



ENZIMAS MICROBIANAS DE DESCONSTRUÇÃO DA PAREDE CELULAR: NOVAS ABORDAGENS

Tallyta Santos Teixeira

Universidade Federal do Tocantins, Brasil
tallyta.tst@gmail.com

Félix Gonçalves de Siqueira

Universidade Federal do Tocantins, Brasil
felix.siqueira@embrapa.br

Ryhára Dias Batista

Universidade Federal do Tocantins, Brasil
ryharabatista@hotmail.com

RESUMO

Os biocombustíveis são considerados fontes de energia alternativa aos combustíveis fósseis. Tal tipo de energia é considerada sustentável por envolver benefícios no âmbito social, econômico e ambiental. Os resíduos agroindustriais e florestais podem ser reaproveitados para produção dessa fonte energética, como por exemplo, na produção de etanol de segunda geração. Porém tal processo envolve altos custos, tendo em vista o arranjo do complexo lignocelulósico da biomassa, que dificulta a liberação de açúcares fermentescíveis, obrigando o uso das etapas de pré-tratamento e hidrólise. Assim, diversos estudos estão sendo realizados a fim de otimizar a sacarificação da biomassa lignocelulósica, o que implicaria em um produto final (biocombustível) menos oneroso. Diversas enzimas são utilizadas nessa etapa, tal como as enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e lignolíticas, porém novas moléculas estão sendo descobertas para auxiliar na desconstrução da parede celular. Dentre essas novas abordagens destacam-se as monoxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) e as expansinas. Dessa forma esse artigo tem como objetivo apresentar as antigas e novas abordagens de enzimas empregadas para desconstrução da parede celular vegetal, a fim de verificar novas aplicações.

Palavras-chaves: Celulases; Hemicelulases; Ligninases; Monoxigenaseslíticas de polissacarídeos; Expansinas.

ABSTRACT

Biofuels are considered alternative energy sources to fossil fuels. This type of energy is considered sustainable because it involves benefits in social, economic and environmental context. The agro-forestry waste and can be reused for the production of this energy source, such as the second generation ethanol. However, this process involves high costs, given the complex arrangement of lignocellulosic biomass, which makes it difficult to release fermentable sugars, forcing the use of the steps of pre-treatment and hydrolysis. Many studies are being conducted to optimize saccharification of lignocellulosic biomass, which would imply a final cheaper product (biofuel). Several enzymes are used in this step as cellulolytic enzymes, and hemicelulolíticas lignolíticas, but new molecules are being discovered to assist in the deconstruction of the cell wall. Among these new approaches there are the lytic monooxygenases polysaccharides (LPMOs) and expansins. This article aims to present the old and new approaches to enzymes used for deconstruction of plant cell wall in order to check for new applications.

Keywords: Cellulases; Hemicellulases; Ligninases; Lytic Monooxygenases Polysaccharides; Expansins.

1 INTRODUÇÃO

O consumo crescente de energia fóssil no setor de transporte nos últimos dois séculos causaram problemas como o aumento da emissão dos gases do efeito estufa, maior dependência energética e insegurança no abastecimento. Uma solução para esses problemas seria a utilização de energia proveniente de

fontes renováveis. Neste cenário os biocombustíveis merecem atenção por serem derivados de matérias-primas consideradas renováveis e de fonte de energia ambientalmente limpa, com potencial para redução significativa do consumo de combustíveis fósseis (KHANAL, 2008; AJANOVIC, 2011).

Os biocombustíveis podem ser classificados como sendo de primeira, segunda, terceira e quarta geração (AWASTHI et al., 2015), onde a principal diferença entre cada uma das gerações de biocombustíveis é a matéria-prima e o nível tecnológico utilizado para sua produção (LÜ, SHEAHANB; FU, 2011). Alguns modelos de biocombustíveis de segunda geração, como etanol 2G a depender da biomassa utilizada, não competem com o setor alimentício aproveitando de resíduos lignocelulósicos de setores que tem passivo ambiental, este cenário tem destaque na literatura deste setor (AJANOVIC, 2011). Alguns biocombustíveis utilizam como substrato a biomassa lignocelulósica, tal como bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, além de outros resíduos agroindustriais e florestais. Essa biomassa é composta basicamente por celulose, hemicelulose, lignina e pectina (NAIK et al., 2010; RYTIOJA et al., 2014; SZAKACS, TENGHERDY; NAGY, 2010).

A conversão da cadeia polissacarídica da celulose da parede celular vegetal em xarope de monômeros de glicose é o alvo do setor de etanol de segunda geração, por exemplo. A celulose é um homopolímero de hexose, unidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas β -1,4, que mantem ligações de hidrogênio, resultando na formação de fibrilas, que são responsáveis pelo elevado grau de cristalinidade dessa molécula, e também possui regiões amorfas, onde possuem menor concentração de pontes de hidrogênio, permitindo maior flexibilidade da planta (LIMAYEM; RICKE, 2012; SANTOS et al., 2012).

A hemicelulose, outro componente da parede celular vegetal, é um heteropolímero constituído de cadeias lineares contendo ramificações laterais formadas por hexoses (D-glicose, D-galactose e D-manose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e pode conter ácidos urônicos, tal como ácido D-glucurônico, D-galacturônico e metilglucurônico. O terceiro componente da estrutura da célula vegetal é a lignina, uma macromolécula fenólica, formada pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Essa macromolécula preenche os espaços entre as fibras de celulose, juntamente com a hemicelulose e pectina (LIMAYEM; RICKE, 2012; SANTOS et al., 2012).

A desconstrução da parede celular vegetal de forma a separar os componentes por tipo e aplicações biotecnológicas é o grande desafio para o modelo de biorrefinaria que propõem a aproveitar o máximo de estruturas das plantas. Deste modo, muitos arranjos têm sido feito e estudado para melhor a eficiência da desconstrução da parede celular vegetal, como é o caso dos estudos com uso de pré-tratamentos físicos, químicos, biológicos e combinados na biomassa vegetal. Outro esforço científico que tem ganhado avanços na sequência de desconstrução da célula vegetal é o uso de enzimas microbianas que agem sobre parte da estrutura molecular dos componentes da célula, liberando compostos químicos antes agregados.

A obtenção de açúcares fermentescíveis a etanol de biomassa lignocelulósica envolve quatro etapas básicas, que são: pré-tratamentos (físico, químico, biológico ou combinados), hidrólise enzimática (coquetel de enzimas microbianas), fermentação da fração de hexose (leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*) e pentose (leveduras especializadas ou modificadas para esta função) e destilação etanol (SOREK et al., 2014).

Os gargalos para obtenção do etanol de segunda geração (2G) estão em todas as etapas do processo desde a desconstrução da parede celular vegetal até a fermentação ou utilização de frações como as pentoses

em produtos biotecnológicos de valor agregado que auxiliem na redução do custo total de produção deste tipo de biocombustível. A escolha de um processo influenciará em todas as etapas seguintes do processo de etanol 2G. Deste modo, as pesquisas são feitas a fim de minimizar os gargalos e chegar a um produto econômico-social-ambiental factível. E os diversos encontrar novas enzimas e/ou coquetéis enzimáticos para aumentar a eficiência da etapa de hidrólise é um dos focos do setor de bioenergia. Dessa forma esse estudo tem como objetivo elencar as antigas e novas abordagens enzimáticas empregadas para a desconstrução da parede celular vegetal.

2 METODOLOGIA

Esta pesquisa científica é predominantemente descritiva, de acordo com COLLIS e HUSSEY (2005), pois visa identificar quais abordagens empregadas para a hidrólise enzimática. Com essa finalidade realizou-se uma revisão das publicações na área de bioenergia, especificadamente sobre as enzimas empregadas na sacarificação. A pesquisa foi realizada nos meses de março a maio de 2016.

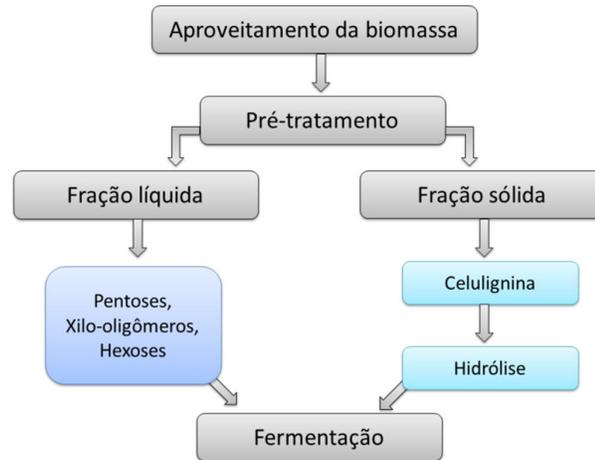
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Hidrólise enzimática

O processo de desconstrução da parede celular, envolve duas etapas principais: pré-tratamento e a hidrólise (SOREK et al., 2014). Existem diversos processos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica os quais podem ser divididos em: físico (moinho de bolas), químico (ácido, alcalino, ozonólise, organosolv), biológico e combinado (explosão a vapor, AFEX). A escolha do método deve basear-se na avaliação de diversas características, tais como: alta recuperação dos açúcares, alta digestibilidade da celulose na hidrólise enzimática posterior, alta concentração de sólidos, elevada concentração de açúcares na fração líquida e baixa demanda energética, de investimento e custo operacional (SANTOS et al., 2012).

Duas frações, líquida e sólida, são formadas após o pré-tratamento (Figura 01). A fração sólida refere-se aos compostos que não foram degradados tal como celulignina, enquanto a fração líquida refere-se à monômeros (pentoses e hexoses) e oligômeros obtidos, que estão aptos à etapa de fermentação, dependendo da concentração de açúcares e de inibidores presentes. Já a fração sólida necessita de uma etapa de hidrólise para liberar os açúcares fermentescíveis (TENGBORG et al., 1998; YANG et al., 2002).

Figura 1 - Esquema dos processos pós a etapa de pré-tratamento da biomassa



Destaca-se que o pré-tratamento promove a degradação do complexo lignocelulósico, separando os três componentes majoritários (celulose, hemicelulose e lignina), que deverão ser hidrolisados em monômeros para serem metabolizados por microrganismos e convertidos em bicomcombustíveis. Dessa forma, após o pré-tratamento é necessário fazer uso de enzimas específicas, que serão responsáveis pela hidrólise da molécula. Para a hidrólise da celulose, utiliza-se as celulasas, que irá formar resíduos de glicose (hexose). Além das celulasas, pode-se empregar as hemicelulasas se o interesse for na obtenção de pentoses, visto que essa fração é rica em compostos dessa forma. Além da hidrólise enzimática, pode-se empregar ácidos ou bases para a hidrólise de celulose e hemicelulose, porém as condições severas da hidrólise ácida ou alcalina, e os problemas de corrosão fazem com que o processo se torne oneroso. Por este motivo a hidrólise enzimática é preferível do que a química (ácida/alcalina). É importante destacar que um dos desafios da hidrólise enzimática, é o alto custo das enzimas, e por este motivo há esforços constantes em pesquisas que visem otimizar a produção de celulasas e/ou hemicelulasas para reduzir o custo do produto final (HENDRICKS; ZEEMAN, 2009; SUN; CHENG, 2002).

Após a obtenção do hidrolisado tais compostos, pentoses ou hexoses, são consumidos por microrganismos específicos para obtenção de biocombustíveis. É perceptível que todas as etapas envolvidas na produção de biocombustíveis são responsáveis pelo custo do produto final. Por isso, é importante avaliar e conhecer cada uma dessas etapas a fim de otimizá-las e reduzir custos. Na etapa de hidrólise, por exemplo, são realizados diversos estudos para obter maior quantidade de monômeros e menos produtos tóxicos para a etapa posterior (de fermentação), a fim de garantir maiores rendimentos. Porém, além do rendimento do produto final, os aspectos econômicos e ambientais devem ser avaliados, para que o processo e o produto seja considerado totalmente viável e sustentável (HENDRICKS; ZEEMAN, 2009; SUN; CHENG, 2002; SOREK, 2013).

3.2 Principais enzimas

3.2.1 Celulases

Durante a Segunda Guerra Mundial, a deterioração de objetos de algodão (fardas, barracas, bolsas e demais objetos dos acampamentos) instigou as forças armadas norte-americanas, juntamente com a *Quartermaster Corps*, a procurarem explicações e soluções para esses problemas. Para tentar resolver esse caso, pesquisadores liderados pelo Dr. Elwyn T. Reese realizaram diversas análises microbiológicas. Através desses estudos isolaram uma estirpe de fungo filamentos a qual denominou, QM6a, posteriormente como *Trichoderma viride* (que depois veio a ganhar o nome de *T. reesei*, em homenagem ao pesquisador líder do grupo). Perceberam que tal microrganismo possuía uma capacidade de degradar celulose. Vendo que tal capacidade seria promissora, o Dr. Reese e mais pesquisadores focaram suas pesquisas na busca de microrganismos mutantes que fossem grandes produtores de celulases, a fim de direcionar a uma aplicação rentável (CASTRO; PEREIRA, 2010).

As celulases podem ser produzidas por fungos ou por bactérias, tanto aeróbia ou anaeróbia, mesofílica ou termofílica. Dentre os produtores de celulases de fungos mesofílicos aeróbicos, destacam-se *Trichoderma viride*, *T. reesei*, *T. koningii*, *Penicillium pinophilum*, *P. funiculosum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani* e *Aspergillus Niger*. Diversos microrganismos podem ser citados como produtores dessa enzima, tal como fungos termofílicos (*Chaetomium thermophilum*, *Humicolain solens*, *Sporotrichum thermophile*, *Talaromyces emersonii*, *Thermoascus aurantiacus*), fungos mesofílicos anaeróbicos (*Neocallimastix frontalis*, *N. patriciarum*, *Orpinomyces* sp., *Sphaeromonas communis*), bactérias aeróbicas mesofílicas e termofílicas (*Bacteroides cellulosolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens*, *Clostridium thermocellum*, *C. stercorarium*), e também actinomicetos (*Microbisporabispora*, *Streptomyces flavogriseus*, *Thermomonospora fusca*), microrganismos hipertermofílicos, *Thermotoga maritima*, *T. neapolitana*, *Pyrococcus furiosus* e *Anaerocellum thermophilum* (SUN; CHENG, 2002; SZAKACS; TENGEDY; NAGY, 2010). Essas enzimas também podem ser produzidas de forma heteróloga, utilizando como hospedeiros a bactéria *Escherichia coli* e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* (CASTRO; PEREIRA, 2010).

As celulases podem ser produzidas por diferentes processos fermentativos, seja submerso ou em estado sólido. O que direciona qual processo será utilizado para a produção dessa enzima é a aplicação em que essa enzima será utilizada. Isso porque caso não seja necessário um alto grau de pureza, como em aplicações agrobiotecnológicas, a fermentação em estado sólido é preferível por reduzir os gastos operacionais. Isso porque a purificação é uma das principais etapas que oneram o processo produtivo. Já para o setor alimentício, por exemplo, em que é requerido alto grau de pureza dessas enzimas, o ideal é que elas sejam produzidas por fermentação submersa, que facilita o emprego das etapas *down-stream* (SZAKACS, TENGEDY e NAGY, 2010).

As celulases são compostas por três enzimas principais que agem de forma sinérgica, onde as endoglucanases (EC 3.2.1.4) clivam especificamente as ligações β -1,4- glicosídica internas da celulose, principalmente em regiões amorfas, liberando fragmentos que serão degradados pelas exoglucanases (E.C 3.2.1.91), também denominadas celobiohidrolases (CBH), à celobiose, que por sua vez serão degradadas pelas β -

glucosidases (EC 3.2.1.21) à glicose (OGEDA; PETRI, 2010; SZAKACS, TENGEDY; NAGY, 2010). Destaca-se que as β -glucosidases são capazes de clivar outros oligossacarídeos à glicose e também de liberar outros monômeros, como xilose, galactose e manose, a partir da xilana e da galactomanana (RYTIOJA et al., 2014), que são constituintes da hemicelulose.

Destaca-se que os principais fatores que afetam a hidrólise enzimática da celulose incluem substratos, atividade enzimáticas, e as condições reacionais (tal como temperatura, pH) (HENDRICKS; ZEEMAN, 2009; SUN; CHENG, 2002).

As celulasas são proteínas modulares compostas por um grande domínio catalítico conectado com um pequeno domínio de ligação a celulose (CBD-*cellulose-binding domain*) via ligação peptídica O-glicosídica. A remoção da CBD reduz a atividade em celulose cristalina enquanto os domínios catalíticos permanecem totalmente ativos em substratos solúveis. Todos os CBDs de *T. reesei* pertencem ao módulo de ligação a carboidrato da família 1, enquanto os domínios catalíticos são encontrados nas mais diversas famílias glicosilhidrolase (SZAKACS, TENGEDY; NAGY, 2010; CASTRO; PEREIRA, 2010).

A celulase é um complexo enzimático induzível com celulose, celobiose e outros oligossacarídeos, e também com carboidratos prontamente metabolizáveis como lactose. Porém, podem ser inibidas por altas concentrações dos produtos da hidrólise. A maioria das celobiohidrolases são inibidas por celobiose, apesar da celobiose estimular a atividade da celobiohidrolase II. As endoglucanases, por sua vez, são inibidas por celobiose e a glicose e mostra um pequeno efeito de repressão catabólica em diversas CBHs e endoglucanases. A inibição produto pode ser diminuída ao utilizar a tecnologia de fermentação adequada ou ainda através de ferramentas da engenharia genética, que é capaz de “criar” microrganismos tolerantes à altos níveis de inibidores específicos (SZAKACS, TENGEDY; NAGY, 2010; CASTRO; PEREIRA, 2010).

3.2.2 Hemicelulasas

A hemicelulose, por ser um heteropolímero, necessita de um arsenal enzimático para a sua completa degradação. Dentre as hemicelulasas podem ser citadas enzimas endo-1,4- β -xilanaase (EC 3.2.1.8) e 1,4- β -xilosidase (EC 3.2.1.37), que são enzimas principais e tem sua ação complementada por enzimas acessórias como α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), β -feruloilesterase (EC 3.1.1.73), β -glucuronidase (EC 3.2.1.139) e acetilxilanoesterase (EC 3.1.1.72) (GILBERT, 2010).

Dentre as principais enzimas responsáveis pela hidrólise da hemicelulose, tem-se as xilanases, que são responsáveis pela quebra da cadeia de xilana (central). As enzimas xilanolíticas podem ser obtidas por uma grande variedade de microrganismos, entre os quais os fungos filamentosos são especialmente interessantes, uma vez que secretam estas enzimas para o meio extracelular e possuem rendimentos mais elevados do que aquelas encontradas em leveduras e bactérias (PREMA, 2010). As xilanases produzidas podem ser alcalina (massa molecular baixa) ou ácida (alta massa molecular), de acordo com as condições de cultivos que o fungo é submetido (JORGE et al., 2005).

As xilanases são enzimas extracelulares classificadas como glicosidases, responsáveis pela quebra das ligações β -1,4 presentes na xilana. Elas se classificam em duas principais famílias: F ou 10, na qual inclui moléculas mais complexas e a família G ou 11, que inclui enzimas mais específicas (como as endo- β -1,4-

xilanase e as β -xilosidase). Destaca-se que as enzimas microbianas, no geral, são proteínas mais estáveis, cujos pH e temperaturas ótimas variam entre 4-7 e de 40-60°C, respectivamente. Tais enzimas podem ser inibidas ou ativadas por íons metálicos, dependendo da concentração, tal como Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} e Ag^{+} (ALBANO, 2012).

A produção de xilanasas é normalmente realizada por processos de fermentação no estado sólido (FES) e em fermentação submersa (FSm). A FSm representa mais de 90% da produção industrial de enzimas devido à facilidade de controle durante o processo de fermentação aeróbica, garantindo uma maior disponibilidade de nutrientes, fornecimento de oxigênio e menos tempo de fermentação quando comparado com outras técnicas; além disso, a FSm é mais preferível quando requer preparações de enzimas maior grau de pureza (UDAY et al., 2015; IRFAN et al., 2015). Porém, o elevado custo de produção destas enzimas dificulta a sua aplicação ao alto custo do substrato xilano purificado (BAKRI et al., 2013). Uma alternativa para a redução do custo da produção é possível pela utilização de resíduos agrícolas de baixo custo que normalmente são incorporados no solo após colheita, ou são destinados à alimentação de animais. Estes resíduos podem ser utilizados como fontes de carbono e nitrogênio na formulação de meios de fermentação (SHAHRIARINOUR et al., 2011).

Além disso, a otimização estatística na formulação do meio ajuda a minimizar a quantidade de componentes não utilizados no final da fermentação, avaliando o efeito de fontes de carbono, nutrientes nitrogenados, íon metálicos, fosfato e sal sobre a produção de enzimas (UDAY et al., 2015). Dessa forma, a utilização de resíduos e o baixo custo da biomassa celulósica podem reduzir significativamente o custo da produção de enzimas e fornecer produtividades comparáveis aos obtidos em presença de outras fontes de carbono (ADSUL et al., 2005).

3.2.3 Ligninases

A lignina é uma macromolécula fenólica presente na parede celular vegetal sendo responsável pela sua estrutura rígida. Para despolimerização da lignina e consequente decomposição da parede celular vegetal, algumas enzimas são relatadas, são elas: lignina peroxidase (LiP – E.C. 1.11.1.14), manganês peroxidase (MnP – E.C. 1.11.1.13), peroxidases versáteis (VP – E.C. 1.11.1.16) e lacases (E.C. 1.10.3.2) (POLLEGIONI, TONIN; ROSINI, 2015).

A LiP e MnP pertencem a classe II das peroxidases. A LiP é segregada como uma série de isoenzimas glicosiladas com massas moleculares variando de 38 a 46kDa, e é capaz de oxidar unidades fenilpropanóides não-fenólicas de lignina. Tal enzima tem alto potencial redox, superior a demais enzimas lignolíticas, sendo capaz de oxidar compostos aromáticos não fenólicos, mesmo na ausência de um mediador (DOSORETZ; WARD, 2010; POLLEGIONI, TONIN; ROSINI, 2015; CHEN, SARKANEN; WANG, 2012).

A MnP existe como uma série de isoenzimas glicosiladas com massas moleculares variando entre 45 e 47 KDa. Em muitos fungos, a MnP desempenha papel crucial no ataque primário da lignina, porque gera Mn^{3+} , um oxidante forte capaz de penetrar a pequenos 'poros molecular' entre as microfibrilas de celulose, o que impede a ação de LiP devido a obstáculos estéricos, mas permite a oxidação dos compostos fenólicos. Ácidos orgânicos, tais como oxalato, fumarato e malato, que é também produzida por fungos da podridão branca,

juntamento com o íon Mn^{3+} , formam complexos com alto poder oxidante, capazes de oxidar as estruturas fenólicas (POLLEGIONI, TONIN; ROSINI, 2015; DOSORETZ; WARD, 2010).

As enzimas LiP e de MnP são secretadas naturalmente por fungos de podridão branca, como *Phanerochaete chrysosporium*, durante a degradação da lignina. Para a produção laboratorial dessas enzimas, fontes de carbono, nitrogênio e manganês são variáveis nutricionais importantes. O íon Mn^{2+} é um efector específico que induz MnP e reprime LiP. Com tal informação é possível direcionar a produção de uma dessas enzimas. Além disso, os níveis de oxigênio empregados nos meios de cultura também podem direcionar a produção da enzima desejada (DOSORETZ; WARD, 2010).

A peroxidase versátil – VP – (EC 1.11.1.16) compartilha diversas características semelhantes as LiP e MnP, sendo capaz de oxidar compostos fenólicos e não fenólicos, de formas semelhantes a catálise realizada pela MnP. Dentre os fungos identificados para a produção dessa enzima tem-se os fungos de podridão branca (do gênero *Pleorotus* e *Bjerkandera*). As lacases, por sua vez, são oxidases polifenólicas, dependente de cobre, que são isoenzimas intra e extracelular em diferentes estados oligoméricos e níveis de glicosilação. O fungo *Trametes versicolor* é encontrado como sendo grande produtor de lacase, mas também pode ser produzido por bactérias, tal como *Bacillus subtilis*. Em relação ao ciclo catalítico, tal enzima oxida substratos por meio da redução de oxigênio, através de duas etapas consecutivas, sendo sua atividade fortemente influenciada pelo pH do meio (POLLEGIONI, TONIN; ROSINI, 2015; CHEN, SARKANEN; WANG, 2012).

3.3 Novas e potenciais enzimas

Novas moléculas já foram descobertas como sendo capazes de descompactar as microfibrilas por meio da ação de proteínas não-hidrolíticas, facilitando o acesso das enzimas hidrolíticas específicas (celulases e hemicelulases) e de enzimas acessórias (ARANTES; SADDLER, 2010). Dentre essas moléculas que possuem efeito sinérgico com as enzimas hidrolíticas desconstrutoras da parede celulósica podem ser citadas as expansinas (ANDBERG, PENTTILÄ E SALOHEIMO, 2015; ARANTES E SADDLER, 2010; RYTIOJA et al., 2014) e as monoxigenases líticas de polissacarídeos – LPMOs (AGGER et al., 2014; RYTIOJA et al., 2014).

3.3.1 Monoxigenases líticas de polissacarídeos

As monoxigenases líticas de polissacarídeos tiveram sua atividade originalmente descoberta em quitinas. Tais moléculas atuam com clivagens oxidativas que causam perturbações locais na estrutura da celulose, facilitando assim a despolimerização hidrolítica da celulose por moléculas específicas. A atividade de LPMOs tem sido observada a partir da liberação lenta de celo-oligossacarídeos solúveis oxidados, porém o mecanismo específico dessa molécula ainda vem sendo estudado (EIBINGER et al., 2014).

As LPMOs auxiliam na degradação da celulose em combinação com as celulases, facilitando a sacarificação da biomassa. Tais moléculas, que podem ser produzidas por fungos ou bactérias, são monooxigenases dependentes de cobre que catalisam a oxidação direta da cadeia de celulose conduzindo à clivagem da ligação glicosídica. Estudos também demonstram a atuação sinérgica dessas proteínas com enzimas

de degradação da hemicelulose (AGGER et al., 2014; RYTIOJA et al., 2014). Estudos mostram ainda que a oxidação de polissacarídeos recalcitrantes por LPMOs aceleram a degradação desses, não apenas pelo aumento da concentração de terminais redutores, através da redução da descristalização, mas também pela redução dos inibidores presentes (VERMAAS et al., 2015).

3.3.2 Expansinas

As expansinas são proteínas derivadas de plantas, que foram inicialmente descobertas na década de 90 como sendo responsáveis pelo efeito da perda de cristalinidade durante seu crescimento (ANDBERG, PENTTILÄ E SALOHEIMO, 2015). As expansinas podem ser classificadas como sendo α -expansinas, β -expansinas, expansinas tipo A (EXLA) e expansinas tipo B (EXLB), e atuam não apenas no relaxamento da parede celular, mas também nos processos de desenvolvimento vegetal tal como na germinação (BUDZINSKI et al., 2012).

Estudos indicam que essas moléculas facilitam o acesso das celulases, uma vez que permite o afrouxamento das microfibrilas, aumentando a eficiência da hidrólise enzimática, nessas condições. Destaca-se que algumas proteínas produzidas por fungos e bactérias possuem ação similar a essas expansinas vegetais, e essas proteínas microbianas estão sendo estudadas a fim de otimizar a sacarificação da biomassa através da ação sinérgica dessas moléculas com as enzimas hidrolíticas (ANDBERG, PENTTILÄ; SALOHEIMO, 2015; ARANTES; SADDLER, 2010; RYTIOJA et al., 2014).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Percebe-se que o conhecimento das moléculas de desconstrução da parede celular é de suma importância para direcionar suas aplicações. Porém, independente da aplicação, o baixo custo na obtenção das enzimas e alta eficiência dessas são requeridas. Assim, novas moléculas tem sido estudadas individualmente e conjuntamente com moléculas já conhecidas, para permitir melhor utilização dessas. Dessa forma, será possível construir um coquetel enzimático capaz de degradar eficientemente a parede celular, e obter monômeros facilmente metabolizados, a um custo operacional viável, fornecendo dessa forma um produto com valor econômico competitivo com as outras alternativas não-renováveis presentes no mercado de energia.

REFERÊNCIAS

- ADSUL, M. G., et al. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 6–10, 2005.
- AGGER, J.W. et al. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. **PNAS**, v. 111, n. 17, p. 6287-6292, 2014.
- AJANOVIC, A. Biofuels versus food production: Does Biofuels production increase food prices? **Energy**, v. 36, p. 2070-2076, 2011.

- ALBANO, M. **Comparação da Produção de Celulases e Xilanases por fungos filamentosos e Fermentação Submersa e Estado sólido**. 2012. 82 p. (Dissertação em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". São José do Rio Preto, 2012.
- ANDBERG, M.; PENTTILÄ, M.; SALOHEIMO, M. Swollenin from *Trichoderma reesei* exhibits hydrolytic activity against cellulosic substrates with features of both endoglucanases and cellobiohydrolases. **Bioresource Technology**. v. 181, p. 105-113, 2015.
- ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4, p. 1-11, 2010.
- AWASTHI, P. et al. Biofuel from agricultural waste: A review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 1, p. 470-477, 2015.
- BAKRI, Y., et al. Xylanase Production by *Fusarium Solani* in Solid State Fermentation. **Research in Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 31-37, 2013.
- CASTRO, A. M.; JÚNIOR, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p.181-188, 2010.
- CHEN, Y.; SARKAREN, S.; WANG, Y. Lignin-Degrading Enzyme Activities. Chapter 21. In: **Biomassa Conversion – Methods in Molecular Biology**, 2012. p. 251-268. (v. 908).
- COLLIS, J.; HUSSEY, R. **Pesquisa em administração: um guia prático para alunos de graduação e pós-graduação**. Porto Alegre: Bookman, 2005.
- DOSORETZ, C.G.; WARD, G. Peroxidases. In: PANDEY, A., et al. **Enzyme Technology**. New Delhi: Springer, 2010. p. 391-432.
- EIBINGER, M. et al. Cellulose surface degradation by lytic polysaccharide monoxygenase and its effect on cellulose hydrolytic efficiency. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 289, n. 52, p. 35929-35938, 2014.
- GILBERT, H. J. The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. **Plant Physiology**, v. 153, p. 444–455, 2010.
- HENDRICKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatment to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10-18, 2009.
- IRFAN, M., et al. Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus* sp. in submerged fermentation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, p.1-9, 2015.
- JORGE, I. R. O. de la., et al. Extracellular xylanases from two pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: enzyme production in culture and purification and characterization of a major isoform as an alkaline endo-b-(1,4)-xylanase of low molecular weight. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, p. 49–59, 2005.
- KHANAL, S. K. Bioenergy Generation from Residues of Biofuels Industries. In: KHANAL, S. K. **Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2008. p. 161-188. Cap. 08
- LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. In: ENERGY AND COMBUSTION SCIENCE, **Progress**, , 2012. p. 38449-467
- LÜ, J.; SHEAHANB, C.; FU, P. Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. **Energy and Environmental Science**, v. 4, p. 2451-2466, 2011.
- NAIK, S. N. et al. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 578-597, 2010.

- OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010
- POLLEGIONI, L.; TONIN, F.; ROSINI, E. Lignin-degrading enzymes. **The FEBS Journal**, v. 282, n. 7, p. 1190-1213, 2015.
- PREMA, P. Xylanases. In: Pandey, A. et al. **Enzyme Technology**. New York: Springer, p. 333-337, 2010.
- RYTIOJA, J. et al. Planta-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 614-649, 2014.
- SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.
- SHAHRIARINOUR, M., et al. B. Effect of medium composition and cultural condition on cellulase production by *Aspergillus terreus*. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n. 38, p. 7459-7467, 2011.
- SOREK, N. et al. The implications of Lignocellulosic Biomass Chemical Composition for the Production of Advanced Biofuels. **BioScience Advance**, v. 64, n. 3, p. 192-201, 2014
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p.1-11, 2002.
- SZAKACS, G.; TENDERDY, R. P.; NAGY, V. Cellulases. In: PANDEY, A., et al. **Enzyme Technology**. New Delhi: Springer, 2010. p. 253-272.
- TENGBORG, C. et al. Comparison of SO₂ and H₂SO₄ Impregnation of Softwood Prior to Steam Treatment on Ethanol Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 3-15, 1998.
- UDAY, U. S. P., et al. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1-14, 2015.
- VERMAAS, J.V. et al. Effects of lytic polysaccharide monooxygenase oxidation on cellulose structure and binding of oxidized cellulose oligomers to cellulases. **Journal of Physical Chemistry**, v. 119, n. 20, p. 6129-6143, 2015.
- YANG, B. et al. Fast and Efficient Alkaline Peroxide Treatment to Enhance the Enzymatic Digestibility of Steam-Exploded Softwood Substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 6, p. 678-684, March 2002.