



Universidade de Brasília - UnB

Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus*:

**Caracterização, degradação de biomassa lignocelulósica e
efeito de compostos fenólicos**

Leonora Rios de Souza Moreira

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus*:
Caracterização, degradação de biomassa lignocelulósica e
efeito de compostos fenólicos

Leonora Rios de Souza Moreira

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biologia Molecular da
Universidade de Brasília como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Brasília, Agosto de 2013

**Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus*: Caracterização,
degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos**

Leonora Rios de Souza Moreira

Banca examinadora:

- ✓ **Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli - USP**
- ✓ **Profa. Dra. Nádia Skorupa Parachin - UnB**
- ✓ **Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart - UnB**
- ✓ **Prof. Dr. Márcio José Poças Fonseca - UnB**
- ✓ **Profa. Dra. Eliane Ferreira Noronha - UnB**

Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho - Orientador

Brasília, Agosto de 2013

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

Agradecimentos

A Deus

“Que nos deu o dom da vida, nos presenteou com liberdade, nos abençoou com inteligência e nos deu a graça de lutarmos para a conquista das nossas realizações” (Ruy Barbosa).

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho por ter me recebido e me incentivado desde o início da minha vida acadêmica. Por toda paciência, dedicação e apoio durante muitos anos de convivência. Por todas as conversas – acadêmicas ou não – que contribuíram muito para todos os aspectos da minha formação. Mais do que um orientador, é um grande amigo.

Ao Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart pela imensa ajuda no desenvolvimento desta tese, por toda paciência, amizade e inúmeros ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Félix por toda paciência e disponibilidade, por todos os ensinamentos e sugestões, sempre com muito carinho;

À Prof^a. Dra. Lourdes Isabel Velho do Amaral “*in memoriam*” pelos poucos momentos, mas de muito aprendizado;

À Prof^a. Dra. Eliane Noronha pela disponibilidade e atenção na resolução de dúvidas que surgiram em vários momentos ao longo desses anos;

Ao Prof. Dr. Márcio Poças pelas críticas e sugestões ao longo deste trabalho;

Ao Dr. Luciano Paulino Silva pelo auxílio com microscopia de força atômica;

Ao Dr. Clóvis Oliveira Silva por me dar total acesso ao seu laboratório durante o período de experimentos com o HPLC;

Ao Prof. Dr. Francides Gomes da Silva Júnior pela gentileza no fornecimento das amostras de polpas de celulose;

Ao Dr. Edgardo Olivares Gómez e Dr. George Jackson de Moraes Rocha pela gentileza no fornecimento das amostras de bagaço de cana-de-açúcar;

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro pela realização das análises químicas composicionais;

Ao Prof. Dr. Luís Roberto Batista pela identificação morfológica do fungo;

À Prof^a. Dra. Nádia Skorupa Parachin pela identificação molecular da cepa de *A. terreus*;

Às técnicas Marísia e Margarete pela amizade, carinho, infinitas ajudas, por serem pessoas tão doces e por tornarem meus momentos no laboratório muito mais agradáveis;

Aos amigos Pedro Henrique e Marcela!! Sem vocês esse trabalho não seria possível;

Aos amigos do laboratório de enzimologia Caio, Helder, Antonielle, Gilvan, Liana, Jacke, Paula, Juliana, Bárbara, Rafaela, Brenda, Francilene, Priscila, Pedro, pela amizade, companheirismo e pelos bons momentos que passamos juntos;

Ao amigo Pedro Martins por todo auxílio com a espectrometria de massa e aos demais amigos do laboratório de bioquímica e química de proteínas Luís, Carroll, Rayner, Jaques, Diana;

Ao amigo Dr. Félix Siqueira pelo incentivo, apoio e inúmeras dicas;

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular pela qualidade e estrutura oferecidas;

Ao meu grande companheiro, Leandro, obrigada por me fazer crer que sou capaz, por não me deixar desistir. Obrigada pelo carinho, compreensão e apoio... Por todo amor e por tudo que tem me ajudado a aprender!! Qualquer agradecimento ficará aquém do merecido!

Aos meus pais por terem me dado todas as condições para trilhar esse caminho, por terem me encorajado a seguir meu sonho e por terem me dado a mão em todos os momentos. Por tudo que me ensinaram em diferentes fases da minha vida, por serem meus maiores exemplos;

Aos meus irmãos por sempre me encorajarem e curtirem minhas conquistas, especialmente ao Ric e Tainá, pelo estímulo, carinho e companheirismo;

À amiga Ju, pelo carinho e pelo suporte técnico à distância!

Apoio Financeiro

Esta pesquisa foi desenvolvida com o apoio financeiro da CAPES, por meio de concessão de bolsa de estudos. E pelos projetos de pesquisa: Redes Sisbiota (CNPq/563260/2010-6), Rede Centro Oeste (CNPq/563823/2010-0 e FAPDF/193.000.470/2011) Universal (CNPq/470265/2011-6), Pronex (FAPDF/193000584/2009) e INCT do Bioetanol/CNPq.

Sumário

Lista de figuras	Pág. xv
Lista de tabelas	Pág. xxi
Lista de abreviaturas	Pág. xxiii
Resumo	Pág. xxiv
Abstract	Pág. xxv
Capítulo I: Introdução, justificativa e objetivos	Pág. 1
1.1. Consumo mundial de energia e aquecimento global.....	Pág. 1
1.2. Lignocelulose e parede celular vegetal.....	Pág. 7
1.2.1. Xilanas.....	Pág 10.
1.3. O papel da biomassa no sistema energético mundial.....	Pág. 12
1.3.1. Bagaço de cana de Açúcar.....	Pág 18
1.3.2. Casca de Soja.....	Pág21
1.3.3. Piolho de algodão.....	Pág.22
1.4. Holocelulases e a degradação de biomassa vegetal.....	Pág. 23
1.4.1. Xilanases.....	Pág 25
1.5. <i>Aspergillus terreus</i>	Pág 31
2. Justificativas.....	Pág 33
3. Objetivos.....	Pág 35
4. Bibliografia.....	Pág 35

Capítulo II: Utilização de resíduos agroindustriais no cultivo de <i>Aspergillus terreus</i> para produção de enzimas holocelulolíticas	Pág. 45
1. Introdução.....	Pág. 47
2. Objetivos.....	Pág. 49
3. Material e Métodos.....	Pág.49
3.1. Origem dos reagentes.....	Pág. 49
3.2. Resíduos Agroindustriais.....	Pág. 49
3.2.1. Origem dos resíduos lignocelulósicos.....	Pág. 49
3.2.2. Pré-tratamento.....	Pág. 50
3.2.3. Análise Bromatológica.....	Pág. 50
3.2.3.1. Análise dos extratíveis.....	Pág. 50
3.2.3.2. Análise da Hemicelulose.....	Pág. 50
3.2.3.3. Análise de Lignina.....	Pág. 50
3.3. Manutenção e cultivo do micro-organismo.....	Pág.52
3.4. Determinação da quantidade de proteínas.....	Pág.53
3.5. Determinação da atividade enzimática.....	Pág.53
4. Resultados e Discussão.....	Pág.55.
4.1. Curva de indução de xilanase.....	Pág.55
4.2. Caracterização dos extratos brutos.....	Pág 58
5. Conclusões.....	Pág 65
6. Bibliografia.....	Pág 66
 Capítulo III: Purificação e caracterização de xilanases de <i>Aspergillus terreus</i> cultivado em resíduos agroindustriais.....	 Pág. 69
1. Introdução.....	Pág 70

2. Objetivos.....	Pág 71
3. Material e métodos.....	Pág 72
3.1. Origem dos reagentes.....	Pág 72
3.2. Purificação de xilanases.....	Pág. 73
3.2.1. Xyl T1 e Xyl T2.....	Pág 73
3.3.3. Xyl T3.....	Pág 74
3.3.4. Xyl T4.....	Pág 75
3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante.....	Pág. 77
3.4. Coloração com nitrato de prata.....	Pág 78
3.5. Caracterização das amostras de xilanases purificadas.....	Pág 78
3.5.1. Determinação de parâmetros cinéticos.....	Pág 79
3.5.2. Efeito de íons metálicos, agentes modificadores de aminoácidos e aminoácidos.....	Pág 80
3.5.3. Atividade em substratos sintéticos.....	Pág 81
3.5.4. Atividade de celulase total.....	Pág 81
3.6. Espectrometria de massa MALDI-TOF (Xyl T1 e Xyl T2).....	Pág 82
3.6.1. Preparo das amostras.....	Pág 82
3.6.2. Espectrometria de massa (MS) e “ <i>Peptide Mass Fingerprinting</i> ” (PMF) por MALDI-TOF.....	Pág. 83
3.7. Microscopia de Força Atômica (MFA)	Pág. 84
3.8. Análises estatísticas.....	Pág. 85
4. Resultados e Discussão.....	Pág. 85
4.1. Purificação de xilanases.....	Pág. 85
4.2. Espectrometria de massa de Xyl T1 e Xyl T2.....	Pág. 99
4.3. Microscopia de massa atômica (MFA) de Xyl T1 e Xyl T2.....	Pág. 101

4.4. Caracterização das xilanases purificadas de <i>A. terreus</i>	Pág.102
5. Conclusões.....	Pág. 117
6. Perspectivas.....	Pág. 117
7. Bibliografia.....	Pág. 117
Capítulo IV: Influência de compostos fenólicos na atividade de β - xilanases purificadas de <i>Aspergillus terreus</i>.....	Pág 125
1. Introdução.....	Pág. 127
2. Objetivos	Pág. 129
3. Material e métodos.....	Pág. 129
3.1. Inibição e desativação por compostos fenólicos	Pág. 129
3.2. Determinação de parâmetros cinéticos de Xyl T1 e Xyl T2	Pág. 130
3.3. Análises estatísticas	Pág. 130
4. Resultados e discussão	Pág. 131
4.1. Efeitos de compostos fenólicos na atividade de β -xilanases purificadas de <i>A terreus</i>	Pág. 131
4.2. Efeitos dos compostos fenólicos nas constantes cinéticas de Xyl T1 e Xyl T2	Pág. 148
5. Conclusões	Pág. 152
6. Perspectivas	Pág. 152
7. Bibliografia	Pág. 152
Capítulo V: Hidrólise enzimática da polpa de celulose.....	Pág. 156
1. Introdução	Pág. 158
2. Objetivos.....	Pág. 161
3. Material e métodos	Pág. 161

3.1. Origem e produção das polpas de celulose	Pág. 161
3.2. Hidrólise enzimática das polpas de celulose	Pág. 162
3.2.1. Dosagem de glicose	Pág. 163
3.2.2. Dosagem de açúcares redutores totais	Pág. 163
3.2.3. Dosagem de pentoses e hexoses livres pelo método do Orcinol-férrico	Pág. 163
3.2.4. Leituras em diferentes comprimentos de onda	Pág. 164
3.3. Análise por HPLC da hidrólise enzimática das polpas de celulose	Pág. 164
3.4. Análises Estatísticas	Pág. 165
4. Resultados e discussão	Pág. 165
4.1. Hidrólise enzimática das polpas de celulose	Pág. 165
5. Conclusão	Pág. 195
6. Perspectivas.....	Pág. 195
7. Referências	Pág. 196
Capítulo VI: Hidrólise enzimática da xilana e bagaço de cana de açúcar.....	Pág. 200
1. Introdução	Pág. 202
2. Objetivos	Pág. 203
3. Material e métodos	Pág. 203
3.1. Xilana	Pág. 203
3.2. Origem do bagaço de cana de açúcar.....	Pág. 204
3.2.1. Análise bromatológica dos bagaços de cana: Não-tratado, hidrolisado por ácido sulfúrico, bagaço de cana explodido a vapor	Pág. 205
3.3. Hidrólise enzimática da xilana.....	Pág. 205
3.3.1. Análise por HPLC da hidrólise enzimática.....	Pág. 205

3.4. Hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar.....	Pág. 206
3.5. Análises estatísticas.....	Pág. 206
4. Resultados e discussão.....	Pág 206
4.1. Análise bromatológica dos bagaços de cana utilizados para hidrólise....	Pág. 206
4.2. Hidrólise da xilana de bétula por Xyl T1.....	Pág. 208
4.3. Hidrólise do bagaço de cana de açúcar.....	Pág. 212
5. Conclusões.....	Pág 215
6. Perspectivas	Pág 215
7. Bibliografia.....	Pág 215
Capítulo VII: Hidrólise de resíduos agroindustriais por enzimas de degradação de holocelulose.....	Pág 219
Considerações finais e perspectivas.....	Pág 230
Apêndice 1: Artigo aceito para publicação. Two β-xylanases from <i>aspergillus terreus</i>: characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity ...	Pág. 232
Apêndice 2: Capítulo publicado no livro: Routes to Cellulosic Ethanol - Chapter 6: Enzymology of Plant Cell Wall Breakdown: An Update	Pág 234
Apêndice 3: Biomass-derived inhibitors of holocellulases.....	Pág 260
Apêndice 4: Use of residual biomass from the textile industry as carbon source for production of a low-molecular-weight xylanase from <i>Aspergillus oryzae</i>.....	Pág 261
Anexo A: Identificação de cepas de Fungos Filamentosos: <i>Aspergillus terreus</i>...	Pág 265
Anexo B: Pré-tratamento e análise química composicional dos bagaços de cana-de-açúcar.....	Pág 269

Lista de figuras

- Figura 1.1.** Consumo mundial de energia primária entre os anos de 1986 e 2011. **Pág 1**
- Figura 1.2.** Matriz energética mundial em 2011.....**Pág 4**
- Figura 1.3.** Matriz de energia elétrica brasileira.....**Pág 4**
- Figura 1.4.** Reservas (em anos) para a produção de combustíveis fósseis no ano de 2011.....**Pág.6**
- Figura 1.5.** Camadas da parede celular vegetal: ML (Lamela média), P (parede primária), S1, S2 e S3 (camadas da parede secundária).....**Pág 9**
- Figura 1.6.** Estrutura da parede celular de resíduos agrícolas..... **Pág 9**
- Figura 1.7.** Estrutura de xilana. Ac: grupo acetil; α -Araf: α -arabinofuranose; α -4-O-Me-GlcA: Ácido α -4-O-metil-glucurônico**Pág 11**
- Figura 1.8.** Diferentes vias para a produção de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica.....**Pág 17**
- Figura 1.9.** Safra de cana de açúcar no Brasil (1970/1971 a 2010/2011).....**Pág 19**
- Figura 1.10.** Energia contida em 1000 toneladas de cana de açúcar (A) e composição do bagaço de cana de açúcar (B).....**Pág 21**
- Figura 1.11.** Ataque enzimático na estrutura holocelulósica.....**Pág. 24**
- 1.12.** Mecanismo geral de hidrólise de ligação glicosídica com retenção anomérica**Pág 27**

- Figura 1.13.** Estrutura hipotética de uma xilana, mostrando diferentes grupos substituintes, com sítios de ataque de xilanases microbianas.....**Pág 29**
- Figura 2.1.** Esquema do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....**Pág. 48**
- Figura 2.2.** Curvas de indução de *A. terreus* quando cultivado em bagaço de cana de açúcar, piolho de algodão sujo e casca de soja.....**Pág. 57**
- Figura 2.3.** Perfil de holocelulases produzidas por *A. terreus* em cultivo em meio líquido contendo bagaço de cana de açúcar, piolho de algodão sujo ou casca de soja como fontes de carbono.....**Pág 59**
- Figura 2.4.** Efeito do pH na atividade xilanolítica dos extratos brutos de *A. terreus*.....**Pág 62**
- Figura 2.5.** Efeito da temperatura na atividade xilanolítica dos extratos brutos....**Pág. 64**
- Figura 3.1.** Esquema da purificação de Xyl T1 e Xyl T2.....**Pág. 74**
- Figura 3.2.** Esquema da purificação de Xyl T3.**Pág. 75**
- Figura 3.3.** Esquema da purificação de Xyl T4.**Pág. 76**
- Figura 3.4.** Atividade xilanolítica presente nas frações concentrada e ultrafiltrada provenientes do fracionamento dos extratos brutos.....**Pág. 86**
- Figura 3.5.** Perfis cromatográficos da purificação da enzima Xyl T1, a partir da fração concentrada do extrato bruto proveniente do cultivo de *A. terreus* em bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono.....**Pág. 88**
- Figura 3.6.** Perfis cromatográficos da purificação da enzima Xyl T2, a partir da fração ultrafiltrada do extrato bruto proveniente do cultivo de *A. terreus* em bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono.**Pág. 89**

- Figura 3.7.** Perfis cromatográficos da purificação da enzima Xyl T3, a partir da fração ultrafiltrada do extrato bruto proveniente do cultivo de *A. terreus* em piolho de algodão sujo como fonte de carbono.**Pág. 91**
- Figura 3.8.** Perfis cromatográficos da purificação da enzima Xyl T4, a partir da fração ultrafiltrada do extrato bruto proveniente do cultivo de *A. terreus* em casca de soja como fonte de carbono.**Pág. 92**
- Figura 3.9.** SDS-PAGE (12%) das amostras purificadas Xyl T1 e Xyl T2, corado com nitrato de prata.....**Pág. 98**
- Figura 3.10.** SDS-PAGE (12%) da amostra purificada de Xyl T4 corado com nitrato de prata.....**Pág. 99**
- Figura 3.11.** Espectrometria de massa de amostras de Xyl T1 (A) e Xyl T2 (B) após digestão com tripsina. Os 14 picos mais intensos após a digestão triptica estão indicadas para cada enzima e representadas pela sua razão massa/carga.....**Pág. 100**
- Figura 3.12.** Imagens de MFA de amostras purificadas Xyl T1 (A) e Xyl T2 (B), depositadas sobre uma superfície de mica, em concentração de 10 µg/mL e histograma de distribuição de altura de ambas as enzimas. A seta vermelha mostra estruturas de tamanho grande em Xyl T2.....**Pág.102**
- Figura 3.13.** Efeito do pH na atividade de xilanases purificadas.....**Pág. 104**
- Figura 3.14.** Efeito da temperatura na atividade xilanolítica das enzimas purificadas de *A. terreus*. **Pág. 105**
- Figura 4.1.** Efeito de compostos fenólicos na atividade xilanolítica de Xyl T1 **Pág. 135**

Figura 4.2. Efeito do tempo (h) e dos tratamentos em função da liberação de açúcares redutores para Xyl T1.	Pág. 136
Figura 4.3. Efeito de compostos fenólicos na atividade xilanolítica de Xyl T2. Pág. 139	
Figura 4.4. Efeito do tempo (h) e dos tratamentos em função da liberação de açúcares redutores para Xyl T2.	Pág. 140
Figura 4.5. Efeito de compostos fenólicos na atividade xilanolítica de Xyl T3. Pág. 142	
Figura 4.6. Efeito do tempo (h) e dos tratamentos em função da liberação de açúcares redutores para Xyl T3.	Pág. 143
Figura 4.7. Efeito de compostos fenólicos na atividade xilanolítica de Xyl T4. Pág 145	
Figura 4.8. Efeito do tempo (h) e dos tratamentos em função da liberação de açúcares redutores para Xyl T4.	Pág 146
Figura 4.9. Efeito do tempo (h) e dos tratamentos em função da liberação de açúcares redutores para Xyl T1, Xyl T2, Xyl T3 e Xyl T4.	Pág. 147
Figura 5.1. Estágios do branqueamento da polpa de celulose para a produção de papel.	Pág. 159
Figura 5.2. Amostras de polpas de celulose.	Pág. 162
Figura 5.3. Hidrólise da polpa clara pelas enzimas Xyl T1 e Xyl T2	Pág 168
Figura 5.4. Hidrólise da polpa clara pelas frações ultrafiltradas em PM 10 kDa. Pág 169	
Figura 5.5. Liberação de xilooligossacarídeos durante a hidrólise da polpa de celulose clara em função do tempo.	Pág. 171
Figura 5.6. Detecções por HPLC dos produtos formados pela hidrólise da polpa de celulose clara	Pág. 172
Figura 5.7. Hidrólise da polpa pré-branqueada pelas enzimas Xyl T1 e Xyl T2 Pág. 175	

- Figura 5.8.** Hidrólise da polpa pré-branqueada pelas frações ultrafiltradas em PM 10 kDa.**Pág. 176**
- Figura 5.9.** Liberação de xilooligossacarídeos durante a hidrólise da polpa de celulose pré-branqueada, em função do tempo. **Pág. 177**
- Figura 5.10.** Detecções por HPLC dos produtos formados pela hidrólise da polpa de celulose pré-branqueada com O₂**Pág. 178**
- Figura 5.11.** Hidrólise da polpa escura pelas enzimas Xyl T1 e Xyl T2**Pág. 181**
- Figura 5.12.** Hidrólise da polpa escura pelas frações ultrafiltradas em PM 10 kDa.**Pág 182**
- Figura 5.13.** Liberação de xilooligossacarídeos durante a hidrólise da polpa de celulose escura em função do tempo.....**Pág. 183**
- Figura 5.14.** Detecções por HPLC dos produtos formados pela hidrólise da polpa de celulose escura **Pág. 184**
- Figura 5.15.** Hidrólise da polpa pescura pelas enzimas Xyl T1 e Xyl T2..... **Pág. 186**
- Figura 5.16.** Hidrólise da polpa escura pelas frações ultrafiltradas em PM 10 kDa.**Pág 187**
- Figura 5.17.** Detecções por HPLC dos produtos formados pela hidrólise da polpa de celulose escura.....**Pág. 188**
- Figura 5.18.** Xilooligossacarídeos liberados por Xyl T1 durante a hidrólise das polpas de celulose clara, pré-branqueada com O₂ e escura, em função do tempo.....**Pág. 190**
- Figura 5.19.** Xilooligossacarídeos liberados por Xyl T2 durante a hidrólise das polpas de celulose clara, pré-branqueada com O₂ e escura, em função do tempo.....**Pág. 191**

- Figura 5.20.** Xilooligossacarídeos liberados pelo ultrafiltrado proveniente do cultivo com bagaço de cana durante a hidrólise das polpas de celulose clara, pré-branqueada com O₂ e escura, em função do tempo.....**Pág. 192**
- Figura 5.21.** Xilooligossacarídeos liberados pelo ultrafiltrado proveniente do cultivo com piolho de algodão durante a hidrólise das polpas de celulose clara, pré-branqueada com O₂ e escura, em função do tempo.**Pág. 193**
- Figura 6.1.** Amostras de bagaço de cana de açúcar. **Pág. 204**
- Figura 6.2.** Hidrólise de xilana de bétula solúvel e insolúvel catalisada por Xyl T1.**Pág. 208**
- Figura 6.3.** Liberação de xilooligossacarídeos durante a hidrólise da xilana solúvel e insolúvel por Xyl T1 em função do tempo.**Pág. 210**
- Figura 6.4.** Detecções por HPLC dos produtos formados pela hidrólise da xilana de bétula solúvel por Xyl T1.....**Pág. 211**
- Figura 6.5.** Detecções por HPLC dos produtos formados pela hidrólise da xilana de bétula insolúvel por Xyl T1.....**Pág. 212**
- Figura 6.6.** Hidrólise do bagaço de cana não tratado, hidrolisado com ácido sulfúrico e explodido a vapor com o extrato bruto e Xyl T1.**Pág. 214**

Lista de tabelas

- Tabela 2.1.** Análise bromatológica de resíduos agroindustriais pré-tratados.....**Pág. 61**
- Tabela 3.1.** Resumo das etapas de purificação de Xyl T1 e de Xyl T2 produzidas por *A. terreus* cultivado em bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono.**Pág. 94**
- Tabela 3.2.** Resumo das etapas de purificação de Xyl T3 produzida por *A. terreus* cultivado em piolho de algodão sujo como fonte de carbono.**Pág. 95**
- Tabela 3.3.** Resumo das etapas de purificação de Xyl T4 produzida por *A. terreus* cultivado em casca de soja como fonte de carbono.**Pág. 96**
- Tabela 3.4.** Parâmetros cinéticos determinados para xilanases purificadas de *A. terreus*, com xilana de bétula como substrato.**Pág. 103**
- Tabela 3.5.** Características físico-químicas descritas para xilanases purificadas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*. **Pág. 106**
- Tabela 3.6.** Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade das β -xilanases purificadas de *A. terreus* a partir do cultivo submerso com bagaço de cana de açúcar (Xyl T1 e Xyl T2).**Pág. 111**
- Tabela 3.7.** Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade das β -xilanases purificadas de *A. terreus* a partir do cultivo submerso com piolho de algodão sujo (Xyl T3) ou casca de soja (Xyl T4).**Pág. 112**
- Tabela 3.8.** Efeito de reagentes modificadores de aminoácidos e aminoácidos na atividade de β -xilanase de Xyl T1 e Xyl T2**Pág. 114**
- Tabela 3.9.** Especificidade do substrato de Xyl T1, Xyl T2 e Xyl T4.....**Pág. 116**

Tabela 4.1. Efeito inibidor de compostos fenólicos na atividade de holocelulases.....	
.....	Pág. 132
Tabela 4.2. Constantes cinéticas de Xyl T1 na presença e ausência de compostos fenólicos.	Pág. 151
Tabela 6.1. Análise bromatológica dos bagaços de cana.	Pág. 207

Lista de Abreviaturas

DEPC: dietil pirocarbonato	pNPM: ρ -nitrofenil- β -D-manopiranosídeo
DP: Desvio padrão	pNPX: ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo
DTNB: 5,5- ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico)	SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
DTP: 2,2-ditiodipiridina	TCA: Ácido tricloroacético
DTT: 1,4-ditiotreitól	TFA: Ácido trifluoroacético
EC: <i>Enzyme commission</i>	V_{max}: Velocidade máxima
EDC: 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) – carbodiimida	Xyl T1: Xilanase purificada a partir da fração concentrada proveniente do cultivo em bagaço de cana de açúcar
K_m: Constante de Michaelis-Menten	Xyl T2: Xilanase purificada a partir da fração ultrafiltrada proveniente do cultivo em bagaço de cana de açúcar
MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight	Xyl T3: Xilanase purificada a partir da fração ultrafiltrada proveniente do cultivo em piolho de algodão sujo
MFA: Microscopia de força atômica	Xyl T4: Xilanase purificada a partir da fração ultrafiltrada proveniente do cultivo em casca de soja
NBS: N-bromosuccinimida	
PMF: <i>Peptide Mass Fingerprinting</i>	
pNPA: ρ -nitrofenil- α -arabinopiranosídeo	
pNPG: ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo	

Resumo

Bagaço de cana de açúcar, piolho de algodão sujo e casca de soja são resíduos agroindustriais com elevado teor de holocelulose. O fungo filamentosso *Aspergillus terreus* foi cultivado por 6, 9, e 5 dias, nos meios contendo bagaço, piolho e casca de soja, respectivamente, como fontes de carbono. Quatro xilanases de baixas massas moleculares foram purificadas, com rendimentos variando entre 5,70 e 74,70% e maiores atividades no intervalo de pH 5,0-6,0 e temperaturas entre 45 e 60°C. Os valores de Km para xilana de bétula solúvel variaram entre 0,42 e 15,33 mg/mL e para xilana insolúvel 0,47 e 10,90 mg/mL. As variações dos valores de Vmax para xilanas solúvel e insolúvel foram 0,15 e 5,37 UI/mL e 0,08 e 2,46 UI/mL, respectivamente. As quatro enzimas foram ativadas pelo íon Mn^{2+} (10 mM) e inibidas pelos íons Hg^{2+} e K^+ (1 e 10 mM). MFA mostrou uma distribuição bimodal de partículas globulares, indicando que Xyl T1 é maior que Xyl T2. Xyl T1 e Xyl T2 foram específicas para xilana como substrato. A espectrometria de massa dos digestos trípticos de Xyl T1 e Xyl T2 mostrou dois espectros diferentes. Xyl T1 e Xyl T3 foram inibidas em maior ou menor grau por todos os compostos fenólicos enquanto que Xyl T2 e Xyl T4 foram bastante resistentes a todos os compostos fenólicos testados. Para Xyl T1, houve um aumento ou diminuição do Km aparente com xilana de bétula, dependendo do tipo de composto fenólico utilizado, entretanto houve uma diminuição do Km aparente de Xyl T2 para xilana de bétula, após a incubação desta enzima com todos os compostos fenólicos. A análise do hidrolisado de três tipos de polpas *kraft* e de xilana de bétula solúvel e insolúvel por Xyl T1 e Xyl T2 mostrou uma predominância na liberação de xilobiose indicando um mecanismo de ação do tipo endo. A ausência de atividade celulolítica demonstra que essas enzimas têm potencial para o uso no branqueamento de papel.

Abstract

The filamentous fungus *Aspergillus terreus* was cultivated for 6, 9, and 5 days in media containing bagasse, dirty cotton residue and soybean residue, respectively, as the carbon sources. Low-molecular-weight xylanases, named Xyl T1, Xyl T2, Xyl T3 and Xyl T4, were purified with purification yields ranging between 5.70 and 74.70% and higher activities in the pH range 5.0-6.0 and temperatures between 45 and 60°C. Km values for soluble and insoluble birchwood xylans were at the interval ranges of 0.42-15.33 mg/mL and 0.47-10.90 mg /mL, respectively. Vmax values for soluble and insoluble birchwood xylans ranged from 0.15 to 5.37 IU/mL and 0.08 to 2.46 IU/mL, respectively. All the above enzymes were activated by Mn²⁺ (10 mM) and inhibited by Hg²⁺ and K⁺ (1 and 10 mM). AFM showed a bimodal distribution of globular particles, indicating that Xyl T1 is larger than Xyl T2. Xyl T1 and Xyl T2 were specific for xylan as substrate. Mass spectrometry showed two different fingerprinting spectra for Xyl T1 and Xyl T2, indicating that they are distinct enzymes. Xyl T1 and Xyl T3 were inhibited in a greater or lesser degree by all phenolic compounds, while Xyl T2 and Xyl T4 were very resistant to the inhibitory effect of all phenolic compounds tested. The apparent Km for Xyl T1 over birchwood xylan increased or decreased depending on the type of phenolic compound used, however, the apparent Km values of Xyl T2, using birchwood xylan as substrate, decreased in the presence of all phenolic compounds. The hydrolysis of cellulose pulps and soluble and insoluble birchwood xylan by Xyl T1 and Xyl T2 showed predominance in the release of xylobiose indicating an endo-type mechanism. The absence of cellulolytic activity indicates that these enzymes have a potential for use in the pulp bleaching process.

Capítulo I

Introdução

Justificativa

e objetivos

1. Introdução

1.1. Consumo mundial de energia e aquecimento global

Há mais de um século, foi postulada a ideia de que o CO₂ proveniente da queima de combustíveis fósseis poderia levar a uma opacidade da atmosfera suficiente para aquecer a Terra (Arrhenius, 1896). No século XX, a população mundial quadruplicou, levando a um aumento no consumo de energia primária de aproximadamente 16 vezes. A teoria do efeito estufa causada por combustíveis fósseis tornou-se mais aceitável na medida em que observações foram sendo acumuladas e houve um melhor entendimento das ligações entre a queima de combustíveis fósseis, mudanças climáticas e impactos ambientais (Hoffert, Caldeira *et al.*, 2002). O CO₂ atmosférico aumentou de aproximadamente 275 ppm para aproximadamente 370 ppm, se não controlados, os níveis de CO₂ podem passar de 550 ppm ainda neste século. Modelos climáticos e paleontológicos sugerem que 550 ppm, se mantidos, poderiam eventualmente produzir um aquecimento global comparado em magnitude, mas com efeito oposto, ao resfriamento global visto na última Era do Gelo (Hoffert e Covey, 1992; Hoffert, Caldeira *et al.*, 2002).

Atualmente, o consumo energético primário mundial é de aproximadamente 12 TW, dos quais, 85% são de combustíveis fósseis (Hoffert, Caldeira *et al.*, 2002). O consumo mundial de energia primária cresceu 2,5% em 2011, menos da metade da taxa de crescimento experimentada em 2010, mas próximo da média histórica nos últimos 10 anos. O petróleo continua sendo o combustível líder no mundo, com 33,1% do consumo global de energia, mas o mesmo continua a perder sua cota de mercado pelo décimo

segundo ano consecutivo, e sua participação de mercado atual é a mais baixa desde 1965. Por outro lado, atualmente 30,3% da energia usada no mundo vêm do carvão, sendo esta a maior participação deste combustível no mercado desde 1969 (figura 1.1) (British Petroleum, 2012).

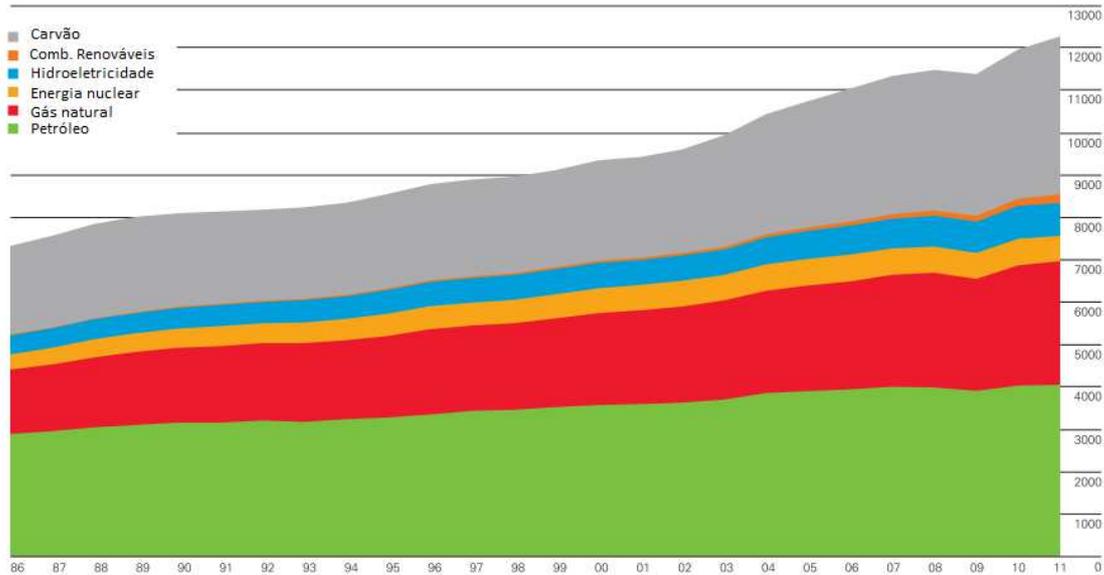


Figura 1.1. O consumo mundial de energia primária entre os anos de 1986 e 2011 (British Petroleum, 2012).

Entre as regiões do mundo, há um consumo diferente de cada uma das fontes energéticas. O carvão é o combustível dominante na região da Ásia-Pacífico, o gás natural é dominante na Europa e Eurásia, enquanto que o petróleo é o combustível dominante em todas as outras regiões. A participação de combustíveis renováveis ainda é muito baixa em todas as regiões (figura 1.2).

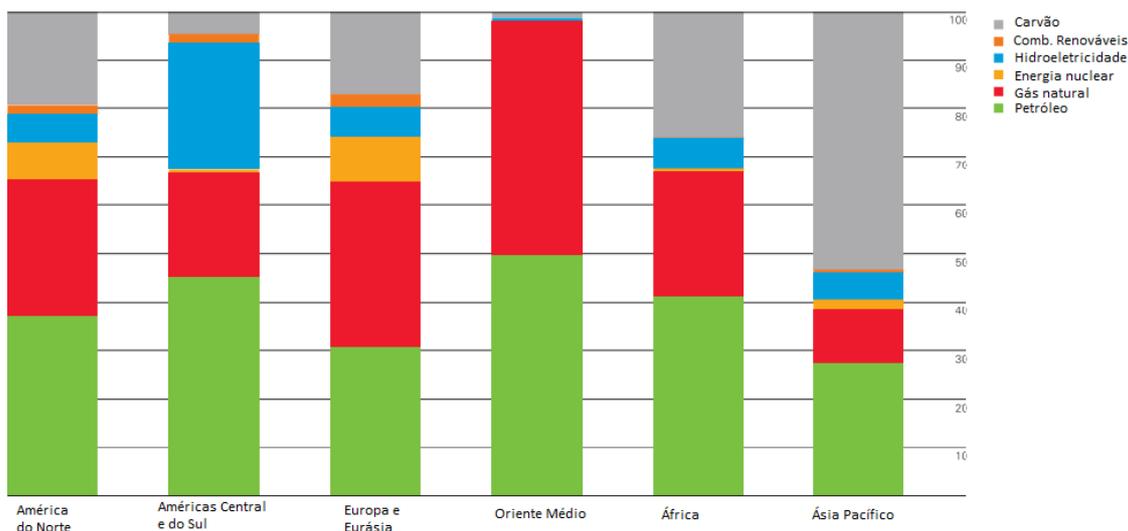


Figura 1.2. Matriz energética mundial em 2011 (British Petroleum, 2012).

Com relação apenas à produção de energia elétrica no Brasil, a principal fonte é a hidrelétrica, representando 64,21%, da matriz energética elétrica brasileira, conforme dados da figura 1.3. A energia gerada a partir da biomassa, é atualmente de 10.677.550 kW, correspondendo a 8,09% do total da energia elétrica produzida no país, já ultrapassando o percentual de produção a partir de petróleo (Aneel, 2013).

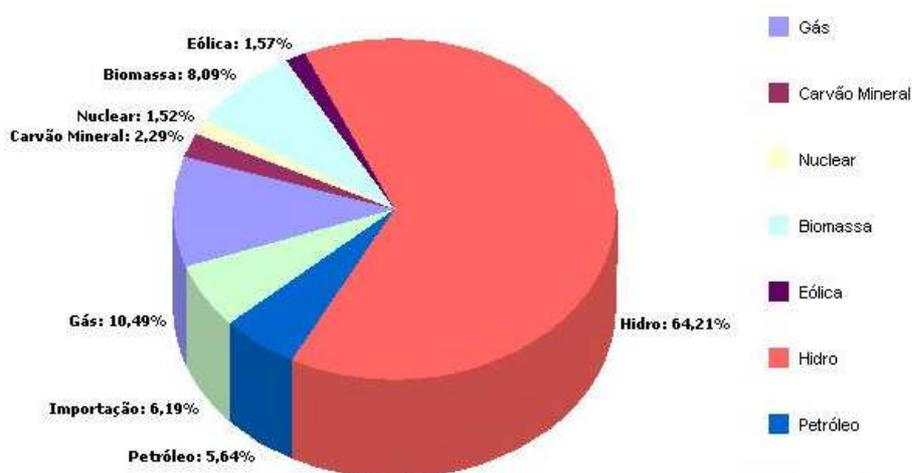


Figura 1.3. Matriz de energia elétrica brasileira (Aneel, 2013).

Embora as estimativas variem, as reservas de combustíveis fósseis economicamente exploráveis incluem quase um trilhão de toneladas de carvão, mais de um trilhão de barris de petróleo liquefeitos e mais de 150 trilhões de metros cúbicos de gás natural. No ano 2000, o consumo mundial de carvão, petróleo e gás, correspondeu a 0,5, 3,0 e 1,6% das reservas mundiais, respectivamente (Chow, Kopp *et al.*, 2003). Mantendo-se constantes as taxas de produção e consumo de energia no mundo, as reservas atualmente conhecidas de petróleo durariam cerca de 40 anos, as de gás natural, 64 anos e as de carvão, 155 anos. Embora muito simplificada, essa análise ilustra porque combustíveis fósseis não podem ser considerados como a principal fonte de energia no mundo por mais de uma ou duas gerações. Além disso, os custos de produção aumentarão à medida que as reservas se aproximarem da exaustão e que tecnologias mais caras serão usadas para explorar e extrair tais recursos. (Goldemberg, 2007). A figura 1.4 ilustra a quantidade de anos em que as três principais fontes energéticas mundiais não renováveis estariam disponíveis, se a produção e consumo de combustíveis mantiver a mesma taxa. Ao se dividir as reservas remanescentes no fim de cada ano pela produção no mesmo ano, o resultado é o período de tempo em que as reservas restantes durariam, se a produção e consumo mantivessem a mesma taxa. Nota-se que o carvão é o único combustível para os quais as reservas durariam mais de um século (British Petroleum, 2012).

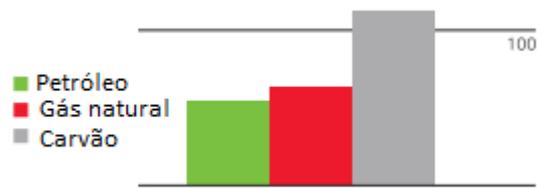


Figura 1.4. Reservas (em anos) para a produção de combustíveis fósseis no ano de 2011 (British Petroleum, 2012).

Além da questão do esgotamento, o uso de combustíveis fósseis apresenta sérios problemas ambientais, particularmente, o aquecimento global (Goldemberg, 2007). Uma reconstrução da história recente do conteúdo de CO₂ da atmosfera estabeleceu um aumento de 13% na concentração de CO₂ atmosférico desde o período pré-industrial até o ano de 1958, e um aumento de 29% desde o mesmo período até o ano de 1995. Estudos baseados em isótopos de carbono relativamente abundantes confirmam o papel do carbono derivado de combustíveis fósseis no aumento observado na quantidade de CO₂ (Holdren e Smith, 2000).

Como alternativa para o problema do aquecimento global causado pelos combustíveis fósseis, os biocombustíveis produzidos a partir de fontes energéticas renováveis podem ajudar a reduzir a queima destes combustíveis e a produção de CO₂. Os biocombustíveis produzidos a partir de biomassa podem ajudar a reduzir tanto a dependência mundial por petróleo quanto a emissão de CO₂. Isso ocorre porque o CO₂ liberado na queima se iguala ao CO₂ gasto na fotossíntese, de forma que não há um aumento na quantidade total de CO₂ na atmosfera (Naik, Goud *et al.*, 2010).

1.2. Lignocelulose e parede celular vegetal

A lignocelulose, o principal componente da biomassa vegetal, constitui cerca de metade da matéria produzida pela fotossíntese. É composta de principalmente de dois tipos de polissacarídeos – celulose e hemicelulose, além da lignina. O termo holocelulose refere-se ao arranjo entre os polissacarídeos que compõem a parede celular vegetal. A ocorrência, abundância, distribuição e estrutura da holocelulose são dependentes da espécie, tecido e condições de crescimento da planta (Andreaus, Filho *et al.*, 2008).

A lignina é um complexo fenólico amorfo, tridimensional, de subunidades aromáticas, normalmente derivadas de fenilalanina. A lignina é hidrofóbica e altamente resistente à degradação química e biológica. Funciona como uma matriz em volta dos polissacarídeos da parede celular das plantas, fornecendo uma rigidez adicional e tornando as paredes impermeáveis à água (Whetten e Sederoff, 1995; Andreaus, Filho *et al.*, 2008).

Por outro lado, a celulose, o polissacarídeo mais abundante na Terra, é um polímero altamente ordenado de celobiose, frequentemente cristalino, representando mais de 50% da massa das madeiras. O tamanho das moléculas de celulose varia entre as diferentes fontes (Martinez, Speranza *et al.*, 2005; Andreaus, Filho *et al.*, 2008). A justaposição de cadeias de celulose é mantida por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals que mantêm o alinhamento paralelo da estrutura cristalina da microfibrila. Como resultado deste alinhamento, a celulose é insolúvel em diversos solventes e apresenta baixa acessibilidade a ácidos e a hidrólise enzimática (Balat e Balat, 2009). Estimativas indicam a produção de 1,5 trilhões de toneladas de

celulose anualmente, representando uma fonte inesgotável de matéria-prima para produtos biocompatíveis e ambientalmente corretos (Kumar, Singh *et al.*, 2008).

As hemiceluloses são o segundo polissacarídeo natural mais abundante e representam 25-35% da biomassa lignocelulósica. São polissacarídeos heterogêneos de pentoses (D-xilose, D-arabinose), hexoses (D-manose, a D-glucose, D-galactose) e ácidos D-galacturônico e D-glucurônico, formados pela união dos açúcares por ligações glicosídicas β -1,4 e, ocasionalmente, β -1,3, mas, ligações do tipo α -1,2 e α -1,5 também são encontradas entre resíduos de açúcares e a cadeia principal. (Pérez, Muñoz-Dorado *et al.*, 2002). As hemiceluloses podem ser classificadas como xilanas, glicomananas, galactanas ou arabinanas, de acordo com o principal resíduo de açúcar presente em sua estrutura polimérica (Beg, Kapoor *et al.*, 2001; Bhat e Hazlewood, 2001). Os açúcares C5 e C6, ligados por ligações glicosídicas 1,3, 1,6 e 1,4 são normalmente acetilados, formam uma estrutura solta, muito hidrófila, que funciona como uma cola entre a celulose e lignina (Andreaus, Filho *et al.*, 2008). Madeiras de angiospermas ou plantas floríferas (*hardwoods*) contém principalmente xilanas, enquanto glucomananas são mais comuns em gimnospermas ou coníferas (*softwoods*) (Saha, 2003; Polizeli, Rizzatti *et al.*, 2005; Teixeira, Siqueira *et al.*, 2010).

A parede celular vegetal é uma estrutura complexa, responsável por, entre outras funções, conferir resistência física às células vegetais. Consiste de três camadas (figura 1.5 e 1.6), a camada mais externa é chamada de lamela média, é a primeira camada formada durante a divisão celular, e é formada principalmente por compostos pécnicos e proteínas. Os compostos pécnicos formam géis hidrofílicos que unem uma célula a outra e proporcionam tecidos coesos (Siqueira e Filho, 2010). A parede primária é uma estrutura altamente hidratada, com uma distribuição relativamente espaçada das microfibrilas de celulose, embebida em uma matriz gelatinosa que aumenta de tamanho

durante o crescimento da planta (Siqueira e Filho, 2010). A parede secundária está depositada sobre a parede primária e apresenta-se dividida em três camadas: S1, S2 e S3.

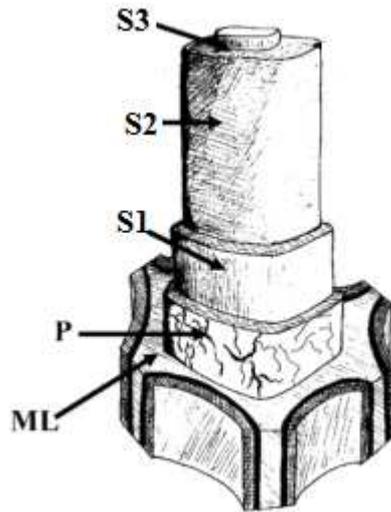


Figura 1.5. Camadas da parede celular vegetal: ML (Lamela média), P (parede primária), S1, S2 e S3 (camadas da parede secundária) (Pérez, Muñoz-Dorado *et al.*, 2002), com modificações.

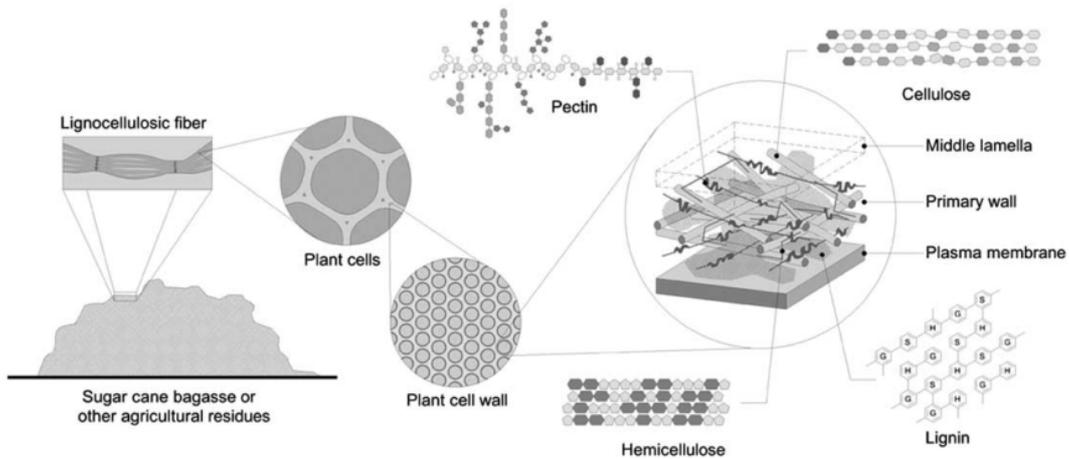


Figura 1.6. Estrutura da parede celular de resíduos agrícolas (Siqueira e Filho, 2010).

Estas três camadas se organizam de modo a formar uma malha de polímeros entrelaçados por ligações covalentes e interações não covalentes. Principalmente nas paredes primárias, a rede de celulose-hemicelulose é permeada por pectinas, um tipo de polissacarídeo altamente hidrofílico que confere maior hidratação à estrutura. Além destes, também são encontrados outros componentes não estruturais como extrativos polares (fenóis e taninos), extrativos apolares (óleos e esteróis) (Martinez, Speranza *et al.*, 2005).

1.2.1. Xilanas

As xilanas são a principal classe de hemiceluloses em angiospermas, contribuindo com 15-30% do peso úmido total, mas são menos abundantes em gimnospermas, que contêm 7-12% de xilanas. São heteropolissacarídeos compostos principalmente de D-xilose, um açúcar de cinco carbonos que pode ser convertido em fonte de energia em diversas células microbianas. Além de xilose, as xilanas podem conter arabinose, ácido glucurônico e ácidos p -cumárico, acético e ferúlico. Xilanas de diferentes fontes, como gramíneas, cereais e madeira, diferem na sua composição (figura 1.7) (Filho, 1998; Saha, 2003).

De acordo com seus substituintes mais comuns, a xilana pode ser classificada como homoxilana linear, arabinoxilana, glucuronoxilana, glucuronoarabinoxilana e galactoglucuronoarabinoxilanas. Homoxilanas são formadas apenas por resíduos de D-xilose e não são comuns na natureza, tendo sido isoladas de poucas fontes como, por

exemplo, talos de tabaco. De acordo com seus substituintes, as xilanas podem ser classificadas em quatro grandes grupos: 1) Arabinoxilanas: são comumente isoladas de cereais e têm apenas cadeias laterais formadas de unidades de α -L-arabinofuranosil. 2) Glucuronoxilanas possuem o ácido α -D-glucurônico ou o seu derivado 4-O-metil-éter como único substituinte. 3) Glucuronoarabinoxilanas, tipicamente encontradas em gimnospermas, possuem tanto o ácido α -D-glucurônico ou o seu derivado 4-O-metil-éter, como α -L-arabinofuranosil. (Filho, 2004; Polizeli, Rizzatti *et al.*, 2005; Motta, Andrade *et al.*, 2013). 4) Galactoglucuronoarabinoxilanas são caracterizadas pela presença do resíduo β -D-galactopiranosil como cadeia lateral, além dos grupos já presentes em glucuronoarabinoxilanas (Motta, Andrade *et al.*, 2013).

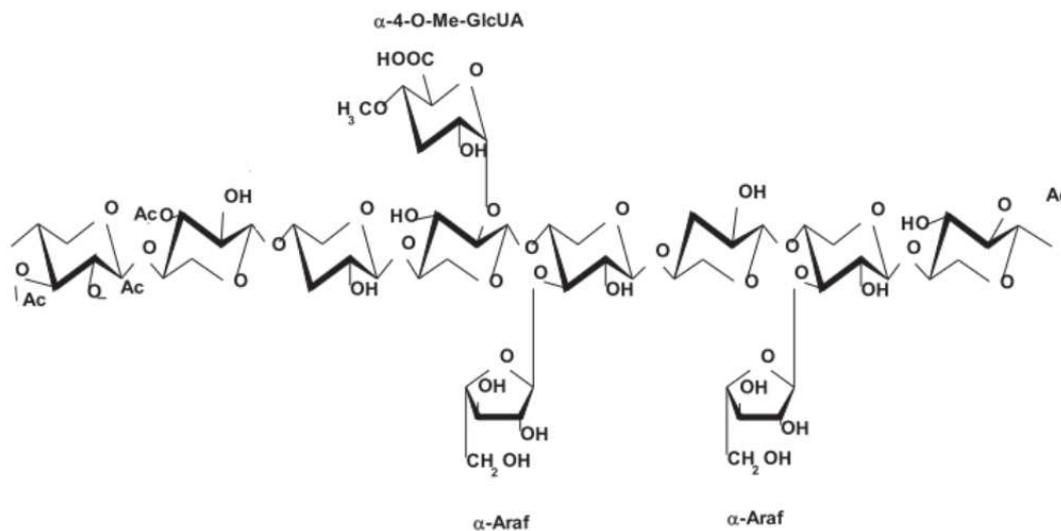


Figura 1.7. Estrutura de xilana. Ac: grupo acetil; α -Araf: α -arabinofuranose; α -4-O-Me-GlcA: Ácido α -4-O-metil-glucurônico (Sunna e Antranikian, 1997), com modificações.

Xilanas são encontradas principalmente na parede celular secundária e forma uma interface entre a lignina e os polissacarídeos. É mais provável que a xilana esteja covalentemente ligada com os resíduos fenólicos da lignina e também interaja com os outros polissacarídeos (Kulkarni, Shendye *et al.*, 1999; Beg, Kapoor *et al.*, 2001).

1.3. O papel da biomassa no sistema energético mundial

O uso contínuo de combustíveis fósseis para suprir uma grande parcela da demanda energética mundial tem consequências ambientais negativas significativas. Assim, há um grande interesse na utilização de fontes renováveis para suprir nossas necessidades de combustível e matérias-primas químicas. Em vista do aumento dos preços do petróleo bruto devido a crescente demanda de combustíveis, a necessidade de fontes alternativas de energia deverá aumentar significativamente nos próximos anos. A parede celular vegetal representa metade do carbono orgânico da biosfera, sendo um substrato renovável abundante e, portanto, um potencial candidato para substituir uma grande fração de produtos que atualmente são derivados de combustíveis fósseis. Existem muitos microrganismos encontrados na natureza, que podem eficientemente degradar a parede celular e utilizar os subprodutos da sua degradação para sua alimentação (Minic e Jouanin, 2006; Smeets, Faaij *et al.*, 2007; Moreira, Milanezi *et al.*, 2011).

Dentre as alternativas aplicadas à redução das emissões de gases do efeito estufa destaca-se a substituição dos combustíveis de origem fóssil pelos combustíveis obtidos de fontes renováveis. A biomassa lignocelulósica é atualmente considerada a

única grande fonte renovável que pode produzir uma fracção significativa de combustíveis líquidos e materiais renováveis no futuro, pois a energia armazenada na fotossíntese a cada ano é de aproximadamente 30 vezes a energia consumida anualmente para o transporte. Os biocombustíveis podem ser produzidos a partir de material orgânico vegetal (ex.: milho, trigo, cana-de-açúcar, beterraba, mandioca, etc), resíduos das culturas agrícolas (ex.: palha e casca de arroz, sabugo e espigas de milho, farelo de trigo) ou outros tipos de resíduos (ex.: resíduos residenciais, resíduos de papel, derivados de madeira utilizada nas construções entre outros). (Neves, Kimura *et al.*, 2007; Huang e Zhang, 2011). Uma grande variedade de biocombustíveis pode ser produzida a partir da biomassa lignocelulósica, incluindo etanol (Huang e Zhang, 2011; Goldemberg, 2013), butanol e/ou álcoois de cadeias longas (Atsumi, Hanai *et al.*, 2008; Zhang, Sawaya *et al.*, 2008), eletricidade (Campbell, Lobell *et al.*, 2009; Logan, 2009), hidrogênio (Chow, Kopp *et al.*, 2003; Ye, Wang *et al.*, 2009), hidrocarbonetos (Serrano-Ruiz e Dumesic, 2011; Wang, Huang *et al.*, 2011) e ceras (Steen, Kang *et al.*, 2010).

Segundo previsões da Agência Internacional de Energia, as fontes renováveis de energia terão aumento progressivo em suas cotas no mercado energético mundial. A energia gerada a partir da biomassa, já no ano de 2040, iguala-se em importância ao petróleo. Ainda segundo previsões da mesma agência, no ano de 2050, a biomassa será a principal fonte de energia, suprimindo 24,94% da energia consumida no mundo, um aumento de quase 11% em relação ao ano de 2009 (Iea, 2013). Estima-se que apenas os EUA têm potencial para produzir mais de 1,3 bilhões de toneladas (base seca) de biomassa por ano. Um bilhão de toneladas de biomassa seca produz entre 80 e 130 bilhões de galões de etanol celulósico (Huang e Zhang, 2011; Santos, Queiróz *et al.*, 2012).

Matérias primas como milho, trigo, cana-de-açúcar, beterraba, mandioca, entre outros, podem ser usadas para produção de etanol de primeira geração. Atualmente, o etanol é o primeiro combustível renovável produzido a partir de plantas como cana de açúcar no Brasil e milho nos Estados Unidos. O CO₂ produzido pela queima do etanol é assimilado pelas plantas, de forma que o etanol não gera um desequilíbrio de gases de efeito estufa como fazem gasolina, diesel e outros combustíveis derivados de petróleo. Preocupações energéticas e o aquecimento global têm levado outros países a desenvolverem suas próprias produções de etanol. Apesar da maior produtividade do bagaço de cana, 2.105 galões de etanol por acre, contra 495 galões por acre do milho, os Estados Unidos ultrapassaram a produção brasileira de etanol em 2006 e atualmente são os maiores produtores de etanol no mundo. Por outro lado, existem preocupações relacionadas ao fornecimento de matérias primas, incluindo o impacto na biodiversidade, e da competição com culturas alimentares. Além disso, o aumento da demanda de biocombustíveis de primeira geração resulta em um aumento dos custos de manutenção dos solos agricultáveis e do uso de fertilizantes, que podem ser relacionados com o aquecimento global e também com a contaminação das águas subterrâneas. Culturas agrícolas são principalmente desenvolvidas como monoculturas que necessitam de mais pesticidas, que são agentes redutores da biodiversidade do meio ambiente. Somado a isto, grandes áreas de florestas tropicais estão sendo devastadas para produção destas monoculturas, especialmente no Brasil, por meio de queimadas que liberam CO₂ e levam a erosão dos solos. Atualmente, a produção de biocombustíveis de primeira geração é rentável, com aproximadamente 50 bilhões de litros produzidos anualmente. A maior desvantagem dos biocombustíveis de primeira geração é o debate “alimento *versus* combustível”, sendo que uma das razões para o aumento do preço dos alimentos em algumas partes do mundo é o aumento na produção

de tais combustíveis (Goldschmidt, 2008; Naik, Goud *et al.*, 2010; Santos, Gómez *et al.*, 2011).

As matérias-primas renováveis utilizadas para a produção do etanol podem ser divididas em três grupos principais: as que contêm sacarose, como cana-de-açúcar, açúcar de beterraba, sorgo doce e frutas; as de material amiláceo, como milho, trigo, arroz, batata, mandioca, batata doce e cevada e as de biomassa lignocelulósica, como madeira, palha, casca e gramíneas. No ano de 2009, a produção de etanol como um combustível veicular foi quase inteiramente dependente do amido e açúcares existentes nas culturas agrícolas (Balat e Balat, 2009), sendo este um combustível de primeira geração. Os atuais meios de produção estão longe de ser capazes de fornecer bioetanol para suprir a demanda mundial. Nesse sentido, pesquisadores e governos tem dado especial atenção à exploração da energia disponível na biomassa lignocelulósica, com o intuito de produzir maior quantidade de biocombustíveis e de forma mais eficiente e sustentável. Atualmente, a maioria da biomassa proveniente do bagaço de cana de açúcar e milho é desperdiçada ou ineficientemente queimada. Essa biomassa é formada basicamente de polissacarídeos. O problema é que esses polissacarídeos são ligados entre eles de formas complexas, formando uma rede entrelaçada de polímeros, que são muito difíceis de separar. Entretanto, uma vez hidrolisados em açúcares livres, esses polissacarídeos podem ser fermentados para produzir etanol (Santos, Gómez *et al.*, 2011).

Grandes quantidades de lignocelulose são geradas diariamente como resíduos industriais, agrícolas e urbanos, contribuindo para o aumento da poluição ambiental. Desta forma, o uso destes resíduos como fonte renovável de energia, via produção de açúcares que podem ser convertidos a combustíveis líquidos, têm tornado-se de grande

interesse nos últimos anos (Demain, Newcomb *et al.*, 2005; Kumar, Singh *et al.*, 2008). Combustíveis gerados a partir de materiais lignocelulósicos são vistos como potenciais substitutos para o petróleo. Etanol lignocelulósico reduz a emissão de gases de efeito estufa, além de aliviar a dependência do petróleo estrangeiro e fornecer um impulso econômico para as comunidades rurais (Farrell, Plevin *et al.*, 2006).

A matéria-prima lignocelulósica tem o potencial de fornecer novos biocombustíveis, os chamados biocombustíveis de segunda geração. Estes são produzidos a partir de biomassa lignocelulósica, um material barato, abundante e não alimentar, disponível a partir das plantas. Entretanto, atualmente, a produção destes combustíveis não é rentável, pois há uma quantidade de obstáculos técnicos que precisam ser superados para concretização de todo seu potencial, como a recalcitrância natural deste material. A biomassa vegetal representa um dos mais abundantes e subutilizados recursos biológicos do planeta, e é visto como uma promissora fonte de material para biocombustíveis líquidos e matérias-primas. O etanol celulósico é um exemplo de biocombustível de segunda geração. (Naik, Goud *et al.*, 2010).

Esses novos biocombustíveis têm potencial para significativamente reduzir a produção de CO₂, com a vantagem de não competirem com a produção de alimentos. A tecnologia de conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis para a produção de etanol vem sendo considerada como uma alternativa promissora para atender a demanda mundial por combustíveis. Apesar de já existirem tecnologias disponíveis para o processamento da celulose, a maioria esbarra em dificuldades técnicas ou econômicas (Santos, Queiróz *et al.*, 2012). A figura 1.8 ilustra diferentes vias para a produção de biocombustíveis a partir da biomassa lignocelulósica.

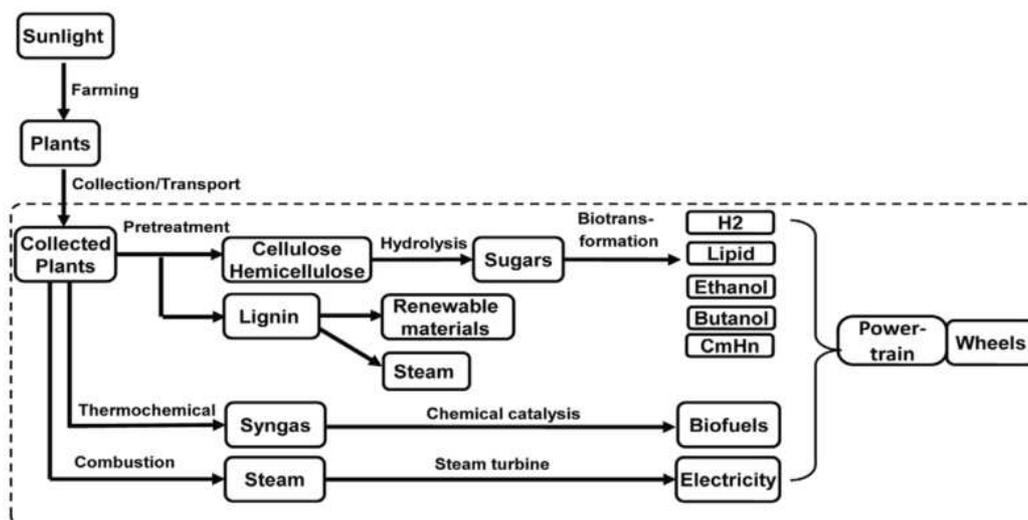


Figura 1.8. Diferentes vias para a produção de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica (Huang e Zhang, 2011).

As dificuldades no estabelecimento de metodologias eficazes para a aplicação da biomassa lignocelulósica como fonte precursora para a produção do bioetanol, mesmo esbarrando em entraves relacionados à recalcitrância natural destes materiais, têm impulsionado a pesquisa científica na busca de alternativas viáveis para a utilização desta fonte renovável de energia, principalmente a partir de produtos residuais oriundos das atividades agrícolas, resíduos domésticos e industriais que oferecem amplas possibilidades de produção do bioetanol em larga escala, favorecendo seu consumo global como combustível renovável. Assim, espera-se que a biomassa lignocelulósica possa se tornar a matéria-prima prioritária para a produção do bioetanol em um futuro próximo (Cardona e Sanchez, 2007).

O processo de produção do bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica inclui etapas de deslignificação da biomassa e a hidrólise da celulose e hemicelulose a monossacarídeos. A hidrólise pode ser feita por tratamentos com ácidos, em elevadas

temperaturas ou por ação enzimática. A hidrólise ácida requer alto consumo energético e equipamentos resistentes à corrosão por ácidos o que torna o custo deste processo elevado. Entretanto, a hidrólise enzimática não acarreta essas desvantagens. A ação sinérgica de enzimas resulta num processo de sacarificação mais eficiente resíduos lignocelulósicos visando a produção de bioetanol. (Sharma e Kumar, 2013)

Diante das perspectivas de que, em um futuro próximo, o bioetanol seja um substituto eficiente tanto econômico quanto ambiental para os combustíveis fósseis, duas alternativas são particularmente importantes quanto à utilização da biomassa lignocelulósica: 1) como substrato para a sacarificação e liberação de hexoses e pentoses que possam ser fermentados, posteriormente, e 2) como fonte de carbono para o cultivo de microrganismos produtores de enzimas.

De acordo com o Departamento de Energia dos Estados Unidos, diversos produtos de elevado valor agregados, como o bioetanol, bioplásticos, surfactantes, biodiesel, óleos e ácidos graxos, detergentes, adesivos, biogás, lubrificantes, tintas e pigmentos, podem ser obtidos pela bioconversão da biomassa lignocelulósica (Turner, Mamo *et al.*, 2007).

1.3.1. Bagaço de cana de Açúcar

No Brasil, o cultivo da cana de açúcar é diretamente relacionado à produção de açúcar e etanol de primeira geração e representa uma grande parcela da produção agrícola brasileira. Atualmente a área cultivada com cana de açúcar (safra 2012/2013) é de 8.520,5 mil hectares, havendo um aumento de 2% em relação à safra passada. O

estado de São Paulo é o principal produtor com 51,78% da produção, seguido pelos estados de Goiás e Minas Gerais com 8,52% e 8,47%, respectivamente. A produtividade da cana de açúcar está estimada em 69.846 kg/ha, 4,2% maior que a safra de 2011/2012. A produção de etanol total é estimada em 23,62 bilhões de litros (Conab, 2012b). A figura 1.9 mostra o crescimento da produção de cana de açúcar desde o ano de 1970.

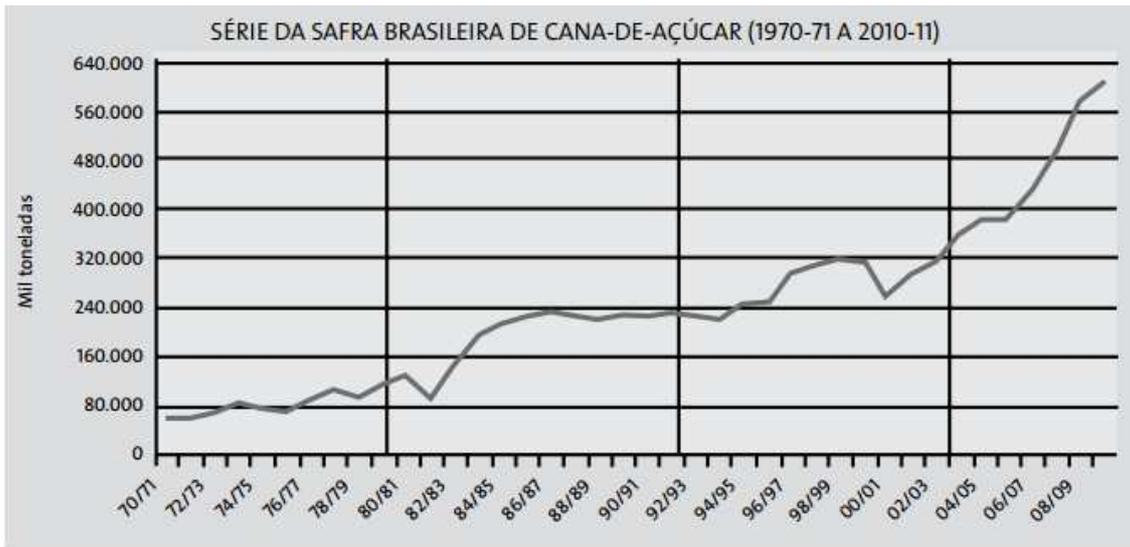


Figura 1.9. Safra de cana de açúcar no Brasil (1970/1971 a 2010/2011) (Conab, 2011).

O Brasil é o maior produtor de cana de açúcar seguido de Índia e China (Kadam, 2002; Chandel, Silva *et al.*, 2012). Com uma produção tão expressiva, uma das maiores quantidades de resíduos lignocelulósicos é o bagaço de cana de açúcar (ou bagaço, como é geralmente chamado). O bagaço é um resíduo fibroso de talos que sobram após a trituração e extração do caldo de cana. É um resíduo lignocelulósico da indústria açucareira usado pelas próprias indústrias como combustível para as caldeiras. Com o maior interesse na utilização de resíduos agrícolas, o bagaço já vem sendo aplicado em vários processos, como geração de eletricidade, produção de polpa e papel (Pandey, Soccol *et al.*, 2000).

Um fato importante é que a energia renovável produzida pelas usinas é cerca de nove vezes maior que o insumo fóssil utilizado na sua produção. Isso torna o processo mais atraente entre os usos comerciais de energia alternativa sob o ponto de vista de sustentabilidade, com a redução de emissões de gases de efeito estufa em cerca de 12,7 milhões de toneladas de carbono (equivalente) (Cgee, 2001).

A complexa composição química do bagaço de cana limita seu uso como alimento para gado e outros ruminantes, em contraste com a palha de trigo, palha de arroz, palha de sorgo, etc, o que o torna um substrato mais atrativo para a aplicação industrial. O bagaço de cana de açúcar é uma excelente matéria prima para ser utilizada como combustível de segunda geração, pois um terço da energia da cana de açúcar está contida no bagaço (figura 1.10). Os polissacarídeos contidos no bagaço podem ser hidrolisados por coquetéis químicos ou enzimáticos a açúcares monoméricos (glicose, manose, xilose, arabinose, galactose, etc). Com a colheita mecanizada, que está progredindo rapidamente no Brasil, a quantidade disponível de tais materiais é cada vez maior. Os açúcares obtidos a partir da hidrólise do bagaço podem ser convertidos a produtos de alto valor agregado, como produção de xilitol e ácidos orgânicos, biocombustíveis, além de ser um bom indutor na produção de enzimas (Siqueira, Siqueira *et al.*, 2010b; Goldemberg, 2011; Chandel, Silva *et al.*, 2012). Um estudo envolvendo o uso de bagaço de cana de açúcar para produzir etanol utilizando sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) com *Zymomonas mobilis* obteve produtividade de 60% (Santos, Camelo *et al.*, 2010). As tecnologias capazes de hidrolisar a holocelulose em seus monossacarídeos a um custo baixo irão tornar possível a utilização dos mais diversos resíduos de plantas para a produção de etanol. Essas tecnologias podem, em teoria, dobrar a produtividade do bioetanol, contribuindo assim para evitar a expansão da área de cultivo necessária para produzir biocombustíveis de

primeira geração e, conseqüentemente, evitar impactos nas ambientais pelo uso inadequado da terra (Santos, Gómez *et al.*, 2011).

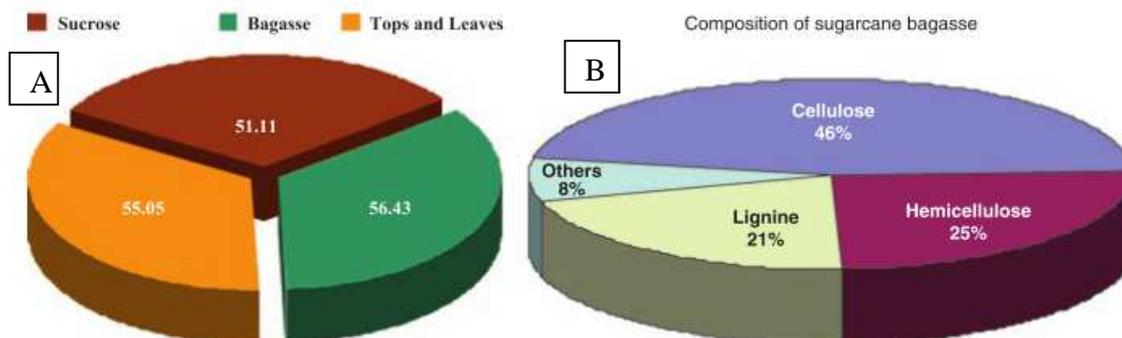


Figura 1.10. Energia contida em 1000 toneladas de cana de açúcar (A) e composição do bagaço de cana de açúcar (B) (Goldemberg, 2011).

1.3.2. Casca de Soja

O Brasil é o segundo maior produtor e exportador de soja no mundo, ficando atrás apenas dos EUA. Na segunda década do século XX, o teor de óleo e proteína do grão da soja começou a despertar o interesse das indústrias mundiais. Com a expansão do cultivo de soja, o Brasil se tornou o segundo maior produtor mundial da cultura, com produtividade média de 2.823 kg/ha, chegando a alcançar até 3.000 kg /ha. A cultura alcançou na safra de 2008/2009 a produção de $57,1 \times 10^6$ toneladas do grão (Embrapa, 2010). A casca do grão soja, composta de aproximadamente 60% de celulose, 10,4% de hemicelulose e 9,4% de lignina (Siqueira, Siqueira *et al.*, 2010a), representa o maior subproduto das indústrias processadoras dessa semente. Na safra de 2011/2012, esta cultura ocupou uma área de 25 milhões de hectares, totalizando uma produção de 66,37

milhões de toneladas (Conab, 2012a). No ano de 2010, os Estados Unidos tiveram uma produção deste grão em torno de 90,6 milhões de toneladas por ano (Embrapa, 2010). A grande produção mundial da soja torna os resíduos lignocelulósicos desta cultura um dos mais expressivos em volume e uma alternativa interessante para bioconversão do seu hidrolisado a produtos de alto valor agregado.

1.3.3. Piolho de algodão

Os resíduos que se acumulam nas indústrias têxteis de beneficiamento de algodão são coletados de diferentes fases da fiação do algodão. Formam basicamente três frações de diferentes qualidades: uma fração fibrosa mais limpa que contém fibras de algodão curtas com um comprimento inferior a 15 mm, que podem ser reutilizadas para a produção de fios de baixa qualidade, denominadas piolho de algodão limpo; uma segunda fração mais suja que contém fibras mais curtas, cascas e outras matérias escuras, denominada piolho de algodão sujo e o pó de filtro, (Siqueira, Siqueira *et al.*, 2010b). Na safra 2011/2012, o Brasil teve 1.396 milhões de hectares plantados com algodão (Conab, 2012a), produzindo grande volume deste resíduo. O piolho de algodão, constituído por aproximadamente 66% de celulose, 10% de hemicelulose e 6,3% de lignina (Siqueira, Siqueira *et al.*, 2010a), possui grande potencial para utilização em processos biotecnológicos.

1.4. Holocelulases e a degradação de biomassa vegetal

Num mundo onde a sustentabilidade tem sido um tema constante, a utilização de enzimas em processos industriais torna-se indispensável, uma vez que estas reduzem a utilização de produtos químicos poluentes.

O uso de enzimas tornou-se atualmente uma necessidade, pois elas produzem efeitos similares aos dos produtos químicos, com a vantagem de serem ecologicamente corretas. As vantagens do uso de enzimas ao invés de produtos químicos são a alta eficiência de conversão, a ausência de perda de substrato devido às modificações químicas, e o uso de condições de operação físico-químicas mais moderadas e não-corrosivas (temperatura de reação mais baixa, não utilização de extremos de pH e uso de reagentes biodegradáveis e não-tóxicos), o que torna o processo mais amigável ao meio ambiente (Andreas, Filho *et al.*, 2008; Sharma e Kumar, 2013).

A degradação de materiais lignocelulósicos a açúcares monoméricos tem grande importância, uma vez que os açúcares fermentescíveis podem ser utilizados como matérias-primas em inúmeros de processos de produção biotecnológica, incluindo a produção de etanol. A hidrólise completa da porção hemicelulósica requer a participação de enzimas responsáveis pelas clivagens das cadeias principais e laterais. Dois tipos básicos de enzimas são necessários para realizar a quebra de polissacarídeos da parede celular vegetal: as exohidrolases, que são responsáveis por atuar nas ligações glicosídicas terminais e liberar as unidades de monossacarídeos terminais, enquanto que as endohidrolases clivam ligações glicosídicas internas de forma aleatória ou em posições específicas, geralmente dentro da cadeia (Coughlan, 1992; Moreira, Milanezi *et al.*, 2011).

A degradação completa da holocelulose requer a utilização de glicosil hidrolases GHs, como as celulases, hemicelulases e pectinases que são eficientemente secretadas por fungos filamentosos como sistemas multienzimáticos capazes de atuarem de maneira sinérgica (Turner, Mamo *et al.*, 2007; Moreira, Ferreira *et al.*, 2012) (figura 1.11). Uma ampla variedade de enzimas hidrolíticas é necessária para a degradação da holocelulose. Dentro desse grupo enzimático, destacam-se xilanase, mananase, poligalacturonase, endoglicanase e exoglicanase.

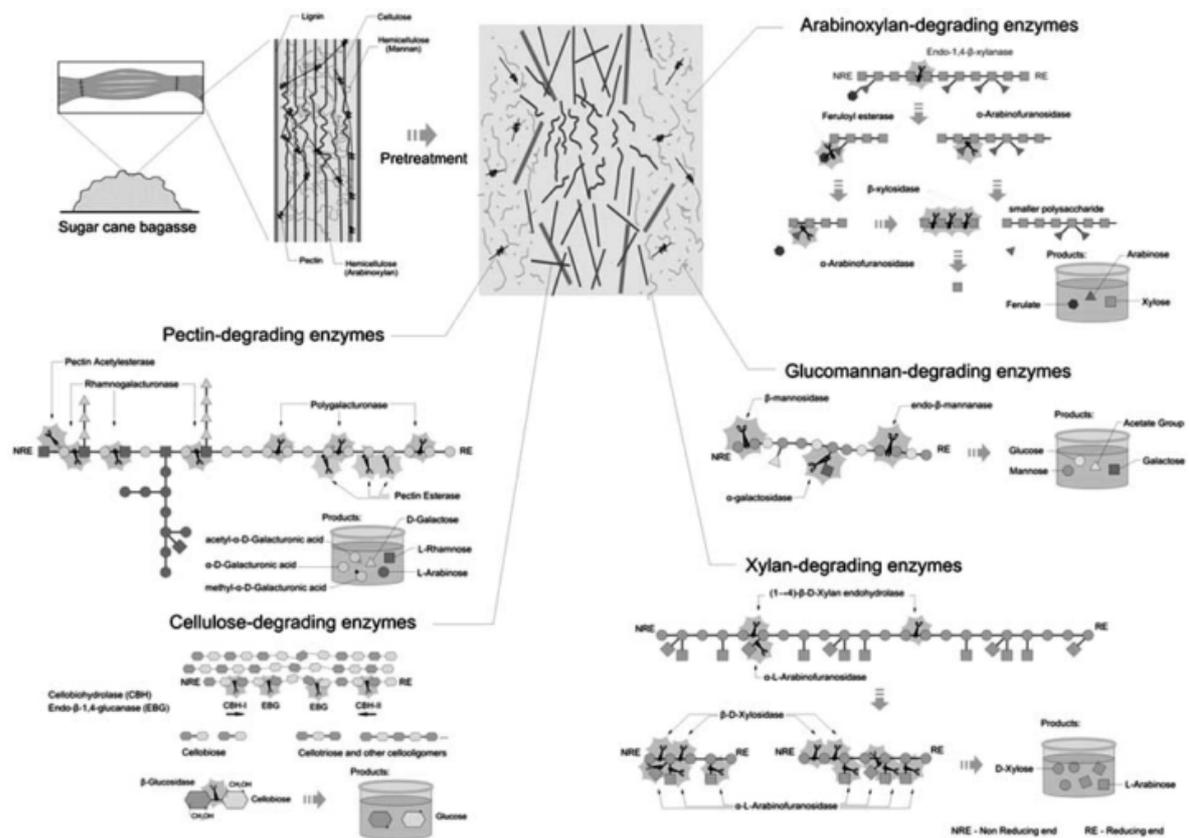


Figura 1.11. Ataque enzimático na estrutura holocelulósica (Siqueira e Filho, 2010).

1.4.1. Xilanases

As xilanases (EC 3.2.1.8) são GHs que catalisam a hidrólise de ligações 1,4-β-D-xilosídicas da cadeia principal da xilana (Collins, Gerday *et al.*, 2005). O sistema de classificação CAZy (Carbohydrate-Active enZymes, disponível em www.cazy.org) é baseado no princípio da similaridade de sequências e apresenta 132 famílias de GHs reconhecidas pelo *Enzyme Commission* (EC). Os fungos produzem enzimas hidrolíticas que estão presentes em 20 dessas famílias, apresentando as atividades necessárias para o processo de hidrólise da biomassa (Jovanovic, Magnuson *et al.*, 2009). Enzimas da mesma família apresentam estrutura tridimensional e mecanismos moleculares similares (Collins, Gerday *et al.*, 2005). Xilanases são encontradas nas famílias 5, 7, 8, 10, 11, 26 e 43 (Juturu e Wu, 2012). As GHs são comumente referidas como glicosidases e podem catalisar a hidrólise de ligações dos tipos O-, N- e S- entre glicosídeos. Cada família de GHs contém proteínas que são relacionadas pela sequência de aminoácidos e pelo dobramento estrutural nativo. Esta inter-relação se estende para a maquinaria catalítica e mecanismos moleculares que são conservados para a grande maioria das GHs. Usualmente, o mecanismo catalítico de retenção ou inversão da configuração em torno do carbono anomérico resultante é também conservado dentro das famílias de GHs (Gloster, Turkenburg *et al.*, 2008). A eficiência catalítica de GHs é aumentada na presença de módulos de ligação ao carboidrato (CBMs), pois esses podem apresentar mais de um sítio ligante e exibir uma gama de especificidades a substratos. A ligação do CBM ao polissacarídeo específico aumenta a concentração da hidrolase na superfície do substrato polimérico e mantém a enzima próxima ao substrato, levando a uma degradação mais rápida do polissacarídeo (Andreaus, Filho *et al.*, 2008).

Outro tipo de classificação baseia-se na homologia da sequência de aminoácidos e análise dos *clusters* hidrofóbicos (HCA). De acordo com a HCA, as xilanases estão subdivididas em duas famílias, F e G, análogas às famílias 10 e 11 das GHs, compreendendo xilanases de alta (35 kDa) e baixa (20 kDa) massa molecular, respectivamente (Kulkarni, Shendye *et al.*, 1999).

As xilanases das famílias 10 e 11 compartilham o mesmo mecanismo de ação: catalisam a hidrólise de xilana mantendo a configuração estereoquímica do carbono anomérico (C1 do anel de xilopirranose) após a clivagem da ligação glicosídica. Isso indica um mecanismo de duplo-deslocamento, no qual um intermediário covalente glicosil-enzima, o íon oxicarbono é formado e subsequentemente hidrolisado via estados de transição (Clark, 1997). Dois resíduos conservados de ácido glutâmico são responsáveis pela catálise. Os grupos carboxílicos dos resíduos catalíticos estão envolvidos na formação do intermediário; um deles age como ácido, protonando o substrato, enquanto o segundo executa o ataque nucleofílico durante a formação do intermediário α -glicosil-enzima (inversão da configuração β para α). Numa etapa posterior, o primeiro grupo carboxilato funciona como uma base geral, subtraindo um próton de uma molécula de água que, por conseguinte, ataca o carbono anomérico. Isso leva a uma segunda substituição na qual o carbono anomérico passa novamente por um estado de transição para dar origem a um produto com a configuração β (inversão da configuração de α para β) (figura 1.12). Dessa forma, o resultado final é a retenção da configuração estereoquímica no centro anomérico (Collins, Gerday *et al.*, 2005).

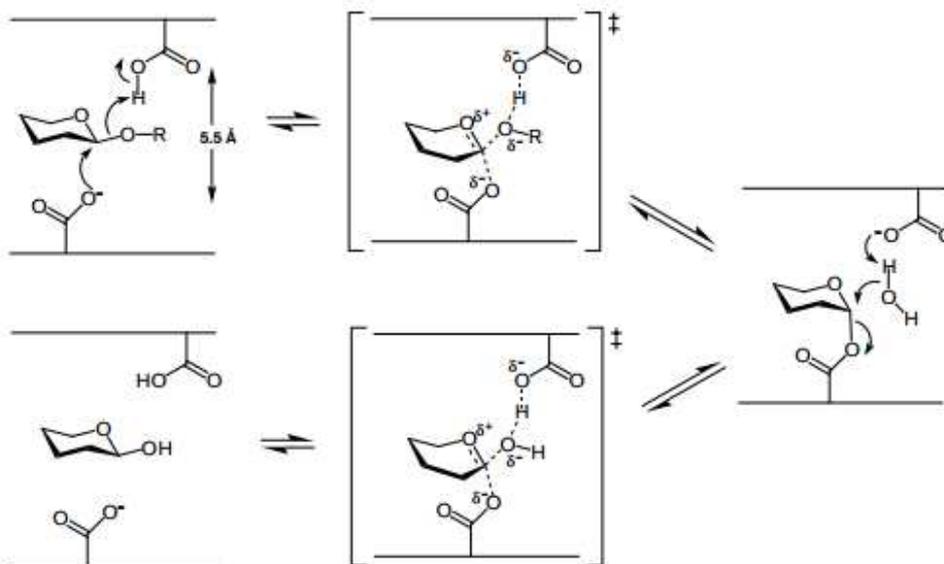


Figura 1.12. Mecanismo geral de hidrólise de ligação glicosídica com retenção anomérica (Rye e Withers, 2002).

As xilanases são produzidas principalmente por microrganismos e participam da quebra de paredes celulares vegetais, juntamente com outras hidrolases. Xilanases podem ainda ser encontradas em protozoários, crustáceos, insetos, caramujos e sementes de plantas terrestres. Entre as fontes microbianas, fungos filamentosos são de especial interesse, pois eles secretam essas enzimas em um meio extracelular e os níveis de xilanases são bem mais altos que aqueles encontrados em leveduras e bactérias (Sunna e Antranikian, 1997; Filho, 2004).

As xilanases são extracelulares e induzidas por seu substrato, o que determina a importância da escolha do meio nutricional. Em geral, a indução da xilanase é um fenômeno complexo e o nível da resposta de um indutor varia de acordo com o organismo (Kulkarni, Shendye *et al.*, 1999). Devido à sua estrutura heterogênea, a degradação da xilana requer um complexo de enzimas para sua total degradação, conforme mostrado na figura 1.13. Estudos mostram que efeitos sinérgicos entre as enzimas xilanolíticas aumentam a suscetibilidade do polímero de xilana ao ataque

enzimático (Van Dyk e Pletschke, 2012). Da mesma forma, as xilanases provenientes de microrganismos crescidos sobre diferentes fontes de carbono também atuam em sinergia sobre a xilana, aumentando a quantidade de açúcares liberados durante a hidrólise (Moreira, Mattos *et al.*, 2008). β -Xilanases e as enzimas que atuam sobre a cadeia lateral são necessárias para uma eficiente quebra da xilana a açúcares fermentescíveis ou oligossacarídeos. As enzimas de cadeia lateral removem os substituintes que estão ligados a vários pontos da xilana, criando mais locais para posterior hidrólise enzimática. Endo-1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8) é a enzima crucial para a despolimerização da xilana, pois ela hidrolisa ligações glicosídicas entre os resíduos de D-xilose na cadeia principal, reduzindo o grau de polimerização do substrato, gerando xilooligossacarídeos. A xilana não é atacada aleatoriamente, mas as ligações selecionadas para hidrólise dependerão do comprimento da cadeia, grau de ramificação, e da presença de substituintes. A hidrólise completa da xilana depende ainda da ação sinérgica de várias enzimas que agem hidrolisando as ligações das cadeias laterais, como, α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), que hidrolisa a arabinose, α -glucuronidase (EC 3.12.1.-), que remove o ácido glucurônico, acetilxilanaesterase (EC 3.1.1.6), que hidrolisa o grupo acetato, feruloilesterase (EC 3.1.1.-) e cumaroilesterase (EC 3.1.1.-) agem hidrolisando os ácidos ferúlico e p -cumárico, respectivamente. Finalmente as β -xilosidases (EC 3.2.1.37) hidrolisam a xilooligossacarídeos ou xilobiose liberando resíduos de β -D-xilopiranosil a partir da extremidade não redutora, e sua afinidade por xilooligossacarídeos é inversamente proporcional ao seu grau de polimerização (Wong, Tan *et al.*, 1988; Biely, Vrsanska *et al.*, 1997; Liab, Azadi *et al.*, 2000; Filho, 2004; Moreira, Milanezi *et al.*, 2011). Por exemplo, muitas xilanases não clivam as ligações glicosídicas entre as unidades de xilose, se estas foram ramificadas, de forma que a cadeia lateral deve ser clivada antes do esqueleto de xilana ser

completamente hidrolisado. De forma oposta, muitas enzimas acessórias só clivam as ligações laterais de xilooligossacarídeos, necessitando da ação prévia de β -xilanases (Polizeli, Rizzatti *et al.*, 2005; Sharma e Kumar, 2013).

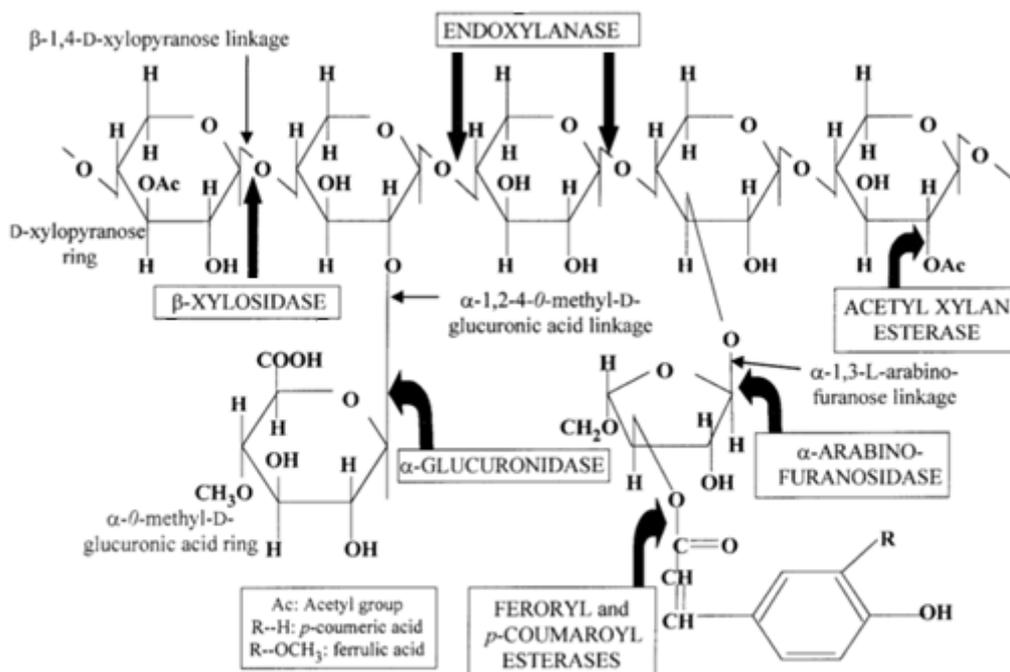


Figura 1.13. Estrutura hipotética de uma xilana, mostrando diferentes grupos substituintes, com sítios de ataque de xilanases microbianas (Beg, Kapoor *et al.*, 2001), com modificações.

Enzimas de fontes microbianas têm tido um crescimento rápido no campo de biotecnologia. O mercado global de enzimas industriais estava próximo a um milhão de dólares em 1990 e passou de dois milhões de dólares no ano de 2005 (Krishna, 2005). Este mercado foi estimado em 3,3 bilhões no ano de 2010 e espera-se que atinja 4,4

bilhões de dólares em 2015 (Sharma e Kumar, 2013). O mercado para enzimas com aplicações industriais é separado em três setores:

1. Enzimas para aplicação técnica - com estimativas de alcançar cerca de US\$ 1,5 bilhão em 2015, um crescimento de 6,6% ao ano. As maiores vendas de enzimas de aplicação técnica ocorrem no mercado de couro, seguido pelo setor de produção de bioetanol;
2. Enzimas envolvidas na manipulação de alimentos e bebidas - com estimativas que devem alcançar US\$ 1,3 bilhão em 2015, um crescimento anual de 5,1% ao ano. Neste segmento, as maiores vendas de enzimas serão para os mercados de leite e derivados, cujo valor alcançado em 2009 foi de US\$ 401,8 milhões;
3. Enzimas para nutrição animal, com valorização estimada para 2012 de US\$ 375 milhões (Bcc Research, 2011).

As xilanases comerciais são produzidas no Japão, Finlândia, Alemanha, Irlanda, Dinamarca, Canadá e Estados Unidos. Sua comercialização tem finalidade biotecnológica na indústria alimentícia, na extração, clarificação e estabilização de sucos de frutas e vegetais, clarificação de cervejas, na redução da viscosidade e incremento da recuperação de aromas, óleos essenciais, sais minerais, vitaminas e panificação. Na indústria farmacêutica, o complexo xilanolítico é utilizado na formulação de produtos dietéticos ou medicamentos para tratar problemas digestivos; na indústria química, os produtos hidrolíticos da xilana podem ser convertidos em combustíveis líquidos, solventes e adoçantes. Xilanases também têm aplicação na redução da viscosidade de rações animais, além da produção de bioetanol. Entretanto,

seu principal uso encontra-se na indústria do papel, onde são utilizadas no branqueamento da polpa de celulose. Para esta finalidade, é necessário que as xilanases sejam livres de celulases, a fim de se evitar a danificação das fibras da polpa. As xilanases também encontram aplicação nas biorefinarias, participando da bioconversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis. Apesar de a celulose ser o polímero mais abundante da biomassa, a remoção da hemicelulose altera substancialmente a estrutura e a acessibilidade da lignocelulose às outras enzimas participantes do processo (Kirk, Borchert *et al.*, 2002; Polizeli, Rizzatti *et al.*, 2005; Medeiros, Silva Jr *et al.*, 2007; Merino e Cherry, 2007; Sharma e Kumar, 2013).

1.5. *Aspergillus terreus*

Os fungos compõem um grupo extenso e diversificado, podendo ser encontrados como organismos unicelulares (leveduriformes) ou pluricelulares (filamentosos), sendo a última, a forma mais abundante. São responsáveis por secretar inúmeras enzimas de grande eficiência na degradação de nutrientes disponíveis no ambiente, que serão absorvidos por suas células o que gera uma grande habilidade na degradação da biomassa lignocelulósica. Essa eficiência na degradação de biomassa lignocelulósica faz com que os fungos sejam capazes de adaptarem-se a diferentes fontes de carbono e nitrogênio, permitindo-os ocupar uma série de nichos ecológicos como solos, madeira e outros resíduos de materiais orgânicos. Alguns fungos são conhecidos por seus impactos negativos no bem estar dos animais e seres humanos, como agentes causadores de doenças em plantas (ex.: ferrugem em cereais), biodegradação (apodrecimento e mofo) ou como agentes patogênicos em animais (ex.: produção de toxinas e micoses). Entretanto, alguns fungos ditos saprófitos têm inúmeras aplicações,

dentre esses destacam-se os filos Ascomycota e Basidiomycota (Bennett, 1998; Bouws, Wattenberg *et al.*, 2008).

O gênero *Aspergillus* é constituído por um grupo de fungos filamentosos com um grande número de espécies. São fungos de dispersão cosmopolita, podendo ser encontrados principalmente em material vegetal em decomposição. Algumas espécies de *Aspergillus* regularmente produzem esporos sexuados e assexuados, em outras espécies, a forma sexuada é rara e há ainda espécies nas quais as formas sexuadas nunca foram vistas. Os fungos do gênero *Aspergillus* foram primeiramente reconhecidos como organismo em 1729 por Micheli. São amplamente dispersos por todos os ambientes e consistem aproximadamente 250 espécies oficialmente reconhecidas e formam um importante grupo de fungos filamentosos, os Ascomycetes. O grupo é morfologicamente definido pelo formato característico de seu conidióforo, onde se encontram os conidiósporos (esporos), e das células da hifa de onde se ramificam os conidióforos. O tamanho, o arranjo e a cor dos conidiósporos são ainda características para a identificação e divisão interna do gênero em subgrupos. Neste grupo também são encontrados agentes patogênicos humanos, como o causador da aspergilose em humanos, *A. fumigatus*; produtor de aflatoxina, *A. flavus* e *A. parasiticus* (De Vries e Visser, 2001; Ward, Qin *et al.*, 2005; Bennett, 2010).

As espécies de fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* podem possuir propriedades benéficas, como é o caso do *Aspergillus terreus*, muito utilizado na indústria para produção de importantes ácidos orgânicos, dentre eles pode se destacar o ácido itacônico, além disso, é fonte inicial para a droga lovastatina, utilizada para reduzir o colesterol.

A Lovastatina, um metabólito secundário de *A. terreus*, é um potente redutor do colesterol e foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1987 como

droga contra hipercolesterolemia. Embora várias espécies de fungos possam produzir a lovastatina, apenas a produção deste composto por *A. terreus* tornou-se comercial para a produção de grande quantidade de lovastatina para uso como medicamento anti-colesterol. A lovastatina foi vendida sob o nome de MevacorTM e tornou-se uma droga de sucesso para a Merck (Bennett, 1998; Shu, 1998; Jahromi, Liang *et al.*, 2012).

A. terreus é usado ainda para a produção de ácido itacônico, tem um amplo espectro de aplicações na produção industrial de resinas, pode ser facilmente incorporado em polímeros e pode servir como um substituto para acrílico. É utilizado de 1 a 5% em resinas e também na produção de fibras sintéticas, em revestimentos, adesivos, espessantes e agentes ligantes. Desde 1960, a produção de ácido itacônico é conseguida por fermentação com *A. terreus* em meios contendo açúcar (Willke e Vorlop, 2001; Steiger, Blumhoff *et al.*, 2013). Embora outros micro-organismos também produzam o ácido itacônico, *A. terreus* é o principal produtor devido à alta produção de 80-86 g/L (Kuenz, Gallenmuller *et al.*, 2012).

2. Justificativas

Atualmente, a sustentabilidade vem sendo largamente discutida, com isso há necessidade da criação e aperfeiçoamento de processos industriais menos agressivos ao meio ambiente. A aplicação das enzimas em processos industriais nos quais tradicionalmente usa-se produtos químicos altamente corrosivos, traz as vantagens de um processo não poluente. A aplicação de enzimas em processos industriais frequentemente elimina o uso de altas temperaturas, solventes orgânicos, extremos de pH e ao mesmo tempo oferece aumento da especificidade da reação, pureza do produto e redução de impacto ambiental.

A hidrólise enzimática da lignocelulose permite agregar valores a resíduos, o que ajuda a controlar o problema da poluição além de fornecer bioenergia reduzindo nossa dependência por combustíveis fósseis. O desenvolvimento de tecnologias que têm resíduos agroindustriais, como bagaço de cana de açúcar, piolho de algodão e casca de soja como fonte de energia tem sido muito comum nas últimas décadas sendo uma tendência cada vez mais abrangente no mundo.

Nos últimos anos tem havido um progresso considerável na identificação de parâmetros importantes para a obtenção de xilanases com alta atividade, o que influencia economicamente seu processo de produção. O custo da fonte de carbono, bem como dos outros componentes do meio, tem um papel importante na economia da produção de xilanases (Siqueira, Siqueira *et al.*, 2010b).

A aplicação de enzimas holocelulolíticas (celulases, hemicelulases e pectinases) em processos de bioconversão de biomassa lignocelulósica tem levado a um crescimento acelerado no mercado de enzimas hidrolíticas o que tem influenciado diversos trabalhos com objetivos de caracterizar e purificar enzimas fúngicas. A utilização comercial de enzimas já pode ser vista em diversos países, principalmente na Europa e América do Norte, com aplicações nas mais diversas áreas.

Sabe-se que o fungo recém-isolado de resíduos de algodão da indústria têxtil *Aspergillus terreus* é um eficiente produtor de xilanase (Siqueira, Siqueira *et al.*, 2010b). *A terreus* tem sido bastante estudado por sua habilidade de produzir enzimas do complexo xilanolítico (Rogalski, Szczodrak *et al.*, 1985; Hrmová, Petráková *et al.*, 1991; Ghanem, Yusef *et al.*, 2000; Chantasingh, Pootanakit *et al.*, 2006; Pal, Ray *et al.*, 2006; Lakshmi, Rao *et al.*, 2009).

Esta tese de doutorado faz parte do projeto do INCT do Bioetanol/CNPq, rede simbiota e rede centro-oeste, de forma que foram priorizadas as análises com as enzimas provenientes do extrato bruto cultivado com bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono.

3. Objetivos

Utilizar a biomassa lignocelulósica de resíduos agroindustriais para o cultivo em meio líquido de *Aspergillus terreus* e consequente produção de holocelulases que degradem substratos diversos, visando a aplicação industrial destas enzimas.

4. Bibliografia

ANDREAUS, J.; FILHO, E. X. F.; BON, E. P. D. S. Biotechnology of Holocellulose-Degrading Enzymes. In: HOU, C. T. e SHAW, J. (Ed.). **Biocatalysis and Bioenergy**: John Wiley & Sons, Inc., 2008. p.195-229.

ANEEL. 2013. Disponível em: <
<http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/OperacaoCapacidadeBrasil.asp>. >.
Acesso em: 29/05/2013.

ARRHENIUS, S. On the Influence of Carbonic Acid in the Air upon the Temperature of the Ground. **Philosophical Magazine and Journal of Science**, v. 41, n. 5, p. 237-276, 1896.

ATSUMI, S.; HANAI, T.; LIAO, J. C. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. **Nature**, v. 451, n. 7174, p. 86-89, 2008.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, n. 11, p. 2273-2282, 2009.

BCC RESEARCH. BCC Research. 2011. Disponível em: <
<http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030f.html>. >. Acesso em: 03/06/2013.

BEG, Q.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326-338, 2001.

BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 66, n. 2-3, p. 101-7, 1998.

BENNETT, J. W. **An overview of the genus *Aspergillus***. Caiser Academic Press, Portland, 2010.

BHAT, M. K.; HAZLEWOOD, G. P. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: BEDFORD, M. R. e PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**: CABI Publishing 2001. p.11- 23.

BIELY, P.; VRSANSKA, M.; TENKANEN, M.; KLUEPFEL, D. Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n. 1-3, p. 151-66, 1997.

BOUWS, H.; WATTENBERG, A.; ZORN, H. Fungal secretomes--nature's toolbox for white biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 381-8, 2008.

BRITISH PETROLEUM. Statistical Review of World Energy 2012. Inglaterra, 2012. Disponível em: <
http://www.bp.com/assets/bp_internet/globalbp/globalbp_uk_english/reports_and_publications/statistical_energy_review_2011/STAGING/local_assets/pdf/statistical_review_of_world_energy_full_report_2012.pdf. >. Acesso em: 23/05/2013.

CAMPBELL, J.; LOBELL, D.; FIELD, C. Greater transportation energy and GHG offsets from bioelectricity than ethanol. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1055-1057, 2009.

CARDONA, C. A.; SANCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, 2007.

CGEE. centro de Gestão e Estudos Estratégicos. 2001. Disponível em: <
http://www.cgee.org.br/reformulacao/publicacoes/biblioteca_pub.html. >.

CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S.; CARVALHO, W.; SINGH, O. V. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 11-20, 2012.

CHANTASINGH, D.; POOTANAKIT, K.; CHAMPREDA, V.; KANOKRATANA, P.; EURWILAICHITR, L. Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 46, n. 1, p. 143-149, 2006.

CHOW, J.; KOPP, R. J.; PORTNEY, P. R. Energy Resources and Global Development. **Science**, v. 302, n. 5650, p. 1528-1531, 2003.

CLARK, A. **Biodegradation of cellulose: enzymology and biotechnology**. Estados Unidos: CRC Press, 1997.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3-23, 2005.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_05_05_15_45_40_geracao_te_rmo_baixa_res..pdf>. Acesso em: 02/06/2013.

_____. Companhia Nacional de Abastecimento. 2012a. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_10_17_16_09_58_boletim_gr_aos_-_julho_2012.pdf>. Acesso em: 02/06/2013.

_____. Companhia Nacional de Abastecimento. 2012b. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_12_10_34_43_boletim_ca_na_portugues_12_2012.pdf>. Acesso em: 27/05/2013.

COUGHLAN, M. P. Towards an understanding of the mechanism of action of main chain cleaving xylanases. In: VISSER, J.; BELDMAN, J. G., *et al* (Ed.). **Xylan and Xylanases**. Amsterdam: Elsevier, 1992. p.111-139.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 497-522, 2001.

DEMAIN, A. L.; NEWCOMB, M.; WU, J. H. Cellulase, *clostridia*, and ethanol. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 1, p. 124-54, 2005.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2010. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294&cod_pai=17>. Acesso em: 03/06/2013.

FARRELL, A. E.; PLEVIN, R. J.; TURNER, B. T.; JONES, A. D.; O'HARE, M.; KAMMEN, D. M. Ethanol Can Contribute to Energy and Environmental Goals. **Science**, v. 311, n. 5760, p. 506-508, 2006.

FILHO, E. X. Xilanases. In: SAID, S. e PIETRO, R. C. L. R. (Ed.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. cap. 8, p.137-148.

FILHO, E. X. F. Hemicellulases and biotechnology. In: PANDALAI, S. G. (Ed.). **Recent research developments in microbiology**. Trivandrum, 1998. p.165-176.

GHANEM, N. B.; YUSEF, H. H.; MAHROUSE, H. K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. **Bioresource Technology**, v. 73, n. 2, p. 113-121, 2000.

GLOSTER, T. M.; TURKENBURG, J. P.; POTTS, J. R.; HENRISSAT, B.; DAVIES, G. J. Divergence of catalytic mechanism within a glycosidase family provides insight into evolution of carbohydrate metabolism by human gut flora. **Chemistry & Biology**, v. 15, n. 10, p. 1058-1067, 2008.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a Sustainable Energy Future. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 808-810, 2007.

GOLDEMBERG, J. The Role of Biomass in the World's Energy System. In: BUCKERIDGE, M. S. e GOLDMAN, G. H. (Ed.). **Routes to Cellulosic Ethanol**: Springer New York, 2011. cap. 1, p.3-14.

GOLDEMBERG, J. Sugarcane Ethanol: Strategies to a Successful Program in Brazil. In: LEE, J. W. (Ed.). **Advanced Biofuels and Bioproducts**: Springer New York, 2013. cap. 2, p.13-20.

GOLDSCHMIDT, F. From Cellulose to Ethanol: Engineering Microorganisms to Produce Biofuel. **Institute of Biogeochemistry and Pollutant Dynamics**, p. 1-17, 2008.

HOFFERT, M. I.; CALDEIRA, K.; BENFORD, G.; CRISWELL, D. R.; GREEN, C.; HERZOG, H.; JAIN, A. K.; KHESHGI, H. S.; LACKNER, K. S.; LEWIS, J. S.; LIGHTFOOT, H. D.; MANHEIMER, W.; MANKINS, J. C.; MAUEL, M. E.; PERKINS, L. J.; SCHLESINGER, M. E.; VOLK, T.; WIGLEY, T. M. L. Advanced

Technology Paths to Global Climate Stability: Energy for a Greenhouse Planet. **Science**, v. 298, n. 5595, p. 981-987, 2002.

HOFFERT, M. I.; COVERY, C. Deriving global climate sensitivity from palaeoclimate reconstructions. **Nature**, v. 360, p. 573-576, 1992.

HOLDREN, J. P.; SMITH, K. R. Energy, the environment and health. In: BROWN, M. M.; DESAI, N., *et al* (Ed.). **Energy and the challenge of sustainability**. Washington, D.C., 2000.

HRMOVÁ, M.; PETRÁKOVÁ, E.; BIELY, P. Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo- and heterodisaccharides composed of glucose and xylose. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 541-547, 1991.

HUANG, W. D.; ZHANG, Y. H. Energy efficiency analysis: biomass-to-wheel efficiency related with biofuels production, fuel distribution, and powertrain systems. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22113, 2011.

IEA. International Energy Agency. 2013. Disponível em: <<http://www.iea.org/publications/>>. Acesso em: 20/05/2013.

JAHROMI, M. F.; LIANG, J. B.; HO, Y. W.; MOHAMAD, R.; GOH, Y. M.; SHOKRYAZDAN, P. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* using agro-biomass as substrate in solid state fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 196-264, 2012.

JOVANOVIC, I.; MAGNUSON, J.; COLLART, F.; ROBBERTSE, B.; ADNEY, W.; HIMMEL, M.; BAKER, S. Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 687-697, 2009.

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

KADAM, K. L. Environmental benefits on a life cycle basis of using bagasse-derived ethanol as a gasoline oxygenate in India. **Energy Policy**, v. 30, n. 5, p. 371-384, 2002.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

KRISHNA, C. Solid-State Fermentation Systems - An Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 1-2, p. 1-30, 2005.

KUENZ, A.; GALLENMULLER, Y.; WILLKE, T.; VORLOP, K. D. Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 5, p. 1209-1216, 2012.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews** v. 23, n. 4, p. 411-456, 1999.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.

LAKSHMI, G. S.; RAO, C. S.; RAO, R. S.; HOBBS, P. J.; PRAKASHAM, R. S. Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: A statistical optimization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 1, p. 51-57, 2009.

LIAB, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J. S.; ERIKSSON, K. E. L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1-2, p. 89-94, 2000.

LOGAN, B. E. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 375-381, 2009.

MARTINEZ, A. T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUENAS, F. J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLEN, F.; MARTINEZ, M. J.; GUTIERREZ, A.; DEL RIO, J. C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 195-204, 2005.

MEDEIROS, R. G.; SILVA JR, F. G. D.; BÁO, S. N.; HANADA, R.; FERREIRA FILHO, E. X. Application of xylanases from Amazon Forest fungal species in bleaching of eucalyptus kraft pulps. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 2, p. 231-238, 2007.

MERINO, S.; CHERRY, J. Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization. In: OLSSON, L. (Ed.). **Biofuels**: Springer Berlin Heidelberg, v.108, 2007. cap. 66, p.95-120.

MINIC, Z.; JOUANIN, L. Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 7–9, p. 435-449, 2006.

MOREIRA, L. R. S.; FERREIRA, G. V.; SANTOS, S. S. T.; RIBEIRO, A. P. S.; SIQUEIRA, F. G.; FERREIRA FILHO, E. X. The hydrolysis of agro-industrial residues by holocellulose-degrading enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 498-505, 2012.

MOREIRA, L. R. S.; MATTOS, I.; MONCLARO, A. V.; SANTOS, S. S. T.; JENSEN, A. T.; SIQUEIRA, F.; FILHO, E. X. F. The use of lignocellulosic substrates as carbon sources for production of xylan-degrading enzymes from *Acrophialophora nainiana*. **Current Topics in Biochemical Research**, v. 10, n. 2, p. 35-45, 2008.

MOREIRA, L. R. S.; MILANEZI, N. V. G.; FILHO, E. X. F. Enzymology of Plant Cell Wall Breakdown: An Update. In: BUCKERIDGE, M. S. e GOLDMAN, G. H. (Ed.). **Routes to Cellulosic Ethanol**: Springer New York, 2011. cap. 6, p.73-96.

MOTTA, F.; ANDRADE, C.; SANTANA, M. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. In: CHANDEL, A. K. e SILVA, S. S. (Ed.). **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**: InTech, 2013. cap. 10,

NAIK, S. N.; GOUD, V. V.; ROUT, P. K.; DALAI, A. K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 578-597, 2010.

NEVES, M. A.; KIMURA, T.; SHIMIZU, N.; NAKAJIMA, M. State of the Art and Future Trends of Bioethanol Production **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2007.

PAL, A.; RAY, L.; CHATTOPADHYAY, P. Purification and immobilization of an *Aspergillus terreus* xylanase: Use of continuous fluidized bed column reactor. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 163-168, 2006.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53-63, 2002.

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

ROGALSKI, J.; SZCZODRAK, J.; DAWIDOWICZ, A.; ILCZUK, Z.; LEONOWICZ, A. Immobilization of cellulase and β -xylanase complexes from *Aspergillus terreus* F-413 on controlled porosity glasses. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, n. 8, p. 395-400, 1985.

RYE, C. S.; WITHERS, S. G. Glycosidase mechanisms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, n. 5, p. 619-629, 2002.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279-91, 2003.

SANTOS, D.; CAMELO, A.; RODRIGUES, K.; CARLOS, L.; PEREIRA, N., JR. Ethanol Production from Sugarcane Bagasse by *Zymomonas mobilis* Using Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) Process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1, p. 93-105, 2010.

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

SANTOS, W.; GÓMEZ, E.; BUCKERIDGE, M. Bioenergy and the Sustainable Revolution. In: BUCKERIDGE, M. S. e GOLDMAN, G. H. (Ed.). **Routes to Cellulosic Ethanol**: Springer New York, 2011. cap. 2, p.15-26.

SERRANO-RUIZ, J. C.; DUMESIC, J. A. Catalytic routes for the conversion of biomass into liquid hydrocarbon transportation fuels. **Energy & Environmental Science**, v. 4, n. 1, p. 83-99, 2011.

SHARMA, M.; KUMAR, A. Xylanases: An overview. **British Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-28, 2013.

SHU, Y.-Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of natural products**, v. 61, n. 8, p. 1053-1071, 1998.

SIQUEIRA, F.; SIQUEIRA, A.; SIQUEIRA, E.; CARVALHO, M.; PERETTI, B.; JARAMILLO, P.; TEIXEIRA, R.; DIAS, E.; FELIX, C.; FILHO, E. Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues. **Biodegradation**, v. 21, n. 5, p. 815-824, 2010a.

SIQUEIRA, F.; SIQUEIRA, E.; JARAMILLO, P. M. D.; SILVEIRA, M. H. L.; ANDREAUS, J.; COUTO, F. A.; BATISTA, L. R.; FILHO, E. X. F. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 20-26, 2010b.

SIQUEIRA, F. G.; FILHO, E. X. F. Plant Cell Wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications. **Bentham Science Publishers**, v. 7, n. 1, p. 55-60, 2010.

SMEETS, E. M.; FAAIJ, A. P.; LEWANDOWSKI, I. M.; TURKENBURG, W. C. A bottom-up assessment and review of global bio-energy potentials to 2050. **Progress in Energy and combustion science**, v. 33, n. 1, p. 56-106, 2007.

STEEN, E. J.; KANG, Y.; BOKINSKY, G.; HU, Z.; SCHIRMER, A.; MCCLURE, A.; DEL CARDAYRE, S. B.; KEASLING, J. D. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 559-562, 2010.

STEIGER, M. G.; BLUMHOFF, M. L.; MATTANOVICH, D.; SAUER, M. Biochemistry of microbial itaconic acid production. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 23, 2013.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology** v. 17, n. 1, p. 39-67, 1997.

TEIXEIRA, R.; SIQUEIRA, F.; SOUZA, M. D.; FILHO, E.; BON, E. D. Purification and characterization studies of a thermostable β -xylanase from *Aspergillus awamori*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 10, p. 1041-1051, 2010.

TURNER, P.; MAMO, G.; KARLSSON, E. N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. **Microbial Cell Factories**, v. 6, p. 9, 2007.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 2012.

WANG, Y.; HUANG, W.; SATHITSUKSANO, N.; ZHU, Z.; ZHANG, Y. H. P. Biohydrogenation from Biomass Sugar Mediated by In Vitro Synthetic Enzymatic Pathways. **Chemistry & Biology**, v. 18, n. 3, p. 372-380, 2011.

WARD, O. P.; QIN, W. M.; DHANJOON, J.; YE, J.; SINGH, A. Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. In: ALLEN I. LASKIN, J. W. B. G. M. G. e SIMA, S. (Ed.). **Advances in Applied Microbiology**: Academic Press, v. Volume 58, 2005. p.1-75.

WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin Biosynthesis. **The plant cell**, v. 7, p. 1001-1013, 1995.

WILLKE, T.; VORLOP, K. D. Biotechnological production of itaconic acid. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 56, n. 3-4, p. 289-95, 2001.

WONG, K.; TAN, L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 305, 1988.

YE, X.; WANG, Y.; HOPKINS, R. C.; ADAMS, M. W.; EVANS, B. R.; MIELENZ, J. R.; ZHANG, Y. H. P. Spontaneous high-yield production of hydrogen from cellulosic materials and water catalyzed by enzyme cocktails. **ChemSusChem**, v. 2, n. 2, p. 149-152, 2009.

ZHANG, K.; SAWAYA, M. R.; EISENBERG, D. S.; LIAO, J. C. Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 52, p. 20653-8, 2008.

Capítulo II

Utilização de resíduos agroindustriais no cultivo de Aspergillus terreus para produção de enzimas holocelulolíticas

Resumo

Os resíduos agroindustriais bagaço de cana, piolho de algodão sujo e casca de soja foram utilizados como fontes de carbono para o cultivo em estado líquido de *A. terreus* para produção de holocelulases, especialmente xilanases. O cultivo do fungo foi feito por 6, 9, e 5 dias, nos meios cultivados com bagaço, piolho e casca de soja, respectivamente. Os maiores percentuais de hemicelulose e lignina foram observados no bagaço de cana de açúcar, enquanto que o piolho de algodão sujo mostrou o maior percentual de celulose. Dentre as atividades holocelulolíticas, a xilanolítica foi a mais expressiva nos três extratos brutos. O extrato bruto cultivado com soja mostrou a maior atividade de xilanase. As xilanases apresentaram maiores atividades nos valores de pH 5,0, 6,0 e 6,5 nos extratos brutos provenientes dos meios cultivados com bagaço, piolho e soja, respectivamente. As atividades mais altas foram observadas a 50°C (bagaço e piolho) e 60°C (soja).

Palavras-chave: *A. terreus*, xilanases, bagaço de cana de açúcar, piolho de algodão sujo, casca de soja.

1. Introdução

Conforme mencionado no capítulo I, resíduos agrícolas e florestais, lixo orgânico municipal, resíduos originados do processamento industrial e safras agrícolas representam uma fonte alternativa de baixo custo de material holocelulósico que pode ser utilizado para obtenção de precursores químicos, biocombustíveis, alimentos e rações. Estas matérias-primas têm as vantagens de serem suficientemente abundantes e gerarem emissões muito baixas de gases de efeito estufa (Andreaus, Filho *et al.*, 2008; Kumar, Barrett *et al.*, 2009). Esses resíduos são fontes de carbono de baixo custo para o cultivo em meio líquido de micro-organismos, incluindo fungos filamentosos para a produção de holocelulases (Siqueira, Siqueira *et al.*, 2010a). A habilidade de certos micro-organismos em metabolizar celulose, hemiceluloses e lignina, faz com que eles sejam potencialmente importantes na utilização de resíduos agroindustriais (Pérez, Muñoz-Dorado *et al.*, 2002). Muitas pesquisas têm usado meio de cultura líquido, devido à maior facilidade de controlar fatores ambientais necessários para as condições ideais de cultivo do micro-organismo e produção enzimática, como o grau de aeração, pH e temperatura do meio (Moreira e Filho, 2008).

O elevado teor de celulose, hemicelulose e lignina leva a uma alta recalcitrância nesta biomassa lignocelulósica, o que dificulta a conversão dos polissacarídeos em açúcares monoméricos. Por esta razão, uma boa ferramenta é a utilização de fungos filamentosos para produção de enzimas extracelulares que atuem sinergicamente sobre esses substratos levando à liberação de açúcares fermentescíveis.

Devido à complexidade estrutural da lignocelulose, sua degradação é facilitada pela inclusão de etapas de pré-tratamento que facilitam a remoção de lignina, tornando a celulose e a hemicelulose mais acessíveis, possibilitando a hidrólise total ou parcial da

porção de hemicelulose, a redução do grau de cristalinidade da celulose, tornando o substrato mais adequado aos passos subsequentes da hidrólise enzimática (figura 2.1). Existem várias técnicas de pré-tratamentos, incluindo explosão da fibra por amônia, tratamentos químicos ou biológicos, explosão a vapor. A hemicelulose está muito próxima da celulose e da lignina, de forma que durante o pré-tratamento, parte dela é removida. Entretanto, parte da hemicelulose permanece na fração sólida do material pré-tratado, e pode ser usada como substrato para indução enzimática ou produção de enzimas. Entre as técnicas de pré-tratamentos usadas para quebrar a celulose, tanto hidrólise ácida como enzimática podem ser empregadas (Juhász, Szengyel *et al.*, 2005; Kumar, Barrett *et al.*, 2009), entretanto as enzimas apresentam a vantagem de não poluírem o meio ambiente.

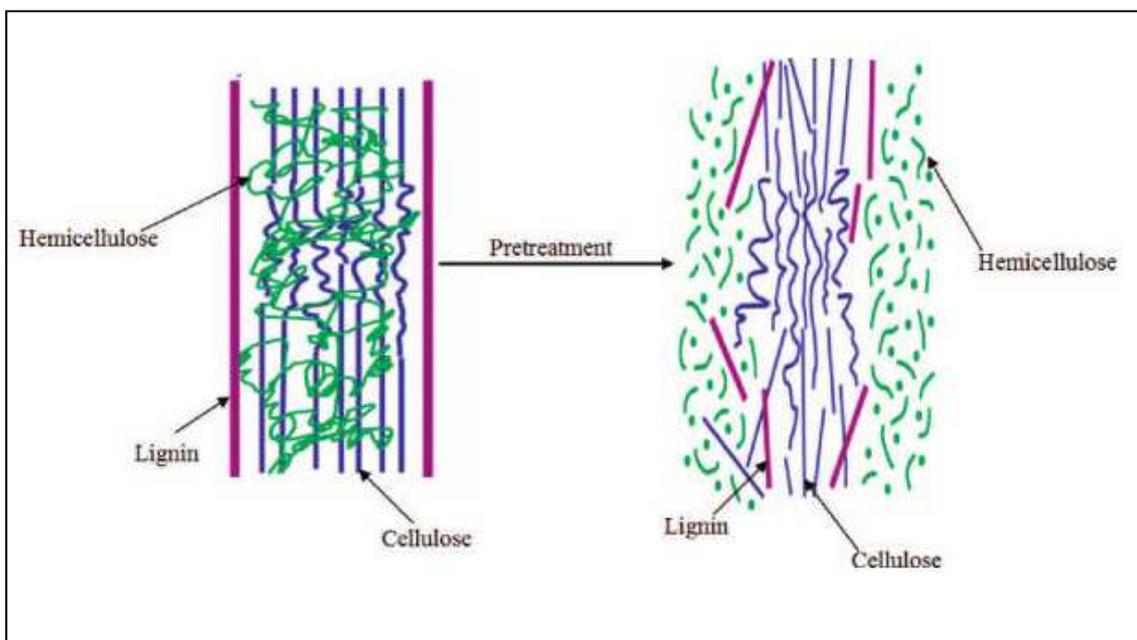


Figura 2.1. Esquema do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (Kumar, Barrett *et al.*, 2009).

2. Objetivos

2.1. Produzir e caracterizar holocelulases, com foco nas xilanases, de *Aspergillus terreus* crescido em meios líquidos contendo: bagaço de cana de açúcar, piolho de algodão sujo e casca de soja como fontes de carbono.

3. Material e Métodos

3.1. Origem dos reagentes

Os reagentes xilana de bétula (*birchwood*), carboximetil-celulose (CM-celulose), pectina, manana, foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Todos outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2. Resíduos Agroindustriais

3.2.1. Origem dos resíduos lignocelulósicos

O bagaço de cana de açúcar foi coletado na Fazenda Brejo, em Formosa, GO. O piolho de algodão sujo foi gentilmente cedido pela Hantex - Resíduos Têxteis Ltda., Gaspar, SC. A casca do grão de soja é proveniente da Fazenda Tropical, em Cabeceiras, GO.

3.2.2. Pré-tratamento

Os resíduos foram autoclavados a 121°C por 2 horas, com posterior lavagem em água corrente para retirar sujidades encontradas neste resíduo. Após a lavagem, este material foi seco a 65°C por 48 horas em estufa, sendo então triturado em moinho de bancada para obtenção de pequenas partículas homogêneas.

3.2.3. Análise Bromatológica

A análise da composição bromatológica destes resíduos foi feita pelo Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro, do laboratório de Química Tecnológica do Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde – GO.

3.2.3.1. Análise dos extratíveis

Foram pesadas 5 g do material lignocelulósico (m_0) e posteriormente transferidos para um extrator Soxhlet. A extração ocorreu por 8 horas, usando cerca de 300 mL de hexano PA. Após a extração, o material foi seco a 35-40°C e pesado (m_1). A diferença de massa corresponde ao teor de extratíveis ($m_1 - m_0$).

O percentual de extratíveis (%E) pode ser calculado por:

$$\%E = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \times 100$$

3.2.3.2. Análise da Hemicelulose

Foi utilizado precisamente 1 g (m1) do material lignocelulósico (livre de extratíveis). Este material foi acrescido de 10 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio (500 mM; 20 g/L). A mistura foi fervida por 3,5 horas, filtrada e lavada com água destilada. O resíduo sólido foi seco a 35- 40°C e pesado (m2). A diferença das massas corresponde à hemicelulose.

O percentual de hemicelulose (%HC) foi determinado por:

$$\%HC = \frac{m2 - m1}{m1} \times 100$$

3.2.3.3. Análise de Lignina

Foi utilizado 1 g (m3) do material lignocelulósico (livre de extratíveis) e este foi acrescido de 30 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico (72%; 72 mL de ácido sulfúrico concentrado com 28 mL de água destilada). A mistura ficou em repouso por 24 horas e depois foi diluída com 300 mL de água destilada e fervida por 1 hora. A mistura foi filtrada e o resíduo sólido foi lavado com água destilada. O resíduo sólido foi seco a 35-40°C e pesado (m4). Esta massa corresponde ao teor de lignina.

O percentual de lignina (%L) foi determinado por:

$$\%L = \frac{m4}{m3} \times 100$$

3.3. Manutenção e cultivo do micro-organismo

A. terreus foi isolado da compostagem natural de resíduos da indústria têxtil e, posteriormente, identificado morfológicamente pelo Prof. Dr. Luís Roberto Batista do Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, (Siqueira, Siqueira *et al.*, 2010b). A identificação molecular da cepa de *A. terreus* foi feita pela Prof^a. Dra. Nádia Skorupa Parachin, do laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília (UnB), conforme metodologia no anexo A.

O isolado foi mantido em meio sólido Batata-Dextrose-Ágar (BDA) contendo (m/v) caldo de batata 2,0%, dextrose 1,0% e ágar 2,0%, com repiques realizados periodicamente. O isolado encontra-se depositado na Micoteca do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília (UnB), sendo mantido em criotubos, contendo glicerol 18% (v/v), para conservação em ultrafreezer a -80°C.

O cultivo em meio líquido de *A. terreus* foi realizado em frascos do tipo Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL de meio líquido suplementado (m/v) (KH₂PO₄ 0,7%, K₂HPO₄ 0,2%, MgSO₄.7 H₂O 0,05%, (NH₄)₂SO₄ 0,1%, extrato de levedura 0,06%); pH 7, e 1,0% (m/v) das fontes de carbono: bagaço de cana de açúcar, piolho de algodão sujo ou casca de soja (Medeiros, Silva Jr *et al.*, 2007). Todos os meios foram autoclavados a 121°C por 30 min.

O inóculo foi obtido por meio da raspagem dos esporos de placas de Petri. O material obtido da raspagem foi disperso em 50 mL de solução salina 0,9%, autoclavada. A contagem de esporos da suspensão foi realizada em câmara de

Newbauer e microscópico ótico. Para produção enzimática, alíquotas de suspensão de esporos (10^8 esporos/mL) foram inoculadas nos Erlenmeyers, na proporção de 1 mL de solução de esporos para cada 100 mL de meio de cultura. O cultivo em meio líquido foi realizado a 28°C e agitação constante de 120 rpm por 6, 9 ou 5 dias, cultivados com as fontes de carbono bagaço de cana de açúcar, piolho de algodão sujo e casca de soja, respectivamente. Após o cultivo, o meio foi filtrado em funil do tipo Büchner com papel de filtro (Whatman N° 1) e armazenadas a 4°C, com adição de 0,1% de azida sódica. O filtrado, a partir de agora denominado extrato bruto, foi usado como fonte de holocelulases. Para os ensaios da curva de indução, os cultivos foram incubados por 19 dias com alíquotas retiradas diariamente.

3.4. Determinação da quantidade de proteínas

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando o *Kit Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, EUA). Uma solução de BSA (albumina sérica bovina) (0,1 mg/mL) foi usada para construção da curva padrão de acordo com instruções do fabricante.

3.5. Determinação da atividade enzimática

Para determinação das atividades de xilanase, pectinase, CM-celulase e mananase foram realizados micro ensaios incubando-se 5 µL de solução enzimática e 10 µL de solução dos substratos 1% (xilana, pectina e carboximetil celulose – CMC) ou 0,5% (manana). Os ensaios foram realizados por 30 min, a 50°C (Filho, Puls *et al.*, 1993). Após o período de incubação, as reações foram interrompidas pela adição de 15

μL de solução do ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) e novamente incubados a 97°C por 10 minutos (Miller, 1959). Após a última incubação, foram adicionados 150 μL de água destilada. A quantidade de açúcar redutor foi quantificada pela leitura da absorbância a 540 nm (SpectraMax M2^o, Molecular DevicesCo., EUA). As atividades enzimáticas foram expressas em UI/mL, sendo definida como a quantidade de açúcares redutores liberados na unidade de tempo por mililitro (μmol de açúcar redutor/min/mL). As curvas padrões foram determinadas com soluções de D-xilose, ácido D-galacturônico, D-glicose e D-manose no intervalo de concentração de 0,2 - 1,2 mg/mL. Para determinação do efeito do pH na atividade de xilanase, os extratos brutos foram incubados a 50°C , numa faixa de pH entre 3,0 – 9,0. Os seguintes tampões foram usados: acetato de sódio 50 mM (pH 3,0 – 6,0), fosfato de sódio 50 mM (6,0 – 7,0), tris-HCl (7,0 – 9,0). Todos os tampões, independente do pH, foram ajustados para a mesma força iônica com NaCl. O efeito da temperatura na atividade de xilanase foi avaliado realizando-se ensaios enzimáticos no intervalo de temperatura de 30 - 80°C . Alíquotas foram retiradas em intervalos determinados para quantificação da atividade residual de xilanase. Os resultados dos ensaios de efeito da temperatura e pH foram expressos como atividade relativa, sendo que o valor de 100% de atividade correspondeu à temperatura ou ao pH de maior atividade. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e os desvios padrões foram menores que 15% da média.

4. Resultados e Discussão

4.1. Curva de indução de xilanase

A utilização de resíduos agroindustriais tem despertado um grande interesse acerca de suas potencialidades biotecnológicas, e tem como vantagens a redução da poluição ambiental, além de ser uma fonte barata e abundante para produção enzimática. Por esse motivo, foi avaliado o potencial do fungo filamentososo *A. terreus* de produzir enzimas holocelulolíticas, com foco em xilanases, usando como substratos diferentes resíduos agroindustriais.

A. terreus cresceu em meio líquido suplementado com os resíduos agroindustriais, bagaço de cana de açúcar, piolho de algodão sujo ou casca de soja, por 19 dias. O perfil de indução de xilanases está demonstrado na figura 2.2. Tanto o crescimento de fungos como a sua produção de xilanases são determinados por uma grande variedade de parâmetros, como a composição, a temperatura e o pH do meio, além disso, a escolha da fonte de carbono tem um papel importante na produção enzimática (Juhász, Szengyel *et al.*, 2005). Para a otimização da utilização dessas enzimas na indústria, faz-se necessária uma prévia caracterização enzimática, que seja capaz de determinar os principais parâmetros que influenciam a atividade e estabilidade enzimática.

O cultivo de *A. terreus* no meio suplementado com bagaço mostrou um único pico de atividade xilanolítica, no 6º dia de incubação (figura 2.2). O perfil de indução foi acompanhado por um aumento na quantidade de proteínas totais, chegando ao

máximo no 11º e 12º dias (dados não mostrados). Baseado nos resultados descritos, o 6º dia foi definido como tempo de cultivo ideal para o meio de cultura líquido cultivado com bagaço de cana.

O meio de cultura cultivado com piolho de algodão sujo demonstrou um aumento progressivo na produção de xilanases, chegando ao máximo no 9º dia de cultivo, com atividade de 0,634 UI/mL (figura 2.2), sendo este tempo definido como padrão para indução de xilanases de *A. terreus* com esta fonte de carbono.

Por outro lado, o cultivo de *A. terreus* no meio de cultura com casca de soja foi acompanhado por diversos picos de produção de xilanase, sendo o mais alto no 5º dia de cultivo. Dentre as três culturas usadas como fontes de carbono para o cultivo de *A. terreus*, a casca de soja apresentou a maior produção de xilanase, chegando a 1,794 UI/mL no 5º dia. A partir de tais dados, o 5º dia foi definido como tempo ideal para indução de xilanases nesta fonte de carbono.

A quantidade de proteínas oscilou durante o período de cultivo com as três fontes de carbono, sugerindo que este resultado abrange outras enzimas além das xilanases, que são produzidas concomitantemente e que também participam do processo de degradação desses substratos. Entretanto, para os fins deste trabalho, a atividade xilanolítica foi o principal alvo de investigação.

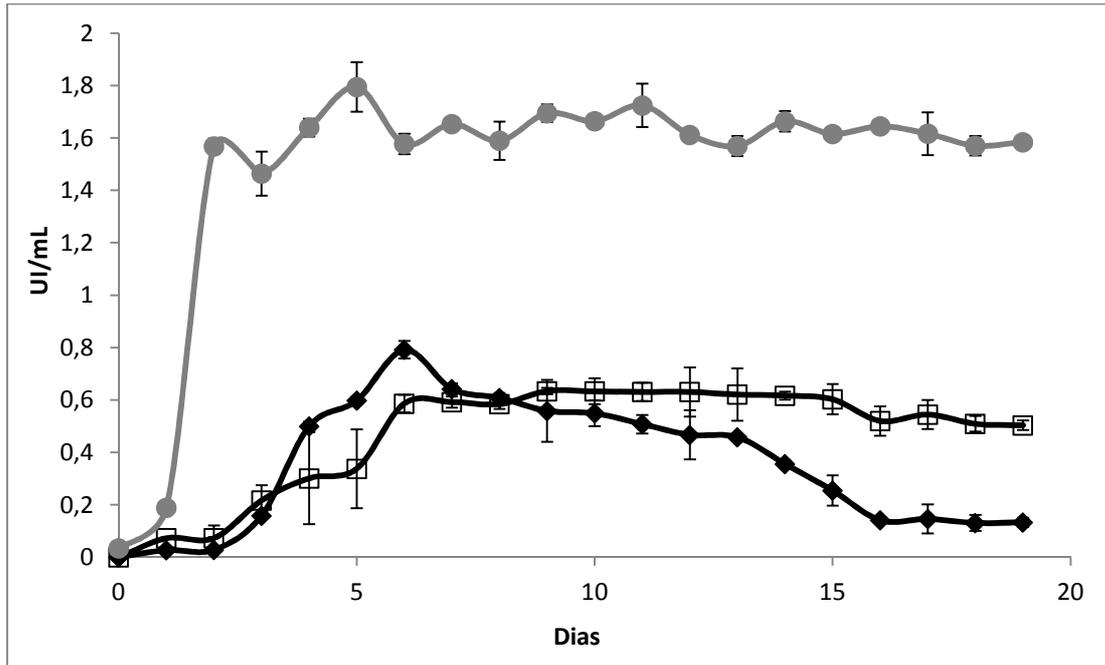


Figura 2.2. Curvas de indução de xilanase durante o cultivo de *A. terreus* em bagaço de cana de açúcar (◆), piolho de algodão sujo (□) e casca de soja(●).

Comparado a outros fungos selvagens, *A. terreus* possui atividade xilanolítica intermediária, sendo superior a *Mucor sp* ($0,560 \pm 0,040$ UI/mL), *Cladosporium cladosporioides* ($0,017 \pm 0,014$ UI/mL), *Trichoderma harzianum* ($0,397 \pm 0,009$ UI/mL), *Penicilium citrinum* ($0,412 \pm 0,020$ UI/mL), *Aspergillus sydowii* ($0,343 \pm 0,014$ UI/mL), *Fusarium sp* ($0,387 \pm 0,047$ UI/mL), *Fusarium proliferatum* ($0,047 \pm 0,034$ UI/mL) e inferior a *Emericella nidulans* ($2,288 \pm 0,075$ UI/mL) e a *Aspergillus tamarii* ($1,418 \pm 0,019$ UI/mL) (Siqueira, Siqueira *et al.*, 2010b)

A proporção entre celulose e hemicelulose contida na fonte de carbono usada para cultivo do fungo é um parâmetro importante para a produção de xilanase (Haltrich e Steiner, 1994). A diferença na constituição físico-química leva a um acesso diferenciado às fibras de hemicelulose de cada substrato, consequentemente leva a

produções e liberações enzimáticas diferenciadas em cada um resíduo agroindustriais avaliados. Sabe-se que a presença de açúcares e outros produtos liberados durante a hidrólise dos substratos no meio de cultura são capazes de inibir a atividade de xilanases (Panagiotou e Olsson, 2007). As xilanases contidas nos meios de cultura cultivados com bagaço de cana e casca de soja sofrem uma queda de aproximadamente 12% em suas atividades a partir do sexto e quinto dias de incubação, respectivamente. É possível que produtos da hidrólise destes substratos comecem a ter ação inibitória sobre essas enzimas. Entretanto, aparentemente, as xilanases presentes no meio de cultura cultivado com piolho de algodão sofrem pouca inibição por açúcares ou outros produtos de hidrólise presentes no meio. O efeito inibitório de derivados de lignina (furanos, fenóis e ácidos orgânicos de baixa massa molecular) provenientes da palha de trigo, na atividade de uma mistura de enzimas comerciais, bem como sobre amostras de extrato bruto de *Penicillium brasilianum* IBT 20888 durante a hidrólise enzimática de xilana foi observado por Panagiotou e Olsson (2007).

4.2. Caracterização dos extratos brutos

Devido à estrutura complexa dos substratos usados no cultivo de *A. terreus*, houve produção de diversas enzimas holocelulolíticas que atuam sinergicamente no processo de degradação desses substratos. Independente da fonte de carbono utilizada, a maior atividade holocelulolítica observada foi a de xilanase. As demais enzimas tiveram atividades significativamente mais baixas (figura 2.3). A maior atividade de CMCase foi observada no meio de cultura cultivado em bagaço de cana, e as maiores atividades

de pectinase e mananase foram observadas nos meios cultivados com casca de soja e piolho de algodão, respectivamente.

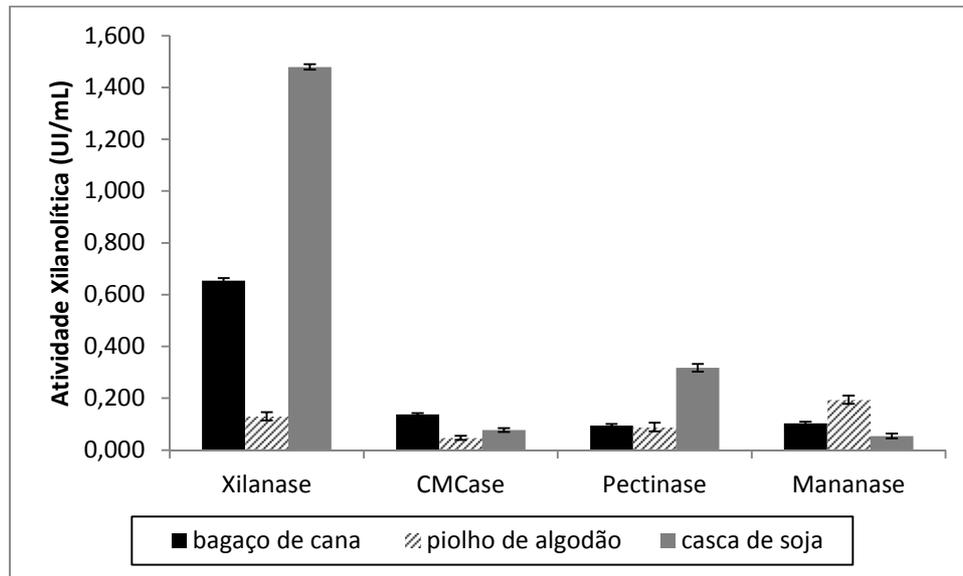


Figura 2.3. Perfil de holocelulases produzidas por *A. terreus* em cultivo em meio líquido contendo bagaço de cana de açúcar, piolho de algodão sujo ou casca de soja como fontes de carbono.

A maior produção de xilanase por *A. terreus* está de acordo com dados previamente descritos (Siqueira, Siqueira *et al.*, 2010a) para produção de holocelulases por *A. flavus* crescido em diversas fontes de carbono, onde se observou maior produção de xilanase quando este fungo foi cultivado com bagaço de cana de açúcar, casca de soja e piolho de algodão sujo.

O efeito de diversas fontes de carbono na indução de xilanases por *A. niveus* RS2 foi investigado por Sudan e Bajaj (2006) e foi demonstrado que, entre os resíduos agrícolas, a casca de arroz, farelo de trigo e palha de trigo são bons indutores de xilanases. Siqueira e Siqueira *et al.* (2010b) demonstraram que piolho de algodão sujo e

engajo de bananeira também são bons indutores de xilanases em *A. terreus*. Fungos filamentosos têm sido cultivados em bagaço de cana, sendo esta uma boa fonte de carbono para produção de enzimas holocelulolíticas (Pandey, Soccol *et al.*, 2000).

Diferentes fontes de carbono levam à produção enzimática em quantidade e características distintas (Yang, Yan *et al.*, 2006; Siqueira, Siqueira *et al.*, 2010a; Moreira, Ferreira *et al.*, 2012). Nas três fontes de carbono usadas, houve grande variação nas concentrações de hemicelulose, celulose e lignina (tabela 2.1). Os teores observados de holocelulose também variaram bastante, correspondendo a 52,4, 77,8 e 64,6, para bagaço, piolho e soja, respectivamente. O bagaço de cana tem os maiores percentuais tanto de hemicelulose (40,7%) quanto de lignina (44,4%). A maior concentração de celulose foi observada no piolho de algodão sujo (62,2%). Resultados anteriores demonstram maiores concentrações de hemicelulose no bagaço de cana, maiores concentrações de celulose no piolho de algodão sujo, entretanto, maiores proporções de lignina na casca do grão de soja (Siqueira, Siqueira *et al.*, 2010a). É possível que o pré-tratamento tenha tornado mais fácil o acesso às fibras de hemicelulose na casca de soja que no bagaço de cana, de forma que a produção de xilanases naquele substrato foi maior.

O efeito de diferentes fontes de carbono na indução de xilanases de *A. terreus* foi demonstrado também durante o cultivo deste fungo com palha de trigo, farelo de trigo, sabugo de milho, casca de arroz e cevada, no qual a maior produção de xilanase foi notada com palha de trigo, seguida pela palha de arroz (Ghanem, Yusef *et al.*, 2000). Produções diferenciadas de hemicelulases e celulases também foram demonstradas quando o fungo *Myceliophthora sp.* IMI 387099 foi cultivado em diferentes resíduos agrícolas (Badhan, Chadha *et al.*, 2007).

Tabela 2.1. Análise bromatológica de resíduos agroindustriais pré-tratados.

Parâmetros analisados (%)	Bagaço de cana de açúcar	Piolho de algodão sujo	Casca do grão de soja
Extratíveis	3,2 ± 0,2	4,1 ± 0,9	5,3 ± 0,3
Hemicelulose	40,7 ± 2,0	15,6 ± 0,8	38,7 ± 3,5
Lignina	44,4 ± 2,0	18,1 ± 0,9	30,2 ± 1,5
Celulose	11,7 ± 0,2	62,2 ± 0,8	25,9 ± 1,7

O efeito de diferentes pH sobre xilanases não purificadas de *A. terreus* está demonstrado na figura 2.4. A xilanase induzida por bagaço de cana de açúcar foi mais ativa em pHs ácidos, mantendo mais de 40% da atividade em pHs de 3,0 a 6,0, sendo a maior atividade (0,771 UI/mL) em pH 5,0 (tampão acetato de sódio 50 mM). A atividade xilanolítica do extrato bruto proveniente do cultivo com piolho de algodão mostrou picos de atividade, nos pHs 4,5 (tampão acetato de sódio 50 mM), e 6,0 (tampões acetato de sódio e fosfato de sódio, ambos a 50 mM), provavelmente indicando a presença de mais de uma xilanase nesse extrato bruto. A maior atividade xilanolítica (0,378UI/mL) foi no pH 6,0 (tampão acetato de sódio), foi muito estável, restando pelo menos 47% da atividade no intervalo de pH entre 3,0 e 7,0. A atividade xilanolítica do extrato bruto proveniente do meio cultivado com casca de soja foi mais alta (1,794 UI/mL), no pH 6,5 (tampão fosfato de sódio, 50 mM), e foi também a mais estável, restando pelo menos 54% de sua atividade máxima em todas as faixas de pH analisadas.

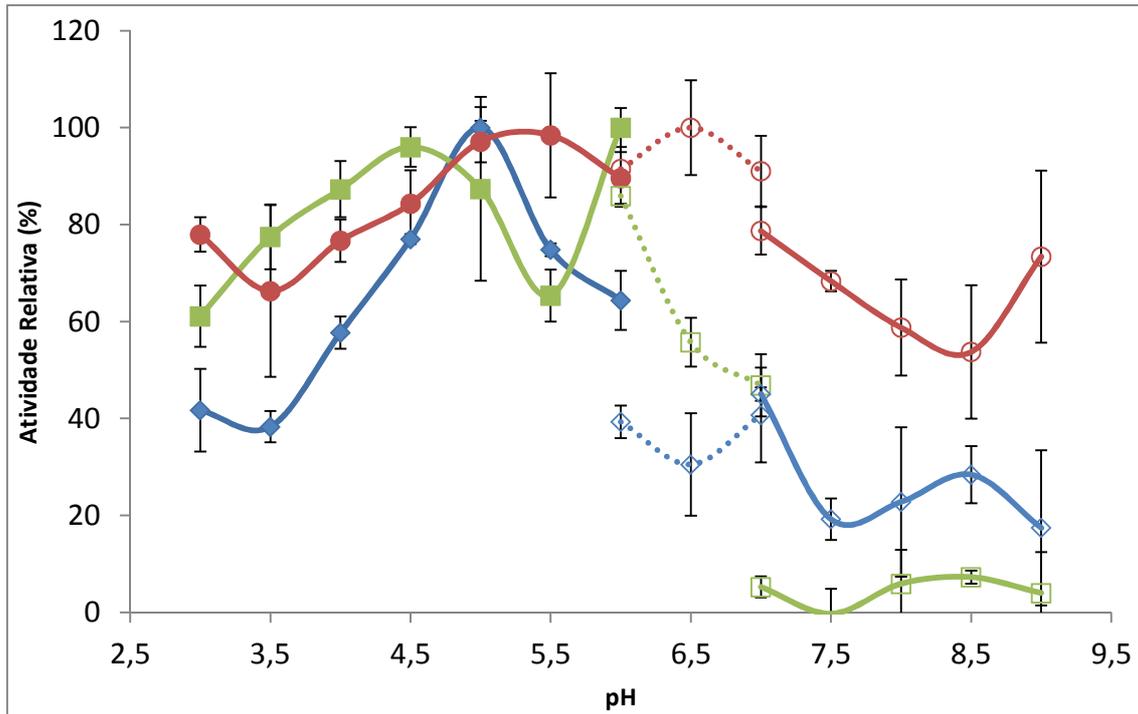


Figura 2.4. Efeito do pH na atividade xilanolítica dos extratos brutos de *A. terreus*. Meio cultivado com bagaço de cana (linha azul), meio cultivado com piolho de algodão sujo (linha verde) e meio cultivado com casca de soja (linha vermelha). Intervalo de pH de 3,0 a 6,0, tampão acetato de sódio; pH de 6,0 a 7,0, tampão fosfato de sódio e pH de 7,0 a 9,0, tampão tris-HCl. Todos os tampões a 50 mM.

A temperatura tem forte influência na atividade enzimática, desta forma, o efeito desta variável foi observado na atividade xilanolítica dos três extratos brutos. A temperatura teve efeito mais marcante sobre a xilanase presente no meio de cultura cultivado com bagaço de cana de açúcar. As temperaturas mais altas e mais baixas (30 e 80°C) tiveram um maior impacto sobre a atividade enzimática, reduzindo essa atividade a aproximadamente 30% da mais alta. A xilanase presente no meio cultivado com bagaço manteve 40% de sua atividade num intervalo de temperatura entre 40 e 70°C. As

xilanases induzidas por bagaço de cana e por piolho de algodão tiveram maior atividade a 50°C, já a induzida por soja apresentou maior atividade a 60°C. A atividade xilanolítica contida no meio de cultura cultivado com casaca de soja foi a mais estável dentre as três analisadas, retendo 56% da sua atividade máxima em toda faixa de temperatura analisada (figura 2.5).

Os pHs e temperaturas de maiores atividades para as xilanases não purificadas de *A. terreus* foram típicas para xilanases de fungos mesofílicos (Silveira, Sousa *et al.*, 1999). As xilanases da maioria dos fungos filamentosos estudados são estáveis na faixa de pH de 3 a 10, apresentando maior atividade no intervalo de pH de 4,0 a 7,0 (Kulkarni, Shendye *et al.*, 1999). Xilanases não purificadas de *P. corylophilum* e *T. longibrachiatum* foram mais ativas a 45°C, enquanto que a de *A. niger* teve maior atividade a 40°C, e tiveram atividades mais elevadas entre os pHs 4,5 e 5,5 (Medeiros, Hanada *et al.*, 2003). De forma semelhante, as xilanases não purificadas de *Aspergillus* sp. PAQ-H, *Colletotrichum* sp. WABA-L, *Guignardia* sp. 2SANQ-F, *Paecilomyces* sp. FDCAB-7, *Penicillium* sp. LIABA-L, *Phomopsis* sp. MACA-J também apresentaram maiores atividades a 50°C (Torres e Dela Cruz, 2013). O extrato bruto de *A. oryzae* também apresentou atividade xilanolítica mais alta em temperaturas e pH semelhantes aos de *A. terreus* (55°C e pH 6,0) (Duarte, 2013). A estabilidade em uma ampla faixa de temperatura, demonstrada pela xilanase induzida por casca de soja, é uma característica desejável para a utilização das enzimas em processos industriais.

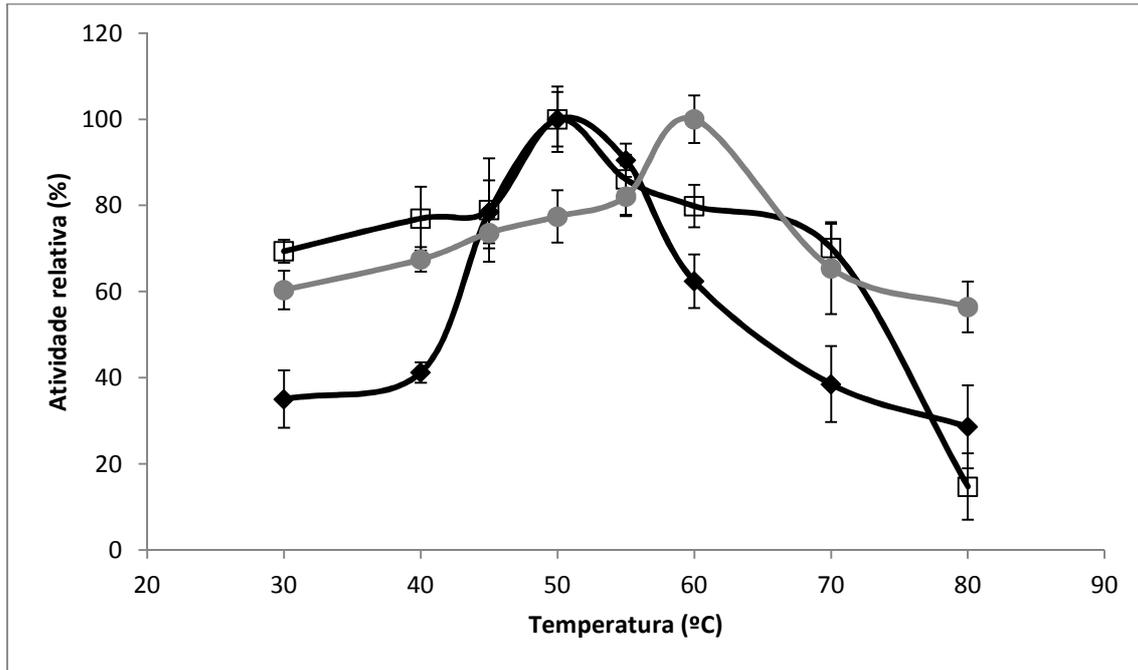


Figura 2.5. Efeito da temperatura na atividade xilanólica dos extratos brutos cultivados em bagaço de cana de açúcar (◆), piolho de algodão sujo (□) e casca de soja (●).

Com o intuito de aprofundar a caracterização enzimática, o efeito do pH foi avaliado ainda nas atividades de pectinase, CMCase, e mananase, presentes no extrato bruto cultivado com bagaço de cana de açúcar. Foi observado que a atividade de pectinase foi mais alta em pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 50 mM), as atividades de CMCase e mananase foram mais altas em pHs 4,0 e 6,0, respectivamente, ambas em tampão acetato de sódio. A avaliação de pectinases não purificadas de *A. flavus* indicou o pH 9,0 como o de maior atividade (Siqueira, 2010). Um estudo envolvendo efeito do pH em celulases de vários fungos do gênero *Aspergillus*, entre eles, *A. niger* SJ1, *A. niger* SJ2, *A. niger* SJ3, *A. niger* SJ4 *A. terreus* e *Aspergillus sp* SJ 11 demonstrou que a atividade mais alta foi observada em pH 4,8 para todas as preparações enzimáticas

citadas (Jahangeer, Khan *et al.*, 2005). Outro estudo também apresentou resultados similares, com atividade mais alta de CMC_{case} de *Penicillium sp.* em pH 4,5 (Picart, Diaz *et al.*, 2007). De forma geral, mananases apresentam atividades mais elevadas em intervalo de pH entre 3,0 e 7,5 (Moreira e Filho, 2008). Mananases não purificadas de *A. flavus* apresentaram atividade mais altas em pH 6,0 ou 7,0, quando o fungo foi cultivado em engaço de bananeira ou bagaço de cana, respectivamente, como fontes de carbono (Siqueira, 2010).

5. Conclusões

- Dentre os resíduos utilizados, maiores concentrações de hemicelulose e lignina foram observadas no bagaço de cana de açúcar, enquanto que maior concentração de celulose foi observada no piolho de algodão sujo;
- A utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono em cultivo em meio líquido de *A. terreus* constitui uma alternativa viável para a produção de enzimas que degradam a holocelulose, principalmente xilanases;
- A casca de soja induziu maior produção de atividade xilanolítica;
- Maiores atividades foram observadas em temperaturas entre 50 e 60°C e numa faixa de pH entre 5,0 e 6,5.

6. Bibliografia

ANDREAUS, J.; FILHO, E. X. F.; BON, E. P. D. S. Biotechnology of Holocellulose-Degrading Enzymes. In: HOU, C. T. e SHAW, J. (Ed.). **Biocatalysis and Bioenergy**: John Wiley & Sons, Inc., 2008. p.195-229.

BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 504-510, 2007.

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

DUARTE, G. **Holocelulases produzidas por *Aspergillus oryzae*: purificação, caracterização e degradação de biomassa lignocelulósica**. 2013. 220 (Doutorado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasil.

FILHO, E. F.; PULS, J.; COUGHLAN, M. Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 171-180, 1993.

GHANEM, N. B.; YUSEF, H. H.; MAHROUSE, H. K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. **Bioresource Technology**, v. 73, n. 2, p. 113-121, 2000.

HALTRICH, D.; STEINER, W. Formation of xylanase by *Schizophyllum commune*: Effect of medium components. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 3, p. 229-235, 1994.

JAHANGEER, S.; KHAN, N.; JAHANGEER, S.; SOHAIL, M.; SHAHZAD, S.; AHMAD, A.; KHAN, S. A. Screening and characterization of fungal cellulases isolated from the native environmental source. **Pakistan Journal of Botany**, v. 37, n. 3, p. 739, 2005.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 3519-3525, 2005.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews** v. 23, n. 4, p. 411-456, 1999.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

MEDEIROS, R. G.; HANADA, R.; FILHO, E. X. F. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, n. 2, p. 97-100, 2003.

MEDEIROS, R. G.; SILVA JR, F. G. D.; BÁO, S. N.; HANADA, R.; FERREIRA FILHO, E. X. Application of xylanases from Amazon Forest fungal species in bleaching of eucalyptus kraft pulps. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 2, p. 231-238, 2007.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOREIRA, L. R. S.; FERREIRA, G. V.; SANTOS, S. S. T.; RIBEIRO, A. P. S.; SIQUEIRA, F. G.; FERREIRA FILHO, E. X. The hydrolysis of agro-industrial residues by holocellulose-degrading enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 498-505, 2012.

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 2, p. 165-178, 2008.

PANAGIOTOU, G.; OLSSON, L. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 250-258, 2007.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53-63, 2002.

PICART, P.; DIAZ, P.; PASTOR, F. Cellulases from two *Penicillium* sp. strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization. **Letters in applied microbiology**, v. 45, n. 1, p. 108-113, 2007.

SILVEIRA, F. Q. D. P.; SOUSA, M. V.; RICART, C. A. O.; MILAGRES, A. M. F.; DE MEDEIROS, C. L.; FILHO, E. X. F. A new xylanase from a *Trichoderma harzianum* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 682-685, 1999.

SIQUEIRA, F. **Resíduos Agroindustriais com Potencial para a Produção de Holocelulases de Origem Fúngica e Aplicações Biotecnológicas de Hidrolases**. 2010. 276 (Doutorado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasil.

SIQUEIRA, F.; SIQUEIRA, A.; SIQUEIRA, E.; CARVALHO, M.; PERETTI, B.; JARAMILLO, P.; TEIXEIRA, R.; DIAS, E.; FELIX, C.; FILHO, E. Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues. **Biodegradation**, v. 21, n. 5, p. 815-824, 2010a.

SIQUEIRA, F.; SIQUEIRA, E.; JARAMILLO, P. M. D.; SILVEIRA, M. H. L.; ANDREAUS, J.; COUTO, F. A.; BATISTA, L. R.; FILHO, E. X. F. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 20-26, 2010b.

TORRES, J.; DELA CRUZ, T. Production of xylanases by mangrove fungi from the Philippines and their application in enzymatic pretreatment of recycled paper pulps. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 645-655, 2013.

YANG, S. Q.; YAN, Q. J.; JIANG, Z. Q.; LI, L. T.; TIAN, H. M.; WANG, Y. Z. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1794-1800, 2006.

Capítulo III

Purificação e caracterização de xilanases de Aspergillus terreus cultivado em resíduos agroindustriais

Resumo

Xilanases foram purificadas por ultrafiltração e cromatografias de exclusão molecular e troca iônica. Xilanases de baixa massa molecular foram isoladas e denominadas de Xyl T1, Xyl T2, Xyl T3 e Xyl T4, com rendimentos de purificação de 5,70% (Xyl T1), 74,70% (Xyl T2), 26,49% (Xyl T3) e 43,80% (Xyl T4). A espectrometria de massa dos digestos trípticos de Xyl T1 e Xyl T2 mostrou dois espectros diferentes, indicando duas enzimas distintas. Microscopia de força atômica de Xyl T1 e Xyl T2 mostrou uma distribuição bimodal de classes de partículas globulares para ambas as enzimas, indicando que Xyl T1 é maior que Xyl T2. As xilanases purificadas mostraram maiores atividades no intervalo de pH 5,0-6,0 e temperaturas entre 45 e 60°C. Os valores de Km para xilana de bétula solúvel foram 0,42 mg/mL (Xyl T1), 13,03 mg/mL (Xyl T2), 6,54 mg/mL (Xyl T3) e 15,33 mg/mL (Xyl T4). Para xilana insolúvel os valores de Km de Xyl T1 e Xyl T2 foram de 0,47 e 10,90 mg/mL, respectivamente, e 4,67 e 9,59 mg/mL para Xyl T3 e Xyl T4, respectivamente. As variações dos valores de Vmax para xilanas solúvel e insolúvel foram 0,15 e 5,37 UI/mL e 0,08 e 2,46 UI/mL, respectivamente. À temperatura ambiente, as enzimas demonstraram meias-vidas de cinco dias (Xyl T1), maior que sete dias (Xyl T2 e Xyl T4) e de 2,5 dias (Xyl T3). As quatro enzimas foram ativadas pelo íon Mn^{2+} (10 mM) e inibidas pelos íons Hg^{2+} e K^+ (1 e 10 mM). Os reagentes NBS e DEPC inibiram Xyl T1 e Xyl T2, enquanto que o DTNB teve ação inibitória sobre Xyl T1 e ativadora sobre Xyl T2. Xyl T1 e Xyl T2 foram específicas para xilana como substrato.

Palavras chave: β -xilanases, purificação, caracterização, espectrometria de massa, microscopia de força atômica.

1. Introdução

A purificação de xilanases é necessária para alguns estudos bioquímicos e moleculares detalhados, é necessária também para a determinação acurada das sequências primárias de aminoácidos e estrutura terciária da proteína. A chave para a obtenção de estratégias de purificação eficientes é a escolha de técnicas apropriadas que possam maximizar o rendimento e a pureza da enzima e, ao mesmo tempo, minimizar o número de passos necessários para a purificação (Sá-Pereira, Paveia *et al.*, 2003). Entretanto, para muitas aplicações industriais, a utilização de enzimas puras é inviável, pois o processo de purificação proteica é laborioso e dispendioso. Dada a importância das xilanases, consideráveis esforços têm sido feitos para aperfeiçoar sua produção (Ximenes, Sousa *et al.*, 1999; Salles, Cunha *et al.*, 2000; Carmona, Fialho *et al.*, 2005; Badhan, Chadha *et al.*, 2007; Amir, Arif *et al.*, 2013).

Xilanases foram descritas em fungos, bactérias e leveduras, entretanto, fungos filamentosos são particularmente úteis para produção de xilanases do ponto de vista industrial, pois eles secretam maiores quantidades de enzimas xilanolíticas que bactérias ou leveduras. Dentre os fungos filamentosos, os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* são os mais extensivamente estudados. Devido à diversidade na estrutura química das xilanas que podem ser derivadas de inúmeras fontes, uma grande variedade de xilanases é conhecida, com atividades hidrolíticas, propriedades físico-químicas e estruturas diferentes. Além disso, derivados de xilanas são frequentemente usados para induzir a produção de xilanases por micro-organismos, usando-se tanto fermentação em estado sólido, quanto submersa (Haltrich, Nidetzky *et al.*, 1996; Puchart, Katapodis *et al.*,

1999; Polizeli, Rizzatti *et al.*, 2005; Agnihotri, Dutt *et al.*, 2010; Kamble e Jadhav, 2012; Motta, Andrade *et al.*, 2013).

Como descrito no capítulo I, a hemicelulose é a segunda fração de biomassa renovável mais abundante na natureza e a xilana é o principal componente da hemicelulose. A xilana é um heteropolissacarídeo ramificado e complexo, sendo encontradas em maiores proporções em angiospermas que em gimnospermas, sendo uma fonte potencial para produção de muitos produtos de alto valor agregado (Motta, Andrade *et al.*, 2013; Sharma e Kumar, 2013). Devido à heterogeneidade e à natureza química complexa da xilana, a sua hidrólise completa envolve a ação sinérgica de enzimas que clivem tanto a cadeia principal como a lateral. Entre estas enzimas, a β -xilanasas (EC 3.2.1.8) tem papel importante, pois ela hidrolisa ligação β 1-4 entre os resíduos de D-xilose na cadeia principal. O interesse em xilanasas têm sido marcante nos últimos anos por seu potencial biotecnológico, principalmente devido à sua utilização na indústria de papel e celulose, no processo de branqueamento do papel. (Puchart, Katapodis *et al.*, 1999; Beg, Kapoor *et al.*, 2001; Collins, Gerday *et al.*, 2005; Polizeli, Rizzatti *et al.*, 2005; Sandrim, Rizzatti *et al.*, 2005; Sudan e Bajaj, 2007; Magalhães e Milagres, 2009; Pandya e Gupte, 2012; Sharma e Kumar, 2013; Torres e Dela Cruz, 2013).

2. Objetivos

- 2.1.** Purificar xilanasas a partir do cultivo líquido de *A. terreus* contendo bagaço de cana, piolho de algodão sujo e casca de soja como fontes de carbono;
- 2.2.** Caracterizar as xilanasas purificadas quanto a diversos parâmetros, incluindo cinético e físico-químicos;

2.3. Utilizar técnicas de espectrometria de massa e microscopia de força atômica para diferenciar as duas xilanases purificadas a partir do cultivo de *A. terreus* em bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono.

3. Material e métodos

3.1. Origem dos reagentes

Os reagentes xilana de bétula (*birchwood*), xilana de faia (*beechwood*) e xilana de aveia (*oat spelt*); carboximetil-celulose (CM-celulose), pectina, manana, β -mercaptoetanol, N-bromosuccinimida (NBS), iodoacetamida, dietil-pirocarbonato (DEPC), 5,5-ditio-bis-ácido-2-nitrobenzóico (DTNB), 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)-carbodiimida (EDC), 2,2-ditiodipiridina, 1,4-ditiotreitól (DTT), L-cisteína e L-triptofano foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Dodecil sulfato de sódio (Sodiumdodecyl sulfate, SDS) foi proveniente da Gibco BRL Life Technologies (Japão). N,N,N',N'- tetramilenediamino (TEMED) adquiridos da ICN Biomedicals, Inc (Aurora, OH, USA). As resinas cromatográficas Sephadex G-50, DEAE-sephacel, além do marcador de massa molecular Low Molecular Weight (LMW) foram adquiridos da GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, USA). Todos outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2. Purificação de xilanases

3.2.1. Xyl T1 e Xyl T2

Todos os passos cromatográficos foram realizados à temperatura ambiente. O extrato bruto, cultivado em bagaço de cana como fonte de carbono, foi concentrado aproximadamente 10 vezes por ultrafiltração, usando o sistema Amicon (Amicon Inc., Beverly, MA, 01915, USA), com uma membrana de exclusão molecular de 10 kDa. Alíquotas do concentrado e do ultrafiltrado foram fracionadas por cromatografia de filtração em gel Sephadex G-50 (51,0 x 3,6 cm) equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. Frações de 5 mL foram eluídas com fluxo de 20 mL/h, e as frações contendo atividade de β -xilanase foram reunidas e aplicadas em uma coluna de troca iônica DEAE-sephacel (8,0 x 3,0 cm) equilibrada com o mesmo tampão descrito anteriormente. Frações de 5 mL foram coletadas em um fluxo de 30 mL/h. A coluna foi lavada com o tampão acima citado, seguido por um gradiente linear de NaCl (0 - 1,0 M), pH 7,0. As frações com atividade de β -xilanase foram reunidas e armazenadas a 4°C. As β -xilanases purificadas a partir do concentrado e do ultrafiltrado foram denominadas de Xyl T1 e Xyl T2, respectivamente (figura 3.1).

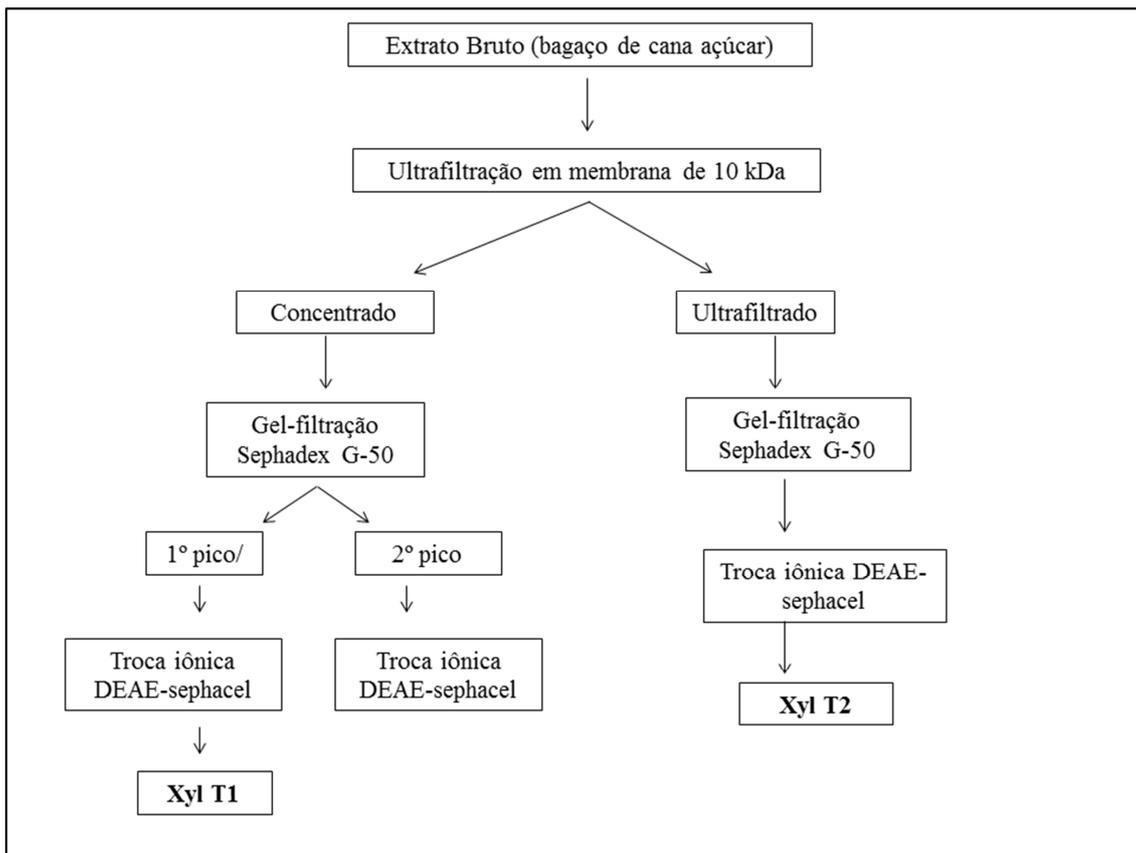


Figura 3.1. Esquema da purificação de Xyl T1 e Xyl T2.

3.2.2. Xyl T3

O extrato bruto foi proveniente do meio cultivado com piolho de algodão sujo. O processo de purificação de Xyl T3 foi feito como descrito anteriormente, no item 3.1.1, para Xyl T1 e Xyl T2, até a cromatografia de filtração em gel Sephadex G-50. Após esta cromatografia, as frações com atividade de β -xilanas foram concentradas duas vezes por *speed vac*. As amostras foram então ressuspensas em água Milli-Q e submetidas à outra cromatografia de exclusão molecular, para dessalinização, em coluna HiTrap™ *Desalting* (GE Healthcare) no sistema ÄKTA purifier. A eluição foi isocrática em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, a um fluxo de 300 mL/h. Após a dessalinização, as amostras foram aplicadas em *superloop* do sistema ÄKTA purifier

(GE Healthcare), em uma coluna de troca iônica HiTrap™ SP *Fast Flow* (HiTrap SP FF) de 1 mL, a um fluxo de 60 mL/h. A coluna foi eluída com o mesmo tampão citado anteriormente, seguido por um gradiente linear de NaCl (0 - 1,0 M), pH 5,0. As frações com atividade de β -xilânase foram armazenadas a 4°C e denominadas Xyl T3. Todos os tampões utilizados no sistema AKTA purifier foram filtrados em membrana de exclusão molecular de 0,22 μ m (GE Healthcare) e previamente de-aerados (figura 3.2).

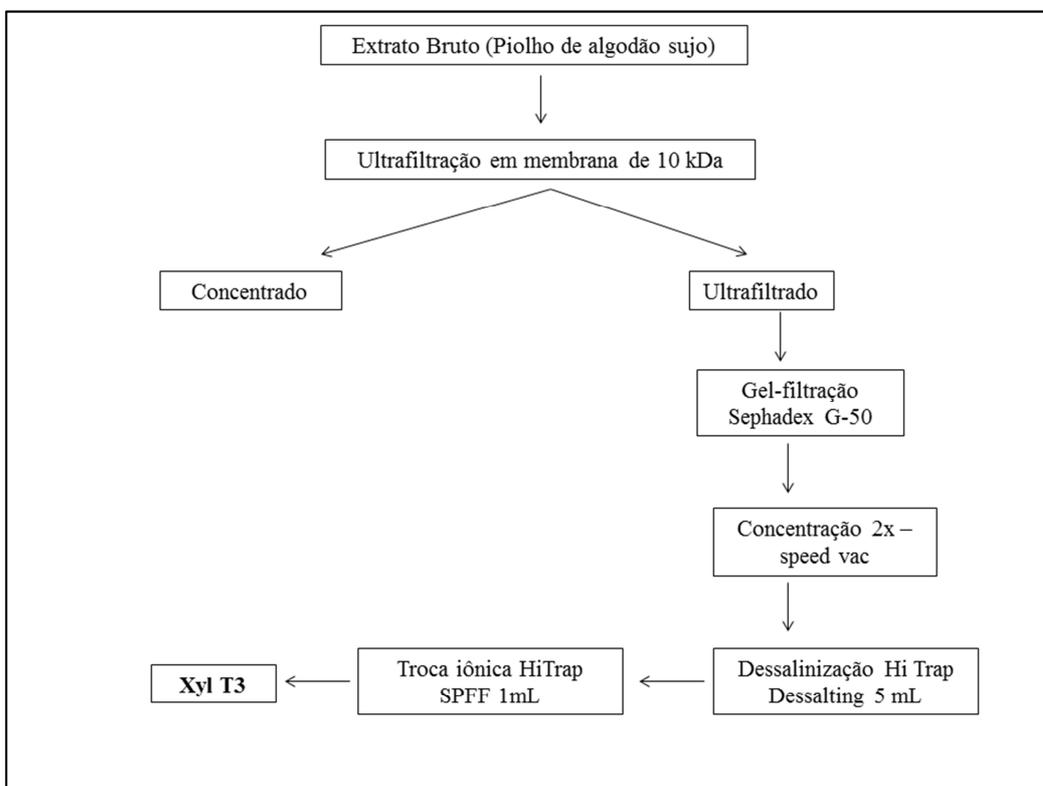


Figura 3.2. Esquema da purificação de Xyl T3.

3.2.3. Xyl T4

O meio de cultura contendo casaca de soja como fonte de carbono foi ultrafiltrado e aplicado em coluna de exclusão molecular Sephadex G-50, conforme

descrito no item 3.1.1. Após a cromatografia de filtração em gel, as frações com atividade de β -xilanase foram dialisadas contra tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. As amostras foram aplicadas em *superloop* do sistema ÄKTA purifier (GE Healthcare), e os demais passos desta purificação foram os mesmo já descritos anteriormente no item 3.1.2, deste capítulo. A β -xilanase purificada a partir do cultivo de *A. terreus* com casca de soja como fonte de carbono foi denominada Xyl T4 e o esquema de sua purificação está demonstrado na figura 3.3.

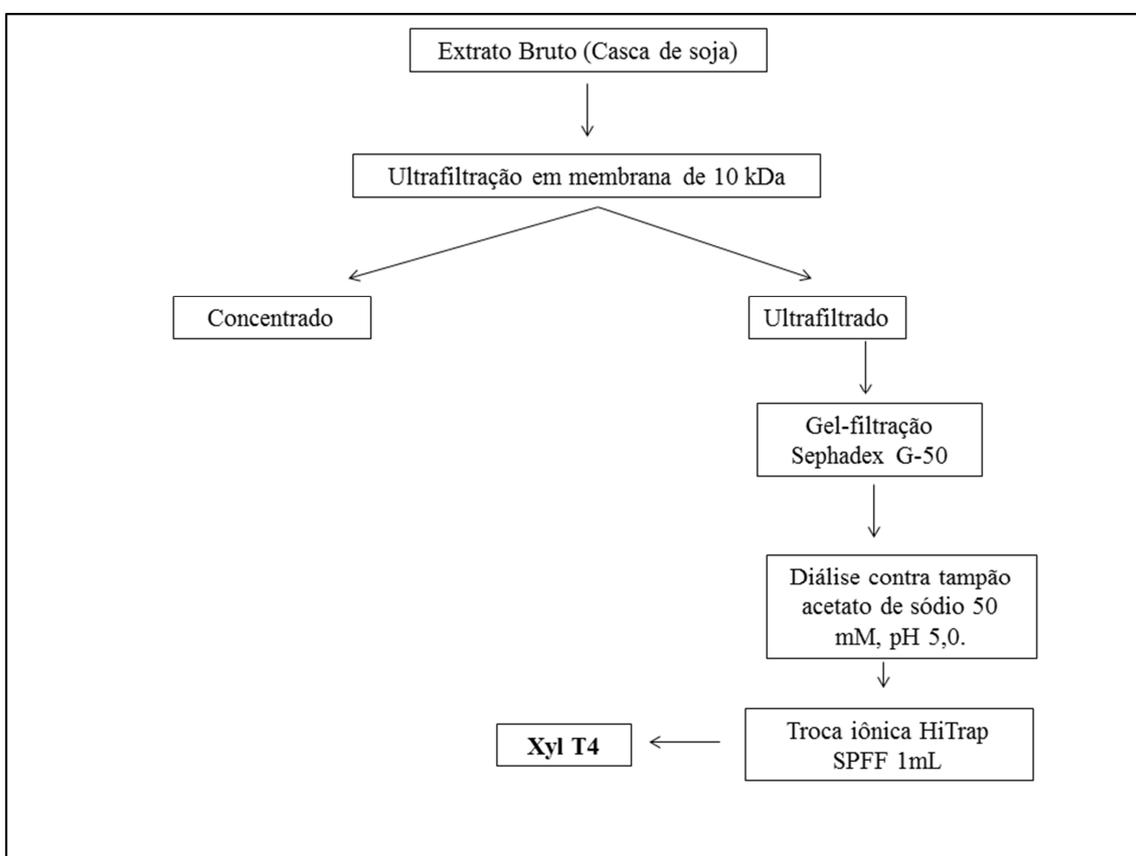


Figura 3.3. Esquema da purificação de Xyl T4.

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

O grau de pureza das enzimas purificadas foi analisado por SDS-PAGE (Laemmli, 1970). As amostras foram previamente submetidas à precipitação por solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% em água, e incubadas por 1 h a 4°C. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 14000 rpm por 15 min a 4°C. Posteriormente, estas foram lavadas por três vezes, em acetona PA refrigerada, e centrifugadas conforme mencionado anteriormente. As amostras permaneceram à temperatura ambiente por 3 min para secagem. Após este período, as mesmas foram ressuspensas em 20 µL de água milli-Q, e, a este volume, foram adicionados 10 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 2,0%; azul de bromofenol 0,05%; glicerol 20% e β-mercaptoetanol 5,0%). Após precipitação com TCA, as amostras foram fervidas por 5 min e aplicadas no gel de poliacrilamida 12%. A eletroforese foi realizada em sistema Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) contendo SDS 0,1% (v/v). Para cada corrida, foram utilizados 2 µL de marcador de massas moleculares Low Molecular Weight (LMW), contendo: fosforilase b (97,0 kDa), soroalbumina bovina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa) (GE Healthcare). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1% (v/v), pH 8,3), à temperatura ambiente, submetida a 25 mA constante por 60 min.

3.4. Coloração com nitrato de prata

Após a corrida das amostras em SDS-PAGE, as bandas proteicas foram reveladas por coloração com nitrato de prata (Blum, Beier *et al.*, 1987). O gel foi incubado sob agitação, em solução fixadora (v/v) (metanol 40% e ácido acético 7%) pelo período mínimo de 1 h. Em seguida, o gel foi lavado por três vezes em solução etanol 50% (v/v) durante 20 min cada, sob agitação. Após as lavagens, o gel foi incubado por 1 min em solução de tiosulfato de sódio 0,02% (m/v), lavado três vezes em água destilada e incubado na solução de coloração (nitrato de prata 0,2% (m/v), formaldeído 0,03% (v/v) em água destilada) por 15 min, sob agitação. Novamente, o gel foi lavado três vezes em água destilada e submetido à solução reveladora (carbonato de sódio 6,0% (m/v), tiosulfato de sódio 0,004% (v/v), formaldeído 0,02% (v/v) em água destilada). A reação foi interrompida com solução fixadora, após o surgimento das bandas.

3.5. Caracterização das amostras de xilanases purificadas

A quantificação das proteínas e os ensaios enzimáticos foram realizados conforme descritos no capítulo II, itens 3.5 e 3.6, respectivamente. Os ensaios de efeito de temperatura e pH foram feitos conforme mencionado no item 3.5 do capítulo II. O ensaio de termoestabilidade das amostras enzimáticas purificadas foi realizado à temperatura ambiente e a 50°C. Alíquotas foram retiradas em intervalos determinados para a quantificação da atividade enzimática residual de xilanase. A atividade foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% de atividade correspondeu

à atividade realizada no tempo zero de incubação. Os desvios-padrão foram calculados como percentuais da média para o ensaio correspondente.

3.5.1. Determinação de parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) das amostras enzimáticas purificadas foram determinados para frações solúveis e insolúveis de xilana de bétula (*birchwood*). Foi pesado 1 g de xilana e então foram adicionadas 20 mL de solução de NaOH 1,0 M, seguida de agitação por 30 min à temperatura ambiente, na sequência adicionou-se 20 mL de solução de HCl 1,0 M, seguida de agitação por 30 min. A este volume adicionou-se tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 para completar o volume final de 100 mL. As soluções de xilana foram agitadas por mais 30 min à temperatura ambiente, e posteriormente, centrifugadas a 8.500 g por 15 min a 4°C resultando em duas frações: uma solúvel e outra insolúvel (Filho, Puls *et al.*, 1993). As duas frações foram previamente dialisadas contra água destilada, em sacos de diálise com poros de 12 kDa a 4°C, e liofilizadas. O ensaio enzimático foi realizado conforme descrito anteriormente (capítulo II, item 3.6), usando como substrato as frações solúveis e insolúveis da xilana no intervalo de concentração de 0,66 a 40 mg/mL. A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima de reação (V_{max}) foram determinadas pelo método de regressão não linear Enzfitter (Leatherbarrow, 1999).

3.5.2. Efeito de íons metálicos, agentes modificadores de aminoácidos e aminoácidos

O efeito dos íons (Ag^+ , K^+ , Na^+ , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+}) e EDTA sobre a atividade das xilanases purificadas foi determinado pela pré-incubação das amostras enzimáticas com as soluções aquosas dos respectivos íons nas concentrações finais de 1 e de 10 mM.

O efeito dos reagentes modificadores de aminoácidos e dos aminoácidos sobre a atividade das amostras enzimáticas foi determinado pela pré-incubação das amostras enzimáticas com soluções dos reagentes, nas concentrações finais de:

- 1 mM: NBS
- 2 mM: 5,5- ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) e 2,2-ditiodipiridina (DTP)
- 5 mM: L-triptofano, iodoacetamida, dietil pirocarbonato (DEPC), 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)- carbodiimida (EDC) e β -mercaptoetanol;
- 20 mM: 1,4-ditiotreitól (DTT), L-cisteína e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS).

Os controles foram feitos substituindo-se o volume dos reagentes por água ou no caso do DTNB e DTT, por álcool etílico 4% .

O efeito dos íons e dos reagentes foi avaliado pela pré-incubação das amostras por 20 minutos, à temperatura ambiente, e a atividade residual de xilanase foi quantificada como descrito anteriormente (capítulo II, item 3.6). A atividade foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% de atividade correspondeu

à atividade realizada no tempo zero de incubação. Os desvios-padrão foram calculados como percentuais da média para o ensaio correspondente.

3.5.3. Atividade em substratos sintéticos

Para os experimentos envolvendo ρ -nitrofenil glicosídeos, as atividades de β -xilosidade, β -glicosidase, β -manosidase e α -arabinofuranosidase foram determinadas com os substratos ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (ρ NPX), ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ NPG), ρ -nitrofenil- β -D-manopiranosídeo (ρ NPM) e ρ -nitrofenil- α -arabinopiranosídeo (ρ NPA), respectivamente (Ximenes, Silveira *et al.*, 1996). A amostra enzimática (100 μ L) foi misturada ao substrato (50 μ L) e a 850 μ L de água destilada. A mistura foi incubada por 10 minutos a 50°C e a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de solução de Na₂CO₃ 1,0 M. O produto (ρ NP) liberado foi quantificado pela leitura da absorbância a 410 nm. Uma unidade de atividade foi definida com a quantidade de enzima que catalisou a liberação de 1,0 μ mol/L de ρ NP/minuto/mL.

3.5.4. Atividade de celulase total

O ensaio para celulase total (FPase) foi realizado pela adição de 150 μ L de solução enzimática a uma tira de papel de filtro (Whatman nº. 1) de dimensões 1,0 x 6,0 cm, como substrato, incubados a 50°C por 60 min (Ghose, 1987). As reações foram interrompidas pela adição de 150 μ L de solução do ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) e incubação em água fervente por 10 min. (Miller, 1959). Em seguida, foram adicionados

150 μ L de água destilada e a glicose liberada foi quantificada pela leitura a 540 nm (SpectraMax M2^e, Molecular Devices Co., EUA). As atividades enzimáticas foram expressas em UI/mL, que é definida como a quantidade de açúcares redutores liberados na unidade de tempo por mililitro (μ mol de açúcar redutor/min/mL), usando-se glicose como padrão.

3.6. Espectrometria de massa MALDI-TOF (Xyl T1 e Xyl T2)

Os experimentos de espectrometria de massa foram realizados no laboratório de bioquímica e química de proteínas da Universidade de Brasília (UnB), sob supervisão do Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart.

3.6.1. Preparo das amostras

As proteínas purificadas foram separadas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida e, em seguida, submetidas a um processo de digestão em gel (Shevchenko, Tomas *et al.*, 2006). As bandas de interesse foram descoradas utilizando-se solução de ferricianeto de potássio 15 mM e tiosulfato de sódio 50 mM e, por fim, lavadas com água até que o gel ficasse transparente. As bandas foram, então, submetidas a agente redutor por 1 hora a 56°C com a adição de DTT 10 mM em tampão NH_4HCO_3 10 mM e em seguida alquiladas por 1 hora a temperatura ambiente em iodoacetamida 55 mM em tampão NH_4HCO_3 a 10 mM. Após esse processo, as bandas foram submetidas a três ciclos de lavagens de 7 minutos em tampão NH_4HCO_3 (10

mM), seguidos de 7 minutos de lavagens em acetonitrila (ACN) 100%. Após a lavagem em ACN as bandas foram reidratadas em tampão de digestão gelado (NH_4HCO_3 10 mM; CaCl_2 5 mM; 10% acetonitrila) adicionado de tripsina 1,25 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ (Promega, Madison, WI, EUA) e incubados a 40°C por 17 horas.

3.6.2. Espectrometria de massa (MS) e “*Peptide Mass Fingerprinting*” (PMF) por MALDI-TOF

Para análise por espectrometria de massas (MS) os peptídeos resultantes da digestão trípica foram acidificados com a adição de 1 μL de TFA 0,1% (Ácido trifluoroacético). A solução resultante de peptídeos foi dessalinizada e concentrada em coluna de fase reversa (POROS R2) e, então, eluída utilizando solução de mistura de matrizes (1:1) contendo ácido 2,5-dihidroxibenzóico 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (DHB; diluído em ACN 90% e ácido fórmico 0,5%) e ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (CHCA; diluído em ACN 90% e TFA 0,01%). As amostras eluídas foram aplicadas em placas AnchorChip™ (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

A análise foi feita utilizando o espectrômetro de massa Autoflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics). Antes da obtenção dos espectros das amostras, realizou-se uma calibração do equipamento utilizando-se uma mistura de peptídeos de massas conhecidas (Peptide calibration standard, Bruker Daltonics) plaqueada com a mesma mistura de matrizes (DHB e CHCA).

Para cada amostra foram gerados espectros de massas em modo refletor positivo com o auxílio do programa FlexControl v. 2.4 (Bruker Daltonics). Em seguida, os espectros foram editados e analisados no programa FlexAnalysis v. 2.4 (Bruker Daltonics). Para cada espectro foram geradas listas de picos contendo as massas

monoisotópicas dos peptídeos trípticos observados. As listas foram usadas para buscar massas semelhantes contra o banco de dados de sequência de proteínas de fungos *online* do NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, EUA) e também sequências de proteínas de fungos *online* contra o banco de dados de *A. terreus* gerado a partir do seu genoma, disponibilizados no NCBI, utilizando-se o programa BioTools v. 3.0 (Bruker Daltonics) acoplado ao programa Mascot (<http://www.matrixscience.com/>). (Perkins, Pappin *et al.*, 1999). Como parâmetro de busca utilizou-se carbamidometilação da cisteína (proveniente da alquilação com iodoacetamida) como modificação fixa. Estabeleceu-se como zero ou, no máximo, um, os sítios de clivagem perdidos pela tripsina. Não foram impostas restrições de massa. Para que uma identificação fosse considerada significativa observaram-se as que apresentaram *score* acima do limiar calculado pelo Mascot considerando-se valor de $p < 0,05$.

3.7. Microscopia de Força Atômica (MFA)

Os experimentos de microscopia de força atômica foram realizados na EMBRAPA-CENARGEN, sob supervisão do Dr. Luciano Paulino Silva. Xyl T1 e Xyl T2 foram analisadas por MFA com o intuito de investigar suas características topográficas. Um pedaço de mica recém-clivada foi colada a um disco de ferro com uma fita dupla-face, em seguida 3 μ L de amostra foram colocadas sobre a superfície da mica e, então, secas ao ar. Para remover os sais contidos nas amostras, Xyl T1 e Xyl T2 foram previamente lavadas contra água mili-Q. As amostras foram analisadas em modo dinâmico, com força constante, com aquisição de imagem de altura (topografia) e fase (viscoelasticidade), por microscópio de força atômica (SPM-9600 Shimadzu, Japão). As

imagens foram obtidas a aproximadamente a 20°C e 20% de umidade relativa. As áreas escaneadas foram quadrados de 5 µm×5 µm com frequência de 1 Hz, aplicando 500 pN de força constante. Traço e retraço foram realizados durante o processo, a fim de provar que as amostras não foram modificadas durante as etapas de digitalização. Todas as imagens de MFA contêm 512 x 512 pixels e as imagens adquiridas foram e processados com o auxílio do software de SPM-9600 *off-line* (versão 3,304, Shimadzu, Japão). As análises estatísticas foram realizadas com o software OriginPro (versão 8.0, OriginLab, EUA).

3.8. Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas (com exceção da MFA) foram feitas com o software *Statistica 8.0*. Os dados foram submetidos à ANOVA fatorial ou One way ANOVA e *post-hoc* teste LSD Fisher de comparação pareada, com nível de significância de 0,05%.

4. Resultados e Discussão

4.1. Purificação de xilanases

O *pool* de xilanases obtido a partir dos cultivos líquidos com bagaço de cana, piolho de algodão ou casca de soja foi isolado por uma combinação de ultrafiltração e cromatografias, conforme mostrado anteriormente nas figuras 3.1, 3.2 e 3.3. O sistema xilanolítico de *A. terreus* foi fracionado por ultrafiltração usando membrana de corte de

10 kDa. A habilidade de β -xilanases de mudar sua conformação e passar através de membranas com ponto de corte de 10 kDa é comumente descrito para xilanases de origem fúngica (Sá-Pereira, Paveia *et al.*, 2003). A figura 3.4 mostra a quantificação da atividade xilanolítica presente nas frações concentrada e ultrafiltrada proveniente dos meios de cultura cultivados com bagaço de cana, piolho de algodão sujo e casca de soja. Embora o extrato bruto cultivado com casca de soja como fonte de carbono tenha apresentado maior atividade de xilanase (discutido no capítulo II), após o fracionamento por ultrafiltração, nota-se atividades maiores nas frações provenientes do cultivo com bagaço de cana de açúcar. Este fato pode ser devido à menor estabilidade das xilanases provenientes do cultivo com casca de soja.

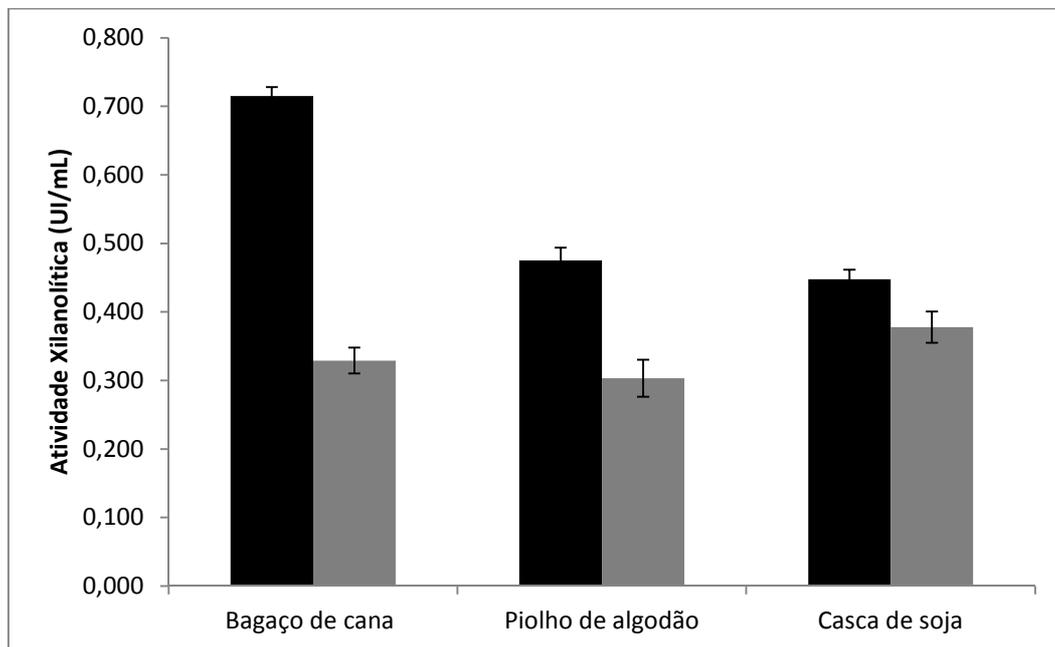


Figura 3.4. Atividade xilanolítica presente nas frações concentrada (preto) e ultrafiltrada (cinza) provenientes do fracionamento dos extratos brutos.

O perfil de eluição da fração concentrada originária do cultivo de *A. terreus* com bagaço de cana em coluna de sephadex G-50, resultou na separação de dois picos de atividade de β -xilanase, conforme mostrado na figura 3.5 (A). O primeiro pico de β -xilanase foi eluído em um único pico de proteína e posteriormente purificado por cromatografia de troca iônica DEAE-sephacel (figura 3.5 – B). O perfil de eluição do ultrafiltrado mostrou apenas um pico de β -xilanase que foi eluído antes do pico maior de proteína (figura 3.6 – A). O pico de atividade enzimática foi fracionado por cromatografia de troca aniônica DEAE-sephacel (figura 3.6 – B).

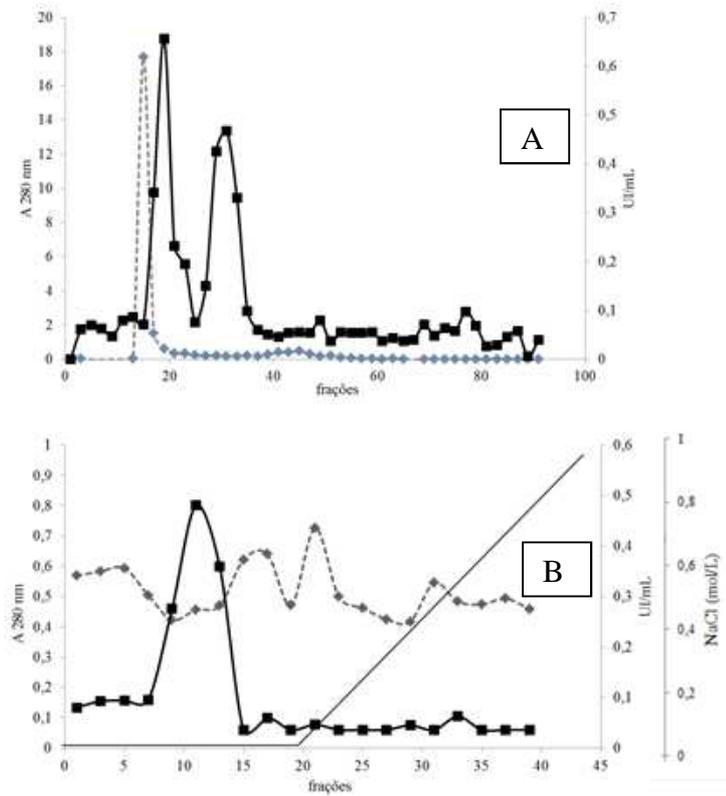


Figura 3.5. Perfis cromatográficos da purificação da enzima Xyl T1, a partir da fração concentrada do extrato bruto proveniente do cultivo de *A. terreus* em bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono. Cromatografia de filtração em gel em resina Sephadex G-50, equilibrada com tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0), com fluxo de 20 mL/h (A). Cromatografia de troca iônica do primeiro pico de atividade xilanolítica da cromatografia Sephadex G-50, em resina DEAE-sephacel, equilibrada com tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0), com fluxo de 30 mL/h (B). Absorbância a 280 nm (\diamond), atividade de xilanase (\blacksquare) e gradiente de NaCl (\blackrightarrow).

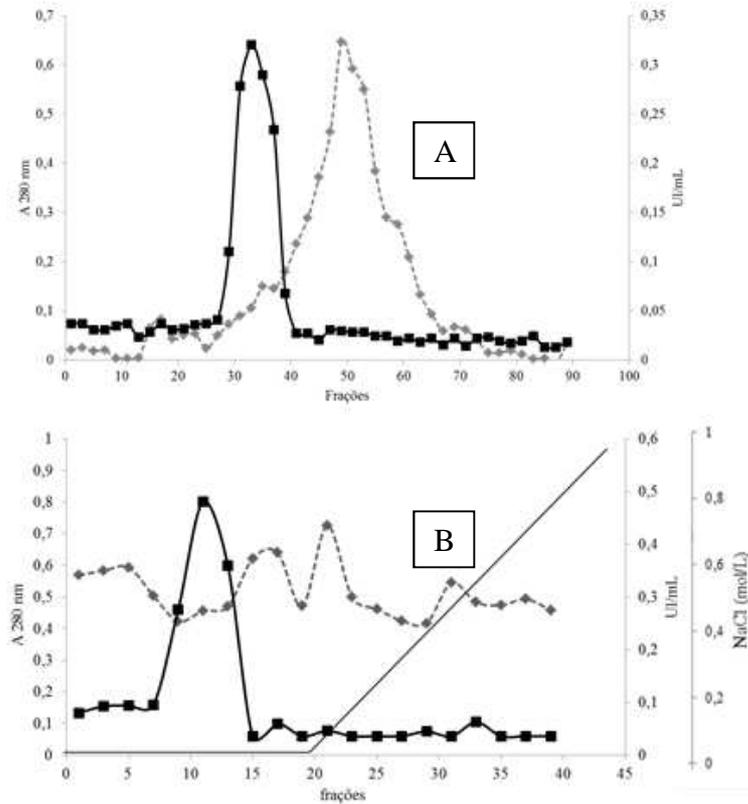


Figura 3.6. Perfis cromatográficos da purificação da enzima Xyl T2, a partir da fração ultrafiltrada do extrato bruto proveniente do cultivo de *A. terreus* em bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono. Cromatografia de filtração em gel em resina Sephadex G-50, equilibrada com tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0), com fluxo de 20 mL/h (A). Cromatografia de troca iônica em resina DEAE-sephacel, equilibrada com tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0), com fluxo de 30 mL/h (B). Absorbância a 280 nm (\diamond), atividade de xilanase (\blacksquare) e gradiente de NaCl (—).

No fracionamento em resina de troca aniônica do tipo DEAE-sephacel, tanto Xyl T1 quanto Xyl T2 foram eluídas apenas no tampão de equilíbrio, antes do gradiente de NaCl.

Assim como o extrato bruto proveniente do cultivo de *A. terreus* com bagaço de cana de açúcar, o extrato proveniente do cultivo com piolho de algodão sujo também foi ultrafiltrado em membrana de corte de 10 kDa e aplicado em coluna de filtração em gel Sephadex G-50. A figura 3.7 (A) mostra o perfil de eluição da fração ultrafiltrada, com um pico de atividade xilanólítica pouco antes do pico de proteínas. Posteriormente, este pico de atividade de xilanase foi purificado por cromatografia em sistema AKTA Purifier com coluna catiônica HiTrap SPFF (figura 3.7- B).

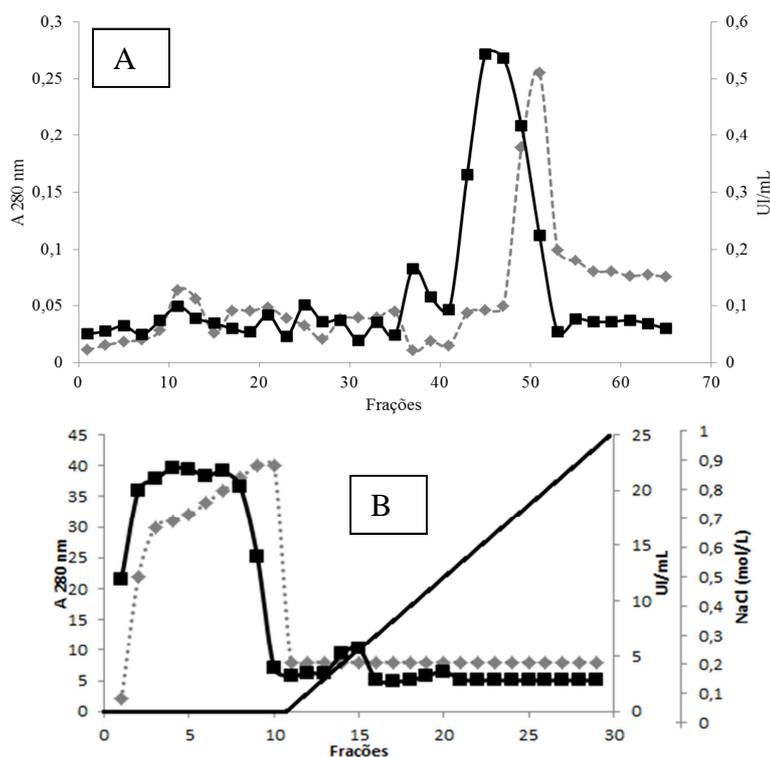


Figura 3.7. Perfis cromatográficos da purificação da enzima Xyl T3, a partir da fração ultrafiltrada do extrato bruto proveniente do cultivo de *A. terreus* em piolho de algodão sujo como fonte de carbono. Cromatografia de filtração em gel em resina Sephadex G-50, equilibrada com tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0), com fluxo de 20 mL/h (A). Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap SP FF, em sistema Akta Purifier, equilibrada com tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0), com fluxo de 300 mL/h (B). Absorbância a 280 nm (\diamond), atividade de xilanase (\blacksquare).

O extrato bruto proveniente do cultivo em casca de soja como fonte de carbono foi fracionado da mesma forma que os outros dois extratos brutos descritos anteriormente. O perfil de eluição da fração ultrafiltrada em coluna Sephadex G-50 mostrou apenas um pico de atividade xilanolítica, antes do pico de proteínas (figura 3.8

– A). Este pico de atividade foi reunido e purificado por cromatografia de troca iônica, em coluna catiônica HiTrap SP FF, em sistema AKTA purifier (figura 3.8 – B).

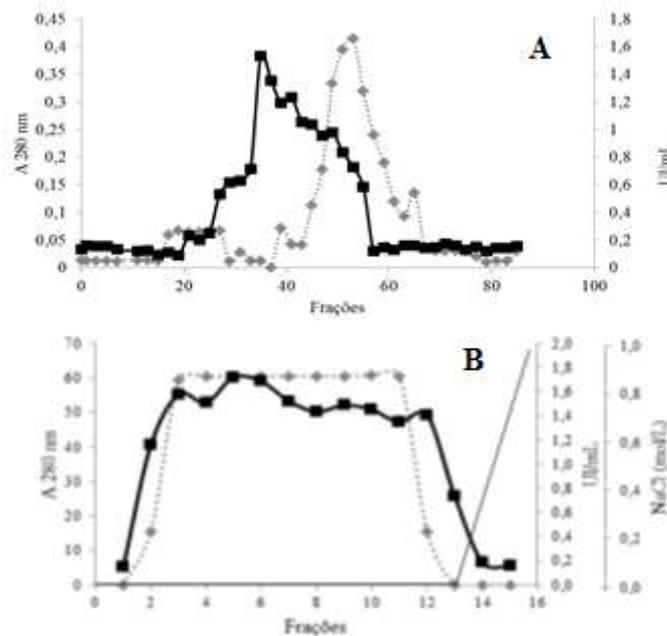


Figura 3.8. Perfis cromatográficos da purificação da enzima Xyl T4, a partir da fração ultrafiltrada do extrato bruto proveniente do cultivo de *A. terreus* em casca de soja como fonte de carbono. Cromatografia de filtração em gel em resina Sephadex G-50, equilibrada com tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0), com fluxo de 20 mL/h (A). Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap SP FF, em sistema Akta Purifier, equilibrada com tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0), com fluxo de 300 mL/h (B). Absorbância a 280 nm (\diamond), atividade de xilanase (\blacksquare) e gradiente de NaCl (—).

Xilanases fúngicas têm sido purificadas até a homogeneidade aparente por diferentes técnicas cromatográficas, incluindo filtração em gel e troca iônica com

diferentes graus de rendimento (Sá-Pereira, Paveia *et al.*, 2003). Xyl T1 e Xyl T2 tiveram rendimentos de 5,70 e 74,70%, respectivamente (tabela 3.1). O baixo rendimento da purificação de Xyl T1 é consistente com outros estudos envolvendo purificação de xilanases nos quais o rendimento foi baixo. Um baixo rendimento foi também reportado para uma β -xilanase de *A. terreus* S₇ (13,90%) (Pal, Ray *et al.*, 2006), *A. fumigatus* (4,49%) (Amir, Arif *et al.*, 2013), *A. awamori* (4,58%) (Teixeira, Siqueira *et al.*, 2010) e *A. niger* (9,5%) (Milanezi, Mendoza *et al.*, 2012). Devido ao fato de que β -xilanases atuam sinergicamente para a completa hidrólise de xilana, e, como foi detectada outra forma de β -xilanase no ultrafiltrado (Xyl T2), o rendimento da purificação de Xyl T1 foi provavelmente subestimado. Por outro lado, a β -xilanase Xyl T2 (tabela 3.1), teve um rendimento muito superior aos comumente descritos para β -xilanases, como β -xilanases purificadas de *P. capsulatum* (13,7 e 12%) (Filho, Puls *et al.*, 1993), *A. oryzae* (16,74%) (Duarte, Moreira *et al.*, 2012), *Paecilomyces themophila* (38,3%) (Li, Tian *et al.*, 2006) e *A. caespitosus* (61,6 e 22%) (Sandrim, Rizzatti *et al.*, 2005). Xyl T3 (tabela 3.2) e Xyl T4 (tabela 3.3) apresentaram rendimentos de 26% e 43%, respectivamente. Os rendimentos descritos para as purificações de xilanases de *C. subvermispora*, de 44% (Magalhães e Milagres, 2009) e de *Bacillus stearothermophilus* T-6 (46%) (Khasin, Alchanati *et al.*, 1993), foram bastante próximos ao observado para Xyl T4.

Tabela 3.1. Resumo das etapas de purificação de Xyl T1 e de Xyl T2 produzidas por *A. terreus* cultivado em bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono.

Etapas da purificação	Proteínas totais (mg)	Atividade total (UI)	Atividade específica (UI/mg)	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
Extrato bruto	27,315	2,616	0,096	1,000	100,000
Xyl T1					
Concentrado	6,500	0,286	0,044	0,460	10,930
Sephadex G-50	2,950	0,221	0,075	0,783	8,460
DEAE-Sephacel	0,094	0,149	1,578	16,48	5,700
Xyl T2					
Ultrafiltrado	4,975	1,184	0,238	2,486	45,270
Sephadex G-50	1,683	1,953	1,160	12,114	74,650
DEAE-Sephacel	3,290	1,954	0,594	6,201	74,700

Tabela 3.2. Resumo das etapas de purificação de Xyl T3 produzida por *A. terreus* cultivado em piolho de algodão sujo como fonte de carbono.

Etapas da purificação	Proteínas totais (mg)	Atividade total (UI)	Atividade específica (UI/mg)	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
Extrato bruto	6,240	158,000	25,183	1,000	100,000
Concentrado	3,239	9,500	2,933	0,116	6,010
Ultrafiltrado	1,694	54,540	32,198	1,279	34,520
Sephadex G-50	0,950	81,300	85,579	3,398	51,456
HiTrap SP FF	0,055	41,850	76,213	30,264	26,487

Tabela 3.3. Resumo das etapas de purificação de Xyl T4 produzida por *A. terreus* cultivado em casca de soja como fonte de carbono.

Etapas da purificação	Proteínas totais (mg)	Atividade total (UI)	Atividade específica (UI/mg)	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
Extrato bruto	30,544	103,002	3,372	1,000	100,000
Concentrado	47,426	8,953	0,189	0,056	8,692
Ultrafiltrado	12,290	67,988	5,532	1,640	66,007
Sephadex G-50	3,932	118,607	30,164	8,945	115,150
HiTrap SP FF	3,401	45,117	13,264	3,933	43,802

As β -xilanases purificadas foram visualizadas em gel de poliacrilamida 12%. A eletroforese sob condições desnaturantes de Xyl T1 e Xyl T2 (figura 3.9) mostrou uma única banda protéica, apresentando massas moleculares aparentes de 24,3 e 23,6 kDa, respectivamente. As eletroforeses tanto de Xyl T3 (dados não mostrados) como de Xyl T4 (figura 3.10) mostraram também bandas únicas. Xyl T4 apresentou massa molecular aparente de 23,4 kDa. A massa molecular de Xyl T3 não pode ser determinada devido à baixa concentração proteica e não pode ser detectada pela coloração com nitrato de prata. As massas moleculares observadas são condizentes com a relatada por Chidi e Godana *et al* (2008) para uma β -xilanase purificadas de *A. terreus* UL 4209, com massa de 22 kDa. Entretanto, massas moleculares de 33 e 67 kDa foram determinadas para β -xilanases de *A. terreus*, cepas BCC 129 e S₇, respectivamente (Chantasingh, Pootanakit *et al.*, 2006; Pal, Ray *et al.*, 2006). As β -xilanases purificadas apresentaram massas moleculares menores que outras β -xilanases purificadas de *Aspergillus*. As xilanases de *A. versicolor* (Carmona, Fialho *et al.*, 2005), *A. niger* (Milanezi, Mendoza *et al.*, 2012) e *A. awamori* (Teixeira, Siqueira *et al.*, 2010) apresentam massas moleculares de 32 kDa. Uma xilanase de *A. fumigatus* apresentou massa de 43 kDa (Amir, Arif *et al.*, 2013), enquanto que xilanases de *A. sojae* apresentaram massas de 33 e 36 kDa (Kimura, Sasahara *et al.*, 1995). Os zimogramas dessas amostras também mostraram uma única banda de atividade de β -xilanase, coincidente com aquela corada com nitrato de prata (dados não mostrados). Xilanases de baixa massa molecular como Xyl T1, Xyl T2 e Xyl T4 apresentam propriedades que as tornam úteis em etapas de branqueamento de papel, uma vez que enzimas com menores massas moleculares podem penetrar com maior facilidade na matriz hemicelulose-lignina-celulose das fibras constituintes da polpa de celulose, e hidrolisar eficientemente a xilana, alterando de maneira eficiente as propriedades da polpa (Filho, 1998; Medeiros, Silva *et al.*, 2007). Xilanases com massas

moleculares menores que 30 kDa têm sido agrupadas na família GH 11 (Henrissat e Bairoch, 1993; Sharma e Kumar, 2013).

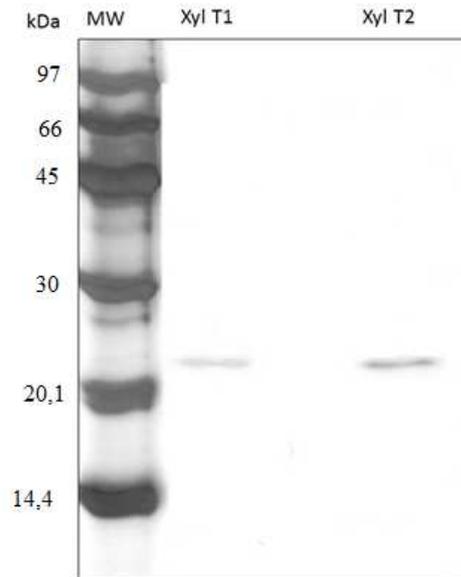


Figura 3.9. SDS-PAGE (12%) das amostras purificadas Xyl T1 e Xyl T2, corado com nitrato de prata. MW – marcador de massa molecular contendo as proteínas: fosforilase B (97 kDa), soroalbumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

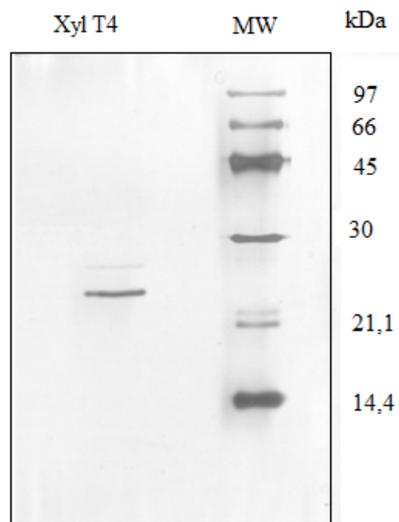


Figura 3.10. SDS-PAGE (12%) da amostra purificada de Xyl T4 corado com nitrato de prata. MW – marcador de massa molecular contendo as proteínas: fosforilase B (97 kDa), soroalbumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

4.2. Espectrometria de massa de Xyl T1 e Xyl T2

As bandas protéicas de Xyl T1 e Xyl T2 separadas por SDS-PAGE foram excisadas e digeridas com tripsina. Embora as bandas das enzimas tenham migrado muito próxima uma a outra, a análise por espectrometria de massas (*peptide mass fingerprint*; PMF), mostrou um perfil de espectros completamente diferente (figura 3.11). Analisando-se ainda os 14 picos mais intensos de cada espectro, tem-se que, provavelmente, Xyl T1 e Xyl T2 são enzimas distintas. Contudo, a análise dos espectros de fragmentação dos peptídeos obtidos (MS/MS) não revelou nenhuma sequência que tivesse identificação positiva com alguma proteína do banco de dados do NCBI para fungos. Em um estudo feito por Chidi, Godana, *et al* (2008) verificou-se que as

sequências de 8 peptídeos, resultantes da análise por MALDI TOF/TOF, mostraram que a β -xilânase produzida por *A. terreus* UL 4209 tem homologia com outras do gênero *Aspergillus*, como *A. terreus* e *A. versicolor*.

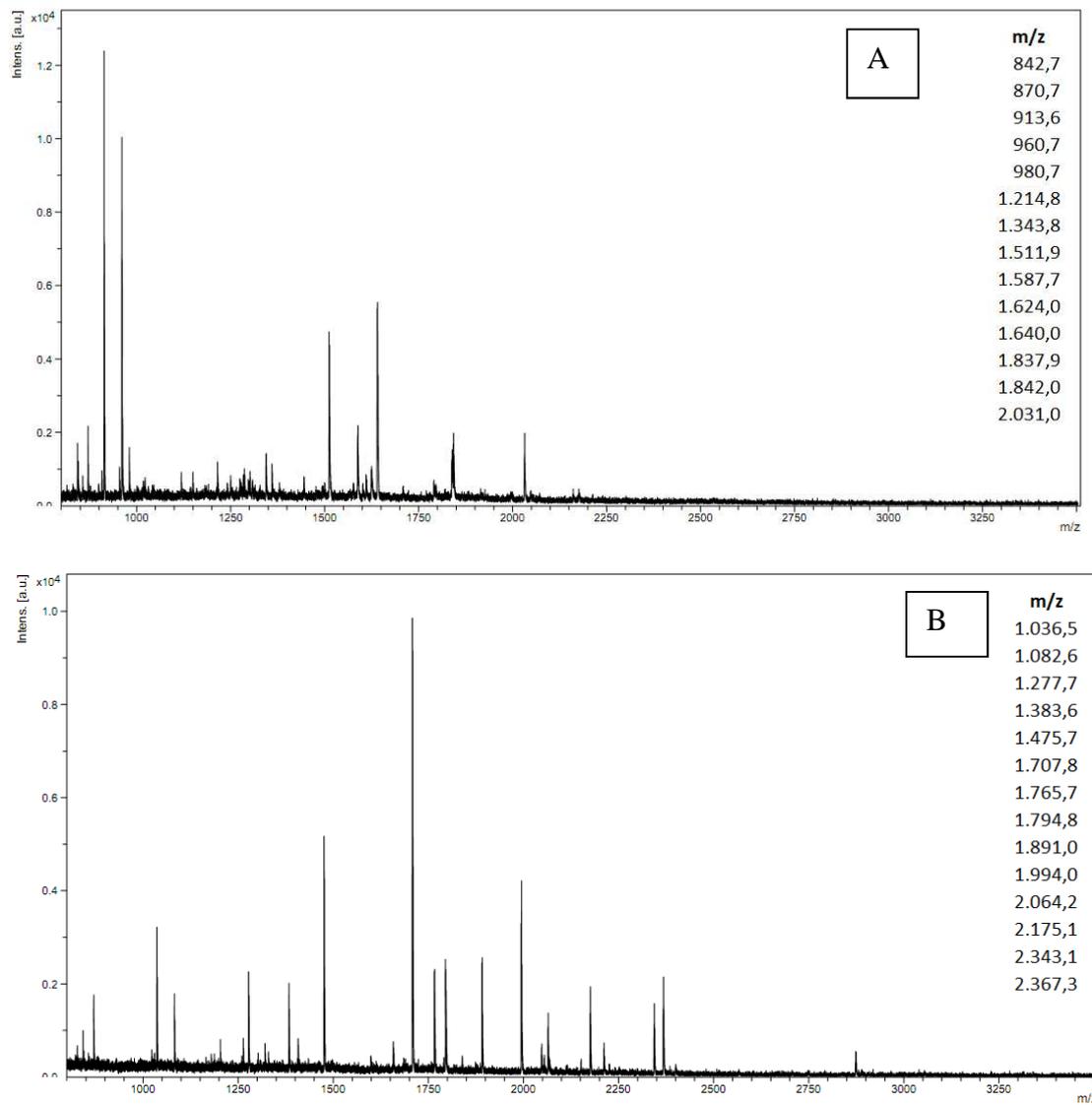


Figura 3.11. Espectrometria de massa de amostras de Xyl T1 (A) e Xyl T2 (B) após digestão com tripsina. Os 14 picos mais intensos após a digestão trípica estão indicadas para cada enzima e representadas pela sua razão massa/carga.

4.3. Microscopia de massa atômica (MFA) de Xyl T1 e Xyl T2

A microscopia de força atômica (MFA) gera imagens tridimensionais, permitindo a medição de estruturas não coradas e não revestidas, com observação direta de espécimes nativos ou em condições quase nativas (Yang, An *et al.*, 2005). A MFA tem sido usada para estudar mudanças físico-químicas na superfície de fibras após o tratamento com xilanases (Ristolainen, Alén *et al.*, 2002; Medeiros, Silva *et al.*, 2007) ou para caracterizar forma, tamanho e heterogeneidade estrutural de arabinoxilanas (Adams, Kroon *et al.*, 2003; Adams, Kroon *et al.*, 2004).

A análise de Xyl T1 e Xyl T2 por microscopia de força atômica foi feita com o objetivo de obter informações sobre possíveis diferenças topográficas entre as duas enzimas em escala nanométrica. As duas enzimas mostraram distribuições bimodais. No caso de Xyl T1, 89,5% das partículas foram observadas na primeira classe, com uma altura média de 6,26 nm e 10,5% das partículas estavam na segunda classe, exibindo uma altura média de 13,5 nm (figura 3.12 – A). Em relação à Xyl T2, foi observado que 80,1% das partículas estavam na primeira classe e 19,9% das partículas estavam na segunda classe, com alturas médias de 4,82 nm e 10,26 nm, respectivamente (figura 3.12 – B). Foram observadas partículas de dois tamanhos em ambas as enzimas, isso pode ser devido às modificações pós-traducionais, que poderiam aumentar o tamanho de uma população dessas enzimas, ou, ainda, pode ser consequência da formação de dímeros entre as partículas, fato que já foi observado em xilanases de *T. reesei* (Parkkinen, Hakulinen *et al.*, 2004), *Thermotoga thermarum* (Sunna, Puls *et al.*, 1996) e *Talaromyces emersonii* (Tuohy, Puls *et al.*, 1993). Além disso, Xyl T2 exibiu, ainda,

partículas de maior tamanho, em torno de 30 nm (figura 3.12 – B – Seta), entretanto, estas partículas são extremamente raras, possivelmente agregados de partículas menores.

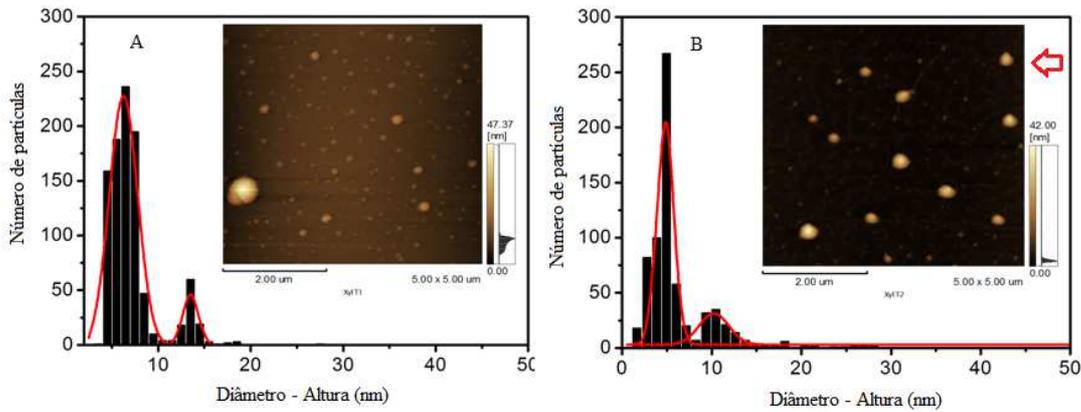


Figura 3.12. Imagens de MFA de amostras purificadas Xyl T1 (A) e Xyl T2 (B), depositadas sobre uma superfície de mica, em concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ e histograma de distribuição de altura de ambas as enzimas. A seta vermelha mostra estruturas de tamanho grande em Xyl T2.

4.4. Caracterização das xilanases purificadas de *A. terreus*

Os valores obtidos para os parâmetros cinéticos de K_m e V_{max} das xilanases purificadas foram determinados para as frações solúveis e insolúveis de xilana de bétula (*birchwood*) e estão apresentados na tabela 3.4. Xyl T1 exibiu valores de K_m bem abaixo do observado por Ghanem e Yusef *et al.* (2000) para uma xilanase purificada de *A. terreus* (16,7 mg/mL). Em comparação à Xyl T1, Xyl T2, Xyl T3 e Xyl T4 apresentaram menor afinidade por xilana, com preferência pela xilana insolúvel, o que

pode sugerir um impedimento estérico, devido à presença de substituintes na xilana solúvel.

Tabela 3.4. Parâmetros cinéticos determinados para xilanases purificadas de *A. terreus*, com xilana de bétula como substrato.

	Xilana solúvel		Xilana insolúvel	
	Km (mg/mL)	Vmax (UI/mL)	Km (mg/mL)	Vmax (UI/mL)
Xyl T1	0,421	0,147	0,465	0,078
Xyl T2	13,030	1,016	10,900	1,020
Xyl T3	6,540	3,090	4,670	0,840
Xyl T4	15,330	5,370	9,500	2,460

Foi observado que as quatro enzimas estudadas mostraram maiores atividades na faixa de pH 4,0 a 7,0 (figura 3.13). Xyl T1 teve maior atividade em pH 6,0, retendo pelo menos 50% da sua atividade máxima no intervalo de pH entre 3,5 e 7,5. Xyl T2 e Xyl T3 exibiram maior atividade em pH 5,0. Xyl T3 manteve pelo menos 70% de sua atividade entre os pHs 3,0 a 7,5. Xyl T4 foi mais ativa em pH 5,5 e reteve 90% de sua atividade em uma faixa de pH entre 4,5 e 7,5.

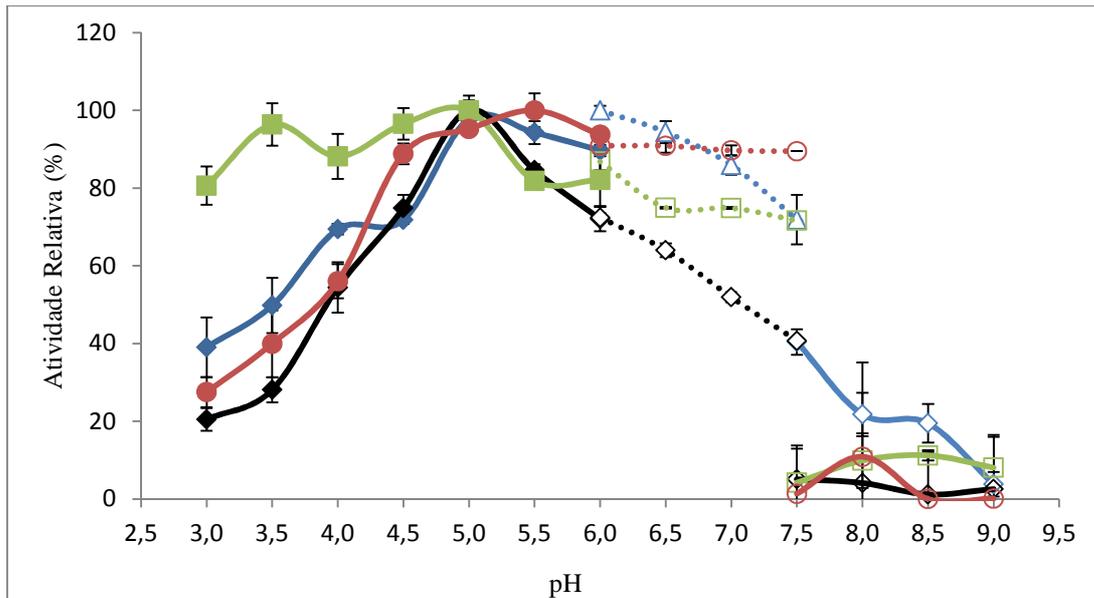


Figura 3.13. Efeito do pH na atividade de xilanases purificadas. Xyl T1 (linha azul), xyl T2 (linha preta), Xyl T3 (linha verde) e Xyl T4 (linha vermelha). Intervalo de pH entre 3,0 a 6,0, tampão acetato de sódio, pH de 6,0 a 7,0, tampão fosfato de sódio e pH entre 7,0 e 9,0, tampão tris-HCl.

Com relação à temperatura, notou-se uma maior atividade no intervalo de temperatura entre 50 e 60°C (figura 3.14). Xyl T1 e Xyl T3 exibiram maior atividade a 50°C, enquanto que Xyl T2 e Xyl T4 tiveram maiores atividades a 45 e 60°C, respectivamente. Xyl T3 foi estável em uma ampla faixa de temperaturas, retendo pelo menos 70% da sua atividade entre 30 e 70°C. As quatro enzimas exibiram atividades muito baixas a 80°C.

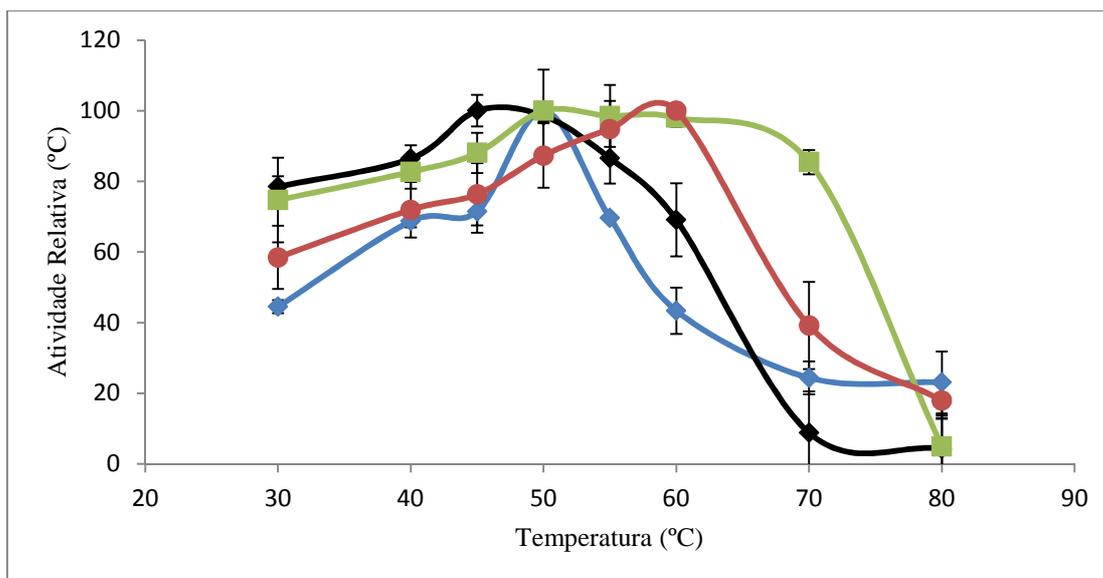


Figura 3.14. Efeito da temperatura na atividade xilanólica das enzimas purificadas de *A. terreus*. Xyl T1 (●), Xyl T2 (●), Xyl T3 (■) e Xyl T4 (●).

Outros estudos envolvendo a purificação e caracterização de β -xilanases *Aspergillus* também estabeleceram a temperatura de 50°C como ideal para a atividade enzimática (tabela 3.5). Os resultados deste trabalho também estão de acordo com os resultados apresentados por Ghanem e Yusef *et al* (2000) que apresentam 50°C como a temperatura de maior atividade para uma xilanase purificada de *A. terreus*, entretanto, Chidi e Godana *et al* (2008) purificaram outra xilanase deste mesmo fungo, com maior atividade a 35°C. Xilanases de diversos fungos do gênero *Aspergillus* apresentam maior atividade na faixa de pH de 4,0 a 6,0 (Subramaniyan e Prema, 2000). De forma geral, os extratos brutos mostraram-se estáveis por maiores variações de temperatura e de pH do que as enzimas puras. Este fato pode ser devido à presença de moléculas com atividade estabilizadora da atividade enzimática presente nos extratos brutos e removida ao longo dos processos de purificação das enzimas.

Tabela 3.5. Características físico-químicas descritas para xilanases purificadas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*.

Espécie	Enzima	Massa		pH ótimo	Temp. ótima (°C)	Referência
		molecular (kDa)	Km			
<i>A. awamori</i> CMI	I	39	-	5,5 – 6,0	55	(Kormelink, Leeuwen <i>et al.</i> , 1993)
<i>A. awamori</i> CMI	II	23	-	5,0	50	(Kormelink, Leeuwen <i>et al.</i> , 1993)
<i>A. awamori</i> CMI	III	26	-	4,0	45-50	(Kormelink, Leeuwen <i>et al.</i> , 1993)
<i>A. terreus</i> UL 4209	xylanase	22	3,57	6,0	35	(Chidi, Godana <i>et al.</i> , 2008)
<i>A. terreus</i>	xylanase	-	16,7	7,0	50	(Ghanem, Yusef <i>et al.</i> , 2000)
<i>A. niger</i>	XYLI	20,8	-	5,0	55	(Frederick, Kiang <i>et al.</i> , 1985)
<i>A. niger</i>	XYLII	13	-	6,0	45	(Frederick, Kiang <i>et al.</i> , 1985)
<i>A. niger</i>	XYLIII	13	-	5,5	45	(Frederick, Kiang <i>et al.</i> , 1985)
<i>A. niger</i>	XYLIV	14	-	4,9	45	(Frederick, Kiang <i>et al.</i> , 1985)
<i>A. niger</i>	XYLV	28	-	5,0	42	(Frederick, Kiang <i>et al.</i> , 1985)

Espécie	Enzima	Massa		pH ótimo	Temp. ótima	Referência
		Molecular (kDa)	Km			
<i>A. caespitosus</i>	Xyl I	27	2,5	6,5 – 7,0	50-55	(Sandrim, Rizzatti <i>et al.</i> , 2005)
<i>A. versicolor</i>	II	32	2,3	6,0 -7,0	55	(Carmona, Fialho <i>et al.</i> , 2005)
<i>A. fumigatus</i>	xylanase	43	3,12	6,0	50	(Amir, Arif <i>et al.</i> , 2013)
<i>A. oryzae</i>	Xyl O1	21,5	3,34	5,5 – 6,0	50	(Duarte, Moreira <i>et al.</i> , 2012)
<i>A. oryzae</i> KBN 616	Xyn G2	21	5,1	6,0	58	(Kimura, Suzuki <i>et al.</i> , 2000)
<i>A. niveus</i> RS2	xylanase	22,5	2,5	7,0	5,0	(Sudan e Bajaj, 2007)
<i>A. kawashii</i>	XylA	32,87	-	5,0 – 5,5	50	(Ito, Ikemasu <i>et al.</i> , 1992)
<i>A. carneus</i> M34	xylanase	18,8	-	6,0	50	(Fang, Chang <i>et al.</i> , 2008)
<i>A. terreus</i>	Xyl T1	24,3	0,421 (S)	6,0	50	Este trabalho
<i>A. terreus</i>	Xyl T2	23,6	13,03 (S)	5,0	45	Este trabalho
<i>A. terreus</i>	Xyl T3	-	6,540 (S)	5,0	50	Este trabalho
<i>A. terreus</i>	Xyl T4	23,4	15,33 (S)	5,5	60	Este trabalho

As enzimas purificadas foram submetidas a ensaios de termoestabilidade nos quais foi dosada a atividade residual de xilanase após um período de incubação, à temperatura ambiente e a 50°C. À temperatura ambiente, a meia vida de Xyl T1 foi de cinco dias. Xyl T2 e Xyl T4 retiveram 100 e 90% de suas atividades iniciais, respectivamente, ao final de sete dias de incubação. Xyl T3 teve baixa estabilidade, de dois dias e meio, à temperatura ambiente. Entretanto, a 50°C a meia vida de todas as enzimas foi reduzida para menos de 12 horas. Com o objetivo de tentar aumentar a estabilidade destas enzimas a 50°C, as mesmas foram incubadas com L-cisteína (20 mM) que aumentou a meia vida de Xyl T1 e de Xyl T2 para 14 e 24 horas, respectivamente, nas outras duas enzimas não foi observado nenhum efeito. A incubação com L-triptofano (20 mM) não acarretou em maior estabilidade da atividade xilanólítica de nenhuma das enzimas. A estabilidade de enzimas pode ser aumentada por muitos métodos, incluindo modificações químicas (Keskar, Srinivasan *et al.*, 1989; Deshpande, Hinge *et al.*, 1990; Angelo, Aguirre *et al.*, 1997) e o uso de aditivos (Singh, Pillay *et al.*, 2000; Sá-Pereira, Paveia *et al.*, 2003). Um efeito estabilizador da atividade de PXII-1, purificada de *A. awamorii* foi observado na presença de 20 mM de cisteína (Teixeira, Siqueira *et al.*, 2010), além disso, 1 mol de triptofano e de cisteína por mol de enzima foi essencial para a atividade de uma xilanase purificada de *Streptomyces* T7 (Keskar, Srinivasan *et al.*, 1989).

A função de ativação ou inibição de compostos químicos ou íons constitui uma ferramenta de grande utilidade na caracterização da estrutura e as possíveis interações que ocorrem no sítio ativo e o mecanismo de ação de enzimas xilanólíticas. Desta forma, o efeito de íons metálicos na atividade de Xyl T1, Xyl T2, Xyl T3 e Xyl T4 foi determinado, conforme mostrado nas tabelas 3.6 e 3.7.

As quatro enzimas purificadas de *A. terreus* foram completamente inativadas quando incubadas com Hg^{2+} na concentração de 10 mM, sugerindo a presença de grupamentos tiol no sítio catalítico destas enzimas (Sandrim, Rizzatti *et al.*, 2005; Teixeira, Siqueira *et al.*, 2010). O efeito inibitório de Hg^{2+} já foi relatado para inúmeras β -xilanases produzidas por vários fungos, entre eles, *A. caespitosus* (Sandrim, Rizzatti *et al.*, 2005), *A. niveus* (Sudan e Bajaj, 2007), *A. awamori* (Teixeira, Siqueira *et al.*, 2010), *A. niger* (Milanezi, Mendoza *et al.*, 2012), *A. oryzae* (Duarte, Moreira *et al.*, 2012), *Penicillium sp* (Murthy e Naidu, 2012) e *Termitomyces clypeatus* (Soren, Jana *et al.*, 2010). O íon Ag^+ (na concentração de 10 mM) e K^+ (nas concentrações de 1 e 10 mM) também tiveram efeitos inibitórios sobre Xyl T1, Xyl T2 e Xyl T3, entretanto Xyl T4 não foi afetada por tais íons. Uma xilanase purificada de *Bacillus stearothermophilus* T-6 também sofreu inibição por Ag^+ (Khasin, Alchanati *et al.*, 1993). Uma inibição causada pelos íons Ag^+ e K^+ também foi observada na xilanase Xyl purificada de *A. niger* (Milanezi, Mendoza *et al.*, 2012), entretanto o íon K^+ teve efeito ativador sobre uma xilanase purificada de *Termitomyces sp* (Faulet, Niamké *et al.*, 2006) e de *Bacillus stearothermophilus* T-6 (Khasin, Alchanati *et al.*, 1993). Por outro lado, o íon Mn^{2+} aumentou a atividade de todas as enzimas em 36% (Xyl T1), 61% (Xyl T2), 26% (Xyl T3) e 20% (Xyl T4) na concentração de 10 mM. Na concentração de 1 mM, o aumento foi de 15 e 16% quando este íon foi incubado com Xyl T2 e Xyl T4, respectivamente. Esse aumento observado durante a incubação com Mn^{2+} indica uma possível função como co-fator na reação enzima-substrato (Ghanem, Yusef *et al.*, 2000). β -xilanases de *A. versicolor* (Carmona, Fialho *et al.*, 2005) e de *A. awamori* (Teixeira, Siqueira *et al.*, 2010) também foram ativadas pelo íon Mn^{2+} , na concentração de 10 mM. Entretanto, a enzima Xyl O1 foi inibida na presença de 10 mM de Mn^{2+} (Duarte, Moreira *et al.*, 2012). Os outros íons, incluindo Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} ,

Cu^{2+} e Na^+ , e EDTA tiveram pouco ou nenhum efeito na atividade destas xilanases estudadas.

Tabela 3.6. Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade das β -xilanases purificadas de *A. terreus* a partir do cultivo submerso com bagaço de cana de açúcar (Xyl T1 e Xyl T2).

	Xyl T1		Xyl T2	
	Atividade Relativa (%)		Atividade Relativa (%)	
	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM
Controle	100,00 \pm 0,006	100,00 \pm 0,02	100,00 \pm 0,053	100,00 \pm 0,030
MgSO ₄	97,40 \pm 0,005	94,67 \pm 0,009	107,77 \pm 0,019	104,25 \pm 0,011
MnCl ₂	110,02 \pm 0,005	136,78 \pm 0,008*	115,24 \pm 0,001*	161,63 \pm 0,020*
AgNO ₃	101,71 \pm 0,005	84,40 \pm 0,018*	118,68 \pm 0,038	69,85 \pm 0,028*
FeSO ₄	102,30 \pm 0,015	96,92 \pm 0,012	71,99 \pm 0,024*	79,98 \pm 0,042*
CoCl ₂	115,95 \pm 0,003*	95,04 \pm 0,010	95,06 \pm 0,049	81,87 \pm 0,002
FeCl ₃	103,14 \pm 0,008	72,39 \pm 0,013*	85,99 \pm 0,022	86,61 \pm 0,007*
CuSO ₄	85,25 \pm 0,005*	86,52 \pm 0,027	84,96 \pm 0,047	75,95 \pm 0,022*
EDTA	97,71 \pm 0,010	91,55 \pm 0,010	101,06 \pm 0,003	93,45 \pm 0,008
CaCl ₂	98,10 \pm 0,010	86,75 \pm 0,022	91,059 \pm 0,019	95,20 \pm 0,006
MgCl ₂	102,23 \pm 0,003	68,90 \pm 0,013*	81,03 \pm 0,012	98,94 \pm 0,015
ZnCl ₂	98,21 \pm 0,007	92,29 \pm 0,029	94,33 \pm 0,029	100,15 \pm 0,003
ZnSO ₄	98,21 \pm 0,009	100,20 \pm 0,005	89,61 \pm 0,033	98,94 \pm 0,003
HgCl ₂	56,220 \pm 0,001*	00,00 \pm 0,001*	86,72 \pm 0,034*	00,00 \pm 0,020*
KCl	79,09 \pm 0,010*	69,26 \pm 0,006*	79,54 \pm 0,024*	79,70 \pm 0,05*
NaCl	98,12 \pm 0,010	96,20 \pm 0,012	91,29 \pm 0,009	98,85 \pm 0,040
CuCl ₂	98,13 \pm 0,010	101,01 \pm 0,005	86,96 \pm 0,052	102,38 \pm 0,040

* Indica diferença estatística no teste pareado LSD – Fisher. DP em relação à média de cada composto avaliado.

Tabela 3.7. Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade das β -xilanases purificadas de *A. terreus* a partir do cultivo submerso com piolho de algodão sujo (Xyl T3) ou casca de soja (Xyl T4).

	Xyl T3		Xyl T4	
	Atividade Relativa (%)		Atividade Relativa (%)	
	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM
Controle	100,00 \pm 0,048	100,00 \pm 0,041	100,00 \pm 0,020	100,00 \pm 0,094
MgSO ₄	104,86 \pm 0,003	106,89 \pm 0,076	102,49 \pm 0,026	94,18 \pm 0,097
MnCl ₂	102,03 \pm 0,031	126,08 \pm 0,022*	116,76 \pm 0,059*	120,00 \pm 0,074*
AgNO ₃	102,55 \pm 0,034	85,00 \pm 0,083*	94,33 \pm 0,34	103,33 \pm 0,084
FeSO ₄	98,64 \pm 0,069	91,77 \pm 0,019	101,90 \pm 0,026	111,94 \pm 0,050
CoCl ₂	105,96 \pm 0,026	104,47 \pm 0,020	90,81 \pm 0,053	79,36 \pm 0,079*
FeCl ₃	104,12 \pm 0,093	99,35 \pm 0,042	98,97 \pm 0,035	74,22 \pm 0,043*
CuSO ₄	97,79 \pm 0,066	78,94 \pm 0,054*	94,43 \pm 0,012	83,80 \pm 0,095*
EDTA	103,41 \pm 0,099	94,58 \pm 0,082	94,81 \pm 0,067	85,65 \pm 0,080*
CaCl ₂	98,67 \pm 0,007	96,36 \pm 0,070	95,17 \pm 0,045	98,93 \pm 0,088
MgCl ₂	91,87 \pm 0,041	100,98 \pm 0,056	111,58 \pm 0,055	101,19 \pm 0,080
ZnCl ₂	97,63 \pm 0,016	97,98 \pm 0,099	97,27 \pm 0,091	101,74 \pm 0,046
ZnSO ₄	98,17 \pm 0,028	94,05 \pm 0,074	102,58 \pm 0,016	95,52 \pm 0,052
HgCl ₂	76,98 \pm 0,057*	00,00 \pm 0,060*	67,94 \pm 0,072*	00,00 \pm 0,087*
KCl	80,09 \pm 0,071*	76,68 \pm 0,068*	79,40 \pm 0,003*	76,92 \pm 0,006*
NaCl	101,98 \pm 0,005	97,98 \pm 0,067	105,14 \pm 0,077	98,61 \pm 0,082
CuCl ₂	101,01 \pm 0,075	104,92 \pm 0,056	81,20 \pm 0,016*	91,81 \pm 0,095

* Indica diferença estatística no teste pareado LSD – Fisher. DP em relação à média de cada composto avaliado.

O efeito de reagentes modificadores de aminoácidos e dos próprios aminoácidos foi avaliado na atividade das β -xilanases Xyl T1 e Xyl T2. Ambas as enzimas foram fortemente inibidas pelo NBS (tabela 3.8), descrito como agente oxidante de resíduos de triptofano. Uma inibição fraca das duas enzimas foi observada na presença do reagente alquilante iodoacetamida, sugerindo que estas enzimas requerem grupamentos tiol para sua estabilidade (Teixeira, Siqueira *et al.*, 2010). Por outro lado, um aumento de 15 e 11% das atividades de Xyl T1 e Xyl T2, respectivamente, foi obtido na presença de L-triptofano, que por sua vez, pode estar envolvido no sítio ativo das enzimas, participando da ligação e/ou hidrólise do substrato e na manutenção da integridade do sítio ativo. Xyl T2 foi ativada em 50% na presença de L-cisteína, sugerindo um envolvimento das ligações de hidrogênio com o substrato ou com o enovelamento da enzima. Embora haja relatos na literatura de uma superestimação da concentração de xilose liberada na hidrólise enzimática de xilana, durante ensaios de DNS na presença de 20 mM de cisteína (Teixeira, Da Silva *et al.*, 2012), esse efeito de interferência da L-cisteína no ensaio de DNS não foi observado. O tratamento de Xyl T2 com DTNB aumentou a atividade da enzima, sugerindo uma influência de L-cisteína na catálise da xilana. Para os outros compostos que contém o grupo tiol, foi observada uma ativação (β -mercaptoetanol) e inibição (DTT) de Xyl T1. A inibição da atividade de Xyl T1 e Xyl T2 por DEPC e EDC apenas para Xyl T2 sugere o envolvimento de histidina e grupos carboxil na atividade enzimática. Xyl T1 e Xyl T2 foram levemente ativadas por DTP e SDS, respectivamente.

Tabela 3.8. Efeito de reagentes modificadores de aminoácidos e aminoácidos na atividade de β -xilanase de Xyl T1 e Xyl T2

Reagente ou aminoácido	Concentração (mM)	Atividade Relativa (%) – Xyl T1	Atividade Relativa (%) – Xyl T2
Controle H ₂ O	-	100,00 \pm 0,011	100,00 \pm 0,010
Controle 4% etanol	-	100,00 \pm 0,020	100,00 \pm 0,014
DTNB ^a	2	88,13 \pm 0,014*	117,16 \pm 0,006*
DTT	20	75,78 \pm 0,008*	109,11 \pm 0,007
L-Cisteína	20	96,71 \pm 0,003	149,86 \pm 0,012*
NBS	1	48,61 \pm 0,027*	11,083 \pm 0,086*
DTP ^a	2	118,66 \pm 0,008*	72,09 \pm 0,037*
L-Triptofano	5	114,69 \pm 0,006	110,68 \pm 0,012*
Iodoacetamida	5	89,40 \pm 0,020*	85,28 \pm 0,006
DEPC	5	81,58 \pm 0,012*	70,07 \pm 0,102*
EDC	5	100,09 \pm 0,006	65,44 \pm 0,043*
β -mercaptoetanol	5	122,92 \pm 0,005*	105,83 \pm 0,040
SDS	20	96,35 \pm 0,014	114,00 \pm 0,014

^aCompostos diluídos em etanol 4%. * Indica diferença estatística no teste pareado LSD

– Fisher. DP em relação à média de cada composto avaliado.

A especificidade das enzimas Xyl T1, Xyl T2 e Xyl T4 foi avaliada por meio de ensaio de hidrólise de diversos substratos (tabela 3.9). As três enzimas mostraram maiores atividades na hidrólise das frações solúveis de xilana de bétula, de aveia e de faia. Nenhuma das enzimas apresentou atividade quando incubadas com papel de filtro.

Estes resultados indicam que estas enzimas têm potencial para aplicações em biobranqueamento de polpa de celulose, uma vez que a aplicação de xilanases em indústrias de polpa e papel requer xilanases livres de atividade celulolítica (Christov, Szakacs *et al.*, 1999; Beg, Kapoor *et al.*, 2001; Cardoso e Filho, 2003; Polizeli, Rizzatti *et al.*, 2005). As três enzimas foram completamente inativas em substratos sintéticos.

Tabela 3.9. Especificidade do substrato de Xyl T1, Xyl T2 e Xyl T4

Substrato	Ligação da cadeia principal	Atividade	Atividade	Atividade
		(IU/mL)	(IU/mL)	(IU/mL)
		Xyl T1	Xyl T2	Xyl T4
Xilana de Bétula (S)	β -1,4	0,400 \pm 0,006	0,360 \pm 0,011	0,289 \pm 0,031
Xilana de Bétula (I)	β -1,4	0,120 \pm 0,050	0,140 \pm 0,018	0,043 \pm 0,018
Xilana de aveia (S)	β -1,4	0,259 \pm 0,008	0,225 \pm 0,028	0,178 \pm 0,062
Xilana de aveia (I)	β -1,4	0,073 \pm 0,019	0,064 \pm 0,085	0,190 \pm 0,057
Xilana de faia (S)	β -1,4	0,253 \pm 0,038	0,208 \pm 0,029	0,227 \pm 0,042
Xilana de faia (I)	β -1,4	0,087 \pm 0,015	0,096 \pm 0,023	0,070 \pm 0,042
Papel de filtro	β -1,4	0,000 \pm 0,001	0,000 \pm 0,001	0,000 \pm 0,002
CM-celulose	β -1,4	0,038 \pm 0,006	0,035 \pm 0,003	0,032 \pm 0,020
Manana	β -1,4	0,046 \pm 0,015	0,075 \pm 0,022	0,000 \pm 0,003
Pectina	α -1,4	0,042 \pm 0,004	0,046 \pm 0,008	0,094 \pm 0,033
ρ NPX	ρ NP- β -1,4	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,005	0,000 \pm 0,000
ρ NPA	ρ NP- α -1,4	0,000 \pm 0,003	0,000 \pm 0,030	0,000 \pm 0,002
ρ NPG	ρ NP- β -1,4	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,005	0,000 \pm 0,004
ρ NPM	ρ NP- β -1,4	0,000 \pm 0,003	0,000 \pm 0,000	0,00 \pm 0,004

(S) Solúvel (I) Insolúvel

5. Conclusões

- Xilanases de baixa massa molecular foram purificadas usando-se técnicas de ultrafiltração e cromatografias;
- Xyl T2 apresentou alto rendimento na purificação (74,70%);
- MFA mostrou diferenças na topografia entre Xyl T1 e Xyl T2;
- Espectrometria de massa mostrou dois espectros diferentes para Xyl T1 e Xyl T2;
- Xyl T1 e Xyl T2 apresentaram especificidade pela hidrólise de xilana, sendo enzimas com bom potencial para aplicações na indústria de papel e celulose, já que esta atividade industrial requer xilanases sem atividade de celulases.

6. Perspectivas

- Análise de espectrometria de massa de Xyl T3 e Xyl T4;
- Análise por MFA de Xyl T3 e Xyl T4;
- Analisar a especificidade de hidrólise da enzima Xyl T3;
- Analisar o efeito de reagentes modificadores de aminoácidos e dos aminoácidos em Xyl T3 e Xyl T4.

7. Bibliografia

ADAMS, E. L.; KROON, P. A.; WILLIAMSON, G.; GILBERT, H. J.; MORRIS, V. J. Inactivated enzymes as probes of the structure of arabinoxylans as observed by atomic force microscopy. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 3, p. 579-590, 2004.

ADAMS, E. L.; KROON, P. A.; WILLIAMSON, G.; MORRIS, V. J. Characterization of heterogeneous arabinoxylans by direct imaging of individual molecules by atomic force microscopy. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 8, p. 771-780, 2003.

AGNIHOTRI, S.; DUTT, D.; TYAGI, C. H.; KUMAR, A.; UPADHYAYA, J. S. Production and biochemical characterization of a novel cellulase-poor alkali-thermo-tolerant xylanase from *Coprinellus disseminatus* SW-1 NTCC 1165. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 1349-1359, 2010.

AMIR, A.; ARIF, M.; PANDE, V. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus fumigatus* isolated from soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 20, p. 3049-3057, 2013.

ANGELO, R.; AGUIRRE, C.; CUROTTO, E.; ESPOSITO, E.; FONTANA, J. D.; BARON, M.; MILAGRES, A. M.; DURAN, N. Stability and chemical modification of xylanase from *Aspergillus* sp. (2M1 strain). **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 25, p. 19-27, 1997.

BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 504-510, 2007.

BEG, Q.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326-338, 2001.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.

CARDOSO, O. A. V.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, n. 2, p. 309-314, 2003.

CARMONA, E. C.; FIALHO, M. B.; BUCHGNANI, É. B.; COELHO, G. D.; BROCHETO-BRAGA, M. R.; JORGE, J. A. L. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 359-364, 2005.

CHANTASINGH, D.; POOTANAKIT, K.; CHAMPREDA, V.; KANOKRATANA, P.; EURWILAICHITR, L. Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 46, n. 1, p. 143-149, 2006.

CHIDI, S. B.; GODANA, B.; NCUBE, I.; VAN RENSBURG, E. J.; CRONSHAW, A.; ABOTSI, E. Production, purification and characterization of cellulase-free xylanase

from *Aspergillus terreus* UL 4209. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 21, p. 3939-3948, 2008.

CHRISTOV, L. P.; SZAKACS, G.; BALAKRISHNAN, H. Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 511-517, 1999.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3-23, 2005.

DESHPANDE, V.; HINGE, J.; RAO, M. Chemical modification of xylanases: evidence for essential tryptophan and cysteine residues at the active site. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1041, n. 2, p. 172-177, 1990.

DUARTE, G.; MOREIRA, L.; GÓMEZ-MENDOZA, D.; SIQUEIRA, F. G. D.; BATISTA, L.; AMARAL, L.; RICART, C.; FILHO, E. Use of Residual Biomass from the Textile Industry as Carbon Source for Production of a Low-Molecular-Weight Xylanase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 754-772, 2012.

FANG, H.-Y.; CHANG, S.-M.; LAN, C.-H.; FANG, T. J. Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 49-55, 2008.

FAULET, B. M.; NIAMKÉ, S.; GONNETY, J. T.; KOUAMÉ, L. P. Purification and biochemical properties of a new thermostable xylanase from symbiotic fungus, *Termitomyces* sp. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 273-282, 2006.

FILHO, E. F.; PULS, J.; COUGHLAN, M. Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 171-180, 1993.

FILHO, E. X. F. Hemicellulases and biotechnology. In: PANDALAI, S. G. (Ed.). **Recent research developments in microbiology**. Trivandrum, 1998. p.165-176.

FREDERICK, M. M.; KIANG, C.-H.; FREDERICK, J. R.; REILLY, P. J. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. Two isozymes active on xylan backbones near branch points. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 4, p. 525-532, 1985.

GHANEM, N. B.; YUSEF, H. H.; MAHROUSE, H. K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett–Burman

experimental design to evaluate nutritional requirements. **Bioresource Technology**, v. 73, n. 2, p. 113-121, 2000.

GHOSE, T. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ŽUPANČIČ, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 2, p. 137-161, 1996.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, p. 781-788, 1993.

ITO, K.; IKEMASU, T.; ISHIKAWA, T. Cloning and sequencing of the xynA gene encoding xylanase A of *Aspergillus kawachii*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** v. 56, p. 906-912, 1992.

KAMBLE, R. D.; JADHAV, A. R. Isolation, identification and screening of potential cellulase-free xylanase producing fungi and its production. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 77, p. 14175-14181, 2012.

KESKAR, S. S.; SRINIVASAN, M. C.; DESHPANDE, V. V. Chemical modification of a xylanase from a thermotolerant *Streptomyces*. Evidence for essential tryptophan and cysteine residues at the active site. **Biochemical Journal**, v. 261, p. 49-55, 1989.

KHASIN, A.; ALCHANATI, I.; SHOHAM, Y. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1725-30, 1993.

KIMURA, I.; SASAHARA, H.; TAJIMA, S. Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 4, p. 334-339, 1995.

KIMURA, T.; SUZUKI, H.; FURUHASHI, H.; ABURATANI, T.; MORIMOTO, K.; KARITA, S.; SAKKA, K.; OHMIYA, K. Molecular Cloning, Overexpression, and Purification of a Major Xylanase from *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n. 12, p. 2734-2738, 2000.

KORMELINK, F. J. M.; LEEUWEN, M. J. F. S.; WOOD, T. M. V., A. G. J. . Purification and characterization of three endo-(1,4)- β -xylanases and one b-xylosidase from *Aspergillus awamori*. **Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 249-265, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEATHERBARROW, R. J. **Enzfitter Manual, a Non-Linear Curve Fitting Program for Windows**. London: Biosoft, 1999.

LI, L.; TIAN, H.; CHENG, Y.; JIANG, Z.; YANG, S. Purification and characterization of a thermostable cellulase-free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces thermophila*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 6, p. 780-787, 2006.

MAGALHÃES, P. O.; MILAGRES, A. M. F. Biochemical properties of a β -mannanase and a β -xylanase produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during biopulping conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 2, p. 191-195, 2009.

MEDEIROS, R. G.; SILVA, L. P.; AZEVEDO, R. B.; SILVA JR, F. G.; FILHO, E. X. F. The use of atomic force microscopy as a tool to study the effect of a xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in kraft pulp bleaching. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 723-731, 2007.

MILANEZI, N.; MENDOZA, D.; SIQUEIRA, F.; SILVA, L.; RICART, C.; FILHO, E. Isolation and Characterization of a Xylan-Degrading Enzyme from *Aspergillus niger* van Tieghem LPM 93 with Potential for Industrial Applications. **BioEnergy Research**, v. 5, n. 2, p. 363-371, 2012.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOTTA, F.; ANDRADE, C.; SANTANA, M. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. In: CHANDEL, A. K. e SILVA, S. S. (Ed.). **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**: InTech, 2013. cap. 10,

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 657-664, 2012.

PAL, A.; RAY, L.; CHATTOPADHYAY, P. Purification and immobilization of an *Aspergillus terreus* xylanase: Use of continuous fluidized bed column reactor. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 163-168, 2006.

PANDYA, J. J.; GUPTA, A. Production of xylanase under solid-state fermentation by *Aspergillus tubingensis* JP-1 and its application. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 35, n. 5, p. 769-779, 2012.

PARKKINEN, T.; HAKULINEN, N.; TENKANEN, M.; SIIKA-AHO, M.; ROUVINEN, J. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a novel *Trichoderma reesei* xylanase IV belonging to glycoside hydrolase family 5. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography** v. 60, n. 3, p. 542-544, 2004.

PERKINS, D.; PAPPIN, D.; CREASY, D.; COTTRELL, J. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3551-3567, 1999.

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

PUCHART, V. R.; KATAPODIS, P.; BIELY, P.; KREMNICKEY, L. R.; CHRISTAKOPOULOS, P.; VRŠANSKÁ, M.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; BHAT, M. K. Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 5-6, p. 355-361, 1999.

RISTOLAINEN, M.; ALÉN, R.; MALKAVAARA, P.; PERE, J. **Reflectance FTIR Microspectroscopy for Studying Effect of Xylan Removal on Unbleached and Bleached Birch Kraft Pulps**. *Holzforschung*. 56: 513 p. 2002.

SÁ-PEREIRA, P.; PAVEIA, H.; COSTA-FERREIRA, M.; AIRES-BARROS, M. A new look at xylanases. **Molecular Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 257-281, 2003.

SALLES, B. C.; CUNHA, R. B.; FONTES, W.; SOUSA, M. V.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **Journal of Biotechnology**, v. 81, n. 2-3, p. 199-204, 2000.

SANDRIM, V. C.; RIZZATTI, A. C. S.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; MILAGRES, A. M. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1823-1828, 2005.

SHARMA, M.; KUMAR, A. Xylanases: An overview. **British Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-28, 2013.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856-2860, 2006.

SINGH, S.; PILLAY, B.; PRIOR, B. A. Thermal stability of beta-xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 502-508, 2000.

SOREN, D.; JANA, M.; SENGUPTA, S.; GHOSH, A. K. Purification and characterization of a low molecular weight endo-xylanase from mushroom *Termitomyces clypeatus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 2, p. 373-389, 2010.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Cellulase-free xylanase from *Bacillus* and other microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, p. 1-7, 2000.

SUDAN, R.; BAJAJ, B. Production and biochemical characterization of xylanase from an alkalitolerant novel species *Aspergillus niveus* RS2. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 491-500, 2007.

SUNNA, A.; PULS, J.; ANTRANIKIAN, G. Purification and characterization of two thermostable endo- β -xylanases from *Thermotoga thermarum*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 24, p. 177-185, 1996.

TEIXEIRA, R.; SIQUEIRA, F.; SOUZA, M. D.; FILHO, E.; BON, E. D. Purification and characterization studies of a thermostable β -xylanase from *Aspergillus awamori*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 10, p. 1041-1051, 2010.

TEIXEIRA, R. S. S.; DA SILVA, A. S. A.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; BON, E. P. D. S. Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements. **Carbohydrate Research**, v. 363, n. 0, p. 33-37, 2012.

TORRES, J.; DELA CRUZ, T. Production of xylanases by mangrove fungi from the Philippines and their application in enzymatic pretreatment of recycled paper pulps. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 645-655, 2013.

TUOHY, M.; PULS, J.; CLAEYSSSENS, M.; VRSANSKA, M.; COUGHLAN, M. The xylan-degrading enzyme system of *Talaromyces emersonii*: novel enzymes with activity against aryl β -D-xylosides and unsubstituted xylans. **Biochemical Journal**, v. 290, p. 515-523, 1993.

XIMENES, F. A.; SOUSA, M. V.; PULS, J.; DA SILVA, F. G., JR.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a low-molecular-weight xylanase produced by *Acrophialophora nainiana*. **Current Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 18-21, 1999.

XIMENES, F. D. A.; SILVEIRA, F. Q. D. P.; FILHO, E. X. F. Production of b-Xylosidase activity by *Trichoderma harzianum* Strains. **Current Microbiology**, v. 33, p. 71-77, 1996.

YANG, H.; AN, H.; FENG, G.; LI, Y. Visualization and quantitative roughness analysis of peach skin by atomic force microscopy under storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 6, p. 571-577, 2005.

Capítulo IV

*Influência de compostos fenólicos na atividade de β - xilanases purificadas de *Aspergillus terreus**

Resumo

O pré-tratamento da biomassa gera compostos fenólicos solúveis que têm ação inibitória e dificultam tanto a hidrólise enzimática quanto a fermentação de açúcares a etanol. Quatro enzimas purificadas de *A. terreus* foram pré-incubadas com os compostos fenólicos: ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, vanilina, ácido cinâmico, ácido 4-hidroxi-benzóico e ácido tânico. Xyl T1 e Xyl T3 foram inibidas em maior ou menor grau por todos os compostos fenólicos. A maior inibição de Xyl T1 foi observada com o ácido cinâmico, enquanto que Xyl T3 foi mais fortemente inibida pela vanilina. Por outro lado, Xyl T2 e Xyl T4 foram bastante resistentes a todos os compostos fenólicos testados, os únicos compostos com atividade inibitória sobre Xyl T4 foram os ácidos tânico e cinâmico. Com relação à Xyl T1, houve, dependendo do composto fenólico utilizado, um aumento ou diminuição do K_m aparente com xilana de bétula. Houve uma diminuição do K_m aparente de Xyl T2 para xilana de bétula, após a incubação desta enzima com todos os compostos fenólicos.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, lignina, pré-tratamento, inibidores de xilanase, constante de Michaelis-Menten.

1. Introdução

A maior limitação para a conversão de biomassa a produtos finais de alto valor agregado é a recalcitrância natural da lignocelulose. Um arranjo complexo entre a holocelulose, as proteínas e a lignina torna a estrutura da parede celular uma estrutura de difícil degradação para as enzimas que a hidrolisam. O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é um passo crucial antes da hidrólise enzimática da holocelulose contida na parede celular vegetal. Aspectos físicos, químicos e morfológicos da lignocelulose são alterados durante o pré-tratamento e, geralmente tornam a biomassa mais acessível à sacarificação enzimática. Várias opções de pré-tratamentos estão disponíveis para fracionar, solubilizar, hidrolisar e separar a celulose, hemicelulose e lignina (Saha, 2003; Duarte, Moreira *et al.*, 2012).

Na parede celular nativa, bem como na biomassa lignocelulósica minimamente tratada, a maior parte dos compostos fenólicos é encontrada na lignina, um complexo fenólico heterogêneo, que está ligado à celulose e à hemicelulose (Tejirian e Xu, 2011; Duarte, Moreira *et al.*, 2012). Durante o pré-tratamento da biomassa, a lignina é normalmente modificada, resultando em demetilação ou solubilização com formação de fenóis simples ou oligoméricos. A fração insolúvel da lignina pode permanecer após o pré-tratamento e estar presente junto com a celulose e hemicelulose na biomassa, o que dificulta a ação hidrolítica de celulasas e hemicelulasas devido à adsorção inespecífica (Berlin, Balakshin *et al.*, 2006; Xu, Ding *et al.*, 2008; Tejirian e Xu, 2011). O uso de aditivos, como *Tween*, polietileno-glicol (PEG) e albumina bovina sérica (BSA) tem mostrado resultados promissores para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática da

lignocelulose, pois eles ligam-se a superfície da lignina, prevenindo a ligação entre as enzimas e a lignina (Börjesson, Engqvist *et al.*, 2007). Além disso, a adição de NaCl (concentrações de 0 – 0,4 M) mostrou que a força iônica também tem efeito na diminuição da adsorção de celulasas à lignina, pois os íons do sal poderiam tanto competir com a proteína por sítios de ligação, quanto alterar a configuração da proteína, resultando numa diminuição nas interações entre a proteína e a lignina (Can e Güner, 2006).

O processo físico-químico de pré-tratamento da lignocelulose modifica a estrutura da lignina e promove a solubilização dos fenóis. Muitos compostos fenólicos simples foram identificados na fração solúvel da biomassa pré-tratada, e eles frequentemente inibem fungos ou bactérias, que convertem glicose, xilose ou outros carboidratos em etanol. Além disso, os compostos fenólicos podem reagir com proteínas através de interações covalentes ou não covalentes (ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas) (Kroll, Rawel *et al.*, 2003). Uma interferência dos subprodutos solúveis de degradação da lignina no processo de ligação entre xilanase e xilana foi também observado por Kaya e Heitmann *et al* (2000).

Para aplicação industrial de enzimas, a interação entre enzima e substrato deve ser muito bem entendida, assim como as variáveis que estão envolvidas nesse processo. Na parede celular, a celulose e a hemicelulose estão associadas à lignina, por esta razão, é importante determinar como a lignina e seus subprodutos afetam a atividade enzimática de xilanases e celulasas, além de investigar seu mecanismo de ação (Kaya, Heitmann *et al.*, 2000; Tian, Jiang *et al.*, 2013).

2. Objetivos

- 2.1. Analisar o efeito dos compostos fenólicos, ácido ferúlico, ácido ρ -cumárico, vanilina, ácido cinâmico, ácido 4-hidroxi-benzóico e ácido tânico sobre a atividade de β -xilanases purificadas de *A. terreus*;
- 2.2. Analisar o efeito destes compostos fenólicos sobre constantes cinéticas de Xyl T1 e Xyl T2.

3. Material e métodos

3.1. Inibição e desativação por compostos fenólicos

O efeito de compostos fenólicos na atividade das xilanases purificadas de *A. terreus*, Xyl T1, Xyl T2, Xyl T3 e Xyl T4 foi avaliado pela pré-incubação das enzimas com ácido ferúlico, ácido ρ -cumárico, vanilina, ácido cinâmico, ácido 4-hidroxi-benzóico e ácido tânico, na concentração de 1 mg/mL, em água (vanilina e ácido ferúlico) ou álcool (ácidos cinâmico, 4-hidroxi-benzóico, ρ -cumárico e tânico). O efeito de inibição foi medido imediatamente após a incubação das enzimas com os compostos fenólicos, enquanto que o efeito de desativação foi relativo ao tempo de incubação (Ximenes, Kim *et al.*, 2011). A incubação foi feita a 25°C por sete dias. Alíquotas foram retiradas em intervalos para determinar a atividade residual de β -xilanase. A determinação da atividade residual de xilanase após a incubação com os compostos fenólicos foi feita conforme descrito no item 3.6 do capítulo II, desta tese. Os controles foram feitos com a pré-incubação das enzimas com água ou álcool e submetidos às mesmas condições de ensaio. A atividade enzimática foi expressa como atividade

relativa, sendo que 100% de atividade correspondeu à atividade realizada a partir de amostras retiradas do controle no tempo zero da incubação. Os desvios-padrão foram calculados como percentuais da média para o ensaio correspondente.

3.2. Determinação de parâmetros cinéticos de Xyl T1 e Xyl T2

Os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) foram determinados para Xyl T1 e Xyl T2, após pré-incubação das enzimas com todos os compostos fenólicos, à temperatura ambiente. Xyl T1 foi pré-incubada em tempo igual à sua meia vida com cada composto fenólico. Xyl T2 foi pré-incubada por 30 minutos. Após a pré-incubação, as constantes cinéticas foram determinadas conforme descrito no item 3.5.1 do capítulo III.

3.3. Análises estatísticas

Os experimentos de desativação e inibição por compostos fenólicos foram submetidos à ANOVA fatorial e teste *post hoc* de comparação pareada LSD Fisher, conforme descrito no item 3.7 do capítulo III.

4. Resultados e discussão

4.1. Efeitos de compostos fenólicos na atividade de β -xilanasas purificadas de *A. terreus*

Segundo Ximenes e Kim *et al* (2011), a inibição se dá quando a ação do composto fenólico sobre a enzima ocorre imediatamente após o contato da enzima com o composto, por outro lado, a desativação ocorre após a pré-incubação da enzima com o composto fenólico por determinado tempo. A concentração usada dos compostos fenólicos (1mg/mL) não teve interferência na curva de DNS. Experimentos anteriores foram feitos com duas concentrações mais altas (5 mg/mL e 10 mg/mL) e nestas concentrações, os compostos fenólicos interferiram na curva de DNS, aumentando os valores de absorbância (dados não mostrados).

Xyl T1 teve sua atividade fortemente reduzida por todos os compostos fenólicos (figura 4.1 A e B). Os ácidos ferúlico, tânico e 4-hidroxi-benzóico e a vanilina inibiram aproximadamente 35% da atividade inicial da enzima. Com o ácido p -cumárico nota-se uma desativação progressiva, com o decorrer do tempo, chegando a 50% de redução da atividade com 8 horas de incubação. O efeito mais forte de desativação foi notado com ácido cinâmico, que com meia hora de incubação, desativou completamente a enzima. Conforme discutido no capítulo I, os ácidos ferúlico e p -cumárico podem fazer parte da constituição da xilana, sugerindo que a hidrólise da xilana também libere compostos que afetem negativamente a atividade desta enzima. Sabe-se que compostos fenólicos têm ação de inibir ou desativar as holocelulases (tabela 4.1).

Tabela 4.1. Efeito inibidor de compostos fenólicos na atividade de holocelulases.

Composto fenólico	Efeito	Referência
Ácido vanílico, ácido siríngico, acetoseringona, seringaldeído	Forte inibição da atividade de xilanase. Nenhum efeito significativo na atividade de celulase e β -glicosidase	(Panagiotou e Olsson, 2007)
Ácido ferúlico	Desativação de β -glicosidase	(Ximenes, Kim <i>et al.</i> , 2011)
Ácido ferúlico	Repressão da atividade de pectinase	(Wu, Luo <i>et al.</i> , 2010)
fenóis substituídos (clorofenóis, saligenina, orto fenil fenol e clorofenil)	Inibição moderada de celulases fúngicas	(Mandels e Reese, 1965)
Ácidos tânico, gálico, hidroxicinâmico, 4-hidroxibenzóico e vanilina	20-80% de desativação de celulases e/ou β -glicosidases, após 24 h de pré-incubação.	(Ximenes, Kim <i>et al.</i> , 2010; Ximenes, Kim <i>et al.</i> , 2011)
Ácido tânico	Forte inibição na atividade de celulase de uma	(Tejirian e Xu, 2011)

	preparação da Novozyme.	
Ácido sinápico	Forte inibição de uma celulase commercial (celluclast 1.5 L)	(Sineiro, Dominguez <i>et al.</i> , 1997)
Taninos condensados	Ação inibitória sobre as atividades de endoglucanases e avicelases	(Bae, Mcallister <i>et al.</i> , 1993; Mcallister, Bae <i>et al.</i> , 1994)
Derivados de lignina	Forte inibição de celulase comercial (Spezyme CP)	(Jing, Zhang <i>et al.</i> , 2009)

Compostos fenólicos, especialmente os ácidos tânico e gálico causaram tanto inibição quanto desativação em β -glicosidases de *A. niger* e *Trichoderma reesei* (Kim, Ximenes *et al.*, 2011). Celulases e pectinases foram inibidas pela presença de compostos fenólicos produzidos após pré-tratamento fibras de linho (Gamble, Snook *et al.*, 2000). Outro estudo mostrou que guaiacol (2-metoxifenol) e ácido caféico (3,4 - ácido di-hidroxicinâmico) inibiram significativamente a atividade de xilanase presente no extrato bruto de *A. japonicus* (Sharma, Milstein *et al.*, 1985). Outro estudo feito com uma xilanase comercial derivada de *Trichoderma*, mostrou que esta enzima foi mais inibida por preparação contendo compostos fenólicos solúveis derivados de lignina do que por preparação contendo resíduos de lignina após tratamento enzimático (Berlin, Balakshin *et al.*, 2006). Os compostos solúveis derivados da lignina contêm menos grupos reativos (grupos carboxil e hidroxila) que as preparações contendo resíduos de lignina após tratamento enzimático. Estes resultados sugerem uma maior hidrofobicidade na primeira preparação do que na segunda. Supostamente, interações hidrofóbicas desempenham um importante papel na adsorção de enzimas à lignocelulose (Palonen, Tjerneld *et al.*, 2004; Berlin, Balakshin *et al.*, 2006; Berlin, Maximenko *et al.*, 2007)

O teste de Fisher dos dados de Xyl T1 mostrou que, no tempo zero, os compostos fenólicos (ácidos ferúlico, tânico, 4-hidroxi-benzóico e a vanilina) têm ação inibitória estatisticamente significativa sobre o controle (ANOVA $p = 0,000$), com exceção do ácido cinâmico que não se diferencia do controle. Ao final dos sete dias, todos os tratamentos diferem-se estatisticamente do controle (ANOVA $p = 0,000$). Na figura 4.2 está mostrado o efeito do tempo e dos diversos tratamentos, em função da liberação de açúcares redutores por Xyl T1.

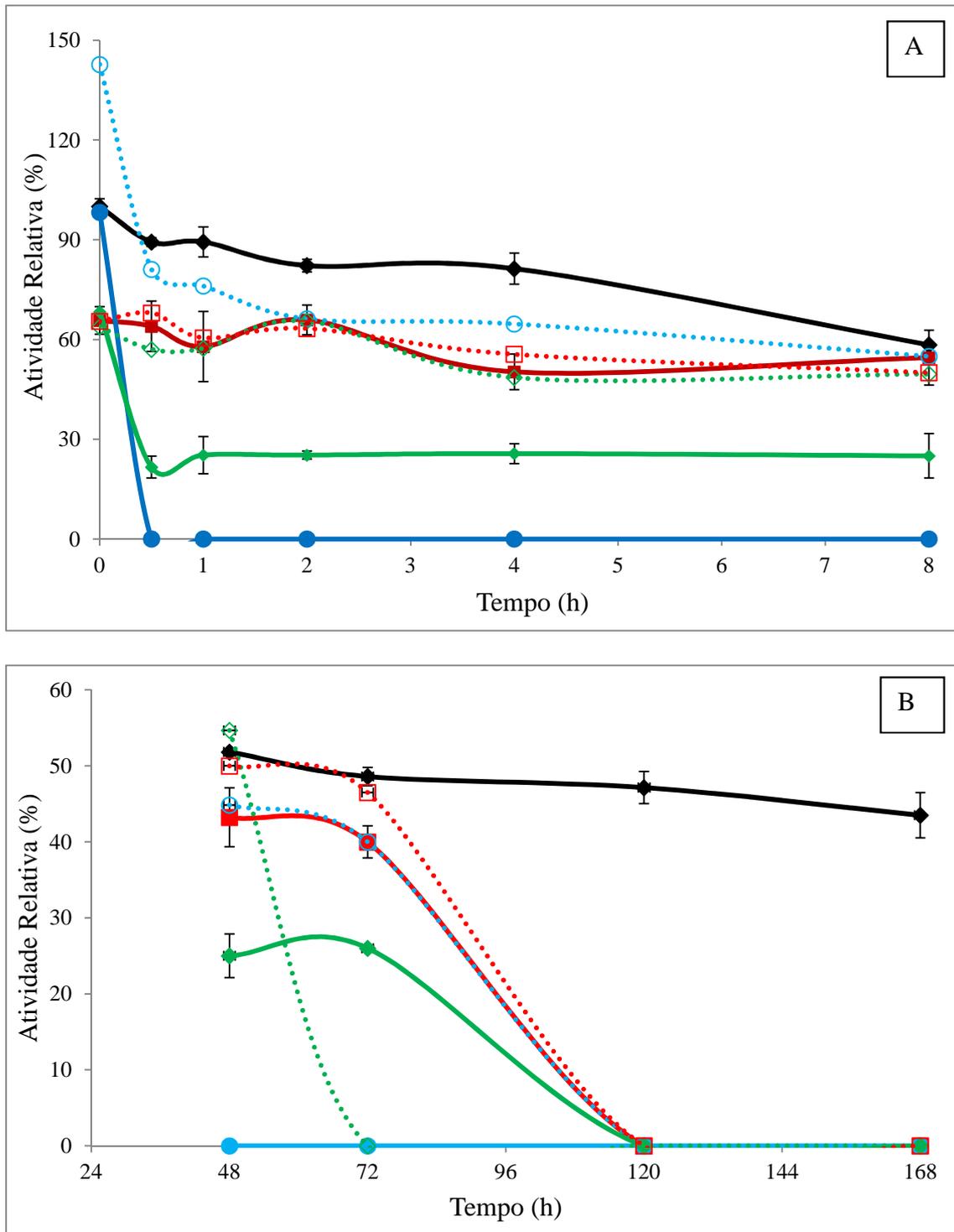


Figura 4.1. Efeito de compostos fenólicos na atividade xilanólítica de Xyl T1. Controle (◆), ácido ferúlico (■), ácido cinâmico (●), Vanilina (◆), ácido tânico (□), ácido p-cumárico (○), ácido 4-hidroxi-benzóico (◇). (A) Tempos entre 0 e oito horas. (B) tempos entre 48 e 168 horas. Atividades relativas ao controle no tempo zero.

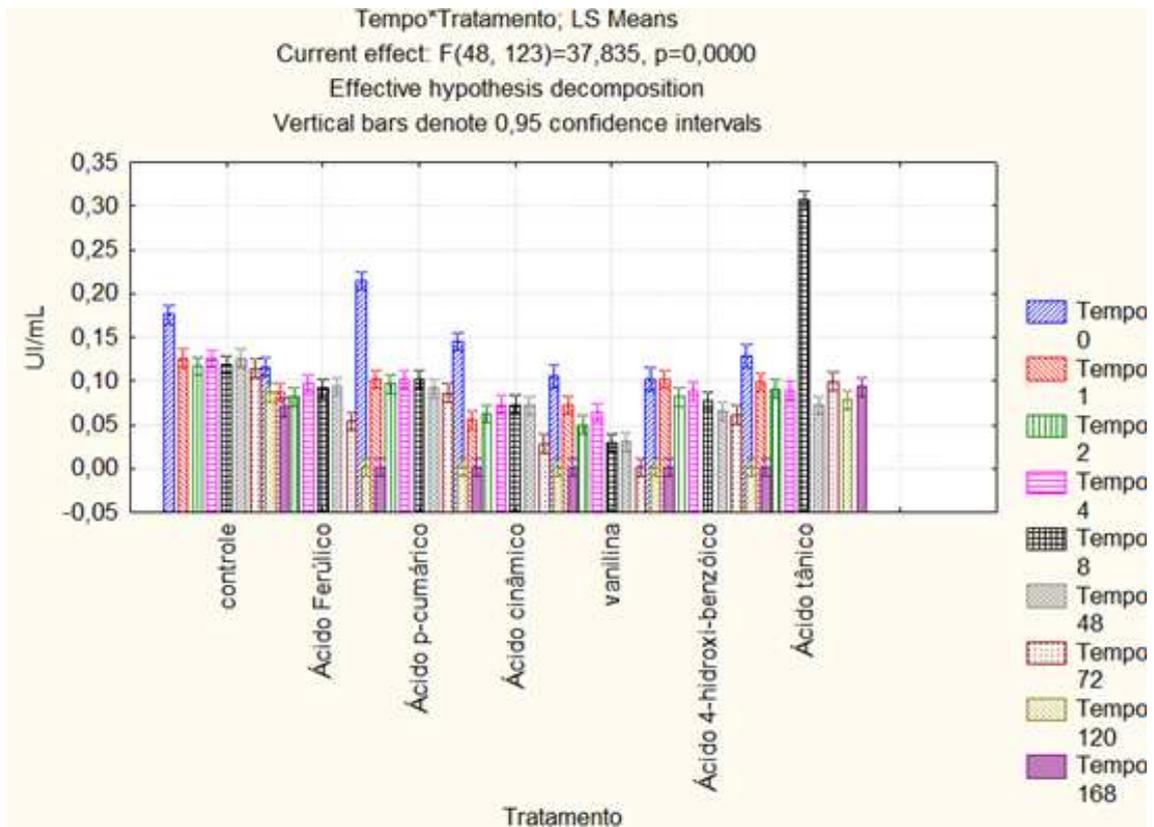


Figura 4.2. Efeito do tempo (h) e dos tratamentos em função da liberação de açúcares redutores para Xyl T1.

Espera-se que a desativação da enzima aumente quanto maior for o tempo de exposição da enzima aos fenóis e este efeito foi notado em quase todos os compostos fenólicos testados contra Xyl T1. Conforme discutido no capítulo III, a meia vida desta enzima à temperatura ambiente foi de cinco dias, entretanto, na presença dos ácidos ferúlico e p-cumárico, a meia vida foi reduzida para 48 e 72 horas, respectivamente. O maior efeito sobre a meia vida foi detectado com o ácido cinâmico e a vanilina, que reduziram a meia vida de Xyl T1 para apenas 15 minutos. Os ácidos tânico e 4-hidroxi-benzóico reduziram a meia vida de Xyl T1 para oito e quatro horas, respectivamente. De forma similar, a meia vida da xilanase Tx-Xyl, purificada de *Thermobacillus*

xylanilyticus foi reduzida na presença dos ácidos cinâmico, *p*-cumárico, caféico, ferúlico e 3,4,5-trimetoxi-cinâmico (Boukari, O'donohue *et al.*, 2011).

De forma oposta à Xyl T1, Xyl T2 foi muito resistente a todos os compostos fenólicos estudados (figura 4.3 A e B). Na ausência de tais compostos (controle), a enzima mostrou-se estável a temperatura ambiente, mesmo após sete dias de incubação. No início da incubação (tempo zero), pelos resultados do teste pareado LSD Fisher, todos os compostos se diferenciam estatisticamente do controle, com efeitos ativadores da atividade de Xyl T2, com exceção dos ácidos tânico e cinâmico. A única ação inibitória sobre a atividade de Xyl T2 foi notada com ácido cinâmico, após sete dias de incubação, reduzindo a atividade para 70% da inicial. Os outros compostos fenólicos não foram capazes de inibir nem desativar esta enzima, chegando a causar uma ativação aparente de sua atividade em alguns casos. Na literatura, existem poucos relatos de ativação de xilanses por compostos fenólicos. Uma preparação comercial de xilanase (Irgazyme-40S, Ciba-Geigy Corporation, Greensboro, NC) foi ativada em até 50% na presença de ácido vanílico, acetovanilona e ácido protocatecuico, na concentração de 0,05%. Em concentrações mais altas, estes mesmos compostos desativaram a enzima (Kaya, Heitmann *et al.*, 2000). Neste mesmo trabalho, a vanilina e guaiacol aumentaram a taxa de hidrólise enzimática da xilana, na medida em que suas concentrações aumentaram, chegando a aumentar a atividade da enzima em até 75%. Além disso, a lignina, em baixas concentrações (0,06%) também aumentou em 20% a atividade desta mesma preparação comercial de xilanase. O aumento na taxa de hidrólise de xilana devido à adição de porções solúveis de lignina pode ser devido a uma afinidade da xilanase pela lignina, de forma que a enzima interage com a lignina ou seus derivados fenólicos (Senior, Mayers *et al.*, 1990; Kaya, Heitmann *et al.*, 2000). Resultados

similares foram observados para atividade de celulase, que foi ativada na presença de lignina, guaiacol, vanilina, ácido vanílico, acetovanilona e ácido protocatecuico, em baixas concentrações. Em altas concentrações todos esses compostos inibiram a celulase (Kaya, Heitmann *et al.*, 1999).

Na figura 4.4 está mostrado o efeito do tempo e dos diversos tratamentos, em função da liberação de açúcares redutores por Xyl T2, mostrando que mesmo após os sete dias de incubação, a enzima permaneceu ativa, tanto no controle, quanto nos diversos tratamentos com compostos fenólicos.

Conforme descrito por Duarte e Moreira *et al.*, (2012), durante a hidrólise enzimática do material lignocelulósico pré-tratado, ocorrem modificações na estrutura da lignina, expondo alguns compostos fenólicos que têm um efeito inibitório na conversão enzimática da biomassa holocelulósica. Desta forma, um ponto crucial para a hidrólise enzimática da biomassa é reduzir a inibição e a desativação causada por compostos fenólicos, de forma a aumentar a taxa de hidrólise e reduzir a carga enzimática usada. Neste contexto, a enzima purificada Xyl T2, surge como alternativa interessante para aplicações industriais, uma vez que foi muito resistente a todos os compostos fenólicos estudados.

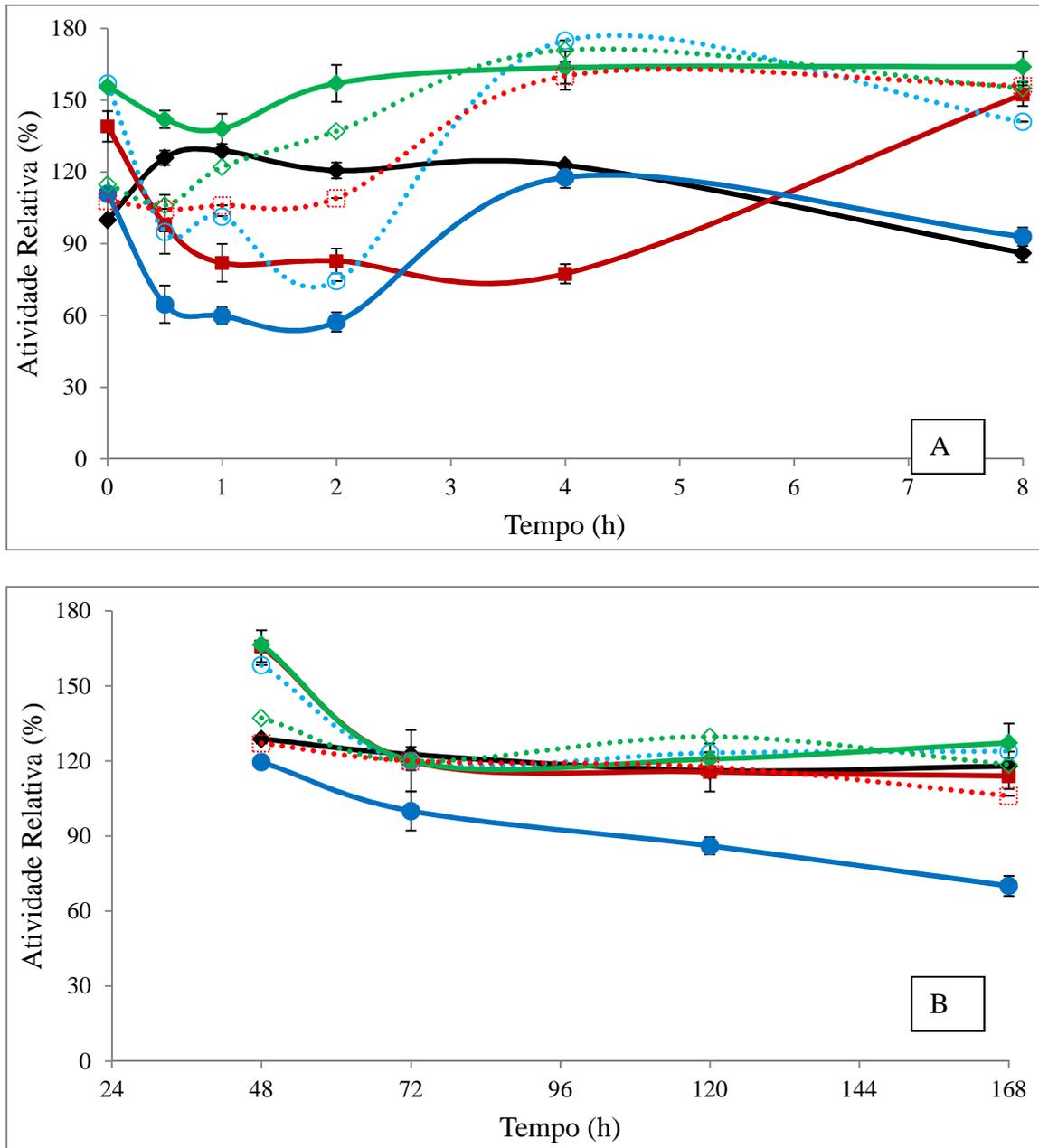


Figura 4.3. Efeito de compostos fenólicos na atividade xilanolítica de Xyl T2. Controle (◆), ácido ferúlico (■), ácido cinâmico (●), vanilina (◆), ácido tânico (□), ácido p-cumárico (○), ácido 4-hidroxi-benzóico (◇). (A) Tempos entre 0 e oito horas. (B) tempos entre 48 e 168 horas. Atividades relativas ao controle no tempo zero.

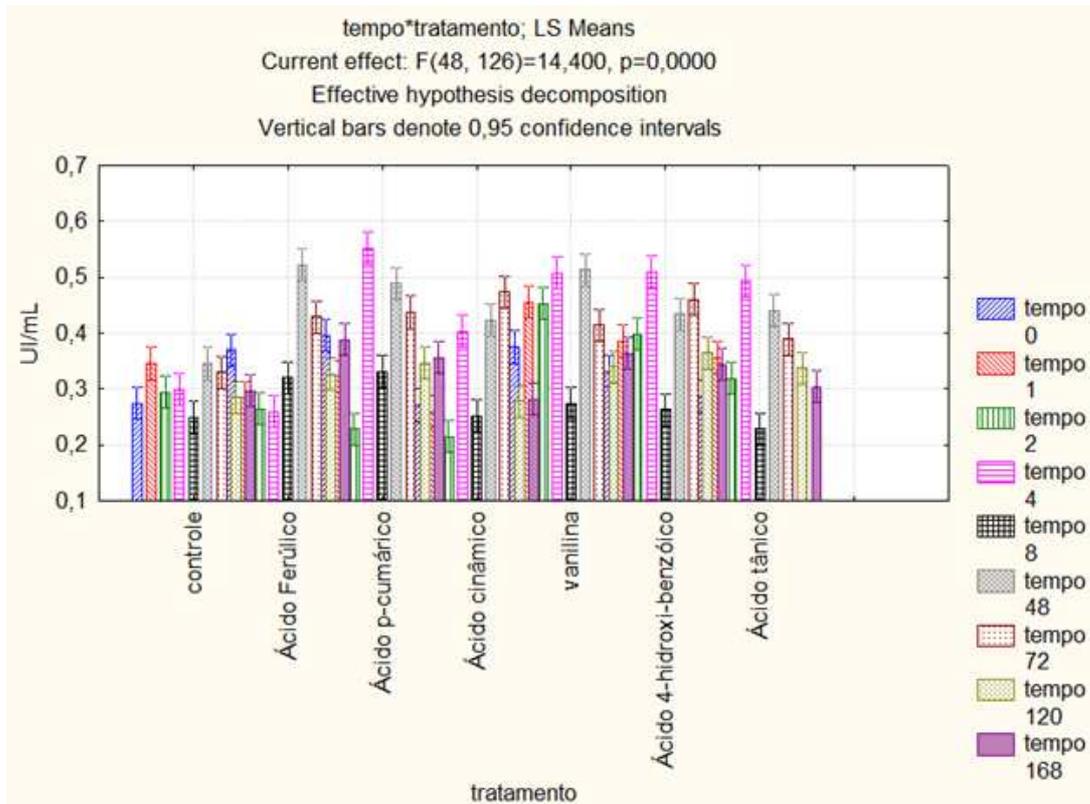


Figura 4.4. Efeito do tempo (h) e dos tratamentos em função da liberação de açúcares redutores para Xyl T2.

Xyl T3 mostrou menos estabilidade à temperatura ambiente, quando comparada às outras enzimas purificadas, com um valor de 2,5 dias. Xyl T3 teve sua atividade reduzida por vários compostos fenólicos, sendo que o efeito mais notado foi da vanilina que desativou 90% da atividade enzimática após 2 horas de incubação (figura 4.5 – A). Os ácidos 4-hidroxi-benzóico e tânico desativaram completamente a enzima com três dias de incubação, enquanto que o ácido cinâmico desativou 75% da atividade da enzima após o mesmo período. Um efeito semelhante foi observado por Ximenes e Kim *et al* (2010) com um forte efeito inibidor da vanilina e efeito inibidor moderado do ácido 4-hidroxi-benzóico em celulases e β -glucosidasas comerciais de *A. niger*. Outro

estudo relata que as atividades de celulase e xilanase tanto de uma mistura de enzimas comercial quanto de uma preparação de *Penicillium brasiliensis* teve diferentes graus de inibição quando compostos fenólicos como ácido vanílico, ácido siríngico, acetosiringona, siringaldeído, ácido furóico, ácido succínico, ácido fórmico e guaicol foram adicionados ao ensaio enzimático (Panagiotou e Olsson, 2007). Entretanto, os ácidos ferúlico e ρ -cumárico parecem ter um efeito de estabilizar a atividade de Xyl T3, visto que na ausência de compostos fenólicos (controle), há uma queda de 65% na atividade xilanolítica de Xyl T3, no terceiro dia de incubação. Quando comparado ao controle no início da incubação (tempo zero), os ácidos ferúlico e ρ -cumárico retiveram 94 e 83% da atividade inicial, respectivamente, com sete dias de incubação, aparentemente estabilizando a atividade enzimática (figura 4.5 – B). O teste LSD Fisher revelou que, após os sete dias de incubação, todos os tratamentos se diferenciaram estatisticamente do controle, tanto com efeitos de desativação da enzima (ácidos tânico, 4-hidroxi-benzoico e cinâmico e a vanilina), quanto com efeitos de uma possível estabilização da enzima (ácidos ferúlico e ρ -cumárico). O efeito do tempo e dos tratamentos em função da liberação de açúcares redutores para Xyl T3, está mostrado na figura 4.6, evidenciando que os efeitos de desativação mais fortes são causados pela vanilina e pelo ácido tânico.

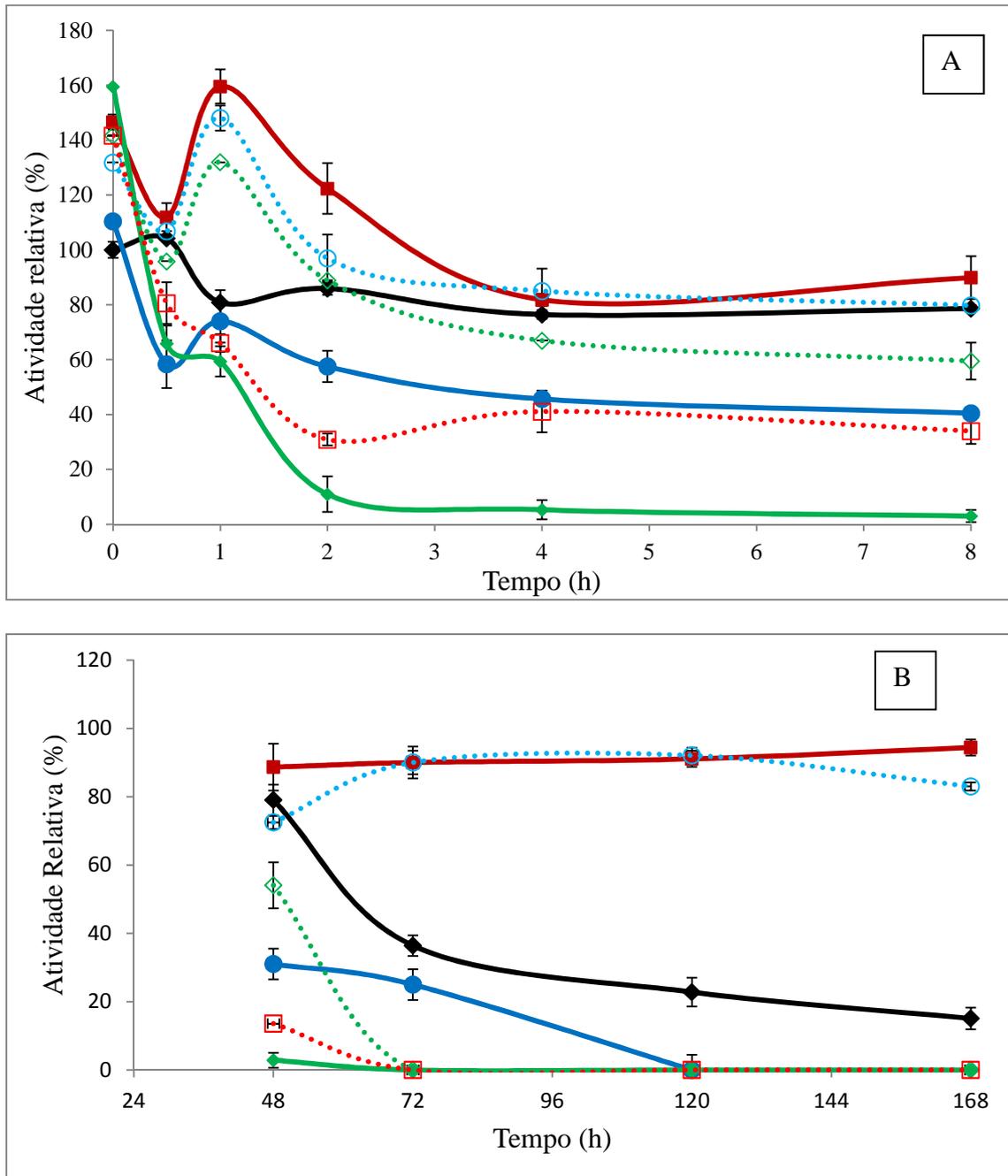


Figura 4.5. Efeito de compostos fenólicos na atividade xilanolítica de Xyl T3. Controle (◆), ácido ferúlico (■), ácido cinâmico (●), vanilina (◆), ácido tânico (□), ácido p-cumárico (○), ácido 4-hidroxi-benzóico (◇). (A) Tempos entre 0 e oito horas. (B) tempos entre 48 e 168 horas. Atividades relativas ao controle no tempo zero.

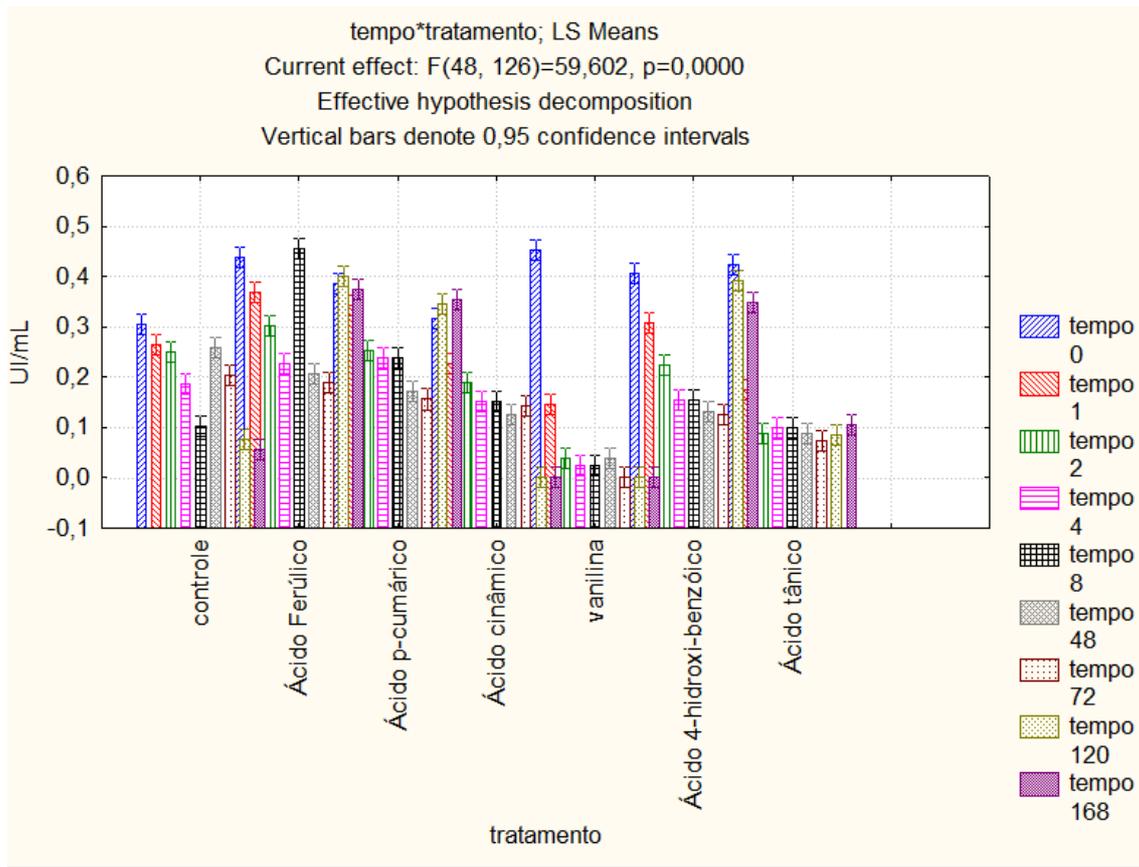


Figura 4.6. Efeito do tempo (h) e dos tratamentos em função da liberação de açúcares redutores para Xyl T3.

Na ausência de compostos fenólicos (controle), Xyl T4 manteve-se estável por sete dias. Assim como previamente observado para Xyl T2, Xyl T4 sofreu menos influência dos compostos fenólicos. Porém, ao contrário de Xyl T2, não foi observado nenhum efeito de ativação da enzima quando incubada com fenóis. Os efeitos de desativação mais fortes foram notados com o ácido tânico, que desativou completamente a enzima com sete dias de incubação e o ácido cinâmico que reduziu a atividade da enzima para 40% da atividade inicial, após o mesmo período de incubação. Um efeito moderado foi observado para o ácido 4-hidroxi-benzóico, com redução de 22% da atividade inicial da enzima. O teste pareado LSD- Fisher mostrou que os ácidos

cinâmico e tânico diferenciam-se estatisticamente do controle, após sete dias de incubação, os demais compostos não tiveram efeito significativo sobre Xyl T4 (figura 4.7 A e B). O efeito do tempo e dos tratamentos em função da liberação de açúcares para Xyl T4, está mostrado na figura 4.8, e evidencia o efeito de desativação do ácido tânico com sete dias de incubação.

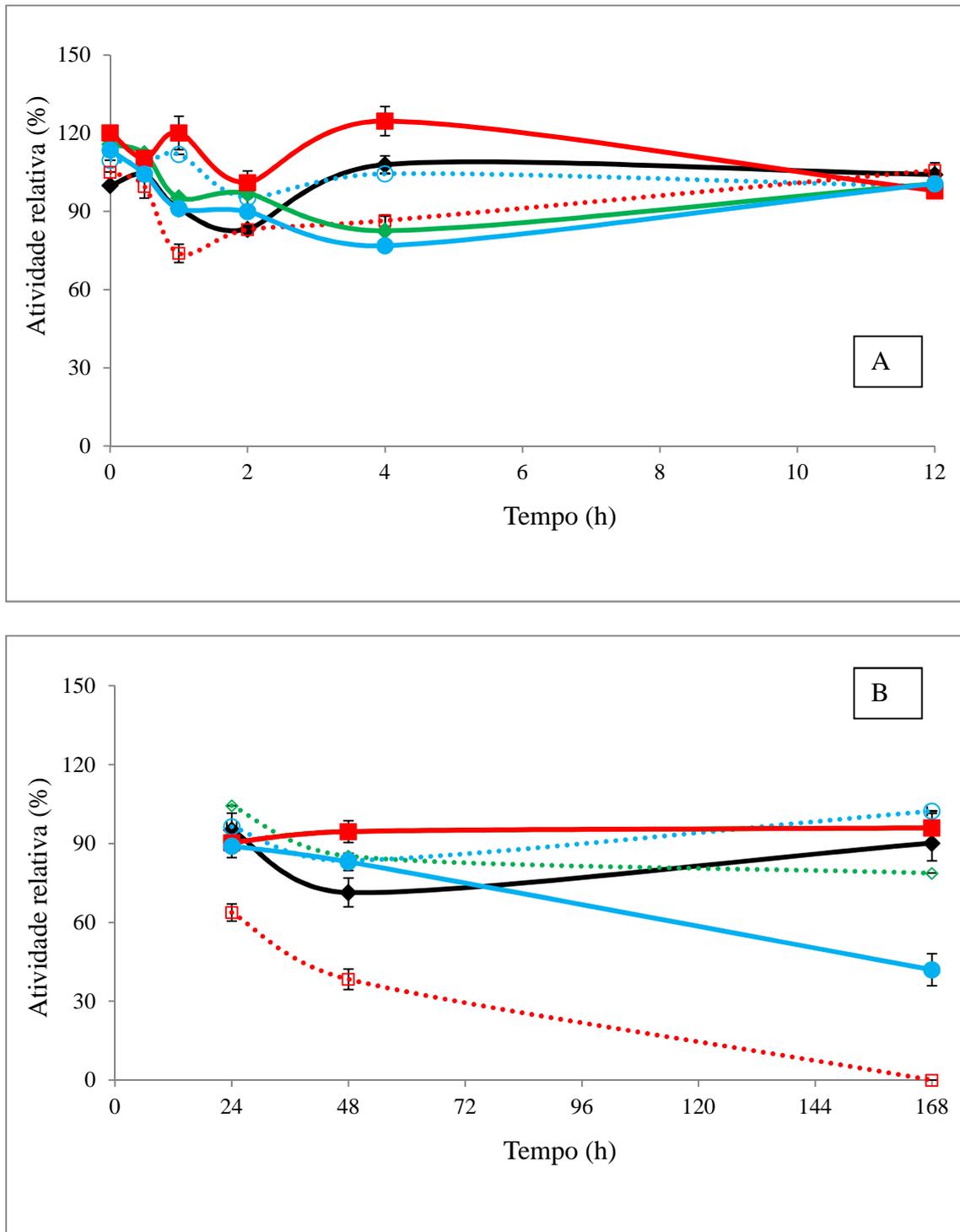


Figura 4.7. Efeito de compostos fenólicos na atividade xilanolítica de Xyl T4. Controle (◆), ácido ferúlico (■), ácido cinâmico (●), vanilina (◆), ácido tânico (□), ácido p-cumárico (○), ácido 4-hidroxi-benzóico (◇). (A) Tempos entre 0 e doze horas. (B) tempos entre 24 e 168 horas. Atividades relativas ao controle no tempo zero.

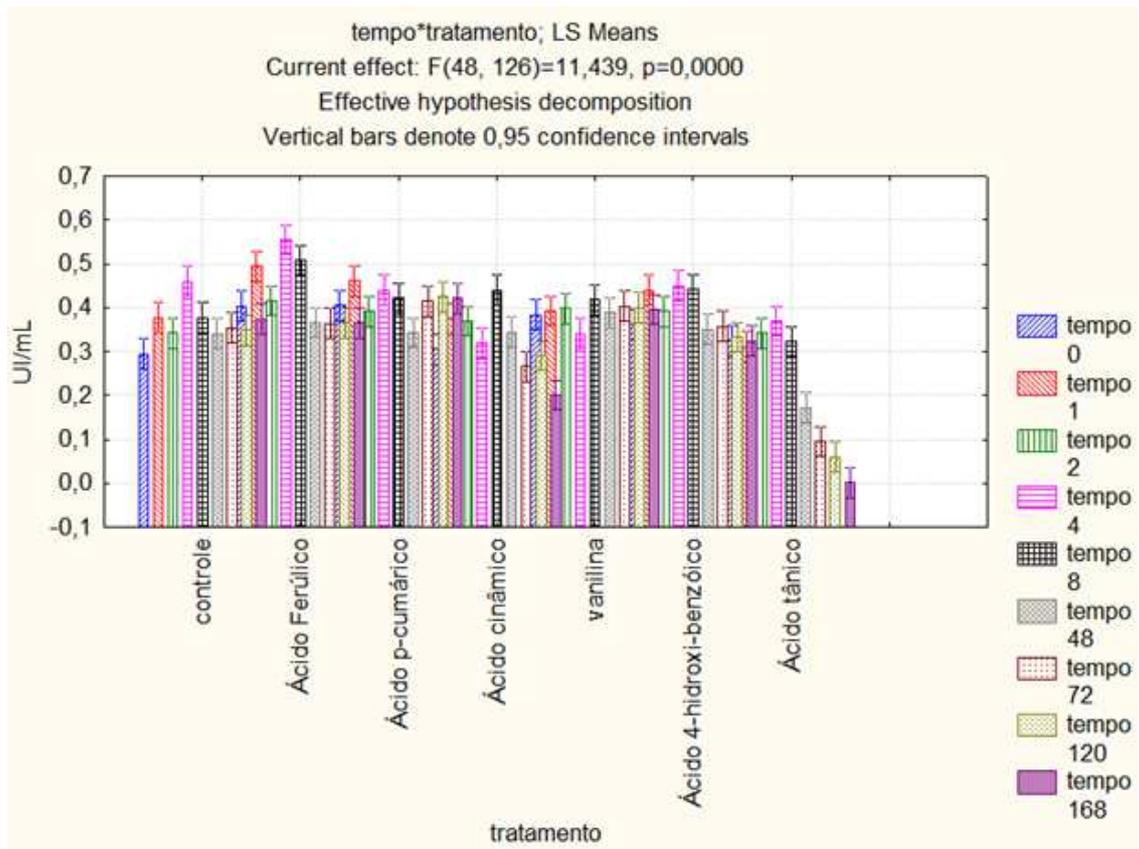


Figura 4.8. Efeito do tempo (h) e dos tratamentos em função da liberação de açúcares redutores para Xyl T4.

A figura 4.9 mostra o efeito dos diversos tratamentos e do tempo nas quatro enzimas, em função da liberação de açúcares redutores. As análises estatísticas mostram que cada enzima responde de forma diferente ao tratamento com compostos fenólicos (ANOVA $p=0,000$). Fica evidente ainda que o tempo de exposição aos tratamentos tem influência na resposta de cada enzima ao tratamento com compostos fenólicos.

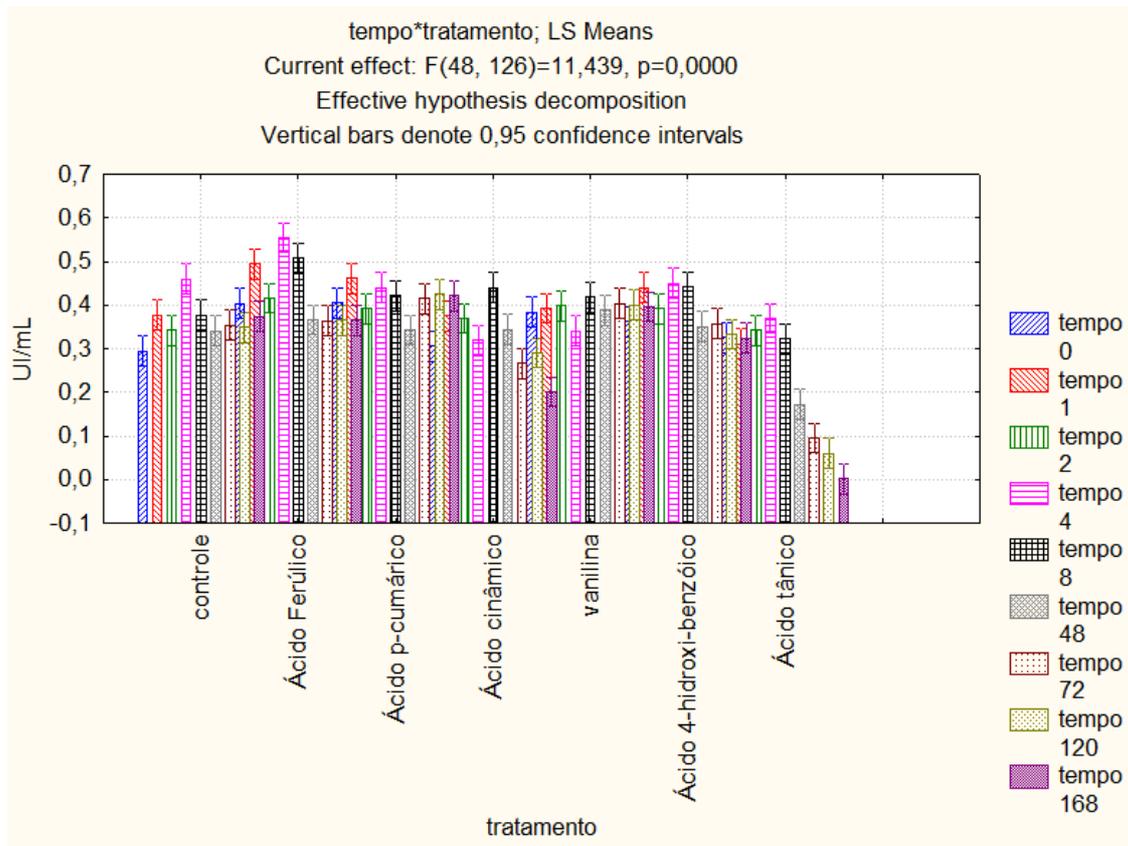


Figura 4.9. Efeito do tempo (h) e dos tratamentos em função da liberação de açúcares redutores para Xyl T1, Xyl T2, Xyl T3 e Xyl T4.

As quantidades e os tipos de inibidores de enzimas formadas durante o pré-tratamento da lignocelulose dependem da composição da biomassa, do tipo de pré-tratamento, e das condições de reação (Panagiotou e Olsson, 2007; Kumar e Wyman, 2009) Os fenóis são fortes inibidores da produção enzimática por micro-organismos, bem como fortes inibidores das atividades enzimáticas (Excoffier, Toussaint *et al.*, 1991; Sineiro, Dominguez *et al.*, 1997; Gamble, Snook *et al.*, 2000; Berlin, Balakshin *et al.*, 2006).

Com base nos resultados observados, Xyl T2 e Xyl T4 possuem grande potencial para aplicação na produção de bioetanol de segunda geração, uma vez que

ambas as enzimas foram resistentes a seis compostos fenólicos por sete dias. Compostos fenólicos podem ter efeitos variados na atividade de xilanase, chegando a aumentar sua atividade dependendo dos compostos usados, da concentração destes e da estrutura da enzima usada. Portanto, a atividade de xilanase e a presença de produtos de degradação de lignina não podem ser correlacionadas de uma forma simples (Kaya, Heitmann *et al.*, 2000).

4.2. Efeitos dos compostos fenólicos nas constantes cinéticas de Xyl T1 e Xyl T2

Na ausência de compostos fenólicos, Xyl T1 teve valores de Km próximos para as frações solúvel e insolúvel da xilana de bétula (tabela 4.2). Os valores de Km para xilana solúvel diminuíram na presença dos ácidos ferúlico e ρ -cumárico e de vanilina. De forma oposta, os ácidos cinâmico, tânico e 4-hidroxi-benzóico diminuíram a afinidade de Xyl T1 tanto pela xilana solúvel como pela insolúvel. Embora tenha sido detectada uma diminuição nos valores de Vmax de Xyl T2, a incubação de Xyl T2 com todos os compostos fenólicos diminuiu substancialmente os valores de Km, sugerindo que os compostos fenólicos aumentam a afinidade de Xyl T2 pelo substrato. Trabalhos futuros serão necessários para esclarecer o mecanismo de ação desses compostos na atividade de Xyl T1 e de Xyl T2. Uma redução na Vmax também foi notada para uma β -xilanase (Tx-Xyl) purificada de *Thermobacillus xylanilyticus* quando esta enzima foi posta em contato com os ácidos cinâmico, ρ -cumárico, caféico, ferúlico e 3,4,5-trimetoxi-cinâmico. Estes compostos fenólicos também tiveram ação na redução da atividade desta enzima. Um mecanismo de inibição não competitivo foi proposto para a ação dos compostos fenólicos sobre a enzima. Este mecanismo indicaria que mais de

uma molécula aromática interage com a enzima para induzir sua inativação completa, conseqüentemente a inibição de Tx-Xyl pelos compostos fenólicos não envolve a interação direta destes com o sítio ativo da enzima. Os compostos fenólicos poderiam afetar a atividade da enzima *in vitro* de duas formas: formando um complexo solúvel, porém inativo entre enzima e fenol, com baixas concentrações de compostos fenólicos; ou reduzindo a solubilidade da enzima pela formação de um complexo insolúvel entre enzima e fenol, em altas concentrações de compostos fenólicos. (Sharma, Milstein *et al.*, 1985; Boukari, O'donohue *et al.*, 2011). Alguns relatos descrevem que interações de compostos fenólicos com celulasas estão correlacionadas com mudanças na estrutura da enzima (Boukari, O'donohue *et al.*, 2011; Tian, Jiang *et al.*, 2013). Estas interações podem incluir tanto interações hidrofóbicas quanto ligações de hidrogênio entre os grupos funcionais (COOH, OH) e os resíduos de aminoácidos básicos.

Estudos de espectroscopia de fluorescência mostraram que o ácido ferúlico e o ácido ρ -cumárico modificam a estrutura e o ambiente hidrofóbico da celulase, afetando sua atividade. Análise de dicroísmo circular também mostrou que a adição de ácidos fenólicos diminuiu significativamente conteúdo de α -hélice, mas aumentou o conteúdo de folhas- β de uma preparação comercial de celulase (Tian, Jiang *et al.*, 2013). Como resultado, a estrutura da enzima se torna mais flexível e sua afinidade pelo substrato aumenta.

Conforme observado na microscopia de força atômica (capítulo 3, item 4.3), Xyl T2 é composta de partículas menores que as partículas Xyl T1. Uma hipótese para o menor tamanho de Xyl T2 seria a falta de um segmento nesta enzima, o que poderia impedir a ligação dos compostos fenólicos com a estrutura da enzima. Além disso, as

interações de compostos fenólicos com resíduos de tirosina e triptofano poderiam ser responsáveis por mudanças na estrutura de Xyl T2.

Tabela 4.2. Constantes cinéticas de Xyl T1 na presença e ausência de compostos fenólicos.

	Xyl T1				Xyl T2			
	Xilana solúvel		Xilana insolúvel		Xilana solúvel		Xilana insolúvel	
	Km	Vmax	Km	Vmax	Km	Vmax	Km	Vmax
Controle	0,421±0,035	0,147±0,001	0,465±0,037	0,078±0,003	13,030±0,278	1,016±0,013	10,900±0,290	1,200±0,190
Ácido ferúlico	0,216±0,036	0,121±0,024	0,901±0,015	0,152±0,001	0,258±0,001	0,094±0,001	0,195±0,005	0,094±0,004
Ácido ρ - cumárico	0,301±0,083	0,225±0,009	0,244±0,001	0,167±0,001	0,668±0,048	0,186±0,003	0,080±0,003	0,123±0,001
Ácido cinâmico	0,453±0,030	0,140±0,003	0,465±0,043	0,116±0,004	0,202±0,020	0,119±0,001	0,115±0,022	0,078±0,001
Vanilina	0,166±0,031	0,233±0,003	0,457±0,052	0,203±0,004	0,352±0,026	0,127±0,001	0,141±0,030	0,093±0,002
Ácido 4-Hidroxi benzóico	0,905±0,001	0,184±0,001	0,476±0,012	0,138±0,001	1,004±0,003	0,121±0,000	0,839±0,292	0,105±0,008
Ácido tânico	0,645±0,089	0,247±0,008	0,305±0,013	0,258±0,002	0,141±0,001	0,110±0,001	0,278±0,044	0,166±0,004

5. Conclusões

- Os compostos fenólicos têm efeitos variados na atividade das xilanases Xyl T1, Xyl T2, Xyl T3 e Xyl T4. Os dados sugerem que compostos fenólicos podem tanto aumentar como diminuir a atividade destas enzimas;
- Xyl T2 e Xyl T4 mostraram resistência à ação de inibição ou desativação de seis compostos fenólicos, sendo enzimas atrativas para o uso na produção de bioetanol, uma vez que esses compostos são formados durante o pré-tratamento da biomassa;
- Os compostos fenólicos estudados aumentam a afinidade de Xyl T2 pela xilana.

6. Perspectivas

- Determinação de constantes cinéticas para Xyl T3 e Xyl T4;
- Utilização de dicroísmo circular para compreensão das interações entre as enzimas e os compostos fenólicos.

7. Bibliografia

BAE, H. D.; MCALLISTER, T. A.; YANKE, J.; CHENG, K. J.; MUIR, A. D. Effects of Condensed Tannins on Endoglucanase Activity and Filter Paper Digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 7, p. 2132-2138, 1993.

BERLIN, A.; BALAKSHIN, M.; GILKES, N.; KADLA, J.; MAXIMENKO, V.; KUBO, S.; SADDLER, J. Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 2, p. 198-209, 2006.

BERLIN, A.; MAXIMENKO, V.; GILKES, N.; SADDLER, J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 287-296, 2007.

BÖRJESSON, J.; ENGQVIST, M.; SIPOS, B.; TJERNELD, F. Effect of poly (ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 1, p. 186-195, 2007.

BOUKARI, I.; O'DONOHUE, M.; RÉMOND, C.; CHABBERT, B. Probing a family GH11 endo- β -1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3-4, p. 130-138, 2011.

CAN, H. K.; GÜNER, A. Investigation of adsorption-desorption dynamism of bovine serum albumin on crosslinked N,N'-diethylaminoethyl dextran microbeads: Solution phase. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 99, n. 5, p. 2288-2299, 2006.

DUARTE, G.; MOREIRA, L.; JARAMILLO, P.; FILHO, E. Biomass-Derived Inhibitors of Holocellulases. **BioEnergy Research**, v. 5, n. 3, p. 768-777, 2012.

EXCOFFIER, G.; TOUSSAINT, B.; VIGNON, M. R. Saccharification of steam-exploded poplar wood. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 11, p. 1308-1317, 1991.

GAMBLE, G.; SNOOK, M.; HENRIKSSON, G.; AKIN, D. Phenolic constituents in flax bast tissue and inhibition of cellulase and pectinase. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 9, p. 741-746, 2000.

JING, X.; ZHANG, X.; BAO, J. Inhibition Performance of Lignocellulose Degradation Products on Industrial Cellulase Enzymes During Cellulose Hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, n. 3, p. 696-707, 2009.

KAYA, F.; HEITMANN, J. A.; JOYCE, T. W. Effect of dissolved lignin and related compounds on the enzymatic hydrolysis of cellulose model compound. **Cellulose chemistry and technology** v. 33, p. 203-213, 1999.

_____. Influence of lignin and its degradation products on enzymatic hydrolysis of xylan. **Journal of Biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 241-247, 2000.

KIM, Y.; XIMENES, E.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 4–5, p. 408-415, 2011.

KROLL, J.; RAWEL, H. M.; ROHN, S. Reactions of Plant Phenolics with Food Proteins and Enzymes under Special Consideration of Covalent Bonds. **Food Science and Technology Research**, v. 9, n. 3, p. 205-218, 2003.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effect of enzyme supplementation at moderate cellulase loadings on initial glucose and xylose release from corn stover solids pretreated by leading technologies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 2, p. 457-467, 2009.

MANDELS, M.; REESE, E. T. Inhibition of Cellulases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 3, n. 1, p. 85-102, 1965.

MCALLISTER, T. A.; BAE, H. D.; YANKE, L. J.; CHENG, K. J.; MUIR, A. Effect of condensed tannins from birdsfoot trefoil on endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by ruminal fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 298-305, 1994.

PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology** v. 107, n. 1, p. 65-72, 2004.

PANAGIOTOU, G.; OLSSON, L. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 250-258, 2007.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279-91, 2003.

SENIOR, D. J.; MAYERS, P. R.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N. Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture. In: KIRK, T. K. e CAHANG, H. M. (Ed.). Boston MA: Butterworth-Heinemann, 1990. p.169-182.

SHARMA, A.; MILSTEIN, O.; VERED, Y.; GRESSEL, J.; FLOWERS, H. M. Effects of aromatic compounds on hemicellulose-degrading enzymes in *Aspergillus japonicus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 8, p. 1095-1101, 1985.

SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; LEMA, J. M. Inhibition of cellulase activity by sunflower polyphenols. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 6, p. 521-524, 1997.

TEJIRIAN, A.; XU, F. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 3, p. 239-247, 2011.

TIAN, Y.; JIANG, Y.; OU, S. Interaction of cellulase with three phenolic acids. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1022-1027, 2013.

WU, H.-S.; LUO, J.; RAZA, W.; LIU, Y.-X.; GU, M.; CHEN, G.; HU, X.-F.; WANG, J.-H.; MAO, Z.-S.; SHEN, Q.-R. Effect of exogenously added ferulic acid on in vitro *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **Scientia Horticulturae**, v. 124, n. 4, p. 448-453, 2010.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3-4, p. 170-176, 2010.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme Microb Technol**, v. 48, n. 1, p. 54-60, 2011.

XU, F.; DING, H.; OSBORN, D.; TEJIRIAN, A.; BROWN, K.; ALBANO, W.; SHEEHY, N.; LANGSTON, J. Partition of enzymes between the solvent and insoluble substrate during the hydrolysis of lignocellulose by cellulases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 1-2, p. 42-48, 2008.

Capítulo V

Hidrólise enzimática da polpa de celulose

Resumo

O processo de produção de papel utiliza grandes quantidades de produtos químicos poluentes, tornando-se um problema devido à descarga dos resíduos nos rios. A necessidade de tecnologias ecologicamente corretas torna-se cada vez mais urgente. Sabe-se que xilanases podem ser aplicadas no branqueamento do papel, substituindo os compostos clorados para promover a quebra das ligações covalentes entre a hemicelulose e a lignina da polpa de celulose, resultando em uma diminuição na utilização de compostos poluentes. Neste trabalho foram usadas três amostras de polpas de celulose em diferentes estágios *kraft* de branqueamento e quatro amostras enzimáticas sendo duas purificadas e duas semi-purificadas. A maior liberação de açúcares redutores ocorreu entre 1 e 2 horas para a polpa clara e pré-branqueada com O₂ e com 20 horas para a polpa escura, evidenciando a maior recalcitrância deste substrato. A predominância na liberação de xilobiose por todas as enzimas e em todas as amostras de polpas utilizadas sugere um mecanismo do tipo endo. A maior liberação de cromóforos a 237 nm sugere uma remoção de cor das polpas de celulose catalisada pelas amostras enzimáticas.

Palavras chave: Polpa *kraft*, Xilooligossacarídeos, hidrólise, cromatografia líquida de alta pressão, xilanase.

1. Introdução

A hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos, tem tido posição de destaque nos cenários ambiental e econômico mundial. O foco principal do segundo milênio será aperfeiçoar a conversão enzimática da biomassa lignocelulósica renovável em açúcares fermentescíveis, os quais poderão ser convertidos em produtos com alto valor agregado (Himmel, Ruth *et al.*, 1999).

O processo mais utilizado de transformação de madeira em papel é o processo *kraft*, no qual três espécies de eucalipto (*Eucalyptus grandis*, *E. saligna* e *E. urophylla*) são as mais usadas como matéria-prima. Neste processo, pequenos cavacos de madeira são digeridos com uma mistura de sulfeto de sódio, hidróxido de sódio e água a 165 - 170°C. Esses dois reagentes têm a função de acelerar a deslignificação, com recuperação das fibras de celulose. Neste processo, parte da lignina solubilizada, comumente se liga a polímeros residuais de hemicelulose que precipitam novamente sobre as fibras de celulose, resultando em uma polpa de coloração escura que precisa ser branqueada antes da produção do papel final. Pode-se assumir que, nesta etapa do processo, 90-95% da hemicelulose e da lignina estão dissolvidas e parcialmente degradadas. A lignina depositada na polpa *kraft* confere a coloração escura à polpa, por esta razão, é realizado um pré-branqueamento com oxigênio para a remoção de impurezas e de uma parte da lignina remanescente. A polpa pré-branqueada com oxigênio tem coloração amarelo-claro, devido à lignina, e ainda não está pronta para a produção de papel boa qualidade. No próximo passo de branqueamento, a polpa *kraft* deverá atingir uma coloração branca devido à remoção de substâncias cromóforas formadas pela quebra da lignina. O último processo de branqueamento consiste na

remoção da lignina residual em vários processos que incluem a utilização de ozônio, dióxido de cloro, hidróxido de sódio, cloro e peróxido de hidrogênio. O processo *kraft* envolve cinco estágios (figura 5.1). (Kulkarni e Rao, 1996; Viikari, Suurnakki *et al.*, 1996; Techapun, Poosaran *et al.*, 2003; Filho, 2004; Polizeli, Rizzatti *et al.*, 2005).

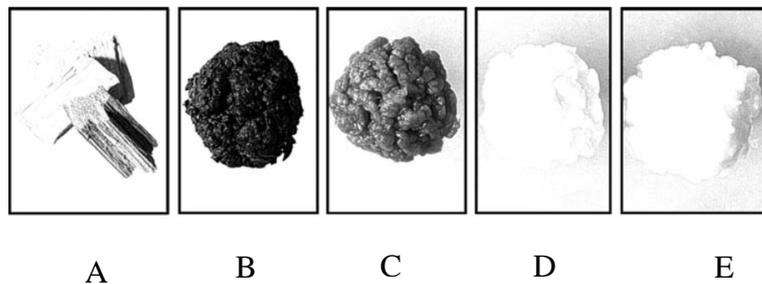


Figura 5.1. Estágios do branqueamento da polpa de celulose para a produção de papel. Aparar as arestas dos cavacos de madeira (A), polpa de celulose após o processo *kraft* (B), polpa pré-branqueada com O₂ (C), polpa de celulose branqueada com ozônio e dióxido de cloro (D) branqueamento final com dióxido de cloro, após o tratamento com hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio e oxigênio (E) (Polizeli, Rizzatti *et al.*, 2005).

O processo de produção de papel utiliza grandes quantidades de produtos químicos poluentes, tornando-se um problema devido à descarga dos resíduos nos efluentes. A necessidade de tecnologias ecologicamente corretas torna-se cada vez mais urgente. Pressões ambientais e legislativas têm forçado as indústrias papeleiras a modificar seus processos de branqueamento e a descarga de resíduos de forma a reduzir o impacto sobre o meio ambiente. Resoluções ambientais, especialmente na Europa Ocidental e Estados Unidos, colocaram restrições ao uso de cloro no processo de

branqueamento do papel (Bajpai, Bhardwaj *et al.*, 1994; Kulkarni, Shendye *et al.*, 1999; Gupta, Bhushan *et al.*, 2000; Manimaran, Kumar *et al.*, 2009).

Enzimas hemicelulolíticas têm mostrado potencial para utilização na indústria de papel e celulose para a modificação das fibras da polpa de celulose. Dentre essas enzimas, a aplicação mais bem sucedida tem sido a de xilanases no branqueamento das polpas *kraft* (Gerber, Heitmann *et al.*, 1999; Motta, Andrade *et al.*, 2013; Torres e Dela Cruz, 2013). Sabe-se que xilanases podem ser aplicadas no branqueamento do papel, diminuindo a utilização dos compostos organoclorados, para promover a quebra das ligações covalentes entre a hemicelulose e a lignina da polpa de celulose.. Além da redução significativa na quantidade de organoclorados despejados nos efluentes, outra vantagem do uso de xilanases é o aumento do brilho do papel (Bajpai, 2004; Salles, Medeiros *et al.*, 2005; Kamble e Jadhav, 2012; Sharma e Kumar, 2013). É importante que a preparação enzimática usada no branqueamento da polpa não tenha atividade de celulase, caso contrário, ela poderia causar mudanças morfológicas nas fibras de celulose, o que reduziria a qualidade final do papel (Gupta, Bhushan *et al.*, 2000; Filho, 2004; Salles, Medeiros *et al.*, 2005).

A indução da produção de enzimas usando substratos puros faz com que o processo seja muito caro, dificultando a aplicação destes catalisadores nos diversos ramos industriais. Neste contexto, o uso de resíduos agroindustriais se torna uma alternativa para a produção de altos níveis de xilanase com menor preço de produção, o que torna a aplicação destas enzimas mais atrativa comercialmente. A aplicação destas enzimas produzidas com substratos agroindustriais no processo de produção de papel diminui os custos do branqueamento enzimático da polpa de celulose (Gupta, Bhushan *et al.*, 2000). Biobranqueamento é o nome dados ao branqueamento da polpa através da

utilização enzimas ou micro-organismos lignolíticos (Pérez, Muñoz-Dorado *et al.*, 2002).

Conforme apresentado nos capítulos anteriores desta tese, o fungo filamentososo *A. terreus* produz grandes quantidades de xilanases quando cultivado em meios de cultura contendo bagaço de cana de açúcar e piolho de algodão sujo. Tais enzimas, purificadas ou semi-purificadas podem ter aplicações em inúmeros processos biotecnológicos, como o biobranqueamento de polpas de celulose.

2. Objetivos

- 2.1.** Avaliar o potencial hidrolítico de enzimas puras e semi-purificadas de *A. terreus* em polpas de celulose obtidas de diferentes estágios *kraft* de branqueamento;
- 2.2.** Comparar a eficiência de hidrólise de xilanases puras e semi-purificadas.

3. Material e métodos

3.1. Origem e produção das polpas de celulose

As polpas de celulose (Figura 5.2) obtidas a partir da mistura de *Eucalyptus grandis* (40%), *E. saligna* (30%) e *E. urophylla* (30%), foram produzidas pela empresa Conpacel, localizada no município de Limeira - SP, e gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Francides Gomes da Silva Júnior do Laboratório de Química, Celulose e Energia, Departamento de Ciências Florestais, ESALQ - Universidade de São Paulo, Piracicaba

– SP. A polpa de celulose foi submetida ao processo industrial *Kraft*. O material resultante após as etapas de cozimento e lavagem foi denominado polpa escura (figura 5.2 – A). A polpa escura submetida ao estágio de deslignificação com O₂ foi denominada polpa pré-branqueada por O₂ (figura 5.2 – B). Por fim, a polpa pré-branqueada submetida ao processo final de branqueamento por reagentes clorados, resultou no material designado polpa branca (figura 5.2 - C).



Figura 5.2. Amostras de polpas de celulose. Polpa de celulose escura (A), polpa de celulose pré-branqueada com O₂ (B) e polpa de celulose clara (C).

3.2. Hidrólise enzimática das polpas de celulose

O potencial de hidrólise de xilanases puras e semi-purificadas, cultivadas em bagaço de cana de açúcar ou piolho de algodão sujo, foi determinado pela mistura de um volume de amostra enzimática e dois volumes de substrato em solução aquosa (10mg/mL) de polpa de celulose escura, polpa de celulose pré-branqueada com O₂ ou polpa de celulose clara. Todos os substratos foram solubilizados em água destilada. A mistura entre enzima e substrato foi incubada a 50°C, com agitação de 120 rpm, por três horas (polpas pré-branqueada e polpa clara), ou por oito horas (polpa escura). A polpa escura foi incubada novamente a 28°C, com agitação de 120 rpm, nos tempos de 20, 24,

28 e 48 horas. Os controles foram feitos substituindo-se o volume de enzimas por água destilada e submetidos às mesmas condições de ensaio. Alíquotas foram retiradas para realização dos seguintes ensaios:

3.2.1. Dosagem de glicose

A análise da quantidade de glicose liberada foi feita pelo *kit* glicose oxidase (Trinder, 1969). Alíquotas de 10 μ L retiradas das misturas de enzima e substrato usado na hidrólise foram incubadas com 1 mL de reagente de cor, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Uma solução de glicose padrão fornecida no *kit* foi preparada de maneira semelhante às amostras e utilizada como padrão; a concentração de glicose liberada foi expressa em mg/mL.

3.2.2. Dosagem de açúcares redutores totais

A quantificação de açúcares redutores totais liberados foi feita pelo método do DNS, conforme descrito no item 3.5 do capítulo II desta tese. A quantidade de açúcares liberados foi expressa em mg/mL.

3.2.3. Dosagem de pentoses e hexoses livres pelo método do Orcinol-férrico

Uma alíquota de 100 μ L das misturas de hidrólise foi adicionada a 100 μ L do reagente A (TCA 10% (m/v), em água destilada) e a mistura foi submetida à fervura por 15 min. Em seguida, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e na sequência foi adicionada de 600 μ L do reagente B (m/v) (sulfato de amônio férrico 1,15% e orcinol

0,2%, diluído em solução de HCl 9,6 mol/L). A mistura resultante foi fervida novamente por 20 min e então resfriada à temperatura ambiente. A solução final do ensaio foi diluída 10 vezes em água destilada e submetida às leituras nas absorvâncias de 660 (pentoses) e 520 nm (hexoses) (Chaplin, 1994). Xilose e manose foram usadas como padrões para as conversões de pentoses e hexoses, respectivamente. Os resultados foram expressos em mg de açúcar redutor liberado/mL.

3.2.4. Leituras em diferentes comprimentos de onda

Alíquotas de 20 µL foram analisadas nos comprimentos de onda de 237, 254, 280 e 465 nm (Medeiros, Silva Jr *et al.*, 2007).

3.3. Análise por HPLC da hidrólise enzimática das polpas de celulose

A análise das amostras por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) foi feita sob supervisão inicial da Profa. Dra. Lourdes Isabel Velho do Amaral e posteriormente do Prof. Dr. Clóvis Oliveira Silva. Alíquotas de 250 µL foram retiradas dos ensaios, fervidas por 10 min e, posteriormente, congeladas a -20°C. As amostras foram liofilizadas e ressuspensas em 500 µL de água mili-Q. A análise foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência de troca aniônica, acoplada a um detector de amperometria pulsada (HPAE-PAD) para a quantificação e identificação dos xilooligossacarídeos liberados durante a hidrólise (Ryan, Nolan *et al.*, 2003). Os xilooligossacarídeos foram analisados em sistema Dionex ICS 3000 DC Ion Chromatography com utilização de pré-coluna CarboPac Guard e coluna CarboPac PA-100 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA), com fluxo de 15 mL/h, a 20°C. Foram

injetados 10 μL de amostra com o *auto sampler* AS40 (Dionex). As amostras foram eluídas em solução de hidróxido de sódio (0,1 M) (Dionex) e solução de Acetato de sódio (0,5 M) (Merck, Darmstadt, Germany) com hidróxido de sódio (0,1 M), por 70 min. Entre as injeções das amostras consecutivas, a coluna foi reequilibrada por 15 min com solução de hidróxido de sódio (0,1 M). Os xilooligossacarídeos foram identificados e quantificados em detector eletroquímico ED40 (Dionex), e os dados analisados pelo programa Chromeleon 6.8 SR8 (Dionex). Como padrão, foi utilizada uma mistura de xilooligossacarídeos (15 $\mu\text{g/mL}$) contendo entre uma e seis unidades de D-xilose (X1, xilose; X2, xilobiose; X3, xilotriose, X4, xilotetraose, X5, xilopentaose; X6, xilohexaose; Megazyme Corporation, Wicklow, Ireland).

3.4. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram feitas como descrito no item 3.7 do capítulo III, desta tese.

4. Resultados e discussão

4.1. Hidrólise enzimática das polpas de celulose

Amostras de enzimas puras (Xyl T1 e Xyl T2) e parcialmente purificadas (frações ultrafiltradas em membrana de corte de 10 kDa, provenientes dos extratos brutos dos cultivos de *A. terreus* em bagaço de cana ou piolho de algodão) produzidas conforme descrito no capítulo III desta tese, foram incubadas juntamente com polpas de

celulose obtidas em diferentes estágios *kraft* de produção de papel: polpa escura, polpa pré-branqueada com O₂ e polpa clara.

Na hidrólise da polpa clara, nota-se que a maior liberação de açúcares redutores totais acontece entre a primeira e a segunda hora de incubação, tanto para as enzimas puras (figura 5.3), quanto para as duas frações ultrafiltradas (figura 5.4). O ensaio de orcinol férrico mostrou uma maior liberação de pentoses e hexoses entre uma e duas horas de hidrólise, assim como observado para os açúcares redutores totais. As maiores liberações de açúcares redutores foram observadas na hidrólise da polpa clara com o *pool* de enzimas contidas nos dois ultrafiltrados. A maior liberação de açúcares redutores totais (0,435 mg/mL) ocorreu durante a hidrólise com o *pool* de enzimas do ultrafiltrado do piolho de algodão, enquanto que a maior liberação de pentoses (67,67 mg/mL) ocorreu com o *pool* de enzimas do ultrafiltrado do bagaço de cana.

A hidrólise das polpas de celulose foi analisada também pela liberação de cromóforos detectados nos comprimentos de onda de 237, 254, 280 e 465 nm, os quais estão relacionados a produtos de degradação originados da estrutura polimérica das polpas de celulose (Garg, Roberts *et al.*, 1998). Assim como a liberação de açúcares, de forma geral, a maior liberação de cromóforos foi observada entre uma e duas horas de hidrólise. A maior liberação de cromóforos foi a 237 nm e ocorreu durante a incubação com Xyl T1.

Na hidrólise da polpa clara, a maior quantidade de proteínas presente nas frações ultrafiltradas não resultou em um aumento estatisticamente significativo na liberação de açúcares redutores totais, nem de pentoses e hexoses. A eficiência na hidrólise das enzimas Xyl T1 e Xyl T2, apesar da baixa concentração de proteínas, pode ser atribuída ao fato de serem amostras purificadas, com maior atividade específica. Esse efeito

também foi observado durante a hidrólise de polpas de celulose por uma fração ultrafiltrada e uma enzima purificada de *A. oryzae*, onde a maior quantidade de proteínas presente na fração ultrafiltrada não se traduziu em maior eficiência na hidrólise (Duarte, 2013). Por outro lado, o tempo de hidrólise é um parâmetro com diferença estatisticamente significativa na liberação de pentoses das quatro amostras enzimáticas, com valores de ANOVA fatorial para Xyl T1 ($p = 0,0002$), Xyl T2 ($p = 8,66 \times 10^{-7}$), *pool* de enzimas contidas no ultrafiltrado do bagaço de cana ($p = 5,8 \times 10^{-7}$) e *pool* de enzimas contidas no ultrafiltrado do piolho de algodão ($p = 0,0002$).

Durante a hidrólise da polpa clara com as enzimas purificadas houve uma relação entre a liberação de açúcares redutores totais e a liberação cromóforos a 237 nm, no período de três horas de incubação, sugerindo que a remoção da cor está associada à liberação de lignina. Segunda Gupta e Bhushan *et al.*, (2000) o pré-tratamento da polpa *Kraft* com a xilanase purificada de *Staphylococcus sp.* SG-13 resultou na liberação de xilose com aumento subsequente da detecção de açúcares redutores totais e liberação de cromóforos a 237 e 465 nm, indicando uma dissociação do complexo lignina-carboidratos das fibras de celulose.

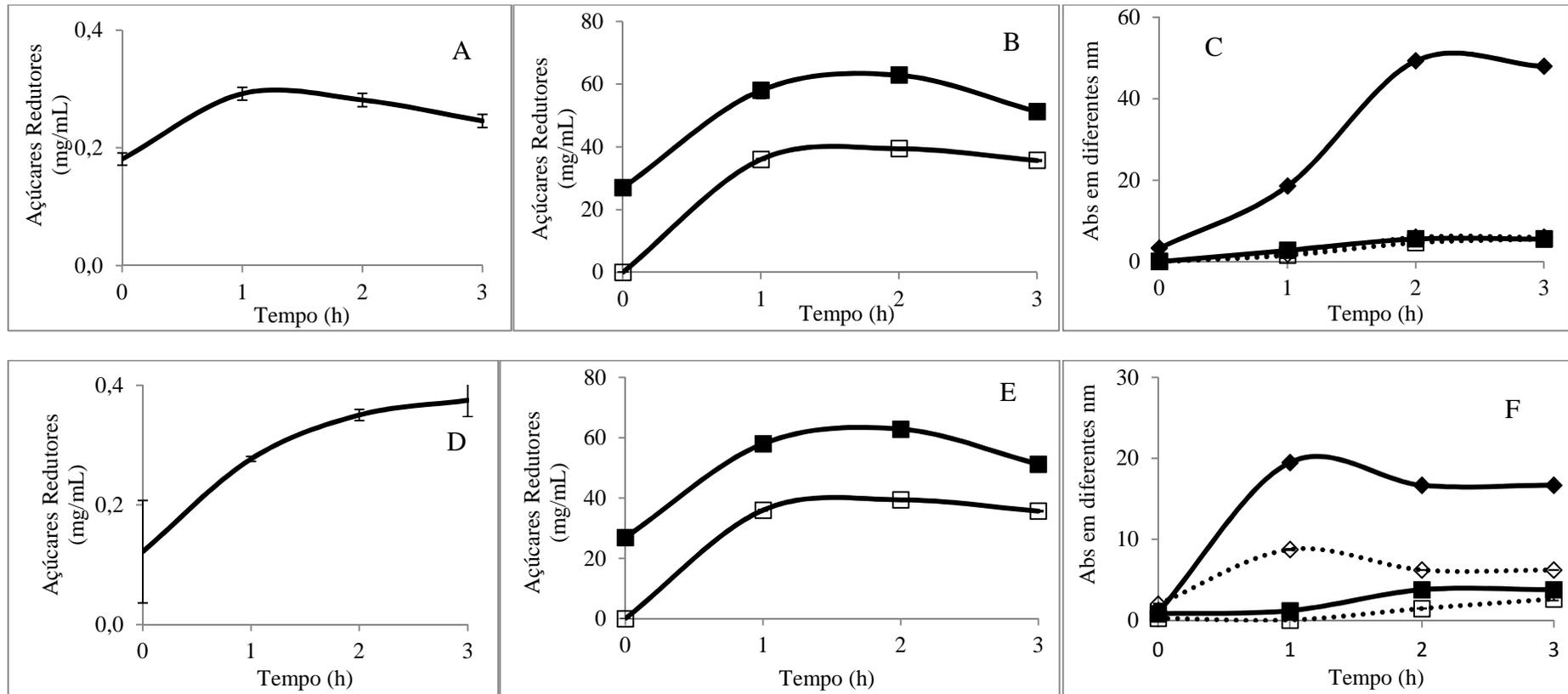


Figura 5.3. Hidrólise da polpa clara pelas enzimas Xyl T1 (A, B, C) e Xyl T2 (D, E, F). Açúcares redutores avaliados por DNS (A e D), por orcinol-férrico à 660 nm (■) e à 520 nm (□) (B e E). Liberação de cromóforos à 237 nm (◆), 254 nm (◇), 280 nm (■) e à 465 nm (□) (C e F).

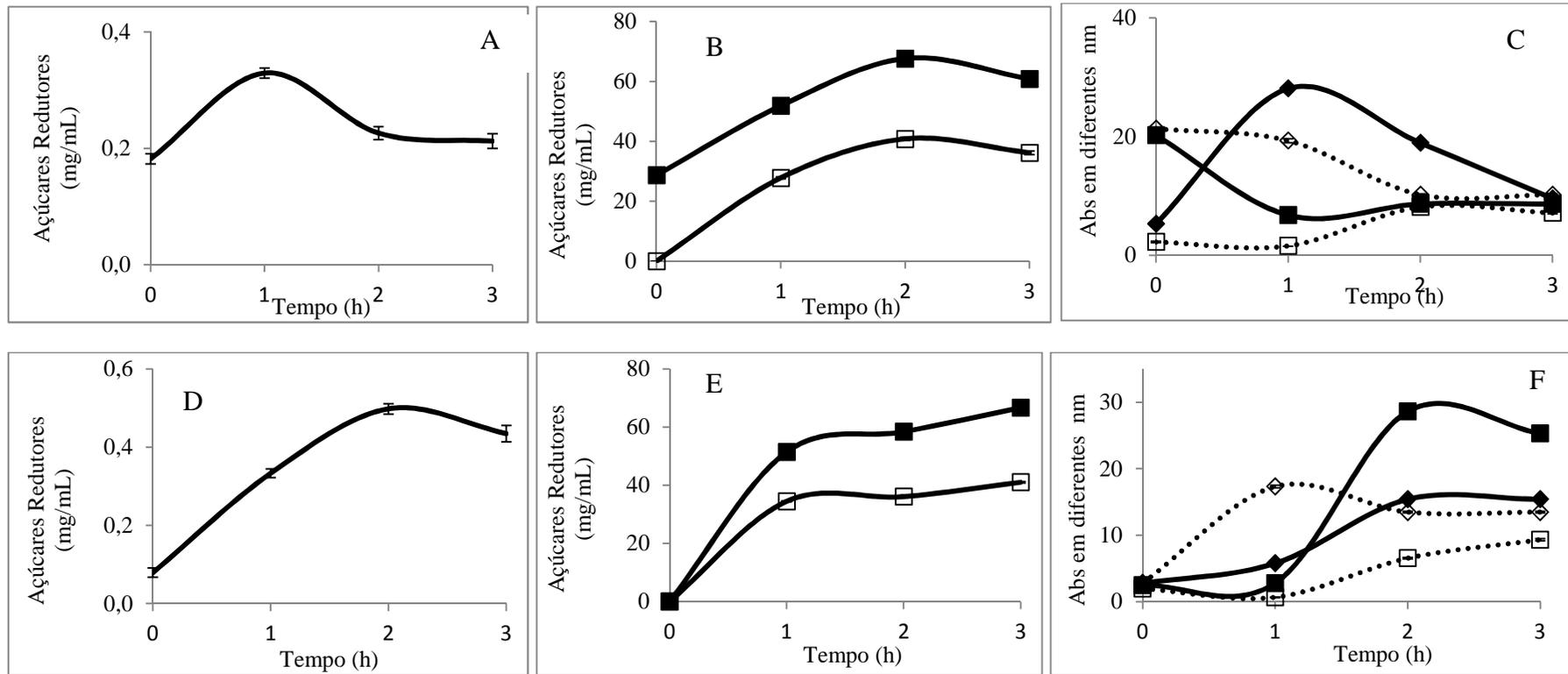


Figura 5.4. Hidrólise da polpa clara pelas frações ultrafiltradas em PM 10 kDa. Ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* em bagaço de cana (A, B, C). Ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* em piolho de algodão (D, E, F). Açúcares redutores avaliados por DNS (A e D), por orcinol-ferríco à 660 nm (■) e à 520 nm (□) (B e E). Liberação de cromóforos à 237 nm (◆), 254 nm (◇), 280 nm (■) e à 465 nm (□) (C e F).

A análise dos xilooligossacarídeos liberados durante a hidrólise da polpa clara mostrou uma liberação preferencial de xilobiose. Pela análise da figura 5.5 nota-se que a quantidade de xilose permaneceu praticamente constante entre zero e três horas para as quatro amostras enzimáticas, indicando que a quantidade de xilose detectada após três horas de incubação, provavelmente já estava presente no tempo zero e não foi resultado da atividade enzimática sobre a polpa de celulose. A ANOVA fatorial indica que há diferença na utilização das quatro amostras enzimáticas em função do tempo ($p = 0,000$). A figura 5.6 mostra exemplos de cromatogramas obtidos com o hidrolisado da polpa clara, no tempo de maior liberação de açúcares redutores (2 horas), evidenciando os picos de identificação de xilose (X1) e xilobiose (X2).

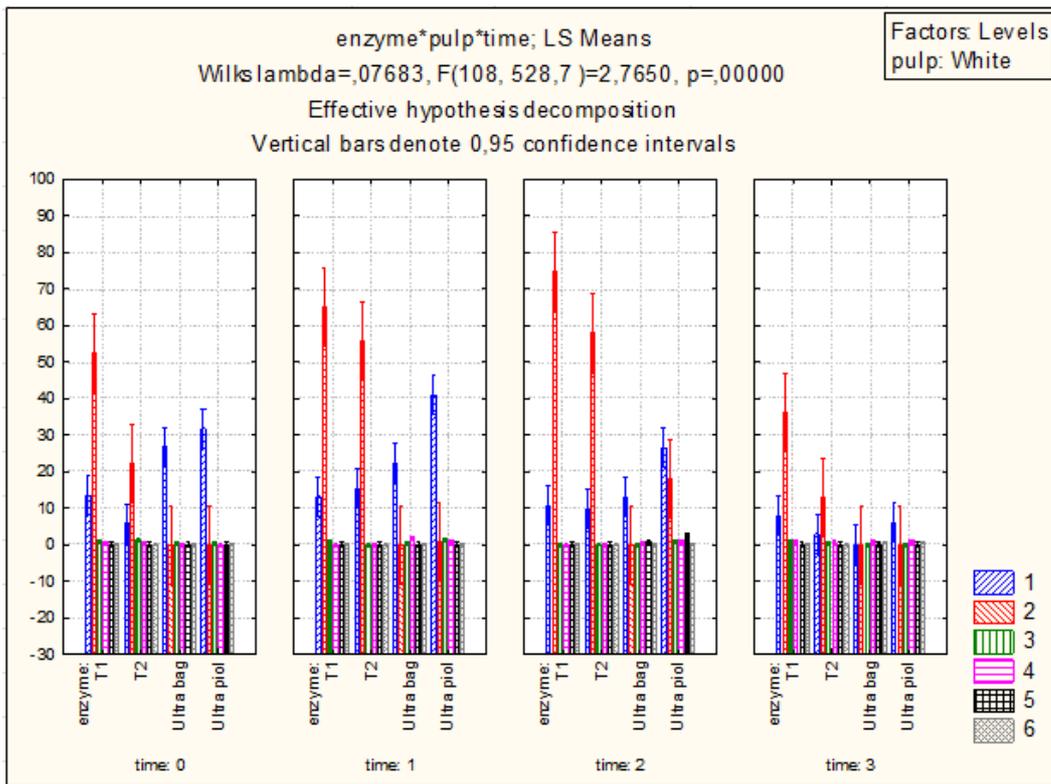


Figura 5.5. Liberação de xilooligosacarídeos durante a hidrólise da polpa de celulose clara em função do tempo. Xilose (■), xilobiose (■), xilotriose (■), xilotetraose (■), xilopentaose (■) e xilohexaose (■).

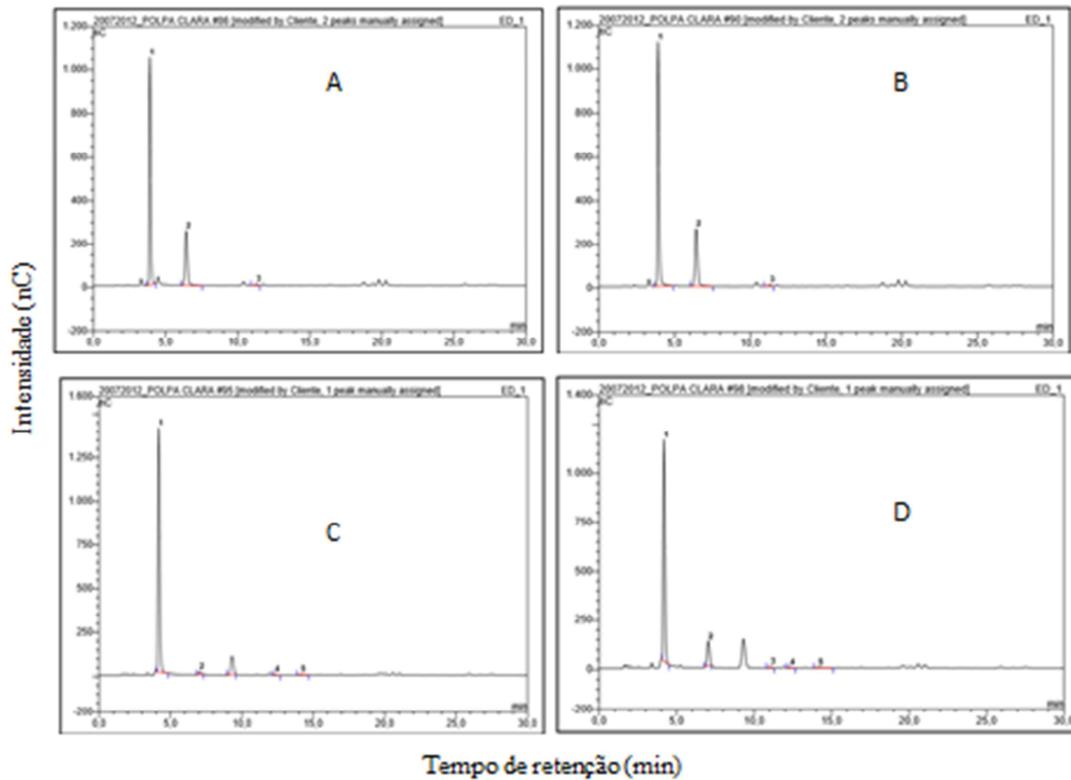


Figura 5.6. Detecções por HPLC dos produtos formados pela hidrólise da polpa de celulose clara, com duas horas de incubação, pelas enzimas Xyl T1 (A), Xyl T2 (B), pelo *pool* de enzimas contidas no ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* com bagaço de cana (C) e pelo *pool* de enzimas contidas no ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* com piolho de algodão (D). Xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentaose (X5) e xilohexaose (X6).

A hidrólise da polpa pré-branqueada pelas enzimas puras Xyl T1 e Xyl T2 mostrou uma maior liberação de açúcares totais (DNS) na primeira hora de hidrólise, enquanto que a maior liberação de pentoses (orcinol férrico a 660 nm) ocorreu na segunda hora de hidrólise. A liberação de cromóforos aumentou com o aumento do tempo de incubação (figura 5.7), durante a incubação com as duas enzimas. De forma geral, a maior liberação de cromóforos foi observada com três horas de hidrólise.

Resultados semelhantes foram observados no estudo de Salles e Medeiros *et al.*, (2005) durante a hidrólise de polpa *kraft* de eucalipto pré-branqueada utilizando-se xilanases de *Hemicola grisea* var. *thermoidea*, no qual a maior liberação de cromóforos também ocorreu com três horas de incubação.

Assim como observado para polpa clara, não há diferença estatisticamente significativa na liberação de açúcares quando o substrato foi incubado com enzimas puras ou frações ultrafiltradas. Ou seja, a utilização das amostras de ultrafiltrado poderia levar a uma redução nos custos de obtenção de enzimas aplicadas como uma alternativa no processo de branqueamento do papel. Diferentemente da polpa clara, na hidrólise da polpa pré-branqueada o tempo de incubação só foi estatisticamente significativo para a liberação de pentoses para Xyl T2 ($p = 0,0010$) e para a fração ultrafiltrada do bagaço de cana ($p = 7,183 \times 10^{-8}$), sendo que o teste LSD Fisher mostrou que todos os tempos são diferentes uns dos outros.

A maior liberação de açúcares totais e de cromóforos no comprimento de onda de 280 nm na hidrólise da polpa pré-branqueada foi observada com *pool* de enzimas presentes no ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* em bagaço de cana de açúcar. A figura 5.8 mostra a liberação de açúcares redutores e de cromóforos durante a hidrólise com o ultrafiltrado proveniente dos cultivos de *A. terreus* em bagaço de cana e em o piolho de algodão. A maior liberação de pentoses ocorre com duas horas de hidrólise com as duas amostras enzimáticas de ultrafiltrado.

A maior liberação de xilooligossacarídeos se deu com três horas de hidrólise (figura 5.9). Este resultado pode parecer contraditório em relação aos dados de liberação de açúcares totais e de pentoses (figuras 5.7 e 5.8), entretanto, como no HPLC só foram detectados xilooligossacarídeos contendo seis ou menos unidades de D-xilose, é

possível inferir que os produtos com maior grau de polimerização não puderam ser identificados, assim como açúcares redutores contendo outro resíduo que não D-xilose. Nos cromatogramas obtidos com o hidrolisado da polpa pré-branqueada com O₂ (figura 5.10) podem ser vistos xilooligossacarídeos com maiores tempos de retenção que não puderam ser identificados pela ausência de xilooligossacarídeos padrões para maiores tempos de retenção. Apesar dos produtos de hidrólise detectados por HPLC representarem valores menores que os obtidos com as outras técnicas de detecção de açúcares redutores, a técnica de detecção com base em seus tempos de retenção resulta em maior especificidade. De forma oposta, a detecção de açúcar redutor pelo método do DNS é menos específica, pois mesmo utilizando D-xilose como açúcar de referência, não seria possível a distinção entre as extremidades reductoras de monômeros de D-xilose e xilooligossacarídeos de maiores massas moleculares. Um resultado semelhante foi observado por Gupta e Bhushan *et al.*, (2000) com maior eficiência do tratamento da polpa *kraft* de eucalipto com xilanase após quatro horas de hidrólise.

Da mesma forma que observado para a hidrólise da polpa clara, a ANOVA fatorial mostra diferença estatisticamente significativa ($p = 0,000$) entre os diversos tratamentos e tempos de hidrólise.

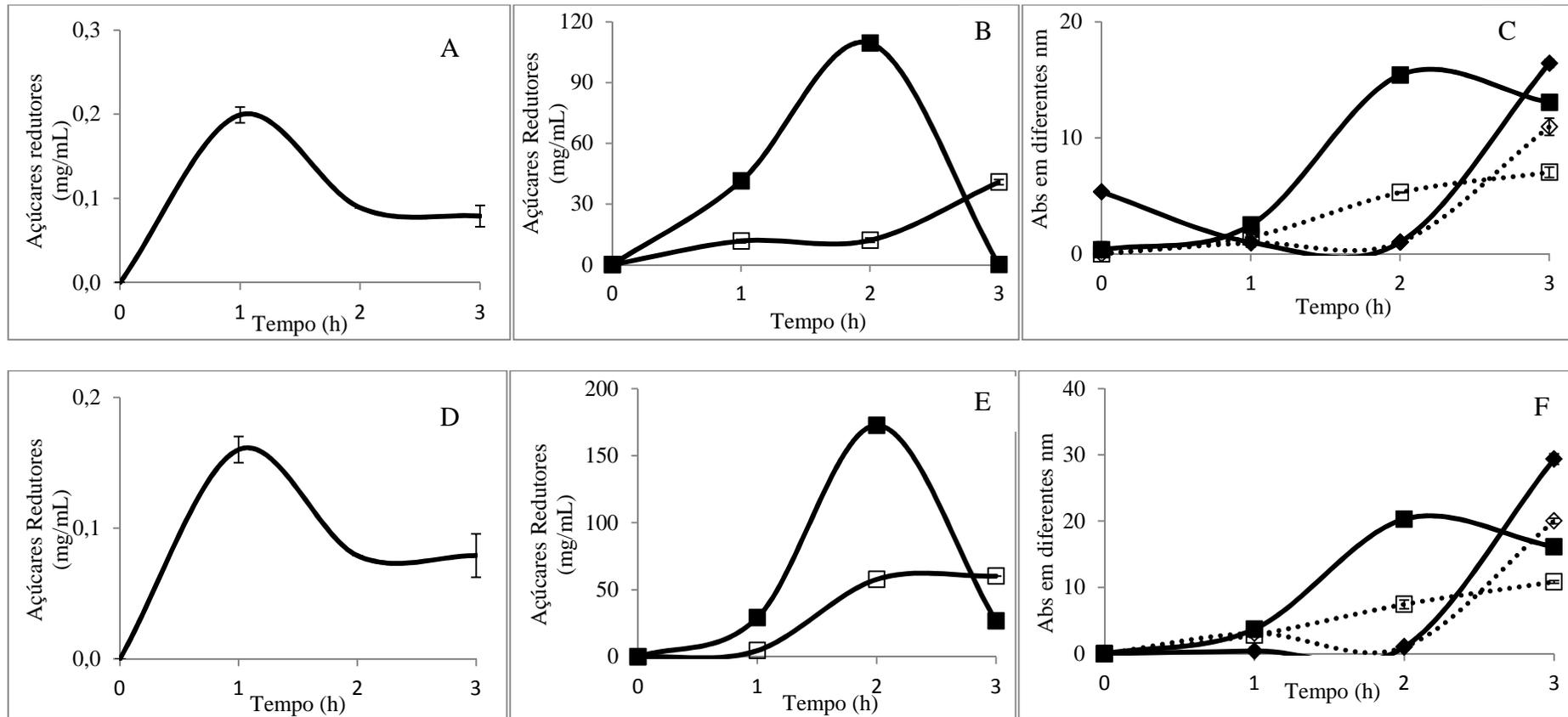


Figura 5.7. Hidrólise da polpa pré-branqueada pelas enzimas Xyl T1 (A, B, C) e Xyl T2 (D, E, F). Açúcares redutores avaliados por DNS (A e D), por orcinol-férrico à 660 nm (■) e à 520 nm (□) (B e E). Liberação de cromóforos à 237 nm (◆), 254 nm (◇), 280 nm (■) e à 465 nm (□) (C e F).

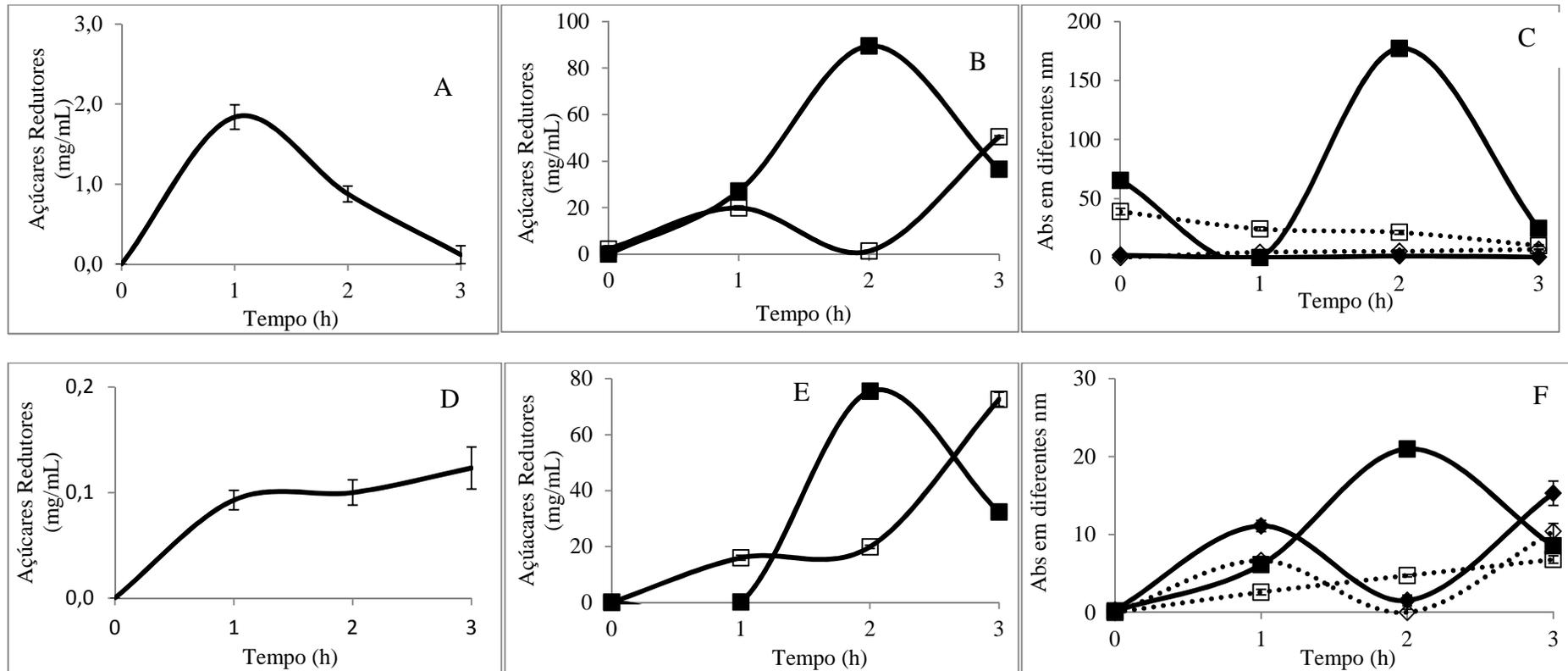


Figura 5.8. Hidrólise da polpa pré-branqueada pelas frações ultrafiltradas em PM 10 kDa. Ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* em bagaço de cana (A, B, C). Ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* em piolho de algodão (D, E, F). Açúcares redutores avaliados por DNS (A e D), por orcinol-férrico à 660 nm (■) e à 520 nm (□) (B e E). Liberação de cromóforos à 237 nm (◆), 254 nm (◇), 280 nm (■) e à 465 nm (□) (C e F).

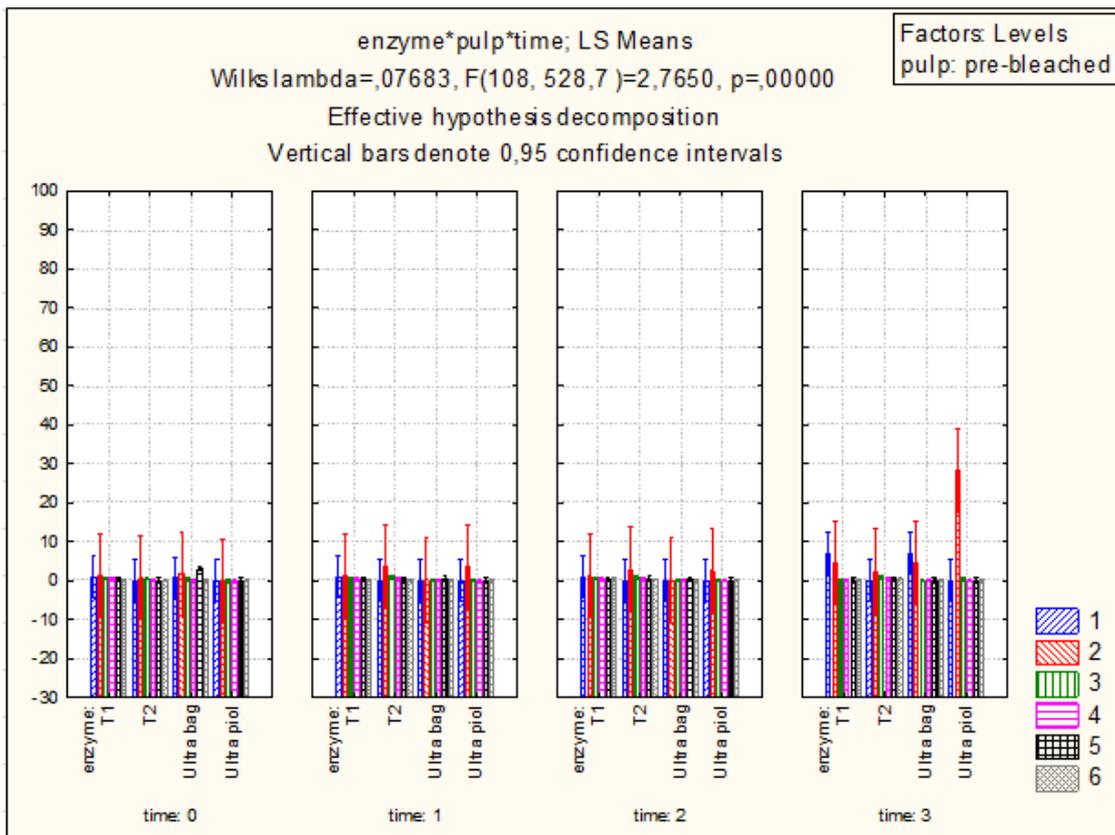


Figura 5.9. Liberação de xilooligossacarídeos durante a hidrólise da polpa de celulose pré-branqueada, em função do tempo. Xilose (■), xilobiose (■), xilotriose (■), xilotetraose (■), xilopentaose (■) e xilohexaose (■).

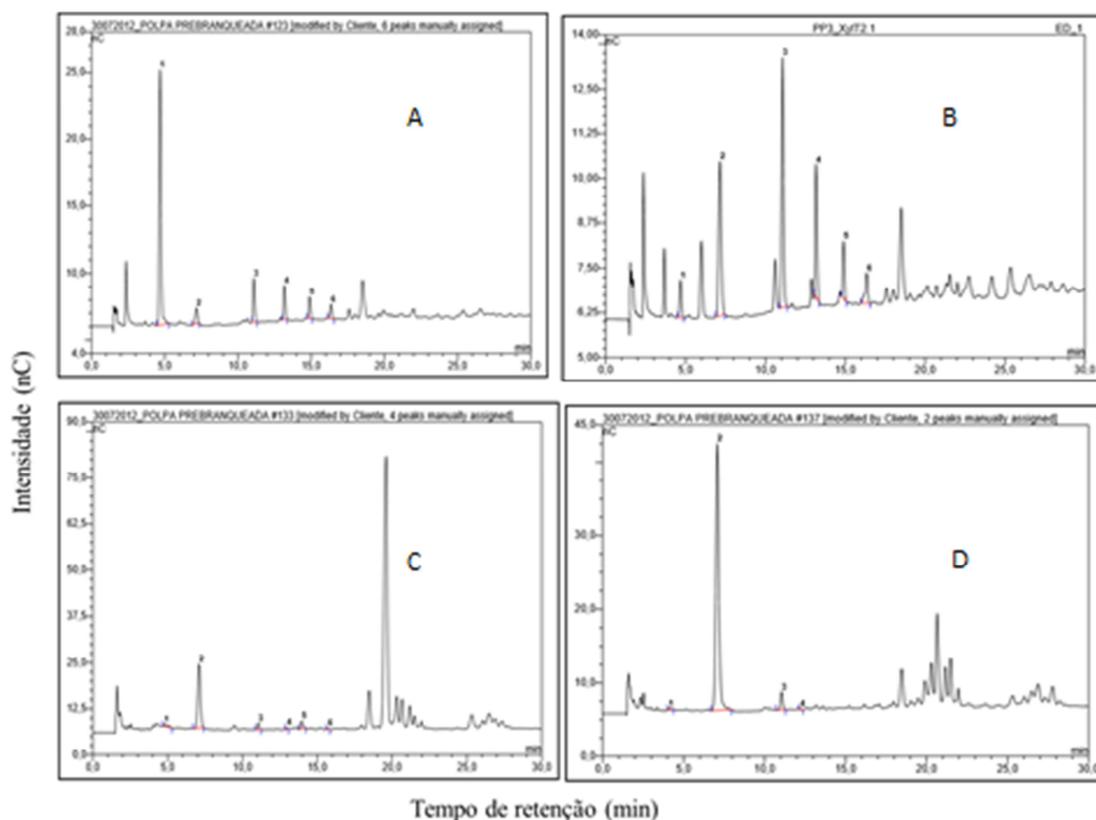


Figura 5.10. Detecções por HPLC dos produtos formados pela hidrólise da polpa de celulose pré-branqueada com O₂, com três horas de incubação, pelas enzimas Xyl T1 (A), Xyl T2 (B), pelo *pool* de enzimas contidas no ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* em bagaço de cana (C) e pelo *pool* de enzimas contidas no ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* em piolho de algodão (D). Xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentaose (X5) e xilohexaose (X6).

Devido à maior recalcitrância da polpa de celulose escura, a hidrólise deste substrato foi feita durante oito horas, com alíquotas retiradas a cada hora. Embora a ANOVA mostre diferenças estatisticamente significativas em poucos casos (liberação de açúcares totais, Xyl T2, $p = 0,0095$; liberação de pentoses, Xyl T2, $p = 0,0012$ e ultrafiltrado proveniente do cultivo com bagaço de cana, $p = 7,83 \times 10^{-8}$; liberação de hexoses, ultrafiltrado proveniente do cultivo com bagaço de cana, $p = 8,94 \times 10^{-5}$), nota-

se uma tendência de aumento de liberação de açúcares redutores totais e de pentoses e hexoses com o passar do tempo, indicando que a maior taxa de hidrólise acontece após maior tempo de incubação. Na hidrólise da polpa escura, são observados desvios-padrão muito maiores que os observados anteriormente, nas hidrólises da polpa clara e pré-branqueada, entretanto, por tratar-se de um substrato muito heterogêneo, são esperados maiores desvios em relação à média do que quando foi usado um substrato mais homogêneo.

Maiores liberações de pentoses e hexoses foram observadas durante a hidrólise com Xyl T1 e com o ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* em bagaço de cana. Na hidrólise feita com a amostra enzimática de ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* em bagaço de cana também foram observadas as maiores liberações de cromóforos. As figuras 5.11 e 5.12 mostram as liberações de açúcares redutores e de cromóforos durante a hidrólise com as amostras enzimáticas purificadas e semi-purificadas, respectivamente.

A análise por HPLC mostrou maior liberação de xilobiase com duas horas de hidrólise. A figura 5.13 mostra a detecção de xilooligossacarídeos produzidos durante a hidrólise da polpa escura, entre zero e três horas de hidrólise. Como o método estatístico usado para analisar a detecção de xiloolgossacarídeos baseou-se na comparação entre os três substratos, a construção do gráfico de liberação de xilooligossacarídeos em função do tempo para a hidrólise da polpa de celulose só foi possível nos tempos em que houve também hidrólise das polpas clara e pré-branqueada. Na figura 5.14 estão exemplos de cromatogramas obtidos durante a detecção de xilooligossacarídeos presentes no hidrolisado da polpa escura, após oito horas de hidrólise. Assim como já observado para as hidrólises anteriores, tanto da polpa clara e como da pré-branqueada, a ANOVA

fatorial mostrou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,000$) entre os tratamentos enzimáticos, em função do tempo.

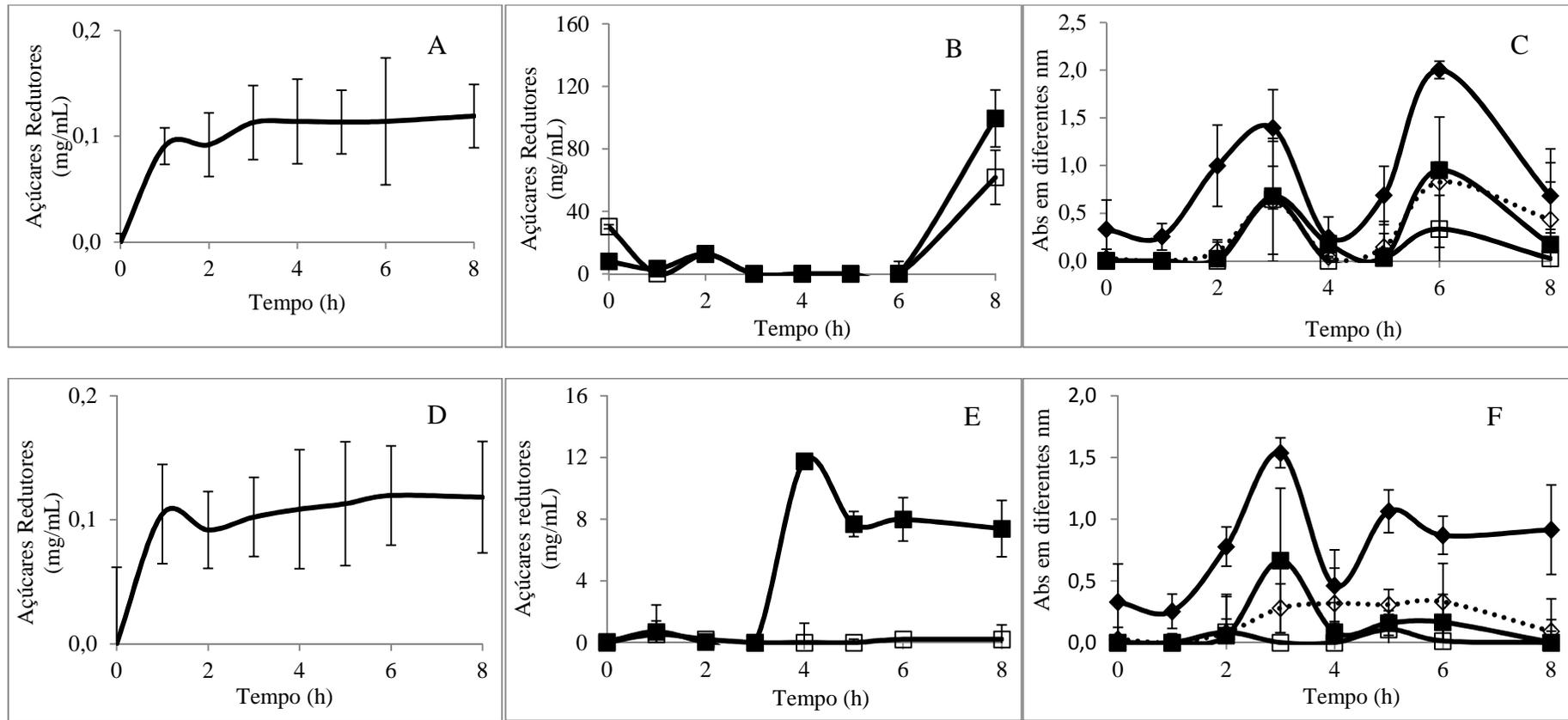
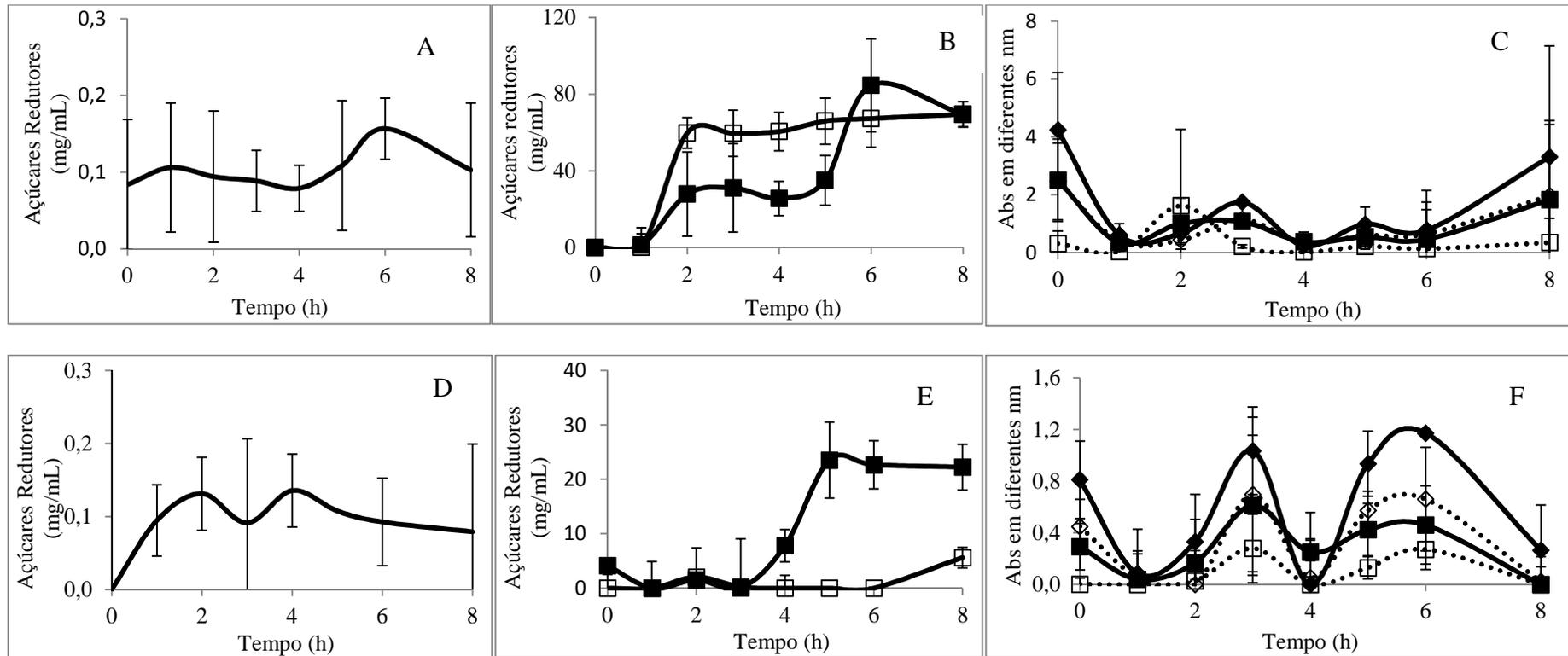


Figura 5.11. Hidrólise da polpa escura pelas enzimas Xyl T1 (A, B, C) e Xyl T2 (D, E, F). Açúcares redutores avaliados por DNS (A e D), por orcinol-férrico à 660 nm (■) e à 520 nm (□) (B e E). Liberação de cromóforos à 237 nm (◆), 254 nm (◇), 280 nm (■) e à 465 nm (□) (C e F).



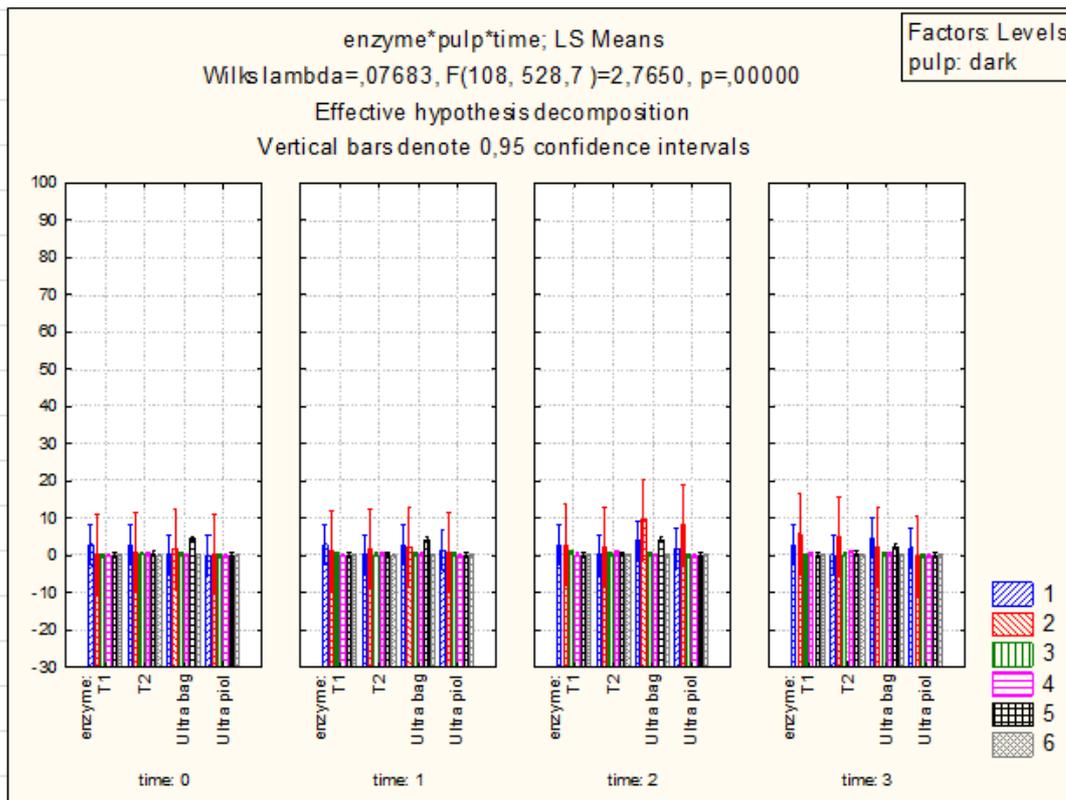


Figura 5.13. Liberação de xilooligosacarídeos durante a hidrólise da polpa de celulose escura em função do tempo. Xilose (■), xilobiose (■), xilotriose (■), xilotetraose (■), xilopentaose (■) e xilohexaose (■).

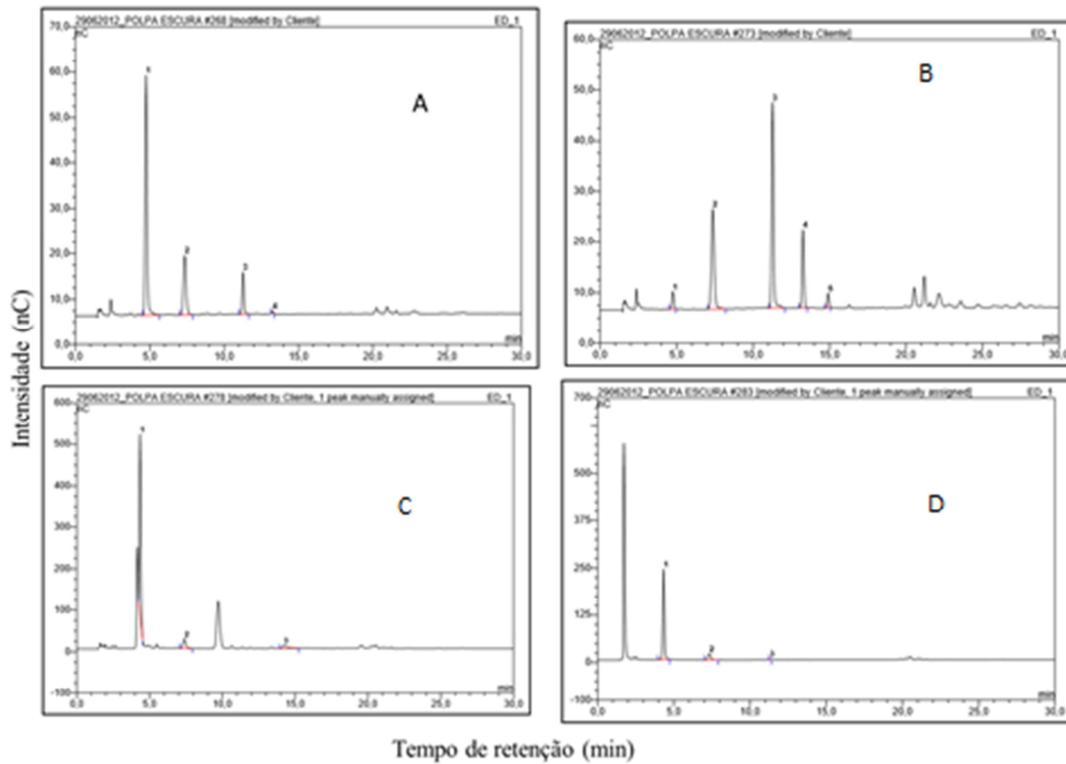


Figura 5.14. Detecções por HPLC dos produtos formados pela hidrólise da polpa de celulose escura, com oito horas de incubação, pelas enzimas Xyl T1 (A), Xyl T2 (B), pelo *pool* de enzimas contidas no ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* em bagaço de cana (C) e pelo *pool* de enzimas contidas no ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* em piolho de algodão (D). Xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentaose (X5) e xilohexaose (X6).

Por ser um substrato que apresenta maior dificuldade na hidrólise, a polpa escura foi incubada novamente por 48 h, porém, conforme mencionado no capítulo III, as enzimas têm baixa estabilidade a 50°C, por esta razão, a incubação foi feita a 28°C. Da mesma forma como na hidrólise a 50°C, a maior liberação de açúcar foi observada durante a incubação com Xyl T1 e com o *pool* de enzimas contidas no ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* em bagaço de cana. Em todos os casos, a maior

liberação de pentoses foi observada com aproximadamente 20 horas de hidrólise. Entretanto, a liberação de cromóforos aumentou progressivamente com o aumento do tempo de incubação (figuras 5.15 e 5.16). Os xilooligômeros liberados entre 20 e 48 horas foram, na sua maioria, xilbiose (figura 5.17). Como discutido anteriormente, as análises estatísticas de liberação de xilooligossacarídeos em função do tempo foram feitas de forma comparativa entre as quatro amostras enzimáticas e os três substratos, portanto, não foi possível a análise nos tempos de 20, 24 28 e 48 horas de hidrólise, pois não foi feita hidrólise das polpas clara e pré-branqueada com O₂ nestes tempos.

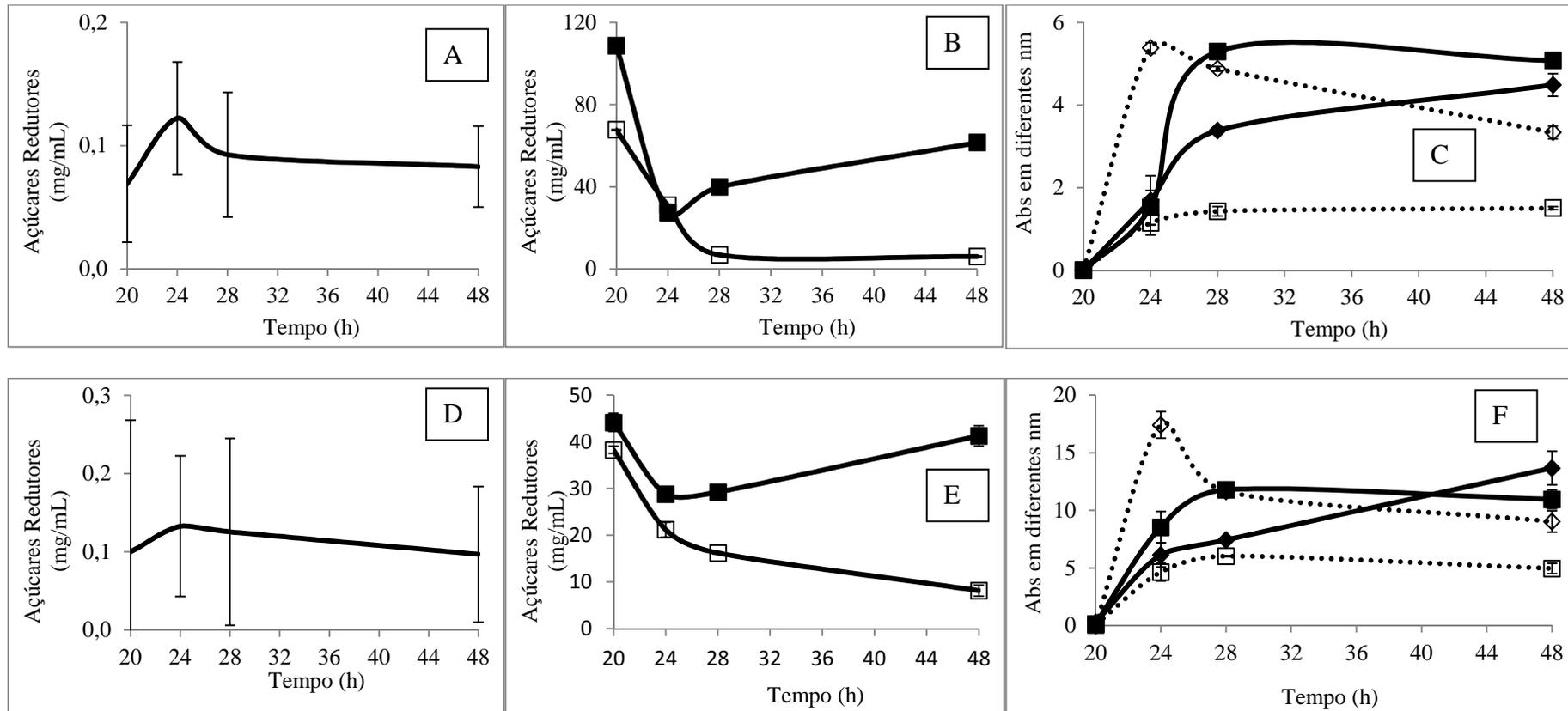


Figura 5.15. Hidrólise da polpa pescura pelas enzimas Xyl T1 (A, B, C) e Xyl T2 (D, E, F). Açúcares redutores avaliados por DNS (A e D), por orcinol-férrico à 660 nm (■) e à 520 nm (□) (B e E). Liberação de cromóforos à 237 nm (◆), 254 nm (◇), 280 nm (■) e à 465 nm (□) (C e F).

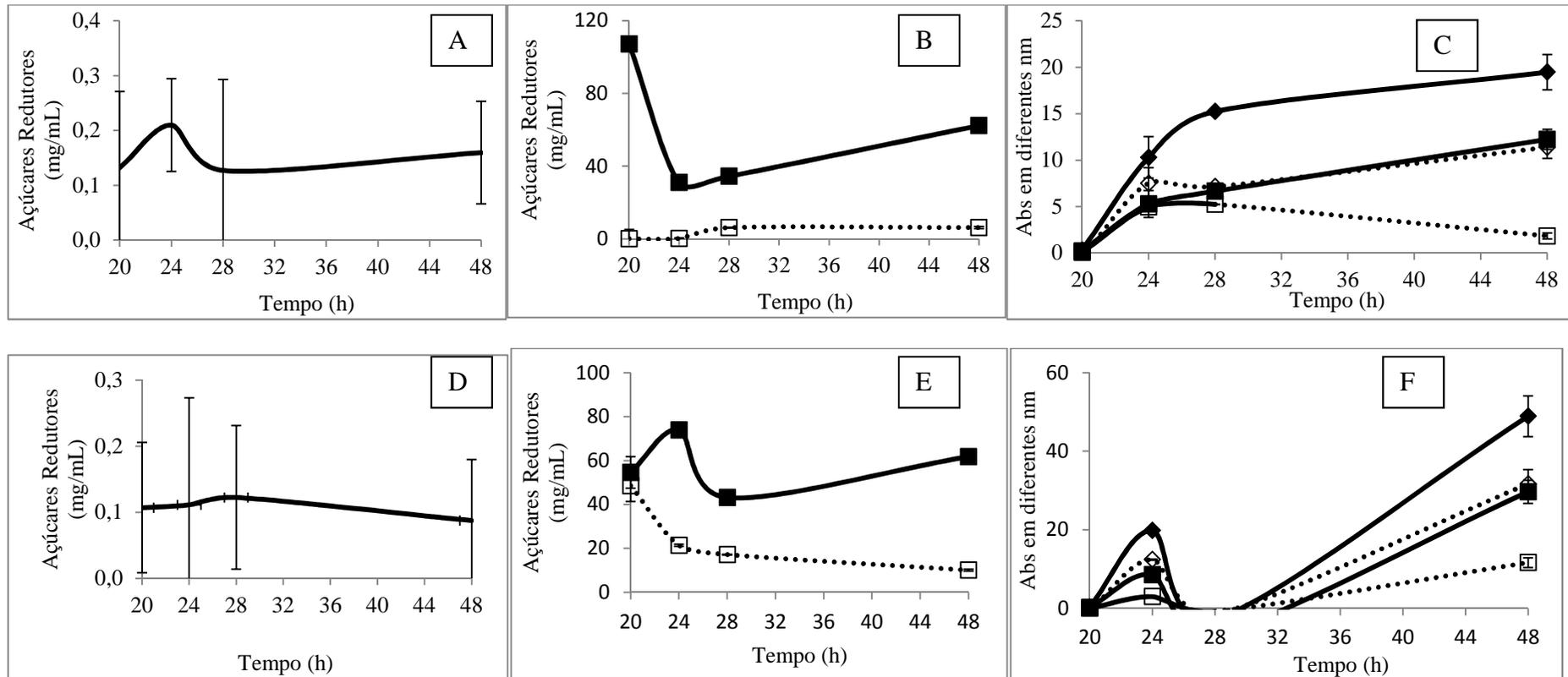


Figura 5.16. Hidrólise da polpa escura pelas frações ultrafiltradas em PM 10 kDa. Ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* em bagaço de cana (A, B, C). Ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* em piolho de algodão (D, E, F). Açúcares redutores avaliados por DNS (A e D), por orcinol-férrico a 660 nm (■) e a 520 nm (□) (B e E). Liberação de cromóforos a 237 nm (◆), 254 nm (◇), 280 nm (■) e a 465 nm (□) (C e F).

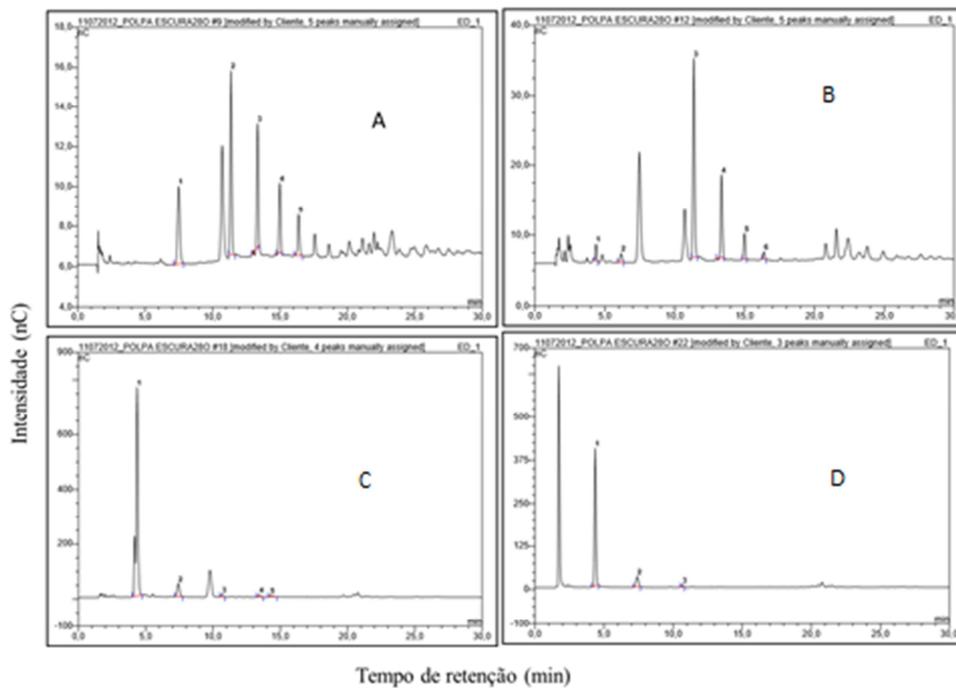


Figura 5.17. Detecções por HPLC dos produtos formados pela hidrólise da polpa de celulose escura, com 20 horas de incubação, pelas enzimas Xyl T1 (A), Xyl T2 (B), pelo *pool* de enzimas contidas no ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* em bagaço de cana (C) e pelo *pool* de enzimas contidas no ultrafiltrado proveniente do cultivo de *A. terreus* em piolho de algodão (D). Xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentaose (X5) e xilohexaose (X6).

A liberação de glicose foi medida em todos os experimentos, e em todos os casos, não houve liberação deste açúcar, demonstrando que as enzimas não agem sobre a polpa de celulose. Além disso, a liberação de pentoses foi maior que a liberação de hexoses, evidenciando que a atividade das enzimas é principalmente sobre a xilana. As enzimas usadas nesses experimentos têm potencial de aplicação na indústria de papel e celulose, pois como anteriormente mencionado, essa aplicação industrial requer

xilanases livres de atividade celulolítica para a manutenção da estrutura da fibra de celulose (Li, Jiang *et al.*, 2005; Chidi, Godana *et al.*, 2008; Motta, Andrade *et al.*, 2013).

Dentre os cromóforos liberados, a maior quantidade observada foi no comprimento de onda de 237 nm. Cromóforos liberados neste comprimento de onda correlacionam-se com a remoção de cor e conseqüentemente redução no teor de lignina, além de aumentar o brilho da polpa de celulose após o branqueamento (Elegir, Sykes *et al.*, 1995; Gupta, Bhushan *et al.*, 2000; Motta, Andrade *et al.*, 2013). A liberação de cromóforos a 465 nm ocorreu de forma geral, no tempo final de todas as hidrólises. A liberação de cromóforos neste comprimento de onda relaciona-se a liberação de compostos hidrofóbicos (Gupta, Bhushan *et al.*, 2000). A liberação de cromóforos é um melhor indicador da ação-enzimática do que a liberação de açúcares redutores, uma vez que açúcares redutores continuam sendo gerados pela hidrólise xilanolítica dos oligossacarídeos solúveis liberados pela despolimerização inicial da xilana na superfície das fibras (Garg, Roberts *et al.*, 1998).

Análises estatísticas foram feitas entre os controles e os tratamentos enzimáticos, demonstrando que os tratamentos enzimáticos têm resultado estatisticamente significativo na liberação de açúcares redutores e de cromóforos. Além disso, a liberação de açúcares e de cromóforos difere estatisticamente entre os três substratos, em todos os tempos analisados (zero hora, $p = 1,71 \times 10^{-4}$; uma hora, $p = 0,0013$; duas horas, $p = 5,55 \times 10^{-2}$ e três horas, $p = 3,16 \times 10^{-5}$).

A análise da liberação de xilooligossacarídeos de cada amostra enzimática em função do tempo e com relação a cada substrato hidrolisado mostrou que todas as enzimas liberam preferencialmente xilobiose, evidenciando o mecanismo de ação destas

enzimas como do tipo endo, tanto para as enzimas puras (Xyl T1 e Xyl T2) quanto para o *pool* de xilanases contidas nos ultrafiltrados provenientes dos cultivos de *A. terreus* em bagaço de cana e em piolho de algodão (figuras 5.18, 5.19, 5.20, 5.21). Concentrações menores de xilose também foram detectadas, entretanto, esta xilose pode ter sido liberada durante as etapas de cozimento ou após a deslignificação por O₂, anteriormente a obtenção da polpa clara, durante o processo *Kraft*.

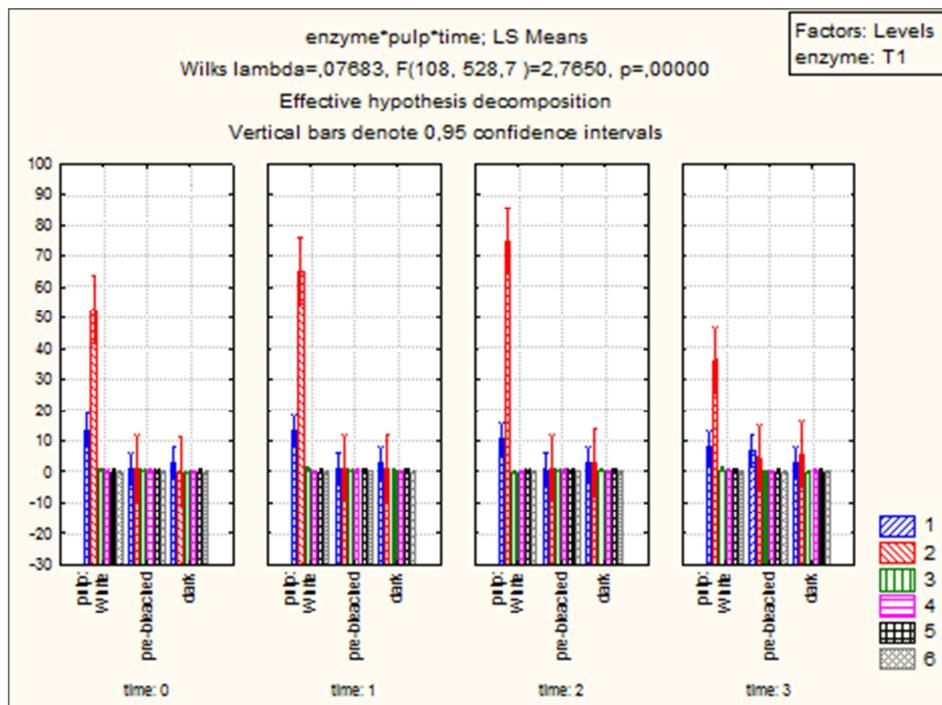


Figura 5.18. Xilooligosacarídeos liberados por Xyl T1 durante a hidrólise das polpas de celulose clara, pré-branqueada com O₂ e escura, em função do tempo. Xilose (■), xilobiose (■), xilotriose (■), xilotetraose (■), xilopentaose (■) e xilo-hexaose (■).

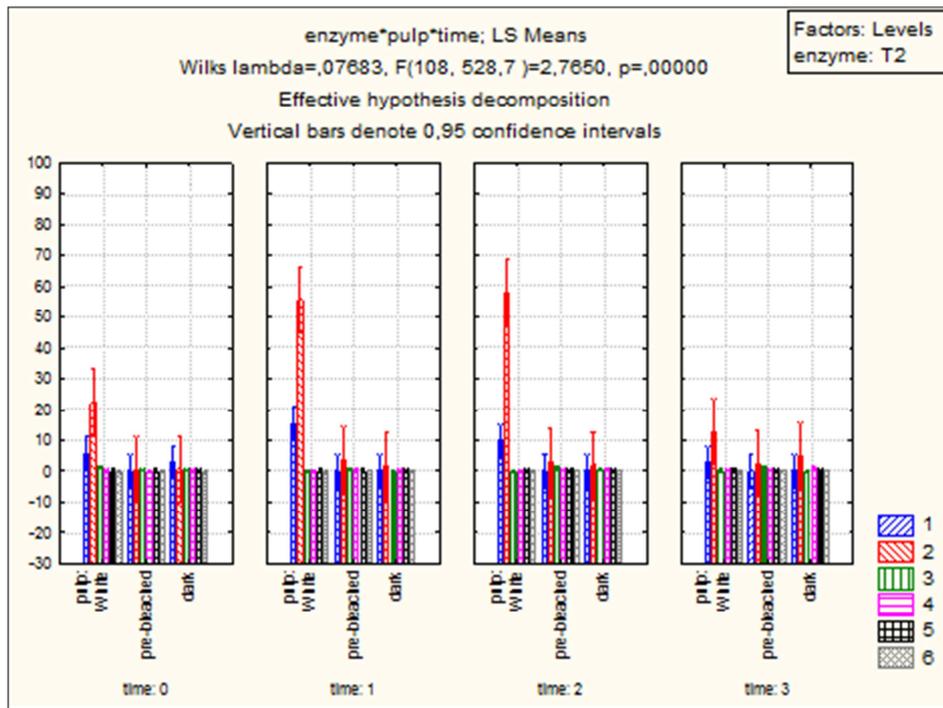


Figura 5.19. Xilooligosacarídeos liberados por Xyl T2 durante a hidrólise das polpas de celulose clara, pré-branqueada com O₂ e escura, em função do tempo. Xilose (■), xilobiose (■), xilotriose (■), xilotetraose (■), xilopentaose (■) e xilohexaose (■).

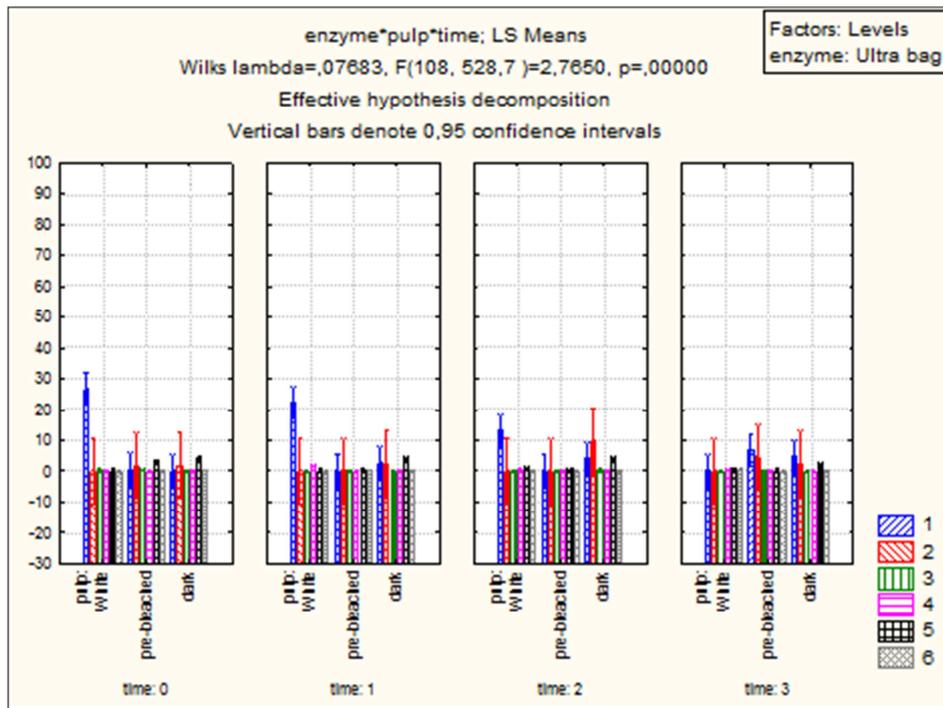


Figura 5.20. Xilooligosacarídeos liberados pelo ultrafiltrado proveniente do cultivo com bagaço de cana durante a hidrólise das polpas de celulose clara, pré-branqueada com O₂ e escura, em função do tempo. Xilose (■), xilobiose (■), xilotriose (■), xilotetraose (■), xilopentaose (■) e xilohexaose (■).

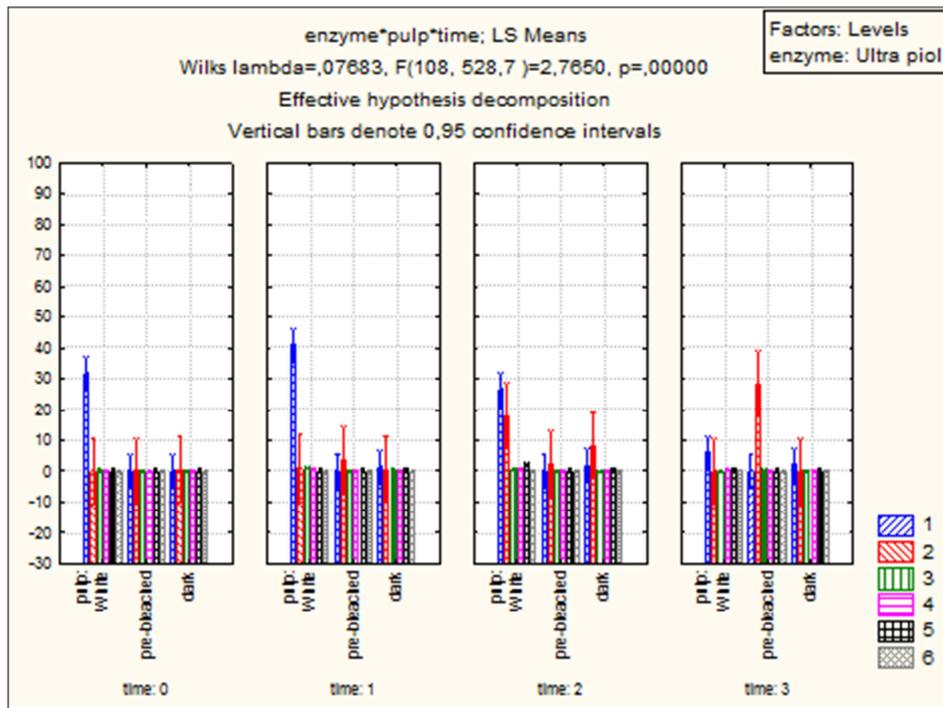


Figura 5.21. Xilooligossacarídeos liberados pelo ultrafiltrado proveniente do cultivo com piolho de algodão durante a hidrólise das polpas de celulose clara, pré-branqueada com O₂ e escura, em função do tempo. Xilose (■), xilobiose (■), xilotriose (■), xilotetraose (■), xilopentaose (■) e xilohexaose (■).

A liberação do complexo carboidrato-lignina libera compostos fenólicos que podem inibir a ação enzimática, entretanto, conforme discutido no capítulo IV, Xyl T2 não é inibida por tais compostos.

O processo *kraft* de branqueamento ocorre em várias etapas, compreendendo etapas para a remoção da lignina residual e as etapas finais aumentam o brilho do papel. A etapa de deslignificação é normalmente realizada por cloro, (Bajpai, 2004), gerando grandes problemas durante a descarga destes resíduos clorados. Os subprodutos gerados dessa utilização do cloro são substâncias orgânicas cloradas, tóxicas, mutagênicas e

presistentes, causando numerosos prejuízos a sistemas biológicos (Filho, 2004). Com relação a este problema, o branqueamento enzimático é uma alternativa muito promissora para diminuir os produtos a base de cloro no processo de branqueamento da polpa e conseqüentemente, reduzir a demanda de oxigênio nos efluentes usados como descarga de resíduos. Um tratamento com xilanase diminuiu o uso de reagentes clorados durante o branqueamento de uma polpa *kraft* em 15% (Skjold-Jorgensen, Munk *et al.*, 1992). Essas enzimas melhoram o processo de branqueamento da polpa, pois ao hidrolisarem a xilana, a ligação lignina – carboidrato é interrompida e conseqüentemente, a lignina presa é liberada, melhorando o acesso para produtos químicos branqueadores à polpa. (Viikari, Ranua *et al.*, 1986; Bajpai, 2004; Angayarkanni, Palaniswamy *et al.*, 2006; Pandya e Gupte, 2012). As enzimas purificadas e semi-purificadas de *A. terreus* podem ter aplicabilidade no processo de branqueamento de papel, uma vez que mostraram potencial para hidrólise de xilana, aparentemente, sem afetar a fibra de celulose.

5. Conclusão

- Xyl T1, Xyl T2 e as amostras enzimáticas semi-purificadas mostraram potencial para o biobranqueamento de papel, uma vez que hidrolisaram a xilana, aparentemente sem hidrolisar a celulose;
- Análises estatísticas revelam que os tratamentos enzimáticos têm ações diferentes nas três polpas analisadas;

Xilobiose foi o xilooligossacarídeo produzido com maior frequência para a hidrólise das três polpas de celulose pelas quatro amostras enzimáticas analisadas, evidenciando o mecanismo de ação destas enzimas como do tipo endo.

6. Perspectivas

- Avaliar as enzimas Xyl T3 e Xyl T4, assim como o ultrafiltrado em PM 10 kDa proveniente do cultivo com casca de soja nos mesmos processos apresentados neste capítulo;
- Utilizar a microscopia eletrônica de varredura como ferramenta para avaliar a integridade estrutural da polpa de celulose após tratamento enzimático;
- Utilizar as amostras enzimáticas em processos de branqueamento de polpa de celulose.

7. Referências

ANGAYARKANNI, J.; PALANISWAMY, M.; PRADEEP, B.; SWAMINATHAN, K. Biochemical substitution of fungal xylanases for prebleaching of hardwood kraft pulp. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, 2006.

BAJPAI, P. Biological bleaching of chemical pulps. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 1-58, 2004.

BAJPAI, P.; BHARDWAJ, N.; BAJPAI, P.; JAUHARI, M. The impact of xylanases on bleaching of eucalyptus kraft pulp. **Journal of Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 1-6, 1994.

CHAPLIN, M. F. Monosaccharides. In: CHAPLIN, M. F. e KENNEDY, J. F. (Ed.). **Carbohydrate Analysis: a practical approach**. 2. Oxford: Oxford University Press, 1994. p.1-36.

CHIDI, S. B.; GODANA, B.; NCUBE, I.; VAN RENSBURG, E. J.; CRONSHAW, A.; ABOTSI, E. Production , purification and characterization of cellulase-free xylanase from *Aspergillus terreus* UL 4209. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 21, p. 3939-3948, 2008.

DUARTE, G. **Holocelulases produzidas por *Aspergillus oryzae*: purificação, caracterização e degradação de biomassa lignocelulósica**. 2013. 220 (Doutorado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasil.

ELEGIR, G.; SYKES, M.; JEFFRIES, T. W. Differential and synergistic action of *Streptomyces* endoxylanases in prebleaching of kraft pulps. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 10, p. 954-959, 1995.

FILHO, E. X. Xilanases. In: SAID, S. e PIETRO, R. C. L. R. (Ed.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. cap. 8, p.137-148.

GARG, A. P.; ROBERTS, J. C.; MCCARTHY, A. J. Bleach Boosting Effect of Cellulase-free Xylanase of *Streptomyces Thermoviolaceus* and its Comparison with Two Commercial Enzyme Preparations on Birchwood Kraft Pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 7, p. 594-598, 1998.

GERBER, P.; HEITMANN, J.; JOYCE, T.; BUCHERT, J.; SIIKA-AHO, M. Adsorption of hemicellulases onto bleached kraft fibers. **Journal of Biotechnology**, v. 67, n. 1, p. 67-75, 1999.

GUPTA, S.; BHUSHAN, B.; HOONDAL, G. S. Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 325-334, 2000.

HIMMEL, M. E.; RUTH, M. F.; WYMAN, C. E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 358-364, 1999.

KAMBLE, R. D.; JADHAV, A. R. Isolation, identification and screening of potential cellulase-free xylanase producing fungi and its production. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 77, p. 14175-14181, 2012.

KULKARNI, N.; RAO, M. Application of Xylanase from Alkaliphilic Thermophilic *Bacillus* sp. NCIM 59 in biobleaching of bagasse pulp. **Journal of Biotechnology**, v. 51, n. 2, p. 167-173, 1996.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews** v. 23, n. 4, p. 411-456, 1999.

LI, X.; JIANG, Z.; LI, L.; YANG, S.; FENG, W.; FAN, J.; KUSAKABE, I. Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 12, p. 1370-1379, 2005.

MANIMARAN, A.; KUMAR, K. S.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Hyper production of cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* SSBP on bagasse pulp and its application in biobleaching. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 5, p. 887-893, 2009.

MEDEIROS, R. G.; SILVA JR, F. G. D.; BÁO, S. N.; HANADA, R.; FERREIRA FILHO, E. X. Application of xylanases from Amazon Forest fungal species in bleaching of eucalyptus kraft pulps. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 2, p. 231-238, 2007.

MOTTA, F.; ANDRADE, C.; SANTANA, M. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. In:

CHANDEL, A. K. e SILVA, S. S. (Ed.). **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**: InTech, 2013. cap. 10,

PANDYA, J. J.; GUPTA, A. Production of xylanase under solid-state fermentation by *Aspergillus tubingensis* JP-1 and its application. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 35, n. 5, p. 769-779, 2012.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53-63, 2002.

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

RYAN, S. E.; NOLAN, K.; THOMPSON, R. N.; GUBITZ, G. M.; SAVAGE, A. V.; TUOHY, M. G. Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p. 775-785, 2003.

SALLES, B. C.; MEDEIROS, R. G.; BÁO, S. N.; SILVA JR, F. G.; FILHO, E. X. F. Effect of cellulase-free xylanases from *Acrophialophora nainiana* and *Humicola grisea* var. thermoidea on eucalyptus kraft pulp. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 343-349, 2005.

SHARMA, M.; KUMAR, A. Xylanases: An overview. **British Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-28, 2013.

SKJOLD-JORGENSEN, S.; MUNK, N.; PEDERSON, L. Recent progress within the application of xylanases for boosting the bleachability of kraft pulp. In: KUWAHARA, M. e SHIMADA, M. (Ed.). **Biotechnology in the pulp and paper industry**. Tóquio, Japão: Uni Publishers Co. Ltd 1992. p.93-99.

TECHAPUN, C.; POOSARAN, N.; WATANABE, M.; SASAKI, K. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 1327-1340, 2003.

TORRES, J.; DELA CRUZ, T. Production of xylanases by mangrove fungi from the Philippines and their application in enzymatic pretreatment of recycled paper pulps. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 645-655, 2013.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 6, p. 24-25, 1969.

VIKARI, L.; RANUA, M.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. Bleaching with enzymes. Proceedings of the Third International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, 1986, Estocolmo. p.67-69.

VIKARI, L.; SUURNAKKI, A.; BUCHERT, J. Enzyme-aided bleaching of kraft pulps: fundamental mechanisms and practical applications. In: JEFFRIES, T. W. e VIKARI, L. (Ed.). **Enzymes for Pulp and Paper Processing**. Estados Unidos: American Chemical Society, 1996. cap. 2, p.15-24.

Capítulo VI

Hidrólise enzimática da xilana e bagaço de cana de açúcar

Resumo

Foi avaliado o potencial de hidrólise da xilana de bétula por Xyl T1. A maior liberação de açúcares redutores foi observada com 12 horas de hidrólise tanto para xilana solúvel (2,40 mg de açúcar/mL) quanto para xilana insolúvel (1,42 mg de açúcar/mL). A análise do hidrolisado de xilana solúvel por HPLC mostrou que há liberação de cinco tipos de xilooligossacarídeos (X2, X3, X4, X5, X6), sugerindo que a enzima catalise a clivagem aleatória no interior da cadeia da xilana, sendo consistente com o mecanismo de ação de uma endo-xilanase. O potencial de hidrólise de Xyl T1 e de xilanases não purificadas induzidas por bagaço de cana de açúcar foi avaliado com amostras de bagaço não tratado, hidrolisado com ácido sulfúrico e explodido a vapor. Para ambas amostras enzimáticas, a maior liberação de açúcares redutores ocorreu na hidrólise do bagaço de cana explodido a vapor, com 20 horas. Tanto o pré-tratamento por hidrólise ácida quanto a explosão a vapor mostraram-se eficazes na diminuição da recalcitrância do bagaço de cana, evidenciado pelo aumento da liberação de açúcares redutores nas duas amostras pré-tratadas em relação a não tratada.

Palavras chave: Hidrólise enzimática, xilanase, bagaço de cana de açúcar, xilana, cromatografia líquida de alta pressão.

1. Introdução

Espera-se que o mercado do bioetanol atinja 100×10^9 litros de combustível em 2015. Os maiores produtores mundiais deste combustível são os Estados Unidos, Brasil e China. Em 2009, os EUA produziram $39,5 \times 10^9$ litros de bioetanol utilizando o milho como matéria prima, enquanto no Brasil, segundo maior produtor, cerca de 30×10^9 litros foram produzidos utilizando a cana-de-açúcar. A China também tem despendido grandes investimentos na produção de bioetanol (Bhatia, Johri *et al.*, 2012). O aumento da demanda energética mundial para várias finalidades industriais tem aumentado a necessidade da produção de etanol (Brooks, 2008; Huang e Zhang, 2011). Algumas propriedades do bioetanol o tornam um combustível importante, como o teor de 35% de oxigênio, que resulta na completa combustão do combustível, diminuindo as emissões de gases tóxicos. Além disso, a produção de bioetanol utiliza energia de fontes renováveis; portanto quantidades reduzidas de dióxido de carbono (CO_2) são adicionadas ao ambiente. (Bhatia, Johri *et al.*, 2012).

Conforme mencionado na introdução desta tese, o bagaço de cana de açúcar é uma excelente matéria prima para ser utilizada como combustível de segunda geração, pois um terço da energia da cana de açúcar está contida no bagaço (Goldemberg, 2011) e grandes quantidades de bagaço estão disponíveis para utilização deste resíduo para a produção de bioetanol (Neves, Kimura *et al.*, 2007; Moreira, Milanezi *et al.*, 2011; Chandel, Silva *et al.*, 2012). As tecnologias capazes de hidrolisar a holocelulose em seus monossacarídeos a um custo baixo tornarão possível a utilização dos mais diversos resíduos de plantas para a produção de etanol. Essas tecnologias podem, em teoria, dobrar a produção do bioetanol, (Santos, Gómez *et al.*, 2011).

Como discutido anteriormente, o bagaço de cana possui uma alta recalcitrância que dificulta sua sacarificação a açúcares fermentescíveis. Além da utilização do pré-tratamentos (Cardona e Sanchez, 2007; Kumar, Barrett *et al.*, 2009; Kawakubo, Karita *et al.*, 2010), pode-se utilizar um consórcio de enzimas com ação sinérgica para liberação de monômeros e oligômeros, que podem ser usados como precursores de combustíveis ou outros produtos químicos (Moreira, Ferreira *et al.*, 2012).

2. Objetivos

- 2.1.** Avaliar o potencial de hidrólise de uma fração enzimática purificada (Xyl T1);
sobre a xilana de bétula;
- 2.2.** Avaliar o potencial de hidrólise do extrato bruto produzido a partir do cultivo de *A. terreus* em bagaço de cana de açúcar e de uma fração enzimática purificada (Xyl T1) sobre três amostras de bagaço de cana de açúcar.

3. Material e métodos

3.1. Xilana

As frações solúveis e insolúveis da xilana de bétula foram preparadas como descrito no item 3.5.1 da capítulo III desta tese.

3.2. Origem do bagaço de cana de açúcar

O resíduo bagaço de cana-de-açúcar não-tratado (figura 6.1 – A) foi produzido pela Usina da Pedra, localizada na zona rural do município de Serrana – SP. O material foi obtido da Safra de cana-de-açúcar do ano de 2011, colhida mecanicamente sem queima prévia do canavial. O teor de umidade de equilíbrio em torno de 8,0 a 10%, base úmida. O material foi seco a 25°C.

Outros dois resíduos, o bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado por ácido sulfúrico (figura 6.1 – B) ou bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor (figura 6.2 – C) foram originados a partir do pré-tratamento de amostra de bagaço de cana não tratado (Anexo B), com umidade em torno de 50%, produzido pela Usina Vale do Rosário, localizada na zona rural do município de Morro Agudo – SP.

As três amostras de bagaço de cana-de-açúcar foram gentilmente fornecidas pelos pesquisadores Dr. Edgardo Olivares Gómez e Dr. George Jackson de Moraes Rocha do Laboratório Nacional de Ciências e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas – SP.



Figura 6.1. Amostras de bagaço de cana de açúcar. Bagaço de cana não tratado (A), bagaço de cana hidrolisado por ácido sulfúrico (B), bagaço de cana explodido a vapor (C).

3.2.1. Análise bromatológica dos bagaços de cana: Não-tratado, hidrolisado por ácido sulfúrico, bagaço de cana explodido a vapor

A análise composicional dos três tipos de bagaço (Anexo B) (Rocha, Silva *et al.*, 1997; Gouveia, Nascimento *et al.*, 2009), foi realizada pelo CTBE do CNPEM, Campinas – SP.

3.3. Hidrólise enzimática da xilana

A hidrólise da xilana de bétula pela xilanase purificada (Xyl T1) foi feita pela mistura de um volume de amostra enzimática e dois volumes de substrato em solução aquosa (10mg/mL) de xilana (frações solúvel e insolúvel). A mistura entre enzima e substrato foi incubada a 28°C, com agitação de 120 rpm, por seis, 12, 18 ou 24 horas. Nos intervalos de tempo determinados, alíquotas foram retiradas para realização da quantificação de açúcares redutores totais liberados, que foi feita pelo método do DNS, conforme descrito no item 3.5 do capítulo II desta tese. A quantidade de açúcares liberados foi expressa em mg/mL.

3.3.1. Análise por HPLC da hidrólise enzimática

A análise das amostras por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) foi feita como descrito no item 3.4 do capítulo V desta tese.

3.4. Hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar

Na hidrólise de bagaço de cana de açúcar, foram utilizadas amostras de bagaço não-tratado, hidrolisado com ácido sulfúrico ou explodido a vapor, solubilizados em água destilada (10 mg/mL). Foram usadas amostras de enzima purificada (Xyl T1) e de extrato bruto. Foi usada a mesma proporção entre enzima e substrato citada anteriormente, para a hidrólise da xilana. A mistura foi incubada a 28°C, com agitação de 120 rpm. Alíquotas foram retiradas com 24, 48, 72 e 96 h., para quantificação dos açúcares redutores liberados pelo método do DNS

3.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas como descrito no item 3.7 do capítulo III, desta tese.

4. Resultados e discussão

4.1. Análise bromatológica dos bagaços de cana utilizados para hidrólise

Os bagaços de cana não-tratado, hidrolisado com ácido sulfúrico e explodido à vapor foram caracterizados quanto à sua composição físico-química. Conforme dados mostrados na tabela 6.1, as duas metodologias utilizadas de pré-tratamento do bagaço, aumentaram o percentual de celulose, visto que o percentual inicial correspondeu a 43,8% no bagaço “*in natura*”, e foi aumentado para 58,4 no bagaço hidrolisado e 53,7

no bagaço explodido a vapor. De forma inversa, ambas as metodologias reduziram o teor de hemicelulose para menos da metade da inicial nos dois casos, o que indica a eficiência dos pré-tratamentos.

A hidrólise por ácido sulfúrico e a explosão a vapor são caracterizadas por melhorar a exposição da celulose à digestão enzimática, aumentar a degradação da fração de hemicelulose e são eficazes na promoção da deslignificação da lignocelulose (Balat, 2011). Inesperadamente, o percentual de lignocelulose detectado aumentou nos dois casos após o pré-tratamento, entretanto pode ter havido uma maior exposição da lignina após as etapas de pré-tratamento.

Tabela 6.1. Análise bromatológica dos bagaços de cana.

Componentes	Não tratado	% em massa	
		Hidrolisado com H ₂ SO ₄	Explodido a vapor
Celulose	43,8 ± 1,1	58,4 ± 1,4	53,7 ± 0,6
Hemicelulose	25,8 ± 0,8	6,5 ± 0,3	8,9 ± 0,1
Lignina total	22,1 ± 0,8	32,0 ± 0,3	32,3 ± 0,3
Cinzas	1,4 ± 0,2	2,9 ± 0,3	5,5 ± 0,2
Extrativos (Ciclo-hexano/etanol 2:1)	6,1 ± 0,3	ND	ND
Total	99,2 ± 0,8	99,3 ± 0,6	110,3 ± 0,4

4.2. Hidrólise da xilana de bétula por Xyl T1

Os produtos de hidrólise da xilana de bétula por Xyl T1 foram analisados por HPLC e pela metodologia do DNS. Os resultados da figura 6.2 mostram que Xyl T1 tem maior potencial para hidrolisar xilana solúvel que insolúvel. A maior liberação de açúcares redutores, tanto na hidrólise da xilana solúvel (2,40 mg de açúcar /mL) quanto insolúvel (1,42 mg de açúcar/mL) foi observada com 12 horas. A maior taxa de hidrólise observada para a fração solúvel da xilana de bétula pode indicar que as ramificações presentes em maior quantidade xilana solúvel funcionem como sítios de ligação para a atividade catalítica de Xyl T1 (Coughlan, 1992). Resultados semelhantes, com maior taxa de hidrólise para xilana solúvel foram observadas por Ryan e Nolan *et al.*, (2003) utilizando uma xilanase purificada de *Penicillium capsulatum*. É importante ressaltar que Xyl T1 apresentou maior afinidade por xilana solúvel, conforme mencionado no capítulo III.

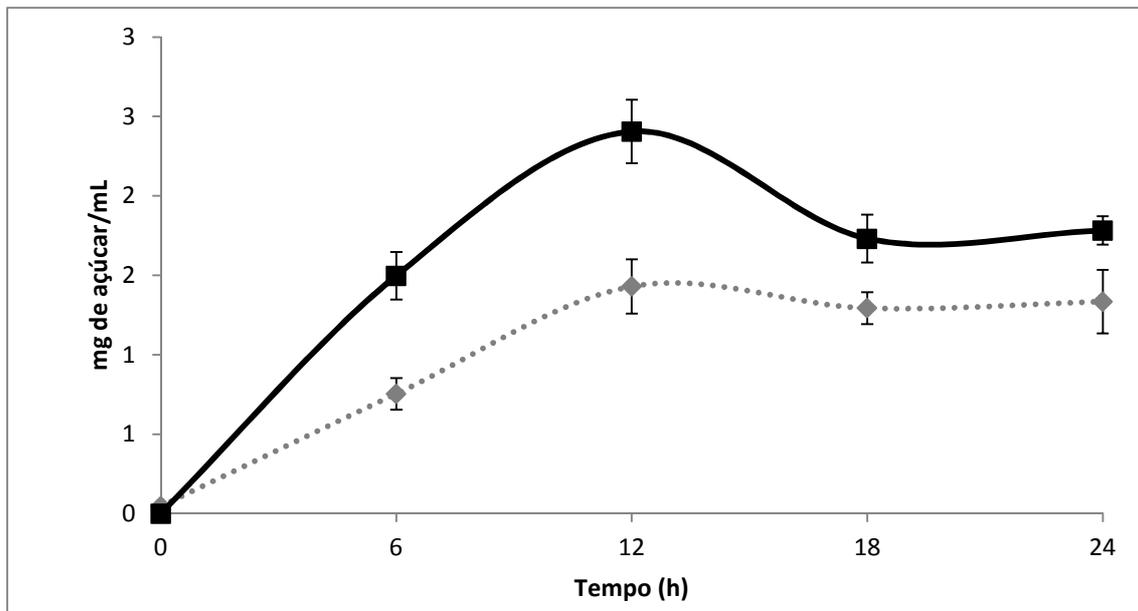


Figura 6.2. Hidrólise de xilana de bétula solúvel (■) e insolúvel (◆) catalisada por Xyl T1.

Embora o método de DNS mostre maior liberação de açúcares totais com 12 horas de hidrólise, a análise por HPLC detectou maior quantidade de xilooligossacarídeos com seis horas de hidrólise (figura 6.3). Como já discutido anteriormente no capítulo V, como no HPLC só foram detectados xilooligossacarídeos contendo seis ou menos unidades de D-xilose, é possível inferir que os produtos com maior grau de polimerização não puderam ser identificados, assim como açúcares redutores contendo outro resíduo que não D-xilose. Entretanto, fica claro que nos tempos de hidrólise de 12, 18 e 24 horas há detecção de xilooligossacarídeos em maiores tempos de retenção que não puderam ser identificados pela ausência de padrões (figuras 6.4 e 6.5). Com a metodologia do DNS, a partir de 12 horas de hidrólise nota-se uma redução na liberação de açúcares redutores o que sugere um envolvimento de Xyl T1 em reações de transglicosilação. Os xilooligossacarídeos detectados com alta intensidade em maiores tempos de retenção (figura 6.4 – B, C, D e figura 6.5 – B, C, D) corroboram com esta hipótese, entretanto, é necessário um teste específico para reação de transglicosilação para confirmar a hipótese de que Xyl T1 promova catálise a partir de determinado tempo de incubação.

A análise do hidrolisado de xilana solúvel mostrou que há liberação de cinco dos seis tipos de xilooligossacarídeos estudados (X2, X3, X4, X5, X6), sugerindo que a enzima catalise a clivagem aleatória no interior da cadeia da xilana, sendo consistente com o mecanismo de ação de uma endo-xilanase. O mecanismo de ação de Xyl T1 como endo-xilanase já foi discutido no capítulo V desta tese, para a hidrólise de polpas de celulose. Um mecanismo similar foi descrito para a ação de β -xilanases XynA e XynB purificadas de *P. capsulatum* sobre vários tipos de xilanas (Filho, Puls *et al.*, 1993), XynC também purificada de *P. capsulatum* (Ryan, Nolan *et al.*, 2003), xylanase

II, purificada de *A. fumigatus* (Silva, Puls *et al.*, 1999), XynI purificada de *A. nainiana* (Ximenes, Sousa *et al.*, 1999) e Xyl O1 purificada de *A. oryzae* (Duarte, Moreira *et al.*, 2012).

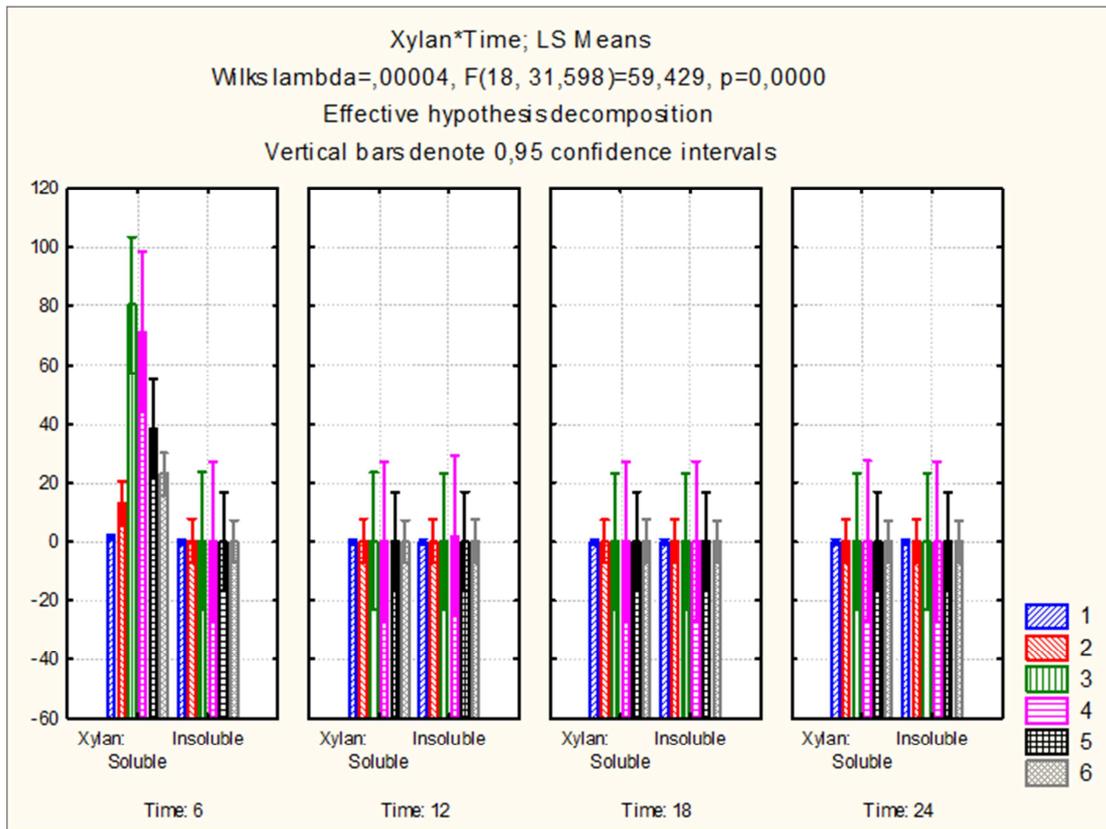


Figura 6.3. Liberação de xilooligosacarídeos durante a hidrólise da xilana solúvel e insolúvel por Xyl T1 em função do tempo. Xilose (■), xilobiose (■), xilotriose (■), xilotetraose (■), xilopentaose (■) e xilohexaose (■).

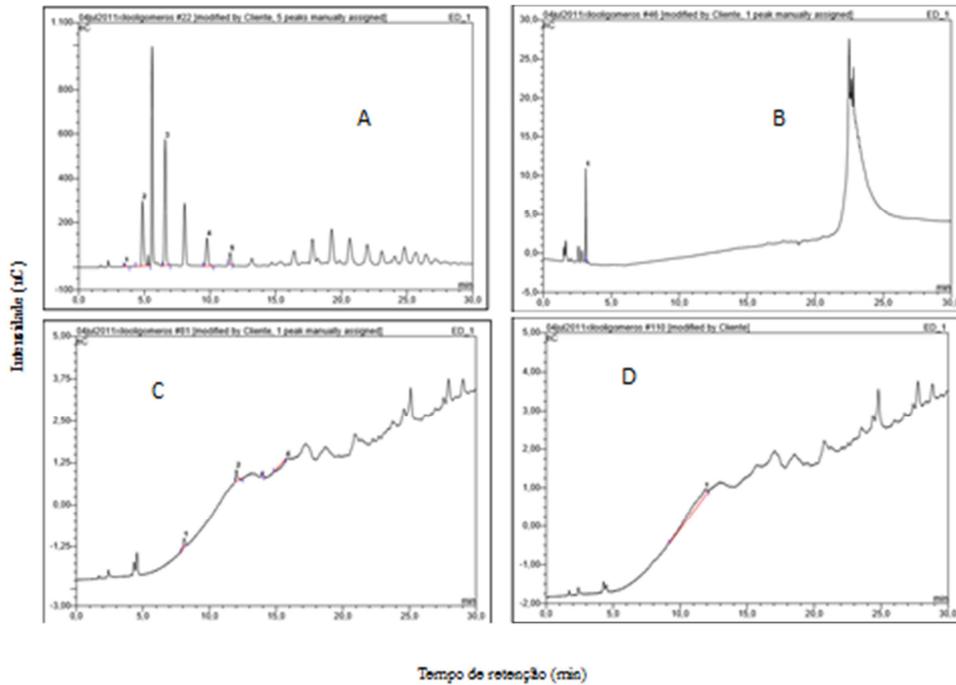


Figura 6.4. Detecções por HPLC dos produtos formados pela hidrólise da xilana de bétula solúvel por Xyl T1, com seis horas de incubação (A) 12 horas (B), 18 horas (C) e 24 horas (D). Xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentaose (X5) e xilohexaose (X6).

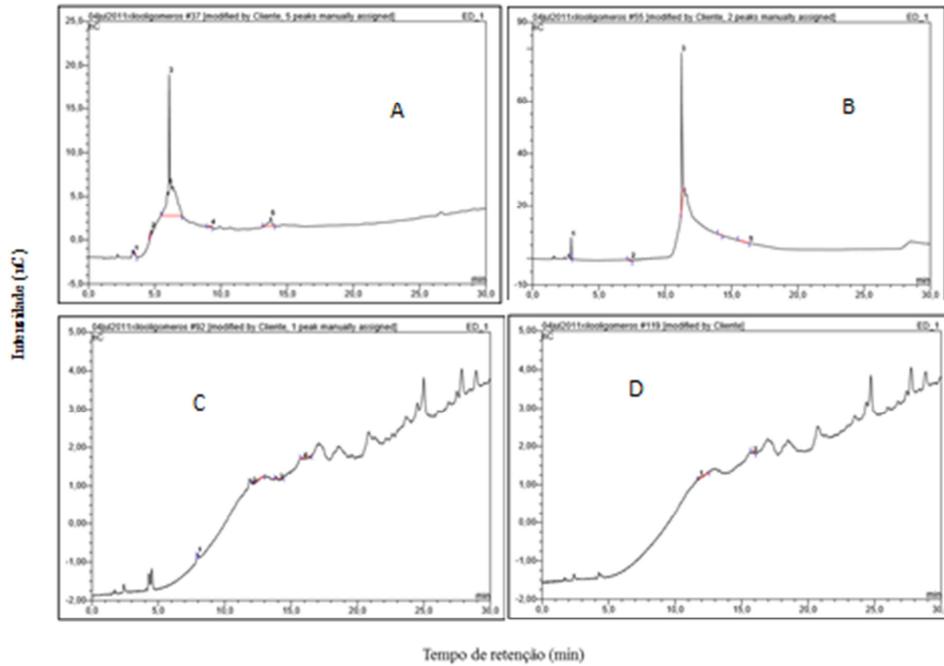


Figura 6.5. Detecções por HPLC dos produtos formados pela hidrólise da xilana de bétula insolúvel por Xyl T1, com seis horas de incubação (A) 12 horas (B), 18 horas (C) e 24 horas (D). Xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentaose (X5) e xilohexaose (X6).

4.3. Hidrólise do bagaço de cana de açúcar

Os três tipos de bagaço de cana de açúcar foram hidrolisados por Xyl T1 e pelo extrato bruto obtido a partir do cultivo do fungo em bagaço de cana de açúcar. As duas metodologias adotadas para o pré-tratamento do bagaço de cana mostraram-se eficazes na redução da recalcitrância desse substrato, visto que a quantidade de açúcares redutores liberados nos substratos pré-tratados é maior que no substrato não tratado (figura 6.6).

De forma geral, a hidrólise feita com o extrato bruto teve maior liberação de açúcares que a hidrólise com Xyl T1 para todos os tipos de bagaço analisados. Como o extrato bruto é composto por várias enzimas, estas devem ter uma ação sinérgica sobre o bagaço de cana. Uma ampla variedade de enzimas é necessária para a degradação da porção de holocelulose, dentro deste grupo de enzimas, xilanases, mananases, poligalacturonases, endo- e exo-glucanases têm papéis importantes na hidrólise de holocelulose (Andreas, Filho *et al.*, 2008; Kumar, Singh *et al.*, 2008; Siqueira, Siqueira *et al.*, 2010; Moreira, Ferreira *et al.*, 2012). Esses resultados estão de acordo com estudos prévios, onde foi observada uma grande quantidade de enzimas holocelulolíticas produzidas por *A. terreus* (Moreira, Ferreira *et al.*, 2012).

Com ambas as amostras enzimáticas, a maior liberação de açúcares redutores foi observada na amostra de bagaço de cana explodido a vapor. É possível que o pré-tratamento tenha aumentado a exposição destas fibras de hemicelulose facilitando a ação hidrolítica das enzimas. Ainda com relação ao bagaço de cana explodido a vapor, nota-se uma tendência de queda na liberação de açúcares redutores após 24 horas de hidrólise, possivelmente por ação inibitória de produtos liberados na hidrólise. Sabe que produtos de hidrólise como furfural, 5-hidroximetil furfural (HMF) e derivados da lignina liberados durante a hidrólise de substratos complexos como o bagaço de cana de açúcar inibem a ação de holocelulases (Takagi, 1984; Palmqvist, Hahn-Hägerdal *et al.*, 1996; Gruno, Våljamäe *et al.*, 2004; Xiao, Zhang *et al.*, 2004; Hu e Ragauskas, 2012).

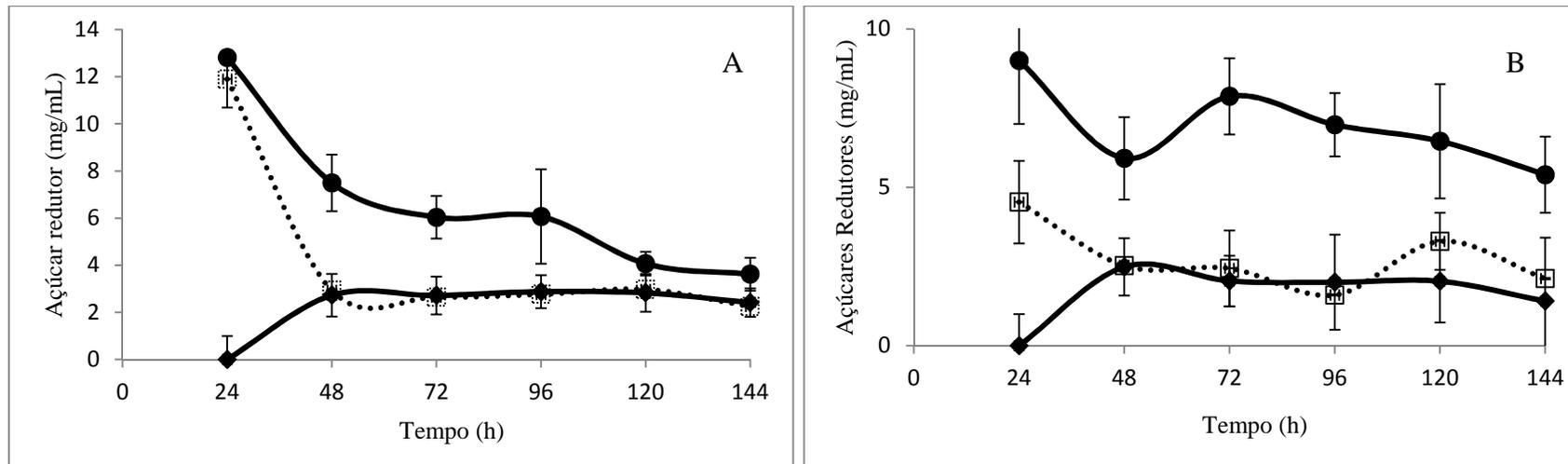


Figura 6.6. Hidrólise do bagaço de cana não tratado (◆), hidrolisado com ácido sulfúrico (□) e explodido a vapor (●) com o extrato bruto (A) e Xyl T1 (B).

5. Conclusões

- Xyl T1 hidrolisa preferencialmente a fração solúvel da xilana de bétula, sugerindo um mecanismo de ação do tipo endo;
- O bagaço de cana explodido a vapor foi o substrato mais suscetível à hidrólise catalisada por Xyl T1 e pelo extrato bruto de *A. terreus*;
- As duas metodologias adotadas de pré-tratamento do bagaço de cana mostraram-se eficazes na diminuição da recalcitrância do bagaço de cana, evidenciado pelo aumento da liberação de açúcares redutores nas duas amostras pré-tratadas em relação a não tratada.

6. Perspectivas

- Aplicar as enzimas purificadas Xyl T2, Xyl T3 e Xyl T4 na hidrólise da xilana de bétula e do bagaço de cana
- Analisar os produtos de hidrólise das três amostras de bagaço de cana de açúcar por HPLC.

7. Bibliografia

ANDREAUS, J.; FILHO, E. X. F.; BON, E. P. D. S. Biotechnology of Holocellulose-Degrading Enzymes. In: HOU, C. T. e SHAW, J. (Ed.). **Biocatalysis and Bioenergy**: John Wiley & Sons, Inc., 2008. p.195-229.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.

BHATIA, L.; JOHRI, S.; AHMAD, R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 1-19, 2012.

BROOKS, A. Ethanol production potential of local yeast strains isolated from ripe banana peels. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 20, 2008.

CARDONA, C. A.; SANCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, 2007.

CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S.; CARVALHO, W.; SINGH, O. V. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 11-20, 2012.

COUGHLAN, M. P. Towards an understanding of the mechanism of action of main chain cleaving xylanases. In: VISSER, J.; BELDMAN, J. G., *et al* (Ed.). **Xylan and Xylanases**. Amsterdam: Elsevier, 1992. p.111-139.

DUARTE, G.; MOREIRA, L.; GÓMEZ-MENDOZA, D.; SIQUEIRA, F. G. D.; BATISTA, L.; AMARAL, L.; RICART, C.; FILHO, E. Use of Residual Biomass from the Textile Industry as Carbon Source for Production of a Low-Molecular-Weight Xylanase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 754-772, 2012.

FILHO, E. F.; PULS, J.; COUGHLAN, M. Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 171-180, 1993.

GOLDEMBERG, J. The Role of Biomass in the World's Energy System. In: BUCKERIDGE, M. S. e GOLDMAN, G. H. (Ed.). **Routes to Cellulosic Ethanol**: Springer New York, 2011. cap. 1, p.3-14.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Quim Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GRUNO, M.; VÄLJAMÄE, P.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 5, p. 503-511, 2004.

HU, F.; RAGAUSKAS, A. Pretreatment and lignocellulosic chemistry. **BioEnergy Research**, v. 5, n. 4, p. 1043-1066, 2012.

HUANG, W. D.; ZHANG, Y. H. Energy efficiency analysis: biomass-to-wheel efficiency related with biofuels production, fuel distribution, and powertrain systems. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22113, 2011.

KAWAKUBO, T.; KARITA, S.; ARAKI, Y.; WATANABE, S.; OYADOMARI, M.; TAKADA, R.; TANAKA, F.; ABE, K.; WATANABE, T.; HONDA, Y.; WATANABE,

T. Analysis of exposed cellulose surfaces in pretreated wood biomass using carbohydrate-binding module (CBM)–cyan fluorescent protein (CFP). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, n. 3, p. 499-508, 2010.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.

MOREIRA, L. R. S.; FERREIRA, G. V.; SANTOS, S. S. T.; RIBEIRO, A. P. S.; SIQUEIRA, F. G.; FERREIRA FILHO, E. X. The hydrolysis of agro-industrial residues by holocellulose-degrading enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 498-505, 2012.

MOREIRA, L. R. S.; MILANEZI, N. V. G.; FILHO, E. X. F. Enzymology of Plant Cell Wall Breakdown: An Update. In: BUCKERIDGE, M. S. e GOLDMAN, G. H. (Ed.). **Routes to Cellulosic Ethanol**: Springer New York, 2011. cap. 6, p.73-96.

NEVES, M. A.; KIMURA, T.; SHIMIZU, N.; NAKAJIMA, M. State of the Art and Future Trends of Bioethanol Production **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2007.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; ZACCHI, G. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 6, p. 470-476, 1996.

ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T.; ARAUJO, G. T.; CURVELO, A. A. S. **A fast and accurate method for determining the cellulose and polyoses through HPLC. V Brazilian Symposium Proceedings on the Chemistry of Lignin and Other Wood Components**. Curitiba. 5: 113-115 p. 1997.

RYAN, S. E.; NOLAN, K.; THOMPSON, R. N.; GUBITZ, G. M.; SAVAGE, A. V.; TUOHY, M. G. Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p. 775-785, 2003.

SANTOS, W.; GÓMEZ, E.; BUCKERIDGE, M. Bioenergy and the Sustainable Revolution. In: BUCKERIDGE, M. S. e GOLDMAN, G. H. (Ed.). **Routes to Cellulosic Ethanol**: Springer New York, 2011. cap. 2, p.15-26.

SILVA, C. H. C. E.; PULS, J.; SOUSA, M. V. D.; FERREIRA FILHO, E. X. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus Fresenius*. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 114-119, 1999.

SIQUEIRA, F.; SIQUEIRA, A.; SIQUEIRA, E.; CARVALHO, M.; PERETTI, B.; JARAMILLO, P.; TEIXEIRA, R.; DIAS, E.; FELIX, C.; FILHO, E. Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues. **Biodegradation**, v. 21, n. 5, p. 815-824, 2010.

TAKAGI, M. Inhibition of cellulase by fermentation products. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 12, p. 1506-1507, 1984.

XIAO, Z.; ZHANG, X.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, p. 1115-26, 2004.

XIMENES, F. A.; SOUSA, M. V.; PULS, J.; DA SILVA, F. G., JR.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a low-molecular-weight xylanase produced by *Acrophialophora nainiana*. **Current Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 18-21, 1999.

Capítulo VII

Hidrólise de resíduos agroindustriais por enzimas de degradação de holocelulose

Artigo publicado na revista Brazilian Journal of Microbiology (2012)

ISSN 1517-8382

Resumo

A hidrólise completa da holocelulase de resíduos agroindustriais necessita de enzimas com especificidades diferentes que clivem tanto a cadeia principal como as cadeias laterais. Combinações de extratos brutos de diferentes espécies de fungos filamentosos, incluindo *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma longibrachiatum* foram utilizadas na hidrólise de bagaço de cana de açúcar, engaço de bananeira e piolho de algodão sujo. *A. terreus* e *A. oryzae* produziram as maiores taxas de FPase e xilanase. A combinação de 50% entre os extratos brutos de *A. terreus* e *A. oryzae* demonstrou a maior taxa de hidrólise do piolho de algodão sujo e do engaço de bananeira. Na hidrólise do bagaço de cana de açúcar, a maior liberação de açúcares redutores foi obtida com amostra de extrato bruto de *A. terreus*.

Palavras chave: Resíduos agrícolas, misturas enzimáticas, hidrólise

THE HYDROLYSIS OF AGRO-INDUSTRIAL RESIDUES BY HOLOCELLULOSE-DEGRADING ENZYMES

Leonora Rios de Souza Moreira*, Gaspar Virgílio Ferreira, Sheila Sousa Thurler Santos, Ana Paula Souza Ribeiro, Félix Gonçalves Siqueira, Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

Submitted: March 31, 2011; Approved: January 16, 2012.

ABSTRACT

Holocellulose structures from agro-industrial residues rely on main and side chain attacking enzymes with different specificities for complete hydrolysis. Combinations of crude enzymatic extracts from different fungal species, including *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* and *Trichoderma longibrachiatum*, were applied to sugar cane bagasse, banana stem and dirty cotton residue to investigate the hydrolysis of holocellulose structures. *A. terreus* and *A. oryzae* were the best producers of FPase and xylanase activities. A combination of *A. terreus* and *A. oryzae* extracts in a 50% proportion provided optimal hydrolysis of dirty cotton residue and banana stem. For the hydrolysis of sugar cane bagasse, the best results were obtained with samples only containing *A. terreus* crude extract.

Key words: agricultural waste, enzymatic mixtures, hydrolysis.

INTRODUCTION

Agro-industrial residues are available for exploitation as sources of fuel, food and chemical feedstocks (12). Agro-industrial residues consist basically of lignocellulosic material containing mainly cellulose (40-50%), hemicellulose (30-40%), lignin (8-10%) and a lower percentage of pectin. (3,15). The use of agro-industrial residues as raw materials decreases the impact on the environment because it reuses these sub-products, reducing their accumulation in the environment and adding economic value to the waste. The production of ethanol from agro-industrial residues is a good alternative for improving energy availability. In recent years, there has been an increasing trend towards more efficient utilization of agro-industrial residues for different applications, including biofuel

production (12). In addition, these agro-industrial residues can be used as a carbon source for the production of enzymes, especially holocellulases, by filamentous fungi. A broad range of hydrolytic enzymes are necessary for the degradation of the carbohydrate portion of lignocellulose (holocellulose) (1, 8, 14). Within this group of enzymes, xylanase, mannanase, polygalacturonase, endoglucanase and exoglucanase have important roles in the hydrolysis of holocellulose (10, 13).

The procedures to optimize the production of fungal holocellulases require only an inexpensive carbon source (13). Here, we investigate the potential use of dirty cotton residue (DCR), sugar cane bagasse (SCB) and banana stem residues (BS) as an inexpensive source of carbon. DCR is the fraction collected from the cotton spinning and yarn forming textile industries that is composed of very short fibers, husks and

*Corresponding Author. Mailing address: Laboratory of Enzymology, Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, DF, CEP 70910 900, Brazil.; E-mail: leonora@unb.br

other dark matter. BS, the grain stalk that supports the banana fruit, is normally discarded from the “packing houses” or delivering centers after harvesting the fruit because it is considered waste due to the great volume generated (10). SCB is the largest Brazilian agro-industrial waste, amounting to approximately 217-380 x 10⁶ tons per year (5, 6). The bagasse piles have low economic value and represent an environmental problem due to the risk of spontaneous combustion. This study will investigate the quantity of reducing sugars liberated in the hydrolysis of SCB, DCR and BS using different combinations of enzymatic extracts from filamentous fungi.

MATERIALS AND METHODS

Organisms and enzyme production

The fungi (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Emmericella nidulans*, *Monilia* sp., *Penicillium corylophilum* and *Trichoderma longibrachiatum*) were obtained from the fungus culture collection of the Enzymology Laboratory, University of Brasília, Brazil, and maintained in PDA medium (2.0% potato broth, 2.0% dextrose and 2.0% agar). An aliquot (2.5 mL) of a spore suspension (10⁸ spores/mL) was inoculated in Erlenmeyer flasks containing 500 mL of liquid medium (0.7% KH₂PO₄, 0.2% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.01% (NH₄)₂SO₄, and 0.06% yeast extract) at pH 7.0 with 1.0% (w/v) sugar cane bagasse or dirty cotton residue as the carbon source. Fungi were grown for eight days at 28°C under agitation at 100 rpm. The resulting supernatants, hereafter called crude extracts, were used for the determination of holocellulose-degrading enzyme activities and extracellular protein concentrations.

Substrates

Xylan preparation was carried out as described elsewhere (12). The filter paper activity (FPase) assay was carried out with a strip of paper of 1 x 6 cm, Whatman number 1.

Residue Pretreatment

SCB, BS and DCR were thoroughly washed with tap

water and autoclaved at 121°C for 2 h. After autoclaving, they were dried at 65°C for 48 h and ground to form a homogeneous blend. A fine powder was obtained and used as a substrate for enzymatic hydrolysis experiments.

Enzyme assays

Xylanase activity was determined by mixing 50 µL of enzyme sample with 100 µL of 1% w/v substrate (oat spelt xylan) at 50°C for 30 min. FPase activity (9) was determined using 150 µL of enzyme with filter paper (Whatman N°1) as a substrate at 50°C for 1 h. The amount of reducing sugar released was measured using acid 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) (10). Activity was expressed as µmol reducing sugar formed per min per liter of enzyme solution, or IU/L. Glucose and xylose were used as standards. Protein concentration was measured by Bradford assay (2) using bovine serum albumin as the standard. Glucose content was measured by the glucose oxidase method (16).

Hydrolysis Assays

The degradation of agro-industrial residues by holocellulose-degrading enzyme crude extracts was determined by quantifying the reducing sugars that were released during the BS, SCB and DCR residue breakdown. The degradation of agro-industrial residues was determined by incubating different proportions (30% – 70%, 50% – 50% and 70% – 30%) of crude enzyme extracts named combinations A, B and C, respectively (comb A, B and C). The crude extracts from *A. terreus*, *A. oryzae* and *A. niger* were obtained from growth cultures containing SCB, while the crude extract from *T. longibrachiatum* was from a growth culture containing DCR. Hydrolysis of SCB, DCR and BS was performed as follows: 10 mL of sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.0) was added to 0.5 g of pretreated substrate in 125 mL Erlenmeyer flasks. The mixture was then autoclaved at 121°C for 1 h, and the contents of the flasks were incubated with 10 mL of enzyme solutions for 168 h at 50°C and 120 rpm. At various time points, aliquots (2 mL) were withdrawn to quantify reducing sugars released

and glucose concentration. All experiments were performed in triplicate, and the data are reported as the average of those experiments, with the standard deviations indicated.

Statistical Analysis

The effect of different mixtures were statistically tested the program PAST (Paleontological Statistics) (4), available in <http://folk.uio.no/ohammer/past/>. Data were submitted to normality test Shapiro-Wilk e than, One Way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's Parwise Comparisons, with significance $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, fungi were grown in liquid cultures supplemented with SCB or DCR. Crude extracts from *A. niger*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *E. nidulans*, *Monilia* sp., *P. corylophilum* and *T. longibrachiatum* were prepared to investigate their ability to degrade lignocellulosic substrates. Previous research (13) has shown that SCB, DCR and BS represent a rich source of lignocellulose. Bromatological analysis revealed that DCR was found to be particularly rich in cellulose, followed by BS and SCB. The highest hemicellulose contents were present in

BS and SCB. The lowest level of lignin was detected in SCB, while BS contained the highest lignin content. All crude extracts were screened for the production of holocellulose-degrading enzyme activities (β -xylanase, β -mannanase, pectinase, β -glucosidase, avicelase, FPase and CMCase). Although fungal growth was abundant on both carbon sources, there were differences in the production of holocellulose-degrading enzyme activities (data not shown). Compared to the other fungi, *A. terreus* and *A. oryzae* were responsible for the greatest production of holocellulose-degrading enzymes (13).

Combinations of two crude extract samples (286 mixtures) were tested for xylanase and FPase activities and selected for hydrolysis experiments. Combination B of *A. terreus* crude extract grown on SCB and DCR exhibited the highest yield of FPase activity, followed by combination B of *A. terreus* and *Monilia* sp. (Table 1). The best yield of FPase activity was obtained from *A. terreus* crude extract grown on SCB, which also has low protein content, while combination B of the *A. niger* and *E. nidulans* crude extracts was the most active, with a 25% increase in xylanolytic activity (Table 2). Combination B of *A. niger* and *E. nidulans* showed the highest protein content.

Table 1. Crude extract combinations with higher FPase activity and correspondent protein quantification.

Combinations	FPase activity (IU/mL)	± SD	Protein Concentration µg/mL
At ¹	0.507	0.001	5.50
At ¹ /At ² (Comb. B)	0.371	0.005	27.79
At ¹ /Mo ¹ (Comb. B)	0.322	0.020	24.56
Ao ¹ /Ti ¹ (Comb. A)	0.318	0.004	35.22
Ao ¹ /Ti ¹ (Comb. B)	0.312	0.015	46.05
At ¹ /At ² (Comb. A)	0.294	0.010	33.60
At ¹ /Af ¹ (Comb. A)	0,284	0.011	53.73
Ao ¹ /Af ¹ (Comb. A)	0.284	0.011	50.60
Ao ¹ /Ao ² (Comb. A)	0.278	0.007	63.24
Ao ¹ /Mo ² (Comb. A)	0.275	0.015	20.24

¹- Crude extracts from the growth on sugar cane bagasse, ²- Crude extracts from the growth on dirty cotton residue. At: *A. terreus*; Mo: *Monilia* sp.; Ao: *A. oryzae*; Ti: *T. longibrachiatum*; Af: *A. flavus*.

Table 2. Crude extract combinations with higher xylanase activity and correspondent protein quantification.

Combinations	Xylanase activity (IU/mL)	± SD	Protein Concentration (µg/mL)
An ¹ /En ² (Comb. B)	0.978	0.013	94.16
Af ¹ /Mo ¹ (Comb. B)	0.778	0.015	74.03
An ¹ /En ² (Comb. A)	0.756	0.010	42.87
Af ¹ /Mo ¹ (Comb. C)	0.736	0.012	58.09
Af ² /En ¹ (Comb. C)	0.733	0.015	55.11
Ao ¹ /An ¹ (Comb. A)	0.720	0.011	51.69
Af ² /An ¹ (Comb. B)	0.716	0.020	90.47
Af ² /An ¹ (Comb. C)	0.703	0.013	86.13
Ao ² /An ¹ (Comb. B)	0.702	0.008	76.35
An ¹ /En ¹ (Comb. C)	0.696	0.012	60.83

¹. Crude extracts from the growth on sugar cane bagasse, ². Crude extracts from the growth on dirty cotton residue.
 An: *A. niger*; En: *E. nidulans*; Af: *A. flavus*; Mo: *Monilia* sp.; Ao: *A. oryzae*

The release of reducing sugars from pretreated SCB, BS and DCR by crude enzyme samples was measured by DNS and glucose oxidase assays (Figs. 1-6). Figures 1 and 2 indicate that the highest amount of reducing sugars released from DCR occurred after an incubation of 72 h with the crude extract combination B of *A. terreus* and *A. oryzae*, followed by the crude extract combination A. In addition, the highest release of reducing sugars after 96 h of incubation was observed with *T. longibrachiatum*. The glucose concentration decreased significantly after 72 and 96 h of incubation in comparison to the results shown in Figure 1 (Fig. 2). The release of reducing sugars from SCB increased steadily with the highest concentration detected after 168 h of incubation (Figs. 3 and 4). It is noteworthy that the release of reducing sugars continued to increase even after 168 h of incubation (Figs. 3 and 4). The best results for reducing sugar release were achieved with *A. terreus* crude extract alone or in combination A (Fig. 3). The maximal glucose release was detected in mixtures containing *A. terreus* crude extract alone and in combination C. A similar pattern was observed when BS was used as the substrate (Figs. 5 and 6).

Shapiro-Wilk test demonstrated that all data have normal distribution. ANOVA and Tukey's Pairwise comparisons showed that P values are less than 5% (P<0.05) in almost all the times and substrates used, demonstrating that mixtures have statistical differences among them.

A number of fungi species were found to secrete a group of enzyme activities able to breakdown holocellulose when grown on DCR and SCB. It appears that the activity yield of holocellulose-degrading enzymes is influenced by the agro-industrial residue used as the carbon source. These materials have complex structures composed of different polymers and components that interact with one another in ways that are not fully understood. The biological conversion of these structures requires a consortium of enzymes that interacts synergistically to release products, such as monomers and oligomers, that might serve as fuel precursors and other chemicals. Some isolates, notably *A. terreus*, produced a significant amount of holocellulose-degrading enzymes. Thus, the mechanism of enzymatic hydrolysis of holocellulose is an important factor to be considered for improving the enzymatic conversion in bioprocesses based on lignocelluloses. Furthermore, the phenomenon of enzyme adsorption should be taken into account when agro-industrial residues are used as substrates.

The mechanism of holocellulose-degrading enzyme adsorption has to do with the presence of highly ordered structures that represent the rate-limiting step in the conversion of holocellulose to soluble products (17). Thus, there appears to be a strong correlation between holocellulose accessibility and the degree of enzyme adsorption. This might contribute to the conversion rates and yields of lignocellulosic structures in plant cell walls (7).

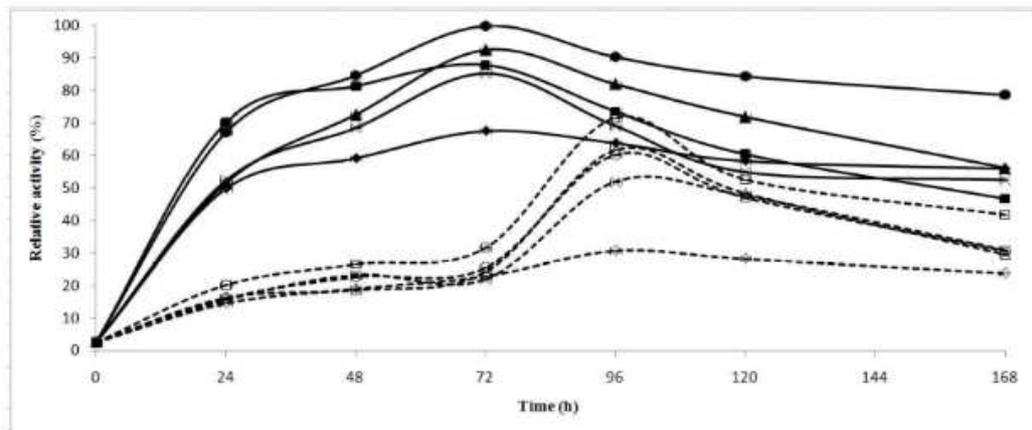


Figure 1. The production of reducing sugars by enzymatic hydrolysis of dirty cotton residue measured by DNS. *A. terreus* crude extract (■), *A. oryzae* crude extract (▲), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. A) (◆), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. B) (●), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. C) (◐), *T. longibrachiatum* (□), *A. niger* (◑), *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. A) (◒), *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. B) (◓), and *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. C) (◔).

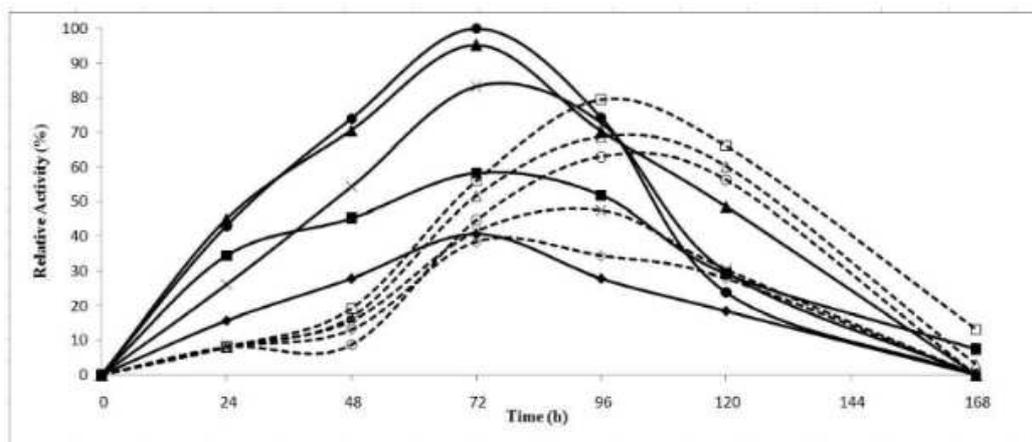


Figure 2. The production of reducing sugars by enzymatic hydrolysis of dirty cotton residue measured by the glucose oxidase method. *A. terreus* crude extract (■), *A. oryzae* crude extract (▲), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. A) (◆), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. B) (●), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. C) (◐), *T. longibrachiatum* (□), *A. niger* (◑), *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. A) (◒), *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. B) (◓), and *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. C) (◔).

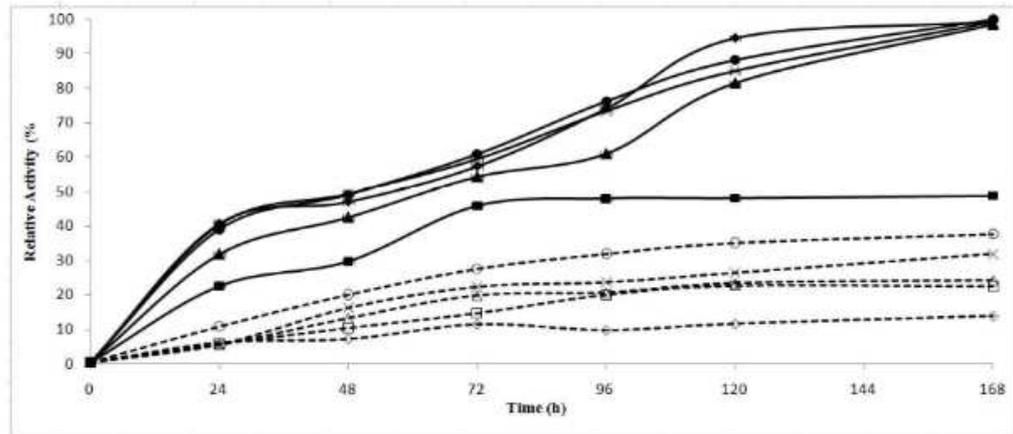


Figure 3. The production of reducing sugars by enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse measured by DNS. *A. terreus* crude extract (■), *A. oryzae* crude extract (▲), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. A) (◆), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. B) (●), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. C) (◄), *T. longibrachiatum* (□), *A. niger* (◄◄), *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. A) (◄◄◄), *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. B) (◄◄◄◄), and *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. C) (***).

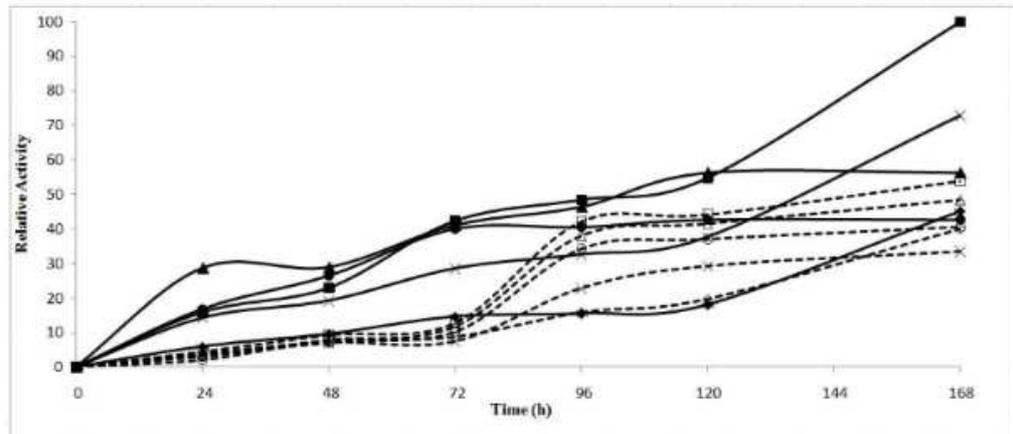


Figure 4. The production of reducing sugars by enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse measured by the glucose oxidase method. *A. terreus* crude extract (■), *A. oryzae* crude extract (▲), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. A) (◆), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. B) (●), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. C) (◄), *T. longibrachiatum* (□), *A. niger* (◄◄), *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. A) (◄◄◄), *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. B) (◄◄◄◄), and *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. C) (***).

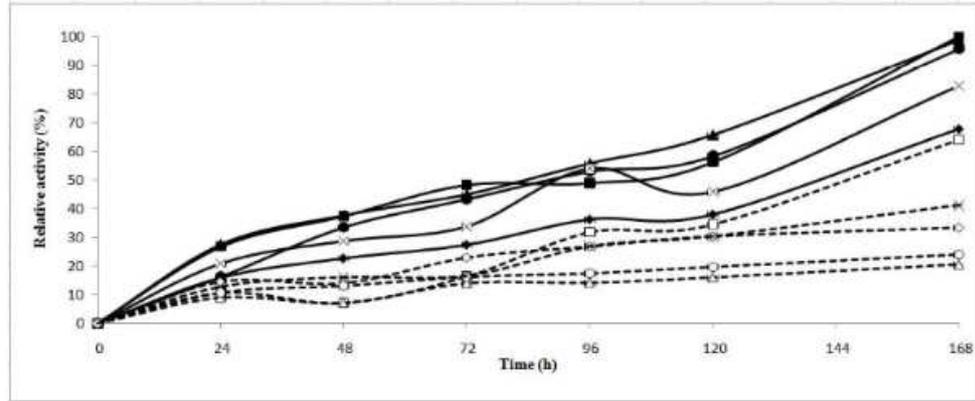


Figure 5. The production of reducing sugars by enzymatic hydrolysis of banana stem by DNS. *A. terreus* crude extract (■), *A. oryzae* crude extract (▲), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. A) (◆), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. B) (●), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. C) (◊), *T. longibrachiatum* (○), *A. niger* (◐), *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. A) (◑), *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. B) (◒), and *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. C) (◓).

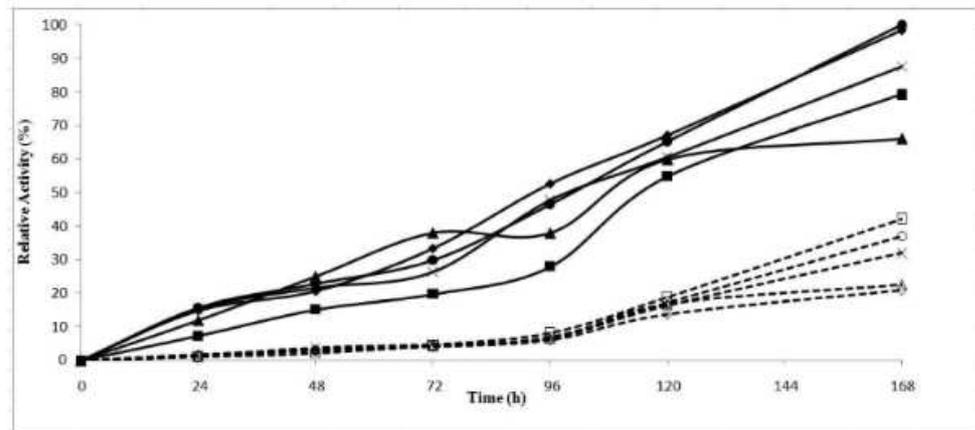


Figure 6. The production of reducing sugars by enzymatic hydrolysis of banana stem measured by the glucose oxidase method. *A. terreus* crude extract (■), *A. oryzae* crude extract (▲), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. A) (◆), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. B) (●), *A. terreus/A. oryzae* (Comb. C) (◊), *T. longibrachiatum* (○), *A. niger* (◐), *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. A) (◑), *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. B) (◒), and *T. longibrachiatum/A. niger* (Comb. C) (◓).

In conclusion, DCR, SCB and BS are inexpensive residues that can be used as substrates to reduce the cost of enzyme production while enzymatically converting the carbohydrate portion of DCR, SCB and BS into fermentable sugars. Further research will be required to study the enzyme mechanisms, particularly the role of xylanases.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Foundation for Research Support of the Federal District (Brazil, research grants numbers 193.000.470/2008 and 193000584/2009). E.X.F.F. and L.R.S.M. acknowledge the receipt of the research fellowship from the Brazilian National Research Council and research post-graduate maintenance scholarship from CAPES, respectively.

REFERENCES

1. Andraus, J.; Filho, E.X.F.; Bon, E.P.S. (2008). Biotechnology of Holocellulose - Degrading Enzymes. In: Hou, C.T.; Shaw, J.R. (eds). *Biocatalysis and Bioenergy*. Copyright, New Jersey, USA, p. 197-229.
2. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
3. Dhillon, A.; Gupta, J.K.; Jauhari, B.M.; Khanna, S. (2000). Production of a thermostable alkalitolerant xylanase from *Bacillus circulans* AB16 grown on wheat straw. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 16 (4), 525-257.
4. Hammer, Ø; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. (2001) Past: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*. [S.I.], 4 (1), 1-9.
5. Kadam, K.L. (2002). Environmental benefits on a life cycle basis of using bagasse-derived ethanol as a gasoline oxygenate in India. *Energy Policy*. 30, 371-384.
6. Khan, M.A.; Ashraf, S.M.; Malhotra, V.P. (2004). Development and characterization of a wood adhesive using bagasse lignin. *Int. J. Adhesion and Adhesives* 24,485-493.
7. Kristensen, J.B.; Felby, C.; Jørgensen, H. (2009.) Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. *Biotechnology for Biofuels* 2, 1-10.
8. Kumar, R.; Singh, S.; Singh, O.V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular properties. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 377-340.
9. Mandels, M.; Andreotti, R.; Roche, C. (1976). Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnol. Bioeng. Sympor.* 16, 21-33.
10. Medeiros, R.G.; Coelho, L.A.; Filho, E.X.F. (2008). Agricultural Residues as Source for Production of Hemicellulases from *Hemicicola grisea* var. *thermoidea*. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*. 2, 30-33.
11. Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31, 426-428.
12. Moreira, L.R.S.; Mattos, I.; Monclaro, A.V.; Santos, S.S.T.; Jensen, A.T.; Siqueira, F.G.; Filho, E.X.F. (2008). The use of lignocellulosic substrates as carbon sources for production of xylan-degrading enzymes from *Aerophilophora nainiana*. *Current Topics in Biochemical*. 10 (2), 35-45.
13. Siqueira, F.G.; Siqueira, A.G.; Siqueira, E.G.; Carvalho, M.A.; Peretti, B.M.P.; Jaramillo, P.M.D.; Sposina, S.S.T.; Dias, E.S.; Felix, C.R.; Filho, E.X.F. (2010). Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues. *Biodegradation*. 21, 815-824.
14. Siqueira, F.G.; Siqueira, E.G.; Jaramillo, P.M.D.; Silveira, M.H.L.; Andraus, J.; Couto, F.A.; Batista, L.R.; Filho, E.X.F. (2010). The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. 64, 20-26.
15. Techapun, C.; Sinsuwongwat, S.; Poosaran, N.; Watanabe, M.; Sasaki, K. (2001). Production of a cellulase-free xylanase from agricultural waste materials by a thermotolerant *Streptomyces* sp. *Biotechnol. Lett.* 23, 1685-1689.
16. Trinder, P. (1969) Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 6, 24-25.
17. Zhang, Y.H.P.; Himmel, M.E.; Mielenz, J.R. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* 24, 452-481.



All the content of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Considerações Finais e Perspectivas

A utilização da biomassa lignocelulósica presente em resíduos agroindustriais como bagaço de cana de açúcar, piolho de algodão sujo e casca de soja, constitui uma alternativa viável para a indução de enzimas holocelulolíticas. Com os resultados descritos ao longo desta tese, notou-se que o fungo filamentosso *Aspergillus terreus*, quando cultivado nestas fontes de carbono, é um potencial produtor de xilanases.

Quatro xilanases de baixas massas moleculares foram purificadas. A análise do hidrolisado de Xyl T1 e Xyl T2 sobre diversos substratos caracterizou o mecanismo de ação destas xilanases como endo. A ausência de atividade de celulase demonstra que essas enzimas tem bom potencial para a utilização no processo de branqueamento de polpa celulose para fabricação de papel. Devem ser avaliadas as vantagens econômicas da utilização das enzimas puras em relação às outras frações enzimáticas, como extratos brutos, frações ultrafiltradas e concentradas.

Compostos fenólicos são liberados durante o processo de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica e descritos como inibidores de hemicelulases e celulases. Tal efeito de inibição contribui para uma menor eficiência nos processos de hidrólise enzimática de lignocelulose, visando a obtenção de etanol de segunda geração. Neste contexto, Xyl T2 e Xyl T4 têm potencial para aplicação no processo de produção de bioetanol uma vez que foram resistentes a uma variedade de compostos fenólicos. A continuidade do estudo da relação entre enzimas e os compostos fenólicos é necessária para a compreensão do mecanismo que leva à resistência destas enzimas aos compostos. Serão realizados estudos da estabilidade conformacional e análises qualitativas e quantitativas das estruturas secundárias α – hélice e folhas β dessas enzimas na presença

e ausência de compostos fenólicos. Pretende-se aprofundar os estudos das interações entre os compostos fenólicos e essas enzimas através de experimentos de dicroísmo circular e fluorescência.

Apêndice - 1

Artigo aceito para publicação

Fungal Genetics and Biology DOI 10.1016/j.fgb.2013.07.006

TWO B-XYLANASES FROM *ASPERGILLUS TERREUS*: CHARACTERIZATION AND INFLUENCE OF PHENOLIC COMPOUNDS ON XYLANASE ACTIVITY

**Leonora Rios de Souza Moreira, Marcela de Carvalho Campos, Pedro Henrique
Vieira Martins de Siqueira, Luciano Paulino Silva, Carlos André Ornelas Ricart,
Pedro Alves Martins, Rayner Myr Lautherjung Queiroz,
Edivaldo Ximenes Ferreira Filho**

ABSTRACT

Sugarcane bagasse was used as an inexpensive alternative carbon source for production of β -xylanases from *Aspergillus terreus*. The induction profile showed that the xylanase activity was detected from the sixth day of cultivation period. Two low molecular weight enzymes, named Xyl T1 and Xyl T2 were purified to apparent homogeneity by ultrafiltration, gel filtration and ion exchange chromatographies and presented molecular masses of 24.3 and 23.60 kDa, as determined by SDS-PAGE, respectively. Xyl T1 showed highest activity at 50 °C and pH 6.0, while Xyl T2 was most active at 45 °C and pH 5.0. Mass spectrometry analysis of trypsin digested Xyl T1 and Xyl T2 showed two different fingerprinting spectra, indicating that they are distinct enzymes. Both enzymes were specific for xylan as substrate. Xyl T1 was inhibited in greater or

lesser degree by phenolic compounds, while Xyl T2 was very resistant to the inhibitory effect of all phenolic compounds tested. The apparent K_m values of Xyl T2, using birchwood xylan as substrate, decreased in the presence of six phenolic compounds. Both enzymes were inhibited by N-bromosuccinimide and Hg^{2+} and activated by Mn^{2+} . Incubation of Xyl T1 and Xyl T2 with L-cysteine increased their half-lives up to 14 and 24 hours at 50 °C, respectively. Atomic force microscopy showed a bimodal size distribution of globular particles for both enzymes, indicating that Xyl T1 is larger than Xyl T2.

Keywords: *Aspergillus terreus*; Phenolic compounds; Atomic force microscopy; β -xylanase purification; Mass spectrometry

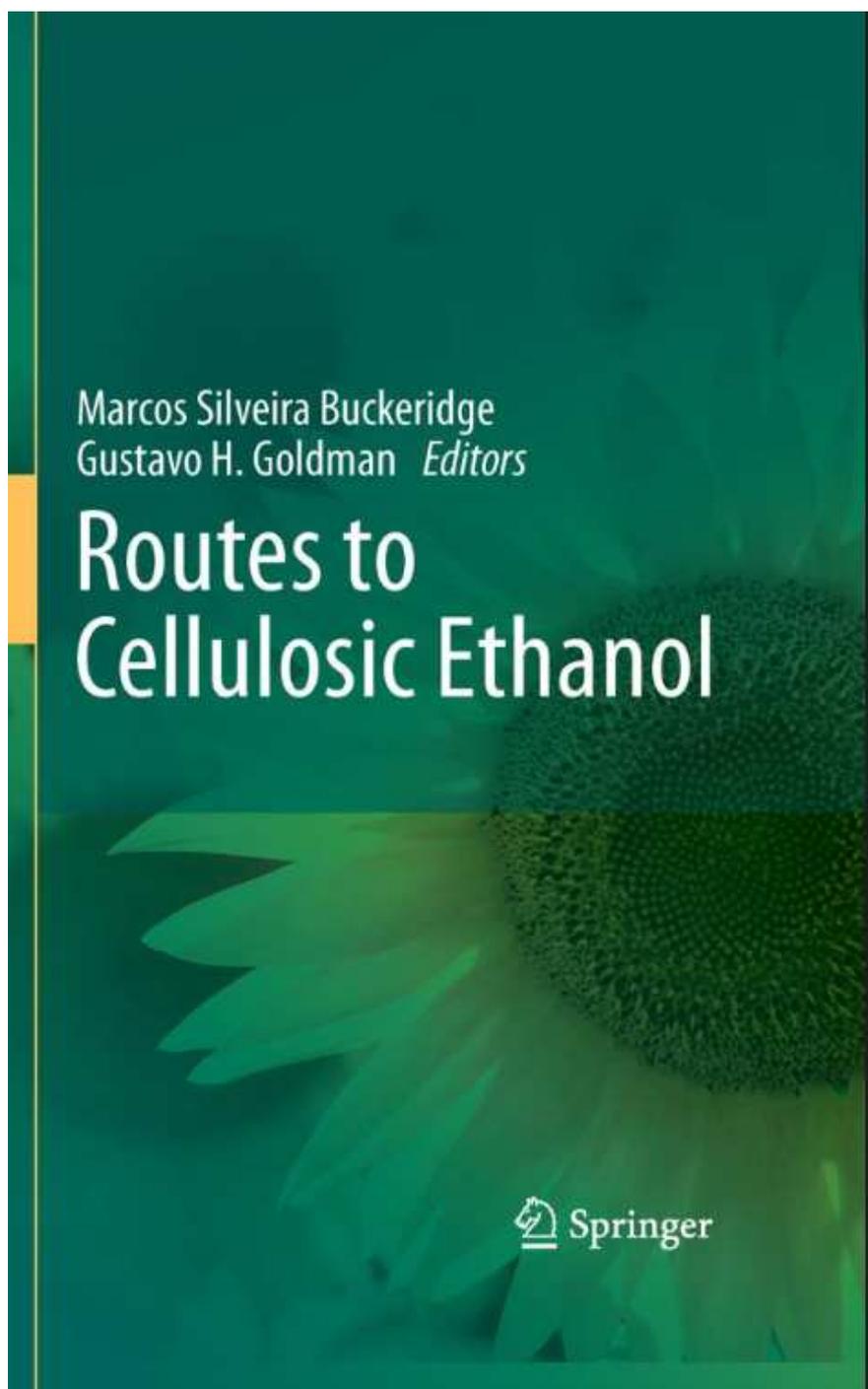
Apêndice 2

Capítulo publicado no livro:

ROUTES TO CELLULOSIC ETHANOL

Chapter 6: Enzymology of Plant Cell Wall Breakdown: An Update

Leonora R. S. Moreira, Natália vG Milanezi and Edivaldo X. F. Filho



Editors Marcos S. Buckeridge Department of Botany Institute of Biosciences University of São Paulo São Paulo, Brazil msbuck@usp.br

Gustavo H. Goldman Universidade de São Paulo Ribeirão Preto, São Paulo Brazil
ggoldman@usp.br

ISBN 978-0-387-92739-8 DOI 10.1007/978-0-387-92740-4 Springer New York
Dordrecht Heidelberg London

© Springer Science+Business Media, LLC 2011 All rights reserved. This work may not be translated or copied in whole or in part without the written permission of the publisher (Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA), except for brief excerpts in connection with reviews or scholarly analysis. Use in connection with any form of information storage and retrieval, electronic adaptation, computer software, or by similar or dissimilar methodology now known or hereafter developed is forbidden. The use in this publication of trade names, trademarks, service marks, and similar terms, even if they are not identified as such, is not to be taken as an expression of opinion as to whether or not they are subject to proprietary rights.

Printed on acid-free paper Springer is part of Springer Science+Business Media
(www.springer.com)

Chapter 6

Enzymology of Plant Cell Wall Breakdown: An Update

Leonora R.S. Moreira, Natália vG. Milanezi, and Edivaldo X.F. Filho

1 Introduction

The continued usage of fossil fuels to support the world economy has significant negative environmental consequences. Thus, there is great interest in utilizing renewable sources to supply our fuel and chemical feedstock needs. The plant cell wall represents half of the organic carbon in the biosphere, being a plentiful renewable substrate and, therefore, a potential candidate to displace a large fraction of products currently derived from fossil fuels (Lee et al. 2008). Its physiological functions during plant life include growth, intercellular communication, defense against pathogen attack, mechanical resistance and interaction with the environment. Even so, there are many organisms in nature that can efficiently degrade the cell wall and use by-products of its degradation for nutrition (Minic and Jouanin 2006).

Lignocellulose, the most abundant biomaterial in nature, is mainly composed by cellulose, hemicelluloses and lignin (Juhász et al. 2005), forming plant cell walls in different proportions. Its predominant polysaccharide is cellulose, followed by hemicellulose, which usually forms hydrogen bonds with the first, as well as with other hemicelluloses, helping in the stabilization of the cell wall matrix and making it water insoluble (Himmel et al. 1999). The study of the enzymes involved in cell wall breakdown has been intense since the early 1950s (Reese 1976; Coughlan 1985; Mandels 1985). The sugars released during the enzyme acting have many applications in different industries.

Hydrolytic enzymes such as cellulases, xylanases, and mannanases contribute to the degradation of the carbohydrate moieties, while oxidative enzymes such as laccases, lignin peroxidase, and manganese peroxidase, in combination with low-molecular-weight mediators, have been shown to be involved in lignin biodegradation (Manfield et al. 1997).

E.X.F. Filho (✉)
Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Enzimologia,
Universidade de Brasília, CEP 70910-900 Brasília, DF, Brazil
e-mail: eximenes@unb.br

M.S. Buckeridge and G.H. Goldman (eds.), *Routes to Cellulosic Ethanol*,
DOI 10.1007/978-0-387-92740-4_6, © Springer Science+Business Media, LLC 2011

73

The plant cell wall complexity and heterogeneity requires a large spectrum of exo- and endo-enzymatic activities (Minic and Jouanin 2006). The degradation of lignocellulosic materials to monomeric sugars has great importance, since fermentable sugars can be used as raw materials in a number of biotechnological production processes, including the ethanol production (Lawford and Rousseau 2003). As matter of fact, two types of enzyme are required to carry out the breaking down of plant cell wall polysaccharides. The exohydrolases are responsible for acting on the terminal glycosidic linkages and liberate terminal monosaccharide units, while endohydrolases cleaves internal glycosidic linkages at random or at specific positions, usually internally (Coughlan 1992). The plant cell wall structure is a good environment to induce substrate promiscuity (Siqueira and Filho 2010). In this case, enzyme systems with high substrate promiscuity act in synergism with enzymes with strict substrate specificity, leading to a more efficiency in the catalytic process. Within this context, enzymes that cut specific sites in the plant cell wall are also important tools for understanding the structure and function of cell wall. Thus, it is clear that one must have a thorough understanding of the enzymatic systems required for the breaking down of each of the components of lignocellulose structure in plant cell wall.

The progress in biotechnology of cellulases and related enzymes attracts worldwide attention. Currently, cellulases, hemicellulases and pectinases are widely used in biofuel, food, brewery and wine, animal feed, textile and laundry, paper and pulp industries as well as in research and development. Some of these applications prefer one or two selected enzymatic components, while others require mixtures of all of them for maximum benefit (Bhat 2000). This chapter aims to overview the main studied enzymes involved in the cell wall degradation. The knowledge of the potential of these enzymes raises the possibility of development of new technologies, including the green ones.

2 Cellulases

Many enzymes are involved in the degradation of the polymers that compose lignocellulose (Ward and Moo-Young 1989). Its predominant polysaccharide is cellulose, which is a crystalline matrix of linear β -(1,4)-D-glucan chains (DGlc) (Himmel et al. 1999).

In the middle of the twentieth century began the discussions about the complexity of the natural cellulolytic enzymes and their different abilities to degrade cellulose. It was speculated that there were three types of enzyme activities involved in hydrolyzing cellulose: C_1 , which would convert crystalline cellulose to amorphous, C_x , which would hydrolyze amorphous cellulose to cellobiose, and β -glucosidase, which would hydrolyze the soluble cellobiose to glucose (Tolan and Foody 1999).

The current opinion about cellulases diversity and action still agrees with the synergistic and coordinate attack of cellulose for a complex of enzymes,

facilitating the degradation of the polymer (Lynd et al. 2002). These enzymes are described in terms of three major classes of cellulases. The endoglucanases (EC 3.2.1.4, EG) act randomly on soluble and insoluble cellulose chains. The exoglucanases, which include cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91, CBHs), act processively to preferentially liberate cellobiose (and glucose in some cases) from the reducing (CBHII) and nonreducing (CBHI) ends of the cellulose chain. The β -glucosidases (EC 3.2.1.21) liberate D-glucose from cellobiose and exoglucosidases (Himmel et al. 1999; Tolan and Foody 1999). Among the studied microorganisms, fungi are most active against natural polymers (Sohail et al. 2009), being capable of producing different amounts of each type of cellulase (Picart et al. 2007), which act synergistically.

Almost all commercial cellulases obtained by submerged fermentation are produced by the fungi *Trichoderma*, *Humicola*, *Aspergillus* and *Penicillium* (Tolan and Foody 1999), and proteins from *Trichoderma* and *Aspergillus* involved in the transcriptional regulation of the genes encoding cellulases and hemicellulases have already been identified (de Vries and Visser 2001; Mach and Zeilinger 2003). The inducer molecules produced during degradation of the lignocellulosic material regulate positively the expression of these enzymes, e.g., cellobiose, D-xylose and L-arabinose (de Vries 2003). However, essential differences between the fungi do exist (Jorgensen et al. 2005). Sophorose, for example, is an effective inducer of cellulase genes and some xylanase genes in *Trichoderma* (Mach and Zeilinger 2003) but this disaccharide does not function as an inducer of an endoglucanase gene in *Penicillium janthinellum*, having no effect on the expression of several cellulolytic genes in *A. niger* (Gielkens et al. 1999). In general, cellulase is inhibited by its end products, cellobiose and glucose. Its action is also inhibited or inactivated by several classes of compounds, including strong oxidants or reducing agents, metal ions, salts, solvents, and surfactants (Tolan and Foody 1999).

Most cellulases are modular enzymes containing two or more discrete modules, described as catalytic and carbohydrate-binding modules (CBMs). They are connected to each other via a linker sequence (Mosier et al. 1999; Arai et al. 2003). Catalytic modules, which are engaged in the hydrolysis of cellulose, are classified in 14 groups in glycoside hydrolase (GH) families on the basis of amino acid sequence similarities (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/cazy/CAZY/index.html>). On the other hand, CBMs, many of which bind preferentially to cellulose, are also classified into 30 families on the basis of amino acid sequence similarities (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/cazy/CAZY/index.html>). It is thought that a CBM in a cellulase molecule enhances the hydrolytic activity of a catalytic domain adjacent to the CBM by increasing the enzyme concentration on the surface of an insoluble substrate or by supplying the catalytic module with a more easily degradable substrate, i.e., amorphous cellulose. Cellulases can provide huge benefits in the utilization of biomass in the long term because of the possible high glucose yields and the opportunity to apply the modern tools of biotechnology to reduce costs (Himmel et al. 1999).

2.1 Cellobiose Dehydrogenase

Cellobiose dehydrogenase (EC 1.1.99.18) is produced extracellularly by a number of wood- and cellulose-degrading fungi when grown on cellulose. It oxidizes the reducing end of cellobiose and cellooligosaccharides to their corresponding 1,5-lactones, which are subsequently hydrolyzed to carboxylic acids in aqueous environments. In addition to the cellooligosaccharides, the presumed natural substrates, CDH oxidizes very few other sugars, the most efficient substrates being β -1,4-linked disaccharides with a β -glucose moiety at their reducing end (Baminger et al. 2001).

CDH is a monomeric enzyme consisting of two prosthetic groups, a heme and a flavin adenine dinucleotide moiety (hemoflavoenzyme). The latter domain is directly involved in both the oxidative and reductive half-reactions and the reduced enzyme is reoxidized by different electron such as cytochrome *c* and Fe^{2+} . These two domains are linked by a protease-sensitive region (Manfield et al. 1997; Baminger et al. 2001).

The in vivo function of CDH is not fully understood. CDH is not an essential component of the lignocellulose-degrading enzyme complex but can enhance both cellulose and lignin degradation. CDH also could have a protective function since it can reduce quinones, one of the major antimicrobial systems used by plants (Baminger et al. 2001).

3 Hemicelluloses

Hemicelluloses are structural polysaccharides of the plant cell wall in close association with cellulose and lignin, forming the lignocellulosic biomass (Moreira and Filho 2008). Hemicelluloses are heterogeneous polymers of pentoses (xylose, arabinose), hexoses (mannose, glucose, galactose), and sugar acids (glucuronic acid). Unlike cellulose, hemicelluloses are not chemically homogeneous. Hardwood hemicelluloses contain mostly xylans, whereas softwood hemicelluloses show a high percent of glucomannans (Saha 2003). Hemicelluloses are classified as arabinoxylan, acetylglucuronoxylan, xylan, xyloglucan, arabinan, arabinogalactan, galactomannan, glucomannan and galactoglucomannan.

The utilization of hemicellulosic sugars is essential for efficient and cost-effective conversion of lignocellulosic material to biofuel (ethanol). In 2002, over two billion gallons of ethanol was produced, mainly by fermenting corn starch (Saha 2003).

Hemicellulases are frequently classified according to their action on distinct substrates. Xylan is the main carbohydrate found in hemicellulose. Its complete degradation requires the cooperative action of a variety of hydrolytic enzymes, such as endo-1,4- β -xylanase and 1,4- β -xylosidase (Pérez et al. 2002). Besides, hemicellulose degradation needs accessory enzymes as xylan esterases, α -L-arabinofuranosidases,

ferulic and *p*-coumaric esterases, and α -4-*O*-methyl glucuronidases acting synergistically to efficiently hydrolyze wood xylans and mannans.

3.1 Xylanases

The structure of xylans found in cell walls of plants can differ greatly depending on their origin, but they always contain a β -1,4-linked D-xylose backbone (de Vries and Visser 2001). Owing to its heterogeneous structure, xylan degradation needs not just one enzyme, but an enzyme complex. Xylanases are produced mainly by microorganisms and take part in the breakdown of plant cell walls, along with other enzymes that also hydrolyze polysaccharides (Polizeli et al. 2005).

Xylan are the major constituent of the hemicelluloses with linear or branched backbone of β -1,4-linked xylopyranose units respectively (Polizeli et al. 2005). β -Xylanases (EC 3.2.1.8) and side-chain enzymes are required for an efficient breaking down of xylan to fermentable sugar or oligosaccharides. Side-chain enzymes remove substituents that are attached at various points on xylan, creating more sites for subsequent enzymatic hydrolysis of xylan. Endo-1,4- β -xylanase (EC 3.2.1.8) is the crucial enzyme for xylan depolymerization, which hydrolyses β -1,4-bonds between D-xylose residues in the main chain generating nonsubstituents or branched xylooligosaccharides. Moreover, α -L-arabinofuranosidase, α -glucuronidase, acetyl (xylan) esterase, ferulic and *p*-coumaric acid esterase have cooperative functions in the complete degradation of xylan (Biely et al. 1997).

Endo-1,4- β -xylanase cleaves the glycosidic bonds in the xylan backbone, bringing about a reduction in the degree of polymerization of the substrate. Initially, the main hydrolysis products are β -D-xylopyranosyl oligomers, but at a later stage, small molecules such as mono-, di- and trisaccharides of β -D-xylopyranosyl may be produced. Acetylxylan esterase (EC 3.1.1.6) removes the *O*-acetyl groups from positions 2 and/or 3 on the β -D-xylopyranosyl residues of acetyl xylan. α -Glucuronidase (EC 3.2.1.131) hydrolyzes the α -1,2 bonds between the glucuronic acid residues and β -D-xylopyranosyl backbone units found in glucuronoxylan (Polizeli et al. 2005)

3.2 Arabinofuranosidases

Lately, much of attention has been given to α -L-arabinofuranosidases (α -L-AFases EC 3.2.1.55). In many plants, xylan backbone is substituted by different side chains with L-arabinose, D-galactose, acetyl, feruloyl, *p*-coumaroyl and glucuronic residues (de Vries and Visser 2001; Adams et al. 2004). There can be differences in the composition and in the frequency of the side chains of xylans of different types of plants (Saha 2000; de Vries and Visser 2001). The α -L-arabinofuranose (α -L-Araf) residues are part of many plant cell wall polysaccharides, including arabinoxylan,

arabinogalactan, and arabinan. In arabinans they are 1,5-linked to the backbone, as well as 1,2- and 1,3-linked as side chains. They are associated with pectic substances in a great variety of sources, e.g., sugar beet and citrus pectins. In arabinogalactans they are found as 1,3- and 1,6-linked side chains (de Wet et al. 2008). Arabinoxylan is the major component of the cell wall of softwoods, as well as grasses and cereals. It consists of a backbone of 1,4-linked β -xylopyranosyl units that have α -L-Araf substituents at the O-2 and O-3 positions (Bacic et al. 1988).

The L-arabinosyl residues distributed as side chains restrict the enzymatic hydrolysis of hemicelluloses and pectins (Saha 2000; Rahman et al. 2003). The α -L-AFases are accessory enzymes that cleave α -L-arabinofuranosidic linkages at the nonreducing ends of arabinose-containing polysaccharides and play an integral role in the biodegradation of hemicellulose (Saha 2000). The action of these enzymes accelerates the hydrolysis of the glycosidic bonds by more than 10^7 fold, making them one of the most efficient catalysts known (Rye and Withers 2000; Shallom et al. 2002). They act synergistically with other hemicellulases and pectic enzymes for the complete hydrolysis of hemicelluloses and pectins (Spagna et al. 1998).

The α -L-AFases exhibit wide substrate specificity for not distinguishing the saccharide link to the arabinofuranosyl moiety (Rahman et al. 2003). They catalyze the hydrolysis of terminal α -L-1,2-, α -L-1,3- and α -L-1,5-arabinofuranosyl residues (Saha and Bothast 1998; Saha 2000), but also residues from pectic, homo and hemicellulosic polysaccharides (branched arabinans, debranched arabinans), heteropolysaccharides (arabinogalactans, arabinoxylans, arabinoxyloglucans, glucuronoarabinoxylans, etc.) and different glycoconjugates (Beldman et al. 1997; Sozzi et al. 2002). Based on primary sequence, α -L-AFases are grouped into GH families 43, 51, 54, and 62, each one with unique substrate specificity (de Wet et al. 2008). The recently described crystal structure of a α -L-AFase (GH 54 family) from *Aspergillus kawachii* (Miyanaga et al. 2004) and whose active site in the catalytic domain similarly accommodates the -1 α -L-Araf in a shallow surface pocket, explains its ability to hydrolyze a variety of sugars, linked from different positions to O-1 of the α -L-Araf.

The action of α -L-AFases alone or in combination with other lignocellulose-degrading enzymes represents a promising biotechnological tool as alternatives to some of the existing chemical technologies such as chlorination in pulp and paper industry, synthesis of oligosaccharides and pretreatment of lignocelluloses for bioethanol production (Numan and Bhosle 2006).

3.3 Feruloyl esterase

Feruloyl esterases or ferulic acid esterases (FAEs, E.C. 3.1.1.73) are members of the carboxylic ester hydrolases subclass of enzymes, which are responsible for cleaving the ester-link between the polysaccharides in the main chain of xylans or pectins, and monomeric or dimeric ferulic acid. These polysaccharides which

complex together with macrocolecular complexes like lignin and cellulose, modulate the plant cell wall material. To date, feruloyl esterases prove to be the key in the enzymatic synthesis of phenolic sugar esters (Vafiadi et al. 2006). Ferulic acid (FA) ester-links arabinose, one of arabinoxylan's side chain types, to lignin (Ralph et al. 1995). Since FAEs hydrolyze the bond between arabinose and FA, they may release the covalently bound lignin from hemicelluloses and aid in the degradation of plant cell walls. Moreover, cross-links through diferulic bridges are found both in heteroxylans and pectin tissues thus playing an important role in the structure of nonlignified cell walls (Saulnier and Thibault 1999).

FAEs occur as single catalytic modules and also as a part of multimodular protein structures. Some enzymes contain cellulose-binding modules (CBM) and some others are part of multimodular complex, such as cellulosomes (Blum et al. 2000). The fusion of a CBM to a catalytic domain improves their catalytic efficiency (reviewed by Vafiadi et al. 2006).

Since the 1990s, more than 30 FAEs have been purified and characterized from a wide range of microorganisms, including bacteria and fungi (Faulds et al. 1995; de Vries et al. 2002). Many enzymes from the genus *Aspergillus*, *Clostridium* and *Penicillium* have been studied (Topakas et al. 2007). The purified FAEs show significant variations in physical characteristics such as molecular weight, isoelectric point and optimum hydrolytic reaction conditions (Topakas et al. 2007).

The nomenclature of FAEs follows both the source of the enzyme and the type of the esterase (Topakas et al. 2007). FAEs are subclassified into four types (A–D) and indicate evolutionary relationship between feruloyl esterases, acetyl xylan esterases and certain lipases. The four functional classes also take into account substrate specificities against synthetic methyl esters of hydroxycinnamic acids, growth substrate requirements of the microorganisms and protein sequence identity (Crépin et al. 2004). Each feruloyl esterase has its own specificity with regard to the release of specific cinnamic acids. Two major enzymes were purified from *Aspergillus niger* and classified as types A and C. The first does not hydrolyze methyl ester of caffeic acid but is able to release diferulic compounds. The second hydrolyzes the four methyl esters of hydroxycinnamic acids generally used as model substrates but not diferulic compounds (Benoit et al. 2006).

It is extremely common for esterases to act on a broad range of substrates. Type A FAE shows preference for the phenolic moiety of the substrate containing methoxy substitutions, especially at meta-position(s), as occur in ferulic and sinapinic acids. Type B FAE shows complementary activity to type A esterases, preferring substrates containing one or two hydroxyl substitutions as found in *p*-coumaric or caffeic acid. In contrast to type B, type A FAE seems to prefer hydrophobic substrates with bulky substituents on the benzene ring (Kroon et al. 1997; Topakas et al. 2005). In any case, the enzyme requires a certain distance between the aromatic ring of substrates and the ester bond for the catalytic activity (Kroon et al. 1997; Vafiadi et al. 2006).

Studies with an inactive mutant of the *A. niger* type A feruloyl esterase (AnFaeA) complexed with a feruloylated trisaccharide demonstrated that tight binding of the

carbohydrate is not required for catalysis (Faulds et al. 2005). Also Type C feruloyl esterase from *Sporotrichum thermophile* (StFaeC) in nonconventional media seems to be able to sterify a broad spectrum of sugars, showing specificity only on the ferulic moiety (Vafiadi et al. 2005).

As phenolic acid sugar esters have presented antitumor activity, they could be applied in the formulation of antimicrobial, antiviral and/or anti-inflammatory agents (Vafiadi et al. 2006). FAEs could also be used in pulp and paper processing and as animal feed additives to facilitate nutrient assimilation. FAEs play a vital role in the delignification and depolymerization of polysaccharide chains as the cross-linking through the FA ester bond substantially increases the recalcitrance of biomass and the resistance to enzymatic hydrolysis. Besides, FA released from plant cell wall by the action of FAEs is an effective natural antioxidant with potential applications in the pharmaceutical and food industries (reviewed by Topakas et al. 2007).

3.4 Coumaroyl Esterase

Lignin plays a critical role in biomass utilization. Lignins are macromolecular complexes composed of three phenylpropanoid monomers, *p*-coumaryl, coniferyl, and sinapyl alcohols coupled through dehydrogenative polymerization via combinatorial radical coupling reactions. In many crops, lignins may be acylated by various acids (Ralph et al. 2004), though the process and function have not been resolved yet. The enzyme responsible for this acylation reaction is *p*-coumaroyl transferase (pCAT).

The anaerobic rumen fungi are known preferentially to colonize and degrade lignified cell walls, which are the least biodegradable walls (Akin et al. 1983). These fungi were found to produce high levels of both *p*-coumaroyl and feruloyl esterase (Borneman et al. 1990). Borneman et al. (1991) proposed that *p*-coumaroyl and feruloyl esterases may provide the anaerobic fungi with an advantage in the degradation of phenolic-containing plant cell walls, providing an ecological niche for the fungi in the rumen.

Studies suggest that ester linkages between phenolic moieties and arabinoxylans prevent the enzymatic hydrolysis and limit utilization by bacteria of otherwise available carbohydrates (Hespell and O'Bryan 1992). Therefore, possession of feruloyl and *p*-coumaroyl esterases, coupled with the penetrative ability given by fungal rhizoids or rhizomicelia, provides a mechanism for the degradation and subsequent utilization of the phenolic ester-linked carbohydrates in plant cell walls (Borneman et al. 1992).

The xylans of gramineaceous cell walls are often highly substituted with arabinosyl residues, many of which are esterified with *p*-coumaroyl and feruloyl groups (Hartley and Ford 1989). There is evidence that these esterified phenolic groups dimerize in vivo either by oxidative coupling, forming dehydrodiferulic acid (Ishii 1991), or by photodimerization in sunlight, forming a series of substituted truxillic and truxinic acid cross-links (Hartley et al. 1990). Evidence also suggests that feruloyl and

p-coumaroyl groups form bonds between the xylan heteropolymer and lignin (Scalbert et al. 1985), possibly limiting cell wall biodegradation (Hartley et al. 1990). Furthermore, the esterification of feruloyl and *p*-coumaroyl groups to arabinoxylans has been shown to limit the release of cell wall pentoses (Hespell and O'Bryan 1992). *p*-Coumaric acid, as a phenolic acid, is an antioxidant which is implicated for the prevention of pathologies, such as colon cancer and cardiovascular diseases (reviewed by Liu et al. 2006).

3.5 Xyloglucanases

The xyloglucan (XG) family of polysaccharides receives considerable attention due to the key structural role these matrix polymers play in the cell walls of higher plants. XGs are major components of the primary wall of all dicots and some monocots where they bridge paracrystalline cellulose microfibrils by surface adsorption and chain intercalation thereby modulating wall mechanical properties and affecting morphology (Baumann et al. 2007). XG acts as the interface between cellulose and other polysaccharides in the primary cell wall and seeds of mono and dicotyledons. They are composed of a backbone of 1,4-linked β -D-glucopyranosyl units with side chains of D-xylosyl residues attached by α -link to O-6 of some of the glucosyl residues (Coughlan et al. 1993).

Enzymes involved in the modification of XG structure are XG specific endoglucanases including XG endo-transglycosylase/hydrolases (XTH, 2.4.1.2070, a XG-active β -D-galactosidase (3.2.1.23), a XG specific α -L-fucosidase (3.2.1.51/3.2.1.63) and a XG oligosaccharide-specific α -D-xylosidase (3.2.1.37) (Minic and Jouanin 2006). XTHs appear to play a major role in plant growth and development because they are probably involved in the construction and restructuring of the plant cell wall (Fry 2003). It cleaves a donor XG to release a smaller XG, with a reducing end in the first step, and then transfers the remainder to the acceptor, an oligosaccharide. Finally, α -D-xylosidase cleaves specifically the α -xylosyl residue attached to the glucose residue of the xyloglucan oligosaccharide (Minic and Jouanin 2006). XTHs in plants are assigned to family 16 of GHs. The structure and organization of the XTH gene family were analyzed in *Arabidopsis* and 33 open reading frames (ORFs) potentially encoding XTH proteins that were divided into three major phylogenetic groups or subfamilies were identified (Rose et al. 2002).

3.6 Mannanases

β -mannanases have been classified within families 5 and 26 of GHs (Henrissat and Bairoch 1993). They are important enzymes for the enzymatic degradation of hemicelluloses from softwood. The mannan-degrading enzymes are composed of β -mannanase (1,4- β -D-mannan mannohydrolase, EC 3.2.178), β -mannosidase

(1,4- β -D-mannopyranoside hydrolase, EC 3.2.1.25), and β -glucosidase (1,4- β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21). Additional enzymes such as acetyl mannan esterase (EC 3.1.1.6) and α -galactosidase (1,6- α -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22) are required to remove side-chain substituents that might be attached at various points on the mannan structure, creating more sites for subsequent enzymic hydrolysis (Filho 1998). β -Mannanase, an endo-type enzyme, is responsible for the cleavage of β -1,4-linked internal linkages of the mannan backbone randomly to produce new chain ends. In nature, endo-1,4- β -mannanase cleaves the main chain of galactomannan, yielding principally oligosaccharides and mannobiose. Subsequently, 1,4- β -mannosidase (EC 3.2.1.25) produces mannose (Xu et al. 2002; Moreira and Filho 2008). The degradation of galactomannan and galactoglucomannan by β -mannanase is greatly affected by the extent and pattern of substitution of the mannan backbone. β -Mannosidase, an exo-type enzyme, cleaves β -1,4-linked mannosides, releasing mannose from the nonreducing end of mannans and manno-oligosaccharides. β -Glucosidase, an exo-type enzyme, hydrolyze 1,4- β -D-glucopyranose at the nonreducing end of the oligosaccharides released from glucomannan and galactoglucomannan by β -mannanase. α -Galactosidase, a deb-branching enzyme, catalyzes the hydrolysis of α -1,6-linked D-galactopyranosyl side chains of galactomannan and galactoglucomannan. Acetyl mannan esterase, a deb-branching enzyme, releases acetyl groups from galactoglucomannan (Moreira and Filho 2008). The mannan structure affords the synergistic actions of a variety of main- and side-chain-cleaving enzymes (Coughlan et al. 1993). These enzymes have ability to degrade several substrates; this might be explained by the presence of multiple catalytic or binding sites where each substrate is being hydrolyzed at a different site in the enzyme (Gübitz et al. 1996; Magalhães and Milagres 2009).

4 Glucuronidases

Glucuronic acid residues and their 4-*O*-methyl ethers can be removed from the xylan backbone by α -glucuronidases (EC 3.2.1.131). The activity of this enzyme has been detected in a large number of fungal and bacterial culture filtrates, but α -glucuronidases have been purified from only a small number of organisms. The enzyme is active mainly on small xylooligomers and therefore is dependent on the action of endoxylanases. α -Glucuronidases have the highest activity against oligo-saccharides, whereas only low or no activity is observed against polymeric substrates (de Vries and Visser 2001). Most of the α -glucuronidases will release glucuronic acid only if the chemical moiety is located on the terminal xylose on the nonreducing end of xylo-oligosaccharides. However, there have been reports of α -glucuronidase enzymes that hydrolyze internal glucuronic acid residues from glucuronoxylan (Lee et al. 2008). Synergy between α -glucuronidases and endoxylanases and between α -glucuronidases and β -xylosidase has been reported (de Vries and Visser 2001; Lee et al. 2008). Despite the important nature of the

glucuronic acid substituent, there are very few known α -glucuronidase-encoding genes (<40). This situation is caused in part by the lack of a high-throughput activity assay (Lee et al. 2008).

5 Pectinases

Pectinases are one of the upcoming enzymes of the commercial sector, especially the juice and food industry and in the paper and pulp industry (Jayani et al. 2005). Pectinases are a heterogeneous group of related enzymes that hydrolyze the pectic substances, present mostly in plants. Pectinolytic enzymes are widely distributed in higher plants and microorganisms. They are of prime importance for plants as they help in cell wall extension and softening of some plant tissues during maturation and storage (Jayani et al. 2005; Uenojo and Pastore 2007).

It has been reported that microbial pectinases account for 25% of the global food enzymes sales. Almost all the commercial preparations of pectinases are produced from fungal sources. *A. niger* is the most commonly used fungal species for industrial production of pectinolytic enzymes (Jayani et al. 2005).

Pectinolytic enzymes can be divided in three major groups based in the attack to galacturonic backbone, preference to the substrate (pectin, pectic acid or protopectin) (Uenojo and Pastore 2007)

5.1 Protopectinases

Protopectinases or pectinosidases degrade the insoluble protopectin and give rise to highly polymerized soluble pectin and can be classified into two types, on the basis of their reaction mechanism. A-type of protopectinases (PPase-A) react with the inner site, i.e., the polygalacturonic acid region of protopectin, whereas B-type protopectinases (PPase-B) react on the outer site, i.e., on the polysaccharide chains that may connect the polygalacturonic acid chain and cell wall constituents (Jayani et al. 2005; Uenojo and Pastore 2007).

5.2 Polygalacturonase

Polygalacturonases (PGases) are the pectinolytic enzymes that catalyze the hydrolytic cleavage of the polygalacturonic acid (1,4- α -D-galacturonide) chain with the introduction of water across the oxygen bridge. They are the most extensively studied among the family of pectinolytic enzymes. The PGases involved in the hydrolysis of pectic substances are:

Endo-PGase (E.C. 3.2.1.15) with random hydrolysis.

Endo-PGase (E.C. 3.2.1.67) with sequential hydrolysis (Kashyap et al. 2001; Jayani et al. 2005; Uenojo and Pastore 2007).

5.3 Lyases

Lyases (or transeliminases) perform nonhydrolytic breakdown of pectates or pectinates, characterized by a trans-eliminative split of the pectic polymer. The lyases break the glycosidic linkages at C-4 and simultaneously eliminate H from C-5, producing a Δ 4:5 unsaturated (Jayani et al. 2005). Lyases can be classified into following types on the basis of the pattern of action and the substrate acted upon by them:

Endopolygalacturonate lyase (EndoPGL, E.C. 4.2.2.2) catalyzes random cleavage of α -1,4-glycosidic linkage in pectic acid.

Exopolygalacturonate lyase (ExoPGL, E.C. 4.2.2.9) catalyzes sequential cleavage of α -1,4-glycosidic linkage in pectic acid.

Endopolymethylgalacturonate lyase (EndoPMGL E.C. 4.2.2.10), catalyzes random cleavage of α -1,4-glycosidic linkages in pectin.

Exopolymethylgalacturonate lyase (exo PMGL) catalyzes stepwise breakdown of pectin by trans-eliminative cleavage (Kashyap et al. 2001; Jayani et al. 2005).

6 Swollenin

Swollenin, a protein with sequence similarity to the plant expansins, breaks down hydrogen bonds between cellulose microfibrils or cellulose and other cells (Cosgrove 2000). Unlike plant expansins, swollenin has a bimodular structure composed of N-terminal fungal type carbohydrate binding domain, connected by a linker region to the plant expansin homologous domain with homology to the group 1 grass pollen allergens (pfam 01357). This modular structure is typical of fungal cellulases and some hemicellulases that contain one or several CBMs to target the catalytic module close to the substrate (Levasseur et al. 2006; Brotman et al. 2008)

This protein was first isolated and characterized from the saprophytic cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*, and was named swollenin due to its ability to swell cotton (*Gossypium hirsutum*) fibers without producing detectable amounts of reducing sugars, pointing to potential application in promoting lignocelluloses enzymatic degradation (Saloheimo et al. 2002; Brotman et al. 2008; Yao et al. 2008). Moreover swollenin has been found to weaken filter paper (Yao et al. 2008). The protein also contains regions similar to mammalian fibronectin type III repeats, found for the first time in a fungal protein. The swollenin gene is regulated in a largely similar manner as the *T. reesei* cellulose genes (Saloheimo et al. 2002).

In the fungal database, proteins sharing similar domain structure to swollenin, a CBD domain linked to an expansin-like domain, are present only in *Aspergillus fumigatus* and *Neosartorya fischeri* (Brotman et al. 2008). Brotman et al. (2008) examined *Trichoderma* mutants with overexpression or silencing of the swollenin gene, providing evidence that this protein remarkably increases fungus plant root colonization efficiency and that the CBD domain is indispensable for protein full activity in vivo.

7 GH 61

The extensive variety of stereochemistry of carbohydrates is paralleled by a large multiplicity of the enzymes involved in their metabolism. Glycosyl hydrolases (EC 3.2.1.x) are key enzymes of carbohydrate metabolism that are found in the three major kingdoms (archaeobacteria, eubacteria and eukaryotes). Heritable deficiencies in glycosyl hydrolases, for example lactose intolerance or mucopolysaccharidosis are among the most frequent genetically based syndromes in man (Henrissat 1991).

Glycosyl hydrolases have been classified into families of related sequences using hydrophobic cluster analysis (Henrissat and Bairoch 1993). The glycosyl hydrolase (GH) family 61 is a long-recognized class of proteins, with little known about the activity, mechanism or function. GHs have been classified into more than 100 families (Karkehabadi et al. 2008; Koseki et al. 2008). GH family 61 includes a endoglucanase from *Aspergillus kawachii* (AkCel61) that is a modular enzyme consisting of a catalytic domain and a carbohydrate-binding module belonging to family 1 (CBM1) that are connected by a Ser-Thr linker region longer than 100 amino acids (Koseki et al. 2008). The family 61 endoglucanases of GHs have been described only in fungi (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>). The endoglucanases EGIV from *Trichoderma reesei* (Saloheimo et al. 1997) and CEL1 from *Agaricus bisporus* (Raguz et al. 1992) also belong to GH 61 family. Cel61A from the filamentous fungus *Hypocrea jecorina* is reported to act on microcrystalline cellulose and cellulose derivative substrates, including carboxymethyl cellulose and phosphoric acid-swollen cellulose (Karlsson et al. 2001; Karkehabadi et al. 2008). In addition, this enzyme is also active against β -glucan, lichenan and cellooligosaccharides. Other examples of endoglucanases in GH 61 family are from *Cryptococcus neoformans* (Chang and Kwon-Chung 1998 – cited by Koseki et al. 2008), *Phanerochaete chrysosporium* (Wymelenberg et al. 2002 – cited by Koseki et al. 2008), *Cochliobolus heterostrophus* (Lev and Horwitz 2003 – cited by Koseki et al. 2008), *Aspergillus kawachii* (Hara et al. 2003 – cited by Koseki et al. 2008), *Aspergillus nidulans* (Bauer et al. 2006 – cited by Koseki et al. 2008), and *Volvariella volvacea* (Ding et al. 2006 – cited by Koseki et al. 2008). Radford (2006) found eleven endoglucanases belonging to GH 61 family in *Neurospora crassa*.

8 Laccase

Lignin is the third major component of lignocellulose, forming a macromolecular complex that surrounds cellulose fibers (Saha 2003). After acid or enzymatic hydrolysis of polysaccharides, lignin is the H₂O-insoluble residue obtained. It is essential in structural support and in plant defense response. It also provides impermeability to the cell wall of plant vascular tissue, which is needed to water conduction (O'Malley et al. 1993).

For a long time it was believed that peroxidases were the only cell wall-associated oxidative enzymes involved in the polymerization step of lignin biosynthesis. After many years of disbelief it was revealed the participation of laccase, first described in 1883 but only later characterized, and laccase-like oxidases in lignification processes (Wallace and Fry 1999). However, Mayer and Staples (2002), reviewing later studies with fungi and plant laccases, exposed the possibility of fungal laccases not to take part in lignification processes. In plants these enzymes would be involved in cell-wall formation, but not exactly in lignification.

The presence of laccase, alone or together with lignin peroxidase and manganese peroxidase, has been detected in a wide variety of white rot fungi, making clear its fundamental role during delignification. The structure of many of these laccases have been described and, although the catalytic site seems to have been highly conserved and despite the fact that lignocellulose is a common substrate, the rest of the molecule appears to show very wide variability (Mayer and Staples 2002). The presence of phenolic compounds, which act as mediators, enhance the stability of some of them, increasing the lignocellulose breakdown ability (Eggert et al. 1996).

The phenolic substrates are also oxidized by laccases, which use oxygen as the electron acceptor. This enzyme is a blue metalloprotein, containing three copper ions that participate in a four-electron transfer to molecular oxygen, which is reduced to form water (Solomon and Lowery 1993). Laccase, which is glycosylated, belongs to the group of the multicopper enzymes along with ascorbic acid oxidase, ceruloplasmin and others, being able to oxidize a wide range of phenolic substrates (Messerschmidt and Huber 1990). Circular dichroism and electron paramagnetic resonance have already been used in the study of the metal centers of fungal laccases, showing that they are relatively stable compared to the secondary structure of the protein (Bonomo et al. 2001). Basically, any substrate with characteristics similar to *p*-diphenol will be oxidized by laccases. In addition, at least some of the fungal laccases can also oxidize monophenols such as cresol, and some are able to oxidize ascorbic acid (Mayer and Staples 2002).

Laccases are divided into two groups: the fungi one, having appeared in most of the studied organisms, and in the higher plants one, where they are less frequently found. The enzymes known as laccase-like enzymes are said to belong to bacteria and insects (Mayer and Staples 2002). Laccase has been shown to be an important virulence factor in many diseases caused by fungi, protecting them from the toxic phytoalexins and tannins in the host environment (Pezet et al. 1992). Its activity may also contribute to cell-wall reconstitution in regenerating protoplasts of higher

plants (De marco and Roubelakis-Angelakis 1997). Laccase-like oxidase activity can be localized in the differentiating xylem of both herbaceous and woody angiosperms (Bao et al. 1993).

9 Industrial Application of Enzymes

The majority of used industrial enzymes are hydrolytic, including proteases and GHs. The global market for industrial enzymes was estimated to totally \$2 billion in 2004, and its annual growth rate predicted to be between 4 and 5% (Kirk et al. 2002; Turner et al. 2007). Given the natural abundance of holocellulosic materials, many microorganisms produce enzyme systems to hydrolyze holocellulose completely into simpler sugars that can be used as energy, feed and food sources. The enzymes described in this chapter are involved in the cleavage of plant cell wall structure. As the industrial processing of cell wall structure involves degradation of its complex components, it is obvious that enzyme systems capable of degrading those components can be applied in various industrial processes (Table 1).

The use of enzymes in the production of feed is an important sector of agrobusiness, with an annual world production exceeding 600 million tons and a turnover of >50 billion dollars. β -Glucanases, xylanases, mannanases, pectinases and feruloyl esterases are used in animal feed to reduce viscosity, leading to an increase on the absorption and release of nutrients through the hydrolysis of nonstarchy polysaccharides, such as β -glucans and arabinoxylans, and also increasing feed conversion rates and weight gain (Bhat 2000; Polizeli et al. 2005; Topakas et al. 2007; Uenojo and Pastore 2007; Moreira and Filho 2008). Moreover, the increase in digestibility is well correlated with the decrease in the degree of substitution of the hemicellulose polymers with arabinosyl residues, promoted by the addition of α -L-Arabinofuranosidases (Numan and Bhosle 2006).

Hemicellulolytic enzymes have shown potential in the pulp and paper industry for the modification of wood fibers. Mixtures of hemicellulases and cellulases have also been used to increase the drainage of secondary fiber during papermaking (Gerber et al. 1999). In the enzymatic treatment for pulp bleaching, β -mannanase and its accessory enzymes are able to cleave the mannan portion in pulps selectively without affecting cellulose (Filho 1998). Xylanases can also be industrially applied in the pulp biobleaching, leading to a decrease in the amount of organochlorine compounds in bleach plant effluents and elemental chlorine – free (ECF) system (Medeiros et al. 2002). Feruloyl esterases, if used together with xylanase and other xylan-degrading enzymes, could partially disrupt and loosen the cell wall structure, enhancing the lignin extractability and reducing the chlorine consumption at the subsequent bleaching stages (Topakas et al. 2007). The application of α -L-Arabinofuranosidases can further enhance the delignification of pulps. The enzyme acts to release the arabinose side chain that retards the action of other bleaching enzymes (Numan and Bhosle 2006). It was also shown that laccases, manganese-dependent peroxidases, and lignin peroxidases, produced by an isolate of the fungus *Flavodon flavus*, were able

Table 1 A summary of the main biotechnology applications of some plant cell wall-degrading enzymes

Enzyme	Application	Sector
Cellulase	Decrease in the viscosity and maintenance of the texture of fruit juices	Juice industry
	Controlling coronary heart disease and arteriosclerosis	Pharmaceutical industry
	Reducing food spoilage	Food industry
Cellulase and hemicellulase	Protein degradation	Detergent
	Lignocellulose breaking down	Biofuel
Xylanase	Improvement of nutrient uptake	Animal feed
	Paper bio-bleachin through lignin removal	Paper and pulp industry
Endoglucanase	Separation and isolation of starch and gluten from wheat flour	Food industry
	Separation and isolation of starch and gluten from wheat flour	Food industry
Pectinase	Decrease in the viscosity and maintenance of the texture of fruit juices	Juice industry
	Increased yields	Wine industry
	Reducing food spoilage	Food industry
	Nutrient uptake improvement	Animal feed
	Alteration of the sensory properties of fruits and vegetables	Food industry
	Paper bio-bleaching through lignin removal	Paper and pulp industry
	Increased yields	Oil extraction
Pectin esterase	Remove mucilage coat from the coffee beans	Coffe processing
	Improvement in the clarification of cider	Wine industry
	Production of high quality tomato ketchup and fruit pulps	Food industry
Rhamnogalacturonase	Production of cloud stable apple juice	Juice industry
Endoxylanase	Improvement in the texture and quality of bakery products	Food industry
β -Glucosidase	Improvement in the aroma of wines	Wine production
	Alteration of the sensory properties of fruits and vegetables	Food industry
Polygalacturonase	Improvement in pressing fruit mashes and high color extraction	Juice Industry
β -Mannanase	Food safety and preservation	Food Industry
	Nutrient uptake improvement	Animal Feed
	Paper prebleaching reducing loss of fiber yield	Paper and Pulp Industry
	Viscosity reduction by hydrolysis	Coffe processing
	Clarification of juices and wines	Juice and wine industry
	Increased yields	Oil extraction

(continued)

Table 1 (continued)

Enzyme	Application	Sector
β -Glucanase	Food safety and preservation	Food industry
	Improvement in primary fermentation, filtration and quality of beer	Beer brewing
	Nutrient uptake improvement	Animal feed
Endo-mannanase	Production of water-soluble dietary fibers to enrich the fiber content of foods	Food industry
Feruloyl esterase	Nutrient uptake improvement	Animal feed
α -L-Arabinofuranosidase	Paper bio-bleaching through lignin removal	Paper and pulp industry
	Decrease in the hemicellulose polymers substitution degree	Animal feed

to act in the decolorization of the effluent from a Kraft paper mill bleach plant, being potential candidates for bioremediation of colored industrial effluents (Mayer and Staples 2002).

Cellulases have achieved worldwide success in textile and laundry because of their ability to modify cellulosic fibers in a controlled and desired manner, so as to improve the quality of fabrics. Bio-stoning and bio-polishing are the best known current textile applications of cellulases, but they can also be used in household washing powders, since they enhance the detergent performance and allow the removal of small, fuzzy fibrils from fabric surfaces and improve the appearance and color brightness (Bhat 2000).

The wine making process requires the extraction of juice from grapes and subsequent fermentation of the juice by yeast. The addition of exogenous glucanases and pectinases are known to improve not only the wine quality, but also its overall production (Bhat 2000). One of the most important characteristics of wine quality is its aromatic fragrance. Terpenols are strongly aromatic molecules, and most of them are linked to disaccharide moieties, in which the major terminal nonreducing sugar is α -L-arabinofuranose that can be released by the action of α -L-Arabinofuranosidases (Numan and Bhosle 2006).

The beer brewing technology is based on the action of enzymes activated during malting and fermentation. Malting of barley depends on seed germination, which initiates the biosynthesis and activation of α - and β -amylases, carboxypeptidase and β -glucanase that hydrolyze the seed reserve. All these enzymes should act in synergy under optimal conditions to produce high quality malt (Bhat 2000).

Currently, a combination of pectinases (pectin lyase, pectin methylesterase, endo and exo-polygalacturonases, pectin acetylerase, rhamnogalacturonase, endo and exo-arabinase), cellulases (endoglucanases, exoglucanases and cellobiases) and hemicellulases (endo and exo-xylanases, galactanases, xyloglucanases and mannanases) are used in the extraction and clarification of fruit and vegetable juices (Bhat 2000). The α -L-arabinofuranosidases are receiving attention for their applications in fruit juice clarification because they specifically remove the 1,3-side chains present on the main 1,5-linked arabinan chains. The resulting 1,5 arabinans in the precipitate are hydrolyzed by the α -1,5 arabinases, increasing their solubility (Numan and Bhosle 2006).

Enzyme-catalyzed conversion of sugarcane, sugar beet, corn or wheat to ethanol by distillers yeast *S. cerevisiae* is the current process for the industrial production of bioethanol (Sorensen et al. 2005). These substrates contain nonfermentable hemicelluloses, which accumulate during the process of ethanol production. Enzymatic hydrolysis can be used for the hydrolysis of arabinoxylans in hemicelluloses to monosaccharides. The complexity and heterogeneity of the arabinoxylans demand also complex enzyme systems that should depolymerize and cleave side groups to degrade hemicelluloses to pentoses monosaccharides (Numan and Bhosle 2006; Kumar et al. 2008). However, cellulose bioconversion into fermentable sugars by cellulases is a biorefining area that has invested enormous research efforts because of its crucial importance to bioenergy production, since cellulose is the most prevalent sugar in nature.

In the processing of instant coffee, where the extracts of coffee beans are concentrated by evaporation and dried by freeze drying, β -mannanase is responsible for the hydrolysis of galactomannan in coffee extracts, leading to a viscosity reduction (Moreira and Filho 2008).

10 Conclusions

The complexity of lignocellulosic substrates is reflected in the battery of main-chain- and side-chain-cleaving enzymes required for their hydrolysis. Such enzyme systems are not only of academic interest since they have potential applications in the bioconversion of agro-industrial residues. As the nature of plant cell wall polysaccharides is heterogeneous, a complex mixture of enzymes is required for their degradation. Efficient conversion of lignocellulosic material into useful products by enzymatic degradation, e.g., bioethanol production, requires a complex, but balanced mixture of enzymes, including hydrolytic and oxidative enzyme systems. The search for new renewable sources of energy has increased in the past 10 years. In this context bioethanol has shown up as a candidate for substituting the old fashioned fossil fuels. The increased demand for fermentable sugars caused the use of lignocelluloses from agricultural residues as substrates for microorganisms to work on. Fungus and bacteria's enzymes and complexes have been studied and their use could promote a sustainable way of dealing with these residues. The leftover from sugarcane, soy, corn, wheat, cotton what was thought to be worthless is now seen a possible gold mine, as well as a mean of saving the world from some of the human's wastes. The costs of the studies make the new technologies not very advantageous yet but there are some characteristics that could still be investigated and exploited.

The understanding of enzymatic synergism is a key for improving the cell wall degradation and sugar production. In many situations the dependence on others can be a better choice than being all by itself. Also, the promiscuous behavior of some enzymes is a desirable characteristic, for its wide range of suitable substrates. But when compared to mankind's situation, it is questionable whether the nature's push towards diversification is a step back when faced with the modern tendency of specialization.

Should enzymes be faithful and direct all their energy to one target or should they be promiscuous and share their performance between many? Anyway, apart from the enzymatic dilemma, the establishment of sugarcane and other cultures as energy source plants, especially in developing countries such as Brazil, could bring positive and negative effects, depending on the focus and in the way it will be treated from now on.

References

- Adams, E. L., Kroon, P. A., Williamson, G., Gilbert, H. J., and Morrisa, V. J. 2004. Inactivated enzymes as probes of the structure of arabinoxylans as observed by atomic force microscopy. *Carbohydr. Res.* 339: 579–590.
- Akin, D. E., Gordon, G. L. R., and Hogan, J. P. 1983. Rumen bacterial and fungal degradation of *Digitaria pentzii* grown with or without sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 738–748.
- Arai, T., Araki, R., Tanaka, A., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K. and Ohmya, K. 2003. Characterization of a cellulase containing a family 30 carbohydrate-binding module (CBM) derived from *Clostridium thermocellum* CelJ: importance of the CBM to cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* 185: 504–512.
- Bacic, Q., Harris, P. J., and Stone, B. A. 1988. Structure and function of plant cell walls. In *The Biochemistry of plants*, vol.14, ed. J. Preiss, pp. 297–371. San Diego: Academic Press.
- Baminger, U., Subramaniam, S. S., Renganathan, V., and Haltrich, D. 2001. Characterization of cellobiose dehydrogenase from the plant pathogen *Sclerotium (Athelia) rolfsii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (4): 1766–1774.
- Bao, W., O'Malley, D. M., Whetten, R., and Sederoff, R. R. 1993. A laccase associated with lignifications in loblolly pine xylem. *Science* 260: 672–674.
- Baumann, M. J., Eklo, J. M., Michel, G., Kallas, A. M., Teeri, T. T., Czjzek, M., and Brumer III, H. 2007. Structural evidence for the evolution of xyloglucanase activity from xyloglucan endo-transglycosylases: biological implications for cell wall metabolism. *The Plant Cell* 19: 1947–1963.
- Beldman, G., Schols, H. A., Pitson, S. M., Searl-van Leeuwen, M. J. F., and Voragen, A. G. J. 1997. Arabinans and arabinan degrading enzymes. *Adv. Macromol. Carbohydr. Res.* 1: 1–64.
- Benoit, I., Navarro, D., Marnet, N., Rakotomanomana, N., Lesage-Meessen, L., Sigoillot, J.C., Asther, M., and Asther, M., 2006. Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. *Carbohydr. Res.* 341: 1820–1827.
- Bhat, M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18: 35–383.
- Biely, P., Vrsanská, M., Tenkanen, M., and Kluepfel, D. 1997. Endo- β -1, 4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.* 57: 151–166.
- Blum, D. L., Kataeva, I. A., Li, X. L., and Ljungdahl, L. G. 2000. Feruloyl esterase activity of the *Clostridium thermocellum* cellosome can be attributed to previously unknown domains of XynY and XynZ. *J. Bacteriol.* 182: 1346–1351.
- Bonomo, R. P., Cennamo, G., Purrello, R., Santoro, A. M., and Zappala, R. 2001. Comparison of three fungal laccases from *Rigodoporus lignosus* and *Pleurotus ostreatus*: correlation between conformational changes and catalytic activity. *J. Inorg. Chem.* 83: 67–73.
- Borneman, W. S., Hartley, R. D., Morrison, W. H., Akin, D. E., and Ljungdahl, L.G. 1990. Feruloyl and *p*-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 345–351.
- Borneman, W. S., Ljungdahl, L. G., Hartley, R. D., and Akin, D. E. 1991. Isolation and characterization of *p*-coumaroyl esterase from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2337–2344.

- Borneman, W. S., Ljungdahl, L. G., Hartley, R. D., and Akin, D. E. 1992. Purification and partial characterization of two feruloyl esterases from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3762–3766.
- Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A., Chet, I. 2008. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiology* 147: 779–784.
- Cosgrove, D. J. 2000. Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 109–124.
- Coughlan, M. P. 1985. Cellulases: production, properties and applications. *Biochem. Soc. Trans.* 13: 405–406.
- Coughlan, M. P. 1992. Towards an understanding of the mechanism of action of main chain cleaving xylanases. In *Xylans and xylanases*, eds J. Visser, J. G. Beldman, M. A. K. Someren, A. G. J. van Voragen, pp. 111–139. Amsterdam: Elsevier Science.
- Coughlan, M. P., Tuohy, M. G., Filho, E. X. F., Puls, J., Claeysens, M., Vrsanská, M., and Hughes, M. M. 1993. Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems. In: *Hemicellulose and hemicellulases*, eds M. P. Coughlan, G. P. Hazlewood, pp. 53–83. London: Portland.
- Crépin, V. F., Faulds, C. B., and Connerton, I. F. 2004. Functional recognition of new classes of feruloyl esterase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 647–652.
- de Marco, A. and Roubelakis-Angelakis, K. A. 1997. Laccase activity could contribute to cell-wall reconstitution of regenerating protoplasts. *Phytochem.* 46: 421–425.
- de Vries, R. P. 2003. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes, relevance for industrial production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 10–20.
- de Vries, R. P., and Visser, J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 497–522.
- de Vries, R. P., van Kuyk, P. A., Kester, H. C. M., and Visser, J. 2002. The *Aspergillus niger faeB* gene encodes a second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation and is specifically induced in the presence of aromatic compounds. *Biochem. J.* 363: 377–386.
- de Wet, B. J. M., Matthew, M. K. A., Storbeck, K.-H., van Zyl, W. H., and Prior, B. A. 2008. Characterization of a family 54 α -L-arabinofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77: 975–983.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F. D., Eriksson, K. E. L. 1996. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.* 391: 144–148.
- Faulds, C. B., Ralet, M. C., Williamson, G., Hazlewood, G. P., and Gilbert, H. J. 1995. Specificity of an esterase (XYLD) from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *Cellulose*. *Biochim. Biophys. Acta* 1243: 265–269.
- Faulds, C. B., Molina, R., Gonzalez, R., Husband, F., Juge, N., Sanz-Aparicio, J., and Hermoso, J. A. 2005. Probing the determinants of substrate specificity of a feruloyl esterase, AnFaeA, from *Aspergillus niger*. *FEBS J.* 272: 4362–4371.
- Filho, E. X. F. Hemicellulases and biotechnology. 1998. In *Recent research developments in microbiology*, ed. S. G. Pandalai, pp. 165–176. Trivandrum: Research Signpost.
- Fry, S. C. 2003. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New phytologist.* 161: 641–675.
- Gerber, P. J., Heitmann, J. A., Joyce, T. W., Buchert, J., and Siika-aho, M. 1999. Adsorption of hemicellulases onto bleached kraft fibers. *J. Biotechnol.* 67: 67–75.
- Gielkens, M. M. C., Dekkers, E., Visser, J., and de Graaff, L. H. 1999. Two cellobiohydrolases-encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XlnR for their expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4340–4345.
- Gübitz, G. M., Hayn, M., Sommerauer, M., and Steiner, W. 1996. Mannan-degrading enzymes from *Sclerotium rolfsii*: Characterization and synergism of two endo β -mannanase and a β -mannosidase. *Biores. Technol.* 58: 127–135.
- Hartley, R. D., and Ford, C. W. 1989. Phenolic constituents of plant cell walls and wall biodegradability. In *Plant cell wall polymers: biogenesis and biodegradation*, eds N. G. Lewis, M. G. Paice, pp. 137–145. Washington: American Chemical Society.
- Hartley, R. D., Morrison, W. H., Himmelsbach, D. S., and Borneman, W. S. 1990. Cross-linking of cell wall arabinoxylans in graminaceous plants. *Phytochem.* 12: 3705–3709.

- Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309–316.
- Henrissat, B. and Bairoch, A. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293: 781–788.
- Hespell, R. B., and O'Bryan, P. J. 1992. Purification and characterization of an α -L-arabinofuranosidase from *Butyrvibrio fibrisolvens* GS113. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1082–1108.
- Himmel, M. E., Ruth, M. F., and Wyman, C. E. 1999. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 358–364.
- Ishii, T. 1991. Isolation and characterization of a diferuloyl arabinoxylan hexasaccharide from bamboo shoot cell-walls. *Carbohydr. Res.* 219: 15–22.
- Jayani, R. S., Saxena, S., and Gupta, R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.* 40: 2931–2944.
- Jorgensen, H., Morkeberg, A., Krogh, K. B. R., and Olsson, L. 2005. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme Microbiol. Technol.* 36: 42–48.
- Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-Aho, M., and Viikari, L. 2005. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochem.* 40: 3519–3525.
- Karkehabadi, S., Hansson, H., Piens, K., Mitchinson, C., and Sandgren, M. 2008. The first structure of a glycoside hydrolase family 61 member, Cel61B from *Hypocrea jecorina*, at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 383: 144–154.
- Karlsson, J., Saloheimo, M., Siika-aho, M., Tenkanen, M., Penttilä, M., Tjerneld, F. (2001). Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*. *Eur. J. Biochem.* 268: 6498–6507.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., Tewari, R. 2001. Applications of pectinase in the commercial sector: a review. *Biores. Technol.* 77: 215–227.
- Kirk, O., Borchert, T. V., Fuglsang, C. C. 2002. Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 345–351.
- Koseki, T., Mese, Y., Fushinobu, S., Masaki, K., Fujii, T., Ito, K., Shiono, Y., Murayama, T., and Iefuji, H. 2008. Biochemical characterization of a glycoside hydrolase family 61 endoglucanase from *Aspergillus kawachii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77: 1279–1285.
- Kroon, P. A., Faulds, C. B., Brézillon, C., and Williamson, G. 1997. Methyl phenylalkanoates as substrates to probe the active sites of esterases. *Eur. J. Biochem.* 248: 245–251.
- Kumar, R., Singh, S., Singh, O. V. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 377–391.
- Lawford, H. G., and Rousseau, J. D. 2003. Cellulosic fuel ethanol – alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 106: 457–469.
- Lee, C. C., Wagschal, K., Kibblewhite-Accinelli, R. E., Orts, W. J., Robertson, G. H., Wong, D. W. S. 2008. An α -glucuronidase enzyme activity assay adaptable for solid phase screening. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 155: 314–320.
- Levasseur, A., Saloheimo, M., Navarro, D., Andberg, M., Monot, F., Nakari-Setälä, T., Asther, M., and Record, E. 2006. Production of a chimeric enzyme tool associating the *Trichoderma reesei* swollenin with the *Aspergillus niger* feruloyl esterase A for release of ferulic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 872–880.
- Liu, K., Yan, L., Yao, G., and Guo, X. 2006. Estimation of *p*-coumaric acid as a metabolite of E-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester in rat plasma by HPLC and its application to a pharmacokinetic study. *J. Chrom. B* 831: 303–306.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., Pretorius, I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 506–577.
- Mach, R. L., and Zeilinger, S. 2003. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 515–522.
- Magalhães, P., Milagres, A. M. F. 2009. Biochemical properties of a β -mannanase and a β -xylanase produced by *Ceriporiopsis subvermispora* during biopulping conditions. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 63: 191–195.

- Mandels, M. 1985. Applications of cellulases. *Biochem. Soc. Trans.* 13: 414–415.
- Manfield, S. D., de Jong, E., and Saddler, J. N. 1997. Cellobiose Dehydrogenase, an Active Agent in Cellulose Depolymerization. *App. Environ. Microbiol.* 63(10): 3804–3809.
- Mayer, A. M., and Staples, R. C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochem.* 60: 551–565.
- Medeiros, R. G., Silva Jr, F. G., Salles, B. C., Estelles, R. S., and Filho, E. X. F. 2002. The performance of fungal xylan-degrading enzyme preparations in elemental chlorine-free bleaching for Eucalyptus pulp. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28: 204–206.
- Messerschmidt, A., and Huber, R. 1990. The blue copper oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin: modeling and structural relationships. *Eur. J. Biochem.* 187: 341–352.
- Minic, Z., and Jouanin, L. 2006. Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 435–449.
- Miyanaga, A., Koseki, T., Matsuzawa, H., Wakagi, T., Shoun, H., and Fushinobu, S. 2004. Crystal structure of a family 54 α -L-arabinofuranosidase reveals a novel carbohydrate-binding module that can bind arabinose. *J. Biol. Chem.* 279: 44907–44914.
- Moreira, L. R. S., and Filho, E. X. F. 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79(2): 165–178.
- Mosier N., Hall, P., Ladisch, C. M., and Ladisch, M. R. 1999. Reaction kinetics, molecular action, and mechanisms of cellulolytic proteins. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 65: 23–39.
- Numan, M. T., and Bhosle, N. B. 2006. α -L-Arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: 247–260.
- O'Malley, D. M., Whetten, R., Bao, W., Chen, C., and Sederoff, R. R. 1993. The role of laccase in lignifications. *The Plant J.* 4(5): 751–757.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de La Rubia, T., and Martínez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5: 53–63.
- Pezet, R., Pont, V., and Hoang-Van, K. 1992. Enzymatic detoxication of stilbenes by *Botrytis cinerea* and inhibition by grape berries proanthocyanidins. In *Recent Advances in Botrytis Research*, eds K. Verhoeff, N. E. Malathrakis, B. Williamson, pp. 87–92. Wageningen: Pudoc Scientific.
- Picart, P., Diaz, P., and Pastor, F. I. J. 2007. Cellulases from two *Penicillium* sp. strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization. *Lett. Appl. Microbiol.* 45: 108–113.
- Polizeli, M. L. T., Rizzatti, A. C. S., Monti R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., and Amorim, D. S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 577–591.
- Radford, A. 2006. Glycosyl hydrolase genes and enzymes of *Neurospora crassa*. *Fungal Gen. Newsletter* 53: 12–14.
- Raguz, S., Yague, E., Wood, D. A., Thurston, C. F. 1992. Isolation and characterisation of a cellulose-growth-specific gene from *Agaricus bisporus*. *Gene (Amst.)* 119: 183–190.
- Rahman, S. A. K. M., Kato, K., Kawai, S., and Takamizawa, K. 2003. Substrate specificity of the α -L-arabinofuranosidase from *Rhizomucor pusillus* HHT-1. *Carbohydr. Res.* 338: 1469–1476.
- Ralph J., Grabber, J. H., Hatfield, R. D. 1995. Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharides esters into ryegrass lignins. *Carbohydr. Res.* 275: 167–178.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Ralph, S. A., Christensen, J. H., and Boerjan, W. 2004. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochem. Rev.* 3: 29–60.
- Reese, E. T. 1976. History of cellulose program at the US Army Natick development centre. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6: 9–20.
- Rose, J. K., Braan, J., Fry, S. C., and Nishitani, K. 2002. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol.* 43: 1421–1435.
- Rye, C. S., and Withers, S. G. 2000. Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 573–580.

- Saha, B. C. 2000. α -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotech. Adv.* 18: 403–423.
- Saha, B. C. 2003. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 279–291.
- Saha, B. C., and Bothast, R. J. 1998. Purification and characterization of a novel thermostable α -L-arabinofuranosidase from a color-variant strain of a *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 216–220.
- Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyyssönen, E., Bhatia, A., Ward, M., and Penttilä, M. 2002. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur. J. Biochem.* 269: 4202–4211.
- Saloheimo, M., Nakari-Setälä, T., Tenaken, M., and Penttilä, M. 1997. cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. *Eur. J. Biochem.* 249: 584–591.
- Saulnier, L., and Thibault, J. F. 1999. Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *J. Sci. Food Agric.* 79: 396–402.
- Scalbert, A., Monties, B., Lallemand, J. Y., Guittet, E., and Rolando, C. 1985. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochem.* 24: 1359–1362.
- Shallom, D., Belakhov, V., Solomon, D., Gilead-Gropper, S., Baasov, T., Shoham, G., and Shohama, Y. 2002. The identification of the acid-base catalyst of α -arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase. *FEBS Lett.* 514: 163–167.
- Siqueira, F.G.S. and Filho, E. X. F. 2010. Plant cell wall as substrate for production of enzymes with industrial applications. *MROC* 7: 54–60.
- Sohail, M., Siddiqi, R., Ahmad, A., and Khan, S. A. 2009. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. *N Biotechnol.* 25: 437–441.
- Solomon, E. I., and Lowery, M. D. 1993. Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *Science.* 259: 1575–1581.
- Sorensen, H. R., Pedersen, S., Vikso-Nielsen, A., Meyer, A. S. 2005. Efficiencies of designed enzyme combinations in releasing arabinose and xylose from wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue. *Enzyme Microb. Technol.* 36: 773–784.
- Sozzi, G. O., Greve, L. C., Prody, G. A., and Labavitch, J. M. 2002. Gibberellic acid, synthetic auxins, and ethylene differentially modulate α -L-arabinofuranosidase activities in antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase Tomato Pericarp. *Discs. Plant Physiol.* 129: 1330–1340.
- Spagna, G., Andreani, F., Salatelli, E., Romagnoli, D., Casarini, D., and Pifferi, P. G. 1998. Immobilization of the glycosidases: α -L-arabinofuranosidase and β -D-glucopyranosidase from *Aspergillus niger* on a chitosan derivative to increase the aroma of wine. Part II. *Enzyme Microb. Technol.* 23: 413–421.
- Tolan, J. S., and Foody, B. 1999. Cellulase from submerged fermentation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 65: 41–67.
- Topakas, E., Christakopoulos, P., and Faulds, C. B. 2005. Comparison of mesophilic and thermophilic feruloyl esterases: characterization of their substrate specificity for methyl phenylalaninoates. *J. Biotechnol.* 115: 355–366.
- Topakas, E., Vafiadi, C., Christakopoulos, P. 2007. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Proc. Biochem.* 42: 497–509.
- Turner, P., Mamo, G., Karlsson, E. N. 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb. Cell Fact.* 6: 1–23.
- Uenojo, M., Pastore, G. M. 2007. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Quim. Nova.* 30: 388–394.
- Vafiadi, C., Topakas, E., Wong, K. K. Y., Suckling, I. D., and Christakopoulos, P. 2005. Mapping the hydrolytic and synthetic selectivity of a type c feruloyl esterase (StFaeC) from *Sporotrichum thermophile* using alkyl ferulates. *Tetrahed. Asym.* 16: 373–379.
- Vafiadi, C., Topakas, E., Christakopoulos, P., and Faulds, C. B. 2006. The feruloyl esterase system of *Talaromyces stipitatus*: determining the hydrolytic and synthetic specificity of TsFaeC. *J. Biotechnol.* 125: 210–221.

- Wallace, G., and Fry, S. C. 1999. Action of diverse peroxidases and laccases on six cell wall-related phenolic compounds. *Phytochem.* 52: 769–773.
- Ward, O. P., and Moo-Young, M. 1989. Degradation of cell wall and related plant polysaccharides. *Crit. Rev. Biotechnol.* 8: 237–274.
- Xu, B., Hägglund, P., Stålbrand, H., Janson, J. 2002. Endo- β -1,4-Mannanases from blue mussel, *Mytilus edulis*: purification, characterization, and mode of action. *J. of Biotechnol.* 92: 267–277.
- Yao, Q., Sun, T., Liu, W., Chen, G. 2008. Gene cloning and heterologous expression of a novel endoglucanase, swollenin, from *Trichoderma pseudokoningii* S38. *Biosci Biotechnol. Biochem.* 72: 2799–2805.

Apêndice 3

BioEnergy Research (2012): 768-777 ISSN 1939-1242

BIOMASS-DERIVED INHIBITORS OF HOLOCELLULASES

Gilvan C. Duarte · Leonora Rios S. Moreira · Paula Marcela D. Jaramillo ·

Edivaldo Ximenes F. Filho*

ABSTRACT

Enzymes constitute a major monetary cost in the bioconversion of holocellulose to ethanol. Identifying enzyme inhibitors and moderating their effects is one approach that may help to overcome this issue. Most inhibitors that reduce the hydrolysis activity of holocellulase are released as the holocellulosic biomass is broken down in the pretreatment and hydrolysis steps. Recent reports in the literature have shown that the major inhibitors or deactivators of cellulases are phenols and xylooligosaccharides. Bioconversion of hemicelluloses by hemicellulases also has important practical applications in various agro-industrial processes in addition to the conversion of hemicellulosic biomass to fuels and chemicals. Hemicellulases, such as β -xylosidases, may also help alleviate the inhibitory effect of xylooligosaccharides in cellulases. However, compared to cellulases, less is known about the inhibition or deactivation of hemicellulases and pectinases, especially for these inhibitors that are generated during pre-treatment and the hydrolysis of lignocellulosic substrates. Considering the importance of such enzymes for the complete degradation of lignocellulosic substrates, this review has a broad approach to providing information on the effect of inhibitors of holocellulases (cellulases, hemicellulases and pectinases).

Keywords: Cellulase · Hemicellulase · Pectinases Inhibitors · Xylooligosaccharide · Biomass

Apêndice 4

Applied Sciences (2012): 754-772 ISSN 2076-3417

USE OF RESIDUAL BIOMASS FROM THE TEXTILE INDUSTRY AS CARBON SOURCE FOR PRODUCTION OF A LOW-MOLECULAR-WEIGHT XYLANASE FROM *ASPERGILLUS ORYZAE*

Gilvan Caetano Duarte, Leonora Rios de Souza Moreira, Diana Paola Gómez-Mendoza, Félix Gonçalves de Siqueira, Luís Roberto Batista, Lourdes Isabel Velho do Amaral, Carlos André Ornelas Ricart and Edivaldo Ximenes Ferreira Filho,*

ABSTRACT

Pretreated dirty cotton residue (PDCR) from the textile industry was used as an alternative carbon source for the submerged cultivation of *Aspergillus oryzae* and the production of xylanases. The filtered culture supernatant was fractionated by ultrafiltration followed by three chromatographic steps, which resulted in the isolation of a homogeneous low-molecular-weight xylanase (Xyl-O1) with a mass of 21.5 kDa as determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) co-polymerized with 0.1% oat spelt xylan. Enzyme catalysis was the most efficient at 50 °C and pH 6.0. The K_m values ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) for the soluble fraction of oat spelt and birchwood xylans were 10.05 and 3.34, respectively. Xyl-O1 was more stable in the presence of 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 1,4-dithiothreitol (DTT), L-cysteine or β -mercaptoethanol, which increased the rate of catalysis by 40%, 14%, 40% or 37%, respectively. The enzyme stability was improved at pH 7.0 in the presence of 20 mM L-cysteine, with the retention of nearly 100% of the activity after 6 h at 50 °C. Xyl-O1 catalyzed the cleavage of internal β -1,4 linkages of the soluble substrates containing D-xylose residues, with a maximum efficiency of 33% for the hydrolysis of

birchwood xylan after 12 h of incubation. Identification of the hydrolysis products by high-performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) indicated the predominance of the hydrolysis products X2-X6 during the first 12 h of incubation and the accumulation of higher xylooligomers after the elution of the last xylooligomer standard, xylohexaose.

Keywords: agro-industrial residues; hemicellulose; enzyme purification; xylanase; hydrolysis

Apêndice 5

BMC Biotechnology (2011): 1-14 ISSN 1472-6750

A NEW CHITINASE-LIKE XYLANASE INHIBITOR PROTEIN (XIP) FROM COFFEE (*COFFEA ARABICA*) AFFECTS SOYBEAN ASIAN RUST (*PHAKOPSORA PACHYRHIZI*) SPORE GERMINATION

**Erico AR Vasconcelos, Celso G Santana, Claudia V Godoy, Claudine DS Seixas,
Marilia S Silva, Leonora RS Moreira, Osmundo B Oliveira-Neto, Daniel Price5,
Elaine Fitches, Edivaldo XF Filho, Angela Mehta, John A Gatehouse,
Maria F Grossi-De-Sa***

ABSTRACT

Background: Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) is a common disease in Brazilian soybean fields and it is difficult to control. To identify a biochemical candidate with potential to combat this disease, a new chitinase-like xylanase inhibitor protein (XIP) from coffee (*Coffea arabica*) (CaclXIP) leaves was cloned into the pGAPZa-B vector for expression in *Pichia pastoris*.

Results: A cDNA encoding a chitinase-like xylanase inhibitor protein (XIP) from coffee (*Coffea arabica*) (CaclXIP), was isolated from leaves. The amino acid sequence predicts a (b/a) 8 topology common to Class III Chitinases (glycoside hydrolase family 18 proteins; GH18), and shares similarity with other GH18 members, although it lacks the glutamic acid residue essential for catalysis, which is replaced by glutamine. CaclXIP was expressed as a recombinant protein in *Pichia pastoris*. Enzymatic assay showed that purified recombinant CaclXIP had only residual chitinolytic activity. However, it inhibited xylanases from *Acrophialophora nainiana* by approx. 60% when

present at 12:1 (w/w) enzyme:inhibitor ratio. Additionally, CaclXIP at 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ inhibited the germination of spores of *Phakopsora pachyrhizi* by 45%.

Conclusions: Our data suggests that CaclXIP belongs to a class of naturally inactive chitinases that have evolved to act in plant cell defence as xylanase inhibitors. Its role on inhibiting germination of fungal spores makes it an eligible candidate gene for the control of Asian rust.

ANEXO A

Identificação de cepas de Fungos Filamentosos *Aspergillus terreus*

1. Extração de DNA

Os micélio do isolado de *A. terreus*, foi crescido em frasco erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura mínimo (KH_2PO_4 1.51g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.52 g/L, NaCl 0.4 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 2.0mg/L, 0.04mg/L de Biotina, e 1 mL/L da solução de elementos traço contendo: $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 100mg/L, MnCl_2 50mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 mg/L e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 250mg/L. Extrato de levedura e lactose serão usados como fonte de nitrogênio e carbono nas concentrações de 4g/L e 20g/L, respectivamente) incubados a 30° e rotação de 180 rpm por 48 horas. O micélio foi recuperado por filtragem manual e mantido a -80°C.

Após a maceração do micélio em cadinho de porcelana, o DNA genômico foi extraído segundo protocolo de Mello-de-Sousa, 2012, onde foram homogeneizados 200 mg de micélio macerado em 1 mL de solução NDB a 4°C (250 mM sucrose, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0.05 mM CaCl_2 , 3 mM MgCl_2 , 0.5 mM DTT, 15 mM Tris-HCl pH 7.5). Em seguida foram adicionados 800 μL de fenol-clorofórmio (1:1), agitados por inversão e submetidos à centrifugação por 5 minutos a 12.000 $\times g$ e a fase aquosa coletado. Tal processo foi realizados duas vezes. Após ao segundo tratamento com fenol-clorofórmio, a fase aquosa foi submetido à tratamento com 800 μL de clorofórmio, agitados por inversão e submetidos à centrifugação por 5 minutos a 12.000 $\times g$. A fase aquosa foi coletada e tratada com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNase A a 37°C por 15 minutos. Após o tratamento com RNase A, foram adicionados 25 μL de Acetato de

Sódio 3M pH 5,2 e 550 µL de Etanol 70%, agitado por inversão e submetido a centrifugação por 15 minutos a 16.000 *xg*. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionou-se 1 ml de etanol a 95%, o qual foi submetido a centrifugação por 15 minutos a 16.000 *xg*. O sobrenadante foi descartado. Para ressuspender a amostra utilizou-se 100 µL de Tris 5mM pH 7,5.

2. PCR

A amplificação dos genes ocorreu utilizando-se os pares de *primers* ITS1F e ITS4 capazes de amplificar as regiões interespaçadoras dos genes do RNAr. Essas regiões não sofrem pressão evolutiva e são bem diferenciadas em indivíduos de espécies diferentes (tabela 1). As reações tiveram: 1 x tampão de Taq polimerase; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; 25 pmol de cada primer; 3 U de Taq Polimerase; e aproximadamente 5 ng de DNA formando 25 µL de solução (WHITE, 1990). As condições de PCR foram: 10 min de desnaturação inicial, seguidos de 40 ciclos de 240 segundos: Desnaturação 94°C, 60 seg.; Anelamento 55°C, 60 seg.; Extensão 72°C, 120 seg.; finalizado por 10 min. de extensão. (SMIT et al., 1999)

Nome	Direção	Sequencia 5' >> 3'	Tamanho do produto	Referência
ITS1F	À diante	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	~641 bp	GARDES et al., 1993
ITS4	Reverso	TCCTCCGCTTATTGATATGC		WHITE et al, 1990 SMIT et al,

Tabela 1. Sequência dos primers, direção e seus respectivos produtos aproximados em pares de base.

3. Purificação

Os produtos de PCR foram purificados com o Kit Cycle Pure Kit D6493-02 da Omega para preparo da reação de sequenciamento.

4. Sequenciamento Sanger 3130

O sequenciamento foi realizado no Centro de Genômica da Universidade Católica de Brasília, utilizando o método de Sanger (SANGER et al., 1977).

5. Análise das sequências

As sequências foram analisadas através da comparação das obtidas com as do banco de dados GenBank utilizando-se o software BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) Com o software BIOEDIT (HALL, 1999) as sequências de nucleotídeos foram examinadas. O software MEGA (Kumar et al., 2001) possibilitou a construção de árvores filogenéticas para análise das relações entre os fungos obtidos.

OBS.: Sequência obtida

```
ATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTG
GAAAAATAAAAGGTTGCAAAACTTGCGCCGGCGGGCGCCGGCCGGGCCT
GCAGAGCGGAAGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCG
CCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGCCGGGGGACGAGGACCCAACAC
ACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGG
AATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTC
TGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAA
```

CCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCAAAGAATCACACTCA
GACTGCAAGCTTTCAGAACAGGGTTCATGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGG
GCCCCGGGGGCGAGACGCCCCCGGCGGCCAGCAGGGCTGGCGGGCCCCGCC
GAAGCAACAAGGTACAATAGTCACGGGTGGGAGGTTGGGCCACGAGGACC
CGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGT

Referências:

SMIT, E. et al. Analysis of Fungal Diversity in the Wheat Rhizosphere by Sequencing of Cloned PCR-Amplified Genes Encoding 18S rRNA and Temperature Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2614–2621, 1999.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, p. 113-118.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; e WHITE T. J. (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**: Academic Press, Inc., New York, 1990. p. 315-322.

ANEXO B

Pré-tratamento e análise química composicional dos bagaços de cana-de-açúcar

1. Bagaço pré-tratado por explosão a vapor em escala industrial utilizando reator de 5000 litros – Usina Vale do Rosário

O bagaço de cana na sua forma “*in natura*”, com 50% de umidade utilizado para o pré-tratamento foi analisado quanto a sua composição (Rocha, Silva *et al.*, 1997; Gouveia, Nascimento *et al.*, 2009).

Composição química do bagaço “*in natura*” empregado:

Componentes	% em massa
Celulose	43,8 ± 1,1
Polioses	25,8 ± 0,8
Lignina total	22,1 ± 0,8
Cinzas	1,4 ± 0,2
Extrativos (ciclo hexano/etanol 2:1)	6,1 ± 0,3
Total	99,2 ± 0,8

O bagaço “*in natura*”, contendo aproximadamente 50% de umidade foi carregado em reator de 5000 litros fabricado pela Caldema Equipamentos Industriais Ltda., somando aproximadamente 1000 kg de bagaço úmido. O reator foi fechado pneumaticamente e pressurizado com vapor fluente até atingir uma pressão de 15,7

kg/cm². Manteve-se pressurizado durante 7 minutos (pressão final 15,3 kg/cm² (equivalente a 200°C)). Após este tempo o reator foi despressurizado subitamente, tendo a abertura total da válvula em aproximadamente 10 segundos. O material pré-tratado foi recolhido em um ciclone. Este material, 2500 kg (3 reações) foi transportado para a EEL/USP onde foi exaustivamente lavado até a remoção total dos componentes solubilizados na reação de auto hidrólise, seco ao ar livre e devidamente armazenado para futuras reações. Uma pequena quantidade deste material (3 amostras diferentes) foram caracterizadas quanto a sua composição química.

Rendimento médio das reações de pré-tratamento foi de 68%.

Composição química média de 3 reações:

Componentes	% em massa	Rendimento = 68%
Celulose	53,7 ± 0,6	36,5 ± 0,6
Poliose	8,9 ± 0,1	6,0 ± 0,1
Lignina	32,3 ± 0,3	22,0 ± 0,1
Cinzas	5,5 ± 0,2	22,0 ± 0,3
Extrativos (ciclo hexano/etanol 2:1)	ND	3,7 ± 0,2
Total	100,3 ± 0,4	ND

2. Bagaço pré-tratado com solução de ácido sulfúrico em escala piloto

O bagaço “*in natura*” empregado nestes experimentos apresentou a seguinte composição:

Composição química do bagaço “*in natura*” empregado nestes experimentos:

Componentes	% em massa
Celulose	43,4 ± 0,8
Polioses	23,7 ± 0,6
Lignina total	22,3 ± 0,2
Cinzas	3,1 ± 0,1
Extrativos (ciclo hexano/etanol 2:1)	4,5 ± 0,3
Total	100,6 ± 0,5

O pré-tratamento do bagaço na sua forma natural (BN) com aproximadamente 50% de umidade foi efetuado em escala piloto em um reator de ferro revestido de aço inoxidável com capacidade de 350L, com uma solução de ácido sulfúrico contendo 100 mg por grama de bagaço seco (1% m/v) e relação sólido/líquido de 1:10, a uma temperatura de 120°C por 10 minutos. Após este período, procedeu-se a separação do bagaço pré-tratado com solução de ácido sulfúrico (H⁺) da fração sólida por centrifugação.

Esse material foi lavado em uma centrífuga semi-industrial com capacidade de 100 litros a 1100 rpm até a completa remoção dos açúcares presentes. O rendimento do experimento piloto foi de 65%, sendo solubilizadas 35% de seus componentes.

Observação: os cálculos da segunda coluna são feitos a partir do rendimento do pré-tratamento. Desta forma podemos comparar com o bagaço “*in natura*”. Exemplo: 89,0 x 0,65 = 57,85
Composição química do bagaço pré-tratado com solução de ácido sulfúrico (H⁺)

Componentes	% em massa	Rendimento = 68%
-------------	------------	------------------

Celulose	58,4 ± 1,4	38,0 ± 1,2
Poliose	6,5 ± 0,3	4,2 ± 0,3
Lignina total	32,0 ± 0,2	20,8 ± 0,4
Cinzas	2,9 ± 0,3	1,9 ± 0,1
Total	99,3 ± 0,6	64,9 ± 0,8

Referências:

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Quim Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T.; ARAUJO, G. T.; CURVELO, A. A. S. **A fast and accurate method for determining the cellulose and polyoses through HPLC.** V Brazilian Symposium Proceedings on the Chemistry of Lignin and Other Wood Components. Curitiba. 5: 113-115 p. 1997.