

## DESAFIOS RELACIONADOS À PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS NA HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Camila Florencio<sup>a</sup>, Alberto Colli Badino<sup>b</sup> e Cristiane Sanchez Farinas<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Embrapa Instrumentação, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos – SP, Brasil

Recebido em 11/04/2017; aceito em 01/06/2017; publicado na web em 03/08/2017

Revisão

CURRENT CHALLENGES ON THE PRODUCTION AND USE OF CELLULOLYTIC ENZYMES IN THE HYDROLYSIS OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS. The second generation (2G) ethanol obtained from lignocellulosic biomass has been considered as a potential alternative source of energy for the transportation sector. However, the technologies to convert lignocellulose into fermentable sugars still face several challenges. One of the major challenges of this process is related to the cellulolytic enzymes. Thus, the development of bioprocesses for enzyme production and strategies to increase the final yield of the enzymatic hydrolysis reactions are required to ensure the economic feasibility of the biomass conversion process. In this review, it is discussed the progress related to fungal enzyme technology over the past few years with major emphasis on the biocatalysts needed for cellulose degradation as well as on cultivation strategies for the production of enzymes on-site. The potential of applying secretome analysis as a tool for the characterization of the enzymatic complexes and some limitations on the use of enzymatic cocktails in the saccharification step, such as the unproductive adsorption of enzymes onto lignin are also discussed in light of the recent literature.

Keywords: cellulosic ethanol; cellulases; biocatalysts; enzymatic hydrolysis, bioprocess.

### INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a escassez das reservas de petróleo e carvão mineral aliada à necessidade de preservação do meio ambiente estão entre os principais fatores que impulsionam a busca de fontes renováveis para a produção de energia e de combustíveis sustentáveis. Atualmente, cerca de 80% da energia primária consumida no mundo têm origem nos combustíveis fósseis.<sup>1</sup> Diante desse cenário, os biocombustíveis se apresentam como uma potencial alternativa de novas fontes de energia para o setor de transporte, com destaque para o etanol de segunda geração (2G) produzido a partir de biomassas lignocelulósicas. O etanol 2G apresenta como principal vantagem a possibilidade de aumento da produtividade em etanol nas unidades já instaladas sem a necessidade de aumento de área cultivada.<sup>2</sup> No entanto, a viabilidade econômica do processo de produção do etanol 2G ainda esbarra em algumas limitações tecno-econômicas, como o alto custo das enzimas utilizadas na conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis.

O uso de biocatalisadores representa uma alternativa importante aos processos químicos convencionais, pois as enzimas catalisam as reações de forma específica, minimizando a geração de subprodutos indesejáveis, e atuam em temperaturas amenas, o que reduz o custo energético do processo. Assim, o desenvolvimento de processos alternativos e mais eficientes para a produção de enzimas é um desafio que precisa ser superado, visto que o alto custo desse insumo pode ser um fator limitante no processo de produção desse biocombustível.<sup>3-5</sup> Nesse sentido, a produção de enzimas *on-site* utilizando materiais lignocelulósicos como fonte de carbono para o cultivo de microrganismos tem sido considerada uma estratégia potencial para reduzir os custos na produção das enzimas celulolíticas e, consequentemente, contribuir para diminuir os custos do processo de obtenção do etanol 2G.<sup>6-11</sup>

Atualmente são usados dois métodos de cultivo convencionais para produção de enzimas celulolíticas: a fermentação em estado

sólido (FES), caracterizada pela ausência de água livre, e a fermentação submersa (FSm), que ocorre em meio líquido.<sup>12</sup> Cada um desses processos apresenta vantagens e desvantagens associadas a condições ambientais e operacionais, sendo que a FSm é utilizada na maioria dos processos industriais para produção de enzimas microbianas. Alternativamente, um novo método de cultivo, denominado de fermentação sequencial (FSeq), foi desenvolvido recentemente na tentativa de unir as vantagens dos processos de cultivo convencionais mencionados anteriormente. A FSeq é baseada na preparação do pré-cultivo no estado sólido com posterior transição para estado submerso, tendo se mostrado como um método promissor para a produção de enzimas celulolíticas, tanto em termos qualitativos como quantitativos.<sup>7,9,10,13-16</sup>

Em termos de microrganismos aptos a produzir enzimas celulolíticas capazes de degradar a biomassa vegetal, os fungos filamentosos se destacam, principalmente as linhagens *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*. O fungo *T. reesei* tem sido amplamente utilizado na produção industrial de coquetéis enzimáticos celulolíticos.<sup>17,18</sup> Apesar de ter um número reduzido de enzimas celulolíticas em comparação com outros fungos filamentosos,<sup>19</sup> o fungo *T. reesei* possui sistemas eficientes para o transporte de nutrientes e alta capacidade de indução/secreção de celulases e hemicelulases.<sup>20</sup> O *A. niger* é também considerado um dos mais importantes fungos para aplicações biotecnológicas e diferentes linhagens industriais são comumente utilizadas na produção de enzimas, entre outros produtos de alto valor agregado.<sup>21</sup> Essa espécie de *Aspergillus* é capaz de produzir uma ampla gama de enzimas relacionadas à degradação de polissacarídeos vegetais tais como celulose, xilana, xiloglucano, pectina, entre outros.<sup>22</sup> Em *A. niger*, a expressão de todas as principais celulases e hemicelulases é regulada pela mesma molécula indutora, D-xilose, mas os mecanismos de indução do *T. reesei* são mais diversos.<sup>23</sup>

A produção das principais celulases por ambos os fungos, *T. reesei* e *A. niger*, é controlada por um sofisticado sistema de regulação que evita o gasto de energia com processos desnecessários quando há fontes de carbono metabolizáveis presentes.<sup>24,25</sup> Nesse sentido, o bagaço de cana-de-açúcar tem sido amplamente utilizado como uma

\*e-mail: cristiane.farinas@embrapa.br

biomassa lignocelulósica indutora na produção de enzimas do complexo celulolítico, além de ser utilizado no processo de sacarificação para liberação dos açúcares fermentescíveis. Estudos de proteoma das linhagens *A. niger* e *T. reesei* para identificar proteínas secretadas na presença de bagaço de cana têm demonstrado que essa biomassa lignocelulósica é capaz de induzir a produção de diferentes tipos de celulases, hemicelulases, esterases e outras proteínas putativas e/ou hipotéticas importantes para a sacarificação da biomassa vegetal, tais como proteínas acessórias não hidrolíticas que aumentam e/ou favorecem a eficiência enzimática.<sup>14,23,26</sup>

No processo de conversão da biomassa lignocelulósica, há necessidade de uma etapa de pré-tratamento da biomassa vegetal para aumentar a acessibilidade da celulose para a ação das enzimas celulolíticas durante a etapa de hidrólise enzimática.<sup>27,28</sup> A reação de hidrólise enzimática compreende uma etapa de adsorção das celulases no material lignocelulósico, porém a presença de lignina residual no material pode levar a uma adsorção improdutivo dessas enzimas. A perda de atividade catalítica devido à adsorção improdutivo das enzimas na lignina representa um dos principais fatores limitantes na conversão da biomassa, sendo influenciada pelo tipo de matéria-prima, pré-tratamento e fonte/características das enzimas. As celulases de *T. reesei* possuem resíduos de aminoácidos hidrofóbicos expostos em sua superfície, assim esses resíduos podem interagir com a superfície hidrofóbica da lignina, causando a adsorção improdutivo das celulases com a desativação das mesmas, reduzindo a eficiência do processo catalítico.<sup>29-31</sup> As enzimas celulolíticas de *A. niger* também sofrem adsorção improdutivo, porém estudos demonstram um perfil de adsorção diferente. Por exemplo, a  $\beta$ -glicosidase de *A. niger* apresenta menor adsorção em lignina do que a produzida pela linhagem *T. reesei*.<sup>32</sup> Além disso, a  $\beta$ -glicosidase de *A. niger* é menos afetada pela lignina do que outras enzimas, como celulases e hemicelulases.<sup>33</sup> Assim, o entendimento da estrutura e características dos biocatalisadores empregados nas reações de hidrólise da biomassa é chave para a viabilização deste processo.

Este artigo de revisão aborda aspectos relacionados a novas estratégias para a produção, caracterização e aplicação das enzimas celulolíticas na sacarificação da biomassa vegetal. A produção enzimática é discutida com base na literatura recente sobre as técnicas de fermentação em estado sólido, submerso e sequencial para as principais linhagens fúngicas. Análises do secretoma são também apresentadas como ferramenta para identificação e caracterização dos coquetéis enzimáticos. Além disso, aspectos relacionados ao processo de hidrólise enzimática são abordados, bem como um dos desafios dessa etapa relacionado à adsorção improdutivo das

celulases na lignina, que afetam significativamente a eficiência do processo.

## ENZIMAS CELULOLÍTICAS QUE ATUAM NA DEGRADAÇÃO DA CELULOSE

A degradação da biomassa lignocelulósica ocorre principalmente por enzimas produzidas e secretadas por microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Dentre esses microrganismos, os fungos filamentosos se destacam como a principal fonte das enzimas comerciais, pois são capazes de produzir em altas concentrações uma variedade de enzimas que possuem atividades complementares.<sup>34,35</sup> Esse grupo de enzimas que atuam no polímero de celulose, denominado de celulases ou enzimas celulolíticas são enzimas essenciais para o processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica. Porém, a hidrólise enzimática da biomassa é um processo complexo, uma vez que a presença do polímero de hemicelulose e da lignina nos substratos lignocelulósicos limita a ação das enzimas, fazendo-se necessária a remoção ou modificação química desses componentes por pré-tratamentos químicos, físicos e/ou biológicos. Deste modo, outras enzimas acessórias, além das celulases, são necessárias para degradação da matéria lignocelulósica, como as hemicelulases (xilanase, mananase, arabinase), mono-oxigenases, esterases, entre outras.<sup>36</sup>

As enzimas celulolíticas são capazes de atuar na hidrólise do polímero de celulose através da ação sinérgica dos seus três principais grupos de enzimas: endoglucanases (EGases) que clivam aleatoriamente ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas nas regiões amorfas da celulose e geram novos terminais redutores e não-redutores, celobiohidrolases (CBH) que são enzimas processivas e liberam celobiose a partir de terminais redutores e não redutores de fragmentos de celulose produzidos por endoglucanases, e as  $\beta$ -glicosidases que hidrolisam celobiose ou celo-oligossacarídeos em glicose. As  $\beta$ -glicosidases são enzimas não-processivas, pois o substrato deve ser liberado após cada clivagem para permitir a liberação da nova molécula de glicose (Figura 1).<sup>37</sup> Ambas as enzimas, celobiohidrolase e  $\beta$ -glicosidase, são fortemente inibidas pelo produto de cada reação, celobiose e glicose, respectivamente.

As enzimas envolvidas na desconstrução de polissacarídeos estão agrupadas na base de dados "Carbohydrate-active enzymes database" (CAZy) baseadas na comparação das sequências de aminoácidos, estruturas 3D e mecanismos catalíticos.<sup>19</sup> A classificação das enzimas em famílias é feita de acordo com sua função no processo de clivagem ou construção de hidratos de carbono complexos, sendo

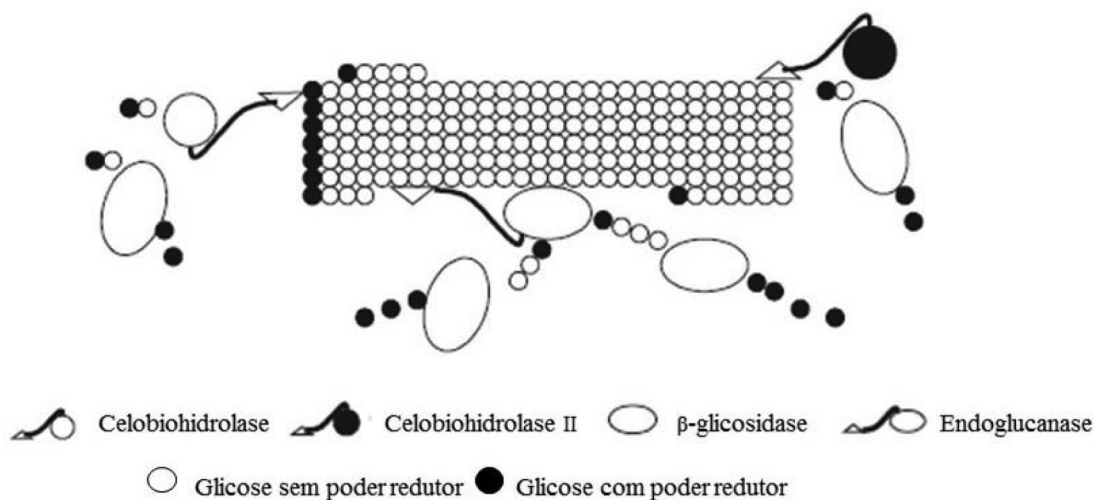


Figura 1. Ação das enzimas no polímero de celulose para liberação de açúcares fermentescíveis<sup>38</sup>

que as celulases pertencem à família glicosil hidrolase (GH). Mais recentemente, foi descoberta a função real de membros da família GH61, antes classificadas como endoglucanases, como sendo mono-oxigenases de polissacarídeos líticas (LPMOs – lytic polysaccharide monoxygenases), resultando na inserção dessas enzimas em uma nova categoria chamada de “atividades auxiliares” (AA).<sup>39</sup> Essas enzimas integram um grupo de módulos catalíticos envolvidos na degradação da parede celular vegetal, por isso essa nova classificação AA fornece uma visão complementar das enzimas lignocelulolíticas, concentrando-se em famílias de enzimas oxidativas.<sup>40</sup> A descoberta de outras enzimas acessórias, como a GH115, uma  $\alpha$ -glucuronidase que possui um elo evolutivo com a  $\alpha$ -glucuronidase da família GH67,<sup>41</sup> representa uma evolução no processamento enzimático da biomassa e confirma que a ação das celulases hidrolíticas clássicas é facilitada pela ação das LPMOs e de outras enzimas acessórias, melhorando o processo de hidrólise enzimática da biomassa lignocelulolítica<sup>42</sup> e auxiliando na tentativa da redução dos custos do coquetel enzimático.

No entanto, os custos para a obtenção de enzimas ainda limita sua utilização em vários processos industriais, incluindo as celulases aplicadas na produção de etanol 2G.<sup>3,5,11,43</sup> Assim, alternativas para diminuir o custo desses biocatalisadores têm sido objeto de vários trabalhos encontrados na literatura. Esses estudos buscam aumentar a produção das enzimas celulolíticas através da seleção da fonte de carbono,<sup>44,45</sup> da seleção de microrganismos capazes de secretar uma alta quantidade de enzimas e um coquetel enzimático eficiente,<sup>8,46,47</sup> do entendimento da composição do coquetel celulolítico secretado por esses microrganismos,<sup>14,26,48</sup> da complementação do coquetel enzimático com outras enzimas,<sup>49,50</sup> entre outros.

A definição de métodos de avaliação sobre o custo das enzimas do complexo celulolítico é importante para apoiar o desenvolvimento futuro das biorrefinarias. Atualmente, os métodos de avaliação de custos das celulases apresentam vários resultados controversos, ou mesmo conflituosos.<sup>5</sup> Em termos econômicos, no ano de 2001, a etapa de obtenção de enzimas a partir de microrganismos celulolíticos era em torno de 50% do custo global do processo de produção do etanol 2G.<sup>51</sup> Diferentes estudos contabilizam o custo das enzimas nesse processo em dólares/galão de etanol celulolítico.<sup>3</sup> Alguns estudos reportam que o custo das celulases varia apenas de \$0.10 a \$0.40/gal etanol, dando suporte a ideia de que a tecnologia atual seja economicamente viável.<sup>52-55</sup> Por outro lado, outros estudos pontuam o custo da enzima de \$0.68/gal etanol baseado em rendimento máximo teórico,<sup>56</sup> chegando até a \$1.47/gal etanol se o rendimento for baseado nas eficiências de sacarificação e fermentação previamente reportados na literatura.<sup>3</sup> Dependendo do preço real das celulases no mercado industrial de enzimas e da produção de etanol convencional, o custo da enzima pode chegar até \$2.71/gal etanol, sendo responsável por 48% do preço mínimo de venda do etanol celulolítico.<sup>5</sup>

Tendo em vista esses valores do custo da enzima no processo de produção de etanol 2G, a produção de enzimas *on-site*, isto é, utilizando as mesmas instalações da usina, pode reduzir significativamente o custo da enzima, proporcionando uma alternativa promissora para a produção de etanol celulolítico em larga escala.<sup>4</sup> Estudos mostram uma redução significativa no custo da enzima quando produzida *on-site* para menos de \$0.30/gal etanol, devido a sua purificação simplificada e logística, bem como a potencial utilização de fonte de carbono de baixo custo a partir de material lignocelulolítico.<sup>57</sup> Em um estudo comparativo dos custos de produção de celulases, mostrou-se que as enzimas produzidas *on-site* reduziram até 30% do custo da enzima em comparação com as enzimas comerciais.<sup>58</sup> Segundo Takimura *et al.*<sup>59</sup> a redução foi de até 70% no custo das celulases quando produzidas *on-site* em relação às celulases comerciais, tendo como fonte de carbono a palha de arroz. Outro estudo realizado recentemente compara os custos de três abordagens para a produção de celulases:

*off-site*, *on-site* e integrado, no qual a fonte de carbono é a própria biomassa lignocelulolítica.<sup>4</sup> A redução de custos observada foi considerada significativa, de \$0.78 para \$0.58 e \$0.23/gal etanol mudando os sistemas de *off-site* para *on-site* e integrado, respectivamente, com redução de 7% e 19% nos custos totais da produção de etanol celulolítico. Portanto, a produção de enzimas celulolíticas *on-site* tem se mostrado como uma potencial estratégia para a diminuição de custo das enzimas utilizadas no processo de sacarificação da biomassa para liberação de açúcares fermentescíveis, contribuindo para tornar o etanol 2G mais competitivo diante do mercado dos biocombustíveis.

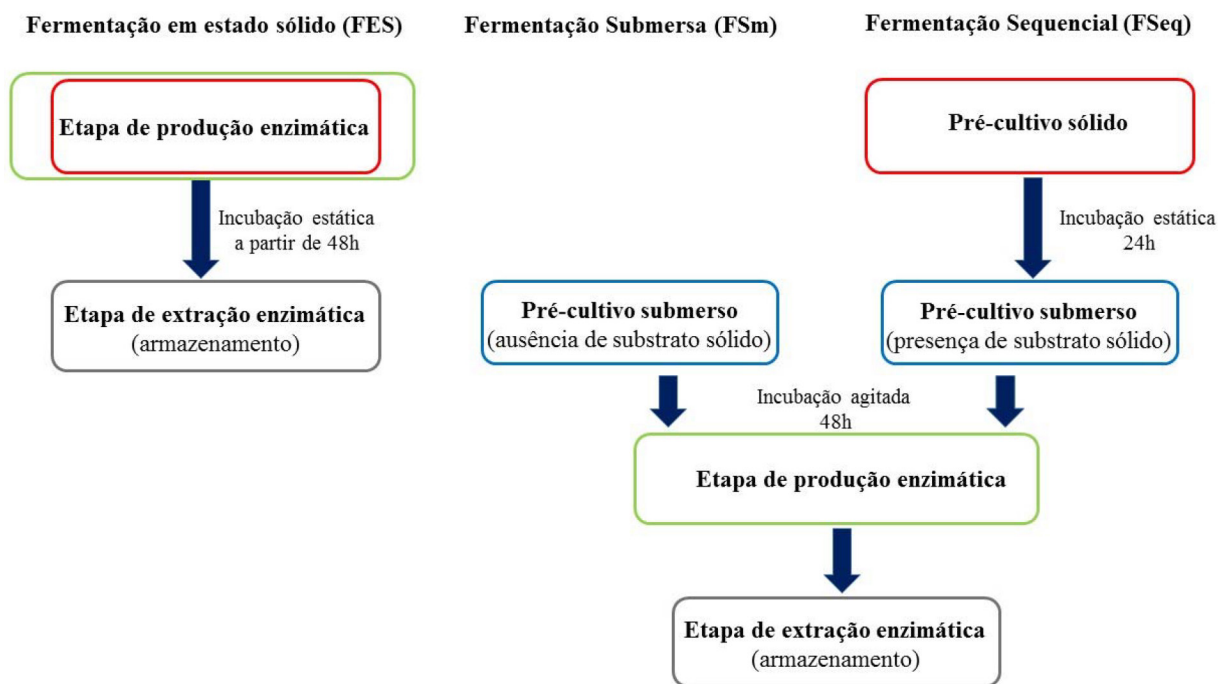
### Estratégias de cultivo para a produção de enzimas *on-site*

Há muitos anos os processos fermentativos são de grande importância prática e econômica para a espécie humana. Diversos produtos de interesse comercial, obtidos por processos de cultivo microbiano, têm sido aplicados com sucesso em diferentes setores que incluem farmacêutico, têxtil, alimentar, entre outros.<sup>60,61</sup> Além disso, há um grande potencial para o uso dos processos fermentativos em novas aplicações, como na conversão de materiais lignocelulolíticos gerados a partir da agroindústria em biocombustíveis e outros produtos de maior valor agregado.<sup>62</sup>

No Brasil, onde a agricultura é uma das principais fontes de atividade econômica, a geração de resíduos florestais e agroindustriais é bastante considerável. O principal resíduo agroindustrial nacional é o bagaço de cana-de-açúcar, gerado a partir das usinas que produzem açúcar e etanol de primeira geração. A cada tonelada de cana-de-açúcar moída na fabricação desses dois produtos são gerados em média 140 kg de bagaço e 140 kg entre palha e ponteira.<sup>2</sup> Uma parte dos resíduos agroindustriais é atualmente utilizada para produção de bioeletricidade, enquanto outra grande fração é deixada no campo, muitas vezes tornando-se um problema ambiental.<sup>62</sup> Portanto, a bioconversão dos resíduos lignocelulolíticos em produtos de interesse comercial poderia proporcionar ajuda econômica e contribuiria para diminuição da poluição ambiental.

Os processos fermentativos realizados por microrganismos podem dar origem a diversos bioprodutos, dentre eles as enzimas industriais, em especial as celulases. O desenvolvimento dos processos biotecnológicos tem sido foco de grande parte dos esforços para a redução nos custos de produção das enzimas celulolíticas. Esses processos podem ser conduzidos em meio sólido, denominado fermentação em estado sólido (FES), ou em meio líquido, denominado fermentação submersa (FSM). Apesar de grande parte dos avanços na produção de celulases microbianas ter sido desenvolvida para FSM, o crescimento de fungos filamentosos produtores de enzimas celulolíticas ocorre naturalmente em condições similares à FES.<sup>60</sup> Ambos os processos apresentam características positivas e negativas, as quais devem ser consideradas de acordo com o produto desejado e o microrganismo a ser utilizado. Recentemente, uma combinação dos dois métodos anteriores, definida como fermentação sequencial (FSeq), tem gerado resultados positivos na produção de enzimas celulolíticas (Figura 2).<sup>7,9,10,13-16</sup>

No processo de FES, o crescimento do microrganismo ocorre em substrato sólido com umidade suficiente apenas para manutenção do metabolismo e desenvolvimento microbiano, não havendo água na forma livre. A água indispensável para o crescimento é adsorvida num suporte sólido ou complexo no interior de uma matriz sólida.<sup>63,64</sup> Para fungos filamentosos a FES é considerada interessante, pois suas características assemelham-se às condições sob as quais a maioria das espécies fúngicas crescem na natureza.<sup>65,66</sup> Existem outras vantagens inerentes à FES, como maior produtividade dos coquetéis enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição pelo produto e substrato e a possibilidade de obtenção de enzimas mais estáveis em termos de



**Figura 2.** Processos fermentativos realizados por microrganismos para a produção de enzimas celulolíticas (FES, FSm, FSeq)

pH e temperatura.<sup>67,68</sup> Do ponto de vista ambiental, uma vantagem importante da FES é a capacidade de utilizar substratos sólidos como resíduos agroindustriais, que servem como fontes de carbono e de energia para o crescimento do microrganismo e a produção de enzima.<sup>62</sup> Como exemplo, o bagaço de cana vem sendo usado como matéria-prima em vários trabalhos que aplicam a técnica da FES.<sup>46,69-74</sup>

Na fermentação submersa, o meio essencial consiste de água contendo nutrientes dissolvidos, sendo que a água pode constituir cerca de 90 a 99% da massa total do material. O processo de cultivo submerso apresenta vantagens relacionadas à instrumentação e controle dos parâmetros físicos-químicos, como controle de temperatura, aeração, agitação e pH.<sup>75</sup> Na FSm, o caldo de fermentação pode ser considerado como uma mistura perfeita, na qual os microrganismos são inoculados diretamente em meio nutriente líquido. Quando se faz uso de fungos filamentosos para a produção de enzimas celulolíticas por esse método de cultivo, pode ser feita tanto a inoculação de esporos quanto de micélios desenvolvidos em uma etapa de pré-cultivo. Além disso, esse tipo de cultivo pode contribuir para uma melhor absorção de nutrientes pelo microrganismo e facilitar a recuperação de metabólitos.<sup>12,76</sup> A maioria das celulases comerciais são produzidas por fungos filamentosos, principalmente *A. niger* e *T. reesei* cultivados em FSm.<sup>77-80</sup>

Alternativamente aos cultivos convencionais FES e FSm, foi descrita recentemente uma nova configuração de processo fermentativo, denominada fermentação sequencial (FSeq).<sup>7</sup> A FSeq é caracterizada pela preparação de pré-cultivo com fase inicial de crescimento fúngico sob estado sólido, seguido por uma transição para estado submerso. A FSeq apresentou resultados significativos em relação ao processo submerso convencional de produção de celulases, tanto em frascos agitados<sup>10,13,14</sup> como em biorreatores convencional tipo tanque agitado e aerado e não convencional pneumático tipo *airlift*.<sup>7,9</sup> A produtividade em endoglucanase foi 3 vezes superior na FSeq em comparação com a FSm, sugerindo o potencial da técnica como uma alternativa promissora para a produção de enzimas celulolíticas por *A. niger*.<sup>7</sup> Florencio *et al.*<sup>10</sup> validaram a metodologia de FSeq para linhagens do gênero *Trichoderma*, observando-se um perfil enzimático com maiores atividades de xilanase, endoglucanase,  $\beta$ -glicosidase, avicelase e

FPase. Posteriormente, Florencio *et al.*<sup>14</sup> avaliaram o secretoma das linhagens *T. reesei* e *A. niger* cultivadas em FSm e FSeq. Os autores observaram que a análise proteômica da linhagem *A. niger* mostrou que a FSeq apresentou o secretoma com um maior número de proteínas identificadas e as maiores atividades enzimáticas. Além disso, as atividades enzimáticas mais elevadas e/ou um melhor equilíbrio da composição do secretoma a partir da FSeq tiveram reflexo de 3 vezes maior conversão na sacarificação do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor quando comparado a FSm.

A morfologia de crescimento dos fungos difere de acordo com as condições de cultivo empregadas, consequentemente, afetam de modo direto a produção de enzimas. Para cada forma de cultivo avaliada tem sido investigada a influência de diferentes parâmetros, tais como pH e temperatura, tipo de reator, tipo de meio nutriente, cultivo de cultura mistas, unidade ideal para cada microrganismo.<sup>9,10,69,73,81-84</sup> Como dito anteriormente, cada processo de cultivo microbiano descrito acima apresenta vantagens e desvantagens relacionadas à produção das enzimas celulolíticas, sendo que o importante no emprego de cada forma de cultivo é ter o entendimento adequado acerca dos parâmetros operacionais que envolvem cada processo. A análise do proteoma para identificar as proteínas secretadas por diferentes microrganismos cultivados sob diferentes condições pode ser considerada como uma ferramenta importante para a caracterização dos complexos enzimáticos, possibilitando um melhor entendimento de como o perfil de proteínas produzidas pode impactar na eficiência da hidrólise da biomassa.

## SECRETOMA COMO FERRAMENTA PARA A CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS ENZIMÁTICOS

O mecanismo de produção e secreção das enzimas celulolíticas por microrganismos, em especial os fungos filamentosos, sempre foi alvo de diversos estudos. A princípio acreditava-se na hipótese de que os fungos filamentosos, dentre eles os do gênero *Trichoderma*, eram capazes de sintetizar níveis basais de celulases constitutivamente e que em contato com a celulose insolúvel o processo de hidrólise era limitado.<sup>85,86</sup> Segundo este modelo, o microrganismo seria capaz de

secretar constantemente enzimas hidrolíticas em baixas concentrações. Tais enzimas degradariam os polissacarídeos em moléculas menores, as quais entrariam na célula provocando indução transcricional de determinados genes para enzimas celulolíticas.<sup>87</sup> Essa hipótese excluiria a possibilidade de existência de um receptor para o reconhecimento dos substratos na membrana plasmática. No entanto, estudos mais recentes têm mostrado outra via de sinalização hipotética.<sup>88</sup> A sugestão da existência de uma proteína receptora (sensora) situada na membrana plasmática da linhagem *T. reesei*, possivelmente acoplada a uma via de sinalização celular específica que intensificaria a produção de algumas enzimas e induziria a síntese de outras vem em contraponto à primeira hipótese.<sup>89,90</sup>

Um grande desafio da biologia está no entendimento da expressão, função e regulação do grupo de proteínas codificadas nos genomas fúngicos, o que forneceria importantes informações sobre mecanismos de colonização fúngica, interação fungo-planta, patogênese e adaptação ecológica.<sup>91</sup> Para melhor entendimento desses mecanismos, o uso de estratégias pós-genômicas, incluindo a proteômica faz-se necessário.<sup>88</sup> A análise sistemática do proteoma trata-se do conjunto de proteínas expressas por um determinado genoma, célula ou tecido em uma condição específica. A proteômica permite o entendimento de algumas respostas através da identificação e quantificação do número de proteínas que influenciam diretamente a bioquímica celular, além de prover uma análise do estado celular que podem ocorrer por mudanças durante o crescimento e/ou desenvolvimento ou resposta a fatores ambientais, mostrando-se útil no estudo de sistemas biológicos altamente dinâmicos e complexos.<sup>92,93</sup> Devido à alta complexidade dos proteomas, uma estratégia comumente adotada é o estudo das frações específicas do proteoma total, ou seja, sub-proteomas que incluem sub-proteomas de organelas (mitocôndria e núcleo), glicoproteomas (proteínas glicosiladas), fosfoproteomas (proteínas fosforiladas) e secretoma (proteínas e/ou enzimas secretadas por um organismo).<sup>94</sup>

A secreção de proteínas produzidas por fungos filamentosos é de extrema importância na nutrição dos mesmos e algumas dessas enzimas secretadas recebem atenção pelo potencial industrial que possuem, estimulando pesquisas relacionadas à genética e mecanismos de secreção, como é o caso das enzimas celulolíticas. A análise do secretoma, definido como o conjunto de enzimas e demais proteínas secretadas por um determinado tipo celular, por um conjunto de células ou organismo,<sup>95</sup> juntamente com o entendimento da maquinaria responsável pela secreção destas proteínas, são indispensáveis para conhecer a identidade e função do arsenal de enzimas hidrolíticas extracelulares que participam na degradação de compostos lignocelulósicos e outros biopolímeros em resposta à adaptação a diferentes fontes de carbono e nitrogênio visando uma aplicação biotecnológica.<sup>96</sup>

O aperfeiçoamento das técnicas de análise de separação e caracterização de proteínas, combinada com avanços de espectrometria de massas (MS – mass spectrometry), tem permitido aumentar o conhecimento sobre as vias de secreção e a expressão diferencial de proteínas de fungos filamentosos com relevância biotecnológica em relação às variáveis ambientais.<sup>97</sup> Além disso, estudos do secretoma estão sendo direcionados não somente para o entendimento do papel dos fungos filamentosos na natureza, mas também para contribuir para viabilizar o uso desses microorganismos como maquinarias celulares capazes de secretar quantidades consideráveis de proteínas. No caso de fungos celulolíticos, o foco é na identificação de glicosil hidrolases e componentes acessórios envolvidos na degradação de polissacarídeos da parede celular de plantas.<sup>98</sup>

Recentemente, a correlação entre a produção de enzimas versus fonte indutora de carbono tem sido amplamente estudada para identificar o efeito dos substratos na produção enzimática de celulases. De forma geral, pode-se considerar que a produção de diferentes tipos

de enzimas celulolíticas secretadas por fungos filamentosos é consequência da fonte indutora de carbono presente no meio de cultura, tais como lactose, sorbose, D-galactose, sacarose, celulose, entre outras.<sup>99-105</sup> Estudo realizado com o fungo *Aspergillus flavus* utilizando diferentes fontes de carbono (glicose, batata dextrose e rutina) para a produção de enzimas demonstraram proteínas secretadas diferencialmente. Para esse estudo foram encontradas proteínas comuns aos três meios, duas proteínas únicas para o meio de batata, 10 para o meio contendo apenas glicose e 18 proteínas no meio com rutina.<sup>106</sup>

O secretoma de diferentes espécies de fungos filamentosos de interesse industrial tem sido investigado nos últimos anos, como é o caso da linhagem amplamente conhecida como a mais eficiente produtora de celulases, *T. reesei*.<sup>107</sup> Estudos do proteoma envolvendo esse fungo tem explorado diferentes fontes de carbono,<sup>104</sup> diferentes pHs,<sup>108</sup> diferentes características morfológicas,<sup>109</sup> entre outros. A composição proteica do secretoma produzido pela linhagem industrial *T. reesei* CL847 cultivada em meio de cultura para a produção de celulases e hemicelulases foi explorada e posteriormente comparada com a linhagem superprodutora de celulases *T. reesei* Rut C30.<sup>110</sup> Foram identificadas 22 proteínas potencialmente envolvidas na degradação da biomassa na linhagem *T. reesei* CL847. A maior diversidade observada no secretoma da linhagem CL847 sugere que este fungo pode ser um hipersecretor mais geral de enzimas, enquanto que linhagem *T. reesei* Rut C30 pode ter a produção mais orientada para as celulases.<sup>110</sup>

A comparação do secretoma da linhagem mutante *T. reesei* Rut C30 e a selvagem *T. reesei* QM6a cultivados em meio de cultura contendo celulose, serragem e palha de trigo mostrou que as enzimas lignocelulolíticas no secretoma de ambas as linhagens são dependentes da fonte de carbono.<sup>111</sup> A classificação funcional destas proteínas quantificadas revelou 31% de celulases, 18% de hemicelulases, 13% de proteínas de degradação de lignina, 22% de peptidases, 6% de quitinases e fosfatases, 3% de proteínas de transporte e 6% de proteínas hipotéticas. O sequenciamento do genoma da linhagem selvagem *T. reesei* QM6a realizado em 2008<sup>19</sup> tem facilitado os estudos de sistemas biológicos deste fungo. Verificou-se que *T. reesei* possui relativamente menos genes que codificam enzimas lignocelulolíticas do que muitos outros fungos sequenciados, com exceção de algumas hemicelulases.<sup>88</sup>

A linhagem *A. niger* também tem sido alvo de diversos estudos secretômicos, pois sabe-se da sua capacidade como produtor de metabólitos primários e de enzimas lignocelulolíticas.<sup>101</sup> Estudos empregando diferentes fontes de carbono têm sido realizados para este fungo, a fim de induzir a produção de pectinases,<sup>112</sup> celulases e xilanases.<sup>113-115</sup> A utilização de xilose e/ou maltose como fonte de carbono afetou fortemente a composição do secretoma do *A. niger*, com uma menor influência na composição do proteoma intracelular.<sup>101</sup> Esses autores observaram que a composição do proteoma extracelular foi completamente diferente para ambas as culturas realizadas tanto em frascos agitados como em biorreator. *A. niger* cultivado em xilose secretou principalmente hidrolases envolvidas na degradação de polímeros da parede celular vegetal, enquanto o secretoma do *A. niger* cultivado em maltose foi dominado por glicoamilases, assim como as enzimas envolvidas na remoção das espécies reativas de oxigênio foram mais abundantes no proteoma extracelular.<sup>101</sup>

Estudos de análises de secretoma utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono para a produção de enzimas lignocelulolíticas são recentes, mas têm avançado rapidamente,<sup>23,26,48,98,111,116-122</sup> A primeira análise global transcricional descrita usando bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEX) e a linhagem *A. niger* foi reportada em 2011.<sup>23</sup> Os estudos revelaram genes que são especificamente induzidos quando o BEX é usado como fonte de carbono. A degradação do BEX requer a produção de diferentes enzimas que

são reguladas pelo tipo e complexidade do substrato disponível. Isto é essencial para compreender quais os genes que codificam enzimas hidrolíticas são induzidos na presença de bagaço de cana, já que a intenção foi produzir coquetéis enzimáticos para hidrolisar esta biomassa pré-tratada. Segundo este estudo foram identificadas 18 celulases e 21 hemicelulases, que representam 58% das enzimas preditas de *A. niger*.

Várias diferenças na regulação da produção de glicosil hidrolases entre os fungos *A. niger* e *T. reesei* já foram descritos,<sup>123-125</sup> sendo que estudos comparativos podem proporcionar uma visão mais abrangente de como essas importantes espécies industriais produzem as enzimas hidrolíticas. Borin *et al.*<sup>26</sup> realizaram uma análise comparativa do secretoma das linhagens *A. niger* e *T. reesei* cultivadas na biomassa da cana-de-açúcar com dois níveis de complexidade diferentes, colmo “*in natura*” e bagaço pré-tratado por explosão a vapor. A produção das enzimas foi monitorada por 24 h e foi observado que ambas as linhagens são capazes de hidrolisar os polissacarídeos da parede celular da cana desde as 6 h pós-inoculação. O fungo *A. niger* produziu mais enzimas do que *T. reesei* em todos os períodos avaliados, qualitativa e quantitativamente. Entretanto, as enzimas mais importantes relacionadas à degradação da biomassa, incluindo celobiohidrolases, endoglucanases,  $\beta$ -glicosidases,  $\beta$ -xilosidases, endoxilanasas, xiloglucanases e  $\alpha$ -arabinofuranosidases foram identificadas em ambos os secretomas. A diferença no mecanismo de degradação da biomassa entre as linhagens *A. niger* e *T. reesei* sugerem que uma combinação das enzimas a partir das duas espécies pode ser uma opção interessante para aumentar a eficiência da sacarificação.<sup>26</sup>

A combinação dos coquetéis enzimáticos das duas linhagens, *A. niger* e *T. reesei*, produzidos por FSm e FSeq foi aplicada no processo de hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEX), em um estudo realizado por Florenco *et al.*<sup>14</sup> A análise do secretoma foi utilizada como ferramenta para um melhor entendimento dos resultados obtidos no processo de hidrólise enzimática, em que a combinação dos coquetéis produzidos por FSeq foi 3 vezes mais eficiente do que aqueles produzidos por FSm. As maiores atividades enzimáticas e/ou um melhor equilíbrio na composição do secretoma obtido na FSeq proporcionou uma hidrólise enzimática mais eficiente do BEX.<sup>14</sup>

Assim, estudos sobre o secretoma dos fungos filamentosos podem contribuir na produção dos coquetéis enzimáticos e no entendimento como esses influenciam a sacarificação da biomassa lignocelulósica. Além disso, a obtenção de coquetéis enzimáticos mais específicos para degradação de cada biomassa em particular pode contribuir para a redução da quantidade de enzimas necessárias no processo de conversão. A possibilidade de obtenção de enzimas com características diferenciadas como maior estabilidade e menor suscetibilidade à adsorção improdutiva à lignina também são estratégias potenciais para a redução da carga de enzimas e aumento da eficiência de sacarificação.

## DESAFIOS TECNOLÓGICOS DA APLICAÇÃO DOS COQUETÉIS ENZIMÁTICOS NA SACARIFICAÇÃO DE BIOMASSAS

O desenvolvimento da tecnologia de produção de etanol 2G apresenta ainda desafios a serem superados, pois diferentemente do etanol de primeira geração são necessárias etapas adicionais de processamento para a obtenção de açúcares fermentescíveis que serão convertidos a etanol. Como citado anteriormente, o pré-tratamento é uma das etapas críticas desse processo<sup>27,28,126</sup> e a escolha do tipo de tecnologia e condições de processo irão impactar diretamente as etapas subsequentes. O processamento de altas cargas de sólidos na etapa de hidrólise enzimática é também outro desafio tecnológico,<sup>127</sup> pois para viabilizar o processo torna-se necessário que altas cargas de

sólidos ( $\geq 20\%$  m/v) sejam processadas para disponibilizar quantidade de açúcares que após a etapa de fermentação, possa gerar um caldo com teor suficiente de etanol que viabilize a etapa de destilação.<sup>128-131</sup> Além dos desafios do ponto de vista de engenharia de processo, como as dificuldades de bombeamento e agitação de altas cargas de sólidos, soma-se a presença de contaminantes das reações bioquímicas que podem impactar de forma negativa tanto a eficiência da hidrólise enzimática, quanto a fermentação alcoólica. Tais contaminantes, também chamados de inibidores, em conjunto com a lignina residual, irão impactar um ponto crítico e determinante no custo final do etanol 2G: a quantidade de enzimas necessárias para converter a celulose em glicose.<sup>132-134</sup> Os inibidores podem ser classificados de acordo com a estrutura química de cada um deles, como ácidos orgânicos, furanos, oligossacarídeos, xilooligomeros e compostos fenólicos,<sup>135,136</sup> sendo os fenóis originados da decomposição da lignina os principais inibidores da hidrólise da celulose e da celobiose.<sup>137</sup>

A presença da lignina confere ao material lignocelulósico uma limitação física à sacarificação enzimática da celulose, diminuindo a acessibilidade das enzimas hidrolíticas às fibras celulósicas.<sup>29</sup> Vários trabalhos têm buscado tratamentos que visem remover esse componente, atingindo dessa forma maiores valores de conversão de hidrólise.<sup>138-141</sup> A remoção da lignina gera poros no material, aumentando a área acessível as enzimas celulolíticas.<sup>142</sup> A correlação positiva entre o aumento da porosidade do bagaço e rendimentos de hidrólise da celulose foi mostrada em estudo com a deslignificação do bagaço de cana não tratado, confirmando a importância da limitação da acessibilidade causada pela lignina na ineficiência da sacarificação.<sup>142</sup> No entanto, a remoção da lignina apresenta algumas desvantagens como o aumento de etapas no processo, alto custo de instalação de equipamentos, limitação da capacidade de deslignificação, entre outras.<sup>143</sup> Estratégias para a redução do teor de lignina na própria planta precisam ser desenvolvidas, porém sem alterar o desenvolvimento da planta ou causar efeitos indesejáveis, sendo que a maior limitação para o processo de redução da lignina seria a falta de especificidade do tecido exibida em abordagens clássicas de modificação da lignina.<sup>144</sup>

Alguns tipos de pré-tratamentos com ácido diluído,<sup>145,146</sup> por explosão a vapor,<sup>147,148</sup> organosolv,<sup>149</sup> hidrotérmico,<sup>150,151</sup> entre outros, promovem a realocação e/ou a remoção de parte da lignina da parede celular, garantindo maiores valores de conversão.<sup>152-155</sup> Além disso, tais processos também podem atuar aumentando a exposição da lignina, além de modificar a sua estrutura. Estudos recentes têm mostrado que o pré-tratamento hidrotérmico modifica a estrutura da lignina para uma forma mais condensada e heterogênea, que seria mais prejudicial à hidrólise enzimática do que a lignina original devido ao favorecimento da adsorção improdutiva das enzimas.<sup>156</sup>

### Adsorção improdutiva de enzimas na lignina

A hidrólise enzimática da celulose acontece de forma heterogênea e as interações entre enzima/substrato são geralmente não-covalentes, sendo que as forças motrizes envolvem principalmente interações hidrofóbicas e eletrostáticas repulsivas e atrativas, com menor contribuição das interações de hidrogênio e dipolo.<sup>157,158</sup> As interações hidrofóbicas frequentemente dominam a adsorção da enzima na celulose, porém as enzimas podem se ligar a outras superfícies, como a lignina.<sup>159</sup> Esse efeito tem sido observado em diversos materiais lignocelulósicos submetidos a diferentes tipos de pré-tratamentos e tem sido considerado um importante efeito negativo da presença da lignina residual,<sup>29,32,128,151,156,160-163</sup> prejudicial para a economia do processo de sacarificação.

Por ser uma molécula poliaromática, os grupos funcionais da lignina exercem influência na adsorção improdutiva, pois podem

ligar-se às enzimas por pareamento de anéis e outras interações hidrofóbicas.<sup>164</sup> Durante o pré-tratamento, modificações químicas da lignina podem alterar sua afinidade por proteínas, o que resultam no aumento de hidroxilas fenólicas que podem aumentar a capacidade adsorviva da lignina residual.<sup>165,166</sup> Por outro lado, são gerados materiais menos susceptíveis a inibição quando o pré-tratamento aumenta a hidrofobicidade da lignina, principalmente pela introdução de grupos ácidos.<sup>167,168</sup> Lignina de diferentes materiais lignocelulósicos também apresentam diferentes capacidades adsorvivas, além das diferenças devido ao tipo de pré-tratamento. As ligninas de algumas biomassas como a palha de milho, por exemplo, adsorvem menos celulases que a lignina de madeiras, tanto de coníferas quanto de folhosas.<sup>162</sup>

A adsorção improdutiva não depende apenas dos grupos funcionais das ligninas, mas também das propriedades das enzimas, como ponto isoelétrico e superfície hidrofóbica.<sup>32,169,170</sup> Estudos realizados com celulases produzidas por *T. reesei* mostraram que estas enzimas possuem resíduos de aminoácidos hidrofóbicos expostos em sua superfície, capazes de interagir com a superfície hidrofóbica da lignina, causando adsorção improdutiva das celulases com desativação das mesmas, reduzindo a eficiência do processo catalítico.<sup>29,171</sup> Segundo estudos realizados por Ko *et al.*,<sup>32</sup> as enzimas produzidas por *T. reesei* e *A. niger* exibem comportamentos diferentes na adsorção pela lignina, sendo que a  $\beta$ -glicosidase de *A. niger* exibe menos adsorção que a  $\beta$ -glicosidase produzida pela linhagem *T. reesei*. Os domínios de ligação a carboidratos (CBMs – carbohydrate binding modules) encontrados em algumas celulases, também exercem influência na adsorção improdutiva,<sup>172</sup> devido à presença de três resíduos de tirosina alinhados (Y5, Y31, Y32), importantes para o pareamento de anéis de interação CBM-celulose,<sup>164</sup> uma vez que tem sido observado aumento na adsorção improdutiva pela presença de CBM.

A maior parte dos estudos de adsorção são realizados em baixas temperaturas (0 a 10 °C), para evitar modificações estruturais nos substratos devido a hidrólise, além de evitar a inativação térmica das enzimas. Nessas temperaturas, as enzimas que são adsorvidas na lignina podem ser recuperadas, com perda mínima na atividade catalítica. Porém, em temperaturas típicas de hidrólise (acima de 45 °C), as interações proteínas-lignina são intensificadas e as enzimas perdem a suas estruturas nativas, sofrem desnaturação e ligam-se irreversivelmente à lignina.<sup>161</sup>

Tentativas para minimizar o efeito negativo da adsorção improdutiva de enzimas sugerem a adição de uma quantidade relativamente alta de enzimas ao processo de sacarificação, pois a adsorção improdutiva é um fenômeno dependente da concentração<sup>147,162</sup> e a superfície disponível para a interação diminui à medida que a concentração de proteínas aumenta. No entanto, essa estratégia não é economicamente viável para aplicação em processo de larga escala. Outra alternativa de contornar esse efeito negativo é pelo uso de aditivos e/ou agentes bloqueadores de lignina (proteínas não-catalíticas, surfactantes, polímeros) na hidrólise enzimática com o intuito de melhorar o rendimento do processo.<sup>173</sup> A Tabela 1 traz os principais trabalhos e tipos de aditivos que vêm sendo utilizados na etapa da sacarificação da biomassa para aumentar a eficiência da reação de hidrólise enzimática.

Vários estudos reportam a adição de outras proteínas, como a albumina sérica bovina (BSA), antes da adição das celulases.<sup>32,156,175,180,201</sup> A proteína BSA possui uma elevada hidrofobicidade superficial, o que contribui para a sua adsorção preferencial na lignina, pois o bloqueio dos sítios de adsorção da lignina ocorre não só pelo efeito da concentração de proteínas, mas também devido às suas propriedades químicas.<sup>170,202</sup> No entanto, o uso da proteína BSA se mostra proibitivo em processos de larga escala devido ao custo dessa proteína. Em estudo recente, Florencio *et al.*<sup>173</sup> fizeram uso da proteína de soja como aditivo alternativo na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor, uma vez que a proteína de soja é considerada

uma das proteínas de menor custo disponíveis comercialmente.<sup>3</sup> O efeito dos coquetéis enzimáticos produzidos por *A. niger* e *T. reesei* sob diferentes métodos de cultivo (FES, FSm e FSeq) foi investigado durante o processo de sacarificação. A adição da proteína de soja no processo conduziu a um aumento de aproximadamente 2 vezes na conversão da hidrólise de celulose em relação ao ensaio controle sem adição de proteína de soja, tanto para o coquetel enzimático de *A. niger* quanto para o de *T. reesei*. Os resultados levaram à conclusão de que a proteína de soja é um potencial aditivo alternativo de menor custo para ser utilizado no processo de conversão da biomassa.<sup>173</sup>

O efeito da adsorção improdutiva também pode ser diminuído pela adição de polímeros, como o polietileno glicol (PEG). Existem algumas explicações possíveis desse efeito que incluem a capacidade do PEG de aumentar a estabilidade das celulases, diminuir a adsorção não-produtiva de celulases e aumentar a desorção de enzimas adsorvidas.<sup>31,174,203,204</sup> A adição de PEG na etapa de hidrólise enzimática de biomassas lignocelulósicas pré-tratadas por explosão a vapor (pinho, salgueiro, palha de trigo, palha de milho, bagaço de sorgo) mostrou ser benéfica para o aumento das celulases livres no sobrenadante da hidrólise.<sup>187</sup> Os resultados sugerem que o diferente grau de aumento na atividade das celulases livres obtidos pela adição do PEG é baseado nas distintas estruturas de lignina presentes em cada substrato. Os autores concluíram que os grupos hidroxil fenólicos expostos na superfície da lignina interagem com o PEG por meio de ligações de hidrogênio, formando uma camada de PEG na superfície da lignina, o que impede a ligação improdutiva das celulases na lignina. Em contraponto, estudos recentes apresentaram resultados interessantes quanto ao efeito da adição de PEG durante o processo de hidrólise do Avicel, celulose pura e cristalina, pelas enzimas endoglucanase, produzida a partir da linhagem *Talaromyces emersonii*, e celobiohidrolase I de *Trichoderma longibrachiatum*.<sup>184</sup> Segundo os autores, o efeito positivo sobre o rendimento da hidrólise parece ser específico para a enzima celobiohidrolase I,<sup>184</sup> visto que não há presença da lignina nesse material.

A adição de surfactantes não-iônicos também tem sido base de estudos para diminuir o efeito negativo da adsorção improdutiva e consequentemente melhorar o rendimento da hidrólise. As presenças de Tween 20 e Tween 80 podem eliminar a desativação enzimática atribuída à lignina, devido à exclusão das enzimas da superfície da lignina, além da atuação na desorção das celulases dos substratos durante a sacarificação, o que aumenta o rendimento da mesma.<sup>192,198,199,205</sup> O estudo do efeito da adição de Tween 80 na hidrólise da palha de milho realizada por enzimas comerciais permitiu compreender melhor o papel da lignina na redução da adsorção das celulases sobre o substrato, em parte devido à adsorção do surfactante que ocupava a superfície hidrofóbica da lignina da palha de milho.<sup>206</sup>

Em resumo, o uso de aditivos mais comumente encontrados na literatura (proteínas não catalíticas, polímeros e surfactantes não-iônicos), assim como a proteína de soja, que vem sendo testada como uma alternativa mais econômica, é significativamente eficaz e reduz a adsorção improdutiva das enzimas do complexo celulolítico sobre a lignina, além de proteger as enzimas da desnaturação térmica durante o processo de hidrólise.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta revisão foram abordadas estratégias de cultivo para melhorar a produção *on-site* de enzimas celulolíticas como forma de diminuir o custo dos biocatalisadores no processo de etanol 2G, apresentando as vantagens e deficiências do uso de cada processo para a produção de enzimas fúngicas que atuam na bioconversão de resíduos lignocelulósicos. O sinergismo entre as enzimas fúngicas também tem sido reconhecido como uma estratégia eficaz para o

**Tabela 1.** Aditivos usados na hidrólise enzimática de substratos celulósicos e lignocelulósicos

Aditivo	Tipo	Substrato	Referência
BSA	Proteínas Não Catalíticas	Palha de trigo pré tratada	Kristensen <i>et al.</i> <sup>174</sup>
		Palha de milho pré tratada	Yang & Wyman <sup>175</sup>
		Azevém perene pré tratado	Zheng <i>et al.</i> <sup>176</sup>
		Palha de milho pré tratada	Kumar <i>et al.</i> <sup>177</sup>
		Celulose Microcristalina - Avicel	Ouyang <i>et al.</i> <sup>178</sup>
		Palha de milho pré tratada e Avicel	Brethauer <i>et al.</i> <sup>179</sup>
		Papel filtro (Whatman n°1)	Wang <i>et al.</i> <sup>180</sup>
		Palha de milho pré tratada	Ge <i>et al.</i> <sup>181</sup>
		Lascas de madeira mista	Ko <i>et al.</i> <sup>32</sup>
		Palha de arroz	Hui <i>et al.</i> <sup>182</sup>
		Palha de arroz pré tratada	Wang <i>et al.</i> <sup>183</sup>
Extrato de levedura	Polímeros	Celulose Microcristalina - Avicel	Ouyang <i>et al.</i> <sup>178</sup>
		Palha de arroz pré tratada	Hui <i>et al.</i> <sup>182</sup>
Peptona	Polímeros	Celulose Microcristalina - Avicel	Ouyang <i>et al.</i> <sup>178</sup>
		Palha de arroz	Hui <i>et al.</i> <sup>182</sup>
Proteína de soja	Polímeros	Bagaço de cana pré tratado	Florencio <i>et al.</i> <sup>173</sup>
PEG 400 e 1500	Polímeros	Celulose Microcristalina - Avicel	Hsieh <i>et al.</i> <sup>184</sup>
PEG 1000	Polímeros	Papel filtro (Whatman n°1)	Lou <i>et al.</i> <sup>185</sup>
PEG 3000	Polímeros	Palha de trigo pré tratada	Cannella e Jorgensen <sup>186</sup>
PEG 4000	Polímeros	Spruce pré tratado a vapor	Börjesson <i>et al.</i> <sup>31</sup>
		Spruce pré tratado a vapor	Sipos <i>et al.</i> <sup>33</sup>
		Spruce, Palha de milho e de trigo, bagaço de sorgo	Sipos <i>et al.</i> <sup>187</sup>
		Bagaço de cana pré tratado	Nasirpour <i>et al.</i> <sup>28</sup>
		Papel filtro e celulose microcristalina	Zhou <i>et al.</i> <sup>188</sup>
		Palha de milho pré tratada	Kumar <i>et al.</i> <sup>177</sup>
PEG 6000	Polímeros	Palha de milho pré tratada	Kumar <i>et al.</i> <sup>177</sup>
PEG 8000	Polímeros	Palha de trigo pré tratada	Monschein <i>et al.</i> <sup>189</sup>
PEG 3000 a 8000	Polímeros	Celulose Microcristalina - Avicel	Hsieh <i>et al.</i> <sup>184</sup>
PEG 2000 e 6000	Polímeros	Palha de milho pré tratada	Ge <i>et al.</i> <sup>181</sup>
		Xilana, Palha de milho e trigo	Li <i>et al.</i> <sup>190</sup>
		Palha de trigo pré tratada	Kristensen <i>et al.</i> <sup>174</sup>
PEG 2000 a 8000	Polímeros	Celulose Microcristalina - Avicel	Ouyang <i>et al.</i> <sup>178</sup>
PEG 2000 a 10000	Polímeros	Avicel, Palha de milho, bagaço da polpa de sulfito	Zhang <i>et al.</i> <sup>191</sup>
Triton x-100 e x114	Surfactantes	Spruce pré tratado a vapor	Eriksson <i>et al.</i> <sup>192</sup>
		Papel filtro e celulose microcristalina	Zhou <i>et al.</i> <sup>188</sup>
Tween 20	Surfactantes	Spruce pré tratado a vapor	Alkaswari <i>et al.</i> <sup>193</sup>
		Spruce pré tratado a vapor	Eriksson <i>et al.</i> <sup>192</sup>
		Azevém perene pré tratado	Zheng <i>et al.</i> <sup>176</sup>
		Palha de milho pré tratada	Kumar <i>et al.</i> <sup>177</sup>
		Celulose Microcristalina - Avicel	Ouyang <i>et al.</i> <sup>178</sup>
		Lascas de madeira de pinho pré tratado	Seo <i>et al.</i> <sup>194</sup>
Tween 80	Surfactantes	<i>Populus sp</i> pré tratado por explosão a vapor	Ballesteros <i>et al.</i> <sup>195</sup>
		Spruce pré tratado a vapor	Eriksson <i>et al.</i> <sup>192</sup>
		Azevém perene pré tratado	Zheng <i>et al.</i> <sup>176</sup>
		<i>Pinus contorts</i> pré tratado por explosão a vapor	Tu & Saddler <sup>196</sup>
		Papel filtro (Whatman n°1)	Yang <i>et al.</i> <sup>197</sup>
		Papel filtro (N°2 Advantec Toyo)	Okino <i>et al.</i> <sup>198</sup>
		Palha de milho pré tratada	Ge <i>et al.</i> <sup>181</sup>
		Bagaço de cana pré tratado	Nasirpour <i>et al.</i> <sup>28</sup>
		Caniço d'água ( <i>P. australis</i> )	Jin <i>et al.</i> <sup>199</sup>
Palha de milho pré tratada	Li <i>et al.</i> <sup>200</sup>		
Tween 20 e 80	Surfactantes	Xilana, Palha de milho e trigo	Li <i>et al.</i> <sup>190</sup>
		Papel filtro e celulose microcristalina	Zhou <i>et al.</i> <sup>188</sup>

BSA: Bovine Serum Albumin; PEG; Polietileno Glicol; P. N-C: Proteína Não-Catalítica; Pol.: Polímero; S: Surfactante.



desenvolvimento de bioprodutos a partir da biomassa lignocelulósica. Nesse sentido, o uso mais extensivo de tecnologias ômicas fúngicas, incluindo genômica, proteoma e secretoma são considerados estrategicamente importantes para uma melhor compreensão dos papéis individuais e interativos das glicosil-hidrolases, das carboidratos-esterases, das ligninases e das proteínas auxiliares fúngicas na degradação da lignocelulose e na produção e valorização dos subprodutos. E além da questão relacionada ao custo e características das enzimas, destaca-se que os desafios atuais para a implantação do processo de conversão da biomassa em larga escala estão diretamente relacionados à necessidade de minimizar a adsorção improdutiva das enzimas na lignina, visando aumentar a eficiência da etapa de hidrólise enzimática e, conseqüentemente, a redução do custo no processo global para a que seja possível viabilizar a produção sustentável do etanol 2G a partir de recursos renováveis.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências de fomento Capes, CNPq (Proc. 401182/2014-2) e FAPESP-BIOEN (Processos 2014/19000-3 e 2016/10636-8) pelo apoio financeiro. Os autores também são gratos à colaboração do Dr. Eduardo Ximenes e Dr. Michael Ladisch (LORRE, Purdue University).

## REFERÊNCIAS

- Morales, M.; Quintero, J.; Conejeros, R.; Aroca, G.; *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2015**, *42*, 1349.
- Pereira, S. C.; Maehara, L.; Machado, C. M. M.; Farinas, C. S.; *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*, 1.
- Klein-Marcuschamer, D.; Oleskowicz-Popiel, P.; Simmons, B. A.; Blanch, H. W.; *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 1083.
- Johnson, E.; *Biotechnol. Bioeng.* **2016**, *10*, 164.
- Liu, G.; Zhang, J.; Bao, J.; *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2016**, *39*, 133.
- Chandel, A. K.; da Silva, S. S.; Carvalho, W.; Singh, O. V.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2012**, *87*, 11.
- Cunha, F. M.; Esperanca, M. N.; Zangirolami, T. C.; Badino, A. C.; Farinas, C. S.; *Bioresour. Technol.* **2012**, *112*, 270.
- Delabona, P. D.; Farinas, C. S.; da Silva, M. R.; Azzoni, S. F.; Pradella, J. G. D.; *Bioresour. Technol.* **2012**, *107*, 517.
- Cunha, F. M.; Esperança, M. N.; Florencio, C.; Vasconcellos, V. M.; Farinas, C. S.; Badino, A. C.; *Biochem. Eng. J.* **2015**, *97*, 32.
- Florencio, C.; Cunha, F. M.; Badino, A. C.; Farinas, C. S.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, *175*, 1389.
- Johnson, E.; *Biotechnol. Bioeng.* **2016**, *10*, 164.
- Singhania, R. R.; Sukumaran, R. K.; Patel, A. K.; Larroche, C.; Pandey, A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46*, 541.
- Vasconcellos, V. M.; Tardioli, P. W.; Giordano, R. L. C.; Farinas, C. S.; *Process Biochem.* **2015**, *50*, 1701.
- Florencio, C.; Cunha, F. M.; Badino, A. C.; Farinas, C. S.; Ximenes, E.; Ladisch, M. R.; *Enzyme Microb. Technol.* **2016**, *90*, 53.
- Florencio, C.; Cunha, F. M.; Badino, A. C.; Farinas, C. S.; Ximenes, E.; Ladisch, M. R.; *Data in Brief* **2016**, *8*, 588.
- Cunha, F. M.; Vasconcellos, V. M.; Florencio, C.; Badino, A. C.; Farinas, C. S.; *Waste Biomass Valorization* **2017**, *8*, 517.
- Gusakov, A. V.; *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 419.
- Jourdier, E.; Cohen, C.; Poughon, L.; Larroche, C.; Monot, F.; Ben Chaabane, F.; *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*.
- Martinez, D.; Berka, R. M.; Henrissat, B.; Saloheimo, M.; Arvas, M.; Baker, S. E.; Chapman, J.; Chertkov, O.; Coutinho, P. M.; Cullen, D.; Danchin, E. G. J.; Grigoriev, I. V.; Harris, P.; Jackson, M.; Kubicek, C. P.; Han, C. S.; Ho, I.; Larrondo, L. F.; de Leon, A. L.; Magnuson, J. K.; Merino, S.; Misra, M.; Nelson, B.; Putnam, N.; Robbertse, B.; Salamov, A. A.; Schmoll, M.; Terry, A.; Thayer, N.; Westerholm-Parvinen, A.; Schoch, C. L.; Yao, J.; Barabote, R.; Nelson, M. A.; Detter, C.; Bruce, D.; Kuske, C. R.; Xie, G.; Richardson, P.; Rokhsar, D. S.; Lucas, S. M.; Rubin, E. M.; Dunn-Coleman, N.; Ward, M.; Brettin, T. S.; *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1193.
- Castro, L. d. S.; Pedersoli, W. R.; Antonio, A. C. C.; Steindorff, A. S.; Silva-Rocha, R.; Martinez-Rossi, N. M.; Rossi, A.; Brown, N. A.; Goldman, G. H.; Faa, V. M.; Persinoti, G. F.; Silva, R. N.; *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*.
- Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; *Curr. Sci.* **1999**, *77*, 149.
- de Vries, R. P.; Visser, J.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, *65*, 497.
- Souza, W. R.; Gouvea, P. F.; Savoldi, M.; Malavazi, I.; Bernardes, L. A. D.; Goldman, M. H. S.; de Vries, R. P.; Oliveira, J. V. D.; Goldman, G. H.; *Biotechnol. Biofuels* **2011**, *4*, 16.
- Kang, S. W.; Park, Y. S.; Lee, J. S.; Hong, S. I.; Kim, S. W.; *Bioresour. Technol.* **2004**, *91*, 153.
- Schuster, A.; Schmoll, M.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 787.
- Borin, G. P.; Sanchez, C. C.; de Souza, A. P.; de Santana, E. S.; de Souza, A. T.; Paes Leme, A. F.; Squina, F. M.; Buckeridge, M.; Goldman, G. H.; de Castro Oliveira, J. V.; *PLoS One* **2015**, *10*, e0129275.
- Zhang, Z.; O'Hara, I. M.; Doherty, W. U. S.; *Bioresour. Technol.* **2012**, *120*, 149.
- Nasirpour, N.; Mousavi, S. M.; Shojaosadati, S. A.; *Bioresour. Technol.* **2014**, *169*, 33.
- Palonen, H.; Tjerneld, F.; Zacchi, G.; Tenkanen, M.; *J. Biotechnol.* **2004**, *107*, 65.
- Yang, B.; Willies, D. M.; Wyman, C. E.; *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *94*, 1122.
- Börjesson, J.; Engqvist, M.; Sipos, B.; Tjerneld, F.; *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 186.
- Ko, J. K.; Ximenes, E.; Kim, Y.; Ladisch, M. R.; *Biotechnol. Bioeng.* **2015**, *112*, 447.
- Sipos, B.; Dienes, D.; Schleicher, Á.; Perazzini, R.; Crestini, C.; Siika-aho, M.; Réczey, K.; *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *47*, 84.
- Valencia, E. Y.; Chambergo, F. S.; *Fungal Genet. Biol.* **2013**, *60*, 9.
- Gupta, V. K.; Kubicek, C. P.; Berrin, J.-G.; Wilson, D. W.; Couturier, M.; Berlin, A.; Filho, E. X. F.; Ezeji, T.; *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 633.
- Shallom, D.; Shoham, Y.; *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, *6*, 219.
- Zhang, Z.; Donaldson, A. A.; Ma, X.; *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 913.
- de Castro, A. M.; Pereira, N.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 181.
- Levasseur, A.; Drula, E.; Lombard, V.; Coutinho, P. M.; Henrissat, B.; *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*.
- Frandsen, K. E. H.; Simmons, T. J.; Dupree, P.; Poulsen, J. C. N.; Hemsworth, G. R.; Ciano, L.; Johnston, E. M.; Tovborg, M.; Johansen, K. S.; von Freiesleben, P.; Marmuse, L.; Fort, S.; Cottaz, S.; Driguez, H.; Henrissat, B.; Lenfant, N.; Tuna, F.; Baldansuren, A.; Davies, G. J.; Lo Leggio, L.; Walton, P. H.; *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 298.
- Rogowski, A.; Basle, A.; Farinas, C. S.; Solovyova, A.; Mortimer, J. C.; Dupree, P.; Gilbert, H. J.; Bolam, D. N.; *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 53.
- Horn, S. J.; Vaaje-Kolstad, G.; Westereng, B.; Eijsink, V. G. H.; *Biotechnol. Biofuels* **2012**, *5*.
- Zhang, Z.; Lohr, L.; Escalante, C.; Wetzstein, M.; *Energies* **2009**, *2*, 320.
- Dashtban, M.; Buchkowski, R.; Qin, W.; *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *2*, 274.
- Juhász, T.; Szengyel, Z.; Réczey, K.; Siika-Aho, M.; Viikari, L.; *Process Biochem.* **2005**, *40*, 3519.
- Delabona, P. D.; Pirota, R.; Codima, C. A.; Tremacoldi, C. R.; Rodrigues, A.; Farinas, C. S.; *Biomass Bioenergy* **2012**, *37*, 243.
- Pirota, R.; Tonelotto, M.; Delabona, P. D.; Tremacoldi, C. R.; Farinas, C. S.; *Cienc. Rural* **2015**, *45*, 1606.
- Gomez-Mendoza, D. P.; Junqueira, M.; do Vale, L. H. F.; Domont, G. B.;

- Freire Filho, E. X.; de Sousa, M. V.; Ornelas Ricart, C. A.; *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 1810.
49. Pinto Braga, C. M.; Delabona, P. d. S.; Lima, D. J. d. S.; Alvaredo Paixao, D. A.; da Cruz Pradella, J. G.; Farinas, C. S.; *Bioresour. Technol.* **2014**, *170*, 316.
50. Banerjee, G.; Scott-Craig, J. S.; Walton, J. D.; *Bioenergy Res.* **2010**, *3*, 82.
51. Wyman, C. E.; *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2001**, *221*, U119.
52. Sassner, P.; Galbe, M.; Zacchi, G.; *Biomass Bioenergy* **2008**, *32*, 422.
53. Wingren, A.; Galbe, M.; Roslander, C.; Rudolf, A.; Zacchi, G.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2005**, *121*, 485.
54. Aden, A.; Foust, T.; *Cellulose* **2009**, *16*, 535.
55. Lynd, L. R.; Laser, M. S.; Bransby, D.; Dale, B. E.; Davison, B.; Hamilton, R.; Himmel, M.; Keller, M.; McMillar, J. D.; Sheehan, J.; Wyman, C. E.; *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 169.
56. Kazi, F. K.; Fortman, J. A.; Anex, R. P.; Hsu, D. D.; Aden, A.; Dutta, A.; Kothandaraman, G.; *Fuel* **2010**, *89*, S20.
57. Merino, S. T.; Cherry, J.; *Biofuels* **2007**, *108*, 95.
58. Hong, Y.; Nizami, A.-S.; Bafrani, M. P.; Saville, B. A.; MacLean, H. L.; *Biofuels Bioprod. Biorefin.* **2013**, *7*, 303.
59. Takimura, O.; Yanagida, T.; Fujimoto, S.; Minowa, T.; *J. Jpn. Pet. Inst.* **2013**, *56*, 150.
60. Singhanian, R. R.; Patel, A. K.; Soccol, C. R.; Pandey, A.; *Biochem. Eng. J.* **2009**, *44*, 13.
61. Sanchez, S.; Demain, A. L.; *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 224.
62. Farinas, C. S.; *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2015**, *52*, 179.
63. Pandey, A.; *Process Biochem.* **1992**, *27*, 109.
64. Pandey, A.; *J. Sci. Ind. Res.* **1996**, *55*, 311.
65. Holker, U.; Hofer, M.; Lenz, J.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 175.
66. Thomas, L.; Larroche, C.; Pandey, A.; *Biochem. Eng. J.* **2013**, *81*, 146.
67. Barrios-González, J.; *Process Biochem.* **2012**, *47*, 175.
68. Holker, U.; Lenz, J.; *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, *8*, 301.
69. Delabona, P. d. S.; Perpetua Buzon Pirota, R. D.; Codima, C. A.; Tremacoldi, C. R.; Rodrigues, A.; Farinas, C. S.; *Ind. Crops Prod.* **2013**, *42*, 236.
70. Delabona, P. D.; Lima, D. J.; Robl, D.; Rabelo, S. C.; Farinas, C. S.; Pradella, J. G. D.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *43*, 617.
71. Vasconcellos, V. M.; Tardioli, P. W.; Giordano, R. L. C.; Farinas, C. S.; *New Biotechnol.* **2016**, *33*, 331.
72. Rodríguez-Zuniga, U. F.; Farinas, C. S.; Neto, V. B.; Couri, S.; Crestana, S.; *Pesqui. Agropecu. Bras.* **2011**, *46*, 912.
73. Rodríguez-Zuniga, U. F.; Couri, S.; Neto, V. B.; Crestana, S.; Farinas, C. S.; *Bioenerg. Res.* **2013**, *6*, 142.
74. Rodríguez-Zuniga, U. F.; Neto, V. B.; Couri, S.; Crestana, S.; Farinas, C. S.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *172*, 2348.
75. Renge, V. C.; Khedkar, S. V.; Nandurkar, N. R.; *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *2*, 585.
76. Mathew, G. M.; Sukumaran, R. K.; Singhanian, R. R.; Pandey, A.; *J. Sci. Ind. Res.* **2008**, *67*, 898.
77. Gamarra, N. N.; Villena, G. K.; Gutierrez-Correa, M.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 545.
78. Cherry, J. R.; Fidantsef, A. L.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 438.
79. Hansen, G. H.; Lubeck, M.; Frisvad, J. C.; Lubeck, P. S.; Andersen, B.; *Process Biochem.* **2015**, *50*, 1327.
80. Cunha, F. M.; Kreke, T.; Badino, A. C.; Farinas, C. S.; Ximenes, E.; Ladisch, M. R.; *Bioresour. Technol.* **2014**, *172*, 249.
81. Farinas, C. S.; Scarpellini, L. M.; Miranda, E. A.; Neto, V. B.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2011**, *28*, 17.
82. Delabona, P. d. S.; Farinas, C. S.; da Silva Lima, D. J.; da Cruz Pradella, J. G.; *Bioresour. Technol.* **2013**, *132*, 401.
83. Farinas, C. S.; Loyo, M. M.; Baraldo, A.; Tardioli, P. W.; Neto, V. B.; Couri, S.; *New Biotechnol.* **2010**, *27*, 810.
84. Farinas, C. S.; Vitcosque, G. L.; Fonseca, R. F.; Neto, V. B.; Couri, S.; *Ind. Crops Prod.* **2011**, *34*, 1186.
85. Messner, R.; Kubicek, C. P.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 630.
86. Merivuori, H.; Siegler, K. M.; Sands, J. A.; Montenecourt, B. S.; *Biochem. Soc. Trans.* **1985**, *13*, 411.
87. Messner, R.; Kubicekpranz, E. M.; Gsur, A.; Kubicek, C. P.; *Arch. Microbiol.* **1991**, *155*, 601.
88. Kubicek, C. P.; *J. Biotechnol.* **2013**, *163*, 133.
89. Sternberg, D.; Mandels, G. R.; *J. Bacteriol.* **1979**, *139*, 761.
90. Karaffa, L.; Fekete, E.; Gamauf, C.; Szentirmai, A.; Kubicek, C. P.; Seiboth, B.; *Microbiology* **2006**, *152*, 1507.
91. Bhadauria, V.; Popescu, L.; Zhao, W.-S.; Peng, Y.-L.; *Microbiol. Res.* **2007**, *162*, 285.
92. Bhadauria, V.; Zhao, W.-S.; Wang, L.-X.; Zhang, Y.; Liu, J.-H.; Yang, J.; Kong, L.-A.; Peng, Y.-L.; *Microbiol. Res.* **2007**, *162*, 193.
93. Chen, S.; Harmon, A. C.; *Proteomics* **2006**, *6*, 5504.
94. Kim, Y.; Nandakumar, M. P.; Marten, M. R.; *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 395.
95. Tjalsma, H.; Bolhuis, A.; Jongbloed, J. D. H.; Bron, S.; van Dijk, J. M.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *64*, 515.
96. Bouws, H.; Wattenberg, A.; Zorn, H.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *80*, 381.
97. Carberry, S.; Doyle, S.; *Cytotechnology* **2007**, *53*, 95.
98. Ribeiro, D. A.; Cota, J.; Alvarez, T. M.; Bruechli, F.; Bragato, J.; Pereira, B. M. P.; Pauletti, B. A.; Jackson, G.; Pimenta, M. T. B.; Murakami, M. T.; Camassola, M.; Ruller, R.; Dillon, A. J. P.; Pradella, J. G. C.; Paes Leme, A. F.; Squina, F. M.; *PLoS One* **2012**, *7*, e50571.
99. Jorgensen, T. R.; Goosen, T.; van den Hondel, C. A. M. J. J.; Ram, A. F. J.; Iversen, J. J. L.; *BMC Genomics* **2009**, *10*.
100. Javier Fernandez-Acero, F.; Colby, T.; Harzen, A.; Carbu, M.; Wieneke, U.; Manuel Cantoral, J.; Schmidt, J.; *Proteomics* **2010**, *10*, 2270.
101. Lu, X.; Sun, J.; Nimtz, M.; Wissing, J.; Zeng, A.-P.; Rinas, U.; *Microb. Cell Fact.* **2010**, *9*.
102. Jun, H.; Guangye, H.; Daiwen, C.; *J. Proteomics* **2013**, *89*, 191.
103. Mahajan, S.; Master, E. R.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 1903.
104. Jun, H.; Kieselbach, T.; Jonsson, L. J.; *Microb. Cell Fact.* **2011**, *10*.
105. Verbeke, J.; Coutinho, P.; Mathis, H.; Quenot, A.; Record, E.; Asther, M.; Heiss-Blanquet, S.; *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1399.
106. Medina, M. L.; Kiernan, U. A.; Francisco, W. A.; *Fungal Genet. Biol.* **2004**, *41*, 327.
107. Foreman, P. K.; Brown, D.; Dankmeyer, L.; Dean, R.; Diener, S.; Dunn-Coleman, N. S.; Goedegebuur, F.; Houfek, T. D.; England, G. J.; Kelley, A. S.; Meerman, H. J.; Mitchell, T.; Mitchinson, C.; Olivares, H. A.; Teunissen, P. J. M.; Yao, J.; Ward, M.; *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31988.
108. Adav, S. S.; Ravindran, A.; Chao, L. T.; Tan, L.; Singh, S.; Sze, S. K.; *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 4579.
109. Chao, Y.; Singh, D.; Yu, L.; Li, Z.; Chi, Z.; Chen, S.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *28*, 2635.
110. Herpoel-Gimbert, I.; Margeot, A.; Dolla, A.; Jan, G.; Molle, D.; Lignon, S.; Mathis, H.; Sigoillot, J.-C.; Monot, F.; Asther, M.; *Biotechnol. Biofuels* **2008**, *1*.
111. Adav, S. S.; Chao, L. T.; Sze, S. K.; *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11*.
112. Tsang, A.; Butler, G.; Powlowski, J.; Panisko, E. A.; Baker, S. E.; *Fungal Genet. Biol.* **2009**, *46*, S153.
113. Oliveira, J. M. P. F.; van Passel, M. W. J.; Schaap, P. J.; de Graaff, L. H.; *PLoS One* **2011**, *6*, e20865.
114. Montibeller, V. W.; Vandenberghe, L. P. D.; Amore, A.; Soccol, C. R.; Birolo, L.; Vinciguerra, R.; Salmon, D. N. X.; Spier, M. R.; Faraco, V.; *Bioresources* **2014**, *9*, 7128.
115. Ries, L.; Pullan, S. T.; Delmas, S.; Malla, S.; Blythe, M. J.; Archer, D. B.; *BMC Genomics* **2013**, *14*.
116. Adav, S. S.; Cheow, E. S. H.; Ravindran, A.; Dutta, B.; Sze, S. K.; *J. Proteomics* **2012**, *75*, 3694.

117. Delmas, S.; Pullan, S. T.; Gaddipati, S.; Kokolski, M.; Malla, S.; Blythe, M. J.; Ibbett, R.; Campbell, M.; Liddell, S.; Aboobaker, A.; Tucker, G. A.; Archer, D. B.; *PLoS Genetics* **2012**, *8*, e1002875.
118. Hakkinen, M.; Arvas, M.; Oja, M.; Aro, N.; Penttila, M.; Saloheimo, M.; Pakula, T. M.; *Microb. Cell Fact.* **2012**, *11*.
119. da Silva, A. J.; Gomez-Mendoza, D. P.; Junqueira, M.; Domont, G. B.; Ferreira, E. X.; de Sousa, M. V.; Ricart, C. A. O.; *Proteomics* **2012**, *12*, 2729.
120. Delabona, P.d.S.; Cota, J.; Hoffmam, Z. B.; Alvaredo Paixao, D. A.; Farinas, C. S.; Lourenco Franco Cairo, J. P.; Lima, D. J.; Squina, F. M.; Ruller, R.; da Cruz Pradella, J. G.; *Bioresour. Technol.* **2013**, *131*, 500.
121. Marx, I. J.; van Wyk, N.; Smit, S.; Jacobson, D.; Viljoen-Bloom, M.; Volschenk, H.; *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*.
122. Crivelente Horta, M. A.; Vicentini, R.; Delabona, P.d.S.; Laborda, P.; Crucello, A.; Freitas, S.; Kuroshu, R. M.; Polikarpov, I.; da Cruz Pradella, J. G.; Souza, A. P.; *PLoS One* **2014**, *9*, e88689.
123. Stricker, A. R.; Mach, R. L.; de Graaff, L. H.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *78*, 211.
124. Glass, N. L.; Schmoll, M.; Cate, J. H. D.; Coradetti, S.; *Annu. Rev. Microbiol.* **2013**, *67*, 477.
125. Tani, S.; Kawaguchi, T.; Kobayashi, T.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 4829.
126. Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y. Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M.; *Bioresour. Technol.* **2005**, *96*, 673.
127. Modenbach, A. A.; Nokes, S. E.; *Biomass Bioenergy* **2013**, *56*, 526.
128. Kim, Y.; Hendrickson, R.; Mosier, N. S.; Ladisch, M. R.; Bals, B.; Balan, V.; Dale, B. E.; *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 5206.
129. Hu, J.; Chandra, R.; Arantes, V.; Gourlay, K.; van Dyk, J. S.; Saddler, J. N.; *Bioresour. Technol.* **2015**, *186*, 149.
130. Ramos, L. P.; da Silva, L.; Ballem, A. C.; Pitarelo, A. P.; Chiarello, L. M.; Silveira, M. H. L.; *Bioresour. Technol.* **2015**, *175*, 195.
131. Zeng, M. J.; Mosier, N. S.; Huang, C. P.; Sherman, D. M.; Ladisch, M. R.; *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *97*, 265.
132. Kim, Y.; Ximenes, E.; Mosier, N. S.; Ladisch, M. R.; *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, *48*, 408.
133. Jonsson, L. J.; Alriksson, B.; Nilvebrant, N. O.; *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*.
134. Mhlongo, S. I.; den Haan, R.; Viljoen-Bloom, M.; van Zyl, W. H.; *Enzyme Microb. Technol.* **2015**, *81*, 16.
135. Cantarella, M.; Cantarella, L.; Gallifuoco, A.; Spera, A.; Alfani, F.; *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 200.
136. Qing, Q.; Yang, B.; Wyman, C. E.; *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 9624.
137. Ximenes, E.; Kim, Y.; Mosier, N.; Dien, B.; Ladisch, M.; *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46*, 170.
138. Ma, X. J.; Cao, S. L.; Yang, X. F.; Lin, L.; Chen, L. H.; Huang, L. L.; *Bioresour. Technol.* **2014**, *151*, 244.
139. Martinez, P. M.; Bakker, R.; Harmsen, P.; Gruppen, H.; Kabel, M.; *Ind. Crops Prod.* **2015**, *64*, 88.
140. Yan, Z. P.; Li, J. H.; Li, S. H.; Chang, S.; Cui, T.; Jiang, Y.; Cong, G. T.; Yu, M. H.; Zhang, L.; *Appl. Energy* **2015**, *160*, 641.
141. Yu, Q.; Zhuang, X. S.; Wang, W.; Qi, W.; Wang, Q.; Tan, X. S.; Kong, X. Y.; Yuan, Z. H.; *Biomass Bioenergy* **2016**, *94*, 105.
142. Santi Junior, C.; Ferreira Milagres, A. M.; Ferraz, A.; Carvalho, W.; *Cellulose* **2013**, *20*, 3165.
143. Maia, E. P.; Colodette, J. L.; *Rev. Arvore* **2003**, *27*, 217.
144. Eudes, A.; Liang, Y.; Mitra, P.; Loque, D.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *26*, 189.
145. Benjamin, Y.; Cheng, H.; Goergens, J. F.; *Ind. Crops Prod.* **2013**, *51*.
146. Benjamin, Y.; Cheng, H.; Goergens, J. F.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *172*.
147. Kumar, L.; Arantes, V.; Chandra, R.; Saddler, J.; *Bioresour. Technol.* **2012**, *103*, 201.
148. Oliveira, F. M. V.; Pinheiro, I. O.; Souto-Maior, A. M.; Martin, C.; Goncalves, A. R.; Rocha, G. J. M.; *Bioresour. Technol.* **2013**, *130*.
149. Arantes, V.; Gourlay, K.; Saddler, J. N.; *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*.
150. Kim, Y.; Mosier, N. S.; Ladisch, M. R.; *Biotechnol. Progr.* **2009**, *25*, 340.
151. Kim, Y.; Kreke, T.; Ko, J. K.; Ladisch, M. R.; *Biotechnol. Bioeng.* **2015**, *112*, 677.
152. Chang, V. S.; Holtzapple, M. T.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, *84-6*, 5.
153. Mooney, C. A.; Mansfield, S. D.; Tuohy, M. G.; Saddler, J. N.; *Biological Sciences Symposium*, San Francisco, USA, 1997.
154. Várnai, A.; Siika-aho, M.; Viikari, L.; *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46*, 185.
155. Lee, S. H.; Doherty, T. V.; Linhardt, R. J.; Dordick, J. S.; *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 1368.
156. Ko, J. K.; Kim, Y.; Ximenes, E.; Ladisch, M. R.; *Biotechnol. Bioeng.* **2015**, *112*, 252.
157. Claesson, P. M.; Blomberg, E.; Froberg, J. C.; Nylander, T.; Arnebrant, T.; *Adv. Colloid Interface Sci.* **1995**, *57*, 161.
158. Norde, W.; *Macromol. Symp.* **1996**, *103*, 5.
159. Jeoh, T.; Ishizawa, C. I.; Davis, M. F.; Himmel, M. E.; Adney, W. S.; Johnson, D. K.; *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *98*, 112.
160. Berlin, A.; Gilkes, N.; Kurabi, A.; Bura, R.; Tu, M. B.; Kilburn, D.; Saddler, J.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2005**, *121*, 163.
161. Rahikainen, J.; Mikander, S.; Marjamaa, K.; Tamminen, T.; Lappas, A.; Viikari, L.; *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*.
162. Nakagame, S.; Chandra, R. P.; Saddler, J. N.; *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *105*, 871.
163. Michelin, M.; Ximenes, E.; Teixeira de Moraes Polizeli, M. d. L.; Ladisch, M. R.; *Bioresour. Technol.* **2016**, *199*, 275.
164. Linder, M.; Mattinen, M. L.; Kontteli, M.; Lindeberg, G.; Stahlberg, J.; Drakenberg, T.; Reinikainen, T.; Pettersson, G.; Annala, A.; *Protein Sci.* **1995**, *4*, 1056.
165. Rahikainen, J. L.; Martin-Sampedro, R.; Heikkinen, H.; Rovio, S.; Marjamaa, K.; Tamminen, T.; Rojas, O. J.; Kruus, K.; *Bioresour. Technol.* **2013**, *133*, 270.
166. Yu, Z.; Gwak, K.-S.; Treasure, T.; Jameel, H.; Chang, H.-m.; Park, S.; *ChemSusChem* **2014**, *7*, 1942.
167. Lou, H.; Zhu, J. Y.; Lan, T. Q.; Lai, H.; Qiu, X.; *ChemSusChem* **2013**, *6*, 919.
168. Nakagame, S.; Chandra, R. P.; Kadla, J. F.; Saddler, J. N.; *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 4507.
169. Lai, C.; Tu, M.; Shi, Z.; Zheng, K.; Olmos, L. G.; Yu, S.; *Bioresour. Technol.* **2014**, *163*, 320.
170. Sammond, D. W.; Yarbrough, J. M.; Mansfield, E.; Bomble, Y. J.; Hobdey, S. E.; Decker, S. R.; Taylor, L. E.; Resch, M. G.; Bozell, J. J.; Himmel, M. E.; Vinzant, T. B.; Crowley, M. F.; *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 20960.
171. Reinikainen, T.; Teleman, O.; Teeri, T. T.; *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1995**, *22*, 392.
172. Rahikainen, J. L.; Evans, J. D.; Mikander, S.; Kalliola, A.; Puranen, T.; Tamminen, T.; Marjamaa, K.; Kruus, K.; *Enzyme Microb. Technol.* **2013**, *53*, 315.
173. Florencio, C.; Badino, A. C.; Farinas, C. S.; *Bioresour. Technol.* **2016**, *221*, 172.
174. Kristensen, J. B.; Borjesson, J.; Bruun, M. H.; Tjerneld, F.; Jorgensen, H.; *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 888.
175. Yang, B.; Wyman, C. E.; *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *94*, 611.
176. Zheng, Y.; Pan, Z.; Zhang, R.; Wang, D.; Jenkins, B.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2008**, *146*, 231.
177. Kumar, R.; Wyman, C. E.; *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 1544.
178. Ouyang, J.; Dong, Z.; Song, X.; Lee, X.; Chen, M.; Yong, Q.; *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 6685.
179. Brethauer, S.; Studer, M. H.; Yang, B.; Wyman, C. E.; *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 6295.

180. Wang, H.; Mochidzuki, K.; Kobayashi, S.; Hiraide, H.; Wang, X.; Cui, Z.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, *170*, 541.
181. Ge, X.; Sun, Z.; Xin, D.; Zhang, J.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *172*, 2106.
182. Hui, W.; Shinichi, K.; Kazuhiro, M.; *Bioresour. Technol.* **2015**, *190*, 373.
183. Wang, H.; Kobayashi, S.; Hiraide, H.; Cui, Z.; Mochidzuki, K.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, *175*, 287.
184. Hsieh, C.-w.C.; Cannella, D.; Jorgensen, H.; Felby, C.; Thygesen, L. G.; *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*.
185. Lou, H.; Wang, M.; Lai, H.; Lin, X.; Zhou, M.; Yang, D.; Qiu, X.; *Bioresour. Technol.* **2013**, *146*, 478.
186. Cannella, D.; Jorgensen, H.; *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111*, 59.
187. Sipos, B.; Szilagyi, M.; Sebestyen, Z.; Perazzini, R.; Dienes, D.; Jakab, E.; Crestini, C.; Reczey, K.; *C. R. Biol.* **2011**, *334*, 812.
188. Zhou, Y.; Chen, H.; Qi, F.; Zhao, X.; Liu, D.; *Bioresour. Technol.* **2015**, *182*, 136.
189. Monschein, M.; Reisinger, C.; Nidetzky, B.; *Bioresour. Technol.* **2014**, *169*, 713.
190. Li, Y.; Ge, X.; Sun, Z.; Zhang, J.; *Bioresour. Technol.* **2015**, *186*, 316.
191. Zhang, M.; Ouyang, J.; Liu, B. T.; Yu, H.; Jiang, T.; Cai, C.; Li, X.; *Bioenergy Res.* **2013**, *6*, 1252.
192. Eriksson, T.; Borjesson, J.; Tjerneld, F.; *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 353.
193. Alkasrawi, M.; Eriksson, T.; Borjesson, J.; Wingren, A.; Galbe, M.; Tjerneld, F.; Zacchi, G.; *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *33*, 71.
194. Seo, D.-J.; Fujita, H.; Sakoda, A.; *Adsorption* **2011**, *17*, 813.
195. Ballesteros, I.; Oliva, J. M.; Carrasco, J.; Cabanas, A.; Navarro, A. A.; Ballesteros, M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1998**, *70-2*, 369.
196. Tu, M.; Saddler, J. N.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *161*, 274.
197. Yang, M.; Zhang, A.; Liu, B.; Li, W.; Xing, J.; *Biochem. Eng. J.* **2011**, *56*, 125.
198. Okino, S.; Ikeo, M.; Ueno, Y.; Taneda, D.; *Bioresour. Technol.* **2013**, *142*, 535.
199. Jin, W. X.; Chen, L.; Hu, M.; Sun, D.; Li, A.; Li, Y.; Hu, Z.; Zhou, S. G.; Tu, Y. Y.; Xia, T.; Wang, Y. T.; Xie, G. S.; Li, Y. B.; Bai, B. W.; Peng, L. C.; *Appl. Energy* **2016**, *175*, 82.
200. Li, Y.; Sun, Z.; Ge, X.; Zhang, J.; *Biotechnol. Biofuels* **2016**, *9*, 1.
201. Bhagia, S.; Kumar, R.; Wyman, C. E.; *Carbohydr. Polym.* **2017**, *157*, 1940.
202. Lijnzaad, P.; Berendsen, H. J. C.; Argos, P.; *Protein: Struct., Funct., Genet.* **1996**, *25*, 389.
203. Börjesson, J.; Peterson, R.; Tjerneld, F.; *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 754.
204. Malmsten, M.; VanAlstine, J. M.; *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *177*, 502.
205. Park, J. W.; Takahata, Y.; Kajiuchi, T.; Akehata, T.; *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *39*, 117.
206. Li, Y.; Sun, Z.; Ge, X.; Zhang, J.; *Biotechnol. Biofuels* **2016**, *9*, 20.