



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

**REGISLANE PINTO RIBEIRO**

**ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS DA MICROBIOTA RUMINAL DE OVINOS  
MORADA NOVA E SEU POTENCIAL NA SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR**

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2019**

REGISLANE PINTO RIBEIRO

ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS DA MICROBIOTA RUMINAL DE OVINOS  
MORADA NOVA E SEU POTENCIAL NA SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Orientador: Dr. Antônio Sílvio do Egito  
Coorientadora: Dra. Hévila Oliveira Salles

FORTALEZA - CEARÁ

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Ribeiro, Regislane Pinto.

Enzimas lignocelulolíticas da microbiota ruminal de ovinos Morada Nova e seu potencial na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar [recurso eletrônico] / Regislane Pinto Ribeiro. - 2019.

1 CD-ROM: il.; 4 ¼ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 81 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Rede Nordeste de Biotecnologia, Doutorado em Biotecnologia, Fortaleza, 2019.

Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Orientação: Prof. Dr. Antônio Sílvio do Egito.

Coorientação: Prof.<sup>a</sup> Dra. Hévila Oliveira Salles.

1. Enzimas. 2. Microrganismos ruminais. 3. Pré-tratamento. 4. Saccharum officinarum. 5. Sacarificação enzimática. I. Título.

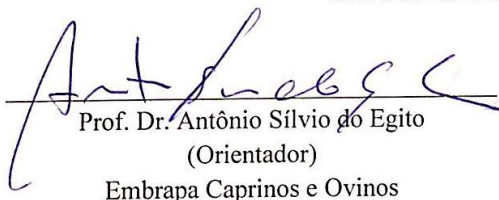
REGISLANE PINTO RIBEIRO

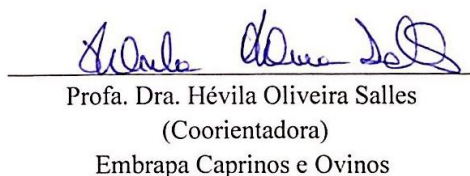
ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS DA MICROBIOTA RUMINAL DE OVINOS  
MORADA NOVA E SEU POTENCIAL NA SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR

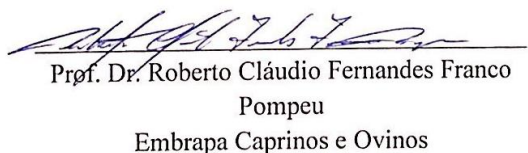
Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará-UECE, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

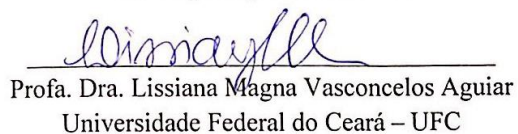
Aprovada em: 27 / 06 / 2019

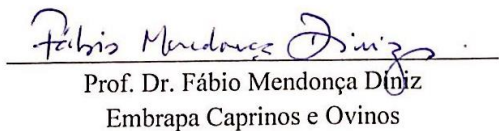
BANCA EXAMINADORA

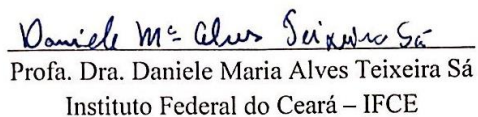
  
Prof. Dr. Antônio Sérgio do Egito  
(Orientador)  
Embrapa Caprinos e Ovinos

  
Profa. Dra. Hévila Oliveira Salles  
(Coorientadora)  
Embrapa Caprinos e Ovinos

  
Prof. Dr. Roberto Cláudio Fernandes Franco  
Pompeu  
Embrapa Caprinos e Ovinos

  
Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar  
Universidade Federal do Ceará – UFC

  
Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz  
Embrapa Caprinos e Ovinos

  
Profa. Dra. Daniele Maria Alves Teixeira Sá  
Instituto Federal do Ceará – IFCE

À minha mãe Maria de Fátima Pinto  
Ribeiro pelo amor, apoio e exemplo de  
determinação.

## **AGRADECIMENTOS**

Em especial, agradeço a Deus por ser tão generoso comigo, dando-me coragem e determinação para alcançar mais esse objetivo.

À Universidade Estadual do Ceará – (UECE) pelo Programa de Doutorado em Biotecnologia – (RENORBIO).

Agradecimento à Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo concedido na forma de bolsa de estudo, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro desta pesquisa.

À Embrapa Caprinos e Ovinos pela oportunidade de desenvolver este trabalho e o apoio técnico.

Ao meu orientador Dr. Antônio Sílvio do Egito, pela orientação dada e disponibilidade em contribuir no desenvolvimento desta pesquisa.

À minha coorientadora Dra. Hévila Oliveira Salles, obrigada pelos ensinamentos repassados, pelo suporte no direcionamento dos experimentos, bem como pela motivação e paciência.

À amiga de doutorado Ana Márjory Paiva de Sousa, obrigada por todo o conhecimento compartilhado durante as atividades experimentais e disciplinas.

À Lidiane Viana Ximenes, técnica do laboratório da Embrapa Caprinos e Ovinos, sou grata pela sua generosidade em contribuir com os experimentos.

Ao doutorando Samuel Barcelos, por sua disponibilidade na elaboração das imagens.

Ao Adriano Rodrigues Lima, pela análise estatística.

Aos colegas de bancada: Islan Barbosa, Darciane Rodrigues, Sueli Santos, Ronaldo Lucas, Patrício Leandro, Aline Venuto e Renata Alencar.

Agradeço também aos funcionários da Embrapa Caprinos e Ovinos, em especial, Alex Miranda, João Ricardo Furtado, Liana Ferreira, Tabosa dos Santos, Galba Carvalho, João Batista e Márcio Ponciano, pela disponibilidade e convivência durante os anos do doutorado.

Aos colaboradores Lorena Mara Alexandre e Silva e Dr. Kirley Marques Canuto da Embrapa Agroindústria Tropical, pelo empenho na análise de ressonância magnética nuclear.

À banca pela participação, trazendo sua colaboração para o aprimoramento e enriquecimento deste trabalho.

À minha grande família, meus pais Maria de Fátima Pinto Ribeiro e Raimundo Alves Ribeiro (*in memoriam*), por serem exemplo de caráter, princípio e honestidade. Aos meus irmãos Rogério Ribeiro, Régio Ribeiro, Romero Ribeiro, Roberto Ribeiro, Romildo Ribeiro, Rejane Ribeiro, Rosana Ribeiro e Rosiane Ribeiro por compartilharem nossas experiências, por todo o carinho e incentivo. Aos meus sobrinhos queridos Isabella Ribeiro Nascimento, Maria Cecília Braz, Raiane Vitória Ribeiro e Ruan Victor Ribeiro, obrigada pelos momentos felizes que enchem o meu coração de alegria. Aos meus cunhados Sandra Ribeiro e Ivan Nascimento obrigada pelo incentivo.

Ao amigo Jackson Costa, agradeço pela disponibilidade de sempre ajudar, sou grata por sua generosa amizade. Ao Renato Passos, um grande amigo, obrigada pelo acolhimento em sua residência em Fortaleza durante as disciplinas do doutorado, e por todo conhecimento compartilhado.

A todos os meus amigos, que fazem parte da minha vida e vibram com as minhas conquistas, Shirleyne Silva, Karla Leylanne Góes, Moemia Portela, Juliane Passos, Anderson Weiny Silva, Glaucinete Borges, Clayrtiano Alves, Jordânia Freire, Amélia Araújo, Ilário Sousa, Clehilton Marques, Aline Alves e Yrla Santos.

Enfim, a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.”

(Eclesiastes, 3:1)



## RESUMO

Os ruminantes são fontes de microrganismos produtores de enzimas lignocelulolíticas, as quais podem ser utilizadas para diferentes aplicações biotecnológicas, como a degradação da fibra do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) para uso alimentar ou para produção de bioetanol. Enzimas mais específicas são obtidas quando o próprio substrato de interesse é utilizado na produção dos microrganismos. Nesse sentido, o presente trabalho direcionou a microbiota ruminal de ovinos Morada Nova para a degradação do BCA objetivando extrair as proteínas aderidas à fibra (PAFs) e caracterizá-las quanto ao potencial de degradação do BCA *in natura* e pré-tratado com 10, 20, 30, 40 ou 50% de NaOH. O conteúdo ruminal foi obtido via fístula, filtrado, lavado com Solução Salina Tamponada (PBS, pH 7,2 sem  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) e as PAFs extraídas com ureia  $8 \text{ mmol.L}^{-1}$  durante 15 minutos. Após serem filtradas e dialisadas contra água (*cut off* de 12 kDa) as PAFs foram liofilizadas. A atividade total de celulase foi determinada pelo ensaio do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em pH 3,99 e papel de filtro. As PAFs mostraram maior atividade enzimática em pH 3,99. O pH 11,71 foi identificado como o de máxima extração de proteína. A temperatura de 50 °C por 60 minutos manteve a atividade específica de celulase total das PAFs e essas também resistiram ao aquecimento a 100 °C por 60 minutos. Em relação aos substratos, as PAFs apresentaram maior atividade específica para xilanase ( $7,01 \pm 0,19 \text{ U.mg}^{-1}$ ) seguida por endoglucanase ( $4,71 \pm 1,65 \text{ U.mg}^{-1}$ ), exoglucanase ( $2,68 \pm 0,42 \text{ U.mg}^{-1}$ ) e celulase total ( $0,62 \pm 0,05 \text{ U.mg}^{-1}$ ). Quanto aos substratos BCA *in natura* e pré-tratado, a atividade enzimática das PAFs aumentou de forma proporcional à concentração de NaOH utilizado no pré-tratamento, ao mesmo tempo em que se observou na fibra melhor solubilização da hemicelulose e lignina, e aumento da cristalinidade. As fibras de BCA *in natura* e pré-tratada foram utilizadas como matriz cromatográfica e observou-se interação das PAFs com as matrizes, com destaque para as matrizes de BCA pré-tratadas com 20% e 40% NaOH. Em conclusão, as enzimas ruminais de ovinos Morada Nova foram capazes de degradar o BCA, sendo sua eficiência elevada ajustando-se o pH e a temperatura reacional, assim como realizando o pré-tratamento alcalino do BCA. Ainda, a própria fibra de BCA pré-tratada pode ser utilizada para isolar e caracterizar enzimas ruminais lignocelulolíticas.

**Palavras-chave:** Enzimas. Microrganismos ruminais. Pré-tratamento. *Saccharum officinarum*. Sacarificação enzimática.

## ABSTRACT

Ruminants are sources of microorganisms that produce lignocellulolytic enzymes which in turn can be used for different biotechnological applications, such as in degrading sugarcane bagasse (SCB) fibers for food use or for producing bioethanol. More specific enzymes are obtained when the substrate of interest itself is used in producing the microorganisms. In this sense, the present work directed Morada Nova sheep ruminal microbiota to degrade SCB, aiming at extracting proteins adhered to the fibers (PAFs), characterizing them as to the potential degradation of the *in natura* SCB and those pretreated with 10, 20, 30, 40 or 50% NaOH. The ruminal content was obtained via fistula, filtered, washed with Phosphate Buffer Saline (pH 7.2 without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>) and the PAFs were extracted with 8 mmol.L<sup>-1</sup> urea for 15 minutes. The PAFs were then lyophilized after filtration and dialysis against water (cut-off of 12 kDa). Total cellulase activity was determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay at pH 3.99 and filter paper. The PAFs showed higher enzymatic activity at pH 3.99. The pH of 11.71 was identified as the maximum protein extraction. A temperature of 50 °C for 60 minutes maintained the specific activity of PAFs total cellulase and they also resisted heating at 100 °C for 60 minutes. Regarding substrates, PAFs showed higher specific activity for xylanase (7.01 ± 0.19 U.mg<sup>-1</sup>), followed by endoglucanase (4.71 ± 1.65 U.mg<sup>-1</sup>), exoglucanase (2.68 ± 0.42 U.mg<sup>-1</sup>) and total cellulase (0.62 ± 0.05 U.mg<sup>-1</sup>). For the SCB substrates *in natura* and pretreated, the enzymatic activity of PAFs increased in proportion to the increased concentration of NaOH used in the pretreatment, while at the same time better hemicellulose and lignin solubilization were observed in the fiber, as well as increased crystallinity. *In natura* and pretreated SCB fibers were used as a chromatographic matrix and interaction of the PAFs with the matrices was observed, especially the pretreated SCB matrices with 20% and 40% NaOH. In conclusion, Morada Nova sheep ruminal enzymes were able to degrade SCB fibers, with higher efficiency by adjusting the pH and reaction temperature, as well as performing alkaline pretreatment of the SCB. In addition, the pretreated SCB fiber itself can be used to isolate and characterize lignocellulolytic ruminal enzymes.

**Keywords:** Enzymes. Ruminant microorganisms. Pretreatment. Enzymatic saccharification. *Saccharum officinarum*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Componentes estruturais da cana-de-açúcar. ....	20
Figura 2 -	Bagaço de cana obtido após a moagem da cana-de-açúcar.....	21
Figura 3 -	Representação da estrutura da parede celular.....	23
Figura 4 -	Representação da estrutura da celulose.....	24
Figura 5 -	Unidades monoméricas de açúcares que compõem a hemicelulose.....	26
Figura 6 -	Precursos da formação da lignina.....	27
Figura 7 -	Estrutura da biomassa lignocelulósica antes e após o pré-tratamento.....	29
Figura 8 -	Representação esquemática da ação catalítica das celulasas sobre a celulose com geração de glucose.....	32
Figura 9 -	Estrutura do xilano (I) e local de ação das xilanases (II).....	34
Figura 10 -	Resíduo da cana-de-açúcar estocado em propriedade rural.....	39
Figura 11 -	Fornecimento do bagaço de cana-de-açúcar.....	40
Figura 12 -	Fluxograma para obtenção das proteínas aderidas à fibra (PAFs) do bagaço de cana-de-açúcar.....	41
Figura 13 -	Bagaço de cana-de-açúcar (100 g) administrado via fístula no rúmen.....	43
Figura 14 -	Bagaço de cana-de-açúcar pulverizado com solução contendo diferentes concentrações de NaOH.....	44
Figura 15 -	Peneira de malha 250 µm (Ø) utilizada para homogeneizar a granulometria do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado .....	44
Figura 16 -	Quantificação de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS). (a) Amostras antes da reação (b) Amostras após a reação.....	47
Figura 17 -	Avaliação dos diferentes pH na atividade de celulase total das proteínas aderidas à fibra (PAFs) .....	50

Figura 18 -	Quantidade de proteínas extraídas nos diferentes pH.....	51
Figura 19 -	Avaliação de diferentes temperaturas na atividade de celulase total das proteínas aderidas à fibra (PAFs) .....	52
Figura 20 -	Avaliação da atividade de celulase total das proteínas aderidas à fibra (PAFs) após incubação a 100 °C por 10, 30 e 60 minutos.....	53
Figura 21 -	Composição química do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) <i>in natura</i> e pré-tratado com NaOH expresso com base na matéria orgânica (MO).....	54
Figura 22 -	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> .....	55
Figura 23 -	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do bagaço de cana-de-açúcar (BCA). (a) BCA <i>in natura</i> ; (b) BCA pré-tratado com 10% de NaOH; (c) BCA pré-tratado com 20% de NaOH; (d) BCA pré-tratado com 30% de NaOH; (e) BCA pré-tratado com 40% de NaOH; (f) pré-tratado com 50% de NaOH .....	56
Figura 24 -	Atividade específica de celulasas e xilanasas das proteínas aderidas à fibra (PAFs) do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) <i>in natura</i> e pré-tratado com 10, 20, 30, 40 ou 50% de NaOH .....	58
Figura 25 -	Cromatografia de afinidade de proteínas aderidas à fibra (PAFs) em matriz de bagaço de cana-de-açúcar (BCA). (A) Matriz BCA <i>in natura</i> ; (B) Matriz pré-tratada com 10% de NaOH; (C) Matriz pré-tratada com 20% de NaOH; (D) Matriz pré-tratada com 30% de NaOH; (E) Matriz pré-tratada com 40% de NaOH; (F) Matriz pré-tratada com 50% de NaOH.....	59
Figura 26 -	Zimograma da atividade de endoglucanases de proteínas aderidas às matrizes de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados .....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	<b>Composição química do bagaço de cana-de-açúcar.....</b>	<b>32</b>
<b>Tabela 2 -</b>	<b>Trabalhos recentes na literatura com pré-tratamentos alcalinos .....</b>	<b>31</b>
<b>Tabela 3 -</b>	<b>Atividade específica de proteínas aderidas à fibra (PAFs) em diferentes substratos .....</b>	<b>53</b>
<b>Tabela 4 -</b>	<b>Porcentagem relativa de lignina e índice de cristalinidade (IC) do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) <i>in natura</i> e pré-tratado com NaOH.....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCA	Bagaço de cana-de-açúcar
CMC	Carboximetilcelulose
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
IC	Índice de cristalinidade
MO	Matéria orgânica
PAFs	Proteínas aderidas à fibra
pH	Potencial hidrogeniônico

## LISTA DE UNIDADES

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
<i>g</i>	Força gravitacional
H	Hora
kDa	KiloDalton
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mmol.L <sup>-1</sup>	Milimol/L, Milimolar
nm	Nanômetro
p/v	Peso por volume
v/v	Volume por volume
U	Unidade de atividade
U.mg <sup>-1</sup>	Atividade específica

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
2.1	GERAL .....	19
2.2	ESPECÍFICO .....	19
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
3.1	CANA-DE-AÇÚCAR .....	20
3.2	BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	21
3.3	PAREDE CELULAR VEGETAL .....	23
3.4	CONSTITUINTES DA PAREDE CELULAR VEGETAL .....	24
<b>3.4.1</b>	<b>Constituintes marjoritários</b> .....	24
3.4.1.1	Celulose .....	24
3.4.1.2	Hemicelulose .....	25
3.4.1.3	Lignina .....	27
<b>3.4.2</b>	<b>Outros constituintes da parede celular vegetal</b> .....	28
3.5	PRÉ-TRATAMENTO.....	28
3.6	ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS E HIDRÓLISE .....	32
<b>3.6.1</b>	<b>Celulases</b> .....	32
<b>3.6.2</b>	<b>Xilanases</b> .....	33
3.7	RÚMEN E MICRORGANISMOS RUMINAIS .....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
4.1	OBTENÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	39
4.2	MANEJO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	39
4.3	COLETA DO MATERIAL RUMINAL E OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS ADERIDAS À FIBRA (PAFS) DO BAGAÇO DE CANA- DE-AÇÚCAR (BCA) .....	40
4.4	ATIVIDADE DE CELULASE TOTAL DAS PAFS EM DIFERENTES PH E TEMPERATURAS .....	42
4.5	PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO DO BAGAÇO DE CANA-DE- AÇÚCAR (BCA) .....	43
4.6	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (BCA) .....	44



4.7	ANÁLISE DA RELAÇÃO LIGNINA/CELULOSE E O ÍNDICE DE CRISTALINIDADE DO BCA IN NATURA E PRÉ-TRATADO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	45
4.8	ENSAIOS ENZIMÁTICOS EM DIFERENTES SUBSTRATOS .....	46
4.9	CROMATOGRAFIA EM MATRIZ DE BCA IN NATURA E PRÉ-TRATADO .....	47
4.10	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	48
4.11	ATIVIDADE RELATIVA DE ENDOGLUCANASE POR ZIMOGRAMA	48
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
5.1	ATIVIDADE DE CELULASE TOTAL DAS PAFS EM DIFERENTES PH E TEMPERATURAS .....	50
5.2	ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES SUBSTRATOS .....	53
5.3	PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	54
5.4	ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) E CRISTALINIDADE DO BCA IN NATURA E PRÉ-TRATADO .....	55
5.5	BIODEGRADAÇÃO DO BCA IN NATURA E PRÉ-TRATADO .....	57
5.6	BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR IN NATURA E PRÉ-TRATADO COMO MATRIZES CROMATOGRÁFICAS .....	58
5.7	ATIVIDADE RELATIVA DE ENDOGLUCANASE POR ZIMOGRAMA	60
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>68</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é um material orgânico encontrado abundantemente na natureza, constituído majoritariamente de celulose, hemicelulose e lignina (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016). Diversos resíduos lignocelulósicos utilizados em bioprocessos, como o bagaço de caju (REIS *et al.*, 2017; CORREIA *et al.*, 2015), o talo do algodoeiro (SEMERCÍ; GÜLER, 2018), a palha de trigo (TOWNSEND *et al.*, 2018), a palha de cana-de-açúcar (SANTOS *et al.*, 2012) e o bagaço de cana-de-açúcar (RABELO *et al.*, 2014).

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma gramínea originada da Ásia, o Brasil é o maior produtor com 758.548.292 toneladas produzidas na safra de 2017/2018 (FAOSTAT, 2019), uma cultura importante para a produção de açúcar e etanol de primeira geração. É uma potente fonte de biomassa, rica em material lignocelulósico que dá origem aos resíduos agroindustriais dessa cultura. Estes resíduos podem ser destinados para à produção de biocombustíveis ou energia (VARSHNEY; MANDADE; SHASTRI, 2019), de forma objetiva reduzir os custos de produção, bem como para minimizar problemas ambientais ocasionados pelo seu acúmulo. No entanto, uma quantidade considerável de bagaço de cana-de-açúcar ainda é desperdiçada.

Dessa forma, sendo o Brasil o maior produtor de cana-de-açúcar, conseqüentemente, é também o maior produtor de resíduo lignocelulósico dessa cultura, representados pela palha e o bagaço de cana-de-açúcar (SANTOS *et al.*, 2014; RAVINDRAN *et al.*, 2018). O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) tem se destacado e ganhado espaço na busca por fontes de energia renováveis, onde o aproveitamento desse surge como uma alternativa para obtenção de etanol de segunda geração, energia e outros bioprodutos de interesse industrial (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016), como o seu uso na alimentação animal (GOMES *et al.*, 2015) e além da produção comercial de enzimas eficientes (PEREIRA *et al.*, 2015).

Considerando a grande disponibilidade desta biomassa no Brasil, o seu aproveitamento possibilita alcançar resultados satisfatórios na geração de produtos, e promover vantagens econômicas e ambientais (ZHANG; DONALDSON; MA, 2012). Com a degradação do BCA pode-se viabilizar a produção de uma maior quantidade de etanol sem que seja necessária a ampliação na área de cultivo.

A composição química do BCA é constituída majoritariamente por 45% de celulose, 23% de hemicelulose e 18% de lignina (NGUYEN *et al.*, 2018). Para a conversão do BCA em açúcares menores, como a glucose, é necessário o tratamento prévio deste material, devido à recalcitrância que é conferida à celulose. O tratamento prévio deste material poderá ser mediante hidrólise química ou enzimática, permitindo abertura ou rompimento da fibra, favorecendo o acesso à celulose (NASIRPOUR *et al.*, 2014; FARINAS, 2015). Os métodos de pré-tratamento utilizados diferem quanto aos rendimentos e efeitos que causam na biomassa. Como exemplo, os pré-tratamentos químicos promovem a solubilização de hemicelulose e lignina (RABELO *et al.*, 2014; AHMADI *et al.*, 2016). E a degradação enzimática do BCA pode ser realizada por enzimas secretadas por diferentes microrganismos.

A celulose é um homopolissacarídeo formado por unidades de glucose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1,4), composta por regiões cristalinas e amorfas. As celulasas quebram a celulose em moléculas de celobiose, que serão convertidas em glucose pela ação da  $\beta$ -glucosidase (BANERJEE; SCOTT-CRAIG; WALTON, 2010). Esses microrganismos também produzem enzimas xilanases, com o papel de hidrolisar o xilano, que é um polissacarídeo formado por unidades monoméricas de xilose, é um dos principais constituintes da hemicelulose (POLIZELI *et al.*, 2005).

No ambiente ruminal existem diversas espécies de microrganismos que são potentes produtores de enzimas capazes de degradar a biomassa (LYND *et al.*, 2002). E a produção dessas enzimas da microbiota ruminal pode ser direcionada através do tipo de alimento, proporcionando a obtenção de enzimas mais específicas, quando o próprio substrato de interesse é utilizado. No tocante à hidrólise enzimática para a conversão de biomassa em etanol de segunda geração e outros bioprodutos, é necessário o desenvolvimento de tecnologia para viabilizar a produção de enzimas mais específicas e de baixo custo (FLORENCIO *et al.*, 2017).

Uma estratégia para a prospecção de enzimas capazes de atuar de forma mais eficiente na degradação do BCA é utilizar comunidades microbianas naturalmente selecionadas em ambiente de degradação de biomassa, como é o caso das enzimas dos microrganismos do rúmen de ovinos, como já sugerido por Gomes *et al.* (2015).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Extrair e caracterizar enzimas lignocelulolíticas do rúmen de ovinos da raça Morada Nova quanto à atividade em diferentes faixas de pH e de temperaturas e avaliar o potencial em degradar e interagir com o bagaço de cana-de-açúcar (BCA) *in natura* e pré-tratado.

### 2.2 ESPECÍFICOS

Determinar a atividade enzimática das proteínas aderidas à fibra (PAFs) do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) sob diferentes faixas de pH e de temperaturas;

Avaliar a atividade das PAFs quanto aos substratos: papel de filtro, carboximetilcelulose (CMC), Avicel® (celulose microcristalina) e xilano;

Avaliar a atividade das PAFs na sacarificação do BCA *in natura* e pré-tratado com hidróxido de sódio (NaOH);

Avaliar as alterações na composição bromatológica e na estrutura cristalina do BCA *in natura* e pré-tratado com NaOH;

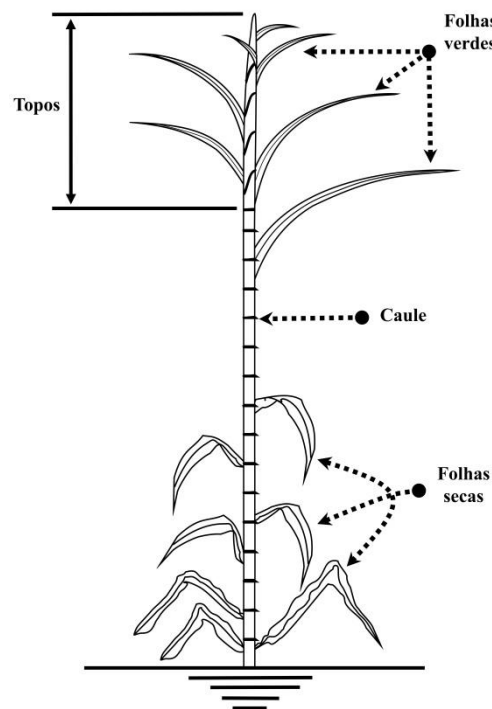
Avaliar o BCA *in natura* e pré-tratado como matrizes cromatográficas para fracionar e isolar PAFs.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma gramínea originada da Ásia, introduzida no Brasil na época colonial, e adaptada aos climas tropicais e subtropicais. Essa planta apresenta uma estrutura composta por caule (colmo), que são segmentados em nós e entrenós, com folhas localizadas na inserção alternada no colmo (Figura 1). A cana-de-açúcar é destinada principalmente para à produção de açúcar e etanol (TYAGI *et al.*, 2019), e o restante são utilizados para fabricação de cachaça e rapadura, e sob a forma de forragem, para alimentação animal (FREITAS *et al.*, 2011). Os principais resíduos produzidos pela indústria da cana-de-açúcar são o bagaço e a palha (SANTOS *et al.*, 2012; del RIO *et al.*, 2015).

**Figura 1 – Componentes estruturais da cana-de-açúcar.**



Fonte: Modificado de SEABRA *et al.*, 2010

No Brasil, ao longo dos anos, foi introduzida uma quantidade significativa de variedades de cana, com cerca de 20 novas variedades sendo incorporadas todos os anos, gerando um material heterogêneo destinado, principalmente, à indústria sucroalcooleira (ROCHA *et al.*, 2015).

O maior produtor de cana-de-açúcar do mundo é o Brasil, com produção na safra de 2017/2018 de 758.548.292 toneladas (FAOSTAT, 2019). Com o seu processamento industrial obtêm-se produtos que geram resíduos em grande escala, como a palha e o bagaço de cana-de-açúcar (SANTOS *et al.*, 2014; RAVINDRAN *et al.*, 2018). Em média, por safra, são gerados 185 milhões de toneladas de resíduos sólidos por safra (ROCHA *et al.*, 2015). Logo, com o aumento da produção de açúcar e etanol de primeira geração, conseqüentemente, ocorre o aumento na quantidade dos resíduos produzidos que precisam ser destinados para a geração de outros produtos.

### 3.2 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (BCA)

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) é um resíduo fibroso (lignocelulósico) resultante da moagem da cana-de-açúcar para extração do conteúdo solúvel (Figura 2) (MISSIO, 2016). O uso desse material pode ser destinado para a geração de energia (queima do bagaço) em caldeiras, produção de etanol de segunda geração, como também na alimentação animal.

**Figura 2 – Bagaço de cana obtido após a moagem da cana-de-açúcar.**



Fonte: Elaborada pela autora.

Quanto à composição química, o BCA apresenta, em média, 84,55% de matéria orgânica, baixo valor proteico, com média de 3,13%, extrato etéreo médio de 1%, e fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose, celulose e lignina com média de 76,50%, 51,33%, 24,59%, 40,77%, 12,18%, respectivamente (Tabela 1).

Observa-se então uma ampla variação desses constituintes no BCA de acordo com a origem, tornando necessário em cada nova pesquisa a análise química prévia do substrato a ser trabalhado. Essa variação na composição destes constituintes sofre influência da espécie de cana-de-açúcar, do tipo de manejo, das condições de cultivo, da idade de corte e do período de colheita (ROCHA *et al.*, 2015; MAGALHÃES *et al.*, 2018).

**Tabela 1- Composição química do bagaço de cana-de-açúcar.**

Referências	MO	PB	EE	FDN	FDA	Hem	Cel	Lig
Gomes <i>et al.</i> , 2013	89,07	3,78	1,54	80,02	51,17	28,85	40,45	10,72
Gomes <i>et al.</i> , 2015	95,97	1,81	-	64,95	43,44	21,51	36,15	7,20
Nguyen <i>et al.</i> , 2018	-	-	-	-	-	23,42	45,73	18,62
Lunsina <i>et al.</i> , 2018	68,6	3,8	1,1	84,5	59,4	-	-	-

MO: Matéria Orgânica, PB: Proteína Bruta, EE: Extrato etéreo; FDN: Fibra em detergente neutro, FDA: Fibra em detergente ácido, Hem: Hemicelulose, Cel: Celulose, Lig: Lignina.

Fonte: Elaborada pela autora.

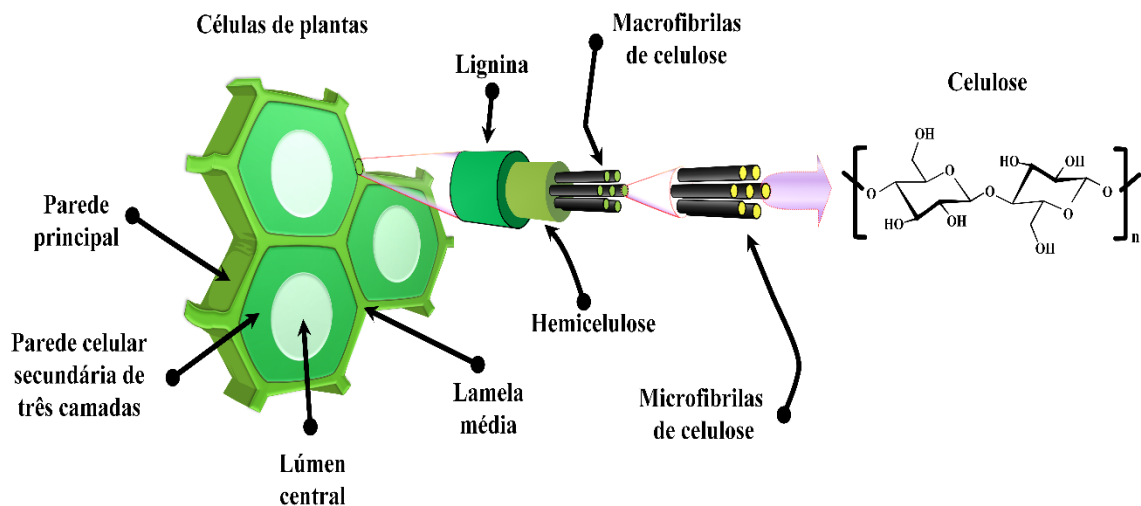
Na natureza, os materiais lignocelulósicos podem ser degradados por comunidades microbianas, como é o caso dos microrganismos presentes no rúmen. O estudo de Gomes *et al.* (2015) mostrou a eficiência dos microrganismos ruminais na degradação do BCA. Em outro trabalho, o fungo anaeróbio *Neocallimastix spp.* promoveu a degradação *in vitro* do BCA (SHELKE *et al.*, 2009). E já foram identificadas enzimas lignocelulolíticas da microbiota ruminal, através da técnica de metagenômica (LOPES *et al.*, 2015).

Assim, o próprio microrganismo quanto a extração de suas enzimas podem ser importantes ferramentas para o desenvolvimento de tecnologias que melhorem o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos, para fins nutricionais quanto industriais.

### 3.3 PAREDE CELULAR VEGETAL

A parede celular é um componente típico da célula vegetal e de diferenciação entre célula vegetal e animal. Apresentam camadas organizadas, com estrutura diversa e complexa. Quanto à estrutura, pode se dividir em lamela média, lúmen central, parede primária e secundária. Cada célula possui sua parede fixada à parede das células vizinhas pela lamela média. Quanto à composição, a parede celular é constituída por celulose, hemicelulose, lignina, pectinas e proteínas estruturais. A celulose é o constituinte principal da parede celular, formada por unidades de glucose unidas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas e se organiza na forma de microfibrilas de celulose. As microfibrilas de celulose estão recobertas pela hemicelulose e lignina (Figura 3), essa interação é responsável pela recalcitrância, impedindo assim o acesso das enzimas para a hidrólise (ZHANG *et al.*, 2016).

**Figura 3 - Representação da estrutura da parede celular.**



Fonte: Modificado de ZHANG *et al.*, 2016.

A parede primária é formada por células em crescimento, e as microfibrilas de celulose, são implantadas em uma matriz altamente hidratada (aproximadamente 80% de água), que apresenta resistência e flexibilidade. A parede celular do tipo I é encontrada em monocotiledôneas e dicotiledôneas que consistem de fibras de celulose dentro de um xiloglucano, e ainda pectina e proteínas estruturais. Já a parede



celular do tipo II é observada em monocotiledôneas (gramíneas) que consistem em fibras de celulose dentro de uma matriz de glucuronoarabinoxilano (ZHONG; YE, 2015).

As paredes secundárias tem sua formação após cessar o crescimento das células, são formadas por fibras de celulose dentro de uma matriz de hemicelulose e lignina. Suas paredes são bem espessas e servem de suporte mecânico para a planta. Nessa parede, a lignina remove água da matriz e constitui uma rede hidrofóbica (COSGROVE, 2005; HARRIS, 2006).

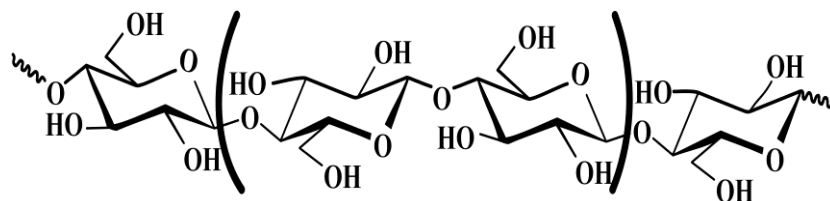
### 3.4 CONSTITUINTES DA PAREDE CELULAR VEGETAL

#### 3.4.1 Constituintes majoritários

##### 3.4.1.1 Celulose

A celulose é o principal componente da biomassa vegetal. Na figura 4 mostra a estrutura da celulose que é um polissacarídeo linear, constituído por unidades de glucose unidas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas (BROWN, 2004).

**Figura 4 - Representação da estrutura da celulose.**



Fonte: Modificado de BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016.

As microfibrilas de celulose são formadas por uma região cristalina, bem organizada, e uma região amorfa, com arranjo desorganizado. Uma característica importante da região cristalina é que as cadeias de celulose se agrupam em microfibrilas, insolúveis em água, e possuem uma estrutura firme impedindo a penetração de enzimas. As cadeias de celulose são bem longas para se estenderem às múltiplas regiões cristalina e amorfa dentro de uma microfibrila. No processo de

degradação da celulose por celulases fúngicas, primeiramente são degradada as regiões amorfas (ZHAO *et al.*, 2012).

As ligações de hidrogênio intermolecular e intramolecular estão dentro da microfibrila de celulose, promovem fortes interações resultando na cristalinidade desta região, e durante a hidrólise pode ocorrer rearranjos dessas ligações de hidrogênio, melhorando o acesso à celulose (WANG *et al.*, 2015). A celulose tem uma alta resistência, equivalente ao do aço, dificultando ação química e enzimática, tais propriedades faz a celulose um excelente material estrutural.

Além das regiões cristalinas e amorfas, a molécula de celulose pode apresentar diversas variações em sua cristalinidade, onde já foram identificadas a celulose  $\alpha$ ,  $I\beta$ , II, III<sub>I</sub>, III<sub>II</sub>, IV<sub>I</sub> e IV<sub>II</sub>. As variações  $\alpha$  e  $I\beta$  são as mais abundantes encontradas na natureza, denominadas de celulose nativa (OGEDA; PETRI, 2010).

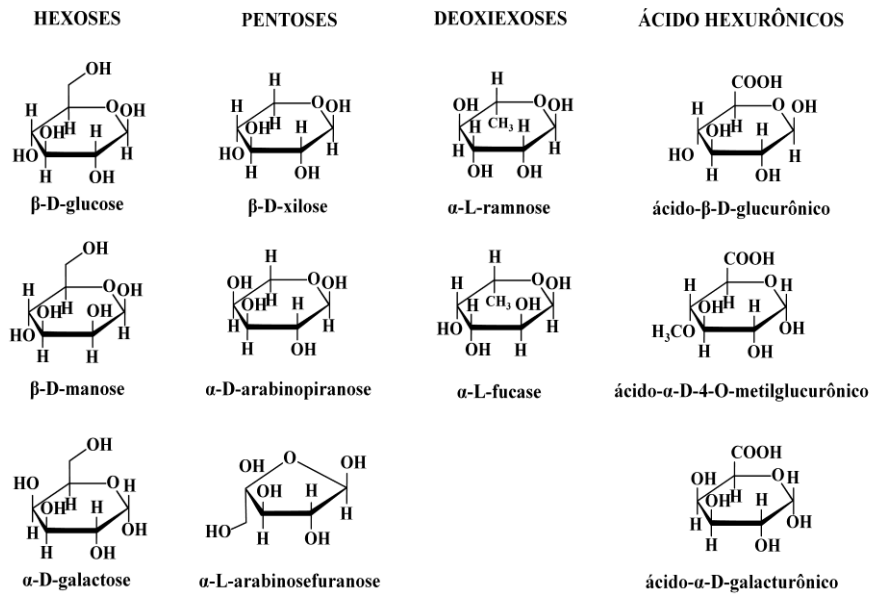
O índice de cristalinidade (IC) é utilizado como parâmetro para avaliar a estrutura da celulose determinando a relação entre celulose cristalina e amorfa. Várias técnicas são preconizadas para sua determinação, dentre elas a ressonância magnética nuclear (RMN) tem mostrado mais acurácia (PARK *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2016).

#### 3.4.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é também um dos componentes majoritários da parede celular dos vegetais e constitui uma parte da biomassa lignocelulósica. Além disso, a hemicelulose desempenha um papel crucial de fortalecimento da parede celular através das interações com a celulose e a lignina.

São polímeros heterogêneos formados por hexoses, pentoses, deoxiexoses e ácidos hexurônicos, incluindo xilanos, mananos e os galactanos entre outros. Na figura 5 mostra as unidades monoméricas, e sua estrutura varia de acordo com a espécie de planta, contendo resíduos de D-glucose, D-galactose, D-manose, D-xilose, D-arabinopiranoose, L-arabinosefuranose, L-ramnose, L-fucase, D-ácido glucurônico, D-ácido metilglucurônico e D-ácido galacturônico, a maioria unidos por ligações  $\beta$ -1,4 (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

**Figura 5- Unidades monoméricas de açúcares que compõem a hemicelulose.**



Fonte: Modificado de MORAIS *et al.*, 2005.

O xilano é encontrado no bagaço de cana-de-açúcar, em outras gramíneas, e também em diferentes tipos de madeiras (SAHA, 2003; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

Sun *et al.*, (2004) observaram que a fração hemicelulósica extraída do BCA por tratamento alcalino mostrou resíduos de xilose com ligações β-1,4 e ramificada principalmente por unidades de arabinofuranosil e 4-O-metilglucopiranosil. Estes resíduos de açúcares apresentaram ligações éster com ácido ferúlico e ácido p-cumárico, que são componentes de lignina.

Variando com o estado de desenvolvimento e com a espécie vegetal, a hemicelulose pode conter grandes quantidades de polissacarídeos importantes como, glucoarabinoxilanos e glucomanos, que estão envolvidos no sistema de armazenagem na célula e mecanismo de retenção de água em sementes.

Estudos envolvendo a aplicabilidade das hemiceluloses vêm sendo desenvolvidos, onde as hemiceluloses do bagaço de cana-de-açúcar têm potencial para produzir filmes biodegradáveis (SABIHA-HANIM; SITI-NORSAFURAH, 2012).

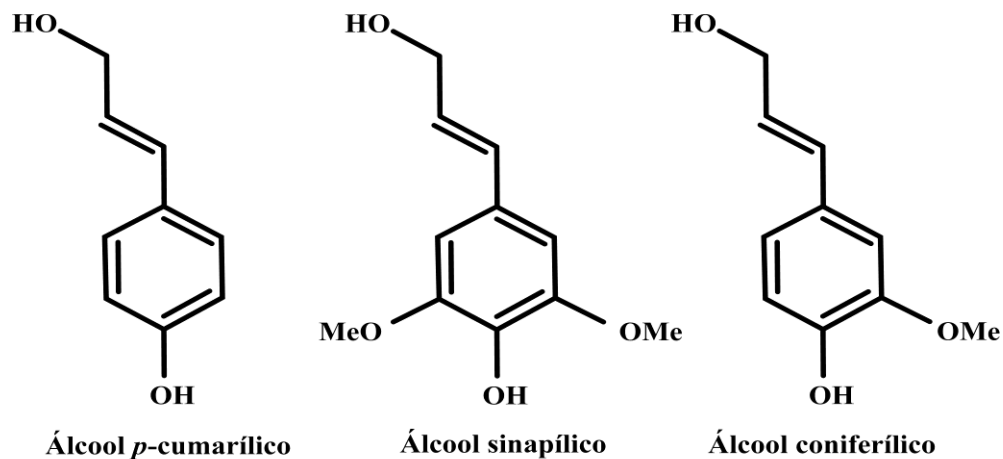
O tratamento alcalino em resíduos agroindustriais, proposto por Carvalho *et al.* (2016), foi eficiente para solubilizar hemicelulose e lignina, e promoveu a remoção de açúcares como xilose, manose, galactose e arabinose juntamente com o ácido urônico, favorecendo a conversão da biomassa.

### 3.4.1.3 Lignina

A lignina é um dos componentes da madeira e de diversas biomassas, apresenta características amorfa e hidrofóbica, está presente na parede celular secundária dos vegetais, conferindo força e rigidez, preenche e liga os espaços entre os elementos fibrilares dos polissacarídeos constituintes (VANHOLME *et al.*, 2010; BONAWITZ *et al.*, 2014).

A formação da lignina ocorre a partir de três álcoois precursores: álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (figura 6), que geram a formação das unidades monoméricas, como p-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), respectivamente (del RÍO *et al.*, 2015; CHENG *et al.*, 2017).

**Figura 6 – Precursores da formação da lignina.**



Fonte: Modificado de BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016.

Os álcoois que formam a lignina diferem em estrutura dependendo do tipo de planta ou das diferentes camadas da parede celular. O estudo de Del Rio *et al.* (2015) mostrou a diferença da estrutura química do bagaço de cana-de-açúcar e da palha de cana-de-açúcar, onde o BCA apresentou ser rico em siringila (H: G: S) já a palha de cana rica em guaiacila (H: G: S). Nas gramíneas, a unidade p-hidroxifenila (H) se apresenta em menor quantidade.

Além disso, em biomassa lignocelulósica a lignina é responsável por promover recalcitrância e resistência à ação microbiana, sendo indicada como um dos principais fatores limitantes da hidrólise (ZANG *et al.*, 2016). Durante o pré-tratamento

é interessante que ocorra a redução da quantidade de lignina, favorecendo a sacarificação enzimática (KIM; LEE; KIM, 2016).

### 3.4.2 Outros constituintes da parede celular vegetal

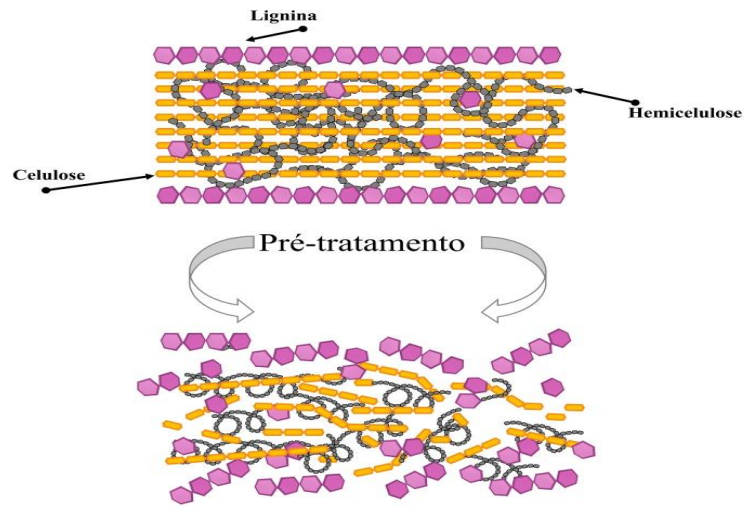
Na parede celular estão presentes também outros constituintes, como as pectinas e as proteínas estruturais. As pectinas são polissacarídeos complexos altamente ramificados e hidrofílicos, contendo açúcares ácidos, como ácido galacturônico, e açúcares neutros como ramnose, galactose e arabinose. A remoção dos grupos das pectinas pode ser por água quente. Uma das pectinas mais abundantes é o polissacarídeo *ramnogalacturonano I (RG I)* tem uma estrutura básica com uma variedade de cadeias laterais. E tem outro polissacarídeo mais complexo e altamente ramificado denominado de *ramnogalacturonano II (RG II)* (O'NEIL *et al.*, 2004).

Além dos polissacarídeos, na parede celular encontram-se várias classes de proteínas estruturais. Entre elas as expansinas que são requeridas no momento de expansão e crescimento dos vegetais (McQUEEN-MASON; DURACHKO; COSGROVE, 1992). E as extensinas que são glicoproteínas presentes na parede durante o crescimento da parede primária, formadas por glicoproteínas rica em aminoácidos, como as glicoproteína rica em hidroxiprolina (HRGP), proteína rica em glicina (GRP), proteína rica em prolina (PRP), que contribuem para a resistência da parede a ataques de patógenos (RINGLI; KELLER; RYSER, 2001).

## 3.5 PRÉ-TRATAMENTO

Como já enfatizado, a biomassa lignocelulósica é constituída de celulose, hemicelulose e lignina, apresenta uma elevada recalcitrância desses constituintes, provenientes de complexas interações, dificultando o acesso à celulose. Dessa forma, o pré-tratamento é uma etapa necessária para permitir o rompimento das estruturas da parede celular, favorecer o acesso das enzimas à celulose (Figura 7), e, conseqüentemente, melhorar a conversão dos carboidratos em açúcares menores (MARTÍNEZ *et al.*, 2016; TYAGI *et al.*, 2019).

**Figura 7- Estrutura da biomassa lignocelulósica antes e após o pré-tratamento.**



Fonte: Modificado de MOOD *et al.*, 2013.

Vários fatores podem estar relacionados com a resistência da biomassa em ser hidrolisada, entre eles a cristalinidade da celulose e a proteção da celulose pela lignina e hemicelulose. Neste sentido, diferentes métodos de pré-tratamento vêm sendo estudados, tais como, o pré-tratamento biológico, com uso de microrganismos, os físicos que incluem moagem e extrusão, os químicos que são os ácidos e os alcalinos, e as várias combinações desses pré-tratamentos (SUN *et al.*, 2014; FARINAS, 2015; GHAFAR; FAN; MCVICAR, 2015).

Os microrganismos utilizados no pré-tratamento biológico, geralmente são bactérias e fungos, secretam enzimas que modificam a composição química e a estrutura dos materiais lignocelulósicos. Empresas no ramo de produção de enzimas têm voltado à atenção para o desenvolvimento de microrganismos produtores de enzimas, como as celulases, que possui potencial biotecnológico na degradação de biomassa.

Entre os métodos físicos pode ser utilizado recurso mecânico, promovendo a redução da partícula pelo processo de moagem, e o aumento da área de superfície para potencializar o desempenho das enzimas. Este processo gera alto consumo de energia, não é tão viável economicamente, pois aumenta o custo do processo (OGEDA; PETRI, 2010).

Os métodos químicos apresentam diferenças nos tipos de reagentes utilizados e nos mecanismos que são responsáveis pelas modificações estruturais ocorridas durante esse processo, como alterações na hemicelulose e lignina

(REZENDE *et al.*, 2011 ZHANG E WU, 2014). Eles permitem a deslignificação e melhoram a digestibilidade da celulose ao aumentar a acessibilidade das enzimas (SHI; YANG; LIN, 2014; CHEN *et al.*, 2017). O pré-tratamento ácido tem desvantagens, por sua ação corrosiva que pode danificar os equipamentos de trabalho, e ainda produzir inibidores para fermentação, dificultando o processo de hidrólise.

O pré-tratamento com líquidos iônicos têm mostrado ser eficientes, são substâncias compostas de íons e líquidos (<100 °C) utilizados à temperatura ambiente que promovem a dissolução e a hidrólise da biomassa (REIS *et al.*, 2017; SEMERCI E GÜLE, 2018).

Com o pré-tratamento alcalino é possível aumentar a porosidade e a área de superfície, melhorando a hidrólise enzimática (KIM; LEE; KIM, 2016). Os principais mecanismos desse pré-tratamento são a degradação de ligações éster e a clivagem de ligações glicosídicas na matriz da parede celular lignocelulósica, que resultam na solubilização do complexo hemicelulose e lignina, alteração da estrutura lignocelulósica e da cristalinidade (BRODEUR *et al.*, 2011; MARTÍNEZ *et al.*, 2015).

Diferentes bases atuam na solubilização da lignina, tais como  $\text{Ca(OH)}_2$  (Hidróxido de cálcio), KOH (Hidróxido de potássio) e NaOH (Hidróxido de sódio). A base mais utilizada tem sido o NaOH, estando sua eficiência condicionada à quantidade de lignina presente na biomassa (MARYANA *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2015; MARTÍNEZ *et al.*, 2016; CHANG *et al.*, 2017).

O NaOH é um dos catalisadores básicos mais fortes, e a sua eficácia no pré-tratamento é confirmada por uma maior produção de açúcares fermentáveis através da hidrólise enzimática, ao ser comparado a outros pré-tratamentos alcalinos (KIM; LEE; KIM, 2016). Devido a essas características do pré-tratamento alcalino já mencionado, e o NaOH ser um reagente que não causa danos corrosivos aos materiais do ambiente de trabalho, essa base foi selecionada para o pré-tratamento nesse estudo. A tabela 2 apresenta os principais resultados de trabalhos publicados recentes na literatura com os diferentes pré-tratamentos alcalinos.

**Tabela 2 - Trabalhos recentes na literatura com pré-tratamentos alcalinos.**

<b>Biomassas</b>	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referências</b>
Bagaço de cana-de-açúcar	Combinação de hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de cálcio Ca(OH) <sub>2</sub>	- Redução de 41,2% de lignina no BCA  - O tratamento combinado aumentou a degradabilidade ruminal do BCA.	Ahmadi <i>et al.</i> , 2016
Bagaço de caju	Peróxido de hidrogênio alcalino	- Reduziu o conteúdo de lignina nos sólidos residuais.  - O aumento da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> resultou em uma maior taxa de hidrólise enzimática.	Correia <i>et al.</i> , 2013
Talo do algodoeiro	Diferentes líquidos iônicos protáticos (PILs)	- Diminuição do teor de lignina e aumento do teor de celulose, após o pré-tratamento.  -Aumento da hidrólise enzimática.  - Mudanças na superfície da estrutura, como formações de poros e camadas divididas	Semerci e Güle, 2018
Palha de trigo	Hidróxido de potássio (KOH) e/ou adicionado de antraquinona (AQ) e lignosulfonato de sódio (SLS)	- A adição de AQ combinada com SLS pode aumentar a remoção de lignina.  - O rendimento total de açúcar foi de 80%, sendo 16% maior em comparação com o pré-tratamento com KOH sem adição de AQ e SLS.	Xie <i>et al.</i> , 2018

Fonte: Elaborada pela autora.

Com pode ser observado na tabela 2, o resultado de um reagente alcalino muda de acordo com o substrato tratado. Dessa forma, o desenvolvimento de um



sistema de pré-tratamento adequado e economicamente viável está na dependência da biomassa a ser usada como substrato.

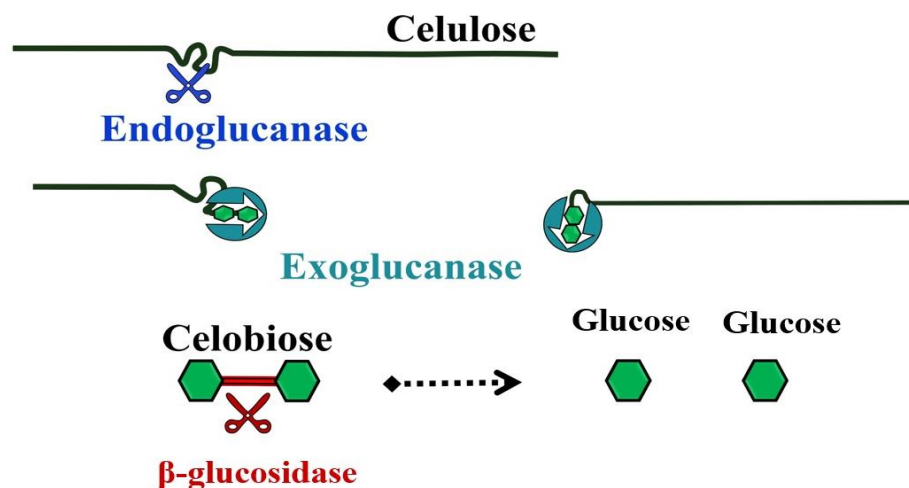
### 3.6 ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS E HIDRÓLISE

#### 3.6.1 Celulases

As celulases também chamadas de hidrolases glicosídicas são secretadas pelos microrganismos, hidrolisam e degradam a celulose insolúvel. São capazes de romper ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 de unidades de celulose, liberando moléculas de celobiose e glucose (GILBERT, 2010; KUBICEK, 2013).

A celulose é hidrolisada por uma série de hidrolases glicosídicas. Na figura 8 mostra as celulases de acordo a ação catalítica no substrato celulósico. Elas se dividem em três grandes grupos: a endoglucanase que age na região amorfa da celulose, criando sítios para exoglucanase atuar no interior da região cristalina da celulose. Por fim celobiose sofre ação da  $\beta$ -glucosidase gerando o produto final glucose (BRÁS *et al.*, 2011, JUTURU; WU, 2014). Todos esses três tipos de hidrolases glicosídicas já foram isolados de diferentes microrganismos do rúmen (KRAUSE *et al.*, 2003).

**Figura 8- Representação esquemática da ação catalítica das celulases sobre a celulose com geração de glucose**



Fonte: Modificado de OGEDA; PETRI, 2010.

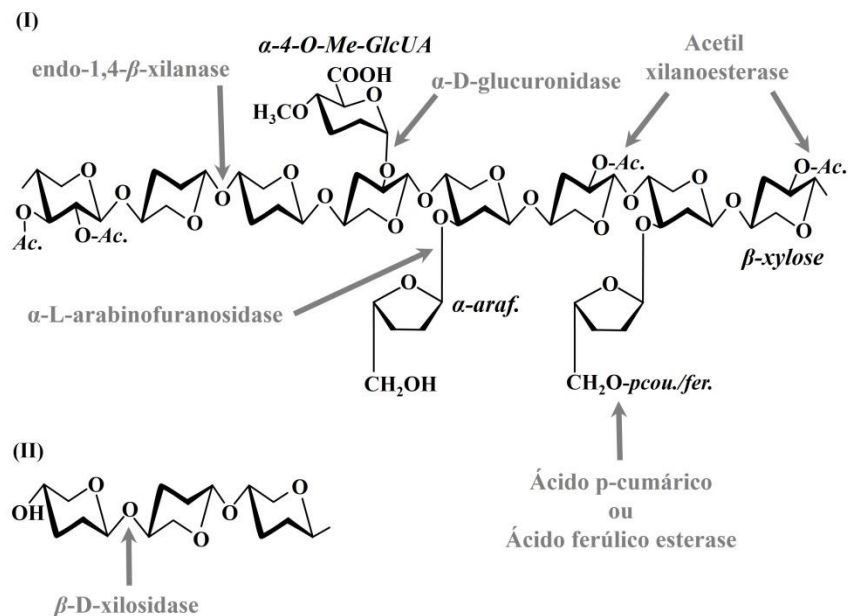
As celulasas têm recebido atenção nos últimos anos devido a sua utilização na sacarificação de materiais lignocelulósicos liberando glucose que pode ser convertida em bioetanol após fermentação por microrganismos. Essa aplicabilidade industrial tem justificado a busca por microrganismos com potencial para produção de celulasas e xilanases mais específicas na degradação dessas biomassas (MARQUES *et al.*, 2018; SALOMÃO *et al.*, 2019).

### 3.6.2 Xilanases

As xilanases são enzimas hemicelulolíticas que hidrolisam o xilano nas ligações ( $\beta$ -1,4). O xilano associado a outros componentes da hemicelulose se ligam à superfície da celulose por ligações de hidrogênio e dificultam a ação das enzimas durante a sacarificação (HOFFMAM *et al.*, 2016).

Para que ocorra a conversão da hemicelulose em açúcares menores, é necessária à ação sinérgica de algumas enzimas, como as endoxilanases,  $\beta$ -xilosidases,  $\alpha$ -glucuronidase,  $\alpha$ -rabinofuranosidase e acetilxilanesterase (figura 9I), que desempenham papel crucial na hidrólise do xilano, que é o principal componente da hemicelulose (GOLDBECK *et al.*, 2016; JUTURU; WU, 2012). As endoxilanases hidrolisam as ligações glicosídicas produzindo xilo-oligossacarídeos (figura 9I), e a  $\beta$ -xilosidase faz a conversão em xilose (figura 9II) (AHMED; RIAZ; JAMIL, 2009; KNOB *et al.*, 2010).

**Figura 9- Estrutura do xilano (I) e local de ação das xilanases (II).**



Fonte: Modificado de COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005.

As xilanases em associação as feruloil esterases além de auxiliarem na sacarificação do BCA hidrolisando as hemiceluloses tipo arabinoxilanos em seus açúcares constituintes, podem também ser utilizadas na geração de moléculas de arabinoxilano intactas para uso como ingredientes alimentares funcionais, filmes, emulsionantes e estabilizantes nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (BRAGA *et al.*, 2014; CAMPBELL *et al.*, 2019). O uso de comunidades microbianas capazes de degradar BCA tem sido utilizada para selecionar enzimas eficientes, como as enzimas das microbiota ruminal de ovinos.

### 3.7 RÚMEN E MICRORGANISMOS RUMINAIS

Os ruminantes são animais herbívoros que possuem um sistema digestivo dividido em quatro compartimentos: rúmen, retículo, omaso e abomaso. O rúmen é uma cavidade que abriga uma rica e diversa comunidade microbiana, que é responsável por executar funções essenciais para atender as necessidades nutricionais do animal (KRAUSE *et al.*, 2003; KAMRA, 2005). Essa microbiota sintetiza enzimas, tais como amilase, celulasas, xilanases, lipases, dentre outras, responsáveis por degradar os substratos fornecidos na dieta.

A combinação da mastigação mecânica e reação enzimática são fatores responsáveis pela a quebra de grandes moléculas, aumentando a superfície de contato na fibra e aderência dos microrganismos (ROSENBERG *et al.*, 2010). Os ruminantes evoluíram em relação ao tipo de dieta a qual gerou variação na composição microbiana destes animais de acordo com as regiões, clima e práticas agrícolas (HENDERSON *et al.*, 2015).

Desta forma, o rúmen pode ser considerado um biorreator natural, devido a sua comunidade microbiana ser eficiente na hidrólise de polissacarídeos da parede celular vegetal e por permitir um ambiente propício para fermentação natural (FLINT *et al.*, 2008).

O ambiente ruminal possui diversas espécies de protozoários, fungos e bactérias, porém em sua maioria é composto por fungos filamentosos e bactérias (SIROHI *et al.*, 2012). Diante da diversidade desses microrganismos, têm sido realizados vários estudos buscando caracterizar a microbiota de diferentes animais, como bovinos (GUO *et al.*, 2019), caprinos (CHENG *et al.*, 2009) e ovinos (GAGEN, 2012). Estes microrganismos ruminais podem ser considerados importantes nos processos biotecnológicos, atuando como fonte de enzimas com alto valor tecnológico.

Os microrganismos ruminais e o animal hospedeiro possuem uma relação benéfica, denominada simbiose mutualística (VAN SOEST, 1994; YUE *et al.*, 2013). A microbiota ruminal pode ser direcionada através do tipo de alimento, proporcionando a produção de enzimas mais específicas, quando o próprio substrato de interesse é utilizado na produção dos microrganismos (GOMES *et al.*, 2013).

Entre os microrganismos ruminais as bactérias correspondem ao grupo que apresenta a maior diversidade em número de espécie. Sua densidade no rúmen do animal hospedeiro é uma das maiores em qualquer ecossistema conhecido, sendo a elevada atividade metabólica aliada à diversidade de alimentos ingeridos, responsáveis por manter essa biodiversidade bacteriana no rúmen (ARCURI *et al.*, 2006). O número total de espécies não é conhecido (KRAUSE; RUSSELL, 1996), no entanto, a concentração no rúmen frequentemente observada é de aproximadamente  $10^{10}$ - $10^{11}$  células/mL de conteúdo ruminal, envolvendo mais de 50 gêneros (KAMRA, 2005). São classificadas de acordo com o substrato alimentar em bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais (celulolíticas ou fibrolíticas), bactérias fermentadoras de carboidratos não-estruturais (amilolíticas e pectinolíticas),

proteolíticas, lipolíticas e anaeróbios facultativos. As bactérias envolvidas no processo de degradação da fibra constituem o grupo mais estudado, considerando a importância econômica e fisiológica do tema (ARCURI *et al.*, 2006).

As principais espécies de bactérias ruminais estão relacionadas com o processo de degradação de material lignocelulósico ingerido pelo animal (RUSSEL; MUCK; WEIMER, 2009). As bactérias mais estudadas são *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium cellulosolvens* e *E. ruminantium* (HUNGATE, 1966; STEWART, 1997; KRAUSE *et al.*, 2003). No estudo de Lopes *et al.* (2015) foi confirmado que no rúmen de ovinos os filos Bacteroidetes e Firmicutes são os maiores representantes.

Os microrganismos celulolíticos são capazes de produzir um complexo de enzimas com uma atuação sinérgica entre mais de um tipo de glicosil hidrolases, que atuam na hidrólise de ligações glicosídicas, incluindo endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glucosidase (KRAUSE *et al.*, 2003), que estão envolvidas na degradação de diversos compostos, como a biomassa lignocelulósica. O celulosoma está presente em várias espécies de bactéria, é uma estrutura complexa multienzimática que atua na adesão dos microrganismos aos substratos insolúveis e, em seguida, na degradação dos substratos celulósicos (ARCURI *et al.*, 2006; VAZANA *et al.*, 2013).

Os fungos anaeróbicos do rúmen são representados pelo filo *Neocallimastigomycota* e são conhecidos por degradarem material lignocelulósico. Este filo abriga seis gêneros: *Orpinomyces*, *Caecomyces*, *Anaeromyces*, *Cyllamyces*, *Piromyces* e *Neocallimastix* (LYND *et al.*, 2002). Estes fungos apresentam uma grande variedade de enzimas para a degradação de biomassa, que pode ser aproveitada para aplicações industriais (DAGAR *et al.*, 2018).

Os *Neocallimastix spp.* são os mais estudados e possuem elevada atividade sobre a região cristalina da celulose (KRAUSE *et al.*, 2003). Isso facilita a atuação das bactérias celulolíticas sobre o substrato fibroso, o que demonstra o sinergismo entre fungos e bactérias ruminais (DERORITY; TIRABASSO, 2000). Joblin *et al.* (2002) observaram que o crescimento da espécie *Caecomyces* com *F. succinogenes* melhorou a degradação de forragem fresca, indicando que podem ser complementares na atividade fibrolítica.

Os protozoários ruminais em sua maioria são representados pelo filo *Ciliophara*, apesar de existir alguns flagelados, os quais são dotados de estruturas ciliares compostas, com função de locomoção ou de obtenção de alimentos

(BARNES, 1990). Os protozoários ciliados podem variar entre  $10^4$  até  $10^6$  ciliados por mililitro de conteúdo ruminal (KAMRA, 2005).

A classificação dos protozoários se baseia na morfologia da célula, pois são organismos grandes o que facilita a visualização das suas principais estruturas celulares características (CHURCH, 1974).

Os protozoários ciliados podem ser divididos em dois grupos: os entodiniomorfidas (entodiniomorfos) e os isotríquídeos (holotríquias). Os primeiros ingerem preferencialmente partículas insolúveis suspensas no fluido ruminal, encontrado em grande número quando a dieta é à base de forragem. O segundo grupo tem maior capacidade de ingerir carboidratos solúveis e grânulos de amido, abundantes em dietas ricas em cereais (KOZLOSKI, 2002) ou à base de cana-de-açúcar (FRANZOLIN *et al.*, 2000).

Os entodiniomorfos podem se aderir às fibras possuindo atividade celulolítica e hemicelulolítica (GUPTA *et al.*, 1990). Dentro do grupo dos entodiniomorfos, as espécies *Epidinium caudatum* e *Polyplastron multivesiculatum* apresentam a maior eficiência fibrolítica (TAKENAKA *et al.*, 2004).

Os isotríquídios possuem o seguinte perfil enzimático: amilase, invertase, esterase, pectina e poligalacturonase, podendo utilizar suficientes quantidades de amido, pectina e açúcar solúvel como fonte de energia. A capacidade celulolítica e hemicelulolítica dos isotríquídios tem sido reportada, no entanto, são menos eficientes que os protozoários entodiniomorfos (WILLIAMS; COLEMAN, 1991). Os protozoários isotríquídios são representados por 15 diferentes gêneros no rúmen de diferentes animais, entre esses, os mais amplamente distribuídos são: *Isotricha*, *Dansutricha*, *Buestchilia* e *Charonina* (KAMRA, 2005).

Uma vantagem do rúmen como fonte de enzimas lignocelulolíticas é que esse órgão pode ser explorado como um biorreator natural direcionando a proliferação microbiana para degradação de um substrato em específico. Associando-se a disponibilidade do BCA à essa particularidade dos ruminantes em degradar biomassa pode-se favorecer a produção de enzimas mais eficientes. Diante disso, ovinos da raça Morada Nova foram alimentados com BCA direcionando a produção de microrganismos para sua degradação, permitindo a extração e a caracterização de enzimas lignocelulolíticas mais específicas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (BCA)

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado para alimentação dos animais foi coletado em propriedades rurais na região norte do estado do Ceará (Figura 10), seco ao sol, moído (partícula de 5 mm) e fornecido aos animais no cocho.

**Figura 10 – Resíduo da cana-de-açúcar estocado em propriedade rural.**



Fonte: elaborado pela autora.

### 4.2 MANEJO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Três ovinos da raça Morada Nova, machos não castrados, fistulados no rúmen, com dois anos de idade, peso entre 35 e 40 Kg, foram adaptados por um período de 21 dias à dieta com bagaço de cana-de-açúcar e fornecido juntamente com a dieta total no cocho (Figura 11), duas vezes ao dia (100 g/dia). O volumoso utilizado foi feno de Capim-tifton 85 (*Cynodon sp.*) com bagaço de cana-de-açúcar e concentrado à base de milho e farelo de soja, e água *ad libitum*. A dieta experimental foi formulada com base nas recomendações NRC (2007).

Os animais foram mantidos em baia coletiva no Campo Experimental da Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada no município de Sobral-CE, e manuseados de acordo com as normas de proteção de animais experimentais preconizadas pelo



*Guide for the Care and Use of Laboratory Animal, National Research Council, USA – GCULA (1996)*, com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética sobre o uso de animais na Embrapa Caprinos e Ovinos, sob o número 005/2014.

**Figura 11 – Fornecimento do bagaço de cana-de-açúcar.**



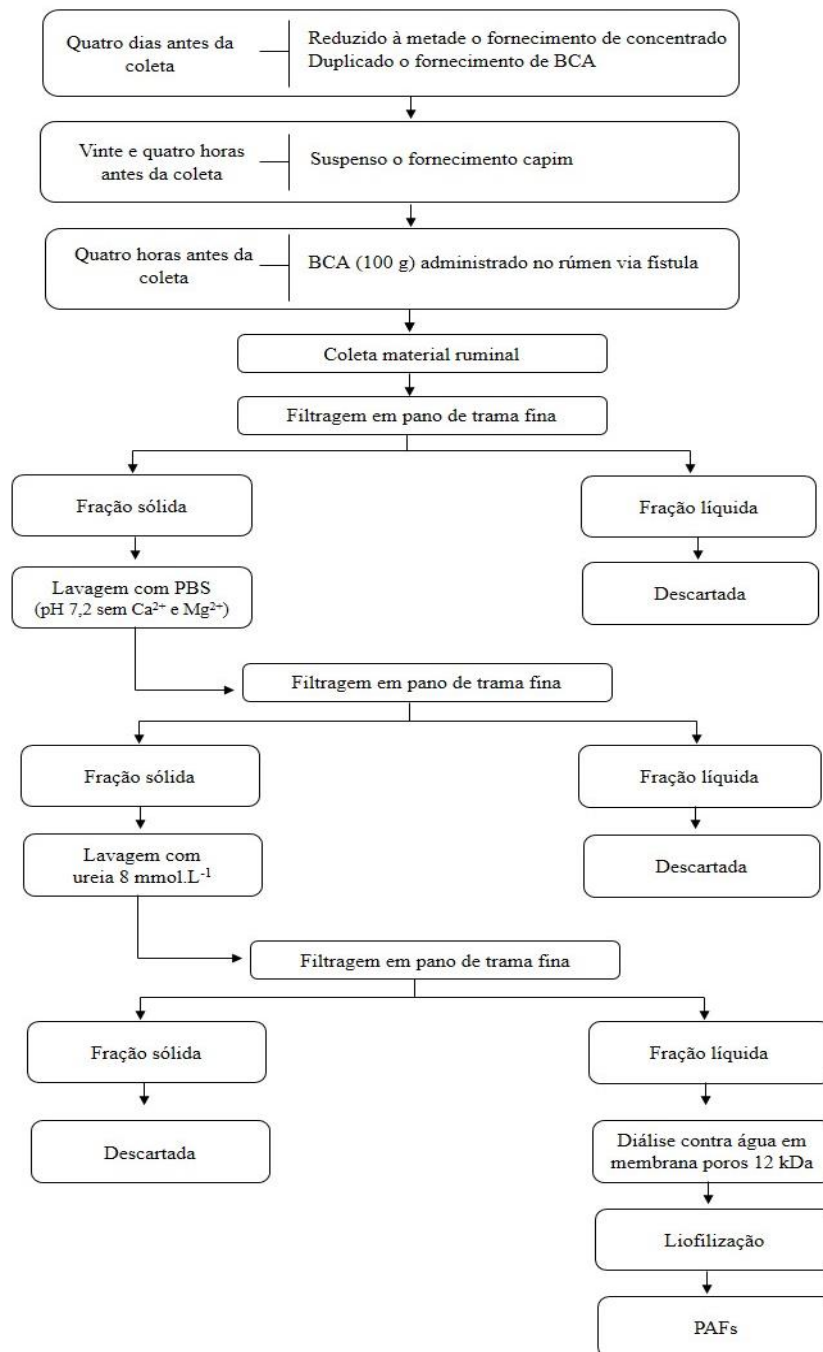
Fonte: elaborado pela autora.

#### 4.3 COLETA DO MATERIAL RUMINAL E OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS ADERIDAS À FIBRA (PAFS) DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (BCA)

A figura 12 mostra o fluxograma para obtenção das proteínas aderidas à fibra do bagaço de cana-de-açúcar. Inicialmente foi seguida a metodologia adaptada de GOMES *et al.* (2015), onde quatro dias antes da coleta de conteúdo ruminal o fornecimento de concentrado foi reduzido pela metade, duplicado o fornecimento de bagaço de cana-de-açúcar e, 24 horas antes, suspenso o fornecimento de Capim-tifton 85. No dia da coleta foram administrados 100 g (partículas de 5 mm) de bagaço de cana-de-açúcar, diretamente no rúmen, via fístula (Figura 13), e, quatro horas após, foi realizada a coleta do conteúdo ruminal e separada a fração líquida da fração sólida por filtragem em pano de trama fina. Seguindo a metodologia adaptada de Toyoda *et al.* (2009) o material sólido retido no pano foi lavado com Solução Salina Tamponada (PBS, pH 7,2, sem  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) na proporção de 1:6 (p/v). Após filtragem, a fração sólida obtida foi lavada na proporção de 1:4 (p/v), por 15 minutos com solução de ureia  $8 \text{ mol.L}^{-1}$  para eluição das proteínas aderidas à fibra. Após nova filtragem, a fração sólida foi descartada e o filtrado recuperado foi dialisado contra água em

membrana com poros de 12 kDa. O material retido na membrana de diálise foi liofilizado e acondicionado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e denominado de proteínas aderidas à fibra (PAFs). As análises químicas foram realizadas no laboratório de Bioquímica da Embrapa Caprinos e Ovinos.

**Figura 12 - Fluxograma para obtenção das proteínas aderidas à fibra (PAFs) do bagaço de cana-de-açúcar**



Fonte: Elaborada pela autora.

As PAFs liofilizadas (5 mg de massa/mL) foram solubilizadas em tampões de diferentes pH (2 a 10) à temperatura ambiente ( $\pm 22$  °C) por uma hora e centrifugadas (14.000 g por 5 minutos a 23 °C). O sobrenadante obtido foi avaliado em ensaios de atividade enzimática e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976).

**Figura 13 - Bagaço de cana-de-açúcar (100 g) administrado via fístula no rúmen.**



Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.4 ATIVIDADE DE CELULASE TOTAL DAS PAFS EM DIFERENTES PH E TEMPERATURAS

A determinação da atividade de celulase total das PAFs, após serem submetidas a diferentes pH, temperaturas e tempos de incubação, foi realizada em papel de filtro (50 mg) utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), com curva padrão de glucose e quantificação espectrométrica de açúcares redutores na absorvância de 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto.

Para as variações de pH foram utilizados os tampões HCl-KCl (pH 2), citrato (pH 3 a pH 7), Tris/HCl (pH 8) e glicina/NaOH (pH 9 e pH 10) a 50 mmol.L<sup>-1</sup>, seguindo metodologia de Pereira *et al.* (2015) com modificações nos tipos de tampões de acordo com o guia *Buffers* (MOHAN, 1997). O ensaio foi realizado a 50 °C por 60 minutos, com as PAFs na concentração de 5 mg de massa/mL. Após identificado o pH reacional ótimo para atividade enzimática, este foi utilizado nos testes que avaliaram a influência da temperatura na atividade. As temperaturas avaliadas foram 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C, como sugerido por Pereira *et al.* (2015), com modificações.

Quanto à termorresistência das PAFs, essa foi testada por meio de incubação a 100 °C por 10, 30 ou 60 minutos, sendo o aquecimento interrompido, transferindo-as imediatamente para banho de gelo. A atividade enzimática residual foi avaliada pelo método de DNS.

Todas as análises enzimáticas foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como unidade de atividade por mg de proteína (U.mg<sup>-1</sup> de proteína). Essas análises químicas foram realizadas no laboratório de Bioquímica da Embrapa Caprinos e Ovinos.

#### 4.5 PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (BCA)

A matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar foi determinada após ser desidratado a 105 °C por 24 horas. Com base na matéria seca, seguindo metodologia adaptada de Gomes *et al.* (2015), foram avaliados cinco tratamentos com os diferentes percentuais de NaOH (10, 20, 30, 40 e 50%), em uma solução pulverizada na proporção 2:1 (v/p) de BCA. O grupo controle (BCA *in natura*) foi pulverizado com água destilada (Figura 14). Após a pulverização, as amostras de BCA foram acondicionadas à temperatura ambiente ( $\pm 28$  °C) por 24 horas. Posteriormente, foram secas a 65 °C, moídas e passadas em peneira de malha de 250  $\mu$ m de diâmetro (Figura 15).

**Figura 14 – Bagaços de cana-de-açúcar pulverizados com solução contendo diferentes concentrações de NaOH**



Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 15 – Peneira de malha 250  $\mu\text{m}$  ( $\emptyset$ ) utilizada para homogeneizar a granulometria do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado**



Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.6 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (BCA)

Para analisar a composição bromatológica do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado com NaOH, utilizou-se os procedimentos descritos pela Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, 1990) e determinou-se, em triplicata, a matéria seca (MS) e a cinza.

O conteúdo de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados de acordo com Van Soest *et al.* (1991), também em triplicata. Os valores de celulose, hemicelulose e lignina foram expressos em porcentagem da matéria orgânica (MO %). As análises químicas foram realizadas no laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Caprinos e Ovinos.

#### 4.7 ANÁLISE DA RELAÇÃO LIGNINA/CELULOSE E O ÍNDICE DE CRISTALINIDADE DO BCA IN NATURA E PRÉ-TRATADO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Uma quantidade de 50 a 55 mg de BCA triturado foi inserido no rotor Kel-F RMN, de 5 mm de diâmetro, para análise. Os experimentos de RMN no estado sólido foram conduzidos em espectrômetro Agilent de 600 MHz operando a 150,87 e 599,93 MHz para  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , respectivamente, equipado com uma sonda de sólidos de 5 mm de diâmetro interno. O experimento de  $^{13}\text{C}$  CP-MAS (Cross Polarization Magic Angle Spinning) (CP-MAS) foram realizado para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado. Para essa análise foram empregados os seguintes parâmetros: rampa de 80-100%, tempo de contato de 1 ms, pulso composto de alta potência (Spinal 64) com 2000 varreduras em uma janela espectral de 414,56 ppm, 3 s de tempo de relaxação entre cada aquisição 1 K de pontos. Todos os experimentos foram realizados com 12 kHz de rotação no ângulo mágico e os espectros foram adquiridos e processados através do software VNMRJ <sup>TM</sup> 4.0. O adamantano foi utilizado como referência de deslocamento químico externo.

A relação entre o teor de lignina e celulose foi obtida a partir do  $^{13}\text{C}$  CP-MAS, conforme proposto anteriormente (FU, 2015; REIS *et al.*, 2017). Para isso, a região integral entre 128,2 e 166,0 ppm, um identificador único para a lignina e a região entre 99,2 e 115,2 ppm, um identificador único para a celulose foram usados para obter a taxa de remoção de lignina. Também foi estimado o índice de cristalinidade (IC) da celulose conforme metodologias descritas anteriormente (LIITIÄ *et al.*, 2001; NEWMAN, 2004). Para isso, o IC foi calculado dividindo a área dos picos cristalinos C4 (92,5-98,5 ppm) por uma área total dos sinais C4, que é a soma dos picos cristalinos (92,5-98,5 ppm) e, dos picos amorfos (86,3-92,5 ppm). A análise de RMN foi realizada na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-Ce.

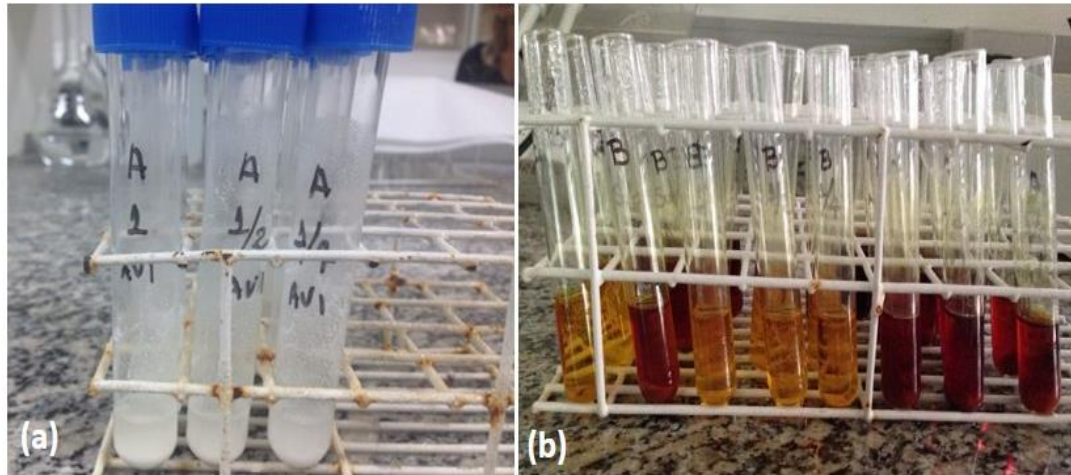
#### 4.8 ENSAIOS ENZIMÁTICOS EM DIFERENTES SUBSTRATOS

A atividade lignocelulolítica das PAFs foi avaliada utilizando 50 mg dos diferentes substratos: papel de filtro (GE Healthcare No. 1), carboximetilcelulose – CMC e xilano, todos adquiridos da Sigma Aldrich Chemical (Saint Louis, MO, EUA), e Avicel® CL 611 obtida da FMC BioPolymer (Filadélfia, PA, EUA).

O substrato papel de filtro foi utilizado para avaliar a atividade de celulase total, o substrato carboximetilcelulose – CMC para avaliar a atividade de endoglucanases, o substrato Avicel® para a atividade de exoglucanases e o xilano para a atividade de xilanases

A quantificação dos grupos redutores foi realizada utilizando o método DNS e curvas padrão de glucose ou xilose (MILLER, 1959). Todos os ensaios e repetições utilizaram as PAFs na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup> de tampão citrato 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 4,0). A mistura reacional foi incubada a 50 °C por 60 min (Figura 16a). Para o substrato Avicel® foi necessário centrifugar (14000 g, 2 min) após o tempo de reação, utilizando o sobrenadante para quantificação de açúcares redutores pelo método de DNS (Figura 16b). A leitura foi realizada em espectrofotômetro na absorvância de 540 nm. Uma unidade de atividade (U) de celulase total, endoglucanase ou avicelase correspondeu a 1 µmol de glucose liberada por minuto. Uma unidade de atividade (U) de xilanase correspondeu a 1 µmol de xilose liberada por minuto. Todas as análises enzimáticas foram realizadas em triplicatas. Os resultados foram expressos como unidade de atividade por mg de proteína (U.mg<sup>-1</sup> de proteína). As análises químicas foram realizadas no laboratório de Bioquímica da Embrapa Caprinos e Ovinos.

**Figura 16 – Quantificação de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). (a) Amostras antes da reação (b) Amostras após a reação.**



Fonte: Elaborada pela autora.

Para uso nos ensaios, os substratos BCA *in natura* e pré-tratados foram previamente lavados com água destilada, por centrifugação a 10.000 g, 15 minutos a 22 °C, até atingirem o pH da água utilizada na lavagem (pH 7,0), objetivando remover impurezas e o hidróxido de sódio utilizado nos tratamentos. As amostras foram então secas e passadas em peneiras com malha de 250 µm de diâmetro.

A degradação enzimática da fibra do BCA *in natura* e pré-tratada foi determinada sob condições semelhantes às descritas acima para o substrato Avicel®. A quantificação de açúcares redutores foi realizada pelo método do DNS e com curva padrão para glucose e xilose. Uma unidade de atividade (U) correspondeu a 1 µmol de glucose ou xilose liberada por minuto. Todas as análises enzimáticas foram realizadas em triplicatas. Os resultados foram expressos como unidade de atividade por mg de proteína (U.mg<sup>-1</sup> de proteína).

#### 4.9 CROMATOGRAFIA EM MATRIZ DE BCA IN NATURA E PRÉ-TRATADO

O bagaço de cana-de-açúcar (partícula de 5 mm) *in natura* e pré-tratados foram processados e passados em peneiras de 250 µm de diâmetro. Após esse processamento, as fibras de BCA *in natura* e pré-tratadas foram utilizadas como matrizes cromatográficas. As matrizes com volume de 5 mL foram previamente lavadas com solução de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>, estabilizadas no tampão de equilíbrio



(tampão citrato 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 4,0), e em seguida, foram aplicadas 200 µg de PAFs, permanecendo em contato com a matriz por uma hora.

Após o período de contato, a coluna foi então percolada com o tampão de equilíbrio até completa remoção das proteínas não retidas (Pico não retido - PNR). A eluição das proteínas retidas nas matrizes foi realizada com a aplicação sequencial do tampão de equilíbrio contendo NaOH nas concentrações de 0,1 e 1,0 mol.L<sup>-1</sup>. O fluxo de eluição foi de 1 mL por minuto, sendo coletadas frações de 2 mL. Todo o procedimento foi monitorado a 280 nm.

#### 4.10 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Para avaliar a atividade de endoglucanase ao longo das cromatografias, alíquotas de 25 µL das frações correspondentes aos picos cromatográficos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio, sem agente redutor, seguindo metodologia descrita por Laemmli (1970).

Os géis de concentração e separação foram preparados com acrilamida a 3,5% e 12,5%, respectivamente, e um aparelho mini-VE vertical electrophoresis system (Amersham Bioscience). Os géis foram corados com coomassie coloidal G-250, de acordo com Neuhoff, Stam e Eibl (1985).

#### 4.11 ATIVIDADE RELATIVA DE ENDOGLUCANASE POR ZIMOGRAMA

Após a realização da eletroforese em gel de poliacrilamida, as proteínas foram descoradas com solução contendo 30% de etanol e 7,5% de ácido acético através de várias lavagens e renaturadas com solução de triton X-100 a 2,5%, durante 30 minutos.

Os géis foram então depositados sobre placas contendo ágar (2,0%) e carboximetilcelulose (1,0%), incubados em estufa a 37 °C por 21 horas. Após, a retirada dos géis, as placas foram coradas com uma solução de vermelho congo 1% e descoradas com uma solução de NaCl 1 mol.L<sup>-1</sup> até visualização das bandas correspondentes à atividade, seguindo metodologia de Rehman *et al.* (2009), com modificações. As imagens das placas foram analisadas e a densitometria das bandas foi processada usando o software livre GelAnalyzer ([www.gelalyzer.com](http://www.gelalyzer.com)).

#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

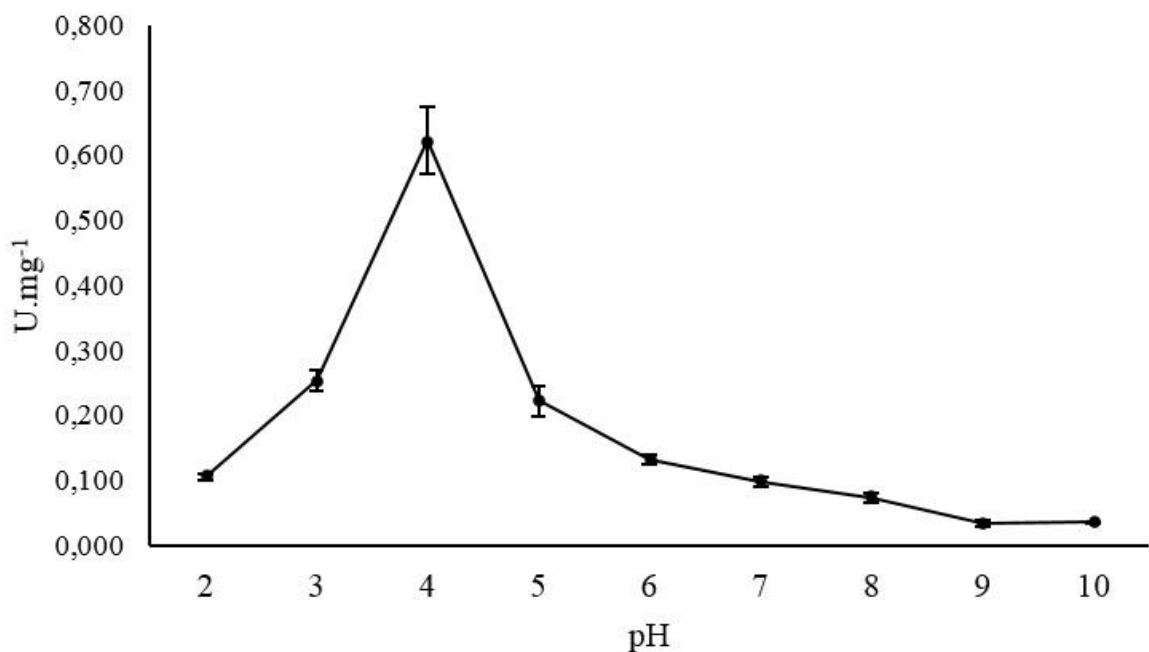
As variáveis foram submetidas aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, a fim de serem verificados os pressupostos da normalidade e homogeneidade, respectivamente. As variáveis pH e temperatura foram transformadas para a escala logarítmica de base 10, e a variável proteína para escala de raiz quadrada, a fim de terem os pressupostos atendidos. Procedeu-se análise de Regressão para avaliar o ajuste dos dados aos modelos quadrático e cúbico. Considerou-se o nível de significância de 5% para todos os casos. O software utilizado na análise foi o software livre R (<https://www.R-project.org/>).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ATIVIDADE DE CELULASE TOTAL DAS PAFS EM DIFERENTES PH E TEMPERATURAS

O pH influenciou a atividade das PAFs, concentrando os maiores valores de atividade específica para celulase total em torno do pH 4 (Figura 17). Os dados de atividade específica de celulase total frente aos diferentes pH foram transformados em escala logarítmica de base 10 e submetidos à análise de regressão, sendo melhor explicados pelo modelo quadrático  $y = -1,07171 + 0,22145x - 0,02778x^2$ ,  $R^2 = 0,7433$  ( $p < 0,0001$ ). Derivando e igualando a zero a equação sugerida para o modelo quadrático, o ponto de máxima atividade específica de celulase total das PAFs foi em pH 3,99.

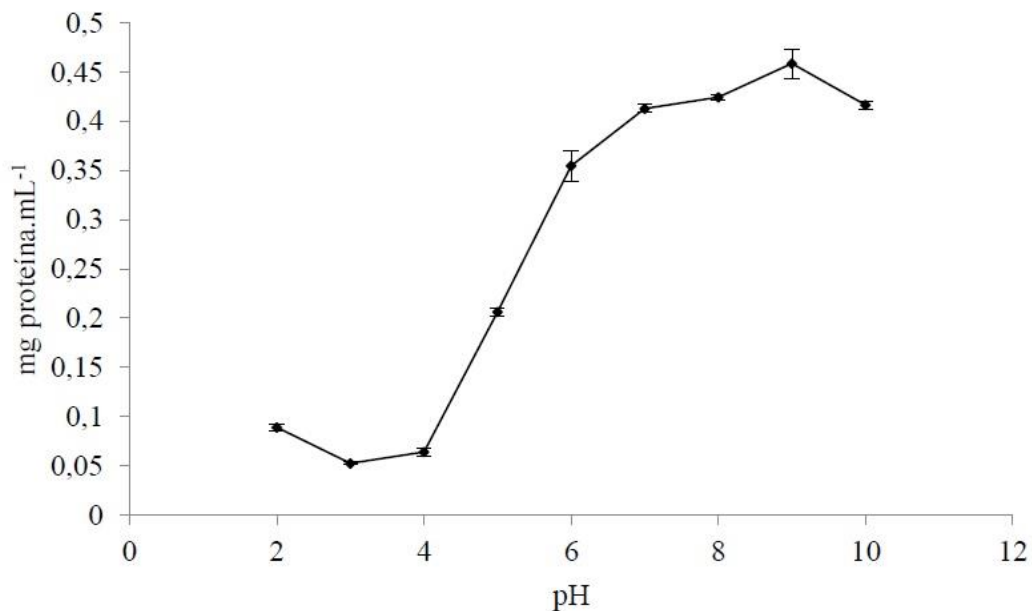
**Figura 17 - Avaliação dos diferentes pH na atividade de celulase total das proteínas aderidas à fibra (PAFs)**



Fonte: Elaborada pela autora.

Avaliando o potencial de extração de proteínas nos diferentes pH utilizados, a figura 18 mostra que há maior extração na faixa de pH alcalino. Transformando os dados para raiz quadrada e realizando a análise de regressão, o modelo quadrático, através da equação  $y = -0,03737 + 0,12724x - 0,00544x^2$ ,  $R^2 = 0,8489$  ( $p < 0,0001$ ), explicou melhor os dados. Após derivar e igualar a zero a equação sugerida para o modelo, o pH 11,71 é apontado como o de máxima extração de proteína.

**Figura 18 – Quantidade de proteínas extraídas nos diferentes pH**



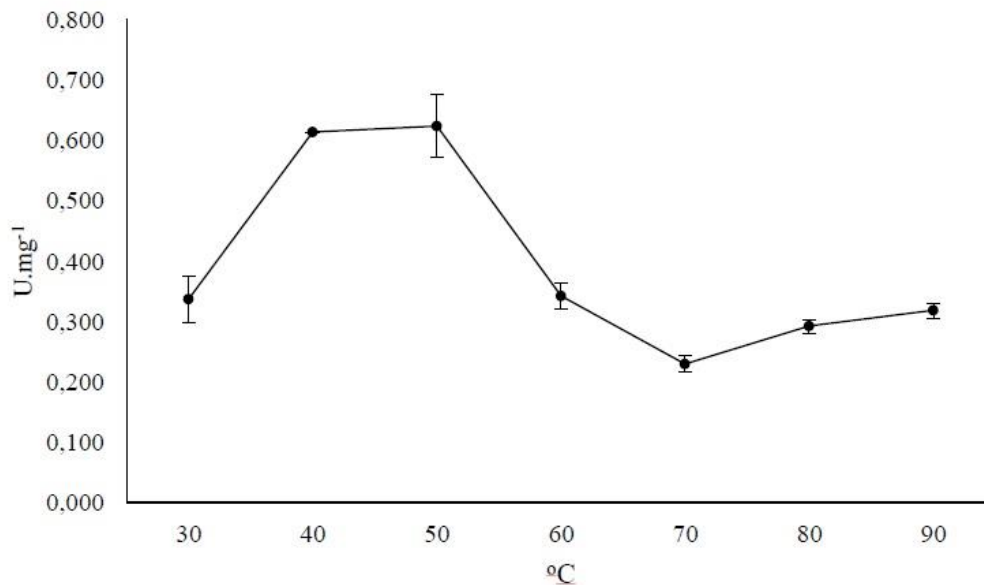
Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 19 observa-se que a temperatura influenciou positivamente a atividade específica de celulase total das PAFs até 50 °C por 60 minutos. Acima dessa temperatura é observada uma queda acentuada na atividade. No entanto, mesmo por 60 minutos a 90 °C não se observa perda total da atividade, indicando uma termoestabilidade das PAFs.

Os dados de temperatura após transformados em escala logarítmica de base 10 e submetidos à análise de regressão foram explicados melhor pelo modelo cúbico através da equação  $y = -3,89995 + 0,20786x - 0,00372x^2 + 0,00002034x^3$ ,  $R^2 = 0,8463$  ( $p < 0,0001$ ). Após a equação em questão ser derivada e igualada a zero

encontrou-se os pontos de máxima e mínima atividade específica de celulase total, que foram 42,58 °C e 80,01 °C, respectivamente.

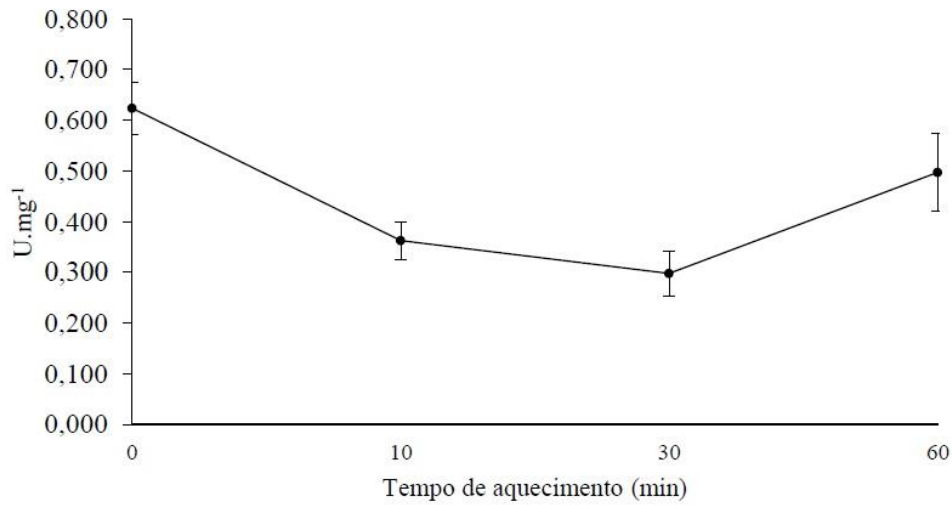
**Figura 19 – Avaliação de diferentes temperaturas na atividade de celulase total das proteínas aderidas à fibra (PAFs)**



Fonte: Elaborada pela autora.

Quanto à termorresistência, observa-se na figura 20 que as PAFs resistem ao aquecimento a 100 °C por longo período (60 minutos). Essa resposta ao tempo de aquecimento é melhor explicada pela equação quadrática  $y = 0,59152 - 0,02025x + 0,00031315x^2$ ,  $R^2 = 0,8120$  ( $p < 0,001$ ).

**Figura 20 – Avaliação da atividade de celulase total das proteínas aderidas à fibra (PAFs) após incubação a 100 °C por 10, 30 e 60 minutos.**



Fonte: Elaborada pela autora.

## 5.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES SUBSTRATOS

Os diferentes substratos como carboximetilcelulose (CMC), celulose microcristalina (Avicel®), papel de filtro e xilano foram utilizados para avaliar a atividade específica das PAFs. Estas mostraram maior atividade para xilanase seguida por endoglucanase, exoglucanase e celulase total (Tabela 3).

**Tabela 3 - Atividade específica de proteínas aderidas à fibra (PAFs) em diferentes substratos**

<b>Substratos</b>	<b>Celulases (U.mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Xilanases (U.mg<sup>-1</sup>)</b>
<b>Carboximetilcelulose</b>	4,71 ± 1,65	-
<b>Avicel®</b>	2,68 ± 0,42	-
<b>Papel de filtro</b>	0,62 ± 0,05	-
<b>Xilano</b>	-	7,01 ± 0,19

Fonte: Elaborada pela autora.

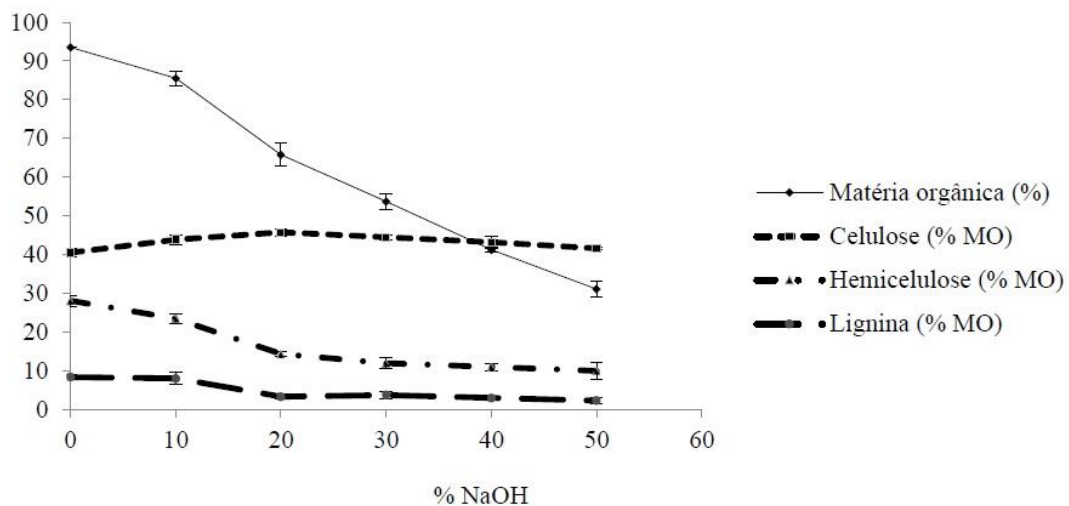
### 5.3 PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Como esperado, os pré-tratamentos do BCA reduziram a quantidade de matéria orgânica (MO) de forma proporcional à porcentagem de NaOH utilizada (Figura 21), sendo os dados explicados por curva de regressão exponencial  $y = 98,0163(-0,9794)^x$ ,  $R^2 = 0,9966$  ( $p < 0,0001$ ).

Com relação à celulose, essa foi preservada pelos tratamentos utilizados (Figura 21). Após análise de regressão, os dados se ajustaram melhor ao modelo exponencial  $y = 43,0716(1,0001)^x$ ,  $R^2 = 0,9980$  ( $p < 0,0001$ ).

As concentrações de NaOH foram efetivas em reduzir a hemicelulose e a lignina no BCA pré-tratado (Figura 21), mostrando após análise de regressão exponencial que a máxima degradação de hemicelulose e de lignina poderão ser obtidas quando do uso das concentrações de 45,75% e 51,06% de NaOH, respectivamente. A equação do modelo exponencial para hemicelulose foi  $y = 27,9587(-0,9753)^x$ ,  $R^2 = 0,9878$  ( $p < 0,0001$ ) e para lignina foi  $y = 8,7413(-0,9713)^x$ ,  $R^2 = 0,9527$  ( $p < 0,0001$ ).

**Figura 21 – Composição química do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) *in natura* e pré-tratado com NaOH expresso com base na matéria orgânica (MO)**

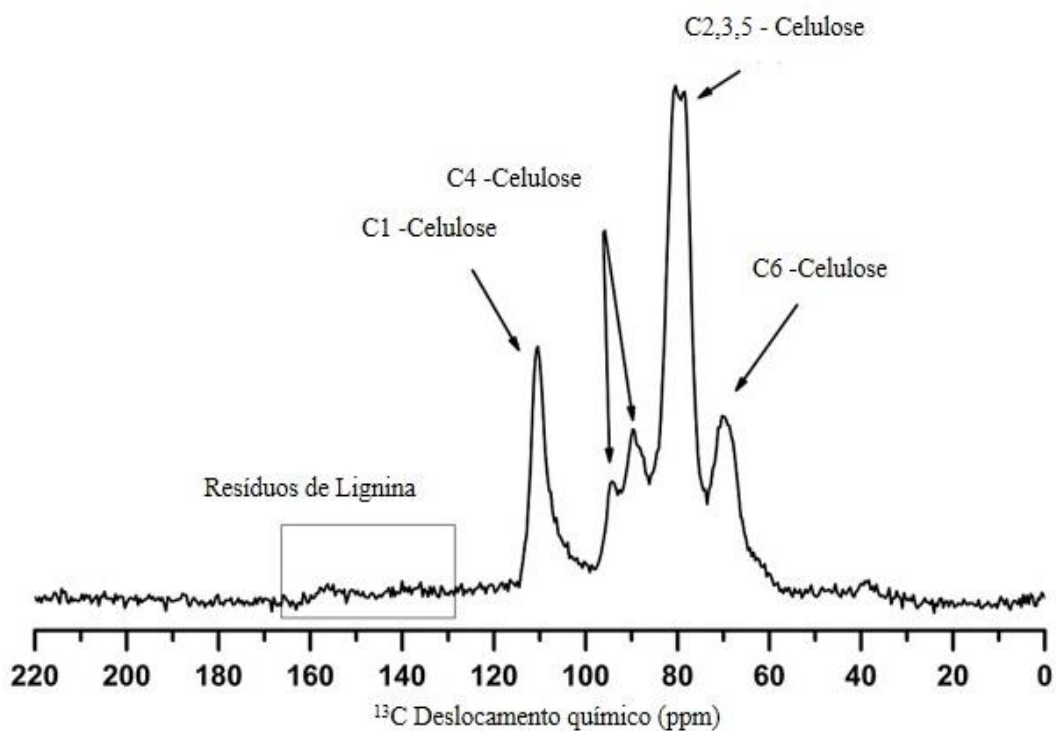


Fonte: Elaborada pela autora.

#### 5.4 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) E CRISTALINIDADE DO BCA IN NATURA E PRÉ-TRATADO

Foram investigadas as alterações estruturais dos principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina) após o pré-tratamento com NaOH pela a técnica de ressonância magnética nuclear do carbono 13 (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) CP-MAS. A Figura 22 apresenta o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP-MAS do BCA *in natura* e sua respectiva caracterização baseada em Reis *et al.* (2017).

**Figura 22 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do bagaço de cana-de-açúcar *in natura***



Fonte: Elaborada pela autora.

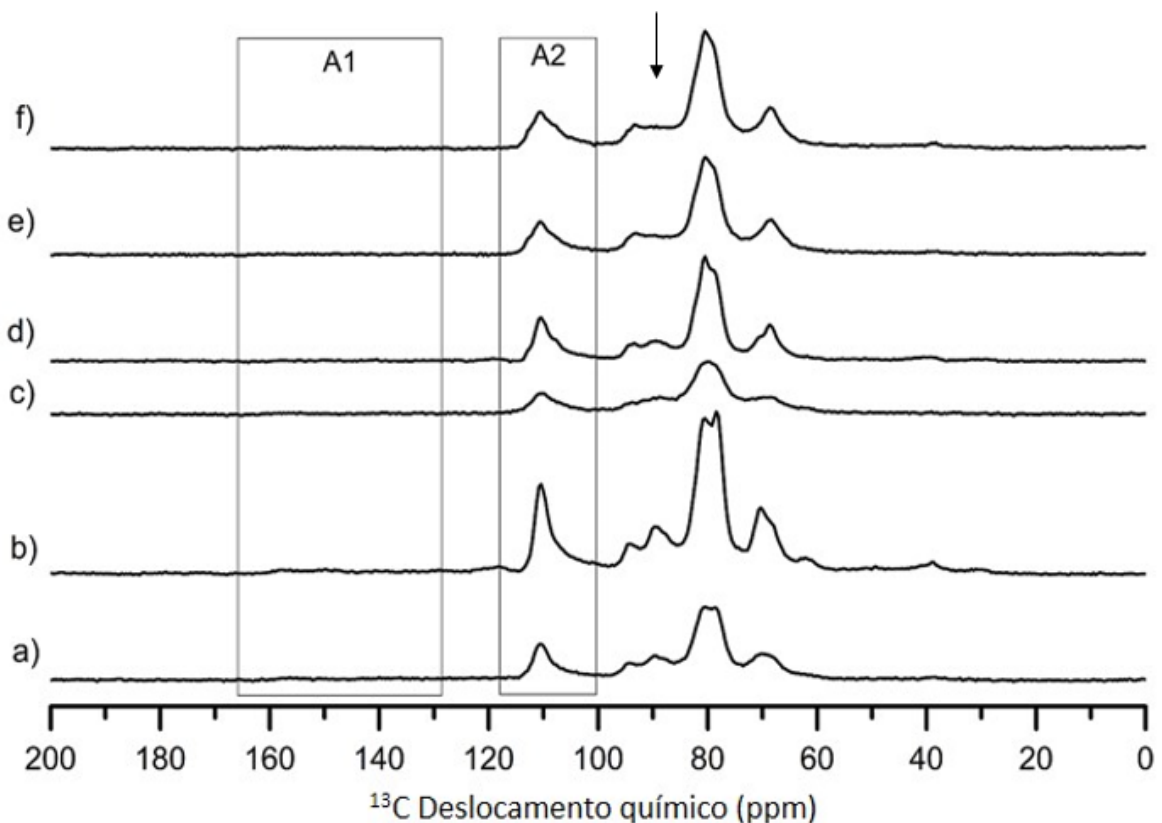
Inicialmente, os sinais da celulose foram analisados (Figura 22) de acordo com a literatura (REIS *et al.*, 2017; ATALLA E VANDERHART, 1999; BERNARDINELLI *et al.*, 2015). A região entre 63,8 e 73,4 ppm refere-se ao carbono C6 da celulose. Além disso, observa-se que os sinais de carbono C2, C3 e C5 aparecem na região entre 73,5 a 85,6 ppm, o carbono C4, utilizado como sonda para o ordenamento da cadeia de celulose, é observado entre 86,3 e 98,5 ppm, e o sinal de 99,2 a 115,2 ppm inerente ao carbono anomérico C1 da celulose. Além disso, os



sinais inerentes aos resíduos de lignina podem ser observados entre 128,2 e 166,0 ppm.

A Figura 23 apresenta o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP-MAS do BCA antes e após o pré-tratamento com NaOH. Observa-se em (A2) a região 99,2 a 115,2 ppm inerente ao carbono anomérico C1 da celulose. Além disso, os sinais inerentes aos resíduos de lignina (A1) podem ser observados entre 128,2 e 166,0 ppm. Na região identificada indicada pela seta, é referente ao C4, é a região para avaliar o índice de cristalinidade, que é calculada dividindo a região cristalina pela soma da região cristalina com a região amorfa.

**Figura 23 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do bagaço de cana-de-açúcar (BCA). (a) BCA *in natura*; (b) BCA pré-tratado com 10% de NaOH; (c) BCA pré-tratado com 20% de NaOH; (d) BCA pré-tratado com 30% de NaOH; (e) BCA pré-tratado com 40% de NaOH; (f) pré-tratado com 50% de NaOH**



Fonte: Elaborada pela autora.

A relação entre o conteúdo de lignina e celulose foi obtida conforme proposto anteriormente (REIS *et al.*, 2017; ATALLA E VANDERHART, 1999) a fim de verificar a remoção de lignina pelo pré-tratamento com NaOH (Tabela 4). Observou-se uma redução do conteúdo de lignina para o BCA 30 e 50% de NaOH. Isso deve ser devido à natureza do material utilizado que já possui uma baixa quantidade de lignina, como observado na Figura 21.

**Tabela 4 - Porcentagem relativa de lignina e índice de cristalinidade (IC) do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) *in natura* e pré-tratado com NaOH**

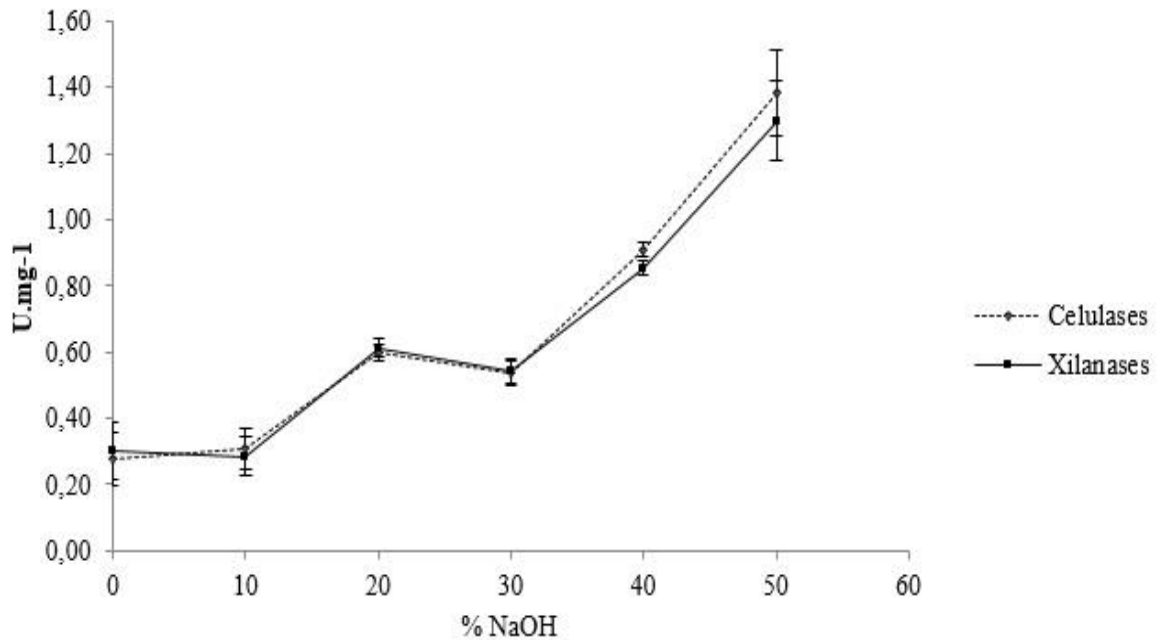
Substratos	Relação Lignina-Celulose (%)	Índice de Cristalinidade (IC)
<b>BCA <i>in natura</i></b>	6,7	36,5
<b>BCA 10% de NaOH</b>	7,9	34,2
<b>BCA 20% de NaOH</b>	7,7	36,8
<b>BCA 30% de NaOH</b>	5,4	42,2
<b>BCA 40% de NaOH</b>	8,8	46,3
<b>BCA 50% de NaOH</b>	5,8	44,1

Fonte: Elaborada pela autora.

## 5.5 BIODEGRADAÇÃO DO BCA IN NATURA E PRÉ-TRATADO

Como mostra a figura 24 tanto a atividade específica de celulase quanto de xilanase das PAFs foram favorecidas pela concentração crescente de NaOH utilizada no pré-tratamento do BCA. Os dados de atividade específica de celulase e xilanase das PAFs foram submetidos à análise de regressão e explicados melhor pelo modelo quadrático,  $y = 0,30006 - 0,00194x + 0,00045382x^2$ ,  $R^2 = 0,9316$  ( $p < 0,0001$ ), para celulase e  $y = 0,30906 - 0,00110x + 0,00040011x^2$ ,  $R^2 = 0,9157$  ( $p < 0,0001$ ), para xilanase. Derivando e igualando a zero as equações obteve-se o ponto mínimo da curva, que informa a concentração mínima necessária para elevar a hidrólise do BCA, sendo 2,14% de NaOH para a atividade específica de celulase e 1,38% de NaOH para elevar a atividade específica de xilanase.

**Figura 24 - Atividade específica de celulases e xilanases das proteínas aderidas à fibra (PAFs) do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) *in natura* e pré-tratado com 10, 20, 30, 40 ou 50% de NaOH.**

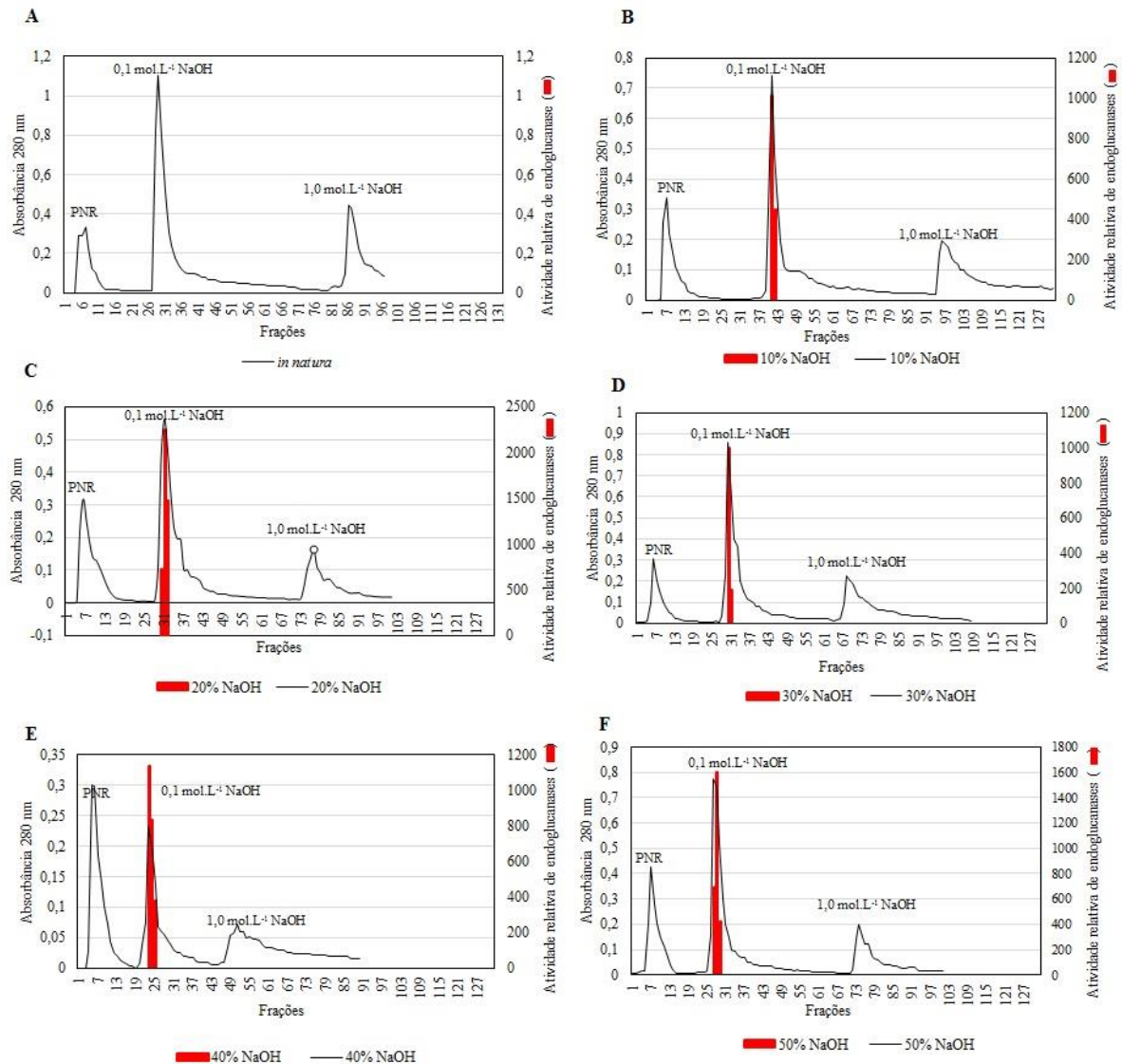


Fonte: Elaborada pela autora.

## 5.6 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR *IN NATURA* E PRÉ-TRATADO COMO MATRIZES CROMATOGRÁFICAS

Para melhor entender a interação das endoglucanases das PAFs com os substratos à base de bagaço de cana-de-açúcar, as fibras de BCA *in natura* e pré-tratadas foram utilizadas como matrizes cromatográficas (Figura 25). As endoglucanases não se ligaram na matriz de BCA *in natura*. No entanto, ficaram retidas nas matrizes pré-tratadas, e puderam ser eluídas com a menor concentração de NaOH (0,1 mol.L<sup>-1</sup>) utilizada. As proteínas eluídas com a maior concentração de NaOH não apresentaram atividade de endoglucanases (Figura 25).

**Figura 25- Cromatografia de afinidade de proteínas aderidas à fibra (PAFs) em matriz de bagaço de cana-de-açúcar (BCA). (A) Matriz BCA *in natura*; (B) Matriz pré-tratada com 10% de NaOH; (C) Matriz pré-tratada com 20% de NaOH; (D) Matriz pré-tratada com 30% de NaOH; (E) Matriz pré-tratada com 40% de NaOH; (F) Matriz pré-tratada com 50% de NaOH**



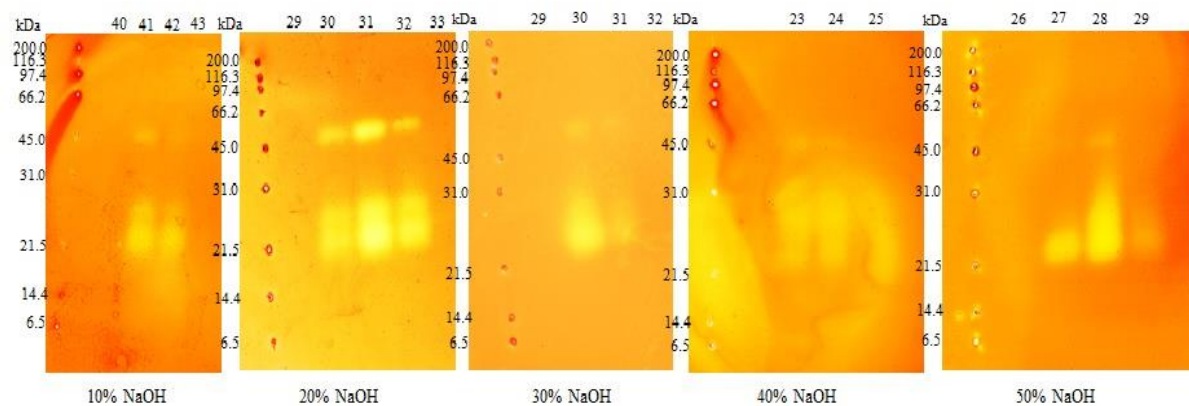
PNR: Pico não retido. 0,1 e 1,0 mol.L<sup>-1</sup> de NaOH: picos eluídos com 0,1 e 1,0 mol.L<sup>-1</sup> de NaOH, respectivamente. As cromatografias seguiram um fluxo de 1 mL/minuto, com coleta de frações a cada 2 minutos.

Fonte: Elaborada pela autora.

## 5.7 ATIVIDADE RELATIVA DE ENDOGLUCANASE POR ZIMOGRAMA

Observa-se na figura 26 uma maior quantidade de proteínas com atividade de endoglucanases interagindo com a matriz de BCA tratada com 20% de NaOH e que a massa molecular aparente das endoglucanases retidas nas matrizes pré-tratadas com NaOH, independente da concentração, está entre 21,5 e 45,0 kDa.

**Figura 26 – Zimograma da atividade de endoglucanases de proteínas aderidas às matrizes de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados**



Os números são referentes aos tubos contendo frações de 2 mL coletadas em matriz pré-tratada com 10% de NaOH; 20% de NaOH; 30% de NaOH; 40% de NaOH e 50% de NaOH, a um fluxo de 1 mL/minuto.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com os resultados obtidos com as cromatografias (Figura 25) e com o zimograma (Figura 26), observa-se que uma menor quantidade de proteína fica retida na matriz de 40% NaOH em relação às demais matrizes, o que pode repercutir negativamente no rendimento de proteína isolada utilizando essa matriz. Mas ao mesmo tempo, é observada nessa matriz maior relação entre absorvância 280 nm e atividade relativa de endoglucanase, sugerindo que o índice de pureza do material retido nessa matriz seja maior.

## 6 DISCUSSÃO

Para viabilizar alternativas na produção de energia, bioetanol e outros produtos da biomassa lignocelulósica é necessário a obtenção de enzimas eficientes que atuem na quebra das ligações químicas dos polissacarídeos que formam a parede celular dos vegetais. O grande entrave para a conversão dessa biomassa em etanol de segunda geração ou em outros produtos biotecnológicos é o alto custo das enzimas disponíveis e a falta de enzimas mais específicas (FLORENCIO *et al.*, 2017). Na busca por enzimas mais específicas na degradação do BCA, o presente trabalho utilizou esse substrato como alimento para direcionar a microbiota do rúmen de ovinos Morada Nova objetivando caracterizar o potencial enzimático das proteínas aderidas à fibra (PAFs) do bagaço de cana (BCA).

Na caracterização destas enzimas é necessário avaliar diferentes parâmetros que interferem na atividade, dentre os mais importantes estão o pH, a temperatura, a estabilidade térmica (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999) e o substrato. Essa caracterização permite pressupor seu uso biotecnológico. No caso de enzimas lignocelulolíticas, prospectadas para degradação do BCA, essas devem se adequar ao máximo à linha de produção industrial hora em uso para produção de etanol de segunda geração, ou, caso seu potencial de degradação seja tão promissor que uma nova estratégia de degradação justifique realizar ajustes no ambiente industrial.

No ambiente industrial de produção de bioetanol as enzimas com perfil ácido são preferidas por resistirem ao pH ácido aplicado nos pré-tratamentos em uso (DASHTBAN; SCHRAFT; QUIN, 2009). As PAFs apresentaram essa vantagem, pois a atividade específica ótima delas foi sugerida ser pH 3,99 (Figura 17). Vale ressaltar que era esperado um pH ótimo da enzima em torno de 6,8 que é o pH médio do ambiente ruminal (VAN SOEST, 1994). Pode-se especular que o pH ótimo abaixo do pH ruminal torne essas enzimas mais tolerantes ao pico de produção dos ácidos orgânicos (ácido acético, butírico e propiônico) gerados durante a digestão ruminal.

Esse perfil de pH ácido parece ser o ótimo das celulases em geral, uma vez que vários estudos reforçam essa faixa de pH ideal para a atividade das celulases (SINGH *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2011; NCUBE *et al.*, 2012; DELABONA *et al.*, 2013).

Em relação à quantidade de proteínas extraídas nos diferentes pH, embora o tampão citrato pH 4 tenha extraído uma menor quantidade de proteínas, mostrou uma melhor atividade enzimática específica. Assim, no momento de selecionar o pH deve-se levar em consideração, principalmente, a atividade enzimática, e não apenas a quantidade de proteínas extraídas (Figura 18).

Quanto à temperatura, sabe-se que as enzimas aumentam sua atividade com a elevação dessa, até atingirem a temperatura ótima. As PAFs mostraram como temperatura ótima 42,58 °C, bem próxima da temperatura corpórea dos ovinos que é entre 39-40 °C (VAN SOEST, 1994). A temperatura de 50 °C é a utilizada no ambiente industrial para produção de bioetanol, e é uma temperatura ótima comum a várias celulases já reportadas, como as produzidas pelos fungos *Thermoascus aurantiacus* (SILVA *et al.*, 2005) e *Humicola grisea* (CYSNEIROS *et al.*, 2013). Na figura 19 as temperaturas entre 40 e 50 °C mostram atividades próximas. Dessa forma, para não mudar a temperatura recomendada no ambiente industrial, assim como a utilizada na metodologia indicada pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* – IUPAC (GHOSE, 1987) para determinação de atividade celulolítica total, a temperatura de 50 °C foi selecionada para realizar as demais avaliações enzimáticas quanto aos substratos.

Outra característica importante para seleção de enzimas para uso industrial é que essas sejam termoestáveis, pois permitem sua manipulação em altas temperaturas, reduzindo a contaminação por microrganismos mesofílicos presentes no ambiente industrial (JAENICKE; BÖHM, 1998), além de poderem ser manipuladas eficientemente por longos períodos (TAVARES *et al.*, 2013). Uma outra aplicação para essas enzimas pode ser utilizada na alimentação animal, como aditivo para melhorar a fermentação ruminal e promover o aumento da digestibilidade (CYSNEIROS *et al.*, 2013).

As PAFs mantiveram boa parte de sua atividade mesmo após aquecimento a 90 °C por uma hora (Figura 19) e resistiram ao aquecimento a 100 °C por longo período (60 minutos, Figura 20) e esse tempo foi determinante para elevar à atividade, o que sugere que o tempo de aquecimento proporciona uma estabilidade conformacional das PAFs. Vale ressaltar ainda, que microrganismos termofílicos têm sido destacados como fonte de enzimas lignocelulolíticas (PEREIRA *et al.*, 2015).

Uma vantagem do rúmen como fonte de enzimas lignocelulolíticas é que esse órgão pode ser explorado como um biorreator natural direcionando a proliferação

microbiana para degradação de um substrato em específico. Dessa forma, por quanto mais tempo esse ambiente tiver sido favorecido para a degradação do substrato, melhores são as chances de se obterem enzimas mais específicas para sua degradação. Diante disso, a primeira medida do presente trabalho foi direcionar a função microbiana no rúmen de ovinos Morada Nova para a digestão do BCA, os animais foram adaptados a uma dieta com bagaço de cana-de-açúcar por um período de 21 dias.

As PAFs frente aos diferentes substratos mostraram maior atividade para xilanases, seguida por endoglucanases, exoglucanases e celulases totais (Tabela 3). A capacidade de hidrolisar diferentes substratos pode ser esclarecida pelas ligações não específicas no sítio ativo e/ou pela presença de distintos domínios catalíticos, cada um apresentando uma atividade particular (VAN DYK; PLETSCHE, 2012). No trabalho de Cheng *et al.* (2016), uma proteína recombinante (cel28a) também apresentou preferência pelo substrato, com maior atividade para xilanase e endoglucanase do que para celulase total e exoglucanase. Tavares *et al.* (2013) trabalhando com um fungo filamentos, observaram maior atividade para endoglucanase. A carboximetilcelulose e o xilano utilizados para determinação de endoglucanases e xilanases, respectivamente, são substratos solúveis, daí a alta atividade observada nos mesmos (Tabela 3). Já o papel de filtro e a Avicel®, utilizados para determinação de celulase total e exoglucanases, respectivamente, são formados predominantemente por celulose microcristalina, o que explica a baixa atividade das PAFs nesses substratos (Tabela 3). Esses resultados reforçam a necessidade da utilização de substratos recalcitrantes na caracterização e seleção de enzimas mais eficientes para degradar BCA, de modo a não superestimar a atividade lignocelulolítica dessas enzimas em substratos solúveis.

Adicionalmente, Lee (1997), em sua revisão, já abordava a importância do substrato na atividade da enzima celulase, onde destacou que a atividade da celulase é dependente do grau de polimerização e cristalinidade da celulose, bem como de sua associação com a hemicelulose e a lignina. Zhang *et al.* (2006) e Colombatto *et al.* (2013) em seus trabalhos reforçam a importância do uso do próprio material lignocelulósico a ser degradado como substrato nos ensaios, no lugar de substratos solúveis disponíveis comercialmente, pois esses mascaram a real atividade da enzima frente ao material lignocelulósico.



Uma forma de elevar a eficiência do substrato de interesse é realizar o pré-tratamento. A remoção de lignina é um fator determinante para que as enzimas tenham acesso à porção celulósica e hemicelulósica de resíduos agrícolas (GARROTE *et al.*, 2002), e o NaOH mostrou-se eficiente nesse papel de deslignificação do BCA (REZENDE *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2015). Pré-tratamentos com soluções alcalinas levam ao rompimento da parede celular lignocelulósica, clivando as ligações de éster entre a lignina e os carboidratos (VAN SOEST, 1994; CHANDRA *et al.*, 2007; GRABBER *et al.*, 2008).

No presente trabalho foi utilizado o pré-tratamento alcalino do BCA com diferentes concentrações de NaOH, e analisadas as mudanças nas características químicas e estruturais desses materiais. Como pode ser observado na figura 21, o tratamento alcalino removeu a hemicelulose e a lignina das amostras de forma significativa ( $p < 0,0001$ ), à medida que se aumentou a porcentagem de NaOH. Camassola e Dillon (2014) também observaram que as maiores taxas de deslignificação do BCA foram alcançadas com o aumento da concentração de reagente nos pré-tratamentos. Utilizando as equações quadráticas geradas com os dados apresentados na figura 21 a máxima degradação da hemicelulose e da lignina é esperada nas concentrações de 45,75% e 51,06% de NaOH, respectivamente.

Além da importância de um método para reduzir a hemicelulose e a lignina, o mesmo não deve alterar as concentrações de celulose. Em todas as concentrações de NaOH avaliadas no presente trabalho não foi observada perda de celulose em relação ao BCA *in natura* (Figura 21), mostrando que o NaOH mesmo em altas concentrações preservou a celulose.

A técnica de ressonância magnética nuclear do carbono 13 (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) CP-MAS foi utilizada para investigar as alterações estruturais dos principais componentes (celulose e lignina) após o pré-tratamento com NaOH. A Figura 22 apresenta o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP-MAS do BCA *in natura* e sua respectiva caracterização baseada em Reis *et al.* (2017).

Como já evidenciado, o teor de lignina é um atributo importante a ser avaliado, pois sua presença diminui a digestibilidade do material lignocelulósico (REIS *et al.*, 2017). O teor de lignina no BCA *in natura* é observado na Figura 22. A relação entre o conteúdo de lignina e celulose foi obtida conforme proposto anteriormente (REIS *et al.*, 2017; ATALLA e VANDERHART, 1999) a fim de verificar a remoção de lignina pelo pré-tratamento com NaOH (Tabela 4). Os resultados apresentados pelo

RMN mostraram uma redução no conteúdo de lignina do BCA após tratamento com 30 e 50% de NaOH. No entanto, os resultados obtidos pela análise bromatológica foram mais conclusivos para a redução de lignina do que a RMN. Isso deve ser devido à natureza do BCA utilizado que já possui uma baixa quantidade de lignina, 8,34% em relação à matéria orgânica.

O RMN de  $^{13}\text{C}$  (CP-MAS) também possibilita o estudo da dinâmica e cristalinidade de sistemas sólidos (BERNARDINELLI *et al.*, 2015). Esta característica é obtida com o uso dos sinais C4, que compreende vários alomorfos de celulose (HULT *et al.*, 2002). Alguns trabalhos demonstram que a cristalinidade da celulose influencia a hidrólise enzimática cuja menor cristalinidade favorece a hidrólise da celulose. No entanto, esse fator está na dependência dos microrganismos que promovem o processo de hidrólise (REIS *et al.*, 2017) e são altamente controversos (PARK *et al.*, 2010). No sistema estudado, o IC aumentou com o aumento do conteúdo de NaOH no pré-tratamento (Tabela 4).

Uma característica interessante é o alargamento do carbono anomérico a 110 ppm, porque o aumento na cristalinidade influencia o acoplamento de RMN, o que deve resultar em um estreitamento desta linha.

A hidrólise enzimática é uma etapa crucial para a conversão de biomassa em produtos biotecnológicos, e o uso de pré-tratamentos foram propostos para melhorar a eficiência do processo.

Dentre os diversos fatores que afetam a hidrólise das amostras de biomassa, destacam-se a porosidade, a cristalinidade da celulose e a acessibilidade das enzimas às frações de celulose e hemicelulose da biomassa. Neste trabalho, foram avaliadas a hidrólise da fibra do BCA *in natura* e pré-tratada com NaOH, quanto às atividades de celulasas e xilanases das PAFs (Figura 24). Utilizando as equações quadráticas geradas como modelo para explicar a atividade de celulase e xilanase das PAFs frente aos bagaços hidrolisados ou não, observa-se que 2,14% e de 1,38% de NaOH são os valores mínimos necessários para elevar à atividade de celulase e xilanase, respectivamente, de forma diretamente proporcional e significativa ( $p < 0,0001$ ) às concentrações utilizadas, e inversamente relacionada à quantidade de hemicelulose e lignina. Dessa forma, o índice de cristalinidade que aumentou com o aumento da concentração de NaOH, não deve ser um parâmetro avaliado isoladamente para seleção de pré-tratamento da fibra lignocelulósica. Isso também foi sugerido por Reis *et al.* (2017) e Semerci; Guller (2018). Esse trabalho reforça a ideia

que a remoção da lignina e da hemicelulose foi fator chave para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática.

A cromatografia é uma técnica utilizada para isolamento de vários constituintes, como também de enzimas, destacando cromatografias de troca iônica e hidrofóbica (REHMAN *et al.*, 2009; TAVARES *et al.*, 2013). No trabalho de Teixeira-Sá *et al.* (2009), foram utilizadas matrizes cromatográficas de galactomanano de *Mucuna sloanei* para isolamento de lectina e galactoxiloglucano também de *M. sloanei* por afinidade, uma ideia próxima à sugerida nesse trabalho que é a de utilizar o próprio substrato para isolar enzimas mais específicas, ou seja, a utilização das fibras de BCA como matrizes cromatográficas. Essa ideia foi fundamentada tendo como base o trabalho de Oliveira; Pinheiro; Campos, (2017) que mostrou a aplicação biotecnológica do BCA como filtro para retenção de poluentes em água residual, sinalizando sua capacidade de reter moléculas.

De fato, as PAFs foram capazes de se ligarem às matrizes cromatográficas de BCA *in natura* e pré-tratada (Figura 25), no entanto, apenas o pico eluído 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de NaOH nas matrizes pré-tratadas mostrou atividade para endoglucanases (Figura 25).

A matriz de BCA 20% NaOH pode ser indicada devido a sua alta capacidade de retenção de endoglucanases. Além disso, o presente estudo sugere a utilização da matriz de BCA 40% NaOH quando se busca por endoglucanases específicas. Desta forma, quando se compara a quantidade de endoglucanases retidas, a matriz de BCA 20% NaOH apresentou uma maior eficiência às demais concentrações de NaOH utilizadas, já a BCA 40% NaOH foi mais seletiva em reter endoglucanases em detrimento de outras proteínas.

Esse trabalho traz novas informações sobre a caracterização bioquímica das enzimas lignocelulolíticas da microbiota ruminal de ovinos Morada Nova. A fibra do BCA pré-tratada com NaOH pode ser utilizada como matriz cromatográfica para isolamento e caracterização enzimática.

Um grande diferencial entre as matrizes pré-tratadas de 10 e 20% de NaOH foi a concentração dos constituintes hemicelulose e lignina (Figura 21), pois na figura 26 observa-se um aumento na quantidade de endoglucanases retidas na matriz de 20% de NaOH em relação à de 10% de NaOH, reforçando os achados de que a lignina e a hemicelulose são os principais componentes limitantes da hidrólise da celulose. Em adição, à medida que se eleva a concentração de NaOH, se reduz a porcentagem

de hemicelulose (Figura 21) e na figura 26 se observa uma redução de endoglucanases retidas, o que sugere a existência de hemicelulases com atividade de endoglucanases, ou seja, a medida que se reduz o substrato específico das hemicelulases se reduz a quantidade delas retidas nas matrizes.

Essa estratégia de usar o BCA pré-tratado como matriz cromatográfica reforçou que as endoglucanases se ligam ao substrato e esse poderá ser utilizado para isolamento e caracterização dessas enzimas.

## 7 CONCLUSÕES

O presente trabalho traz novas informações sobre a caracterização bioquímica das enzimas lignocelulolíticas da microbiota ruminal de ovinos Morada Nova e sua capacidade de interação e degradação do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) *in natura* e pré-tratado com NaOH. As enzimas ruminais de ovinos Morada Nova são eficientes em degradar o BCA, sendo sua eficiência elevada ajustando-se o pH e a temperatura reacional, assim como realizando o pré-tratamento alcalino do BCA. Além disso, o trabalho sugere a utilização da fibra do BCA pré-tratada com NaOH como matriz cromatográfica para isolamento e caracterização de endoglucanases, diante da capacidade de reterem essas enzimas ligadas à fibra do BCA pré-tratada.

## REFERÊNCIAS

- AHMADI, F.; ZAMIRI, M. J.; KHORVASH, M.; ZIAEE, E.; POLIKARPOV, I. Pretreatment of sugarcane bagasse with a combination of sodium hydroxide and lime for improving the ruminal degradability: optimization of process parameters using response surface methodology. **Journal of Applied Animal Research**, v. 44, n. 1, 287–296, 2016.
- AHMED, S.; RIAZ, S.; JAMIL, A. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 19–35, 2009.
- ANDRADE, J. P.; BISPO, A. S. R.; MARBACH, P. A. S.; NASCIMENTO, R. P. Production and Partial Characterization of Cellulases from *Trichoderma* sp. IS-05 Isolated from Sandy Coastal Plains of Northeast Brazil. **Enzyme Research**, v. 2011, Article ID 167248, p. 1-7, 2011.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 15th ed. Arlington, VA, USA: AOAC, 1990.
- ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. de. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, p. 111-116, 2006.
- ATALLA, R. H.; VANDERHART, D. L. The role of solid state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy in studies of the nature of native celluloses. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 15, n. 1, p. 1-19, 1999.
- BANERJEE, G.; SCOTT-CRAIG, J. S.; WALTON J. D. Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. **BioEnergy Research**, v. 3, n. 1, p. 82–92, 2010.
- BARNES, R. D. Protozoários. In: \_\_\_\_\_. **Zoologia dos invertebrados**. São Paulo: Roca, p. 13-77, 1990.
- BERNARDINELLI, O. D.; LIMA, M. A.; REZENDE, C. A.; POLIKARPOV, I., DE AZEVEDO, E. R. Quantitative  $^{13}\text{C}$  MultiCP solid-state NMR as a tool for evaluation of cellulose crystallinity index measured directly inside sugarcane biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 110, p. 2-11, 2015.
- BEZERRA, T. L.; RAGAUSKAS, A. J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 10, n. 5, p. 634-647, 2016.
- BONAWITZ, N. D.; KIM, J. I.; TOBIMATSU, Y.; CIESIELSKI, P. N.; ANDERSON, N. A.; XIMENES, E.; MAEDA, J.; RALPH, J.; DONOHOE, B. S.; LADISCH, M.; CHAPPLE, C. Disruption of mediator rescues the stunted growth of a lignin-deficient *Arabidopsis* mutant. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 376–380, 2014.

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

BRAGA, C. M. P.; DELABONA, P. D. S.; LIMA, D. J. D. S.; PAIXÃO, D. A. A.; PRADELLA, J. G. D. C.; FARINAS, C. S. Addition of feruloyl esterase and xylanase produced on-site improves sugarcane bagasse hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 316–324, 2014.

BRÁS, J. L.; CARTMELL, A.; CARVALHO, A. L.; VERZÉ, G.; BAYER, E. A.; VAZANA, Y.; CORREIA, M. A. S.; PRATES, M. A. S.; RATNAPARKH, S.; BORASTON, A. B.; ROMÃO, M. J. FONTES, C. M. G. A.; GILBERT, H. J. Structural insights into a unique cellulase fold and mechanism of cellulose hydrolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 13, p. 5237-5242, 2011.

BRODEUR, G.; YAU, E.; BADAL, K.; COLLIER, J.; RAMACHANDRAN, K. B.; RAMAKRISHNAN, S. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. **Enzyme Research**, v. 2011, p.1-17, 2011.

BROWN, R. M. J. Cellulose Structure and Biosynthesis: What is in Store for the 21st Century? **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 487–495, 2004.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Effect of Different Pretreatment of Sugar Cane Bagasse on Cellulase and Xylanases Production by the Mutant *Penicillium echinulatum* 9A02S1 Grown in Submerged Culture. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

CAMPBELL, G. M.; ČUKELJ MUSTAČ, N.; ALYASSIN, M.; GOMEZ, L. D.; SIMISTER, R.; FLINT, J.; PHILIPS, D. J.; GRONNOW, M. J. WESTWOOD, N. J. Integrated processing of sugarcane bagasse: Arabinoxylan extraction integrated with ethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 146, p. 31–40, 2019.

CARVALHO, D. M.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L. Assessment of alkaline pretreatment for the production of bioethanol from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 932–941, 2016.

CHANG, M.; LI, D.; WANG, W.; CHEN, D.; ZHANG, Y.; HU, H.; YE, X. Comparison of sodium hydroxide and calcium hydroxide pretreatments on the enzymatic hydrolysis and lignin recovery of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 244, n. 1, p. 1055–1058, 2017.

CHEN, H.; LIU, J.; CHANG, X.; CHEN, D.; XUE, Y.; LIU, P.; LIN, H.; HAN, S. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. **Fuel Processing Technology**, v. 160, p. 196–206, 2017.

CHENG, C.; WANG, J.; SHEN, D.; XUE, J. GUAN, S.; GU, S.; LUO, K. H. Catalytic Oxidation of Lignin in Solvent Systems for Production of Renewable Chemicals: A Review. **Polymers**, v. 9, n. 240, p. 2-25, 2017.

CHENG, J.; HUANG, S.; JIANG, H.; ZHANG, Y.; LI, L.; WANG, J.; FAN, C. Isolation and characterization of a non-specific endoglucanase from a metagenomic library of goat rumen. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 12, p. 2-8, 2016.

CHENG, Y. F.; MAO, S. Y.; LIU, J. X.; ZHU, W. Y. Molecular diversity analysis of rumen methanogenic Archaea from goat in eastern China by DGGE methods using different primer pairs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 585-592, 2009.

CHURCH, D.C. Microbiologia del rumen. In: \_\_\_\_\_. **Fisiologia digestiva y nutrición de los ruminantes**. Zaragoza: Acribia, p.184-224, 1974.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3–23, 2005.

COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P., FURTTADO, A. F.; BEAUCHEMIN, K. A. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2628-2638, 2013.

CORREIA, J. A. C.; JUNIOR, J. E. M.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: study of parameters. **Bioresource Technology**, 139, p. 249–256, 2013.

CORREIA, J. A.; MARQUES, J. E.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Enhanced enzymatic hydrolysis and ethanol production from cashew apple bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 249–259, 2015.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, 2005.

CYSNEIROS, C. S.; FERREIRA, R. N.; OLIVEIRA, A. M.; FAVORETTO, A. D.; ARNOLD, E.; ULHOA, C. J. Produção, caracterização e avaliação de enzimas fibrolíticas na digestibilidade da forragem de milho. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 4, 426-435, 2013.



DAGAR, S. S.; KUMAR, S.; MUDGIL, P.; PUNIYA, A. K. Comparative evaluation of lignocellulolytic activities of filamentous cultures of monocentric and polycentric anaerobic fungi. **Anaerobe**, v. 50, p. 76–79, 2018.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578-595, 2009.

DEL RÍO, J. C.; LINO, A. G.; COLODETTE, J. L.; LIMA, C. F.; GUTIÉRREZ, A., MARTÍNEZ, Á. T.; LU, F.; RALPH, J.; RENCORET, J. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 322–338, 2015.

DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 236-242, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. **FAOSTAT**: FAO's corporate database. 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 5 jul. 2019.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.

FLINT, H. J.; BAYER, E. A.; RINCON, M. T.; LAMED, R.; WHITE, B. A. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 121-131, 2008.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1082-1093, 2017.

FRANZOLIN, M. H. T.; LUCCI, C. S., FRANZOLIN, R. Efeitos de rações com níveis crescentes de cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho sobre a população de protozoários no rúmen de ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p.1452-1457, 2000.

FREITAS A. W. P.; ROCHA F. C.; ZONTA, A.; FAGUNDES J. L.; FONSECA, R.; ZONTA, M. C. M.. Desempenho de novilhos recebendo dietas à base de cana-de-açúcar in natura ou hidrolisada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 11, p. 2532-2537, 2011.

FU, L.; MCCALLUM, S. A.; MIAO, J.; HART, C.; TUDRYN, G. J.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. J. Rapid and accurate determination of the lignin content of lignocellulosic biomass by solid-state NMR. **Fuel**, v. 141, p. 39-45, 2015.

GAGEN, E. J.; MOSONI, P.; DENMAN, S. E.; AL, JASSIM, R.; MCSWEENEY, C. S.; FORANO, E. Methanogen colonization does not significantly alter acetogen diversity in lambs isolated 17h after birth and raised aseptically. **Microbiology Ecology**, v. 64, n. 3, p. 628-640, 2012.

GARROTE, G.; DOMINGUEZ, H. E.; PARAJO, J. C. Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. **Journal of Food Engineering**, v. 52, n. 3, p. 211–218, 2002.

INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES; COMMISSION ON LIFE SCIENCES; NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animal**. Washington, D.C., USA: GCULA, 1996. Disponível em: <<http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>>. Acesso em: 5 jul. 2019.

GHAFFAR, S. H.; FAN, M.; MCVICAR, B. Bioengineering for utilisation and bioconversion of straw biomass into bio-products. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 262-274, 2015.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, n. 59, p. 257-268, 1987.

GILBERT, H. J. The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. **Plant Physiology**, v. 153, p. 444–455, 2010.

GOLDBECK, R.; GONÇALVES, T. A.; DAMÁSIO, A. R. L.; BRENELLI, L. B.; WOLF, L. D.; PAIXÃO, D. A. A.; ROCHA, G. J. M.; SQUINA, F. M. Effect of hemicellulolytic enzymes to improve sugarcane bagasse saccharification and xylooligosaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 131, p. 36–46, 2016.

GOMES, G. M. F.; VASCONCELOS, A. M.; EGITO, A. S.; CARNEIRO, J. C.; FONTELES, N. L. O.; SALLES, H. O. Biodegradação do bagaço de cana-de-açúcar por microrganismos ruminais de caprinos e ovinos. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 1, p. 204-214, 2015.

GOMES, G. M. F.; VASCONCELOS, A. M.; EGITO, A. S.; CARNEIRO, J. C.; LANDIM, A. V.; FONTELES, N. L. O.; SALLES, H. O. Degradabilidade in situ do bagaço de cana-de-açúcar para pequenos ruminantes de raças naturalizadas do Nordeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1792-1800, 2013.

GUO, W.; GUO, X. J.; ZHU, B. C.; GUO, Y. Y.; ZHAOU, X. In situ degradation, ruminal fermentation, and the rumen bacterial community of cattle fed corn stover fermented by lignocellulolytic microorganisms. **Animal Feed Science and Technology**, v. 248, p. 10-19, 2019.

GUPTA, M.; KAPOOR, P. D.; PURI, J. P. Effect of defaunation and different rations on in vitro cellulose digestion in buffaloes. **The Indian Journal of Animal Sciences**, v. 60, p. 748-749, 1990.

HARRIS, P. J. Primary and secondary plant cell walls: A comparative overview. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v. 36, n. 1, p. 36–53, 2006.

HENDERSON, G.; COX, F.; GANESH, S.; JONKER, A.; YOUNG, W.; JANSSEN, P.H. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific Reports**, London, v. 5, n. 14567, p. 1-15, 2015.

HOFFMAM, Z. B.; ZANPHORLIN, L. M.; COTA, J.; DIOGO, J. A.; ALMEIDA, G. B.; DAMÁSIO, A. R.; SQUINA, F.; MURAKAMI, M. T.; RULLER, R. Xylan-specific carbohydrate-binding module belonging to family 6 enhances the catalytic performance of a GH11 endo-xylanase. **New Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 467-472, 2016.

HULT, E.-L.; LIITIÄ, T.; MAUNU, S. L.; HORTLING, B.; IVERSEN, T. A CP/MAS <sup>13</sup>C-NMR study of cellulose structure on the surface of refined kraft pulp fibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 2, p. 231-234, 2002.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. New York, NY: Academic Press, 1966. 533p.

JAENICKE R.; BÖHM G. The stability of proteins in extreme environments. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, n. 6, p. 738-48. 1998.

JOBLIN, K. N.; MATSUI, H.; NAYLOR, G. E.; USHIDA.; K. Degradation of fresh ryegrass by methanogenic co-cultures of ruminal fungi grown in the presence or absence of *Fibrobacter succinogenes*. **Current Microbiology**, v. 45, p. 46-53, 2002.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188–203, 2014.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1219–1227, 2012.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, p. 125-135, 2005.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42-48, 2016.

KNOB, A.; TERRASAN, C.; CARMONA, E.  $\beta$ -Xylosidases from filamentous fungi: An overview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 389–407, 2010.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: UFSM, 2002. 140 p.

- KRAUSE, D. O.; DENMAN, S. E.; MACKIE, R. I., MORRISON, M.; RAE, A. L.; ATTWOOD, G. T.; MCSWEENEY, S. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology and genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 5, p. 663-693, 2003.
- KRAUSE, D. O.; RUSSELL, J. B. An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid deamination. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 815-821, 1996.
- KRAUSE, D. O.; DENMAN, S. E.; MACKIE, R. I.; MORRISON, M.; RAE, A. L.; ATTWOOD, G. T.; MCSWEENEY, S. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology and genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 663-693, 2003.
- KUBICEK, C. P. Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 133-142, 2013.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, 411-456, 1999.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24, 1997.
- LIITIÄ, T.; MAUNU SIRKKA, L.; HORTLING, B., Solid State NMR Studies on Inhomogeneous Structure of Fibre Wall in Kraft Pulp. **Holzforschung**, v. 55, n. 5, p. 503-510. 2001.
- LOPES, L. D.; DE SOUZA LIMA, A. O.; TAKETANI, R. G.; DARIAS, P.; DA SILVA, L. R. F.; ROMAGNOLI, E. M.; LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A. L.; MENDES, R. Exploring the sheep rumen microbiome for carbohydrate-active enzymes. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 108, n. 1, p. 15–30, 2015.
- LUNSINA, R.; DUANYAI, S.; PILAJUNB, R.; SOMPORN, D.; SOMBATSRI, P. Effect of urea- and molasses-treated sugarcane bagasse on nutrient composition and in vitro rumen fermentation in dairy cows. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, n. 6, p. 622-627, 2018.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.
- MAGALHÃES, J. A.; RODRIGUES, B. H. N.; SANTOS, F. J. S.; ANDRADE JUNIOR, A. S. A.; ARAÚJO NETO, R. B.; COSTA, N. L.; AZEVÉDO, D. M. M. R.; POMPEU, R. C. F. F.; CASTRO, K. N. C. Produção e composição química de variedades de cana-de-açúcar com fins forrageiros sob irrigação e adubação. **Medicina Veterinária e Zootecnia, PUB VET**, v. 12, n.12, p.1-10, 2018.

MARQUES, N. P.; PEREIRA, J. C.; GOMES, E.; SILVA, R.; ARAÚJO, A. R.; FERREIRA, H.; RODRIGUES, A.; DUSSÂN, K. J. BOCCHINI, D. A. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 66–75, 2018.

MARTÍNEZ, P. M.; BAKKER, P. R.; HARMSEN, P.; GRUPPEN, H.; KABEL, M. Importance of acid or alkali concentration on the removal of xylan and lignin for enzymatic cellulose hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 88–96, 2015.

MARTÍNEZ, P. M.; PUNT, A. M.; KABEL, M. A.; GRUPPEN, H. Deconstruction of lignin linked p-coumarates, ferulates and xylan by NaOH enhances the enzymatic conversion of glucan. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 44–51, 2016.

MARYANA, R.; MA'RIFATUN, D.; WHENI, I. A.; SATRIYO, K. W.; RIZAL, W. A. Alkaline Pretreatment on Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. **Energy Procedia**, v. 47, p. 250 – 254, 2014.

McQUEEN-MASON, S.; DURACHKO, D. M.; COSGROVE, D. J. Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. **Plant Cell**, v. 4, p. 1425–1433, 1992.

MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, 426–428, 1959.

MISSIO, R. L. Tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para alimentação de ruminantes. **Archivos de Zootecnia**, v. 65, n. 250, p. 267-278. 2016.

MOHAN, C. **BUFFERS A guide for the preparation and use of buffers in biological systems**. [S.l.]: Calbiochem, 1997.

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic Biomass to Bioethanol, a Comprehensive Review with a Focus on Pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da Madeira de Pinus oocarpa parte I – Estudo dos Constituintes Macromoleculares e Extrativos Voláteis. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

NASIRPOUR, N.; MOUSAVI, S. M.; SHOJAOSADATI, S. A. A novel surfactant-assisted ionic liquid pretreatment of sugarcane bagasse for enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 33–37, 2014.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington: The National Academies Press, 2007.

NCUBE, T.; HOWARD, R. L.; ABOTSI, E. K.; RENSBURG, E. L. J.; NCUBE, I. *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulose by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 118-123, 2012.

NEUHOFF, V.; STAMM, R.; EIBL, H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. **Electrophoresis**, v. 6, n. 9, p. 427-448, 1985.

NEWMAN, R. H. Homogeneity in cellulose crystallinity between samples of *Pinus radiata* wood. **Holzforschung**, v. 58, n. 1, p. 91-96, 2004.

NGUYEN, H. C.; CHIA-HUNG, S.; YUAN-KUN Y.; HUONG, D. T. M. Sugarcane bagasse as a novel carbon source for heterotrophic cultivation of oleaginous microalga *Schizochytrium* sp. **Industrial Crops and Products**, v. 121, p. 99–105, 2012.

ODEGA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v.33, p.1549-1558, 2010.

PARK, S., BAKER, J. O., HIMMEL, M. E., PARILLA, P. A., JOHNSON, D. K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 10, p. 1-10, 2010.

PEREIRA, J. C.; MARQUES, N. P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, T. B.; BOSCOLO, M.; SILVA R, GOMES E, MARTINS, D. A. B. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 928-939, 2015.

PEREIRA, S. C.; MAEHARA, L.; MACHADO, C. M. M. FARINAS, C. S. Physical–chemical–morphological characterization of the whole sugarcane lignocellulosic biomass used for 2G ethanol production by spectroscopy and microscopy techniques. **Renewable Energy**, v. 87, n. 1, p. 607-617, 2016.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

RABELO, S. C.; ANDRADE, R. R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, v. 136, 349–357, 2014.

RAVINDRAN, R.; HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. A Review on Bioconversion of Agro-Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes. **Bioengineering**, Basel, Switzerland, v. 5, n. 4, 2018.

REHMAN, F. U.; ASLAM, M.; TARIQ, M. I.; SHAHEEN, A.; SAMI, A. J.; NAVEED, N. H.; BATOOL, A. I. Isolation of cellulolytic activities from *Tribolium castaneum* (red flour beetle). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 6710-6715, 2009.

REIS, C. L. B.; SILVA, L. M. A. E.; RODRIGUES, T. H. S.; FÉLIX, A. K. N.; SANTIAGO-AGUIAR, R. S. D.; CANUTO, K. M.; ROCHA, M. V. P. Pretreatment of cashew apple bagasse using protic ionic liquids: Enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 694-701, 2017.

REZENDE, C. A.; LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E. R., GARCIA W.; I. POLIKARPOV. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 28, n. 4, 2011.

RINGLIA, C.; KELLER, B.; RYSERB, U. Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 1430–1441, 2001.

ROCHA, G. J. M.; NASCIMENTO, V. M.; GONÇALVES, A. R.; SILVA, F. N.; MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical–chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52–58, 2015.

ROSENBERG, E.; SHARON, G.; ATAD, I.; ZILBER-ROSENBERG, I. The evolution of animal and plants via symbiosis with microorganisms. **Environmental Microbiology Reports**, Hoboken, v. 2, n. 4, p. 500-506, 2010.

RUSSELL, J. B.; MUCK, R. E.; WEIMER, P. J. Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, p. 183–197, 2009.

RUSSELL, J. B.; MUCK, R. E.; WEIMER, P. J. Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, p. 183–197, 2009.

SABIHA-HANIM, S.; SITI-NORSAFURAH, A. M. Physical properties of hemicelulose films from sugarcane bagasse. **Procedia Engineering**, v. 42, p. 1390-1395, 2012.

SAHA, B. C. Hemicelulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279-291, 2003.

SALOMÃO, G. S. B., AGNEZI, J. C., PAULINO, L. B., HENCKER, L. B., DE LIRA, T. S., TARDIOLI, P. W.; PINOTTI, L. M. Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 1-6, 2019.

SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE J. L., MANFREDI, M.; QUEIROZ, M. R. L. R.; CALDAS, C. S.; SOARES, F. E. F. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 56–62, 2014.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010.

SEABRA, J. E. A.; TAO, L.; CHUMA, H. L.; MACEDO, I. C. A techno-economic evaluation of the effects of centralized cellulosic ethanol and co-products refinery options with sugarcane mill clustering. **Biomassa and Bioenergy**, v. 34, p. 1065–1078, 2010.

SEMERCİ, İ.; GÜLER, F. Protic ionic liquids as effective agents for pretreatment of cotton stalks at high biomass loading. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 588–595, 2018.

SHELKE, S. K., CHHABRA, A.; PUNIYA, A. K.; SEHGAL, J. P. In vitro degradation of sugarcane bagasse based ruminant rations using anaerobic fungi. **Annals of Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 415–418, 2009.

SHI, J.; YANG, Q.; LIND, L. The structural features of hemicelluloses dissolved out at different cooking stages of active oxygen cooking process. **Carbohydrate Polymers**, v. 104, p. 182–190, 2014.

SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miede. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 235–241, 2005.

SINGH, R.; KUMAR, R.; BISHNOI, K.; BISHNOI, N. R. Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 1, p. 28–35, 2009.

SIROHI, S. K.; SINGH, N.; DAGAR, S. S.; PUNIYA, A. K. Molecular tools for deciphering the microbial community structure and diversity in rumen ecosystem. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 95, p. 1135–1154, 2012.

STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; BRYANT, M. P. The rumen bacteria. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. London: Chapman & Hall, p.140-19, 1997.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN, R. C.; SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 195–204, 2004.

SUN, S. N.; CAO, X. F.; XU, F.; SUN, R. C.; JONES, G. L.; BAIRD, M. Structure and thermal property of alkaline hemicelluloses from steam exploded *Phyllostachys pubescens*. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1191–1197, 2014.



TAKENAKA, A.; TAJIMA, K.; MITSUMORI, M.; KAJIKAWA, H. Fiber digestion by rumen ciliate protozoa. **Microbes and Environments**, v.19, p. 203-210, 2004.

TAVARES, E. Q. P.; RUBINI, M. R.; MELLO-DE-SOUSA, T. M.; DUARTE, G. C.; FARIA, F. P.; FERREIRA FILHO, E. X.; KYAW, C. M.; PEREIRA-SILVA, I.; POÇAS-FONSECA, M. J. An acidic thermostable recombinant *Aspergillus nidulans* endoglucanase is active towards distinct agriculture residues. **Enzyme Research**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

TEIXEIRA-SA, D. M. A.; REICHER, F.; BRAGA, R. C.; BELTRAMINI, L. M.; MOREIRA, R. A. Isolation of a lectin and a galactoxyloglucan from *Mucuna sloanei* seeds. **Phytochemistry**, v. 70, n. 17-18, p. 1965–1972, 2009.

TOWNSEND, T. J.; SPARKES, D. L.; RAMSDEN, S. J.; GLITHERO, N. J.; WILSON, P. Wheat straw availability for bioenergy in England. **Energy Policy**, v. 122, p. 349–357, 2018.

TOYODA, A.; IIO, W.; MITSUMORI, M.; MINATO, H. Isolation and identification of cellulose-binding proteins from sheep rumen contents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 1667-1673, 2009.

TYAGI, S.; LEE, K.-J.; MULLA, S. I.; GARG, N.; CHAE, J.-C. Production of Bioethanol from Sugarcane Bagasse: Current Approaches and Perspectives. **Applied Microbiology and Bioengineering**, v. 2, p. 21–42, 2019.

VAN DYK, J.; PLETSCHE B. A. review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advance**, v. 30, n. 6, p. 1458–80, 2012.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 895–905, 2010.

VARSHNEY, D.; MANDADE, P.; SHASTRI, Y. Multi-objective optimization of sugarcane bagasse utilization in an Indian sugar mill. **Sustainable Production and Consumption**, v. 18, p. 96–114, 2019.

VAZANA, Y.; BARAK, Y.; UNGER, T.; PELEG, Y.; SHAMSHOUM, M.; BEN-YEHEZKEL, T.; MAZON, Y.; SHAPIRO, E.; LAMED, R.; BAYER, E. A. A synthetic biology approach for evaluating the functional contribution of designer cellulosome components to deconstruction of cellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, 182, 2013.

WANG, Y.; LIAN, J.; WAN, J.; MA, Y.; ZHANG, Y. A supramolecular structure insight for conversion property of cellulose in hot compressed water: Polymorphs and hydrogen bonds changes. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 94–103, 2015.

WILLIAMS, A. G.; COLEMAN, G. S. **The rumen protozoa**. New York: Springer-Verlag, 1991. 423 p.

XIE, X.; FENG, X.; CHI, S.; ZHANG, Y.; YU, G.; LIU, C.; LI, Z.; LI, B.; PENG, H. A sustainable and effective potassium hydroxide pretreatment of wheat straw for the production of fermentable sugars. **Bioresource Technology Reports**, v. 3, p. 169–176, 2018.

YUE, Z. B.; LI, W. W.; YU, H. Q. Application of rumen microorganisms for anaerobic bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 738–744, 2013.

ZHANG, H.; WU, S. Efficient Sugar Release by Acetic Acid Ethanol-Based Organosolv Pretreatment and Enzymatic Saccharification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 11681–11687, 2014.

ZHANG, Y.- HIMMEL, E. H.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.

ZHANG, Z.; DONALDSON, A. A.; MA, X. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. **Biotechnology Advance**, v. 30, p. 913-919, 2012.

ZHANG, Z.; HARRISON, M. D.; RACKEMANN, D. W.; DOHERTY, W. O. S.; O'HARA, I. M. Organosolv pretreatment of plant biomass for enhanced enzymatic saccharification. **Green Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 360–381, 2016.

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

ZHONG, R.; YE, ZH. Secondary Cell Walls: Biosynthesis, Patterned Deposition and Transcriptional Regulation. **Plant Cell Physiology**, v. 56, n. 2, p. 195–214, 2015.