UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA INSTITUTO DE QUÍMICA

ROBERTA PEREIRA ESPINHEIRA

POTENCIAL DE LIQUEFAÇÃO DE COQUETÉIS ENZIMÁTICOS DURANTE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM MEIO COM ALTO TEOR DE SÓLIDOS

Rio de Janeiro 2020

ROBERTA PEREIRA ESPINHEIRA

POTENCIAL DE LIQUEFAÇÃO DE COQUETÉIS ENZIMÁTICOS DURANTE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM MEIO COM ALTO TEOR DE SÓLIDOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientadoras: D.Sc. Ayla Sant'Ana da Silva D.Sc. Elba Pinto da Silva Bon

> Rio de Janeiro 2020

Ficha catalográfica



ROBERTA PEREIRA ESPINHEIRA

POTENCIAL DE LIQUEFAÇÃO DE COQUETÉIS ENZIMÁTICOS DURANTE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM MEIO COM ALTO TEOR DE SÓLIDOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Rio de Janeiro, 17 de fevereiro de 2020.

Dra. Ayla Sant'Ana da Silva – INT Orientadora

Prof. Dra. Elba Pinto da Silva Bon – UFRJ Orientadora

Prof. Dr. Fábio César Sousa Nogueira – UFRJ Membro interno

Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho – UnB Membro externo

Dr. Carlos Wanderlei Piler de Carvalho – Embrapa Membro externo

Aos meus pais Selma e José Roberto Espinheira pelo amor incondicional

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Ayla Sant'Ana, pela dedicação e paciência em me orientar. Por ter me proporcionado oportunidades que favoreceram o meu crescimento profissional e pessoal. Pela genialidade e virtuosidade que me inspiram diariamente.

À minha orientadora Dra. Elba Bon, pela oportunidade que foi me dada, pela vasta experiência e sabedoria.

Ao Dr. Ricardo Teixeira, pela dedicação e paciência em ensinar, pelos conselhos, caronas e companhia.

À Dra. Viridiana Ferreira-Leitão, pelos conselhos, orientações e importantes momentos de descontrações.

Ao pessoal do LABIC, por serem as melhores companhias de trabalho do mundo. Agradeço especialmente à minha amiga, de todas as horas e lugares, Mariana Faber, pelas conversas demoradas, conselhos, companhia e carinho. Ao Bruno César, Ingrid Miguez e Álvaro Monteiro, meus irmãos de orientadora, pelos ensinamentos de cada metodologia que foi aplicada nesse trabalho e pelas risadas diárias. Aos meus alunos de iniciação científica Tiago Guimarães e João Lucas, pelo carinho e dedicação. Às minhas amigas Marina Tomasini, Carolina Lázaro, Stella Buback e Raquel Lopes, pela amizade e companheirismo.

Ao pessoal do laboratório Bioetanol, pelos ensinamentos sobre bagaço de cana-deaçúcar e produção de enzimas, especialmente ao Lucas Pereira e Sharon Queiroz.

Ao pessoal do IFRJ Maracanã, especialmente à Dra. Catarina Amorim, pelos ensinamentos sobre reologia.

Ao Dr. Fábio Nogueira e seus alunos, pelos ensinamentos sobre proteômica, especialmente à Yara Martins e ao Luis Felipe Ramos.

À minha parceira de vida Alice Saes, pelo cuidado, compreensão, amor e carinho. Aos meus pais, Selma e José Roberto Espinheira e ao meu irmão João Gabriel Espinheira, pelo amor incondicional. À toda minha família que mesmo de longe torce pelo meu sucesso. Aos meus sogros Sílvia e Homero Saes, pelo cuidado, carinho e amor.

Ao meu amigo Danilo Almeida e à minha amiga Karin Weitzman, pela companhia, risadas e carinho. Aos meus eternos amigos Matheus Neves, Daniel Rosendo, Ian Nunes, Pedro Porto, Catarina Vargas por terem me escutado nas minhas horas de desespero mesmo de tão longe.

Ao CNPq e à FAPERJ pelo financiamento dos meus estudos.

"O conhecimento é um grande tema. A ignorância é ainda maior. E é mais interessante." (STUART FIRESTEIN).

RESUMO

A produção industrial de glicose a partir da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica requer a utilização de meios concentrados, ou seja, com conteúdo de sólidos superior a 15% (m/m), para ser economicamente viável. No entanto, nessas condições, a mistura reacional apresenta alta viscosidade, tornando-se um ambiente adverso para reações enzimáticas. Sendo assim, para que o processo seja viável, nas primeiras horas de hidrólise deve ocorrer uma rápida hidrólise parcial das fibras insolúveis, fenômeno chamado de liquefação. Neste contexto, este estudo objetivou investigar potenciais enzimas/proteínas acessórias responsáveis pela liquefação eficiente do bagaço de cana-de-açúcar durante hidrólise enzimática com 30% sólidos. Inicialmente, buscou-se selecionar coquetéis enzimáticos com potencial de liquefação. O bagaço pré-tratado hidrotermicamente foi hidrolisado utilizando os coquetéis enzimáticos (i) Cellic® CTec2 (CT2); (ii) Celluclast + Novozyme 188 (CEL188); e (iii) um coquetel preparado em laboratório com os sobrenadantes de Trichoderma reesei e Aspergillus awamori (TrAa). Os ensaios de hidrólise foram conduzidos com 30% de sólidos a 50 °C e 200 rpm por 24 h. TrAa promoveu uma maior liquefação do meio de hidrólise quando comparado com CT2 e CEL188. CT2 e TrAa promoveram uma maior liberação de glicose (116 e 115 g/L), enquanto CEL188 liberou 55 g/L. Considerando que a enzima CEL é proveniente de T. reesei, os resultados indicaram que o sobrenadante de A. awamori (Aa) era responsável pela melhoria na liquefação observada com TrAa. Sendo assim, outras duas misturas enzimáticas foram avaliadas: (iv) CT2+Aa e (v) CEL188+Aa. A adição de Aa em CT2 e CEL188 provocou uma diminuição na viscosidade e um aumento nas concentrações de glicose após 24 h de hidrólise, em ambos os ensaios. Devido ao desempenho de Aa, uma segunda etapa focada no estudo de Aa foi iniciada para avaliar a presença de endoglucanases, celulases reportadas como responsáveis pela liquefação. Sendo assim, o sobrenadante foi fracionado utilizando cromatografia de exclusão por tamanho. Foram medidas as atividades enzimáticas de β -glicosidase, CMCase e xilanase e os tubos de fracionamento foram reunidos em quatro frações principais de acordo com as atividades enzimáticas observadas. Em seguida, as quatro frações foram analisadas por espectrometria de massas, para identificação das proteínas. Dentre estas, a fração rica em endoglucanases foi testada para hidrólise enzimática com alto teor de sólidos em mistura com CT2 (CT2F3), em paralelo com CT2 e CT2Aa, para verificar se o mesmo padrão de liquefação iria ser observado com CT2F3 e CT2Aa. Como resultado, CT2F3 e CT2Aa apresentaram o mesmo perfil de liberação de glicose nas primeiras 6 h de hidrólise, indicando que a fração de A. awamori rica em

endoglucanases foi responsável pela melhora da hidrólise enzimática observada em CT2Aa. Os meios de 6 h hidrólise contendo CT2Aa e CT2F3 apresentaram o mesmo perfil de viscosidade e uma pequena diminuição de viscosidade em relação ao meio com CT2. Desse modo, os achados desse estudo contribuem com o entendimento das enzimas envolvidas na liquefação eficiente do bagaço de cana-de-açúcar em meio com alto teor de sólidos, o que pode contribuir com a melhoria da economicidade das biorrefinarias da cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática em alto teor de sólidos, biomassa lignocelulósica, liquefação, celulases, endoglucanases, *Aspergillus awamori*.

ABSTRACT

The industrial production of glucose by the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomasses requires the use of concentrated media, i.e., with solids content above 15% (w/w), to be economically feasible. However, under these conditions, the reaction medium has high viscosity, becoming an adverse environment for enzymatic reactions. Therefore, to increase the feasibility of the process, in the first hours of hydrolysis, a rapid partial hydrolysis of insoluble fibers must occur, a phenomenon called liquefaction. In this context, the aim of this study was to investigate potential enzymes/accessory proteins responsible for the efficient liquefaction of sugarcane bagasse during the enzymatic hydrolysis with 30% solids. Initially, the selection of enzymatic cocktails with liquefaction potential was carried out. The hydrothermally pretreated bagasse was hydrolyzed using three enzymatic cocktails: (i) Cellic® CTec 2 (CT2); (ii) Celluclast 1.5 L + Novozyme 188 (CEL188); and (iii) an lab-made enzymatic cocktail of the supernatants of Trichoderma reesei and Aspergillus awamori (TrAa). The hydrolysis assays were conducted with 30% of solids at 50 °C, 200 rpm for 24 h. TrAa promoted the most pronounced liquefaction effect when compared to CT2 and CEL188. CT2 and TrAa promoted the highest glucose release (116 and 115 g/L respectively), while CEL188 produced 55 g/L. Considering that CEL is a T. reesei enzymatic pool, the results indicated that the supernatant of A. awamori was responsible for the liquefaction effect observed in TrAa. To verify this hypothesis, new enzymatic mixtures were tested: (iv) CT2 + Aa (CT2Aa) and CEL188 + Aa (CEL188Aa). The supplementation of commercial cocktails with the supernatant of A. awamori caused a decrease in the viscosity of the media and an increase in glucose concentration after 24 h of hydrolysis in both enzymatic conditions. Due to the performance of Aa, a study focused on the identification of Aa proteins was initiated to assess the presence of endoglucanases, cellulases reported as responsible for liquefaction. Thus, the supernatant was fractionated using size exclusion chromatography. The enzymatic activities of β -glycosidase, CMCase and xylanase were measured and the fractionation tubes were grouped into four main fractions according to the observed enzymatic activities and further analyzed by mass spectrometry to identify proteins. Among these, the fraction rich in endoglucanases was tested during high solids enzymatic hydrolysis in a mixture with CT2 (CT2F3), in parallel with CT2 and CT2Aa, to verify whether the same liquefaction pattern would be observed in CT2F3 and CT2Aa. As a result, CT2F3 and CT2Aa showed the same glucose releasing profile in the first 6 h of hydrolysis, indicating that fraction rich in endoglucanases was responsible for the improvement of the enzymatic hydrolysis observed

with CT2Aa. The 6 h hydrolysis medium containing CT2Aa and CT2F3 showed the same viscosity profile and a small decrease in viscosity when compared to the medium with CT2. Thus, the findings of this study provide further understanding of the enzymes involved in the efficient liquefaction of sugarcane bagasse in a medium with a high solids content, which can contribute to improving the economics of sugarcane biorefineries.

Keywords: High solids enzymatic hydrolysis, lignocellulosic biomass, liquefaction, cellulases, endoglucanases, *Aspergillus awamori*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura da parede celular vegetal. (A) Modelo da parede celular primária, composta de microfibrilas de celulose delgadas e mais desorganizadas, hemicelulose, pectina e proteínas. Acima da parede celular primária está representada a lamela média e, abaixo, a membrana plasmática, onde se localiza o complexo enzimático celulose-sintase responsável pela síntese da celulose. (B) Modelo da parede celular secundária, formada por microfibrilas de celulose espessas e organizadas, hemicelulose, lignina e proteínas. A parede celular secundária se encontra depositada entre a parede celular primária e a membrana plasmática. Adaptado de (NAKANO et al., 2015)
Figura 2. Representação 3D da estrutura da biomassa lignocelulósica, mostrando as interações entre a celulose, hemicelulose e lignina. As celuloses estão representadas pelas estruturas em forma de fibras organizadas na cor verde, as moléculas da hemicelulose interagindo de forma aleatória com a celulose representada por fibras amarelas e a lignina está representada como aglomerados aderidos à celulose na cor marrom. Adaptado de (PETRIDIS; SMITH, 2018)
Figura 3. Cadeia primária da celulose formada por repetições de celobiose ligadas por ligações do tipo β-1,4 (UMMARTYOTIN; MANUSPIYA, 2015)
Figura 4. Ligações equatoriais entre os resíduos que constituem as diferentes hemiceluloses. As moléculas brancas são representações de glicoses, as roxas de xilose e as verdes de manose. Adaptado de (SCHELLER, H. V., ULVSKOV, 2010)
Figura 5. Monolignois precursores da lignina: o álcool p-cumarílico (I), álcool coniferílico (II) e o álcool sinapílico (III) (Oliveira, 2014)
Figura 6. Representação das estruturas da cana-de-açúcar. (HASSUANI; CELENTE 2016).
Figura 7. Composição do colmo da cana-de-açúcar. Adaptado de (CANILHA et al., 2012). 32
Figura 8. Degradação da cadeia de celulose pela ação sinérgicas das celobioidrolases (CBH), endoglucanases (EGs), β-glicosidades (BGs) e monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs). O ácido ascóbico é um dos doadores de elétrons utilizado nas reações das LPMOs. Adaptado de (ANDLAR et al., 2018)
Quadro 1. Aspectos positivos e aspectos negativos da hidrólise enzimática com baixo e alto teor de sólidos
Figura 9. Ilustração das etapas e metodologias utilizadas nesse estudo
Figura 10. Perfil de (A) sólidos insolúveis totais e (B) concentração de glicose durante

hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com 30% de sólidos por 24 horas utilizando três coquetéis enzimáticos. Linha vermelha: CEL188; linha azul: CT2; linha verde: TrAa. .. 65

Figura 12. Variação do aspecto macroscópico do meio de hidrólise enzimática com 30% de sólidos do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente ao longo de 24 horas de hidrólise utilizando o coquetel preparado em laboratório contendo o sobrenadante enzimático de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus awamori*. (A) 0 h; (B) 3 h; (C) 6 h; (D) 9 h; (E) 24 h...68

Figura 21. (A) Classe enzimática de todas as proteínas identificadas na fração 2 do sobrenadante enzimático de <i>A. awamori</i> e (B) as biomoléculas em que as hidrolases
identificadas são ativas
Figura 22. (A) Classe enzimática de todas as proteínas identificadas na fração 3 do sobrenadante enzimático de <i>A. awamori</i> e (B) as biomoléculas em que as hidrolases identificadas são ativas
Quadro 4. Informações sobre as enzimas envolvidas na hidrólise enzimática da celulose identificadas na fração F3 do sobrenadante enzimático de <i>A. awamori</i>
Figura 23. Perfil da corrida eletroforética em gel desnaturante (SDS-PAGE) (12%) das quatro frações do sobrenadante enzimático de <i>A. awamori</i> recuperadas após fracionamento por cromatografia de exclusão utilizando a resina Sephadex G-75
Figura 24. Efeito da suplementação com a fração de <i>A. awamori</i> rica em endoglucanases (F3) no coquetel comercial CT2 (CT2F3), comparada com o coquetel sem suplementação (CT2) e o coquetel com suplementação do sobrenadante enzimático total de <i>A. awamori</i> (CT2Aa). (A) Perfil de liberação de glicose durante hidrólise enzimática com 30% de sólidos do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente durante 24 h. Linha vermelha: CT2; linha verde: CT2; F3; linha azul: CT2Aa. (B) Viscosidade do meio reacional em 6 h de hidrólise,
com taxa de cisalhamento de 1-26 s ⁻¹ . \diamond : CT2; Δ : CT2F3; \Box : CT2Aa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do meio Breccia (BRECCIA et al., 1995) adaptado do pré-inóculo edo meio de cultivo para produção de enzimas de <i>A. awamori.</i> 49
Tabela 2. Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadohidrotermicamente (190 °C, 12 min) cedico pela Inbicon A/S e utilizado nesse estudo 60
Tabela 3. Atividade enzimática dos coquetéis enzimáticos utilizados na etapa 1 do estudodurante hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com 30% de sólidos. 61
Tabela 4. Proporção utlizada de unidades de filtro de papel (FPU) e unidades de β-glicosidase (BGU) de cada coquetel enzimático
Tabela 5. Proporção utilizada de unidades de filtro de papel (FPU) e unidades de β- glicosidase (BGU) de cada coquetel enzimático70
Tabela 6. Concentração de proteínas e volume total das frações obtidas após fracionamentodo sobrenadante enzimático de A. awamori por cromatografia de exclusão.79
Tabela 7. Atividades enzimáticas de FPase, β-glicosidase e CMCase dos coquetéis enzimáticos utilizados na Parte 2 do estudo durante hidrólise enzimática do bagaço de cana- de-açúcar pré-tratado com 30% de sólidos

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Aa	Sobrenadante enzimático de Aspergillus awamori
188	Enzima comercial Novozyme 188
BG	β-glicosidase
BGU	Unidade de β-glicosidase
СВН	Celobioidrolases
CEL	Enzima comercial Celluclast 1.5 L
CEL188	Coquetel enzimático de Celluclast 1.5 L e Novozymes 188
CEL188Aa	Coquetel enzimático de Celluclast 1.5 L, Novozymes 188 e o sobrenadante
	enzimático de Aspergillus awamori
CID	Dissociação induzida com colisão
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Atividade enzimática de carboximetilcelulase
CMCU	Unidade de carboximetilcelulase
CSR	Controlled shear rate
CT2	Enzima comercial Cellic® CTec2
CT2Aa	Coquetel enzimático de Cellic® CTec2 e o sobrenadante enzimático de
	Aspergillus awamori
DDA	Data dependente acquisition
DNS	Ácido dinitrosalicílico
EG	Endoglucanase
F1	Fração um do sobrenadante enzimático de Aspergillus awamori
F2	Fração dois do sobrenadante enzimático de Aspergillus awamori
F3	Fração três do sobrenadante enzimático de Aspergillus awamori
F4	Fração quatro do sobrenadante enzimático de Aspergillus awamori
FPase	Atividade enzimática de celulases totais
FPU	Unidade de papel de filtro
GH	Glicosil hidrolase
GRAS	Generally recognized as safe
Gt C	Gigatonelada de carbono
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada

LC-MS/MS	Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry
LPMO	Lytic polysaccharide monoxygenase
NREL	National Renewable Energy Laboratory
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pNPG	4-nitrofenol β-D-glicopiranose
PRA	Padrão de recuperação de açúcares
ProÁlcool	Programa Nacional do Álcool
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Tr	Sobrenadante enzimático de Trichoderma reesei
TrAa	Coquetel enzimático do sobrenadante enzimático de Aspergillus awamori e
	Trichoderma reesei
UI	Unidade internacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1	PAREDE CELULAR VEGETAL	24
2.2	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	25
2.2.1	Celulose	26
2.2.2	Hemicelulose	27
2.2.3	Lignina	28
2.2.4	Biomassa da cana-de-açúcar	29
2.3	PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	32
2.3.1	Pré-tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica	33
2.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE	34
2.4.1	Enzimas celulolíticas	35
2.4.1.1	Celobioidrolases (CBH)	35
2.4.1.2	Endoglucanases (EG)	36
2.4.1.3	Enzimas auxiliares	37
2.4.2	β-Glicosidase (BG)	37
2.4.3	Fungos produtores de enzimas celulolíticas e β-glicosidase	38
2.4.4	Hidrólise enzimática com alto teor de sólidos	39
2.4.4.1	Características reológicas do sistema de hidrólise enzimática com alto teor de sólid	os
		40
2.4.4.2 durante	Coquetéis enzimáticos especializados na liquefação da biomassa lignocelulósica e a hidrólise enzimática com alto teor de sólidos	42
3	JUSTIFICATIVA	44
4	OBJETIVOS	45
4.1	OBJETIVO GERAL	45
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
5	MATERIAIS E MÉTODOS	46
5.1 TRAB	FONTE DOS MATERIAIS UTILIZADOS E ETAPAS EXPERIMENTAIS DO ALHO	46
5.2	CARACTERIZAÇÃO OUÍMICA DO BAGACO DE CANA-DE-ACUCAR	
5.3	PRODUCÃO DE ENZIMAS DE ASPERGILLUS AWAMORI	
5.4	ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	
5.4.1	Atividade enzimática de celulases totais (FPase)	49
-	- (-

5.4.2	Atividade enzimática de β-glicosidase	50
5.4.3	Atividade enzimática carboximetilcelulase (CMCase)	51
5.4.4	Determinação de proteínas totais	52
5.5 ASPER	FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS DO SOBRENADANTE ENZIMÁTICO E RGILLUS AWAMORI)Е 52
5.5.1	Atividade enzimática das frações de proteínas	53
5.5.2	Diálise osmótica	54
5.5.3	Liofilização	54
5.6	ANÁLISES POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS E GEL DE ELETROFORESE	54
5.6.1 Asperg	Análises por espectrometria de massas das frações do sobrenadante de <i>illus awamori</i>	55
5.6.1.1	Digestão tripsínica das frações de A. awamori	55
5.6.1.2 das fra	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (<i>LC-MS/MS</i>) ções de <i>A. awamori</i>	55
5.6.2	Gel de eletroforese	56
5.7	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	57
5.7.1	Análise dos sólidos insolúveis em água	58
5.7.2	Análise da glicose produzida	58
5.7.3	Análise da viscosidade	58
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
6.1 TRAT	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ- ADO	60
6.2 COME	POTENCIAL DE LIQUEFAÇÃO DE DOIS COQUETÉIS ENZIMÁTICOS RCIAIS E UM PREPARADO EM LABORATÓRIO	61
6.2.1	Atividades enzimáticas	61
6.2.2	Hidrólise enzimática	62
6.2.3	Análise da viscosidade	65
6.3 SOBRI	SUPLEMENTAÇÃO DOS COQUETÉIS COMERCIAIS COM O ENADANTE ENZIMÁTICO DE <i>A. AWAMORI</i>	69
6.3.1	Hidrólise enzimática	69
6.3.2	Análise da viscosidade	71
6.4 DE <i>A</i> . 2	EFEITO DA FRAÇÃO RICA EM ENDOGLUCANASES DO SOBRENADANTE AWAMORI NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM ALTO TEOR DE SÓLIDOS	73
6.4.1	Fracionamento das proteínas do sobrenadante enzimático de Aspergillus awamo	o ri 74
6.4.1.1	Perfil proteico	75
6.4.1.2	Atividades enzimáticas	76

6.4.2 awamo	Identificação das proteínas das frações do sobrenadante enzimático de A. pri por espectrometria de massas	. 79
6.4.2.1	Proteínas em comum das quatro frações	. 79
6.4.2.2	Análise da fração um do sobrenadante enzimático de Aspergillus awamori	. 82
6.4.2.3	Análise da fração dois do sobrenadante enzimático de Aspergillus awamori	. 84
6.4.2.4	Análise da fração três do sobrenadante enzimático de Aspergillus awamori	. 85
6.4.3	Gel de eletroforese	. 87
6.4.4 <i>awamo</i>	Efeito da suplementação com a fração rica em endoglucanases de <i>Aspergillus</i> <i>ori</i> no perfil da hidrólise enzimática com alto teor de sólidos	. 88
7	CONCLUSÕES	. 92
8	PERSPECTIVAS	. 94
REFE	RÊNCIAS	. 95
APÊN	DICE A	105
APÊN	DICE B	112
APÊN	DICE C	115
APÊN	DICE D	118

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com a safra 2019/20 estimada em cerca de 643 milhões de toneladas (CONAB, 2019). O beneficiamento da cana-de-açúcar é feito através da moagem do colmo, de onde se extrai o caldo que é atualmente utilizado para produção de açúcar e etanol. Após a colheita e a moagem, dois resíduos principais são gerados: a palha e o bagaço. O bagaço representa cerca de 14% da massa seca da cana-deaçúcar (LABAT; GONÇALVES, 2008), o que significa que aproximadamente 90 milhões de toneladas de bagaço seco serão gerados na safra 2019/20. A própria indústria sucroalcooleira aproveita o bagaço gerado, o utilizando para geração de energia através da queima (LOBO et al., 2007). Porém, embora a queima do bagaço represente um aproveitamento de resíduo, a composição química desse material, rico em polímeros (celulose, hemicelulose e lignina), confere um potencial para um aproveitamento mais completo e tecnologicamente eficiente dessa matéria-prima, uma vez que o seu fracionamento permitiria a utilização dos seus polímeros constituintes de maneira mais adequada.

Nesse contexto, é possível desenvolver processos focados na utilização integral das frações da biomassa lignocelulósica para produção de combustíveis e produtos químicos, o que estabelece o conceito de biorrefinaria. Além disso, devido ao fato do bagaço ser um resíduo abundante, a indústria de cana-de-açúcar se encontra em uma posição estratégica para impulsionar a implementação de biorrefinarias no Brasil.

Embora as vantagens da implantação de biorrefinaria tenham sido amplamente proposta pela academia, estas ainda não são uma realidade mundial. Ao contrário, diversas empresas desse ramo acabaram encerrando suas atividades devido à falta de viabilidade técnica e econômica após escalonamento da tecnologia (PAVLENKO, 2018). Nas biorrefinarias, a principal tecnologia utilizada e estudada para conversão de celulose em glicose é a tecnologia enzimática. A hidrólise enzimática com uma alta quantidade de substrato ou com alto teor de sólidos, condição na qual o meio de hidrólise se encontra praticamente sem água livre, (contendo pelo menos 150 g do substrato seco/L do meio) já foi sugerida como sendo um fator essencial para aumentar significativamente a viabilidade econômica do processo (MODENBACH; NOKES, 2013). Ao aumentar a concentração do substrato na hidrólise enzimática, diminui-se o custo de capital com equipamentos, a demanda por água e, consequentemente, ao final do processo é possível obter um produto mais concentrado (HUMBIRD et al., 2010). Diversos estudos já estudaram a conversão de celulose em glicose utilizando 15, 20, 30 e até 40% de sólidos (m/m) (LUDWIG et al., 2014; SILVA et al., 2016;

VIAMAJALA et al., 2009). No entanto, apesar das vantagens apontadas, novos problemas são gerados quando a hidrólise enzimática é conduzida nessas condições. O início da hidrólise é a parte mais crítica, pois a quase inexistência de água livre no meio dificulta a homogeneização, sendo necessário utilizar mais energia para agitação do meio; ainda, há limitação na transferência de massa, inibição enzimática e mudanças nas propriedades reológicas que dificultam o processo. Normalmente, nas primeiras horas da hidrólise enzimática com alto teor de sólidos são observadas mudanças na natureza do material. O meio, que inicialmente se comportava mais como um sólido, passa a se comportar como um líquido capaz de fluir. Essa mudança é chamada de liquefação. A liquefação ocorre devido à quebra, promovida por enzimas específicas, das fibras da celulose e devido à liberação da água que anteriormente estava retida nas fibras. Dessa maneira, a liquefação e as enzimas envolvidas nessa etapa são parâmetros cruciais para uma hidrólise enzimática eficiente e viável em processos com alto teor de sólidos.

Três classes enzimáticas principais são necessárias para a hidrólise enzimática da celulose em glicose: as celobioidrolases, endoglucanases e as β -glicosidades (YANG et al., 2011). As endoglucanases são descritas como as principais responsáveis pela liquefação, pois agem nas partes desorganizadas da celulose (amorfas) e que fazem ligação com a molécula da água. A perda da capacidade de se ligar à água e a quebra da fibra da celulose são processos que culminam na liquefação do meio (SZIJÁRTÓ et al., 2011a).

Devido à importância dessa etapa durante a hidrólise com alto teor de sólidos, a investigação de enzimas eficientes que promovem a liquefação é extremamente importante. Um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa identificou uma mistura enzimática preparada em laboratório, composta por sobrenadantes dos fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus awamori* (TrAa), com uma alta capacidade de solubilização de sólidos nas primeiras seis horas de hidrólise com alto teor de sólidos quando comparada com enzimas comerciais (SILVA et al., 2016). Além disso, os autores hipotetizaram que uma endoglucanase, por ser a classe enzimática envolvida na liquefação, presente no sobrenadante enzimático de *A. awamori* (Aa) seria provavelmente responsável pelo efeito.

Deste modo, nesse estudo foi proposta uma avaliação mais aprofundada do efeito do sobrenadante de Aa na liquefação do bagaço de cana-de-açúcar em meio com alto teor de sólidos. O trabalho foi dividido em três etapas: (1) comparação entre coquetéis enzimáticos comerciais (Cellic® CTec2 e Celluclast+Novozyme 188) e o coquetel enzimático feito em laboratório (TrAa), considerando o potencial sacarificação e liquefação promovidos por esses três coquetéis; (2) avaliação da utilização do sobrenadante de Aa, que compõe o coquetel

enzimático feito em laboratório, como suplemento dos coquetéis enzimáticos comerciais, a fim de observar o efeito de liquefação promovido por este sobrenadante enzimático; e (3) o estudo do fracionamento do sobrenadante de Aa, com o objetivo de separar frações proteicas com diferentes atividades enzimáticas, identificar a fração rica em endoglucanases e, por fim, avaliar se essa fração rica em endoglucanases seria de fato responsável pelo efeito de liquefação promovido pelo sobrenadante Aa.

Sendo assim, para facilitar a exposição dos dados desse estudo, este documento está dividido em seis partes, sendo essas: (1) revisão bibliográfica, com informações gerais acerca dos assuntos tratados nesse trabalho; (2) a justificativa do estudo; (3) os objetivos gerais e específicos; (4) os materiais e as metodologias utilizadas durante o estudo; (5) os resultados alcançados e a discussão dos dados com a literatura; e (5) as conclusões geradas desse trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PAREDE CELULAR VEGETAL

O reino das plantas representa o maior reservatório de carbono entre os reinos, chegando a cerca de 450 gigatoneladas de carbono (Gt C), o que corresponde a mais de 80% das 550 Gt C presentes em todos os organismos vivos do mundo (BAR-ON; PHILLIPS; MILO, 2018)[.] O carbono presente nesses seres está depositado majoritariamente na sua complexa parede celular (VERBANČIČ et al., 2018).

A parede celular vegetal é responsável pela força, expansibilidade, modularidade e proteção do organismo (SOMERVILLE et al., 2004), sendo formada principalmente por microfibrilas de celulose, estruturas compostas por cadeias de celulose dispostas em camadas ortogonais e sintetizadas pelo complexo enzimático celulose-sintase. É usualmente dividida em dois tipos: parede celular primária e parede celular secundária. A parede celular primária está relacionada à célula vegetal em crescimento, com depósitos de celulose, hemicelulose e pectina, conferindo integridade (porém sem impedir o crescimento celular), como também participando da sinalização e da adesão celular (OCHOA-VILLARREAL et al., 2012) (Figura 1). Já a parede celular secundária confere, principalmente, força e rigidez, e é composta principalmente de celulose, lignina e hemicelulose (Figura 1).

Outra estrutura presente na parede celular vegetal são as lamelas médias, que nas células que se encontram em desenvolvimento são formadas principalmente por polissacarídeos pectinados e pequenas quantidades de proteínas (Figura 1). Devido à composição química, as lamelas médias estão relacionadas às adesões entre as estruturas da parede celular. Quando o crescimento celular cessa, e as células vegetais passam a sintetizar a parede celular secundária, o interstício entre a parede celular primária e secundária é chamada de lamela média composta e a lignificação da parede celular secundária se inicia a partir dessa estrutura rica em lignina e polissacarídeos pectinados (WESTERMARK, 1985; ZAMIL; GEITMANN, 2017). Além disso, a composição química da parede celular depende da sua localização no tecido, a fase de desenvolvimento da célula e da espécie do organismo (PAULY; KEEGSTRA, 2010).

Devido à composição química da parede celular, os muitos resíduos agroindustriais derivados de plantas (compostos de parede celular) são comumente conhecidos como biomassa lignocelulósica.



Figura 1. Estrutura da parede celular vegetal. (A) Modelo da parede celular primária, composta de microfibrilas de celulose delgadas e mais desorganizadas, hemicelulose, pectina e proteínas. Acima da parede celular primária está representada a lamela média e, abaixo, a membrana plasmática, onde se localiza o complexo enzimático celulose-sintase responsável pela síntese da celulose. (B) Modelo da parede celular secundária, formada por microfibrilas de celulose espessas e organizadas, hemicelulose, lignina e proteínas. A parede celular secundária se encontra depositada entre a parede celular primária e a membrana plasmática. Adaptado de (NAKANO et al., 2015).

2.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

O termo "Biomassa lignocelulósica" refere-se às biomassas vegetais que são compostas quimicamente por celulose, hemicelulose e lignina. Usualmente o termo é utilizado para se referir-se aos resíduos agroindustriais (ex.: bagaço de cana, palha de milho, palha de trigo) (ISHIZAKI; HASUMI, 2013). O aproveitamento de resíduos agroindustriais é um dos indicadores de desenvolvimento sustentável, por se tratar da utilização de matérias-primas renováveis e residuais para produção de produtos e combustíveis. Sendo assim, a utilização de biomassas é um dos parâmetros a ser seguido como medida para descarbonização da indústria (GERRES et al., 2019).

Há diversas maneiras de utilizar a biomassa lignocelulósica, desde a sua queima integral (produto de baixo valor agregado) até à produção de insumos para indústria cosmética e alimentícia (produtos de alto valor agregado). Esse amplo espectro de aproveitamento é devido à composição química das frações: celulose, hemicelulose, lignina e pectina. Uma representação da estrutura 3D da biomassa lignocelulósica é apresentada na Figura 2, que

mostra esquematicamente as fibrilas de celulose embebidas em um emaranhado formado por hemicelulose e aglomerados de lignina (ISIKGOR; BECER, 2015).

Sendo assim, os próximos parágrafos irão detalhar cada uma das estruturas principais presentes na biomassa lignocelulósica: a celulose, hemicelulose e a lignina.



Figura 2. Representação 3D da estrutura da biomassa lignocelulósica, mostrando as interações entre a celulose, hemicelulose e lignina. As celuloses estão representadas pelas estruturas em forma de fibras organizadas na cor verde, as moléculas da hemicelulose interagindo de forma aleatória com a celulose representada por fibras amarelas e a lignina está representada como aglomerados aderidos à celulose na cor marrom. Adaptado de (PETRIDIS; SMITH, 2018).

2.2.1 Celulose

A celulose é o polímero renovável mais abundante do planeta Terra. É vastamente utilizada nas indústrias têxtil, de papel, de materiais e produtos químicos. Esse polissacarídeo é formado por repetições de celobiose, um dissacarídeo formado por duas moléculas de D-glucopiranose antiparalelas ligadas por ligações do tipo β-1,4 glicosídicas (Figura 3), com grau de polimerização médio de 10.000 unidades de glicose (AZIZI SAMIR; ALLOIN; DUFRESNE, 2005). A celulose presente na parede celular vegetal encontra-se extremamente compactada; as cadeias primárias de celulose, representadas na Figura 3, interagem umas com as outras, formando ligações de hidrogênio entre as cadeias dispostas paralelamente (ligações inter cadeias) que se dão entre as carboxilas livres das moléculas de glicose. Além disso, ocorre também a formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas de glicose adjacentes na mesma cadeia (ligações intra cadeia). O agrupamento de 18-24 cadeias de celulose forma uma estrutura chamada de microfibrila de celulose (PETRIDIS; SMITH, 2018).

Adicionalmente, as microfibrilas se agrupam e formam fibras na parede celular. Devido a essas interações intra e intermoleculares, e pela organização das moléculas, as fibras de celulose são formadas majoritariamente por estruturas cristalinas, com regiões de estruturas amorfas. Existem alguns alomorfos de cristais de celulose reportados, no entanto, a celulose I é a forma mais abundante, estudada e presente naturalmente nas paredes celulares vegetais. A celulose I é formada por dois tipos de cristais, I_{α} e I_{β} , e a proporção destes varia de acordo com a fonte de celulose. Como os cristais de celulose são imperfeitos, uma parte da molécula de celulose se encontra desordenada, formando as regiões com estruturas amorfas, como citado acima. A proporção de cristalinidade da estrutura da celulose (índice de cristalinidade) pode ser quantificada através de diversos métodos, tais como a ressonância magnética nuclear, difração de raios X, a espectroscopia de infravermelho, entre outras (PARK et al., 2010).



Figura 3. Cadeia primária da celulose formada por repetições de celobiose ligadas por ligações do tipo β -1,4 (UMMARTYOTIN; MANUSPIYA, 2015).

2.2.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são polissacarídeos presentes na parede celular vegetal que se diferenciam estruturalmente da celulose e da pectina. Possuem esqueletos formados de resíduos de glicose, xilose ou manose, ligados por uma ligação do tipo β-1,4 (SCHELLER, H. V., ULVSKOV, 2010) (Figura 4). Durante muito tempo, as hemiceluloses foram negligenciadas no âmbito da sua utilização como matéria-prima renovável, pois a maioria dos estudos e processos era focada no aproveitamento e utilização da celulose.

Diferentemente da celulose, existe mais de um tipo de hemicelulose, que se diferenciam pela composição dos monossacarídeos presentes nas cadeias principais e ramificações. Existem as xiloglucanas, as glucuronoxilanas, as (gluco)mananas as galactoglucomananas, as arabinogalactanas, arabinoxilanas, homoxilanas e as glucuronoarabinoxilanas (GÍRIO et al., 2010). A glucoronoarabinoxilana é o tipo de hemicelulose mais abundante na parede celular de gramíneas, como a cana-de-açúcar. É formada por um esqueleto de resíduos de xilose,

ligados por ligações β -1,4, com ramificações em C2 e C3 formadas majoritariamente por resíduos de arabinose e ácido glucurônico, ou seu derivado 4-*O*-metil (PENG et al., 2009). Outra substituição vastamente encontrada em hemiceluloses é a *O*-acetilação. Essa substituição é bastante importante, pois traz impactos em processos nas indústrias de polpa e papel e na indústria de etanol celulósico, interferindo durante o processo do pré-tratamento, sacarificação da biomassa e fermentação. A presença de ácido acético derivado da hidrólise de grupamento acetil pode inibir enzimas celulolíticas e o metabolismo de leveduras no processo de fermentação alcoólica.



Figura 4. Ligações equatoriais entre os resíduos que constituem as diferentes hemiceluloses. As moléculas brancas são representações de glicoses, as roxas de xilose e as verdes de manose. Adaptado de (SCHELLER, H. V., ULVSKOV, 2010).

2.2.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula aromática que se deposita na lamela média e na parede celular secundária e é responsável pela rigidez e pela força mecânica observada nos vegetais. É um biopolímero formado por fenilpropanoides derivados de três monolignois: o álcool *p*-cumarílico (I), o álcool coniferílico (II) e o álcool sinapílico (III) (PANDEY; KIM, 2011) (Figura 5). A partir desses monômeros, são gerados três compostos que compõe a lignina, respectivamente o *p*-hidroxifenil, o guaiacil e o siringil (WONG, 2009). As madeiras

coníferas possuem apenas o álcool coniferílico como precursor da sua lignina, já as folhosas possuem o coniferílico e o sinapílico e a lignina das gramíneas possuem os três álcoois como precursores. Os polímeros da lignina são ligados por ligações do tipo eter (β -O-4) (PONNUSAMY et al., 2019).

O aproveitamento da lignina é negligenciado quando comparado às outras duas frações poliméricas da biomassa lignocelulósica. A maioria das abordagens de aproveitamento dessa fração visa à produção de combustível para gerar calor e energia através da sua combustão (CAO et al., 2018). No entanto, a sua despolimerização possibilitaria a obtenção de compostos com maior valor agregado, como a vanilina (FACHE; BOUTEVIN; CAILLOL, 2016).



Figura 5. Monolignois precursores da lignina: o álcool p-cumarílico (I), álcool coniferílico (II) e o álcool sinapílico (III) (Oliveira, 2014).

2.2.4 Biomassa da cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e, devido à demanda mundial para reduzir a dependência de petróleo e diminuir os problemas climáticos, sua produção anual quase dobrou nas últimas décadas (BORDONAL et al., 2018). Nos últimos cinco anos, a produção brasileira ficou em torno de 600 milhões de toneladas ao ano (CONAB, 2019). O aumento da produção da cana-de-açúcar no Brasil se deu a partir de 1975, com a criação do Programa Nacional do Álcool (ProÁlcool), que visava reduzir a dependência brasileira das importações de petróleo através da produção de etanol proveniente de cana-de-açúcar (BORDONAL et al., 2018). O programa foi muito bem sucedido e os benefícios ambientais foram notados devido à substituição parcial do uso de gasolina no Brasil (MACEDO; SEABRA; SILVA, 2008).

Devido à demanda para produção de etanol, os resíduos da produção e do beneficiamento de cana-de-açúcar são um dos mais abundantes dentre as biomassas

lignocelulósicas advindas de resíduos agroindustriais brasileiros (ARAÚJO; MACHADO; VILARINHO, 2019). Dois resíduos principais são gerados na cadeia de produção de cana-deaçúcar: a palha e o bagaço. A palha, composta por folhas e ponteiro da cana (Figura 6), é gerada majoritariamente durante o processo de colheita (LEAL et al., 2013). Já o bagaço é gerado durante a moagem do colmo (Figura 6) para a extração do caldo da cana, que é utilizado para produção do açúcar e do etanol.

Atualmente, a maioria das indústrias sucroalcoleiras utiliza o bagaço de cana-de-açúcar para cogeração de energia, ou seja, a partir da combustão do bagaço são gerados eficientemente eletricidade (geração de energia) e energia térmica (produção de vapor) (HOFSETZ; SILVA, 2012). O processo é tão bem-sucedido que consegue abastecer completamente as indústrias e a energia excedente é comercializada (ISO). No entanto, como citado anteriormente, o bagaço é rico em celulose, que é uma fonte renovável de glicose, que pode integrar a cadeia de produção de etanol, sem precisar ocupar mais área agrícola, um problema atual da agroindústria. Seria possível aumentar a produção de etanol, pois do mesmo colmo de cana-de-açúcar seria aproveitado não só o caldo, mas o colmo por inteiro (ASSUNCAO; CHIAVARI 2015). Segundo o site da Raízen, única empresa que produz etanol celulósico em escala comercial, a utilização da palha e do bagaço de cana de açúcar aumentou a produtividade do etanol em 50% e foram diminuídos 35% da pegada de carbono quando comparado ao etanol produzido a partir do caldo da cana-de-açúcar (RAÍZEN, 2020). Além disso, o bagaço é uma matéria-prima muito mais barata do que a cana-de-açúcar, sendo estimado um preço de mercado da cana de 60,9 dólares/tonelada e o bagaço de 36,38 dólares/tonelada (BONOMI et al., 2016; HAROLDO JOSÉ TORRES DA SILVA; PEDRO VALENTIM MARQUES, 2017; HUMBIRD et al., 2010). Ademais, embora produzir etanol celulósico aumente a produtividade da cadeia de etanol, a queima acaba sendo mais viável economicamente, principalmente devido à necessidade de tecnologias mais robustas para o processo de aproveitamento da biomassa lignocelulósica. No entanto, para melhorar a competitividade econômica do processo de produção de etanol celulósico com a cogeração de energia, alguns estudos mostram que é possível adicionar valor na cadeia de produção do etanol celulósico, aproveitando as outras frações da biomassa lignocelulósica, outros produtos com maior valor agregado e de grande demanda no mercado, como o 1,3 butanodiol, acetaldeído, ácido acético, etilenoglicol, furfural, ácido lático, polietileno, sorbitol, ácido succínico, xilitol, terpenos, dentre outros (ROSALES-CALDERON; ARANTES, 2019). Esse aproveitamento integral da biomassa é o conceito de biorrefinaria, uma alusão à refinaria do petróleo, que utiliza integralmente todas as moléculas que compõe o petróleo.

A composição do colmo da cana-de-açúcar está ilustrada na Figura 7. O bagaço está representado como a "fibra" e as proporções de celulose, hemicelulose e lignina são aproximadamente de: 25-45% de celulose, 28-32% de hemicelulose e 15-25% de lignina (ISIKGOR; BECER, 2015). A interação entre as três frações do bagaço de cana-de-açúcar promove a recalcitrância da biomassa lignocelulósica, um mecanismo evolutivo natural dos vegetais, que confere proteção a ataques físicos e biológicos (HOLWERDA et al., 2019). No entanto, essa recalcitrância dificulta a utilização das frações, fazendo-se necessário uma etapa anterior (pré-tratamento) ao beneficiamento das frações de interesse.



Figura 6. Representação das estruturas da cana-de-açúcar. (HASSUANI; CELENTE 2016).



Figura 7. Composição do colmo da cana-de-açúcar. Adaptado de (CANILHA et al., 2012).

2.3 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Como dito anteriormente, a biomassa lignocelulósica é resistente a ataques químicos e biológicos, sendo assim, para o aproveitamento das frações, o pré-tratamento é uma etapa necessária para disponibilizar a fração da biomassa lignocelulósica de interesse. No contexto de biorrefinaria, o objetivo do pré-tratamento da biomassa vem mudando nos últimos anos. Como o principal produto estudado advindo de biomassa lignocelulósica era o etanol celulósico, o objetivo principal era disponibilizar a celulose para a subsequente hidrólise

enzimática. Porém, hoje, a biorrefinaria visa aproveitar por completo todas as frações presentes nas biomassas lignocelulósicas, com a produção de diferentes produtos a partir das diferentes frações da biomassa. Dessa maneira, o pré-tratamento irá depender do produto de interesse e da avaliação da melhor maneira de disponibilizar a fração que será utilizada para a produção do produto (GALBE; WALLBERG, 2019). Como nesse trabalho a fração de interesse da biomassa lignocelulósica é a celulose, no próximo parágrafo estão exemplificados alguns pré-tratamentos utilizados para melhorar a digestibilidade enzimática da celulose.

Sendo assim, existem diversos tipos de pré-tratamento, com diferentes objetivos e que podem gerar diferentes produtos. Os pré-tratamentos podem ser químicos, como por exemplo, o pré-tratamento ácido que tem como objetivo diminuir a fração hemicelulósica da biomassa e gera um material rico em celulose e lignina. Físicos, como a utilização de moinho de bolas e de discos, que tem como objetivo reduzir o tamanho de partícula para aumentar a superfície de contato e reduzir a cristalinidade da celulose, e ao final do processo é produzido um material que possui todas as frações da biomassa, no entanto com maior digestibilidade devido às modificações sofridas pela celulose. Ainda, são reportados exemplos de prétratamentos biológicos, como a utilização de fungos produtores de enzimas que degradam a lignina, obtendo ao final do processo um material com uma quantidade de lignina reduzida quando comparado ao material in natura. Por último, há os métodos físico-químicos, como a utilização de explosão a vapor, que une o processo químico da autohidrólise, que será detalhado posteriormente, e um processo físico, obtido da rápida descompressão que gera rupturas na parede celular, e ao final do processo é gerado um material rico em celulose e lignina. O mesmo ocorre no pré-tratamento hidrotérmico, um processo físico-químico que visa à diminuição da fração hemicelulósica da biomassa e que será detalhado na próxima seção desse documento (DA SILVA et al., 2013).

2.3.1 Pré-tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica

O pré-tratamento hidrotérmico tem como objetivo retirar a fração hemicelulósica da fibra do material. É um método que utiliza a água sob pressão e em altas temperaturas (160-240 °C) (DA SILVA et al., 2013; GALBE; WALLBERG, 2019). O pré-tratamento hidrotérmico apresenta vantagens quando comparado a métodos químicos, pois é considerado mais seguro, os equipamentos utilizados sofrem menos corrosão, e é menos nocivo ao meio-ambiente, tendo em vista que seu efluente é menos poluidor devido a não utilização de produtos químicos (ALLEN et al., 2001; LASER et al., 2002).

Durante o processo do pré-tratamento hidrotérmico, a água sofre auto-ionização formando íons de hidrônios e ocorre o processo da autohidrólise, que consiste na formação de ácido acético e alguns outros ácidos orgânicos provenientes das substituições das hemiceluloses (GALIA et al., 2015). Esses compostos catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas da fração mais suscetível a ataques ácidos, a hemicelulose (BRIENZO, 2016). O produto do pré-tratamento hidrotérmico depende do índice de severidade do processo, que relaciona temperatura do processo com o tempo de pré-tratamento. A depender da severidade do processo, pode haver formação de compostos da desidratação dos carboidratos, tais como o furfural e o hidroximetilfurfural, moléculas que podem inibir o processo de fermentação (PEREIRA RAMOS, 2003). A eficiência do pré-tratamento hidrotérmico, que depende da severidade do processo, é determinada a partir de alguns parâmetros como a porcentagem de recuperação da hemicelulose do material e do aumento da digestibilidade enzimática da celulose. Para o pré-tratamento hidrotérmico são reportados resultados satisfatórios para ambos os parâmetros (EWANICK; BURA, 2010).

O resultado do pré-tratamento hidrotérmico é uma fração líquida rica em oligômeros da hemicelulose e uma fração sólida rica em celulose e lignina (EWANICK; BURA, 2010). Sendo assim, se a matéria-prima a ser beneficiada for a celulose, a fração sólida resultante do pré-tratamento que será utilizada para esse processo.

2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE

Como já mencionado, a celulose é uma fonte renovável de glicose, monômero que pode ser utilizado como precursor de diversos produtos químicos. Para obter a glicose a partir da celulose, é necessário realizar um processo de despolimerização desse polissacarídeo. Essa despolimerização pode ocorrer por um método químico através de hidrólise catalisada por um ácido; físico, através de radiação; ou biológico (PONOMAREV; ERSHOV, 2018; SHROTRI; KOBAYASHI; FUKUOKA, 2018). A obtenção pela via biológica, ou seja, através da hidrólise enzimática, é a mais estudada e aplicada. Nesse processo, a celulose é hidrolisada por diferentes enzimas sinergicamente, em um processo que possui diversos passos: (1) transferência das enzimas da fase aquosa para a superfície das partículas da celulose; (2) adsorção das enzimas e a formação do complexo enzima-substrato; (3) hidrólise da celulose; (4) transferência da celodextrina, glicose e celobiose da superfície da celulose para a fase aquosa; e (5) hidrólise das celodextrinas e celobioses em glicose na fase aquosa (WALKER; WILSON, 1991).

O processo da hidrólise é influenciado por diversos parâmetros. Podem estar relacionados ao substrato, como por exemplo, a utilização de diferentes biomassas lignocelulósicas que possuem diferentes composições químicas; além disso, as características da celulose também podem afetar a hidrólise enzimática, pois alguns pré-tratamentos podem diminuir a cristalinidade ou aumentar a porosidade da celulose; a composição do material insolúvel após pré-tratamento também influencia a hidrólise enzimática, tendo em vista que um pré-tratamento ineficiente irá gerar uma hidrólise enzimática com baixos rendimentos; a inibição enzimática por produtos da hemicelulose ou lignina também influenciam a hidrólise da celulose; e também outros parâmetros relacionados às enzimas como a inibição enzimática pela formação de produto, diferentes características de enzimas provenientes de diferentes organismos e também o efeito sinérgico entre as enzimas celulolíticas (KUMAR et al., 2018; YANG et al., 2011).

2.4.1 Enzimas celulolíticas

As enzimas celulolíticas catalisam de forma sinérgica a quebra das ligações do tipo β -1,4 da celulose. Essas enzimas são produzidas por fungos, bactérias, plantas, algas e animais (ZHANG; ZHANG, 2013). Duas classes enzimáticas estão envolvidas diretamente na hidrólise enzimática da celulose: as celobioidrolases (CBH) ou exoglucanases e as endoglucanases (EG). São enzimas formadas por módulos, um modulo catalítico, que está localizado o sítio catalítico onde ocorre as reações enzimáticas e algumas celulases possuem um módulo de ligação à celulose, que não possuem sítios catalíticos, mas sim regiões que possuem afinidade pela celulose. O produto da hidrólise da celulose são os oligômeros da glicose e celobiose, o dímero da glicose (ZHANG; ZHANG, 2013).

2.4.1.1 Celobioidrolases (CBH)

As CBHs ou exoglucanases são enzimas processivas, que possuem o sítio ativo em formato de túnel e catalisam a quebra da celulose em celobiose das extremidades da cadeia de celulose. Existem dois tipos de CBHs descritas, a CBH I, que cliva a celulose a partir da extremidade redutora e a CBH II, que catalisa a quebra da celulose a partir da extremidade não-redutora (TETER; SUTTON; EMME, 2014) (Figura 8).

A reação começa com a adsorção da enzima pela celulose, o primeiro módulo que interage com a celulose é o de ligação à celulose que se liga na superfície da fibra até o

encontro de uma extremidade redutora ou não redutora, a depender do tipo da enzima. A extremidade redutora ou não redutora da molécula da celulose penetra no microporo da CBH até o sítio ativo da enzima, que possui um ácido carboxílico e um carboxilato. As CBHs hidrolisam a celulose a partir de um mecanismo de retenção ou de um mecanismo de inversão, a depender da enzima. No mecanismo de retenção, a ligação glicosídica sofre uma substituição nucleofílica pelo carboxilato e o alcóxido formado é neutralizado pelo ácido carboxílico. Depois, uma molécula de água ativada pelo carboxilato ataca o intermediário éster formado. O equilíbrio entre a acidez do ácido carboxílico e a basicidade dos carboxilatos é crucial para essa via. Quanto ao mecanismo de inversão, uma molécula de água quebra a ligação glicosídica, similarmente ao segundo passo do mecanismo de retenção. (SHROTRI; KOBAYASHI; FUKUOKA, 2017). Outra enzima que participa da hidrólise enzimática da celulose e possui sinergia com as CBHs, são as endoglucanases.

2.4.1.2 Endoglucanases (EG)

As EGs (3.2.1.4) são enzimas responsáveis pela clivagem das ligações β -1,4 internas da celulose (TETER; SUTTON; EMME, 2014) (Figura 8). Diferindo das CBHs, as EGs possuem sítio catalítico aberto em forma tipo fenda, que pode se ligar a qualquer ponto da cadeia da celulose (principalmente na parte amorfa) (JUTURU; WU, 2014; WILSON, 2015). Embora a maioria das EGs sejam classicamente reportadas como sendo não-processivas (WILSON, 2012), alguns estudos já reportaram EGs processivas (WATSON et al., 2009; WU et al., 2018). As EGs como o das CBHs, catalisam a celulose pelos mecanismos de retenção ou inversão. Estão agupadadas pela plataforma CAZy (*carbohydrate active enzyme database* - www.cazy.org) em treze famílias das glicosil hidrolases (GHs), sendo que as que estão agrupadas nas famílias GH6, 8, 9, 45, 48, 74 e 124 catalisam a hidrólise da celulose pelo mecanismo de inversão; e as que estão nas famílias GH5, 7, 12, 44 e 51 pelo mecanismo de retenção (KUMAR; NARAIAN, 2019). O produto da hidrólise das EGs são oligômeros de glicose e, dessa forma, são geradas novas extremidades na cadeia de celulose que servirão como ponto inicial catalítico para as CBHs, gerando assim uma sinergia entre as EGs e as CBHs (TETER; SUTTON; EMME, 2014).

Como o grau de polimerização da celulose é um dos parâmetros que influenciam a viscosidade do meio (BEDFORD; PARTRIDGE, 2010), as EGs foram identificadas como sendo as celulases com o maior poder de liquefação do meio de hidrólise, devido à sua capacidade de diminuir o comprimento da fibra da celulose. Além disso, as endoglucanases ao
hidrolisar as estruturas amorfas (que são hidrofílicas) da celulose, libera água livre que resulta em um meio de hidrólise menos viscoso (BOYCE; WALSH, 2015; OKSANEN et al., 2000).

Além das CBHs e das EGs, outra classe enzimática foi descrita como capaz de degradar a celulose, as oxidorredutases que estão classificadas nos grupos das enzimas auxiliares.

2.4.1.3 Enzimas auxiliares

Antes conhecida como fazendo parte das famílias das hidrolases GH61, e desde 2013 reclassificadas como parte da família das atividades auxiliares (AA) AA9 e AA10, as monooxigenases líticas de polissacarídeo (*lytic polysaccharide monooxygenases* - LPMOs) (EC 1.14.99.56) catalisam a quebra da celulose a partir de uma reação de oxidação (LEVASSEUR et al., 2013) (Figura 8). Diferentemente das EGs e CBHs, as LPMOs não necessitam de um sítio específico de clivagem, essas enzimas conseguem catalisar a oxidação na superfície da celulose cristalina (VAAJE-KOLSTAD et al., 2010). Dessa maneira, as LPMOs conseguem potencializar a hidrólise enzimática da celulose (FROMMHAGEN et al., 2017).

Como os produtos das CBHs, EGs e LPMOs só hidrolisam a celulose a no máximo celobiose, outra classe enzimática é necessária para a hidrólise completa da celulose em glicose, as β -glicosidases.

2.4.2 β -Glicosidase (BG)

As β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (BGs) são exoenzimas que clivam as ligações glicosídicas β -1,4 a partir dos resíduos não-redutores da celobiose, de pequenos oligômeros e de vários glicoconjugados (Figura 8). A reação catalisada pelas BGs começa na primeira etapa chamada glicosilação, na qual ocorre um ataque nucleófilo do glutamato no carbono anomérico (C1) da molécula glicosídica, seguido pela formação de um intermediário da enzima glicosilada. Na segunda etapa ocorre a deglicosilação, na qual uma molécula de água ativada pelo glutamato irá servir como um segundo nucleófilo para assim liberar a glicose do intermediário (BADIEYAN; BEVAN; ZHANG, 2012).

Todas as enzimas acima citadas são produzidas por diversos organismos, como plantas, bactérias, animais, e fungos, sendo estes últimos os que possuem as celulases que são mais estudadas e utilizadas comercialmente.



Figura 8. Degradação da cadeia de celulose pela ação sinérgicas das celobioidrolases (CBH), endoglucanases (EGs), β -glicosidades (BGs) e monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs). O ácido ascóbico é um dos doadores de elétrons utilizado nas reações das LPMOs. Adaptado de (ANDLAR et al., 2018).

2.4.3 Fungos produtores de enzimas celulolíticas e β-glicosidase

As celulases são produzidas por diversos organismos, no entanto, as celulases fúngicas são as mais estudadas e utilizadas industrialmente. Os fungos são considerados decompositores universais na ecologia devido a sua alta capacidade de produzir enzimas. Além disso, o fato dos fungos secretarem diversas enzimas de interesse para aplicações industriais, favorece a sua utilização como organismo de escolha, uma vez que a purificação em escala laboratorial e industrial é facilitada (PANCHAPAKESAN; SHANKAR, 2016).

Os fungos produtores de celulases estão presentes em filos como Ascomycota, Basidiomycota, Deuteromycota, Chytridiomycota, de espécies dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus, Penicillium, Chaetomium, Cladosporium, Humicola, Acremonium, Talaromyces,* dentre outros (WOOD, 1985).

O principal fungo produtor de celulases é o *Trichoderma reesei*. Esse fungo filamentoso possui duas CBHs e ao menos cinco EGs em seu repertório de enzimas (FOWLER; BROWN, 1992; SALOHEIMO et al., 1997, 2002; SRISODSUK et al., 1997). A maioria das

formulações comerciais de celulases é composta por enzimas desse organismo. No entanto, *Trichoderma reesei* não é um fungo bom produtor de BGs, enzima necessária para a completa hidrólise da celulose.

Fungos do gênero *Aspergillus* são produtores de diversas enzimas de aplicação industrial. São fungos facilmente cultiváveis que tem uma alta capacidade de produção de enzimas e alguns possuem o selo "geralmente reconhecido como seguro" (GRAS), que garante que esses fungos não causam nenhum tipo de reação nociva à saúde. Quanto às enzimas celulolíticas, são reportados genes de CBHs, EGs e BGs nos genomas das espécies desse gênero (DE VRIES; VISSER, 2001).

2.4.4 Hidrólise enzimática com alto teor de sólidos

A nível industrial, a hidrólise enzimática para ser economicamente viável precisa ser conduzida com alto conteúdo de substrato (pelo menos 150 g por litro). O uso de alto teor de sólidos beneficia a economicidade do processo de conversão da biomassa lignocelulósica em combustíveis e produtos químicos, diminuindo os custos capitais e operacionais, pois o aumento na concentração do produto final reduz o uso dos equipamentos e o consumo de água, juntamente com a redução nos custos das etapas de separação, na geração de águas residuais e no custo subsequente do descarte. Além disso, este método também diminui a demanda de energia para as etapas de resfriamento e aquecimento (CHENG et al., 2019; HUMBIRD et al., 2010; MODENBACH; NOKES, 2013). Especialmente para processos que objetivam produzir etanol celulósico, a hidrólise enzimática com alto teor de sólidos é de extrema importância, pois foi demonstrado que a viabilidade da etapa de destilação requer um caldo de fermentação com concentrações de etanol acima de 4% (v/v) (ZACCHI; AXELSSON, 1989) e, por extensão, uma concentração aproximada de 80–100 g/L de açúcares fermentáveis no xarope de biomassa. As vantagens e desvantagens de se conduzir a hidrólise enzimática em alto teor de sólidos estão apresentadas no Quadro 1.

No entanto, a hidrólise enzimática com alto teor de sólidos de materiais lignocelulósicos apresenta dificuldades técnicas aparentemente relacionadas à quantidade reduzida de água livre no meio. Sob essa condição, o meio de hidrólise apresenta uma alta viscosidade aparente que resulta em limitações na homogeneização e baixa transferência de massa, reduzindo a eficiência das enzimas durante os estágios iniciais da hidrólise, conhecida como "etapa de liquefação" (JØRGENSEN et al., 2007)). Além disso, também é observada uma diminuição no rendimento final de glicose, um efeito que se intensifica quanto maior é o teor de sólidos

na hidrólise enzimática (KRISTENSEN; FELBY; JØRGENSEN, 2009). Tal fenômeno, denominado na literatura como "efeito do alto teor de sólidos", tem sido atribuído de forma inconclusiva à diversos fatores, como à restrição de água (ROBERTS et al., 2011), à inibição das enzimas celulolíticas pela alta concentração de seus produtos, (HODGE et al., 2008; KRISTENSEN; FELBY; JØRGENSEN, 2009; ROBERTS et al., 2011), pelo aumento da concentração de inibidores produzidos durante a etapa de pré-tratamento (HODGE et al., 2008; KIM, 2018) e pela ligação improdutiva de enzimas para lignina (HAO et al., 2019; LU et al., 2018).

Como dito anteriormente, o meio de hidrólise enzimática com alto teor de sólidos apresenta mudanças reológicas quando comparado à hidrólise com baixo teor de sólidos, sendo assim, as características reológicas do meio de hidrólise enzimática com alto teor de sólidos estão detalhadas na próxima seção.

	Hidrólise enzimática com	Hidrólise enzimática	
	baixo teor de sólidos	com alto teor de sólidos	
Aspectos positivos	Menor uso de enzimas	Maior concentração de açúcares	
	Baixa viscosidade	Melhor uso da energia	
	Altos rendimentos	Viabilidade econômica	
Aspectos negativos	Baixa concentração de açúcares	Quase inexistência de água livre	
	Baixa eficiência no uso da água e de equipamentos	Alta viscosidade	
	Menor viabilidade econômica	Adverso para reações	

Quadro 1. Aspectos positivos e aspectos negativos da hidrólise enzimática com baixo e alto teor de sólidos.

2.4.4.1 Características reológicas do sistema de hidrólise enzimática com alto teor de sólidos

O meio inicial de hidrólise de biomassas lignocelulósicas é classificado como um fluido não-newtoniano com um comportamento de cisalhamento fino ou pseudoplástico (isto é, a viscosidade diminui com um aumento na taxa de cisalhamento). Essa característica é atribuída à organização das fibras na direção do fluxo sob altas taxas de cisalhamento (WIMAN et al., 2011). Além disso, a viscosidade aparente dessas misturas aumenta significativamente com o aumento da carga de sólidos (DASARI; DUNAWAY; BERSON, 2009). Esse comportamento pode ser atribuído à tendência das fibras em criar interjunções quando em suspensão; portanto, ao trabalhar com um alto teor de sólidos insolúveis, o número de junções aumenta por área e uma quantidade maior de força é necessária para romper as junções para o início de um fluxo (WIMAN et al., 2011). Além disso, como a quantidade de água livre é muito

limitada, a lubrificação entre as fibras diminui à medida que o atrito aumenta, adicionando mais dificuldade ao fluxo do meio (KRISTENSEN; FELBY; JØRGENSEN, 2009).

Como o aumento da viscosidade em condições com alto teor de sólidos pode ter um impacto severo no processo de hidrólise, a caracterização reológica do meio de hidrólise pode ser uma técnica valiosa para selecionar melhores parâmetros do processo (CHEN et al., 2019; COFFMAN et al., 2018; STICKEL et al., 2009; WIMAN et al., 2011). A caracterização reológica de materiais pode ser realizada em viscosímetros ou reômetros. Os reômetros podem ser equipados com diferentes geometrias, a depender do material a ser analisado, como placa-placa, cone-placa, dentre outras. No entanto, essa caracterização não é facilmente realizada ao trabalhar com alto teor de sólidos; amostragem representativa pode ser um desafio, juntamente com o carregamento do reômetro, devido à natureza heterogênea da suspensão lignocelulósica, com diferentes comprimentos de fibra e tamanhos de partícula (STICKEL et al., 2009; WIMAN et al., 2011). A escolha da geometria do reômetro também tem impacto nos dados obtidos, pois o meio de hidrólise está sujeito a deslizamento nas paredes e fraturas, entre outros problemas, o que dificulta a medição precisa dos parâmetros reológicos (NGUYEN; ANNE-ARCHARD; FILLAUDEAU, 2015). Nesse contexto, as palhetas ou "vane" e a placa-placa são as geometrias mais adequadas para o estudo de materiais lignocelulósicos (STICKEL et al., 2009; WIMAN et al., 2011). Mais recentemente, a medição on-line de propriedades reológicas foi estudada com impulsores conectados a um medidor de torque, resultando em medições mais representativas, pois não é necessária amostragem (HOU et al., 2016). Somente a viscosidade e a tensão de escoamento podem ser determinadas nesses sistemas, mas como esses são os principais parâmetros atualmente determinados para suspensões lignocelulósicas, isso não deve ser visto como uma limitação da técnica on-line.

O comportamento reológico do meio de hidrólise é, portanto, uma característica importante a ser avaliada para o processamento da biomassa lignocelulósica com alto teor de sólidos, pois pode ser usada para desenvolver processos, projetar reatores e impelidores e avaliar a energia necessária para a agitação. Além disso, pode orientar a escolha de biomassa e pré-tratamento para produzir meios de hidrólise com características reológicas mais adequadas.

Durante a hidrólise enzimática com alto teor de sólidos, as enzimas modificam diferentemente a fibra da celulose provocando mudanças reológicas no meio. Dessa maneira, o comportamento reológico do meio de hidrólise é afetado pela utilização de diferentes coquetéis enzimáticos.

2.4.4.2 Coquetéis enzimáticos especializados na liquefação da biomassa lignocelulósica durante a hidrólise enzimática com alto teor de sólidos

Várias estratégias já foram relatadas visando melhorar a eficiência das enzimas em condições de alto teor de sólidos e diminuir os efeitos de inibição. Essas investigações concentraram-se no uso de carga enzimática adequada e novas formulações enzimáticas com atividades complementares (lacases, hemicelulases, pectinases e LPMOs), além da engenharia de proteínas com o objetivo de melhorar a tolerância a inibidores. Adicionalmente, a adição de proteínas não catalíticas e aditivos químicos também foram estudados como estratégias para melhorar a eficiência da hidrólise enzimática em alto teor de sólidos.

No entanto, uma das principais preocupações com relação à hidrólise enzimática com alto teor de sólidos é obter rapidamente a liquefação da biomassa para melhorar a disponibilidade de água e reduzir as limitações de transferência de massa, o que consequentemente melhora a cinética da hidrólise (COFFMAN et al., 2018). A atividade de endoglucanase tem um papel especial na liquefação da biomassa, pois muitos estudos comprovaram a correlação da diminuição da viscosidade com o uso de altas cargas de endoglucanases (COFFMAN et al., 2018; SZIJÁRTÓ et al., 2011a, 2011b). Além disso, outros trabalhos demonstraram o efeito de "inchaço" na celulose promovido por endoglucanases (JOSEFSSON; HENRIKSSON; WÅGBERG, 2008) e nos materiais lignocelulósicos (PÄÄKKO et al., 2007). Josefsson e colaboradores (JOSEFSSON; HENRIKSSON; WÅGBERG, 2008) relataram que uma endoglucanase purificada (Cel 17B) de T. reesei promoveu o enfraquecimento e "inchaço" de um filme de celulose, o que provavelmente ocorreu devido à redução das forças de restrição das ligações da celulose, enquanto Pääkko e coautores (PÄÄKKO et al., 2007) concluíram que a adição de endoglucanases à polpa de celulose de coníferas promoveu a delaminação da parede celular e melhorou a hidrólise enzimática da celulose.

Assim, a inibição das endoglucanases resulta em redução da liquefação da biomassa, o que afeta a produção de açúcares e impõe uma limitação significativa à conversão da biomassa em alto teor de sólidos. Considerando os resultados descritos por Silva e colaboradores (SILVA et al., 2016), de que a mistura preparada em laboratório de *Trichoderma reesei* Rut C-30 e *Aspergillus awamori* promoveu uma solubilização de sólidos superior às enzimas comerciais em 6 horas de hidrólise, este coquetel enzimático pode conter endoglucanases com maior tolerância à inibição do açúcar e/ou maior penetração e ação nas

fibras internas de celulose e/ou presença de enzimas acessórias que agem sinergicamente para uma melhor liquefação da biomassa. Nesse sentido, é crucial enfatizar a importância de prospectar e identificar as enzimas envolvidas nesse rápido efeito de liquefação para melhorar o desempenho das enzimas usadas atualmente na hidrólise com alto teor de sólidos.

3 JUSTIFICATIVA

A transição de uma economia baseada no petróleo para uma economia mais verde se tornou uma das ações para conter as mudanças climáticas. Nesse contexto, a produção de combustíveis e produtos químicos a partir da biomassa lignocelulósica vem ganhando destaque, por ser um material abundante e renovável, sendo a matéria-prima principal para o desenvolvimento das biorrefinarias. Nas biorrefinarias, a principal tecnologia utilizada para conversão da celulose é a hidrólise enzimática. A nível industrial, a hidrólise enzimática para ser economicamente viável precisa ser conduzida com um alto teor de substrato, para dessa maneira, aumentar a concentração dos açúcares nos xaropes resultantes. No entanto, algumas limitações surgem no processo com alto teor de sólidos, já que efeitos inibitórios, restrição de água livre e o aumento na viscosidade do meio tornam o processo tecnicamente inviável industrialmente.

Dessa maneira, a liquefação se torna uma etapa crucial da hidrólise enzimática com alto teor de sólidos, pois é nesta fase que haverá liberação de água livre das fibras da celulose para o meio, a quebra e enfraquecimento das ligações da celulose, que irá culminar na diminuição da viscosidade do meio. A liquefação enzimática é promovida por enzimas, particularmente pela classe das endoglucanases, que vem sendo reportada como sendo a principal classe enzimática responsável pela liquefação. Sendo assim, para aumentar a viabilidade técnica do processo, faz-se necessário o estudo de novas enzimas e coquetéis enzimáticos capazes de liquefazer o meio de hidrólise enzimática com alto teor de sólidos de forma eficiente.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar potenciais enzimas ou proteínas acessórias responsáveis por atuar na liquefação eficiente do bagaço de cana-de-açúcar durante hidrólise enzimática em meio com alto teor de sólidos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir o coquetel enzimático com maior poder de liquefação em meio com 30% de sólidos;
- Determinar o comportamento de fluxo do meio de hidrólise enzimática com alto teor de sólidos;
- Analisar as mudanças de viscosidade durante hidrólise enzimática utilizando diferentes coquetéis enzimáticos;
- Fracionar as proteínas do sobrenadante de *A. awamori* através de cromatografia por exclusão de tamanho e separá-las conforme suas atividades hidrolíticas;
- Identificar as proteínas presentes nas frações proteicas de *A. awamori* envolvidas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por espectrometria de massas;
- Analisar a possível ação de liquefação da fração semi-purificada selecionada na hidrólise com alto teor de sólidos de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 FONTE DOS MATERIAIS UTILIZADOS E ETAPAS EXPERIMENTAIS DO TRABALHO

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente (190 °C, 12 min) foi gentilmente cedido pela empresa Inbicon A/S (Dinamarca). O sobrenadante enzimático liofilizado de *Trichoderma reesei* Rut C-30 rico em atividade enzimática de celulases totais e o sobrenadante enzimático de *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1, produtor de β -glicosidase utilizado na primeira etapa do estudo foi cedido pelo Laboratório Bioetanol (Instituto de Química/ UFRJ), assim como a solução de esporos do fungo *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1 utilizado para produção de enzimas da segunda etapa do estudo. Na primeira etapa do estudo foi utilizado o coquetel enzimático comercial Cellic® CTec 2 cedido gentilmente pela Novozymes (Bagæverd, CPH, Dinamarca), um coquetel completo com atividade de celulases totais e β -glicosidase, e na segunda etapa do estudo foi utilizado o coquetel Cellic® CTec 2 adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), e as enzimas comerciais Celluclast 1.5 L e Novozymes 188, ricas em atividade de celulases totais e em atividade de β -glicosidase respectivamente, foram cedidas pela empresa Novozymes (Bagæverd, CPH, Dinamarca).

A Figura 9 apresenta a sequência de experimentos realizados nesse trabalho. Na primeira etapa, foram realizadas hidrólises enzimáticas em alto teor de sólidos utilizando três coquetéis enzimáticos, dois comerciais e um preparado em laboratório. Além disso, foi avaliada a suplementação dos coquetéis comerciais com o sobrenadante enzimático de *Aspergillus awamori*. Foram analisados os sólidos insolúveis em água, a produção de glicose e a viscosidade do meio. Na segunda etapa, foi produzido o sobrenadante enzimático de *A. awamori*, que foi fracionado por cromatografia de exclusão por tamanho e as frações foram analisada por espectrometria de massas e gel de eletroforese. O coquetel enzimático comercial foi suplementado com a fração selecionada da cromatografia de exclusão para a hidrólise enzimática com alto teor de sólidos, visando comparar a produção de glicose e alteração da viscosidade com o coquetel enzimático comercial sem suplementação e suplementação com o sobrenadante total de *A. awamori*.



Figura 9. Ilustração das etapas e metodologias utilizadas nesse estudo.

5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

A metodologia para a caracterização química do bagaço pré-tratado foi realizada de acordo com o procedimento descrito pelo NREL (*National Renewable Energy Laboratory*) (SLUITER et al., 2005, 2012). Nesta etapa, foram determinados os seguintes componentes: cinzas, carboidratos estruturais, lignina insolúvel em ácido.

Amostras do bagaço foram adicionadas em cadinhos de porcelana, para determinação de seu peso seco. Os cadinhos contendo o bagaço foram colocados na mufla a 575 °C por 24

horas para sua calcinação. Após isso, foram resfriados em dessecador e a massa de cinzas foi determinada pela diferença entre a massa final e a massa inicial dos cadinhos, em peso seco.

Antes de iniciar o procedimento, foi preparada uma solução padrão de recuperação de açúcares (PRA), a fim de determinar o efeito do ácido ao longo do procedimento em autoclave, sobre soluções de açúcar de concentrações previamente conhecidas, fazendo uma estimativa do teor de açúcares que deveria ser recuperado na amostra, para que se pudesse fazer um fator de correção nos cálculos procedentes. Para o preparo do PRA, foram pesados 0,15 g de glicose, 0,10 g de xilose, 0,05 g de galactose e 0,05 g de arabinose em balão volumétrico de 50 mL e adicionou-se água destilada.

Amostras de aproximadamente 0,3 g do bagaço com umidade inferior a 10% foram pesadas e colocadas em tubos de hidrólise. Foram adicionados 3 mL de H₂SO₄ 72% às amostras nos tubos de hidrólise e foram incubados e homogeneizados durante uma hora a 30 °C. Após esse período, foram adicionados 84 mL de água ultrapura, diluindo a concentração do ácido para 4%. Simultaneamente, foram preparados tubos de hidrólise com PRA em triplicata. Em cada um deles foram adicionados 10 mL de PRA juntamente a 348 µL de H₂SO₄ 72%, para que a concentração do ácido fosse igual a das amostras. Os tubos foram autoclavados a pressão de 1 bar (121°C) por uma hora. Após esse período, os tubos foram resfriados e, com o auxílio de uma bomba de vácuo, as amostras foram filtradas em cadinhos de Gooch, com peso seco previamente determinado. A fração sólida foi lavada com água destilada até que a água de lavagem apresentasse aproximadamente pH 6,5 para, posteriormente, ser determinado o teor de lignina e cinzas insolúveis em ácido. A fração líquida resultante da primeira filtração foi neutralizada com CaCO₃ até atingir pH entre 5 e 6. Em seguida foi filtrada em filtro Millex de 0,45 µm e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para a determinação da concentração dos açúcares.

Os cadinhos de Gooch com o material insolúvel obtidos na filtração da hidrólise ácida foram colocados na estufa a 105 °C e, posteriormente, resfriados em dessecador por 15 min e pesados. Depois, foram colocados na mufla a 575 °C para calcinação por 24 horas, resfriados em dessecador e pesados. O teor de cinzas insolúveis em ácido foi determinado pela diferença de massa entre o cadinho pós estufa e pós mufla. O teor de lignina insolúvel em ácido foi determinado pela diferença gravimétrica.

5.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE ASPERGILLUS AWAMORI

O fungo filamentoso *Aspergillus awamori* cepa 2B.361 U2/1 foi cultivado com o objetivo de fracionar esse sobrenadante enzimático, identificar as proteínas presentes nas frações proteicas, principalmente endoglucanases, que possivelmente estão envolvidas na liquefação da biomassa lignocelulósica. O fungo foi cultivado de acordo com (SILVA et al., 2016) em erlenmeyers de 1 L com 300 mL de meio de cultivo com composição apresentada no Tabela 1. Um pré-inóculo foi preparado em um erlenmeyer de 1 L e 300 mL de meio com a mesma composição do meio de cultivo, foi utilizado uma suspensão de esporos com aproximadamente 10⁶ de células, preservados em glicerol 20%. O pré-inóculo foi cultivado por dois dias a 30 °C e 200 rpm antes de ser utilizado como inóculo para produção de enzimas. Depois de sete dias de cultivo, a cultura foi filtrada utilizando filtro de vidro e o sobrenadante resultante foi concentrado seis vezes por ultrafiltração em módulos de membranas de polietersulfona de 1 m² de área nas seguintes condições: corte da membrana 30 kDa; pressão 0,5 bar a temperatura ambiente 25 °C.

Tabela 1. Composição do meio Breccia (BRECCIA et al., 1995) adaptado do pré-inóculo e do meio de cultivo para produção de enzimas de *A. awamori*.

Reagente	Concentração (g/L)
NaNO ₃	1,2
KH_2PO_4	3
K ₂ HPO ₄	6
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,002
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,016
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,005
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0014
Extrato de levedura	12
Farelo de trigo	30

5.4 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Com o objetivo de padronizar a dosagem de atividade enzimática utilizada na hidrólise enzimática de cada coquetel, as enzimas comerciais e as preparadas em laboratório foram submetidas a ensaios de atividade enzimática.

5.4.1 Atividade enzimática de celulases totais (FPase)

O procedimento seguiu a metodologia descrita pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) adaptada por Adney e Baker (ADNEY; BAKER, 1996) de maneira

a determinar a atividade da celulase em FPU (filter paper unit) sobre o papel de filtro. A quantificação dos açúcares liberados foi determinada com auxílio do método do ácido dinitrosalicílico (DNS) Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA) descrito por Miller (MILLER, 1959) e adaptado conforme Teixeira e colaboradores (TEIXEIRA et al., 2012).

Primeiramente, foi preparada uma curva padrão de glicose. Para isso, foram preparadas diluições de 1:1,5; 1:2; 1:3 e 1:5 a partir de uma solução de glicose padrão com concentração de 10 mg/mL de água destilada. Adicionou-se 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8 em um tubo de ensaio e, aproximadamente 5 minutos depois, adicionou-se 0,5 mL da diluição. Para a determinação enzimática, o substrato utilizado foi uma tira de papel de filtro de 50 mg Whatman N°1 (1,0 x 6,0 cm). As tiras foram enroladas nos tubos de ensaio. As análises foram realizadas em triplicata. As diluições da amostra e as da curva padrão foram então incubadas em banho a 50 °C por 1 hora. Em seguida, adicionou-se 3,0 mL de reagente DNS e transferiram-se todos os tubos para o banho-maria a 100 °C por 5 minutos. Após esse período, os tubos foram resfriados em banho de gelo. Por fim, diluiu-se 0,2 mL do conteúdo de cada tubo em 2,5 mL de água destilada e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de açúcares redutores equivalentes à glicose foi determinada através da curva padrão, cujas concentrações de glicose eram previamente conhecidas.

Para a atividade de FPase, uma unidade de enzima (FPU) equivale a formação de um µmol de açúcar redutor liberado em solução por minuto. Este ensaio é baseado em um grau de conversão fixo, isto é, 2,0 mg de açúcar redutor liberado a partir do papel de filtro em 60 minutos de reação. A atividade foi calculada seguindo a Equação 1 a seguir:

 $FPU = \frac{2,0}{(0,18016 \times 0.5 \times 60) \times [enzima diluída]} unidades/mL$ (Equação 1)

5.4.2 Atividade enzimática de β-glicosidase

As dosagens da atividade enzimática de β -glicosidase foram realizadas conforme metodologia descrita pela IUPAC por Ghose (GHOSE, 1987), com adaptações descritas a seguir, utilizando como subtrato uma solução de celobiose 15 mmol/L e expressa em unidades de β -glicosidase (BGU). Primeiramente, preparou-se uma solução de celobiose 5 mg/mL em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8. Em seguida, foram adicionados em tubos de ensaio 0,5 mL da enzima diluída e 0,5 mL da solução de celobiose, sendo que as diluições da enzima

só foram adicionadas após 5 minutos em banho maria, com o objetivo de começar a reação na temperatura ideal. . Para o preparo do branco da reação, adicionou-se num tubo de ensaio 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8 e 0,5 mL de celobiose. No preparo do branco da enzima, foram adicionados 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8 e 0,5 mL da solução enzimática. Todos os tubos foram mantidos em banho-maria a 50 °C durante 30 minutos. Logo após, a reação foi parada colocando-se os tubos em banho-maria a 100 °C por 5 minutos. As amostras foram resfriadas em banho de gelo e, em seguida, analisadas no analisador bioquímico YSI 2700 SELECT para a quantificação da concentração de glicose. Uma unidade de atividade (UI) corresponde à liberação de um µmol de produto por minuto. Os ensaios para determinação da atividade enzimática foram realizados em triplicata e os resultados obtidos segundo a Equação 2 a seguir:

 $\frac{IU}{mL} = \frac{\text{Diluição x Fator de correção x Volume total do ensaio (mL)}}{\text{Tempo (min) x Volume da enzima (mL)}}$ (Equação 2) Obs. : Fator de converção = 5,55(µmol/mL)

5.4.3 Atividade enzimática carboximetilcelulase (CMCase)

A metodologia foi realizada baseada na metodologia descrita pela IUPAC (GHOSE, 1987) e a quantificação dos açúcares liberados foi determinada com auxílio do método DNS descrito por Miller (MILLER, 1959) e adaptado conforme Teixeira e colaboradores (TEIXEIRA et al., 2012).

Primeiramente, uma solução estoque de glicose de 2 mg/mL foi preparada e diluída em tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8 para concentrações de 2, 1,33, 1 e 0,5 mg/mL. Foi adicionado 0,5 mL de cada diluição em 1 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 em duplicatas. Concomitantemente, foi preparada uma solução de 2% de carboximetilcelulose (CMC) Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA), a ser utilizado como substrato para o ensaio enzimático. Para preparo da solução de CMC, o volume de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 a ser utilizado para solução foi medido com o auxílio de uma proveta graduada, metade desse volume foi transferido para um erlenmeyer e a massa de CMC pesada foi lentamente sendo adicionada ao erlenmeyer com o auxílio de uma espátula. Esse procedimento foi realizado com o erlenmeyer sendo agitado e aquecido em banho a 50 °C. A outra metade do volume do tampão foi utilizada para lavar a espátula e o béquer da pesagem do CMC. Os preparados enzimáticos foram diluídos e foram adicionados a tubos de ensaio contendo 1 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8, 0,5 mL da solução de CMC e 0,5

mL de cada diluição das enzimas. Foi preparado o branco de cada diluição, com 1,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e 0,5 mL de cada diluição. Também foram preparados o branco da reação total com 2 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e o branco do substrato com 1,5 mL de tampão de 0,5 mL da solução de CMC. Todas as reações e a curva padrão foram incubadas em banho a 50 °C por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 3 mL de DNS e as reações foram levadas a banho a 100 °C por 5 minutos. As reações foram resfriadas em banho de gelo e 0,4 mL de cada reação foram diluídos em 2 mL de água destilada. As reações foram analisadas em espectrofotômetro a 540 nm de comprimento de onda.

Os ensaios foram realizados em triplicatas e o resultado da atividade foi calculado de acordo com a equação a seguir:

 $CMCase = \frac{0.5}{(0.18016 x 0.5 x 30)x(enzima diluída)}$ unidades (UI)/mL (Equação 3)

5.4.4 Determinação de proteínas totais

As concentrações de proteínas totais das amostras foram determinadas utilizando o kit do método do ácido bicinchonínico da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA).

Primeiramente foi feito o reagente de trabalho, que se resume na mistura do reagente A (solução do ácido bicinchonínico) com o reagente B (sulfato de cobre pentahidratado 4%) em uma proporção de 1:0,02. Após o preparo do reagente de trabalho, foi preparada uma curva padrão com albumina de soro bovino como proteína de referência. A concentração linear variou entre 200-1.000 µg/mL de proteína. As amostras com a concentração de proteínas desconhecidas também foram analisadas e diluídas quando necessário. Foram adicionados em tubos de ensaio 0,1 mL dos pontos da curva e 0,1 mL das amostras em 2 mL do reagente de trabalho. Os tubos foram agitados e incubados a 60 °C por 15 minutos. Após esse período, os tubos foram resfriaram até temperatura ambiente e as reações foram analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 562 nm.

5.5 FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS DO SOBRENADANTE ENZIMÁTICO DE ASPERGILLUS AWAMORI

O sobrenadante enzimático de A. awamori foi eluido uma coluna de exclusão por tamanho, com o objetivo de se obter frações proteicas, incluindo frações ricas em endoglucanases, para posteriormente serem testadas durante a hidrólise enzimática. A coluna com altura de 65 cm e diâmetro de 3 cm foi preenchida, de acordo com TEIXEIRA, 2010, com a resina Sephadex G-75 e tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0, contendo cloreto de sódio 0,15 M. De acordo com o fabricante, GE Healthcare (Chicago, Illinois EUA), a resina Sephadex G-75 fraciona proteínas com a massa molecular de 3 a 80 kDa.

A resina foi hidratada a temperatura ambiente com tampão fosfato 10 mM pH 6,8 e deixada um dia decantando em um kitassato. Após a hidratação a resina foi desaerada sob vácuo, empacotada na coluna sob um fluxo de aproximadamente 60 mL/h e equilibrada no fluxo de 20 mL/h com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 com o auxílio de uma bomba peristáltica (P-1, GE Healthcare, Chicago Illinois EUA). Com a resina empacotada e equilibrada foi feita a aplicação do sobrenadante de *A. awamori*.

Primeiramente foi retirado o tampão que fica acima da resina, sem desidratar completamente o topo da resina. Em seguida 5 mL da amostra foi aplicada cuidadosamente e uniformemente sobre a resina com auxílio de uma pipeta automática. Quando a amostra permeou a resina por completo sob o fluxo de 20 mL/h, foram adicionados 5 mL de tampão para cobrir a resina. Noventa e cinco frações de 4 mL foram coletadas automaticamente, em um coletor de frações do tipo AKTA (GE Healthcare, Chicago, Illinois EUA). A eluição das proteínas foi acompanhada a 280 nm em espectrofotômetro.

5.5.1 Atividade enzimática das frações de proteínas

As frações que continham proteínas foram intercaladamente, de uma em uma, submetidas a testes enzimáticos miniaturizados para estimar a atividade de endoglucanases, β -glicosidase e xilanase, utilizando como substratos carboximetilcelulose (CMC) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) (1%), 4-nitrofenol β -D-glicopiranose (pNPG) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA), 0,01M e beechwood xilana (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) (1%), respectivamente. 100 µL de CMC foram misturados com 50 µL das frações coletadas, incubados por 30 minutos a 50°C, foi adicionado 300 µL de DNS e fervido por 10 minutos. As amostras então foram lidas no espectrofotômetro a 540 nm. Para o substrato pNPG foram utilizados 100 µL da fração com 50 µL de pNPG e 350 µL de água destilada, os tubos foram incubados por 10 minutos a 50° C e a reação foi parada adicionando 1 mL de carbonato de sódio (1M). As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 410 nm. A atividade enzimática utilizando xilana como substrato foi realizada utilizando o mesmo procedimento do substrato CMC.

Após a separação das 95 frações provenientes da cromatografia de exclusão e a análise qualitativa da atividade enzimática presente em cada uma, as frações foram agrupadas conforme os picos de atividade enzimática observados. Dessa maneira, a corrida cromatográfica foi dividida em quatro frações principais, formadas pelas 95 frações iniciais.

5.5.2 Diálise osmótica

Devido à alta concentração de sal das quatro frações de *A. awamori*, proveniente da cromatografia de exclusão, as quatro amostras foram submetidas a um processo de diálise osmótica para prepará-las para a análise de eletroforese e espectrometria de massas e hidrólise enzimática.

As membranas de diálise de celulose da Sigma-Aldrich (D-5692) foram hidratadas e lavadas por 2 h em água corrente e posteriormente água destilada. As membranas foram deixadas *overnight* na câmara fria em uma solução de 2% de NaHCO₃ + 1 mM de EDTA. No dia seguinte, as membranas foram colocadas em um banho de aquecimento a 60° C por 2 h e, após as 2 h, lavadas com água destilada. As membranas foram então presas com duas presilhas e preenchidas com 10 mL das quatro amostras provenientes da cromatografia e colocadas em um béquer, presas por um cordão e fita crepe. O béquer foi preenchido com 3 L de água destilada e colocado na câmara fria sob agitação por 4 horas. A água saturada foi trocada cinco vezes durante 4 h de diálise.

5.5.3 Liofilização

Após serem dialisadas, as quatro amostras foram congeladas em freezer -20 por 48 h e liofilizadas, utilizando o equipamento Christ Delta 2-24 LSC plus, com um vácuo equivalente à pressão de 1,8 mbar, com o propósito de ao ressuspender em fase aquosa, obter frações com a concentração de proteínas mais elevada. As amostras liofilizadas foram então utilizadas para análises em espectrômetro de massas e para hidrólise enzimática.

5.6 ANÁLISES POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS E GEL DE ELETROFORESE

Visando identificar as proteínas presentes nas frações que foram separadas por cromatografia de exclusão, as quatro amostras foram submetidas a análises utilizando espectrometria de massas.

5.6.1 Análises por espectrometria de massas das frações do sobrenadante de Aspergillus awamori

5.6.1.1 Digestão tripsínica das frações de A. awamori

As quatro amostras liofilizadas foram ressuspensas em 100 µL uréia/tioureia 7M/2M respectivamente, visando estabelecer um ambiente desnaturante para as proteínas. Em seguida, a concentração de proteína foi determinada utilizando o Qubit 2.0® Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Amostras de 80 µg de cada fração foram aliquotadas e o protocolo de digestão foi realizado segundo NOGUEIRA et al. (2012), com algumas modificações, utilizando 10 mM DTT a 30 °C por uma hora para a reação de redução, 40 mM de iodoacetamida por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente para a reação de alquilação, e a enzima tripsina Promega (Madison, WI, USA) na proporção de 1:50 (m/m) para a digestão, por 18 h a 35 °C. Após a digestão, o ácido fórmico foi adicionado a uma concentração final de 1% e os peptídeos trípticos foram limpos por cromatografia utilizando microcolunas de fase reversa Poros 20 R2 (PerSeptive Biosystems, Framingham, EUA), como descrito em detalhe anteriormente (LARSEN et al., 2002), os peptídeos foram ressuspensos em solução 0,1 % de ácido fórmico e dosados utilizando Qubit 2.0®.

5.6.1.2 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (*LC-MS/MS*) das frações de *A. awamori*

Os peptídeos foram analisados em um sistema EASY II-nanoLC ThermoScientific (Waltham, MA, EUA) acoplado ao espectrômetro LTQ Orbitrap Velos. A eluição dos peptídeos ocorreu através de gradiente do solvente (ácido fórmico 0,1%, acetonitrila 95%) de 5-35% por 45 minutos, 35-95% por 10 minutos e 95% por 5 minutos, em um fluxo de 250 nl/min. O tempo total de análise foi de 60 minutos. Os espectros MS1 foram adquiridos em modo positivo, e os espectros MS/MS por *data dependent acquisition* (DDA). Cada evento de *full scan* compreende um intervalo de 350-1800 m/z, resolução de 60.000 FWHM (para m/z 400). Para obtenção dos MS2, os dez íons mais intensos foram selecionados e fragmentados usando dissociação induzida por colisão (CID) com energia de colisão normalizada de 35, intensidade mínima de 1x104, janela de isolamento de m/z 2 e lista de exclusão dinâmica de 60 s. Os cromatogramas e espectros foram visualizados pelo software Xcalibur v.2.1 As

pesquisas de bancos de dados foram realizadas usando o Proteome Discoverer 2.1 ThermoScientific (Waltham, MA, EUA) contra o banco de dados de *Aspergillus awamori*, depositados do banco de dados Uniprot (uniprot.org).

Apenas proteínas com a confiabilidade alta (Taxa de descoberta falsa <1%) foram consideradas nesse estudo.

5.6.2 Gel de eletroforese

Visando observar por eletroforese a abundância e a massa molecular das proteínas presentes nas frações da cromatografia foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) utilizando o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS). O gel de separação foi composto de 3,3 mL de H₂O Milli-Q, 4 mL do mix de acrilamida 30% e 2,5 mL de Tris – HCl 1,5 M (pH 8,8). O gel stack (5%) foi composto de 2,7 mL de H₂O Milli-Q, 0,67 mL do mix de acrilamida 30% e 0,5 mL de Tris – HCl 1,5 M (pH 6,8). Ambos os géis tiveram 100 µL de persulfato de amônio 10% e 10 µL de TEMED adicionados por último para começar a reação da polimerização. A solução do gel separação foi adicionada no interior da placa, para dar molde ao gel. Para a polimerização do gel na placa é preciso interromper o contato da solução com o oxigênio. Sendo assim, acrescentou-se butanol hidratado, o que também ajudou no alinhamento do gel. Após a polimerização do gel de separação, o excesso de butanol hidratado foi retirado do interior da placa e adicionou-se o gel stack e o pente que moldam os poços. Após as polimerizações, o gel foi colocado na cuba contendo tampão de corrida com 25 mM de Tris, 250 mM de glicina (pH 8,3) e 0,1% de SDS. Os pentes, presentes no interior da placa, foram retirados para que as amostras pudessem ser depositadas nos poços. Antes das amostras serem adicionadas aos poços do gel, 50 µg de proteínas foram misturadas ao tampão de amostra com 200 mM de Tris - HCl (pH 6,8), 8% de SDS, 0,4% de azul de bromofenol, 40% de glicerol, 400 mM de beta-mercaptoetanol na proporção de 1:3 (tampão:amostra). Após a adição das amostras, o suporte junto às placas foi conectado a fonte. A corrente foi ajustada para 15 mA (para cada placa) e, depois que as amostras, alinhadas, chegaram ao gel de separação, foi ajustada para 20 mA. Após a corrida, o gel foi retirado do suporte, com auxílio de uma espátula, e colocado em um recipiente, contendo água, no qual se agitou o gel por aproximadamente 2 minutos. A água foi retirada e colocouse a solução de coloração do gel (2,5 g de Coomassie blue, 450 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial e 450 mL de água). A solução ficou agindo overnight. No dia seguinte, a

solução de coloração do gel foi retirada e foi adicionada ao recipiente a solução descorante (450 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial e 450 mL de água).

5.7 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Os ensaios de hidrólise enzimática foram conduzidos utilizando 30% (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados hidrotermicamente. Para a primeira etapa do estudo, a biomassa (1,5 g massa seca) e o respectivo coquetel enzimático foram adicionados ao tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8 em erlenmeyers de 25 mL com tampa em uma reação com conteúdo total de 5 g. Para a segunda etapa, a biomassa (0,75 g massa seca) e o respectivo coquetel enzimático foram adicionados ao tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 em erlenmeyers de 25 mL com tampa em uma reação com conteúdo total de 2,5g. Todos os ensaios de hidrólise enzimática foram conduzidos em duplicatas, com erlenmeyers de sacrifício, ou seja, cada tempo de reação tinha um frasco independente, a 50 °C e 200 rpm por 24 h. As reações foram paradas nos tempos de 3, 6, 9 e 24 h. Para parar a reação, os erlenmeyers foram removidos do shaker e submersos em água a 100 °C por 5 minutos. Para as análises de açúcares e sólidos insolúveis em água (descritas abaixo), como o meio de hidrólise possuía um alto teor de sólidos, ou seja, quase ausência de água livre no meio, era difícil aliquotar uma fração líquida homogênea, pois os açúcares formados durante a hidrólise podem ser concentrar em diferentes pontos da amostra, sendo difícil inferir que a concentração encontrada na amostra represente toda a reação. Sendo assim, foi adicionado água destilada diluindo o meio 4 vezes do volume total da reação. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas. Foi aliquotado do sobrenadante 1,0 mL para quantificação de açúcares por cromatografia liquída de alta eficiência (CLAE) e o pellet da centrifugação juntamente com a fração sólida do meio hidrolisado foi utilizado para análise dos sólidos insolúveis em água. O rendimento de conversão da celulose em glicose foi calculado de acordo com a seguinte equação 3:

Rendimento em glicose (%) =
$$\frac{(Cglicose-Cglicose0)}{1,111(\frac{Wt}{Vh0})Fins0Fglucan}x100$$
 (Equação 3)

Cglicose é a concentração da glicose nos hidrolisados (g/L); Cglicose0 é a concentração de glicose inicial no experimento de hidrólise; Wt é a massa total do ensaio de hidrólise (g); Vh0 é o volume inicial de líquido (L); Fins0 é a fração mássica dos sólidos insolúveis no ensaio de

hidrólise total; Fglucan é a fração mássica de glucana nos sólidos insolúveis. Vh0 é o volume que corresponde à massa inicial (g) de líquido adicionado ao ensaio de hidrólise (Wt-Wins0).

Para análise de viscosidade, a hidrólise foi conduzida em erlenmeyers de 50 mL com tampa em um uma reação total de 10 g (3 g de bagaço em peso seco), também em duplicatas e erlenmeyers de sacrifício, ou seja, cada tempo de reação possuía um frasco independente. O meio reacional obtido foi transferido para frascos de plástico com tampas e resfriados 4 °C para análises futuras.

Cinco misturas enzimáticas diferentes foram testadas nesse estudo, com uma carga enzimática padrão de 20 FPU/g de celulose e o mínimo de proporção de FPU:BGU de 1:3.

5.7.1 Análise dos sólidos insolúveis em água

Após a hidrólise enzimática, os sólidos foram filtrados em filtro de vidro e lavados exaustivamente com água destilada até a glicose não ser mais detectada no filtrado, o líquido resultante da filtração foi analisado utilizando o analisador bioquímico 2700 SELECT. Os filtros foram postos *overnight* na estufa de 105 °C até peso constante. O objetivo dessa análise é quantificar todo sólido que não foi hidrolisado até o momento de retirada da reação.

5.7.2 Análise da glicose produzida

As alíquotas líquidas do sobrenadante resultante da hidrólise foram então diluídas e as concentrações de glicose foram analisadas. A análise foi realizada primeiramente utilizando o analisador bioquímico YSI 2700 SELECT e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que foi conduzida utilizando o sistema Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) com um detector de índice de refração (Modelo RID-10A). A aquisição e o tratamento dos dados foram controlados pelo software Class VP 6.1 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). A coluna cromatográfica utilizada foi a Aminex HPX-87H (300 mmX7.8 mmX9 mm) da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). O cartucho de proteção utilizado foi o deashing da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico a 5mM em um fluxo de 0,6 mL/min com a temperatura do forno de 55 °C e a temperatura do detector de 55 °C.

5.7.3 Análise da viscosidade

As análises de viscosidade foram realizadas com o objetivo de comparar a eficiência dos coquetéis enzimáticos em liquefazer o meio de hidrólise enzimática com alto teor de sólidos. As análises foram feitas de acordo com (STICKEL et al., 2009), utilizando um reômetro Anton Paar, modelo MCR 302 (Anton Paar GmbH, Graz, Austria), com sistema Peltier e banho termostatizado Tecnal TE 2015 para controle da temperatura, equipado com a geometria placa-placa com 20 mm de diâmetro e gap de 4 mm a 50 °C. A viscosidade das amostras foi determinada através de um teste rotacional em função da taxa de cisalhamento de tipo *controlled shear rate* (CSR) em uma variação de 1-100 s⁻¹. As amostras foram postas em banho a 50 °C por 5 minutos antes das análises, homogeneizadas e adicionadas ao reômetro cobrindo por completo a base do equipamento e preenchendo o espaço entre as placas. Os dados foram obtidos pelo software Rheoplus/32 O comportamento de fluxo foi analisado segundo a seguinte equação do modelo Newtoniano (Equação 4):

 $\tau = \eta \gamma$ (Equação 4)

Na qual τ é a tensão de cisalhamento (Pa), η representa a viscosidade (Pa.s) e γ é a taxa de cisalhamento (s⁻¹).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO

A composição química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente utilizado no estudo está apresentada na Tabela 2. A análise da composição química das biomassas lignocelulósicas pré-tratadas é importante para determinar o efeito do pré-tratamento na composição do material e para estabelecer a dosagem das enzimas para a etapa de hidrólise enzimática, pois a padronização da quantidade de enzimas utilizadas no ensaio de hidrólise é calculada com base no conteúdo de celulose do material ou na massa total de biomassa no ensaio. Ainda, é importante para o cálculo do rendimento em glicose das hidrólises enzimáticas.

Tabela 2. Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente (190 °C, 12 min) cedico pela Inbicon A/S e utilizado nesse estudo.

Porcentagem
45,85% (±2.22%)
1,80% (±0,08%)
31,70% (±0,49%)
16,37% (±3,53%)

O principal efeito descrito para o pré-tratamento hidrotérmico está associado à redução do conteúdo de hemicelulose na matéria-prima pré-tratada, através de um mecanismo conhecido como auto-hidrólise. Neste processo, íons hidrônios, provenientes da água sob pressão, levam a catálise dos terminais acetatos da hemicelulose, que levam a formação de ácido acético que, por consequência, acarreta na hidrólise ácida e liberação da fração de hemicelulose (EWANICK; BURA, 2010). Desse modo, pelos dados apresentados na Tabela 2, pode-se perceber que o pré-tratamento hidrotérmico realizado pela Inbicon A/S foi eficaz, uma vez que o conteúdo de xilana foi de 1,8% e não houve detecção de resíduos de arabinose. Como o material analisado já foi cedido pré-tratado pela empresa, não foi possível obter a composição do material de partida. No entanto, é reportado na literatura que o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* contém de 25-32% de hemiceulose (considerando a soma de xilana e arabinana) (ISIKGOR; BECER, 2015) (Tabela 2). O valor obtido de 16,37% de cinzas é bastante superior aos valores reportados de 1,14-5,96% para o bagaço *in natura* (ROCHA et al., 2015). Tal diferença poderia estar associada a mistura de componentes do solo durante o armazenamento da biomassa *in natura* nas instalações industriais, que diferem das condições

de preparo da amostra em laboratório. Uma média de 57,85% de celulose, 4,62% de hemicelulose e 24,49% de lignina é reportada para outros estudos que utilizaram bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente (BRAGA et al., 2014; MACHADO et al., 2015; MOUTTA et al., 2013; SILVA et al., 2011). Sendo assim, a composição do bagaço pré-tratado recebido apresenta uma porcentagem de celulose e hemicelulose um pouco abaixo do que é reportado na literatura (o que se explica devido ao alto percentual de cinzas), assim como a porcentagem de lignina, que está um pouco acima da média reportada.

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado descrito na Tabela 2 foi utilizado em todos os ensaios de hidrólise enzimática que serão apresentados neste trabalho.

6.2 POTENCIAL DE LIQUEFAÇÃO DE DOIS COQUETÉIS ENZIMÁTICOS COMERCIAIS E UM PREPARADO EM LABORATÓRIO

O objetivo dos ensaios que serão apresentados nessa seção foi identificar o potencial de liquefação de três coquetéis enzimáticos, através da comparação de três parâmetros: a produção de glicose, a diminuição do percentual de sólidos insolúveis em água e a diminuição da viscosidade do meio reacional.

6.2.1 Atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas das enzimas que foram utilizadas na etapa da hidrólise foram avaliadas em ensaios para determinação de celulases totais e de β -glicosidase. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Enzima	FPU/mL	BGU/mL
Celluclast (CEL)	59,9	25,9
Novozyme 188 (188)	*	547,2
Cellic® CTec 2 (CT2)	81,5	4150,9
Sobrenadante enzimático liofilizado de	13,5	0,8
Trichodema reesei** (Tr)		
Sobrenadante enzimático de Aspergillus	*	24,7
awamori (Aa)		

Tabela 3. Atividade enzimática dos coquetéis enzimáticos utilizados na etapa 1 do estudo durante hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com 30% de sólidos.

*Não foi observada atividade enzimática

**Solução com o liofilizado de T. reesei com 0,5 g do liofilizado/mL

O coquetel comercial Cellic® CTec2 (CT2) foi desenvolvido pela Novozymes e apresenta alta atividade de celulases totais e excesso de β -glicosidases que diminui o efeito de inibição por celobiose no meio de hidrólise enzimática de biomassas lignocelulósica, além de

ser formulado com LPMOs, que intensificam a hidrólise da celulose cristalina. O coquetel CT2 já é uma evolução da Cellic® CTec1 e atualmente já está sendo comercializado a Cellic® CTec3. CT2 possui uma proporção FPU:BGU de aproximadamente 1:51, muito acima da outra enzima comercial rica em atividade de celulases totais Celluclast, que é de 1:0,4. Celluclast é uma geração mais antiga de celulase comercial proveniente do fungo T. *reesei* e, por isso, possui uma baixa atividade de β -glicosidases, já que esse fungo tem deficiência na secreção dessas enzimas. Dessa maneira, a enzima Celluclast é suplementada com a enzima comercial Novozymes 188, um coquetel enzimático proveniente de Aspergillus *niger*, um fungo que produz β -glicosidases em alta quantidade, formando assim o coquetel enzimático CEL188, uma mistura vastamente avaliada em estudos acadêmicos (ROSGAARD et al., 2007; SILVA et al., 2016; WEISS; FELBY; THYGESEN, 2019). O coquetel enzimático preparado em laboratório é formado pelo sobrenadante enzimático de T. reesei, que como dito anteriormente é rico em atividade de celulases totais, utilizado juntamente com o sobrenadante enzimático de A. awamori, um fungo superprodutor de amilases, mas que foi identificado como eficiente secretor de β-glicosidases. O coquetel TrAa foi desenvolvido pela equipe do laboratório Bioetanol (Instituto de Química/ UFRJ) e colaboradores, e é objeto de uma patente concedida pelo Instituto Nacional de Propriedade Intelectual em 2017 (Instituto de Química/ UFRJ), tendo já sido foi utilizado em outros estudos que demonstraram a hidrólise efetiva do bagaço de cana-de-açúcar (GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BON, 2010; PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2016; SOUZA; BON; SILVA, 2018).

6.2.2 Hidrólise enzimática

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente foi submetido a hidrólise enzimática com 30% de sólidos (massa seca). Primeiramente, foram avaliados os dois coquetéis enzimáticos comerciais e o preparado em laboratório. Os preparados enzimáticos originados da mistura de Celluclast e Novozymes 188 e dos sobrenadantes de *T. reesei* e *A. awamori*, serão identificados como CEL188 e TrAa, respectivamente. Para tal, os preparados enzimáticos foram misturados com o objetivo de atingir a proporção de 1:3 entra as atividades enzimáticas de FPase (FPU) e beta-glicosidase (BGU), conforme identificado na Tabela 4. A proporção BGU:FPU de 1:3 que foi utilizada nesse estudo foi baseada na patente do coquetel TrAa que mostrou que a proporção 1:3 é suficiente para liberar o máximo de glicose possível, ou seja, mesma aumentando a quantidade de unidades de β -glicosidase, a mesma quantidade de glicose era alcançada (BON et al., 2007).

Coquetel enzimático	Proporção de FPU:BGU
Cellic® CTec2 (CT2)	1:51
Celluclast + Novozymes 188 (CEL188)	1:3
Sobrenadante de T. reesei + sobrenadante de A. awamori (TrAa)	1:3

Tabela 4. Proporção utilizada de unidades de filtro de papel (FPU) e unidades de β -glicosidase (BGU) de cada coquetel enzimático.

Primeiramente, o efeito de cada um dos coquetéis foi avaliado quanto ao impacto na redução de sólidos insolúveis em água, que corresponde a fração da biomassa que não foi hidrolisada, e do aumento da produção de glicose ao longo de 24 horas de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado. O coquetel CEL188 solubilizou, depois de 24 horas de hidrólise, aproximadamente 6% dos sólidos insolúveis iniciais, enquanto que CT2 e TrAa apresentaram um melhor resultado, solubilizando cerca de 20% dos sólidos insolúveis iniciais (Figura 10), já descontado o percentual de sólidos solubilizados ao se incubar a suspensão de bagaço sem enzimas pelo mesmo período. CT2 apresentou o mesmo perfil de produção de glicose quando comparado ao TrAa, resultando na produção de cerca de 115 g/L de glicose (52% de conversão celulose em glicose) depois de 24 horas de hidrólise.

Um padrão de hidrólise enzimática parecido entre CT2 e TrAa já foi observado em um estudo anterior, em que o coquetel CT2 resultou em maior produção de glicose em 24 horas de hidrólise enzimática quando comparado à mistura TrAa (SILVA et al., 2016). No entanto, nesse mesmo estudo, TrAa apresentou um melhor resultado em 6 horas de hidrólise quando comparado com CT2, efeito não observado no presente estudo. Essa diferença pode ser devido ao efeito da quantidade de sólidos inicial, que pode afetar diferentemente o desempenho de coquetéis enzimáticos, uma vez que o trabalho anterior conduziu a hidrólise enzimática com 20% de sólidos, enquanto o presente estudo utilizou 30% de sólidos.

A mistura CEL188 catalisou a menor produção de glicose, disponibilizando 54 g/L de glicose em 24 h de hidrólise (24% de rendimento de celulose em glicose). Cara e coautores observaram uma concentração de glicose similar, de aproximadamente 50 g/L, depois de 24 horas de hidrólise enzimática com 30% de sólidos utilizando o coquetel enzimáticos CEL188 (CARA et al., 2007). Uma das explicações da estagnação da hidrólise enzimática ao utilizar o coquetel CEL188 é a inibição enzimática por produto. Esse efeito inibitório da glicose na mistura CEL188 foi demonstrado por outros estudos, através da diminuição no rendimento da reação ao adicionar de 30 a 60 g/L de glicose no meio de hidrólise (KRISTENSEN; FELBY; JØRGENSEN, 2009; SILVA et al., 2016). Além disso, também foi demonstrada uma maior

inibição enzimática por produto ao aumentar a carga de sólidos da hidrólise, um fenômeno não observado em ensaios de sacarificação utilizando CT2 (WEISS; FELBY; THYGESEN, 2019).

É possível observar que, embora a hidrólise enzimática com alto teor de sólidos apresente diversos desafios, altas concentrações de glicose foram obtidas até após 24 horas de hidrólise. É importante salientar que o aspecto físico do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pela Inbicon A/S é um dos parâmetros que permitiu a condução da hidrólise enzimática com 30% de sólidos. O bagaço pré-tratado pela Inbicon A/S é um material com baixa higroscopicidade, característica fundamental para hidrólise com alta carga de sólidos, pois permite a presença de água livre no meio. Provavelmente a baixa interação com a água do bagaço pré-tratado da Inbicon A/S é devido à diminuição significativa da hemicelulose, que é a principal fração da biomassa lignocelulósica responsável pela capacidade de absorver água das biomassas e, consequentemente, o aumento relativo do percentual de lignina, que é hidrofóbica, no material (SELIG; THYGESEN; FELBY, 2014).



Figura 10. Perfil de (A) sólidos insolúveis totais e (B) concentração de glicose durante hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com 30% de sólidos por 24 horas utilizando três coquetéis enzimáticos. Linha vermelha: CEL188; linha azul: CT2; linha verde: TrAa.

6.2.3 Análise da viscosidade

As análises de viscosidade foram realizadas em um reômetro rotacional, que permite medir a tensão e deformação de um determinado material. Essa medição é observada através do escoamento do material causado pelo arraste de uma superfície em movimento em contato com a amostra. A taxa de cisalhamento pode ser alterada pela velocidade de rotação e pela distância entre as placas, nesse estudo foi escolhida a faixa de taxa de cisalhamento 1-100 s⁻¹ com a distância entre as placas de 4 mm, conforme (STICKEL et al., 2009; WIMAN et al., 2011). A viscosidade é calculada através da relação entre a taxa e tensão de cisalhamento.

Para a avaliação da viscosidade do meio de hidrólise enzimática de cada coquetel enzimático foram realizados ensaios de hidrólise em que o conteúdo total do meio foi

recuperado em cada um dos tempos analisados. Dessa maneira, foi possível correlacionar os resultados de concentração de glicose e redução de sólidos insolúveis em água com a variação da viscosidade do meio. O meio de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar apresentou como esperado para suspensões de fibras, um comportamento de cisalhamento fino, o que também já foi observado em estudos com outras biomassas lignocelulósicas (STICKEL et al., 2009; WIMAN et al., 2011). A viscosidade do meio controle, ou seja, sem adição de nenhuma enzima, na taxa de cisalhamento de 1 s⁻¹, foi de aproximadamente 1000 Pa.s (Figura 14), mesmo valor encontrado para o meio reacional com 30% de sólidos de capim elefante pré-tratado (CRUZ et al., 2013). Com o prosseguimento da hidrólise, a viscosidade diminuiu em todas as condições enzimáticas avaliadas, variando de 1340 – 0.99 Pa.s em CEL188; 408 – 0.244 Pa.s em CT2; and 598 – 0.007 Pa.s em TrAa (Figura 11). A redução da viscosidade também pode ser observada qualitativamente através da variação no aspecto macroscópico do meio reacional ao longo do tempo de hidrólise (Figura 12), sendo possível observar que em 24 h o aspecto do meio é de um líquido grosso com capacidade de fluir, apresentando poucos entrelaçamentos, quando comparado com o início da hidrólise.

No entanto, não foi observada uma estabilização da viscosidade em nenhum dos meios reacionais avaliados, sugerindo que a liquefação não ocorreu por completo. Um padrão similar foi reportado em estudos que avaliaram a hidrólise enzimática com 30% de sólidos do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor utilizando uma endoglucanase comercial, além de ter sido observado na hidrólise enzimática com 15% de sólidos da palha de cevada pré-tratada a vapor utilizando a mistura CEL188. Nesses estudos, a etapa de liquefação só se completou após 48 horas de hidrólise (CUNHA et al., 2014; ROSGAARD et al., 2007). Embora a liquefação não tenha sido completa, as primeiras 8-10 h de hidrólise são reportadas como sendo as mais significativas para redução da viscosidade do meio reacional (WIMAN et al., 2011).



Figura 11. Variação da viscosidade dos meios de hidrólise enzimática com 30% de sólidos ao longo de 24 horas durante cisalhamento de 1-100 s-1. (A) CEL188; (B) CT2; (C) TrAa. \diamond : 3 h \Box : 6 h Δ : 9 h \circ : 24 h.



Figura 12. Variação do aspecto macroscópico do meio de hidrólise enzimática com 30% de sólidos do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente ao longo de 24 horas de hidrólise utilizando o coquetel preparado em laboratório contendo o sobrenadante enzimático de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus awamori*. (A) 0 h; (B) 3 h; (C) 6 h; (D) 9 h; (E) 24 h.

De acordo com os dados apresentados na Figura 11, TrAa mostrou um maior potencial de liquefação quando comparado a CT2 e CEL188 em 6, 9 e 24 h de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar em meio com 30% de sólidos. Embora CT2 tenha promovido uma melhor liberação de glicose, os resultados de viscosidade mostram que CT2 foi mais eficiente na redução da viscosidade apenas em 3 h de hidrólise, sendo a mistura TrAa muito mais eficaz para promover uma maior fluidez para o meio de 6 a 24 h, mostrando que a liguefação não é uma etapa estritamente relacionada com a sacarificação. Esse fenômeno também é corroborado por outro estudo que avaliou a viscosidade do meio de hidrólise da palha de trigo pré-tratada hidrotermicamente pela Inbicon A/S, durante hidrólise com diferentes enzimas purificadas e um coquetel preparado a partir da mistura das enzimas purificadas. Segundo os autores, existe pouca relação entre a liquefação e a sacarificação, devido à esses dois fenômenos serem relacionados a diferentes classes enzimáticas (SKOVGAARD et al., 2014). Após 24 h de hidrólise, o meio com TrAa apresentou uma fluidez aproximadamente 15 vezes, superior ao meio reacional com CT2, no entanto, tendo liberando a mesma quantidade de glicose. A análise da capacidade de redução da viscosidade durante a hidrolise enzimática é de extrema importância, já que permite a identificação de coquetéis enzimáticos que reduzem efetivamente a viscosidade do meio de hidrólise com alto teor de sólidos, que são indispensáveis para implementação industrial do processo, pois isso representaria uma economia significativa na demanda de energia para misturar e bombear o meio de hidrólise (KNUTSEN; LIBERATORE, 2010).

De acordo com a literatura, as principais enzimas responsáveis pela liquefação são as endoglucanases (SZIJÁRTÓ et al., 2011b). Por consequência, de acordo com os resultados obtidos, é possível inferir que a eficiência observada na promoção da liquefação pela mistura TrAa possa estar relacionada com a presença de endoglucanases nesse coquetel enzimático. Tais endoglunases poderiam ser provenientes tanto do sobrenadante de *T. reesei* quanto de *A*.

awamori, uma vez que ambos os fungos já foram reportados como produtores dessas enzimas (PETROVA et al., 1995; SINGH et al., 2011). No entanto, a mistura CEL188, composta pela Celluclast, uma enzima comercial proveniente de *T. reesei* e, consequentemente, similar ao sobrenadante utilizado na mistura TrAa, promoveu resultados insatisfatórios para a liquefação do meio. Desse modo, foi hipotetizado que o efeito de TrAa na promoção da liquefação poderia estar mais relacionado às EGs de *A. awamori*. Para testar essa hipótese, o sobrenadante Aa foi utilizado juntamente com as enzimas comerciais com o objetivo de observar se tal suplementação seria capaz de promover uma melhora da liquefação durante hidrólise enzimática com alto teor de sólidos.

6.3 SUPLEMENTAÇÃO DOS COQUETÉIS COMERCIAIS COM O SOBRENADANTE ENZIMÁTICO DE A. AWAMORI

A análise da contribuição específica de diferentes classes de enzimas em aspectos da hidrólise enzimática, como aumento da taxa de conversão, diminuição da inibição por produto e diminuição da viscosidade do meio, pode ser estudada através de estratégias de suplementação da hidrólise enzimática com enzimas purificadas e sobrenadantes de fungos, como reportado em alguns estudos (HU; ARANTES; SADDLER, 2011; PECIULYTE et al., 2017). Nesse estudo, a suplementação teve o objetivo de avaliar a capacidade do sobrenadante de *A. awamori* em aumentar o poder de liquefação dos coquetéis enzimáticos comerciais. Desse modo, as duas seções a seguir irão comparar os perfis de hidrólise enzimática para produção de açúcar, diminuição do percentual de sólidos insolúveis em água e avaliação da viscosidade dos meios de hidrólise contendo os coquetéis CT2 e CEL1188 com e sem a suplementação do sobrenadante enzimático de *A. awamori*.

6.3.1 Hidrólise enzimática

Os coquetéis enzimáticos comerciais CT2 e CEL188 foram então suplementados com a mesma quantidade (em volume) de Aa presente no coquetel preparado em laboratório TrAa. A proporção FPU:BGU das misturas está apresentada na Tabela 5. Como é possível observar pela comparação das Tabela 4 e 4, a proporção das atividades quando comparado CT2 com CT2Aa quase não muda, de 1:51 para 1:54, devido à alta atividade de β -glicosidase presente em CT2, enquanto que CEL188 comparado com CEL188Aa, a quantidade de unidade de β -glicosidase dobra, de 1:3 vai para 1:6. No entanto, esse aumento da atividade de β -glicosidase não deveria representar impacto para a diminuição da viscosidade, uma vez que na relação de

1:3 a atividade de β -glicosidases está em excesso. Além disso, não há estudos que correlacionem a quantidade de β -glicosidases com a diminuição do meio de hidrólise enzimática.

Tabela 5. Proporção utilizada de unidades de filtro de papel (FPU) e unidades de β -glicosidase (BGU) de cada coquetel enzimático.

Coquetel enzimático	Proporção FPU:BGU
Cellic® CTec2 + sobrenadante de A. awamori (CT2Aa)	1:54
Celluclast + Novozymes 188 + sobrenadante de A. awamori (CEL188Aa)	1:6

A Figura 13 apresenta os resultados referentes ao perfil do conteúdo de sólidos insolúveis e da liberação de açúcar ao longo da hidrólise enzimática contendo os coquetéis CT2 e CEL188 ou suplementados com o sobrenadante Aa. Foi possível observar que a suplementação com Aa acarretou em efeito positivo na redução do percentual de sólidos insolúveis e no aumento da concentração de glicose liberada a partir de 6 h para CEL188 e 9 h para CT2. A suplementação com Aa em CT2 e CEL188 resultou, em 24 horas de hidrólise, respectivamente, em 13 e 10% de redução no conteúdo de sólidos insolúveis e em aumento na produção de glicose de 40 e 20 g/L, respectivamente. (Figura 13).

PECIULYTE e colaboradores avaliaram a suplementação do coquetel enzimático Celluclast 1.5 L com um sobrenadante de *Aspergillus niger* e comparou com a suplementação de Celluclast 1.5 L suplementado com a β -glicosidase purificada de *A. niger* durante a hidrólise enzimática de farelo de trigo em 24 h. Os resultados mostraram uma maior produção de glicose ao utilizar o sobrenadante total de *A. niger*, indicando que o sobrenadante total provavelmente possui outras enzimas além da β -glicosidase que é capaz de melhorar a hidrólise enzimática utilizando o coquetel enzimático Celluclast 1.5 L (PECIULYTE et al., 2017). Nesse contexto, a suplementação do coquetel enzimático Celluclast 1.5 L com uma endoglucanases purificada da família 7 (GH7) produzida por *Aspergillus fumigatus* foi reportada aumentando a solubilização de açúcares redutores durante a hidrólise enzimática de diversos materiais lignocelulósicos, incluindo bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (BERNARDI et al., 2018, 2019). Esses estudos indicam que os sobrenadantes enzimáticos de *Aspergillus spp.* possuem enzimas, além das β -glicosidases, capazes de melhorar a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica.



Figura 13. (A) Efeito da suplementação dos coquetéis enzimáticos comerciasis com o sobrenadante enzimático de *Aspergillus awamori* na diminuição dos sólidos insolúveis em água e (B) na concentração de glicose durante hidrólise enzimática com 30% de sólidos do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente. Linhas tracejadas vermelhas: CEL188; linhas contínuas vermelhas: CEL188Aa; linhas tracejadas azuis: CT2; linhas contínuas azuis: CT2Aa.

6.3.2 Análise da viscosidade

A Figura 14 apresenta a variação de viscosidade nos meios de hidrólise enzimática contendo os coquetéis CT2 e CEL188 suplementados com o sobrenadante Aa em comparação aos meios em que foram utilizados isoladamente. Nenhuma diferença na viscosidade foi observada nos meios suplementados com Aa em relação aos meios com os coquetéis sem

suplementação nos tempos de 3 e 6 h de hidrólise enzimática. No entanto, em 9 h de hidrólise, CT2Aa promoveu uma liquefação superior quando comparado com CT2, com uma performance similar à que foi observada para TrAa. A suplementação com Aa resultou em um meio 10 vezes mais liquefeito após 24 horas de hidrólise quando comparado com os dois coquetéis comerciais sem Aa (Figura 14).

Alguns estudos já demonstraram o efeito de endoglucanases purificadas de *T. reesei* na redução da viscosidade durante a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos (SZIJÁRTÓ et al., 2011b, 2011c). Não há relatos de estudos que correlacionem a atividade de endoglucanases produzidas por *Aspergillus spp*. com a redução de viscosidade do meio de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, no entanto, alguns estudos reportaram o efeito de EGs de *Aspegillus spp*. na diminuição da viscosidade de carboximetilcelulose (DOBREV; ZHEKOVA, 2012). Não obstante, uma endoglucanase da mesma família 7 (GH7) citada acima na seção 6.3.1, proveniente da espécie *Myceliophthora thermophila*, foi reportada como sendo capaz de reduzir a viscosidade do meio de hidrólise enzimática contendo alto teor de sólidos palha de trigo pré-tratada hidrotermicamente (KARNAOURI; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2014).


Figura 14. Variação da viscosidade dos meios de hidrólise enzimática com 30% de sólidos ao longo de 24 horas durante cisalhamento de 1-100 s-1com e sem a suplementação de *A. awamori*. (A) 3 h; (B) 6 h; (C) 9 h; (D) 24 h. \Diamond : Controle \Box : CEL188 **•**: CEL188Aa Δ : CT2 **•**: CT2Aa.

Aparentemente, os efeitos observados decorrentes da suplementação de Aa nos dois coquetéis enzimáticos comerciais são diferentes. De acordo com Weiss e colaboradores, a mistura de Celluclast 1.5 L e Novozymes 188 é altamente suscetível a inibição por produto, diferentemente de Cellic® CTec2, que é principalmente afetada pela limitação de transferência de massa (WEISS; FELBY; THYGESEN, 2019). A produção de glicose por CEL188Aa foi aumentada desde o início da hidrólise em comparação a CEL188, mesmo sem uma melhora na liquefação, indicando que, provavelmente, ao adicionar mais unidades de β-glicosidase, foi possível atrasar o efeito de inibição por produto. Por outro lado, o aumento na liquefação de glicose no meio CT2Aa foi observado apenas quando uma maior eficiência na liquefação foi alcançada, em 9 h de hidrólise, provavelmente porque quando o substrato está liquefeito, o acesso ao substrato se torna mais fácil, tornando a hidrólise enzimática mais eficiente (QIN, 2010).

É notável que existe uma sinergia entre as enzimas que estão envolvidas na liquefação e uma relação entre uma liquefação mais eficiente e uma maior liberação de glicose, uma vez que há diferenças dos tempos de liquefação e na concentração de glicose produzida, dependendo dos diferentes coquetéis enzimáticos. As enzimas de *T. reesei* e *A. awamori* são reportadas como tendo uma atividade sinérgica na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado a vapor, e em substratos como papel de filtro e carboximetilcelulose (GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BON, 2010). Embora uma melhora na liquefação e na sacarificação tenha sido observada através da suplementação dos coquetéis comerciais com o sobrenadante enzimático de *A. awamori*, é muito difícil sugerir o verdadeiro mecanismo biológico envolvido no sistema, uma vez que o sobrenadante enzimático é muito complexo. Com o propósito de avaliar se a fração do sobrenadante de *A. awamori* contendo endoglucanases seria responsável por esse efeito, um processo de fracionamento das proteínas de Aa foi realizado visando o isolamento de uma fração do sobrenadante enzimático rica em endoglucanases para posterior avaliação como suplementação na hidrólise enzimática.

6.4 EFEITO DA FRAÇÃO RICA EM ENDOGLUCANASES DO SOBRENADANTE DE A. AWAMORI NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM ALTO TEOR DE SÓLIDOS

Com o propósito de isolar uma fração do sobrenadante enzimático de *A. awamori* rica em endoglucanases, primeiramente, foi produzido o sobrenadante nas mesmas condições do

sobrenadante utilizado na primeira etapa do estudo, exceto pela concentração por ultrafiltração, já que o coquetel utilizado na primeira etapa do estudo utilizou uma membrana de 10 kDa e concentrou o sobrenadante 10 vezes, e o sobrenadante utilizado na segunda etapa foi concentrado 6 vezes com uma membrana de 30 kDa.

Foi avaliada a atividade enzimática de CMCase (que utiliza carboximetilcelulose como substrato) do sobrenadante Aa, resultando em 5,67 U/mL, indicando que Aa tem atividade de endoglucanases. A atividade de CMCase é considerada por muitos autores como um indicativo da atividade de endoglucanases, pois a carboximetilcelulose é uma forma amorfa de celulose modificada, ou seja, um substrato preferencial para a catálise por endoglucanases. Outros trabalhos já relataram a secreção de diferentes tipos de endoglucanases por linhagens de Aspergillus spp. (DOBREV; ZHEKOVA, 2012; HASPER et al., 2002; RUNGRATTANAKASIN et al., 2018). Ademais, a concentração de proteínas totais do sobrenadante foi determinada pelo método do ácido bicinchonínico, com o resultado de 7 mg/mL.

Sendo assim, as próximas seções irão detalhar o processo do fracionamento das proteínas do sobrenadante enzimático de *A. awamori*, a caracterização enzimática das frações, a identificação das proteínas presentes nas frações e a utilização da fração rica em endoglucanases como suplementação do coquetel CT2 na hidrólise enzimática contendo 30% de bagaço de cana-de-açúcar.

6.4.1 Fracionamento das proteínas do sobrenadante enzimático de *Aspergillus awamori*

O sobrenadante enzimático produzido de *A. awamori*, após dosagem de proteínas totais e das atividades enzimáticas, foi submetido ao fracionamento por cromatografia por exclusão de tamanho com o objetivo de isolar uma fração do sobrenadante enzimático enriquecida em endoglucanases. Ao aplicar uma amostra proteica complexa na coluna Sephadex G75, todas as proteínas com maior massa molecular do que 80 kDa não permeiam a resina, e são recuperadas nas primeiras frações proteicas, enquanto as proteínas menores que 80 kDa, permeiam a resina e podem ser fracionadas e recuperadas da maior para a menor massa molecular. Assim as proteínas com maior massa molecular foram recuperadas nas primeiras frações e as com menor massa molecular nas frações subsequentes.

A cromatografia por exclusão de tamanho é amplamente utilizada no processo de purificação enzimática, e já foi utilizada para purificação de xilanases, celulases e até endoglucanases (BEGUM; ABSAR; ALAM, 2009; PETROVA et al., 1995; SARASWAT; BISARIA, 2000; TEIXEIRA et al., 2010). No entanto, o objetivo desses artigos era purificar uma única enzima, diferente desse trabalho que teve como objetivo purificar parcialmente uma fração rica em endoglucanases. Um trabalho já utilizou frações enzimáticas provenientes de cromatografia de exclusão para hidrólise enzimática de Avicel (INOUE et al., 2014).

6.4.1.1 Perfil proteico

As 95 frações separadas pela cromatografia de exclusão foram analisadas no espectrofotômetro a 280 nm. Esse comprimento de onda é absorvido pelos anéis aromáticos presentes nos aminoácidos tirosina, triptofano e fenilalanina, resultando em uma quantificação relativa das proteínas em cada fração. A Figura 15 mostra o perfil de eluição das proteínas do sobrenadante enzimático de *A. awamori* na coluna Sephadex G-75. É possível observar que as proteínas começaram a eluir a partir da fração 25, na qual se inicia um pico de aproximadamente 0,4 de absorbância, que logo descende para dar início ao segundo pico da amostra, que se encontra aproximadamente na fração 39 com uma absorbância de aproximadamente 1. Após esses dois picos, há a presença de um vale entre as frações 45 e 65 e logo após esse vale o início do maior pico da amostra, com intensidade de 1,6 de absorbância.



Figura 15. Perfil de eluição de proteínas presentes no sobrenadante enzimático de *A. awamori* utilizando cromatografia de exclusão com a resina Sephadex G-75.

6.4.1.2 Atividades enzimáticas

Após analisar as 95 frações para presença de proteínas, as frações que indicavam a presença de proteínas foram submetidas a três ensaios de atividade enzimática, com o objetivo de identificar as frações com atividade hidrolítica no substrato CMC, pNPG e xilanas. A

Figura 16 apresenta o perfil de eluição do sobrenadante enzimático de *A. awamori* com as atividades enzimáticas qualitativas de cada fração com os três substratos. Segundo os resultados das atividades enzimática qualitativas, as frações do primeiro pico da amostra são ricas em proteínas com atividade em pNPG e em xilana, indicando a presença de β glicosidases e xilanases com alta massa molecular, pois eluiram no início da corrida cromatográfica. Já nas frações do segundo pico, não foi observado nenhuma atividade enzimática testada, no entanto, é provável que seja rica em atividade de amilase, pois *A. awamori* é um fungo majoritariamente produtor de amilases (ANINDYAWATI et al., 1998; PAVEZZI; GOMES; DA SILVA, 2008), porém a atividade enzimática de amilases não foi avaliada no presente estudo. As frações presentes no vale apresentaram atividades no substrato CMC e xilana, indicando a presença de xilanases e endoglucanases de menor massa molecular. O último pico da amostra não apresentou nenhuma atividade enzimática testada. O sobrenadante enzimático de *A. awamori* é escuro e foi possível observar macroscopicamente que a eluição dos pigmentos que compõe o sobrenadante se dá ao final da corrida cromatográfica, o que sugere que o pico final da amostra identificado pelas análises das frações no comprimento onda 280 nm pode ser relativo à interferência de pigmentos, que provavelmente são formados por anéis aromáticos que absorvem luz nessa faixa do espectro.

Sendo assim, após a caracterização das atividades enzimáticas de cada uma das frações, as que tiveram a mesma atividade enzimática foram agrupadas, formando quatro frações principais a partir das 95 iniciais. A divisão está ilustrada na Figura 17. Foram realizadas oito corridas cromatográficas com a mesma condição, e as quatro frações das oito corridas foram agrupadas. Como resultado do fracionamento, foram obtidas a fração 1 (F1), rica em atividade de β-glicosidase e xilanase; a fração 2 (F2), sem atividade especificada; a fração 3, rica em atividade de endoglucanase e xilanase; e a fração 4 (F4) rica em atividade de xilanase. A quantidade em volume e a concentração de proteínas de cada uma das frações estão apresentadas na Tabela 6. O objetivo de agrupar as frações foi facilitar as análises posteriores de identificação das proteínas de cada fração por espectrometria de massas e da utilização da fração rica em endoglucanases na suplementação da hidrólise enzimática com alto teor de sólidos.



Figura 16. Perfil de eluição das proteínas do sobrenadante enzimático de *A. awamori* utilizando cromatografia de exclusão com a resina Sephadex -75 e a quantificação enzimática qualitativa de (A) B-glicosidase (B) xilanase e (C) CMCase.



Figura 17. Criação das quatro frações do sobrenadante enzimático de *A. awamori*, a partir das junções das frações com a mesma atividade enzimática qualitativa. Fracionamento obtido através de cromatografia de exclusão com a resina Sephadex G-75.

Tabela 6. Concentração de proteínas e volume total das frações obtidas após fracionamento do sobrenadante enzimático de *A. awamori* por cromatografia de exclusão.

Fração	Concentração de proteínas (mg/mL)	Volume (mL)
F1	0,11	190
F2	0,54	185
F3	0,31	306
F4	0,20	170

6.4.2 Identificação das proteínas das frações do sobrenadante enzimático de *A*. *awamori* por espectrometria de massas

Com o objetivo de confirmar que a F3 é rica em endoglucanases e para identificar outras enzimas presentes no sobrenadante enzimático de *A. awamori* que participam da hidrólise enzimática da celulose, as frações F1 a F4 foram submetidas à identificação por espectrometria de massas. As próximas seções irão detalhar as classes enzimáticas e, principalmente, quais enzimas envolvidas na conversão da celulose a glicose estão presentes em cada uma das frações do sobrenadante enzimático de *A. awamori*.

analisar separadamente, Venny Antes de as frações a ferramenta (https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/) foi utilizada para gerar um diagrama de Venn das proteínas identificadas nas quatro frações analisadas, mostrando graficamente o número de proteínas assinaladas exclusivamente em cada fração e as proteínas comuns dentre duas, três ou às quatro frações. A Figura 18 mostra que na F4 foram identificadas 8 proteínas, sendo que dentre estas apenas uma está presente exclusivamente em F4. Essa proteína é o alérgeno Asp F 15, proteína das espécies do gênero Aspergillus associada a reações alérgicas em humanos (RUBINI et al., 2017). Como essa proteína não é relevante para a hidrólise enzimática da celulose, a F4 foi desconsiderada nas análises seguintes.



Figura 18. Diagrama de Venn do número e percentual de proteínas identificadas por espectrometria de massas nas quatro frações do sobrenadante enzimatico de *A. awamori*. Gerado por: https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/

Sendo assim, um novo diagrama de Venn foi gerado com as frações F1, F2 e F3 (Figura 19).



Fração 3

Figura 19. Diagrama de Venn do número de percentual total das proteínas identificadas por espectrometria de massas nas frações F1, F2 e F3 do sobrenadante enzimático de *A. awamori*. Gerado por: https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/

Na F1 foram identificadas 64 proteínas únicas, seguida da F3 e F2, com 19 e 4, respectivamente. A F2 é a que mais compartilha proteínas individualmente com as outras frações, provavelmente devido à proximidade com as duas durante a eluição cromatográfica. Cinco proteínas foram identificadas como sendo comuns às três frações analisadas (Quadro 2).

Nº de acesso	Proteína	Massa molecular estimada (kDa)
A0A401KXT8	Glucoamilase	68
A0A401KS37	β-glicosidase	94
A0A401L3U7	Glucanase	56
A0A401KPI8	Glucanase	48
A0A401L6U8	Proteína não caracterizada	23

Quadro 2. Informações das cinco proteínas comuns às frações F1, F2 e F3 do sobrenadante enzimático de A. awamori.

A identificação das mesmas proteínas nas diferentes frações pode estar relacionada à abundância relativa dessas proteínas, no entanto, é necessário testar outras condições cromatográficas para confirmar esta hipótese. Todas as proteínas caracterizadas e identificadas nas quatro frações são hidrolases ativas em carboidrato, no entanto, duas delas não tiveram a função específica identificada (A0A401L3U7 e A0A401KPI8). Dentre as quatro que tiveram a função especificada, há uma glucoamilase. Como dito anteriormente, o fungo *A. awamori* já foi reportado como sendo produtor de amilases. As glucoamilases são exoenzimas, que clivam as ligações glicosídicas do tipo α -1,4 da extremidade não redutora das cadeias glicosídicas (TRONO, 2019). Essa é uma das enzimas com histórico mais antigo de utilização industrial, sendo ainda hoje uma das mais utilizadas na indústria alimentícia, além de ser largamente empregada para produção de etanol combustível a partir do amido (KUMAR; SATYANARAYANA, 2009).

Outra enzima identificada nas três frações foi a β -glicosidase. Era de se esperar a identificação de uma β -glicosidase, pois como mencionado anteriormente, o sobrenadante de *A. awamori* é utilizado na hidrólise enzimática da celulose com o objetivo de suplementar a atividade de β -glicosidase. Outros trabalhos já reportaram a identificação de β -glicosidases de *A. awamori*, de massa molecular de 180 kDa e 116 kDa, massa superior a massa estimada da β -glicosidase identificada nesse estudo de 94 kDa (NISHIDA et al., 2018; PETROVA et al., 2002). Uma proteína não caracterizada de massa molecular estimada em 23 kDa foi identificada.

Nas próximas seções, serão detalhadas as enzimas presentes nas frações F1, F2 e F3, com enfoque nas hidrolases envolvidas na conversão da celulose em glicose.

6.4.2.2 Análise da fração um do sobrenadante enzimático de Aspergillus awamori

Foram identificadas ao total 85 proteínas na F1. Das 85 proteínas, 73% pertencem a classe enzimática de hidrolases, 8% oxidorredutases e 4% de transferases (Figura 20). Como as três classes enzimáticas (CBH, EG e BG) envolvidas na hidrólise da celulose em glicose são hidrolases, foi realizada uma correlação entre as hidrolases identificadas e as biomoléculas correlacionadas com a atividade de tais enzimas. Das hidrolases identificadas, 56% participam do metabolismo de carboidratos, 24% de proteínas, sendo os 20% restantes correlacionados a outras biomoléculas.



Figura 20. (A) Classe enzimática de todas as proteínas identificadas na fração 1 do sobrenadante enzimático de *A. awamori* e (B) as biomoléculas em que as hidrolases identificadas são ativas.

Dentre as hidrolases envolvidas no metabolismo de carboidratos presentes na F1, apenas três estão envolvidas na hidrólise enzimática da celulose (Quadro 3), sendo todas identificadas como β -glicosidases, incluindo a que foi identificada como comum à todas as frações.

Nº de acesso	Proteína	Exclusiva da fração?	Massa molecular estimada (kDa)
A0A401KS37	β-glicosidase	Não	94
A0A401KZ55	β-glicosidase periplasmática	Sim	88
A0A401KLT2	Provável β-glicosidase M	Sim	82

Quadro 3. Informações das enzimas envolvidas na hidrólise enzimática da celulose identificadas na F1 do sobrenadante enzimático de *A. awamori*.

Outra enzima identificada é uma β -glicosidase que é secretada na região periplasmática, ou seja, entre a parede celular e a membrana plasmática do fungo. Já a outra β -glicosidase, é uma provável β -glicosidase M, uma proteína expressa pelo gene bglM, presente em espécies do gênero *Aspergillus* e em outros microrganismos (Uniprot). A lista completa das proteínas identificadas na F1 encontra-se no Apêndice A. O resultado encontrado na identificação por espectrometria de massas é compatível com o resultado observado das atividades enzimáticas qualitativas testadas durante o fracionamento do sobrenadante (Figura 16), uma vez que F1 foi a fração com maior atividade o substrato pNPG. Embora as β -glicosidases sejam enzimas importantes para a hidrólise enzimática, a F1 não será considerada prioritariamente para a avaliação do potencial de liquefação na hidrólise enzimática com alto teor de sólidos nesse estudo, pois a hipótese inicial da melhora na liquefação do bagaço de cana-de-açúcar se baseia na ação de endoglucanases presentes no sobrenadante enzimático de *A. awamori*.

6.4.2.3 Análise da fração dois do sobrenadante enzimático de Aspergillus awamori

Foram identificadas ao todo 29 proteínas na F2, sendo 80% pertencentes a classe das hidrolases, 3% de oxidorredutases e 7% de transferases. Dentre as hidrolases identificadas, 75% estão envolvidas no metabolismo de carboidratos, 21% de proteínas e 4% com o metabolismo de nucleotídeos (Figura 21).



Figura 21. (A) Classe enzimática de todas as proteínas identificadas na fração 2 do sobrenadante enzimático de *A. awamori* e (B) as biomoléculas em que as hidrolases identificadas são ativas.

Considerando as hidrolases envolvidas no metabolismo de carboidratos, apenas uma está relacionada a hidrólise enzimática da celulose, sendo esta a β-glicosidase que está presente em todas as frações. Todas as proteínas identificadas na F2 estão apresentadas no Apêndice B. Os resultados encontrados também estão coerentes com os resultados das dosagens enzimáticas realizadas após fracionamento, uma vez que nenhuma atividade predominante dentre as atividades de β-glicosidase, xilanase e CMCase foi observada como sendo compatível ao no pico de proteína da F2. Além disso, foi dito anteriormente que provavelmente o pico de F2 era correspondente à presença de amilases. A abundância relativa (emPAI) da glucoamilase na F2 é a maior quando comparado com as das outras proteínas, no entanto, outras metodologias durante a análise por espectrometria de massa são necessárias para confirmar que a F2 é formada majoritariamente por glucoamilases. Como a F2 não apresentou nenhuma enzima exclusiva relacionada à hidrólise enzimática da celulose, essa fração também não será prioritariamente considerada para suplementar o meio de hidrólise enzimática com alto teor de sólidos com o objetivo de avaliar o potencial de liquefação.

6.4.2.4 Análise da fração três do sobrenadante enzimático de Aspergillus awamori

Das 30 proteínas identificadas na F3, 77% foram assinaladas como hidrolases e 3% de transferases e 2% isomerases. Desse total, 97% das hidrolases encontradas estavam relacionadas com o metabolismo de carboidratos (Figura 22).



Figura 22. (A) Classe enzimática de todas as proteínas identificadas na fração 3 do sobrenadante enzimático de *A. awamori* e (B) as biomoléculas em que as hidrolases identificadas são ativas.

Como dito anteriormente, a F3 no fracionamento do sobrenadante, apresentou a maior atividade relativa no substrato CMC (Figura 16), o que corrobora com os dados obtidos na análise por espectrometria de massa, uma vez que foram identificadas três endoglucanases exclusivamente presentes na F3, além de uma provável endoglucanase D (Quadro 4). Aparentemente, no sobrenadante de *A. awamori* há 3 isoformas de endoglucanases. A endoglucanase A apresentou o maior número de abundância relativa (emPAI) quando comparada às outras endoglucanases e comparada a F3 total só foi menor do que uma proteína não caracterizada.

Nº de acesso	Enzima	Exclusiva da fração?	Massa molecular estimada (kDa)
A0A401KJH0	Endoglucanase A	Sim	25
A0A401L2H3	Endoglucanase E1	Sim	45
A0A401KS37	β-glicosidase	Não	94
A0A401KU32	Endoglucanase-4	Sim	41
A0A401L877	Provável endo-β-1,4- glucanase D	Sim	36

Quadro 4. Informações sobre as enzimas envolvidas na hidrólise enzimática da celulose identificadas na fração F3 do sobrenadante enzimático de *A. awamori*.

Endoglucanases já foram purificadas de sobrenadantes enzimáticos de *A. awamori*, como reportado por Singh e colaboradores, que isolaram uma endoglucanase termoestável com massa molecular de 43 kDa, valor aproximado da endoglucanase-4 e da endoglucanase E1 identificada no presente estudo (SINGH et al., 2011). Outro estudo isolou uma endoglucanase de *A. awamori* com massa molecular entre 26 e 28 kDa, valor próximo da endoglucanase A apresentada no Quadro 4 (DOBREV; ZHEKOVA, 2012). Todas as proteínas identificadas na F3 estão apresentadas no Apêndice C. Devido à presença e abundância de endoglucanases na F3, a mesma foi escolhida para ser testada na hidrólise enzimática em alto conteúdo de sólidos, a fim de avaliar seu potencial para liquefação da biomassa em comparação ao sobrenadante antes do fracionamento.

Antes de apresentar os resultados da suplementação com a fração rica em endoglucanases de *A. awamori*, uma corrida de eletroforese das quatro frações foi realizada a fim de avaliar a heterogeneidade da amostra, verificar a eficácia do fracionamento e estimar a massa molecular das proteínas presentes em cada fração.

6.4.3 Gel de eletroforese

As frações da cromatografia foram submetidas à análise por eletroforese. As proteínas de F1 e F2 se concentraram no início do gel, tendo a presença abundante de proteínas com massa molecular superior a 66,2 kDa, confirmando os dados apresentados no Quadro 3. Embora tenha sido identificada em todas as frações, a glucoamilase de cerca de 68 kDa não está abundantemente presente nas frações 3 e 4. A F3 possui uma proteína de aproximadamente 25 kDa, que pode ser a endoglucanase A identificada, como mostra o Quadro 4, além disso, a abundância relativa (emPAI) dessa proteína se encontra mais alta do que a maioria das proteínas identificadas na F3.

Além disso, esta análise confirma a hipótese inicial de que os dados de absorvância obtidos a 280 nm para os tubos do fracionamento que compões a F4 estão correlacionados majoritariamente à pigmentos e não à proteínas, uma vez que são observadas apenas bandas bem claras nessa amostra. Ademais, foi possível observar que a cromatografia de exclusão por tamanho foi eficiente em separar frações com diferentes massas moleculares.

Após o fracionamento do sobrenadante enzimático de *A. awamori* e a identificação da fração rica em endoglucanases, foi realizado o ensaio de hidrólise enzimática com 30% de

sólidos, utilizando a F3 misturada com o coquetel enzimático CT2. Paralelamente, as condições CT2 e CT2Aa também foram analisadas, visando identificar o perfil de hidrólise da suplementação com F3 e a similaridade com CT2Aa.



Figura 23. Perfil da corrida eletroforética em gel desnaturante (SDS-PAGE) (12%) das quatro frações do sobrenadante enzimático de *A. awamori* recuperadas após fracionamento por cromatografia de exclusão utilizando a resina Sephadex G-75.

6.4.4 Efeito da suplementação com a fração rica em endoglucanases de *Aspergillus awamori* no perfil da hidrólise enzimática com alto teor de sólidos

Para esse ensaio, devido a pouca quantidade restante da biomassa pré-tratada do lote estudado na Parte 1, foi necessário diminuir a massa do ensaio total de 5 g para 2,5 g. Ademais, foi utilizado um lote diferente da enzima Cellic® CTec 2, uma vez que o lote utilizado nos ensaios da Parte 1 desse trabalho não estava mais disponível. O mesmo sobrenadante enzimático de *A. awamori* que foi submetido ao fracionamento, foi utilizado nessa etapa do estudo. As atividades enzimáticas dos coquetéis enzimáticos utilizados nessa etapa do estudo estão apresentadas na Tabela 7. Foi utilizada uma carga enzimática de 20 FPU/g de celulose em todas as três condições observadas.

Tabela 7. Atividades enzimáticas de FPase, β -glicosidase e CMCase dos coquetéis enzimáticos utilizados na Parte 2 do estudo durante hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com 30% de sólidos.

Coquetel enzimático	FPase (FPU/mL)	β-glicosidase BGU/mL	CMCase (IU/mL)
Cellic® CTec2 (CT2)	128,7	5827,5	6145,7
Sobrenadante de Aspergillus awamori (Aa)	*	36,5	5,6

*Não foi observada atividade enzimática

A quantidade proteína utilizada em CT2Aa foi de 9,71 mg em cada reação, enquanto foram utilizados 8,25 mg de proteínas da fração F3 em cada reação.

A Figura 24 apresenta o efeito da suplementação de CT2 com a fração F3 (CT2F3) do sobrenadante enzimático no perfil de liberação da glicose ao longo de 24 horas e da viscosidade do meio em 6 h de hidrólise, comparado ao uso de CT2 isoladamente ou suplementado com o sobrenadante total de *A. awamori* (CT2Aa).



Figura 24. Efeito da suplementação com a fração de *A. awamori* rica em endoglucanases (F3) no coquetel comercial CT2 (CT2F3), comparada com o coquetel sem suplementação (CT2) e o coquetel com suplementação do sobrenadante enzimático total de *A. awamori* (CT2Aa). (A) Perfil de liberação de glicose durante hidrólise enzimática com 30% de sólidos do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente durante 24 h. Linha vermelha: CT2; linha verde: CT2; F3; linha azul: CT2Aa. (B) Viscosidade do meio reacional em 6 h de hidrólise, com taxa de cisalhamento de 1-26 s⁻¹. \diamond : CT2; Δ : CT2F3; \Box : CT2Aa.

Como é possível analisar, ao suplementar CT2 com Aa e com F3, o perfil de liberação de glicose em 3 e 6 h se coincidem, sendo observado um aumento de aproximadamente 10 g/L de glicose quando comparada com CT2. O aumento na liberação de glicose observado é condizente com a hipótese de SILVA e colaboradores, que observou uma maior solubilização de sólidos nas primeiras 6 h de hidrólise utilizando o coquetel enzimático preparado em laboratório TrAa, e supôs que esse efeito era observado devido à presença de endoglucanases do sobrenadante enzimático de A. awamori (SILVA et al., 2016). Um aumento da sacarificação da palha de arroz pré-tratada também já foi observado ao suplementar o meio com uma endoglucanase de Aspergillus terreus, no entanto o trabalho mostrou que o aumento só foi possível ser observado em 12 h de hidrólise enzimática (NARRA et al., 2014). Em 9 h e 24 h de hidrólise enzimática, CT2Aa segue superior a CT2, enquanto CT2F3 tendeu a solubilizar a mesma quantidade de glicose que CT2. Esses resultados indicam que a suplementação com a fração F3 do sobrenadante enzimático de A. awamori aumenta a solubilização de glicose apenas na fase inicial da hidrólise enzimática, enquanto a suplementação com o sobrenadante total segue melhorando a hidrólise enzimática com alto teor de sólidos. A atividade enzimática CMCase é utilizada para inferir a atividade de endoglucanases, no entanto, como está apresentado na Tabela 7, CT2 possui cerca de 1000 vezes mais unidades de CMCase do que Aa. Considerando o volume adicionada de cada um dos coquetéis enzimáticos nas reações, CT2 conferiu cerca de 384 U de CMCase/ g de biomassa, enquanto Aa contribuiu com 9.7 U de CMCase/ g de biomassa. Esses resultados indicam que a provável endoglucanase de A. awamori envolvida na melhora da hidrólise enzimática com alto teor de sólidos possui características que conferem vantagem frente às endoglucanases presentes em CT2, no entanto, estudos mais aprofundados da caracterização e comparação das endoglucanases dos dois coquetéis são necessários.

A melhora no início da hidrólise enzimática na primeira etapa do estudo foi observada concomitantemente com a diminuição da viscosidade do meio, sendo assim, as viscosidades dos três meios reacionais foram analisadas. Apenas o tempo de 6 h foi analisado e devido a dificuldades técnicas de *wall-slip*, ou seja, quando as amostras "escorregam" para fora da geometria do reômetro durante o cisalhamento, efeito comum em amostras com alto teor de sólidos. Devido a isso, apenas a taxa de cisalhamento 1-26 s⁻¹ está apresentada na Figura 24. A viscosidade de CT2Aa e CT2F3 se sobrepuseram, enquanto CT2 apresentou uma viscosidade um pouco maior quando comparado aos outros dois coquetéis enzimáticos. Uma diminuição na viscosidade durante hidrólise enzimática com alto teor de sólidos ao utilizar uma endoglucanase purificada já foi observada por SZIJÁRTÓ e colaboradores, que

comparou com outras classes enzimáticas e concluiu que a diminuição da viscosidade do meio de hidrólise é mediada pelas endoglucanases (SZIJÁRTÓ et al., 2011b, 2011a). Outro estudo analisou a diminuição de viscosidade de dois materiais lignocelulósicos ao suplementar o meio de hidrólise enzimática com endoglucanases, e foi observada uma diminuição significativa da viscosidade nas primeiras 6 h de hidrólise da madeira de conífera pré-tratada. No entanto, esse efeito não foi observado na palha de milho pré-tratada, o que indicou que o efeito de diminuição de viscosidade mediado por endoglucanases é dependente da biomassa a ser hidrolisada (KADIĆ; LIDÉN, 2018). A diminuição de viscosidade por endoglucanases também foi observada ao utilizar celulose micro/nanofibrilada como substrato, por um efeito, segundo os autores, de diminuição da interação fibrila-fibrila e dos emaranhados das fibras da celulose (GOURLAY et al., 2018). Assim como na primeira etapa, em que a melhora na hidrólise foi observada juntamente com a diminuição da viscosidade do meio, uma tendência de diminuição de viscosidade foi observada ao suplementar o meio com o sobrenadante enzimático e com a fração F3 de A. awamori, indicando que esta fração contém as enzimas/proteínas acessórias responsáveis pela diminuição da viscosidade do meio reacional de hidrólise enzimática em alto teor de sólidos. No entanto, análises dos outros tempos de hidrólise e os ensaios com as outras frações são necessários para o completo entendimento da contribuição do sobrenadante enzimático de A. awamori e das endoglucanases na hidrólise enzimática com alto teor de sólidos.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho foi possível concluir que:

- Os coquetéis enzimáticos, mesmo quando adicionados às reações com dosagens idênticas de celulases totais (FPase) e β-glicosidase, influenciam diferentemente o padrão de comportamento de fluxo do meio reacional de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado em meio com 30% de sólidos. Ou seja, ao utilizar diferentes coquetéis enzimáticos, diferentes padrões de liquefação foram observados, sendo provavelmente associados a enzimas e/ou proteínas assessorias que não são diretamente quantificadas;
- Os coquetéis enzimáticos, mesmo quando adicionados às reações com dosagens idênticas de celulases totais (FPase) e β-glicosidase, acarretam na liberação de glicose diferentemente durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado em meio com 30% de sólidos. Analogamente ao observado para a liquefação, isso ocorre provavelmente devido à efeitos secundários da ação de enzimas e/ou proteínas assessorias que não são diretamente quantificadas e que auxiliam a atuação das celulases e β-glicosidases;
- O coquetel enzimático preparado em laboratório (TrAa) é capaz de promover uma maior e mais rápida liquefação do meio de hidrólise enzimática do bagaço de cana-deaçúcar pré-tratado em meio com 30% de sólidos, quando comparado com os coquetéis comerciais, devido à provável presença de enzimas ou proteínas acessórias no sobrenadante enzimático de *A. awamori*, hipótese levantada por estudos do nosso grupo anteriores à este;
- O sobrenadante de *A. awamori*, ao ser adicionado aos coquetéis enzimáticos comerciais, mesmo sem alterar significativamente as dosagens enzimáticas, foi capaz de diminuir a viscosidade do meio reacional e aumentar a liberação de glicose liberada durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com 30% de sólidos;

 A identificação de uma fração rica em endoglucanases no sobrenadante enzimático de *A. awamori* e a indicação de que essa fração é capaz de promover a diminuição da viscosidade e o aumento da liberação de glicose de maneira semelhante ao sobrenadante completo de *A. awamori*, dão suporte à hipótese levantada por trabalhos anteriores do nosso grupo de que o sobrenadante de *A. awamori* contém proteínas, provavelmente endoglucanases, responsáveis por uma liquefação eficiente.

8 PERSPECTIVAS

Após demonstrar que o sobrenadante enzimático de *A. awamori* é capaz de impulsionar e liquefazer eficientemente o meio da hidrólise enzimática em alto teor de sólidos, seria interessante avaliar a suplementação do coquetel comercial Cellic® CTec2 com todas as frações do sobrenadante enzimático de *A. awamori*. Desta maneira, seria possível identificar a contribuição de cada enzima ou proteína acessória presente nesse sobrenadante enzimático. Nesse estudo, apenas um tipo de biomassa pré-tratada foi avaliada. Logo, para entender a extensão do benefício da suplementação de *A. awamori* para etapa de liquefação da hidrólise com alto teor de biomassas lignocelulósicas de forma mais ampla, seria necessário realizar o estudo com outras biomassas tratadas hidrotermicamente ou mesmo do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por outros métodos.

Além disso, após confirmar que a suplementação do coquetel Cellic® CTec2 com a fração de *A. awamori* rica em endoglucanases é capaz de melhorar a sacarificação e aparentemente a liquefação em 6 h do meio de hidrólise enzimática em alto teor de sólidos, é necessário a avaliação da viscosidade de todos os tempos de hidrólise enzimática, para assim afirmar que a melhora na sacarificação está relacionada à diminuição da viscosidade do meio de hidrólise com alto teor de sólidos.

Ademais, para a continuidade desse estudo, é desejável a purificação e caracterização das endoglucanases da fração F3 do sobrenadante enzimático de *A. awamori*. Desta maneira, será possível a elucidação das características das endoglucanases de *A. awamori* que favorecem a liquefação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado em meio com alto teor de sólidos.

REFERÊNCIAS

ADNEY, B.; BAKER, J. Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 08 / 12 / 1996 Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure (LAP). **Renewable Energy**, 1996.

ALLEN, S. G. et al. A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, 2001.

ANINDYAWATI, T. et al. Three different types of α -amylases from aspergillus awamori KT-11: Their purifications, properties, and specificities. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 1998.

ARAÚJO, D. J. C.; MACHADO, A. V.; VILARINHO, M. C. L. G. Availability and Suitability of Agroindustrial Residues as Feedstock for Cellulose-Based Materials: Brazil Case Study. **Waste and Biomass Valorization**, 2019.

ASSUNÇÃO, J.; CHIAVARI, J. Towards efficient land use in Brazil. **Climate Policy Initiative**, Sept. 2015. (The new climate economy: the Global Commission on the Economy and Climate). Disponível em: < <u>https://climatepolicyinitiative.org/publication/towards-</u> <u>efficient-land-use-in-brazil/</u>>. Acesso em: 28 set. 2015.

AZIZI SAMIR, M. A. S.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. **Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite fieldBiomacromolecules**, 2005.

BADIEYAN, S.; BEVAN, D. R.; ZHANG, C. Probing the active site chemistry of β -glucosidases along the hydrolysis reaction pathway. **Biochemistry**, 2012.

BAR-ON, Y. M.; PHILLIPS, R.; MILO, R. The biomass distribution on Earth. **Proceedings** of the National Academy of Sciences, 2018.

BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. Enzymes in farm animal nutrition. [s.l: s.n.].

BEGUM, F.; ABSAR, N.; ALAM, M. S. Purification and characterization of extracellular cellulase from A. oryzae ITCC-4857.01. Journal of Applied Sciences Research, 2009.

BERNARDI, A. V. et al. Functional characterization of GH7 endo-1,4- β -glucanase from Aspergillus fumigatus and its potential industrial application. **Protein Expression and Purification**, 2018.

BERNARDI, A. V. et al. A thermostable Aspergillus fumigatus gh7 endoglucanase overexpressed in pichia pastoris stimulates lignocellulosic biomass hydrolysis. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019.

BON, Elba Pinto da Silva *et al.* **Composição de enzimas, uso da composição na hidrólise enzimática de material lignocelulósico, processo de produção de enzimas que degradam a fração de polissacarídeos da biomassa, processo de produção de álcool utilizando a composição de enzima.** Depositante: Universidade Federal do Rio de Janeiro; Universidade de Brasília; Universidade Estadual de Campinas. PI 0705744-0 B1. Depósito: 19 nov. 2007. Concessão: 13 jun. 2017.

BONOMI, A. et al. The Virtual Sugarcane Biorefinery Concept. In: [s.l: s.n.].

BORDONAL, R. DE O. et al. Sustainability of sugarcane production in Brazil. A reviewAgronomy for Sustainable Development, 2018.

BOYCE, A.; WALSH, G. Characterisation of a novel thermostable endoglucanase from Alicyclobacillus vulcanalis of potential application in bioethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2015.

BRAGA, C. M. P. et al. Addition of feruloyl esterase and xylanase produced on-site improves sugarcane bagasse hydrolysis. **Bioresource Technology**, 2014.

BRECCIA, J. D. et al. Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method. **Journal of Applied Bacteriology**, 1995.

BRIENZO, M. SUGARCANE BAGASSE HEMICELLULOSE PROPERTIES, EXTRACTION TECHNOLOGIES AND XYLOOLIGOSACCHARIDES PRODUCTION. In: Food waste. [s.l: s.n.].

CAO, L. et al. Lignin valorization for the production of renewable chemicals: State-ofthe-art review and future prospectsBioresource Technology, 2018.

CARA, C. et al. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. **Process Biochemistry**, 2007.

CHEN, X. et al. Kinetics and Rheological Behavior of Higher Solid (Solids >20%) Enzymatic Hydrolysis Reactions Using Dilute Acid Pretreated, Deacetylation and Disk Refined, and Deacetylation and Mechanical Refined (DMR) Corn Stover Slurries. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, 2019.

CHENG, M. H. et al. Economic analysis of cellulosic ethanol production from sugarcane bagasse using a sequential deacetylation, hot water and disk-refining pretreatment. **Processes**, 2019.

COFFMAN, P. et al. In Situ Rheological Method to Evaluate Feedstock Physical Properties Throughout Enzymatic Deconstruction. **Frontiers in Energy Research**, 2018.

CONAB. Acompanhamento da Safra Basileira 2019/20. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2019/20, 2019.

CRUZ, A. G. et al. Impact of high biomass loading on ionic liquid pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, 2013.

CUNHA, F. M. et al. Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production. **Bioresource Technology**, 2014.

DA SILVA, A. S. et al. Sugarcane and Woody Biomass Pretreatments for Ethanol Production.

In: Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization. [s.l: s.n.].

DASARI, R. K.; DUNAWAY, K.; BERSON, R. E. A scraped surface bioreactor for enzymatic saccharification of pretreated corn stover slurries. **Energy and Fuels**, 2009.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2001.

DOBREV, G. T.; ZHEKOVA, B. Y. Biosynthesis, purification and characterization of endoglucanase from a xylanase producing strain Aspergillus niger B03. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2012.

EWANICK, S.; BURA, R. Hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass. In: **Bioalcohol Production: Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass**. [s.l: s.n.].

FACHE, M.; BOUTEVIN, B.; CAILLOL, S. Vanillin Production from Lignin and Its Use as a Renewable Chemical. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, 2016.

FOWLER, T.; BROWN, R. D. The bgI1 gene encoding extracellular β -glucosidase from Trichoderma reesei is required for rapid induction of the cellulase complex. **Molecular Microbiology**, 1992.

FROMMHAGEN, M. et al. Boosting LPMO-driven lignocellulose degradation by polyphenol oxidase-activated lignin building blocks. **Biotechnology for Biofuels**, 2017.

GALBE, M.; WALLBERG, O. Pretreatment for biorefineries: A review of common methods for efficient utilisation of lignocellulosic materialsBiotechnology for Biofuels, 2019.

GALIA, A. et al. Autohydrolysis pretreatment of Arundo donax: A comparison between microwave-assisted batch and fast heating rate flow-through reaction systems. **Biotechnology for Biofuels**, 2015.

GERRES, T. et al. A review of cross-sector decarbonisation potentials in the European energy intensive industryJournal of Cleaner Production, 2019.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry, 1987.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A reviewBioresource Technology, 2010.

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

GOURLAY, K. et al. The potential of endoglucanases to rapidly and specifically enhance the rheological properties of micro/nanofibrillated cellulose. **Cellulose**, 2018.

HAO, X. et al. Adsorption and desorption of cellulases on/from lignin-rich residues from corn stover. **Industrial Crops and Products**, 2019.

HAROLDO JOSÉ TORRES DA SILVA; PEDRO VALENTIM MARQUES. Evolution of Production Costs in Brazilian Sugar-Energy Sector. **China-USA Business Review**, 2017.

HASPER, A. A. et al. EglC, a new endoglucanase from Aspergillus niger with major activity towards xyloglucan. **Applied and Environmental Microbiology**, 2002.

HODGE, D. B. et al. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Bioresource Technology**, 2008.

HOFSETZ, K.; SILVA, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. **Biomass and Bioenergy**, 2012.

HOU, W. et al. On-site measurement and modeling of rheological property of corn stover hydrolysate at high solids content. **Biochemical Engineering Journal**, 2016.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: Is it an additive or synergistic effect? **Biotechnology for Biofuels**, 2011.

HUMBIRD, D. et al. Economic impact of total solids loading on enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated corn stover. **Biotechnology progress**, 2010.

INOUE, H. et al. Identification and characterization of core cellulolytic enzymes from Talaromyces cellulolyticus (formerly Acremonium cellulolyticus) critical for hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, 2014.

ISHIZAKI, H.; HASUMI, K. Ethanol Production from Biomass. In: **Research Approaches** to Sustainable Biomass Systems. [s.l: s.n.].

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, 2015.

ISO. International Sugar Organization. **Cogeneration opportunities in the world sugar industries**. Disponível em: <<u>http://www.cogensp.com.br/</u>> Acesso em: 03 jan. 2020.

JØRGENSEN, H. et al. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. **Biotechnology and Bioengineering**, 2007.

JOSEFSSON, P.; HENRIKSSON, G.; WÅGBERG, L. The physical action of cellulases revealed by a quartz crystal microbalance study using ultrathin cellulose films and pure cellulases. **Biomacromolecules**, 2008.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applicationsRenewable and Sustainable Energy Reviews, 2014.

KADIĆ, A.; LIDÉN, G. Viscosity reduction of pretreated softwood by endoglucanases. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2018.

KARNAOURI, A. C.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cloning, expression, and characterization of a thermostable GH7 endoglucanase from Myceliophthora thermophila capable of high-consistency enzymatic liquefaction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014.

KIM, D. Physico-chemical conversion of lignocellulose: Inhibitor effects and detoxification strategies: A mini reviewMolecules, 2018.

KNUTSEN, J. S.; LIBERATORE, M. W. Rheology modification and enzyme kinetics of high-solids cellulosic slurries: An economic analysis. **Energy and Fuels**, 2010.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, 2009.

KUMAR, A. et al. A Review of Factors affecting Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Lignocellulosic Biomass. **Research Journal of Chemistry and Environment**, 2018.

KUMAR, A.; NARAIAN, R. Differential Expression of the Microbial β -1,4-Xylanase, and β -1,4-Endoglucanase Genes. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. [s.1: s.n.].

KUMAR, P.; SATYANARAYANA, T. Microbial glucoamylases: Characteristics and applicationsCritical Reviews in Biotechnology, 2009.

LABAT, G. A. A.; GONÇALVES, A. R. Oxidation in acidic medium of lignins from agricultural residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2008.

LASER, M. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, 2002.

LEAL, M. R. L. V. et al. Sugarcane straw availability, quality, recovery and energy use: A literature review. **Biomass and Bioenergy**, 2013.

LEVASSEUR, A. et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for Biofuels**, 2013.

LOBO, P. C. et al. Economics of alternative sugar cane milling options. **Applied Thermal Engineering**, 2007.

LU, X. et al. The adsorption properties of endoglucanase to lignin and their impact on hydrolysis. **Bioresource Technology**, 2018.

LUDWIG, D. et al. High solids enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic materials with a powerful stirrer concept. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2014.

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

MACHADO, D. L. et al. Adsorption characteristics of cellulase and β -glucosidase on Avicel, pretreated sugarcane bagasse, and lignin. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2015.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 1959.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A reviewBiomass and Bioenergy, 2013.

MOUTTA, R. DE et al. Comparative Response and Structural Characterization of Sugarcane Bagasse, Straw and Bagasse-Straw 1:1 Mixtures Subjected to Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Conversion. Journal of Microbial & Biochemical Technology, v. 01, n. S12, 2013.

NARRA, M. et al. Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from aspergillus terreus and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 2014.

NGUYEN, T. C.; ANNE-ARCHARD, D.; FILLAUDEAU, L. Rheology of lignocellulose suspensions and impact of hydrolysis: A review. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2015.

NISHIDA, V. S. et al. Immobilization of Aspergillus awamori β -glucosidase on commercial gelatin: An inexpensive and efficient process. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018.

OCHOA-VILLARREAL, M. et al. Plant Cell Wall Polymers: Function, Structure and Biological Activity of Their Derivatives. In: **Polymerization**. [s.l: s.n.].

OKSANEN, T. et al. Treatment of recycled kraft pulps with Trichoderma reesei hemicellulases and cellulases. **Journal of Biotechnology**, 2000.

PÄÄKKO, M. et al. Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and highpressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. **Biomacromolecules**, 2007.

PANCHAPAKESAN, A.; SHANKAR, N. Fungal Cellulases: An Overview. In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Cellulase System Properties and Applications. [s.l: s.n.].

PANDEY, M. P.; KIM, C. S. Lignin Depolymerization and Conversion: A Review of Thermochemical MethodsChemical Engineering and Technology, 2011.

PARK, S. et al. Cellulose crystallinity index: Measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, 2010.

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Plant cell wall polymers as precursors for biofuelsCurrent **Opinion in Plant Biology**, 2010.

PAVEZZI, F. C.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Production and characterization of

glucoamylase from fungus Aspergillus awamori expressed in yeast Saccharomyces cerevisiae using different carbon sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2008.

PAVLENKO, N. Failure to Launch: Why Advanced Biorefineries Are So Slow to Ramp Up Production. **The International Council on Clean Transportation**. Disponível em: <<u>https://theicct.org/blog/staff/failure-to-launch-biorefineries-slow-ramp-up</u>> Acesso em: 03

jan. 2020.

PECIULYTE, A. et al. Hydrolytic potential of five fungal supernatants to enhance a commercial enzyme cocktail. **Biotechnology Letters**, 2017.

PENG, F. et al. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009.

PEREIRA, L. T. C. et al. Sugarcane bagasse enzymatic hydrolysis: Rheological data as criteria for impeller selection. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2011.

PEREIRA RAMOS, L. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materialsQuimica Nova, 2003.

PETRIDIS, L.; SMITH, J. C. Molecular-level driving forces in lignocellulosic biomass deconstruction for bioenergyNature Reviews Chemistry, 2018.

PETROVA, S. et al. Isolation and purification of an endoglucanase from trichoderma reeseim7. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, 1995.

PETROVA, S. D. et al. Purification and biochemical characteristics of β -glucosidase from aspergillus awamori k-1. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, 2002.

PONNUSAMY, V. K. et al. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potentialBioresource Technology, 2019.

PONOMAREV, A. V.; ERSHOV, B. G. Radiation-induced degradation of cellulose: From partial depolymerization to complete self-disassembly. **Radiation Physics and Chemistry**, 2018.

QIN, W. High consistency enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Master of Applied Science Dissertation**, 2010.

ROBERTS, K. M. et al. The effects of water interactions in cellulose suspensions on mass transfer and saccharification efficiency at high solids loadings. **Cellulose**, 2011.

ROCHA, G. J. DE M. et al. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**, 2015.

ROSALES-CALDERON, O.; ARANTES, V. A review on commercial-scale high-value products that can be produced alongside cellulosic ethanolBiotechnology for Biofuels, 2019.

ROSGAARD, L. et al. Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2007.

RUBINI, N. DE P. M. et al. Guia prático sobre controle ambiental para pacientes com rinite alérgica. Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia, 2017.

RUNGRATTANAKASIN, B. et al. Cloning and expression of an endoglucanase gene from the thermotolerant fungus Aspergillus fumigatus DBiNU-1 in Kluyveromyces lactis. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2018.

SALOHEIMO, M. et al. cDNA cloning of a Trichoderma reesei cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. **European Journal of Biochemistry**, 1997.

SALOHEIMO, M. et al. Enzymatic properties and intracellular localization of the novel Trichoderma reesei β-glucosidase BGLII (Cel1A). **Applied and Environmental Microbiology**, 2002.

SARASWAT, V.; BISARIA, V. S. Purification, characterization and substrate specificities of xylanase isoenzymes from melanocarpus albomyces IIS 68. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 2000.

SCHELLER, H. V., ULVSKOV, P. Hemicellulose_composition. Annu. Rev. Plant Biol., 2010.

SELIG, M. J.; THYGESEN, L. G.; FELBY, C. Correlating the ability of lignocellulosic polymers to constrain water with the potential to inhibit cellulose saccharification. **Biotechnology for Biofuels**, 2014.

SHROTRI, A.; KOBAYASHI, H.; FUKUOKA, A. Catalytic Conversion of Structural Carbohydrates and Lignin to Chemicals. In: **Advances in Catalysis**. [s.l: s.n.].

SHROTRI, A.; KOBAYASHI, H.; FUKUOKA, A. Cellulose Depolymerization over Heterogeneous Catalysts. Accounts of Chemical Research, 2018.

SILVA, A. S. DA et al. High-solids content enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse using a laboratory-made enzyme blend and commercial preparations. **Process Biochemistry**, 2016.

SILVA, V. F. N. et al. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2011.

SINGH, S. et al. Detection and Characterization of New Thermostable Endoglucanase from Aspergillus awamori Strain F 18. **J Mycol Pl Pathol**, 2011.

SKOVGAARD, P. A. et al. The role of endoglucanase and endoxylanase in liquefaction of hydrothermally pretreated wheat straw. **Biotechnology Progress**, 2014.

SLUITER, A. et al. Determination of Extractives in Biomass. Laboratory Analytical

Procedure (LAP), 2005.

SLUITER, A. et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP), 2012.

SOMERVILLE, C. et al. Toward a systems approach to understanding plant cell wallsScience, 2004.

SOUZA, M. F. DE; BON, E. P. DA S.; SILVA, A. S. DA. On-site integrated production of cellulases and β -glucosidases by Trichoderma reesei Rut C30 using steam pretreated sugarcane bagasse. **bioRxiv**, 2018.

SRISODSUK, M. et al. Trichoderma reesei cellobiohydrolase I with an endoglucanase cellulose-binding domain: Action on bacterial microcrystalline cellulose. **Journal of Biotechnology**, 1997.

STICKEL, J. J. et al. Rheology measurements of a biomass slurry: An inter-laboratory study. **Rheologica Acta**, 2009.

SZIJÁRTÓ, N. et al. Thermostable endoglucanases in the liquefaction of hydrothermally pretreated wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, 2011a. SZIJÁRTÓ, N. et al. Liquefaction of hydrothermally pretreated wheat straw at high-solids content by purified Trichoderma enzymes. **Bioresource Technology**, 2011b.

TEIXEIRA, R. S. S. et al. Purification and characterization studies of a thermostable β xylanase from Aspergillus awamori. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2010.

TEIXEIRA, R. S. S. et al. Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements. **Carbohydrate Research**, 2012.

TETER, S. A.; SUTTON, K. B.; EMME, B. Enzymatic processes and enzyme development in biorefining. In: Advances in Biorefineries: Biomass and Waste Supply Chain Exploitation. [s.l: s.n.].

TRONO, D. Recombinant Enzymes in the Food and Pharmaceutical Industries. In: Advances in Enzyme Technology. [s.l: s.n.].

VAAJE-KOLSTAD, G. et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. **Science**, 2010.

VERBANČIČ, J. et al. Carbon Supply and the Regulation of Cell Wall SynthesisMolecular Plant, 2018.

VIAMAJALA, S. et al. Rheology of corn stover slurries at high solids concentrations - Effects of saccharification and particle size. **Bioresource Technology**, 2009.

WALKER, L. P.; WILSON, D. B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview. **Bioresource Technology**, 1991.

WATSON, B. J. et al. Processive endoglucanases mediate degradation of cellulose by Saccharophagus degradans. **Journal of Bacteriology**, 2009.

WEISS, N. D.; FELBY, C.; THYGESEN, L. G. Enzymatic hydrolysis is limited by biomass– water interactions at high-solids: improved performance through substrate modifications. **Biotechnology for Biofuels**, 2019.

WESTERMARK, U. The occurrence of p-hydroxyphenylpropane units in the middle-lamella lignin of spruce (Picea abies). **Wood Science and Technology**, 1985.

WILSON, D. B. Processive and nonprocessive cellulases for biofuel production - Lessons from bacterial genomes and structural analysisApplied Microbiology and Biotechnology, 2012.

WILSON, D. B. Processive Cellulases. In: **Direct Microbial Conversion of Biomass to Advanced Biofuels**. [s.l: s.n.].

WIMAN, M. et al. Rheological characterization of dilute acid pretreated softwood. **Biotechnology and Bioengineering**, 2011.

WONG, D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymesApplied Biochemistry and Biotechnology, 2009.

WOOD, T. M. Properties of cellulolytic enzyme systems. **Biochemical Society transactions**, 1985.

WU, B. et al. Processivity and enzymatic mechanism of a multifunctional family 5 endoglucanase from Bacillus subtilis BS-5 with potential applications in the saccharification of cellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, 2018.

YANG, B. et al. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomassBiofuels, 2011.

ZACCHI, G.; AXELSSON, A. Economic evaluation of preconcentration in production of ethanol from dilute sugar solutions. **Biotechnology and Bioengineering**, 1989.

ZAMIL, M. S.; GEITMANN, A. The middle lamella - More than a glue. **Physical Biology**, 2017.

ZHANG, X.-Z.; ZHANG, Y.-H. P. Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. In: **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**. [s.l: s.n.].

	Informações	das proteín	as identi	ficada	is de Asp	ergillus a	awan	nori na f	ração	1 após cr	omatograf	fia de exo	clusão m	olecula	r (Sephadex	G-75)		
Acesso	Descrição	Cobertur a	# Peptíd eos	# PS Ms	# Peptíd eos únicos	# Grupo de proteí nas	# A As	MM [kDa]	pI	Encontr ada na amostra : [S1] F1: Amostr a	Encontr ada na amostra : [S2] F2: Amostr a	Área: F1: Amost ra	Área: F2: Amost ra	emP AI	FDR de confiabili dade da proteína Sequest HT	Valo r-q exp. Sequ est HT	Score Sequest HT	# Seque st HT de peptíd eos
A0A401K XT8	Glucoamylase	55	15	422	15	1	64 0	68,26 7	4,4 5	Alta	Alta	5,90E +09	4,70E +09	6,49 9	Alta	0	1943,25 3466	15
A0A401K S37	Beta-glucosidase	37,7880 1843	22	353	22	1	86 8	94,1	4,7 7	Alta	Alta	4,50E +09	5,90E +09	5,38 1	Alta	0	1411,83 3166	22
A0A401L 4C3	Exo-1,4-beta- xylosidase xlnD	29,7263 6816	14	185	14	1	80 4	87,14 3	4,9 1	Alta	Alta	6,20E +09	6,10E +09	3,74 8	Alta	0	803,773 9699	14
A0A401L 653	Catalase	44,8418 1568	22	178	22	1	72 7	80,22	5,2 6	Alta	Alta	2,60E +09	2,90E +09	4,87 8	Alta	0	766,746 4428	22
A0A401K W55	Alpha- glucosidase	31,3492 0635	19	183	19	1	10 08	111,4 56	5,5 3	Alta	Alta	5,30E +09	4,50E +09	3,73 2	Alta	0	756,358 6545	19
A0A401K J46	Tripeptidyl- peptidase sed2	27,6143 7908	9	89	9	1	61 2	65,70 1	5,7 7	Alta	Alta	2,20E +09	2,30E +09	2,03 9	Alta	0	376,283 8061	9
A0A401K GW5	Carboxypeptidase	19,5856 8738	5	74	5	1	53 1	59,35 8	4,9 4	Alta	Alta	3,00E +09	4,40E +09	3,39 4	Alta	0	338,766 149	5
A0A401K XD7	Protein ecm33	11,9700 7481	3	64	3	1	40 1	40,99 6	4,5 1	Alta	Alta	1,00E +09	9,20E +08	0,63 8	Alta	0	262,967 0973	3
A0A401L 3U6	Beta- galactosidase	34,7567 0308	20	58	20	1	10 07	109,6 9	5,1 9	Alta	Alta	4,70E +08	5,30E +08	2,49 5	Alta	0	241,574 2705	20
A0A401K WP9	Aminopeptidase	34,9385 2459	22	44	22	1	97 6	108,1 32	6,5 7	Alta	Alta	2,10E +08	1,30E +08	1,92 1	Alta	0	192,045 4779	22
A0A401L 6B6	Probable alpha- L- arabinofuranosid ase A	13,5430 9166	6	42	6	1	73 1	79,22	4,6 1	Alta	Alta	2,60E +08	2,10E +08	1,15 4	Alta	0	179,465 5983	6

APÊNDICE A – TODAS AS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NA FRAÇÃO UM DO SOBRENADANTE ENZIMÁTICO DE *ASPERGILLUS AWAMORI*

105

A0A401L 451	Probable alpha/beta- glucosidase agdC Uncharacterized	24,7113 164	13	45	13	1	86 6	97,28 1	5,1	Alta	Alta	1,10E +09	1,00E +09	1,62 2	Alta	0	175,549 5832	13
A0A401K XV4	FAD-linked oxidoreductase ARB 02478	15,5752 2124	6	27	6	1	56 5	61,29 2	5,3 1	Alta	Alta	2,30E +08	4,10E +08	1,01 5	Alta	0	138,861 9385	6
A0A401K G14	Uncharacterized protein	19,7761 194	9	35	9	1	80 4	86,15 4	4,7 9	Alta	Alta	4,30E +08	5,80E +08	3,83 3	Alta	0	137,127 7535	9
A0A401K ZV1	Carboxypeptidase	30,2536 2319	8	27	8	1	55 2	61,17 1	4,6 3	Alta	Alta	4,90E +08	4,50E +08	2,98 1	Alta	0	132,431 1967	8
A0A401K KD9	Probable thioredoxin reductase ARB 06224	38,7755 102	12	35	12	1	39 2	43,47 1	5,7 3	Alta	Alta	1,80E +09	1,20E +09	3,80 6	Alta	0	131,494 2119	12
A0A401K FT6	Alpha- galactosidase Probable 6-	5,31496 063	7	30	7	1	15 24	172,1 37	5,4 1	Alta	Alta	3,40E +08	9,80E +08	0,31 6	Alta	0	126,951 2153	7
A0A401L 384	phosphogluconol actonase ARB 02015	26,8844 2211	5	22	5	1	39 8	42,44 5	6,2 7	Alta	Alta	1,40E +09	1,40E +09	1,63 7	Alta	0	126,754 3268	5
A0A401K TS4	Protein SEY1	9,72972 973	7	29	7	1	14 80	164,9 61	5,2	Alta	Alta	1,80E +09	9,10E +08	0,33 4	Alta	0	120,279 9771	7
A0A401K V94	Alpha- galactosidase	23,4636 8715	7	28	7	1	53 7	59,11 1	5,0 6	Alta	Alta	3,60E +08	3,60E +08	0,88 7	Alta	0	117,520 3686	7
A0A401K KY0	Beta- hexosaminidase	30,4635 7616	10	28	10	1	60 4	67,72 9	4,8 9	Alta	Alta	1,50E +09	1,30E +09	2,02	Alta	0	112,482 3637	10
A0A401K XZ5	Carboxypeptidase S1 homolog B	24,6935 2014	8	25	8	1	57 1	62,97 5	4,6 7	Alta	Alta	8,40E +08	8,80E +08	2,16 2	Alta	0	107,824 3132	8
A0A401K RW4	Ent-kaurene oxidase	8,25574 1775	7	22	7	1	16 11	182,4 97	6,5 7	Alta	Alta	4,20E +08	1,90E +08	0,23 3	Alta	0	98,0454 9766	7
A0A401L 5W3	Acid trehalase	17,4440 2985	10	21	10	1	10 72	116,0 95	5,0 6	Alta	Alta	2,40E +08	2,80E +08	1,20 2	Alta	0	96,5582 6521	10
A0A401L 2M7	6-hydroxy-D- nicotine oxidase Probable clucar	23,8	7	19	7	1	50 0	54,61 5	5,2 2	Alta	Alta	2,50E +08	2,60E +08	1,29 1	Alta	0	87,2694 2992	7
A0A401L 3Q9	endo-1,3-beta- glucosidase ARB_02077	21,2539 8512	10	19	10	1	94 1	98,76 2	4,7	Alta	Alta	2,70E +08	3,80E +08	1,84 8	Alta	0	81,8704 7553	10

A0A401K MY5	Beta- mannosidase A Probable	22,3204 4199	12	22	12	1	90 5	101,0 06	5,1 9	Alta	Alta	3,90E +08	4,00E +08	0,97 4	Alta	0	81,8317 6875	12
A0A401K R10	extracellular serine	19,3321 6169	6	20	6	1	56 9	62,91 4	5,0 7	Alta	Alta	3,20E +08	2,80E +08	1,15 4	Alta	0	80,6527 0209	6
A0A401K L94	carboxypeptidase Alpha- galactosidase	23,9625 1673	9	21	9	1	74 7	81,82 7	5,0 8	Alta	Alta	2,90E +08	2,80E +08	1,89 4	Alta	0	78,0624 6424	9
A0A401K Z55	Periplasmic beta- glucosidase	18,4863 5236	9	17	9	1	80 6	88,09 1	5,1 1	Alta	Alta	2,80E +08	2,20E +08	0,82 8	Alta	0	76,9149 5776	9
A0A401K FJ0	Uncharacterized protein	14,3018 018	8	17	8	1	88 8	98,85 3	5,1 9	Alta	Alta	5,50E +07	4,50E +07	0,54	Alta	0	74,3652 1602	8
A0A401K RU4	Hydrolase_4 domain- containing protain	17,4683 5443	3	16	3	1	39 5	41,93 9	5,0 2	Alta	Alta	3,00E +08	8,30E +07	1,37 1	Alta	0	74,0101 378	3
A0A401K VX5	Meiotically up- regulated gene 157 protein	24,8134 3284	9	17	9	1	53 6	58,90 7	5,2 5	Alta	Alta	2,30E +08	3,40E +08	1,72 1	Alta	0	73,0995 667	9
A0A401K Z19	SGNH_hydro domain- containing	15,2073 7327	4	15	4	1	43 4	47,12 4	5,7 6	Alta	Alta	1,50E +08	2,50E +08	1,15 4	Alta	0	70,8102 0665	4
A0A401K MA3	protein Uncharacterized FAD-linked oxidoreductase ARB_02478	17,7192 9825	8	18	8	1	57 0	61,20 2	4,8 2	Alta	Alta	1,40E +08	1,30E +08	1,99 4	Alta	0	68,2151 0768	8
A0A401K PD4	3-phytase A	17,7263 9692	4	16	4	1	51 9	56,33 3	4,8 1	Alta	Alta	2,70E +08	2,90E +08	1,05 4	Alta	0	67,6957 7408	4
A0A401L 621	Xyloglucanase	12,8235 2941	6	16	6	1	85 0	89,63 7	4,5 3	Alta	Alta	9,10E +07	8,60E +07	0,77 8	Alta	0	67,5767 5099	6
A0A401K K90	Vacuolar aminopeptidase 1	30,7843 1373	9	17	9	1	51 0	55,20 9	6,1 6	Alta	Alta	2,20E +08	1,70E +08	1,56 5	Alta	0	67,2925 5557	9
A0A401K J99	Âlpha- galactosidase	4,19536 6312	5	14	5	1	15 97	172,8 21	5,1	Alta	Alta	1,60E +08	1,40E +08	0,18 4	Alta	0	64,4999 4135	5
A0A401K KQ2	Alpha-xylosidase A	17,9347 8261	7	17	7	1	73 6	82,54 2	5,5 7	Alta	Alta	2,90E +08	3,00E +08	0,65 5	Alta	0	64,2904 9516	7
A0A401K G02	Probable aldose 1-epimerase	25,3101 737	6	14	6	1	40 3	44,11 2	4,7 9	Alta	Alta	1,60E +09	1,40E +09	1,25 4	Alta	0	62,1153 0995	6

A0A401K OK6	Extracellular exo- inulinase inuE	19,5530 7263	7	16	7	1	53 7	59,10 7	5,5 2	Alta	Alta	4,30E +08	4,20E +08	1,31	Alta	0	58,7505 6481	7
A0A401K FK4	Glutaminase A	15,1953 6903	5	16	5	1	69 1	75,45 9	4,4 9	Alta	Alta	3,70E +08	3,50E +08	1,44 8	Alta	0	57,3223 9342	5
A0A401L 7N1	Alkyl/aryl- sulfatase BDS1	23,8993 7107	9	17	9	1	63 6	70,37 3	5,1 7	Alta	Alta	1,90E +08	2,00E +08	1,51 2	Alta	0	54,3896 06	9
A0A401L 140	Probable alpha- fucosidase A	17,6172 3701	8	15	8	1	78 9	86,07 3	4,8 7	Alta	Alta	3,20E +08	3,00E +08	0,69 3	Alta	0	53,6337 6808	8
A0A401K ED2	Uncharacterized protein	15,8319 8708	6	12	6	1	61 9	68,47 5	5,0 1	Alta	Alta	9,60E +07	5,80E +07	0,88 7	Alta	0	50,7220 2086	6
P00761 SWISS- PROT:P00 761	Trypsin	21,6450 2165	3	9	3	1	23 1	24,39 4	7,1 8	Alta	Alta	1,20E +09	7,90E +08	1,42 4	Alta	0	48,6139 3523	3
A0A401L 5T3	Beta- hexosaminidase	10,8603 6671	5	11	5	1	70 9	78,78 9	5,5 3	Alta	Alta	1,20E +08	1,20E +08	0,54	Alta	0	47,4633 8391	5
A0A401K KY1	Alpha-amylase A type-3	14,0540 5405	5	10	5	1	55 5	60,88 7	4,9 6	Alta	Alta	8,10E +07	7,10E +07	1,15 4	Alta	0	46,5134 9068	5
A0A401K YU7	Lipase_GDSL domain- containing protain	22,8169 0141	4	11	4	1	35 5	39,71 1	5,3 3	Alta	Alta	1,30E +08	2,80E +08	1,15 4	Alta	0	43,8258 7576	4
A0A401K V82	Tripeptidyl- peptidase sed4	13,7980 0853	6	11	6	1	70 3	76,21 1	5,1 2	Alta	Alta	5,10E +07	6,00E +07	0,58 5	Alta	0	42,4611 0368	6
A0A401K EA1	Putative formamidase C869 04	21,0653 753	5	10	5	1	41 3	45,32 8	5,6 7	Alta	Alta	2,80E +08	3,00E +08	1,33 6	Alta	0	42,4492 991	5
A0A401K J92	Carboxylic ester hydrolase	7,38831 6151	2	7	2	1	58 2	64,01 6	4,9 6	Alta	Alta	3,80E +07	4,50E +07	0,18 6	Alta	0	41,4008 8582	2
A0A401L 104	Antigenic thaumatin-like protein ARB 01183	16,6666 6667	1	7	1	1	18 0	19,02 2	4,3 2	Alta	Alta	4,80E +08	4,60E +08	2,16 2	Alta	0	40,6912 1981	1
A0A401L 636	Aorsin	12,8482 9721	3	10	3	1	64 6	69,99 9	5,1 5	Alta	Alta	2,40E +08	1,60E +08	0,46 8	Alta	0	39,3478 7869	3
A0A401K NJ9	1,3-beta- glucanosyltransfe rase	19,1806 3315	7	10	7	1	53 7	57,16 2	4,6 4	Alta	Alta	2,80E +08	2,40E +08	1,33 6	Alta	0	37,4238 1549	7
A0A401K SS4	Gluconolactonase	20,6812 6521	4	9	4	1	41 1	44,71 4	5,3 8	Alta	Alta	1,70E +08	1,60E +08	0,62 4	Alta	0	36,8834 5623	4
----------------	---	-----------------	---	---	---	---	---------	------------	----------	------	------	--------------	--------------	-----------	------	---	-----------------	---
A0A401K FI1	Beta- glucuronidase	14,375	4	7	4	1	48 0	52,42 4	5,2 1	Alta	Alta	9,50E +07	6,20E +07	0,52	Alta	0	31,6444 8166	4
A0A401K UB2	1,3-beta- glucanosyltransfe rase	10,0823 0453	3	8	3	1	48 6	52,04 5	4,4 6	Alta	Alta	9,20E +06	1,70E +07	0,54	Alta	0	31,5501 9355	3
A0A401K QM6	Uncharacterized protein Uncharacterized	17,6282 0513	3	7	3	1	31 2	33,64 4	4,9 4	Alta	Alta	1,40E +08	1,20E +08	1,51 2	Alta	0	31,2360 9853	3
A0A401L 6S6	secreted glycosidase ARB_07629	10,0755 6675	6	9	6	1	79 4	87,67 6	4,9 7	Alta	Alta	1,70E +07	2,00E +07	0,54	Alta	0	30,7922 1106	6
A0A401K ZF7	Carboxypeptidase S1 homolog B	12,4615 3846	6	9	6	1	65 0	71,49 7	4,5 1	Alta	Alta	1,50E +08	1,20E +08	0,82 3	Alta	0	30,5080 1539	6
A0A401K Q69	Carboxylic ester hydrolase Altered	10,1727 4472	4	8	4	1	52 1	57,18 8	5,2	Alta	Alta	6,60E +07	6,40E +07	0,37 4	Alta	0	28,7680 6903	4
A0A401K DP1	inheritance of mitochondria protein 6 homolog	25,5591 0543	3	7	3	1	31 3	34,44	4,7 7	Alta	Alta	4,70E +07	4,80E +07	0,50 1	Alta	0	28,7199 0371	3
A0A401L 3Q6	ARB_00900 alpha-1,2- Mannosidase Bao, rhamnosid6	13,0097 0874	3	5	3	1	51 5	56,13 5	5,0 5	Alta	Alta	1,70E +08	1,10E +08	0,36 9	Alta	0	28,5071 5733	3
A0A401L 4X5	H domain- containing	7,77439 0244	4	7	4	1	65 6	70,30 8	5,3 5	Alta	Alta	1,40E +08	8,90E +07	0,53 2	Alta	0	26,8148 3912	4
A0A401K ZP6	Purine nucleoside permease Probable	17,9361 1794	4	8	4	1	40 7	43,49 5	5,0 3	Alta	Alta	4,80E +08	1,30E +08	1,31	Alta	0	25,7994 0009	4
A0A401K RN9	aspartic-type endopeptidase onsB	4,62085 3081	2	4	2	1	84 4	91,33 8	5,2 7	Alta	Alta	3,20E +07	3,00E +07	0,21 2	Alta	0	22,9519 1193	2
A0A401K VC8	Extracellular exo- inulinase inuE	7,00636 9427	3	6	3	1	62 8	67,97 2	5	Alta	Alta	7,50E +07	9,70E +07	0,49 2	Alta	0	22,6259 4628	3
A0A401K EP1	Carboxypeptidase	6,40301 3183	2	5	2	1	53 1	59,52 5	4,7 2	Alta	Alta	4,70E +08	1,50E +08	0,58 5	Alta	0	21,4266 5458	2

P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	7,76397 5155	4	7	4	1	64 4	65,97 8	8,1 2	Alta	Alta	1,50E +07	1,10E +07	0,27 4	Alta	0	21,0970 068	4
A0A401K FL1	Dipeptidyl- aminopeptidase B	8,52459 0164	5	6	5	1	91 5	102,9 57	5,0 8	Alta	Alta	2,10E +07	2,00E +07	0,27 8	Alta	0	21,0809 0901	5
A0A401K WX5	3-phytase A	8,99357 6017	2	3	2	1	46 7	51,13 4	4,9 6	Alta	Alta	1,80E +07		0,24 5	Alta	0	20,8849 678	2
A0A401L 1L8	Alpha-L- fucosidase 2	8,61850 4436	4	5	4	1	78 9	86,39 1	5,0 1	Alta	Alta	4,60E +07	3,60E +07	0,27 4	Alta	0	19,1757 5765	4
A0A401K VC4	Probable beta- galactosidase C	2,31388 33	2	6	2	1	99 4	108,5 88	4,7 8	Alta	Alta	3,10E +07	2,80E +07	0,12 5	Alta	0	19,0520 8039	2
A0A401L 3U7	Glucanase	7,46268 6567	3	5	3	1	53 6	56,15 5	4,3	Alta	Alta	6,90E +07	5,60E +07	0,58 5	Alta	0	17,6080 2794	3
A0A401L 8N3	Probable alpha- L- arabinofuranosid ase B	8,61723 4469	2	3	2	1	49 9	52,47 8	4,4 4	Alta	Alta	2,10E +07	2,70E +07	0,38 9	Alta	0	14,5047 6408	2
A0A401K PI8	Glucanase	10,2396 5142	2	4	2	1	45 9	48,09	4,5 3	Alta	Alta	5,80E +07	8,40E +07	0,93 1	Alta	0	14,2982 564	2
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	3,37268 1282	2	4	2	1	59 3	59,47 5	5,2 1	Alta	Alta	1,10E +07	9,90E +06	0,28	Alta	0	14,1039 9294	2
A0A401K IX6	Beta- galactosidase	4,46601 9417	3	4	3	1	10 30	113,5 99	5,4 3	Alta	Alta	1,60E +07	2,10E +07	0,20 5	Alta	0	14,0095 2601	3
A0A401L 2H4	Uncharacterized protein	2,27057 7105	1	3	1	1	10 57	114,3 02	5,0 5	Alta	Alta	1,40E +07	1,10E +07	0,04 6	Alta	0	12,9265 8234	1
A0A401L 5T1	Polyadenylate- binding protein	3,66492 1466	2	3	2	1	76 4	82,36 8	5,8 5	Alta	Alta	1,00E +06	1,80E +06	0,12 5	Alta	0	11,9445 9319	2
A0A401L 6U8	Uncharacterized protein	7,40740 7407	1	3	1	1	21 6	23,45 2	4,6 7	Alta	Alta	5,30E +06	5,90E +06	0,77 8	Alta	0	11,3772 5687	1
A0A401K FF6	Carboxypeptidase S	4,67128 0277	2	3	2	1	57 8	63,56 2	5,0 7	Alta	Alta	2,50E +07	1,30E +07	0,17 9	Alta	0	10,9942 8225	2
A0A401K LT2	Probable beta- glucosidase M	3,79084 9673	2	3	2	1	76 5	82,12 1	4,7 4	Alta	Alta	1,50E +07	2,90E +07	0,16 6	Alta	0	10,6239 6836	2
Q86YZ3	Hornerin	0,77192 9825	1	2	1	1	28 50	282,2 28	10, 04	Alta	Alta	5,90E +05	6,10E +05	0,02	Alta	0	10,2521 8678	1
A0A401K L50	Carboxylic ester hydrolase	4,49438 2022	1	2	1	1	53 4	57,75 5	4,6 7	Alta	Alta	2,10E +06	1,60E +06	0,14 5	Alta	0	9,52212 9536	1
A0A401L 8P4	Uncharacterized FAD-linked oxidoreductase	3,86473 43	2	3	2	1	62 1	67,94 3	6,1 5	Alta	Alta	1,10E +07	8,50E +06	0,21 2	Alta	0	8,83342 7906	2

ARB	02478

P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	3,25581 3953	2	3	2	1	64 5	65,82 5	8	Alta	Alta		5,70E +06	0,11 3	Alta	0	8,72242 5938	2
A0A401L 6V5	Lipase 2	2,46913 5802	2	3	2	1	81 0	88,26 8	5,4 7	Alta	Alta	1,50E +07	1,30E +07	0,12 9	Alta	0	8,44765 1148	2

APÊNDICE B – INFORMAÇÕES DE TODAS AS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NA FRAÇÃO DOIS DO SOBRENADANTE ENZIMÁTICO DE *ASPERGILLUS AWAMORI*

	Informações	das proteín	as identi	ficada	s de Asp	ergillus a	wan	nori na f	ração	o 2 após ci	romatogra	fia de ex	clusão m	olecula	r (Sephade)	x G-75)		
Acesso	Descrição	Cobertur a	# Peptíd eos	# PS Ms	# Peptíd eos únicos	# Grupo de proteí nas	# A As	MM [kDa]	pI	Encontr ada na amostra : [S1] F1: Amostr a	Encontr ada na amostra : [S2] F2: Amostr a	Área: F1: Amost ra	Área: F2: Amost ra	emP AI	FDR de confiabili dade da proteína Sequest HT	Valo r-q exp. Sequ est HT	Score Sequest HT	# Seque st HT de peptíd eos
A0A401K XT8	Glucoamylase	57,1875	18	851	18	1	64 0	68,26 7	4, 45	Alta	Alta	1,30E +10	1,20E +10	11,1 15	Alta	0	4003,72 9972	18
A0A401L 8N3	Probable alpha- L- arabinofuranosid ase B	28,8577 1543	7	68	7	1	49 9	52,47 8	4, 44	Alta	Alta	4,60E +08	7,20E +08	5,10 5	Alta	0	367,390 3325	7
A0A401K J46	Tripeptidyl- peptidase sed2 Probable 6	25,6535 9477	8	72	8	1	61 2	65,70 1	5, 77	Alta	Alta	2,40E +09	2,10E +09	1,80 7	Alta	0	313,457 4349	8
A0A401L 384	phosphogluconola ctonase	23,1155 7789	4	27	4	1	39 8	42,44 5	6, 27	Alta	Alta	6,80E +08	6,60E +08	1,06 9	Alta	0	142,176 4877	4
A0A401L 2M7	6-hydroxy-D- nicotine oxidase	25,6	8	24	8	1	50 0	54,61 5	5, 22	Alta	Alta	1,70E +08	1,70E +08	1,29 1	Alta	0	100,278 2767	8
A0A401K T71	Glucanase	24,4444 4444	4	20	4	1	40 5	42,7	4, 35	Alta	Alta	4,10E +08	3,50E +08	1,27 6	Alta	0	91,9597 0154	4
A0A401K S37	Beta-glucosidase	20,1612 9032	11	20	11	1	86 8	94,1	4, 77	Alta	Alta	7,10E +07	7,70E +07	0,96 2	Alta	0	79,0026 0735	11
A0A401L 6B6	Probable alpha- L- arabinofuranosid ase A	2,05198 3584	1	20	1	1	73 1	79,22	4, 61	Alta	Alta	1,30E +07	1,70E +07	0,11 6	Alta	0	74,1979 2485	1
A0A401K TS4	Protein SEY1	10,5405 4054	8	17	8	1	14 80	164,9 61	5, 2	Alta	Alta	5,40E +08	3,50E +08	0,37 7	Alta	0	68,3974 1731	8
A0A401K TV3	Tripeptidyl- peptidase sed4	18,7931 0345	6	17	6	1	58 0	62,08 9	4, 45	Alta	Alta	2,60E +08	2,20E +08	0,82 3	Alta	0	64,1692 729	6

A0A401L 3Q6	alpha-1,2- Mannosidase	26,6019 4175	7	14	7	1	51 5	56,13 5	5, 05	Alta	Alta	2,70E +08	2,60E +08	1,08 1	Alta	0	61,3105 1707	7
A0A401K YX1	1,3-beta- glucanosyltransfe rase	29,6943 2314	9	17	9	1	45 8	48,46 1	4, 93	Alta	Alta	5,70E +08	6,80E +08	1,56 5	Alta	0	59,9942 8058	9
A0A401K XD7	Protein ecm33	11,9700 7481	3	11	3	1	40 1	40,99 6	4, 51	Alta	Alta	4,80E +08	4,40E +08	0,63 8	Alta	0	48,7062 9525	3
A0A401K S89	Probable glucan 1,3-beta- glucosidase A	20,9134 6154	4	12	4	1	41 6	45,46 7	5, 19	Alta	Alta	9,20E +07	5,10E +07	0,73	Alta	0	47,5241 2939	4
P00761 SWISS- PROT:P00 761	Trypsin	17,3160 1732	2	9	2	1	23 1	24,39 4	7, 18	Alta	Alta	4,40E +08	5,80E +08	1,03 1	Alta	0	47,3841 5074	2
A0A401L 3U7	Glucanase	12,1268 6567	5	13	4	1	53 6	56,15 5	4, 3	Alta	Alta	3,60E +07	2,40E +08	1,51 2	Alta	0	44,2545 7263	5
A0A401K EN8	Glucanase	19,2477 8761	4	10	3	1	45 2	48,2	4, 32	Alta	Alta	1,50E +08	1,40E +08	1,27 6	Alta	0	39,3242 1231	4
A0A401K V94	Alpha- galactosidase	13,2216 0149	5	10	5	1	53 7	59,11 1	5, 06	Alta	Alta	1,00E +08	1,40E +08	0,61	Alta	0	39,0921 6356	5
A0A401L 2E9	Peptide hydrolase	10,4330 7087	3	9	3	1	50 8	55,09 7	4, 77	Alta	Alta	2,50E +07	2,60E +07	0,36 9	Alta	0	38,2485 5852	3
A0A401K FT6	Alpha- galactosidase	5,97112 8609	6	10	6	1	15 24	172,1 37	5, 41	Alta	Alta	9,30E +07	4,50E +08	0,27 2	Alta	0	37,5283 4654	6
A0A401L 6U8	Uncharacterized protein	13,8888 8889	2	9	2	1	21 6	23,45 2	4, 67	Alta	Alta	3,10E +08	3,60E +08	4,62 3	Alta	0	36,6440 2795	2
A0A401L 440	Glycosidase	11,6751 269	3	10	3	1	39 4	39,65 5	4, 21	Alta	Alta	4,20E +08	7,40E +08	0,87 4	Alta	0	35,5242 2595	3
A0A401K GW5	Carboxypeptidase	10,7344 6328	3	9	3	1	53 1	59,35 8	4, 94	Alta	Alta	9,80E +07	7,30E +07	0,93 1	Alta	0	34,9843 4496	3
A0A401K NJ9	1,3-beta- glucanosyltransfe rase	11,1731 8436	4	9	4	1	53 7	57,16 2	4, 64	Alta	Alta	8,70E +07	9,20E +07	0,62 4	Alta	0	34,1816 4325	4
A0A401K PI8	Glucanase	15,0326 7974	3	8	3	1	45 9	48,09	4, 53	Alta	Alta	1,40E +08	2,20E +08	2,72 8	Alta	0	34,0494 3514	3
A0A401K QK6	Extracellular exo- inulinase inuE	13,4078 2123	5	8	5	1	53 7	59,10 7	5, 52	Alta	Alta	1,40E +08	2,00E +08	0,68 8	Alta	0	32,5965 9958	5
A0A401L 2L5	Endo-1,6-beta-D- glucanase neg1	19,5519 3483	5	8	5	1	49 1	52,13 1	4, 34	Alta	Alta	2,70E +08	3,00E +08	1,42 4	Alta	0	32,2654 5238	5

A0A401K WP9	Aminopeptidase	6,14754 0984	5	9	5	1	97 6	108,1 32	6, 57	Alta	Alta	1,80E +07	1,90E +07	0,22	Alta	0	31,9587 2235	5
A0A401K W55	Alpha- glucosidase Probable endo	12,2023 8095	6	8	6	1	10 08	111,4 56	5, 53	Alta	Alta	6,60E +07	5,50E +07	0,41 3	Alta	0	31,4695 6944	6
A0A401L 5N7	1,3(4)-beta- glucanase ARB_01444	2,46027 6781	4	9	4	1	19 51	216,0 21	5, 5	Alta	Alta	5,10E +07	5,20E +07	0,11 2	Alta	0	31,3523 5834	4
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	14,5962 7329	5	7	5	1	64 4	65,97 8	8, 12	Alta	Alta	2,10E +07	1,80E +07	0,35 4	Alta	0	28,8272 3117	5
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	9,61214 1653	5	8	5	1	59 3	59,47 5	5, 21	Alta	Alta	1,70E +07	2,30E +07	0,50 9	Alta	0	28,2792 6135	5
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	21,1878 0096	5	6	5	1	62 3	62,09 2	5, 3	Alta	Alta	3,20E +07	2,20E +07	0,40 3	Alta	0	27,4948 8807	5

APÊNDICE C - INFORMAÇÕES DE TODAS AS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NA FRAÇÃO TRÊS DO SOBRENADANTE ENZIMÁTICO DE *ASPERGILLUS AWAMORI*

	Informaçõe	s das prot	teínas ide	ntifica	adas de A	spergillu	ıs awa	amori n	a fraç	ão 3 após	cromatog	rafia de e	xclusão 1	nolecul	lar (Sephade	ex G-75)	1	
Acesso	Descrição	Cobert ura	# Peptíd eos	# PS Ms	# Peptíd eos únicos	# Grupo de proteí nas	# AA s	MM [kDa]	pI	Encontr ada na amostra : [S1] F1: Amostr a	Encontr ada na amostra : [S2] F2: Amostr a	Área: F1: Amost ra	Área: F2: Amost ra	emP AI	FDR de confiabili dade da proteína Sequest HT	Valor -q exp. Sequ est HT	Score Sequest HT	# Seque st HT de peptíd eos
A0A401K		57,031					64	68,26	4,4			5,80E	7,90E	8,08			2070,870	
XT8	Glucoamylase	25	16	478	16	1	0	7	5	Alta	Alta	+09	+09	5	Alta	0	46	16
	Alpha-L-																	
A0A401L2	arabinofuranos	34,337					33	35,84	4,7			6,50E	7,30E	13,6			1906,305	
H5	idase axhA	349	7	473	7	1	2	2	9	Alta	Alta	+09	+09	78	Alta	0	339	7
A0A401L2		70,739					31	34,12	6,5			4,90E	1,10E	16,3			1010,451	
J5	Beta-xylanase	55	16	245	16	1	1	6	5	Alta	Alta	+09	+10	02	Alta	0	984	16
A0A401KJ	Endoglucanase	35,564					23	25,85	4,6			5,30E	5,60E	18,3			972,5060	
H0	Α	854	8	239	8	1	9	7	4	Alta	Alta	+09	+09	07	Alta	0	649	8
A0A401L6	Endo-1,4-beta-	14,666					22	24,04	5,4			1,70E	2,10E	1,68			240,4441	
30	xylanase	667	2	63	2	1	5	2	5	Alta	Alta	+09	+09	3	Alta	0	65	2
A0A401K		33,086					40		4,3			1,00E	1,50E	2,72			176,3335	
T71	Glucanase	42	5	42	5	1	5	42,7	5	Alta	Alta	+09	+09	8	Alta	0	173	5
A0A401KJ	Uncharacterize	43,548					12	12,12	5,1			1,50E	1,50E	20,5			116,8999	
19	d protein	387	3	23	3	1	4	4	1	Alta	Alta	+09	+09	44	Alta	0	226	3
A0A401K	Uncharacterize	65,432					16	17,13	5,4			6,70E	6,50E	6,49			106,9317	
VD3	d protein	099	6	26	6	1	2	1	8	Alta	Alta	+08	+08	9	Alta	0	577	6
A0A401K	Endochitinase	46,979					44	48,91	5,2			2,70E	2,10E	2,98			102,7886	
GL6	В	866	10	27	10	1	7	2	7	Alta	Alta	+08	+08	1	Alta	0	512	10
	Probable glucan 1,3-																	
A0A401K	beta-	31,971					41	45,46	5,1			1,60E	1,50E	1,99			91,04490	
S 89	glucosidase A Probable	154	8	21	8	1	6	7	9	Alta	Alta	+08	+08	4	Alta	0	614	8
A0A401K	glucan endo-	12,284					46	46,77	4,5			7,20E	3,90E				90,95854	
XZ3	1,3-beta-	483	4	21	4	1	4	6	1	Alta	Alta	+08	+08	1,61	Alta	0	235	4

	glucosidase																	
	eglC																	
A0A401L3		20,522					53	56,15				2,70E	2,70E	2,98			78,34603	
U7	Glucanase	388	6	18	5	1	6	5	4,3	Alta	Alta	+08	+08	1	Alta	0	238	6
	Keratin, type I	27,287					62	62,09				3,20E	3,90E				74,56839	
P35527	cytoskeletal 9	319	8	19	8	1	3	2	5,3	Alta	Alta	+07	+07	0,84	Alta	0	371	8
A0A401L2	Endoglucanase	15,776					41	45,64				4,80E	4,40E	2,98			64,76682	
H3	<i>E1</i>	699	7	19	7	1	2	2	4,5	Alta	Alta	+08	+08	1	Alta	0	544	7
	Keratin, type II	21,428					64	65,97	8,1			3,00E	1,90E	0,83			61,51790	
P04264	cytoskeletal 1	571	10	16	6	1	4	8	2	Alta	Alta	+07	+07	3	Alta	0	762	10
A0A401K	1,5-Deta-	27 720					15	18 16	10			3 40E	3 30E	1.84			56 88144	
VY1	foraso	21,12)	10	16	10	1	8	10,70	ч,) 2	Alta	Alta	08	08	1,0 4 8	Alta	0	68/	10
171	Keratin type II	230	10	10	10	1	0	1	5	Ana	Ana	100	100	0	Ana	0	004	10
	cvtoskeletal?	15 813					6/	65 82				1 70F	2 20F	0.53			53 90793	
P35908	enidermal	953	8	15	6	1	5	5	8	Alta	Alta	+07	$^{2,20L}_{\pm 07}$	5	Alta	0	848	8
1 33700	Probable	755	0	15	0	1	5	5	0	2 mu	7 IItu	107	107	5	7 ma	0	040	0
A0A401K	feruloyl	31,316					28	30,50	4,5			7,60E	6,90E	2,72			51,77968	
KW4	esterase A	726	4	13	4	1	1	1	9	Alta	Alta	+07	+07	8	Alta	0	335	4
A0A401K		21,460					45		4,3			1,40E	1,30E	1,27			45,18145	
EN8	Glucanase	177	5	11	4	1	2	48,2	2	Alta	Alta	+08	+08	6	Alta	0	895	5
A0A401L4	Exo-1,4-beta-	7,5870					80	87,14	4,9			3,70E	5,00E	0,22			42,99334	
C3	xylosidase xlnD	647	3	10	3	1	4	3	1	Alta	Alta	+07	+07	5	Alta	0	311	3
	Keratin, type I	11,129					59	59,47	5,2			1,40E	1,60E	0,93			42,43056	
P13645	cytoskeletal 10	848	7	12	6	1	3	5	1	Alta	Alta	+07	+07	1	Alta	0	464	7
A0A401K	Beta-	8,8709					86		4,7			4,60E	6,40E	0,40			38,33093	
S 37	glucosidase	677	6	10	6	1	8	94,1	7	Alta	Alta	+07	+07	1	Alta	0	381	6
	Probable																	
A0A401K	feruloyl	21,111					27	28,54	4,9			2,10E	1,70E	2,59			35,75209	
PN2	esterase C	111	3	8	3	1	0	9	4	Alta	Alta	+08	+08	4	Alta	0	522	3
	Extracellular																	
	endo-alpha-(1-																	
A0A401L8	>5)-L-	16,181					30	33,47	4,8			9,40E	9,80E	0,63			35,26802	
E5	arabinanase 1	23	3	8	3	1	9	7	1	Alta	Alta	+07	+07	8	Alta	0	325	3
A0A401L4		16,730					26	29,19	4,1			5,50E	5,70E	1,37			34,43082	
61	Ribonuclease M	038	3	10	3	1	3	1	5	Alta	Alta	+08	+08	1	Alta	0	595	3
P00761																		
SWISS-		17,316					23	24,39	7,1			5,30E	3,50E	1,03			33,26778	
PROT:P00	Trypsin	017	2	7	2	1	1	4	8	Alta	Alta	+08	+08	1	Alta	0	03	2

	10,239					45		4,5			3,60E	4,20E	1,68			33,14982	
Glucanase	651	2	7	2	1	9	48,09	3	Alta	Alta	+08	+08	3	Alta	0	772	2
Uncharacterize	13,888					21	23,45	4,6			1,70E	1,80E	4,62			30,24370	
d protein	889	2	7	2	1	6	2	7	Alta	Alta	+08	+08	3	Alta	0	694	2
Endoglucanase	9,2039					40	41,14	4,5			3,20E	3,00E	1,15			28,69102	
-4	801	3	8	3	1	2	1	6	Alta	Alta	+07	+07	4	Alta	0	597	3
Probable endo-																	
beta-1,4-	16,764					34	36,24	4,6			1,60E	1,50E	1,03			28,55736	
glucanase D	706	4	8	4	1	0	5	7	Alta	Alta	+08	+08	1	Alta	0	16	4
Uncharacterize						20	22,89	5,7			1,90E	1,80E	1,68			28,20416	
d protein	25	2	6	2	1	8	3	1	Alta	Alta	+08	+08	3	Alta	0	88	2
Glucan 1,3-																	
beta-																	
glucosidase						25	274,0	5,1			5,20E	4,30E	0,08			26,79073	
ARB_02797	3,24	5	8	5	1	00	09	4	Alta	Alta	+07	+07	6	Alta	0	334	5
Uncharacterize	14,153					32	35,62	5,3			1,60E	1,60E	0,41			26,39547	
d protein	846	3	7	3	1	5	9	6	Alta	Alta	+07	+07	3	Alta	0	634	3
	11,675					39	39,65	4,2			3,20E	2,20E	0,87			26,32887	
Glycosidase	127	3	8	3	1	4	5	1	Alta	Alta	+08	+08	4	Alta	0	173	3
	5,3956					27	28,89	4,3				1,40E	0,46			24,76838	
Allergen Asp f 7	835	1	8	1	1	8	4	1	Alta	Alta		+09	8	Alta	0	732	1
	Glucanase Uncharacterize d protein Endoglucanase -4 Probable endo- beta-1,4- glucanase D Uncharacterize d protein Glucan 1,3- beta- glucosidase ARB_02797 Uncharacterize d protein Glycosidase Allergen Asp f 7	$\begin{array}{cccc} 10,239\\ Glucanase & 651\\ Uncharacterize & 13,888\\ d \ protein & 889\\ Endoglucanase & 9,2039\\ -4 & 801\\ Probable \ endo-\\beta-1,4- & 16,764\\ glucanase \ D & 706\\ Uncharacterize & \\d \ protein & 25\\ Glucan 1,3-\\beta-\\glucosidase & \\ ARB_02797 & 3,24\\ Uncharacterize & 14,153\\ d \ protein & 846\\ 11,675\\ Glycosidase & 127\\ 5,3956\\ Allergen \ Asp \ f 7 & 835\\ \end{array}$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$									

APÊNDICE D - INFORMAÇÕES DE TODAS AS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NA FRAÇÃO QUATRO DO SOBRENADANTE ENZIMÁTICO DE *ASPERGILLUS AWAMORI*

Infor	mações das prote	eínas identi	ficadas	de As	pergillus	awamo	ori na	fração	o 1 ap	oós croma	atografia	de exclu	são mole	ecular ((Sephadex)	G-75)		
Acesso	Descrição	Cobertu ra	# Peptíd eos	# PS Ms	# Peptíd eos único s	# Grup o de proteí nas	# A As	MM [kD a]	pI	Encont rada na amostr a: [S1] F1: Amostr a	Encont rada na amostr a: [S2] F2: Amostr a	Área: F1: Amos tra	Área: F2: Amos tra	emP AI	FDR de confiabil idade da proteína Sequest HT	Valo r-q exp. Sequ est HT	Score Sequest HT	# Seque st HT de peptíd eos
A0A401KJ19	Uncharacteri zed protein	43,5483 871	3	23	3	1	12 4	12,1 24	5, 11	Alta	Alta	2,70E +08	1,50E +08	45,4 16	Alta	0	113,921 9961	3
A0A401KXT8	Glucoamylas e	24,0625	7	13	7	1	64 0	68,2 67	4, 45	Alta	Alta	3,40E +07	2,50E +07	0,95 7	Alta	0	54,9477 0288	7
A0A401L2H5	Alpha-L- arabinofuran osidase axhA	11,7469 8795	2	13	2	1	33 2	35,8 42	4, 79	Alta	Alta	2,70E +06	1,10E +06	1,15 4	Alta	0	51,0985 5986	2
P00761 SWISS- PROT:P00761	Trypsin	17,3160 1732	2	5	2	1	23 1	24,3 94	7, 18	Alta	Alta	2,40E +06	1,30E +06	0,70 1	Alta	0	23,3064 1294	2
P04264	Keratin, type II cvtoskeletal 1	5,90062 1118	3	4	3	1	64 4	65,9 78	8, 12	Alta	Alta	5,50E +05	3,30E +05	0,19 9	Alta	0	15,3301 7659	3
A0A401KHK2	Allergen Asp f 15	20,1342 2819	2	3	2	1	14 9	15,2 27	4, 42	Alta	Alta	1,10E +07	1,40E +06	2,16 2	Alta	0	10,7640 8362	2
A0A401L3U7	Glucanase	7,08955 2239	2	2	2	1	53 6	56,1 55	4, 3	Alta	Não encontr ada	1,10E +06		0,35 9	Alta	0	7,79390 2636	2
Q9R0H5	Keratin, type II cytoskeletal 71	2,29007 6336	1	2	1	1	52 4	57,3 47	6, 99	Alta	Alta	6,70E +05	4,70E +05	0,06 6	Alta	0	7,14598 4888	1
Q6NXH9	Keratin, type II cytoskeletal 73	2,22634 5083	1	2	1	1	53 9	58,8 75	8, 09	Alta	Alta	6,70E +05	4,70E +05	0,06 1	Alta	0	7,14598 4888	1
Q7Z794	Keratin, type	2,07612	1	2	1	1	57	61,7	5,	Alta	Alta	6,70E	4,70E	0,06	Alta	0	7,14598	1

	II cytoskeletal Ib	4567					8	64	85			+05	+05	8			4888	
ENSEMBL:ENSBTAP 00000038253	10	1,98019 802	1	2	1	1	60 6	63,1 27	8, 46	Alta	Alta	6,70E +05	4,70E +05	0,06 4	Alta	0	7,14598 4888	1
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	1,86046 5116	1	2	1	1	64 5	65,8 25	8	Alta	Alta	6,70E +05	4,70E +05	0,05 5	Alta	0	7,14598 4888	1
Q6IFZ6	Keratin, type II cytoskeletal Ib	2,09790 2098	1	2	1	1	57 2	61,3 22	8, 02	Alta	Alta	6,70E +05	4,70E +05	0,05 8	Alta	0	7,14598 4888	1
A0A401L2J5	Beta- xylanase	6,43086 8167	1	2	1	1	31 1	34,1 26	6, 55	Alta	Não encontr ada	1,70E +06		0,11 6	Alta	0	6,09882 7124	1
A0A401L630	Endo-1,4- beta- xylanase	7,11111 1111	1	1	1	1	22 5	24,0 42	5, 45	Alta	Não encontr ada	3,50E +05		0,38 9	Alta	0	4,57712 5549	1
A0A401KS37	Beta- glucosidase	1,72811 0599	1	1	1	1	86 8	94,1	4, 77	Alta	Não encontr ada	7,60E +05		0,05 8	Alta	0	3,57117 1999	1