

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

Felipe de Almeida Silva Corradini

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE
XILOSE E XILOOLIGÔMEROS USANDO XILANASES,
XILOSE ISOMERASE E LEVEDURA CO-
IMOBILIZADAS**

SÃO CARLOS -SP

2019

FELIPE DE ALMEIDA SILVA CORRADINI

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE XILOSE
E XILOOLIGÔMEROS USANDO XILANASES, XILOSE
ISOMERASE E LEVEDURA CO-IMOBILIZADAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Química da Universidade Federal de
São Carlos, para obtenção do título de doutor em
Engenharia Química.

Orientadora: Dra. Raquel de L. C. Giordano.

São Carlos-SP
2019

Corradini, Felipe de Almeida Silva

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE XILOSE E XILOOLIGÔMEROS USANDO XILANASES, XILOSE ISOMERASE E LEVEDURA CO-IMOBILIZADAS / Felipe de Almeida Silva Corradini. -- 2019.

197 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador: Raquel de L. C. Giordano

Banca examinadora: Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano; Dra. Teresa Cristina Zangirolami; Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves; Dra. Maria de Lourdes Texeira de Moraes Polizeli; Dr. Roberto de Campos Giordano

Bibliografia

1. xilanase. 2. SHIF. 3. etanol. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325

*Dedico este trabalho para minha amada
esposa Patricia e para meus queridos pais
Elis e Joaquim, pelo apoio e incentivo ao
longo dessa jornada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Soberano Senhor Jeová Deus, que me deu a vida e está sempre comigo, me ajudando a encarar cada dia e cada desafio que a vida me colocou. *“Teus, ó Jeová, são a grandeza, o poder, a glória, o esplendor e a majestade; pois tudo o que há nos céus e na terra pertence a ti. Tu és o reino, ó Jeová. Tu te elevas como cabeça acima de todos. As riquezas e a glória vêm de ti, e tu dominas sobre tudo. Nas tuas mãos há força e poder, e nas tuas mãos há a capacidade para engrandecer e para fortalecer a todos. E agora, ó nosso Deus, nós te agradecemos e louvamos o teu belo nome.”* (1 Crônicas 29:11-13)

À minha amada esposa Patricia Corradini, meu amor, minha amiga, parceira e confidente; que divide comigo as alegrias da vida e enfrenta os desafios do dia-a-dia, com confiança e bom humor. Obrigado por me entender tão bem, pelo incentivo, por aguentar meu humor e minhas (milhares) de manias!

Aos meus queridos pais, Elis e Joaquim Silva, por terem me incentivado em cada etapa da vida, não poupando esforços, incentivo e apoio às escolhas que fiz. Sua confiança em mim e palavras de carinho com certeza me ajudaram em todos os momentos.

À professora Raquel de L. C. Giordano, pela oportunidade e confiança ao longo de minha trajetória acadêmica. Agradeço a paciência, aos exemplos, ensinamentos e orientação ao longo desses 6 anos de UFSCar.

Aos professores Paulo W. Tardioli, Tereza C. Zangirolami e Roberto de C. Giordano, que se fizeram presentes ao longo de toda minha formação; sempre dispostos a ajudar, ensinar e colaborar para a execução desse projeto.

À Dra. Viviane M. Gonçalves e toda a equipe do Laboratório de Bioprocessos do Instituto Butantan pela prontidão, suporte e por me receberem tão bem durante o período em que estive realizando os ensaios de purificação da β -xilosidase.

À amiga Thais Milessi Esteves, pela parceria, ombro amigo e gigantesca ajuda em inúmeros experimentos. Ao amigo Willian Kopp, pela amizade e disposição em ajudar quando necessário, sempre disposto e positivo.

Aos colegas de DEQ/PPGEQ Geisa, Ananda, Thalita, Agnes, William, Andreza, Matheus, Kaio, Ricardo e Ivan. Agradeço aos colegas do Labenz pela companhia. Também aos alunos do Lafac, em especial à Caroline Perez pelo suporte para a realização dos últimos ensaios de *SHIF/SHF*, sem o qual com certeza teriam sido muito mais difíceis de serem realizados. À Cíntia Sargo pelo trabalho realizado em parceria e por ter compartilhado parte de seus conhecimentos comigo.

Um muito obrigado a todos os professores do PPGEQ, por terem feito parte de minha formação acadêmica com ensinamentos. Aos técnicos e funcionários do DEQ pelo apoio técnico dispensado.

Aos amigos de São Carlos, Mogi das Cruzes e São Paulo pelo apoio e palavras de incentivo.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro.

À DUPONT/GENENCOR e à NOVOZYMES pela doação dos complexos enzimáticos utilizados nesse trabalho. À International Paper e à Companhia Suzano pela gentil doação da polpa branqueada de celulose, essencial para o desenvolvimento de uma etapa deste trabalho. Ao Kerry Group pela doação da peptona Hy Soy.

À KOPP Technologies por fornecer parte dos materiais utilizados nos ensaios de imobilização e reciclo realizados nesse projeto.

Finalmente, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, que embora não citados jamais serão esquecidos.

“Da mesma forma, quando vocês tiverem feito todas as coisas que lhes foram designadas, digam: ‘Somos escravos imprestáveis. O que fizemos é o que devíamos fazer.’” – Lucas 17:10



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Relatório de Defesa de Tese

Candidato: Felipe de Almeida Silva Corradini

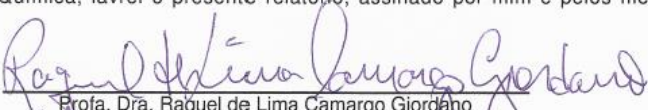
Aos 24/04/2019, às 14:00, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, a defesa de tese de doutorado sob o título: Estudo da produção de etanol a partir de xilose e xilooligômeros usando xilanases, xilose isomerase e levedura co-imobilizadas, apresentada pelo candidato Felipe de Almeida Silva Corradini. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

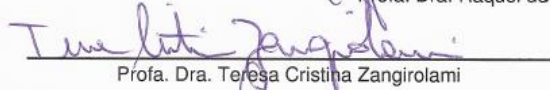
| Participantes da Banca | Função | Instituição | Resultado |
|--|------------|-------------|-----------|
| Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano | Presidente | UFSCar | APROVADO |
| Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami | Titular | UFSCar | APROVADO |
| Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves | Titular | UFC | APROVADO |
| Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli | Titular | USP | APROVADO |
| Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano | Titular | UFSCar | APROVADO |

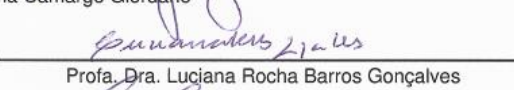
Resultado Final: APROVADO

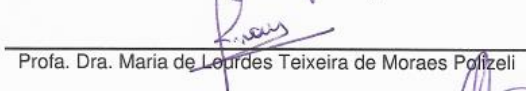
Parecer da Comissão Julgadora*:

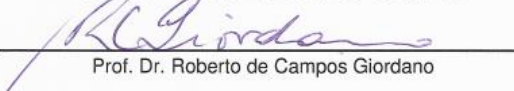
Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, Raquel Ferreira dos Santos Diniz, representante do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.



Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano


Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami


Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves


Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli


Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano


Representante do PPG: Raquel Ferreira dos Santos Diniz

Não houve alteração no título da tese () Houve. O novo título passa a ser:

Observações:

- Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.
- Para gozar dos direitos do título de Mestre ou Doutor em Engenharia Química, o candidato ainda precisa ter sua dissertação ou tese homologada pelo Conselho de Pós-Graduação da UFSCar.

RESUMO

A produção de etanol a partir de xilose com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* se iniciou no grupo com o processo SIF (simultâneas isomerização e fermentação). Esse processo permite total conversão da xilose, mas se mostrou vulnerável a contaminação por bactérias. Propôs-se então como alternativa para a fermentação de pentoses por levedura comercial o processo de hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas (*SHIF*) de xilooligômeros. Nesse processo, um complexo de xilanases hidrolisa o substrato a xilose, a qual, pela ação de xilose isomerase, é transformada em xilulose, que é fermentada então a etanol por *S.cerevisiae*. Todas as reações ocorrem dentro do biocatalizador onde se encontram co-imobilizados enzimas e levedura. Foi possível a produção de etanol por esse processo, mas os primeiros ensaios mostraram que a conversão de substrato era incompleta, requerendo investigação das possíveis causas do problema. A ineficiência da etapa de hidrólise, catalisada por endo-/exoxilanases e β -xilosidase, etapa não existente no processo *SIF*, foi a primeira hipótese verificada. A necessidade de produzir um substrato padrão para estudo dessa etapa reacional foi o primeiro desafio enfrentado, pois a xilana de bétula, substrato comercial até então usado, foi descontinuada. Um substrato foi desenvolvido em laboratório, a partir da polpa branqueada de eucalipto. Xilana foi extraída com solução de NaOH a 4% m.v⁻¹ a 25°C, precipitada com ácido acético glacial e liofilizada. Um pré-tratamento térmico em autoclave (15 min, 121 °C, 1 atm) permitiu aumentar a solubilidade das cadeias de carboidrato. A xilana assim obtida foi hidrolisada por xilanases na mesma velocidade que a xilana comercial de bétula, e tornou possível iniciar-se a investigação da reação de hidrólise. O acúmulo de xilobiose observado indicou que a ineficiência da hidrólise era devida à pequena concentração de β -xilosidase nos complexos enzimáticos comerciais. Após se obter *Escherichia coli* clonada com gene de β -xilosidase de *Bacillus subtilis*, a enzima recombinante foi produzida, purificada e caracterizada. Os resultados obtidos mostraram reduzida atividade da enzima no pH do processo e baixa estabilidade operacional. A imobilização e estabilização de β -xilosidase em suporte agarose-glioxil mostrou-se eficiente, pois aumentou consideravelmente a estabilidade térmica da enzima a 35 °C (164x) e 50 °C (3605x), não havendo perda significativa de atividade do derivado após 10 ciclos de hidrólise consecutivos. O complexo xilanolítico comercial Multifect, responsável principalmente pela ação endoxilanase, foi imobilizado em quitosana-glutaraldeído. Essa técnica não permite significativo aumento na estabilidade das enzimas do complexo com a imobilização, mas como as xilanases solúveis já têm boa estabilidade a 35 °C, não foram testados novos protocolos. Os derivados obtidos apresentaram atividades recuperadas máximas de 50%. Testes de atividades em diferentes temperaturas não indicaram presença de efeitos difusivos, sendo, possivelmente, a distorção da enzima devido à formação de múltiplas ligações com o suporte a provável justificativa para a perda de 50% de atividade com a imobilização. O derivado obtido permitiu hidrolisar o licor hidrotérmico em XOS menores ($X < 6$), com rendimentos em XOS de 56,3% e de xilose de 12,9%. A elevada concentração de xilobiose (28,8 g.L⁻¹) acumulada indicou necessidade de complementar o complexo com mais β -xilosidase. Hidrólises complementadas com derivado de β -xilosidase aumentaram os rendimentos de xilose para 34,2%, produzindo 46,5 g.L⁻¹ de xilose e reduzindo xilobiose para 7,4 g.L⁻¹. A não obtenção de conversão completa de xilooligômeros em xilose pode ser devida a efeitos inibitórios

de produto ou limitação da ação das endoxilanasas pela sua especificidade frente ao substrato. Os resultados obtidos, contudo, foram considerados satisfatórios para estudos iniciais do processo SHIF. Outra possível explicação para a parada SHIF viriam dos efeitos inibitórios de íons cálcio e/ou subprodutos da reação de hidrólise (XOS) sobre a ação de xilose isomerase-XI. Ensaio de isomerização com Ca^{2+} mostraram realmente ocorrer redução da velocidade da reação de isomerização, havendo competição entre os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} pelo sítio metálico no interior da enzima. A velocidade de isomerização foi afetada por X_2 apenas em elevadas concentrações de substrato ($C_s > 50 \text{ g.L}^{-1}$), caracterizando a inibição incompetitiva ($R^2 = 0,99$). A velocidade de isomerização se mostrou bastante reduzida nas condições de SHIF (pH 5,6 35 °C), sendo ainda mais afetada pelo efeito combinado das presenças de íons Ca^{2+} e X_2 , embora não cesse completamente a reação. Esses efeitos não devem, portanto, serem os responsáveis pela conversão incompleta do substrato. Novos ensaios do processo SHIF confirmaram a importância do derivado de β -xilosidase na composição do biocatalisador, observando-se aumento da produção de etanol. A adição de mais levedura ao reator elevou o consumo das pentoses e conduziu ao aumento da produção de etanol para $0,221 \text{ g.g}^{-1}$ e $0,153 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), indicando que a estagnação do processo SHIF poderia estar também relacionada à reduzida velocidade de fermentação de xilulose. Decidiu-se, nesse ponto, comparar o desempenho de *S. cerevisiae* modificada geneticamente com o da levedura comercial na fermentação de xilooligômeros obtidos por tratamento hidrotérmico de bagaço de cana. O processo SHIF novamente mostrou estagnação, atingindo apenas 5 g.L^{-1} de etanol. Utilizando-se a levedura recombinante, tem-se o processo de hidrólise e fermentação simultâneas (SHF), uma vez que esse microrganismo faz a isomerização *in vivo*. Nesse processo houve aumento da concentração de etanol para 15 g.L^{-1} , o qual foi gerado de xilose já presente no licor hidrotérmico e da hidrólise parcial de xilooligômeros, mas também com a levedura recombinante observou-se estagnação, com acúmulo de xilose em solução. Esses resultados indicam assim que o processo de hidrólise gera alguma condição que afeta a fermentação. O controle do pH permitiu pequeno aumento da conversão nos processos SHIF e SHF, mas não impediu a estagnação. Após os ensaios, 95% da levedura selvagem e 50% da modificada geneticamente permaneceram viáveis. Observou-se que a redução na velocidade de fermentação pode estar relacionada com um observado aumento na concentração de ácido acético gerado na etapa de hidrólise e que estaria afetando tanto a levedura comercial quanto a recombinante. Assim, embora não tenha conseguido total elucidação dos fenômenos presentes nesse complexo processo, este trabalho permitiu um grande aumento no conhecimento do processo SHIF, fornecendo importantes indicações para a necessária continuidade do seu estudo, tendo em vista a total conversão de xilooligômeros.

Palavras-chave: SHIF, SHF, xilanase, β -xilosidase, xilose isomerase, etanol

ABSTRACT

The production of ethanol from xylose with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was initiated in the group with the SIF process (simultaneous isomerization and fermentation). This process allows total conversion of xylose, but has been shown to be vulnerable to bacterial contamination. The process of simultaneous hydrolysis, isomerization and fermentation (SHIF) of xylooligomers was then proposed as an alternative for the fermentation of pentoses by commercial yeast. In this process, a xylanase cocktail hydrolyses the substrate to xylose, which, by the action of xylose isomerase, is transformed into xylulose, which is then fermented to ethanol by *S.cerevisiae*. All reactions take place within the biocatalyst where enzymes and yeast are co-immobilized. It was possible to produce ethanol by this process, but the first tests showed that the substrate conversion was incomplete, requiring investigation of the possible causes of the problem. The inefficiency of the hydrolysis stage, catalyzed by endo- / exoxylanases and β -xylosidase, a non-existent step in the SIF process, was the first hypothesis verified. The need to produce a standard substrate for the study of this reaction stage was the first challenge faced, since birchwood xylan, a commercial substrate previously used, was discontinued. A substrate was then produced in the laboratory from bleached eucalyptus pulp. Xylan was extracted with 4% NaOH solution at 25 °C, precipitated with glacial acetic acid and lyophilized. An autoclave heat pretreatment (15 min, 121 °C, 1 atm) allowed to increase the solubility of the carbohydrate chains. The xylan thus obtained was hydrolyzed by xylanases at the same rate as the commercial birchwood xylan, and made it possible to begin the investigation of the hydrolysis reaction. The observed xylobiose accumulation indicated that the inefficiency of the hydrolysis was due to the low concentration of β -xylosidase in the commercial enzymatic complexes. After cloning the *Bacillus subtilis* β -xylosidase gene in *Escherichia coli*, the recombinant enzyme was produced, purified and characterized. The results showed reduced enzyme activity at the process pH and low operational stability. The immobilization and stabilization of β -xylosidase in agarose-glyoxyl support proved to be efficient, as it considerably increased the thermal stability of the enzyme at 35 °C (164x) and 50 °C (3605x), with no significant loss of activity of the derivative after 10 consecutive hydrolysis cycles. The commercial xylanolytic complex Multifect, mainly responsible for the endoxylanase action, was immobilized on chitosan-glutaraldehyde. This technique does not allow a significant increase in the stability of complex enzymes with immobilization, but since soluble xylanases already have good stability at 35 °C, no new protocols have been tested. The obtained derivatives presented recovered activities maximum of 50%. Activity assays at different temperatures did not indicate the presence of diffusive effects, possibly being the enzymatic distortion due to the formation of multiple bonds with the support a probable reason for the 50% loss of immobilization activity. The obtained derivative was capable to hydrolyze the hydrothermal liquor in smaller XOS ($X < 6$), with XOS yields of 56.3% and xylose of 12.9%. The high concentration of xylobiose (28.8 g.L⁻¹) accumulated indicated a need to complement the enzymatic cocktail with more β -xylosidase. Hydrolyses supplemented with β -xylosidase derivative increased yields of xylose to 34.2%, yielding 46.5 g.L⁻¹ xylose and reducing xylobiose to 7.4 g.L⁻¹. The failure to obtain complete conversion of xylooligomers into xylose may be due to inhibitory effects of the product or limitation of the action of endoxylanases by their specificity to the substrate. The results obtained, however, were considered

satisfactory for initial studies of the SHIF process. Another possible explanation for the SHIF halt would be the inhibitory effects of calcium ions and / or the hydrolysis reaction byproducts (e.g. XOS) on the action of xylose isomerase. Ca^{2+} isomerization tests showed that the reduction of the isomerization reaction rate truly occurs, with competition between the Ca^{2+} and Mg^{2+} ions for the metal site inside the enzyme. The isomerization velocity was affected by X_2 only at high substrate concentrations ($C_S > 50 \text{ g.L}^{-1}$), characterizing the competitive inhibition ($R^2 = 0.99$). The isomerization rate was significantly reduced under SHIF conditions (pH 5.6 35 ° C) and was even more affected by the combined effect of the presence of Ca^{2+} and X_2 ions, although the reaction did not completely stop. These effects should therefore not be responsible for the incomplete conversion of the substrate. New assays of the SHIF process confirmed the importance of the β -xylosidase derivative in the biocatalyst composition, with an increase in ethanol production. The addition of more yeast to the reactor increased the consumption of the pentoses and led to an increase in ethanol production to 0.221 g.g^{-1} and $0.153 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), indicating that the SHIF process stagnation could also be related to the reduced speed of xylulose fermentation. It was decided at this point to compare the performance of genetically modified *S. cerevisiae* with that of commercial yeast in the fermentation of xylooligomers obtained by hydrothermal treatment of sugarcane bagasse. The SHIF process again showed stagnation, reaching only 5 g.L^{-1} of ethanol. Using the recombinant yeast, the simultaneous hydrolysis and fermentation-SHF process is performed, since this microorganism does *the in vivo* isomerization. In this process, ethanol concentration was increased to 15 g.L^{-1} , generated from xylose already present in the hydrothermal liquor and the partial hydrolysis of xylooligomers. However, with the recombinant yeast stagnation was also observed, with accumulation of xylose in solution. These results thus indicate that the hydrolysis process generates some condition affecting the fermentation. The pH control allowed a small increase of the conversion in the SHIF and SHF processes, but did not prevent the stagnation. After the tests, 95% of the wild yeast and 50% of the genetically modified yeast remained viable. It has been observed that the reduction in fermentation rate may be related to an observed increase in acetic acid concentration generated in the hydrolysis step and which would be affecting both commercial and recombinant yeast. Thus, although it has not achieved full elucidation of the phenomena present in this complex process, this work allowed a great increase in the knowledge of the SHIF process, providing important indications for the necessary continuity of its study, in view of the total conversion of xylooligomers.

Keywords: SHIF, SHF, xylanase, β -xylosidase, xylose isomerase, ethanol

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Esquema do processo de hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas (SHIF) utilizando biocatalisador contendo derivados de xilanase, xilose isomerase e *S. cerevisiae* co-imobilizados em gel de aginato de cálcio..... 28
- Figura 3.1** Espectro de FT-IR para (1) bétula comercial e xilana de eucalipto precipitada com (2) HOAc, (3) HCl e (4) H₂SO₄..... 62
- Figura 3.2.** Curvas de TGA (A) e DTG (B) para xilana de bétula e de eucalipto. Xilanas de eucalipto foram extraídas com 4% m.v⁻¹ NaOH (25°C, 20h) e precipitadas com pH final entre 5,0 – 7,0 com HOAc. 63
- Figura 3.3.** Efeito do pH do ponto final de precipitação da Euc-xilana nas atividades da xilanase Multifect, medida na suspensão (cinza) e no sobrenadante filtrado (branco). A xilana de bétula não-autoclavada foi utilizada como referência. 64
- Figura 3.4.** Solubilização de Euc-xilana (121 °C, 1 atm, 15 min). Atividade enzimática medida com xilanase Multifect na suspensão (cinza) e o sobrenadante filtrado (branco). A xilana de bétula não-autoclavada foi utilizada como referência. 65
- Figura 3.5.** Atividades enzimáticas de xilanas comerciais em (A) xilana de bétula não autoclavada, Euc-xilana (B) SUZ e (C) IPAPER antes e depois da solubilização (121 ° C, 1 atm, 15 minutos) na suspensão (cinza) e o sobrenadante filtrado (branco). 67
- Figura 3.6.** Espectros de RMN-HSQC de (A) xilana de bétula, Euc-xilanas (B) SUZ e (C) IPAPER em DMSO-d₆ a 80 °C. 69
- Figura 4.1.** Cinética de imobilização de β-xilosidase. (A) Variação da atividade enzimática residual relativa (%) em função do tempo nos ensaios de imobilização da β-xilosidase em suportes ativados com grupos glioxil: (○) sobrenadante, Aga-glio, (∇) sobrenadante, Quit-glio, (□) solução controle Aga-glio e (△) solução controle Quit-glio. Condições de imobilização: tampão bicarbonato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 10,05 a 25 °C. (B) Atividade enzimática residual, suportes ativados com glutaraldeído: (○) sobrenadante, Aga-glut, (∇) sobrenadante, Quit-glio, (□) solução controle Aga-glio e (△) solução controle Quit-glio. Condições de imobilização: tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0 a 25 °C. Barra de erro: desvio padrão das triplicatas..... 83
- Figura 4.2.** (A) Representação em fitas da estrutura tridimensional da β-xilosidase de *Bacillus subtilis* (1YIF no PDB), contendo as 4 subunidades apresentadas em cores distintas. (B) Representação da superfície das 4 subunidades da β-xilosidase. Em vermelho são os resíduos de lisina e em azul amino terminais de cada subunidade (os demais encontram-se na face oposta da enzima)..... 85
- Figura 4.3.** Influência do pH (A) e temperatura (B) na atividade da β-xilosidase livre e imobilizada em suportes Aga-glio, Aga-glut e Quit-glut. (A) Atividades enzimáticas medidas a 35 °C, substrato p-NPX 5 mmol.L⁻¹ preparado nos tampões 50 mmol.L⁻¹: citrato de sódio pHs 4 e 5, fosfato de sódio pHs 6-8, bicarbonato de sódio pH 9 e 10. (B) Atividades medidas a 10 - 80°C em substrato p-NPX 5 mmol, tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 6,0. 89
- Figura 4.4.** Inativação térmica da β-xilosidase livre (A) e imobilizada (B) em suportes Aga-glio (□), Aga-glut (○) e Quit-glut (△). Condições experimentais: 50°C, tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 6.0. Atividades medidas pela hidrólise do p-NPX 5

mmol.L⁻¹a 35 °C. As atividades iniciais foram definidas como 100% de atividade relativa..... 91

Figura 4.5. Inativação térmica da β -xilosidase livre (A) e dos derivados (B) β -aga-glio (\square) e β -quit-glut (\circ). Condições experimentais: 35 °C, tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 6.0. Atividades medidas pela hidrólise do p-NPX a 35 °C. As atividades iniciais foram definidas como 100% de atividade relativa..... 92

Figura 4.6. Curso de tempo da hidrólise da xilana de milho (40 g.L⁻¹) catalisada pela β -xilosidase livre (\square) e imobilizada em suporte Aga-glio (\circ) e Quit-glut (Δ) realizados em pH 5,6 a 35 °C. Concentração de catalisador: 1 U.L⁻¹. Barras de erro: desvio padrão dos ensaios. 93

Figura 4.7. Ciclos consecutivos de hidrólise de xilana de milho (40 g.L⁻¹) catalisada pelos derivados β -aga-glio (preenchido) e β -quit-glut (vazado) realizados em pH 5,6 a 35 °C. Concentração de catalisador: 1 U.L⁻¹. Após cada ciclo de hidrólise (4h), o sobrenadante foi filtrado e os derivados lavados com tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 6,0 25 °C; e uma nova batelada iniciada. Barras de erro: desvio padrão dos ensaios. 95

Figura 5.1. Esquema de degradação enzimática de arabinoglucuronoxilana por xilanases de famílias de GH 10 e 11. Ácido glucurônicos e acetilações não apresentados. A hidrólise para monossacarídeos requer ação de dois tipos de α -L-arabinofuranosidases e β -xilosidase 101

Figura 5.2. (A) Eletroforese SDS-PAGE do complexo xilanolítico Multifect CX XL. (B) A representação da superfície da endoxlanase de *Trichoderma reesei*. Resíduos de lisina destacados em vermelho sítio ativo amarelo e resíduo treonina (amino-terminal) em azul (código de acesso PDB: 2DFB). 110

Figura 6.1. (A) Atividade relativa da xilose isomerase solúvel em função do pH (T: 60 °C). Condições: xilose 2 mol.L⁻¹ (300,3 g.L⁻¹) preparada nos tampões 50 mmol.L⁻¹ citrato de sódio (pH 4,0 e 5,0), tris-maleato (pH 6,0, 7,0 e 8,0) e carbonato-bicarbonato de sódio (pH 9,0 e 10,0), contendo MgCl₂.6H₂O 50 mmol.L⁻¹ e CoCl₂.6H₂O 2,5 mmol.L⁻¹. (B) Efeito da temperatura sobre a atividade catalítica da XI solúvel. Atividades determinadas em função das velocidades iniciais de isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose. Condições: xilose 2 mol.L⁻¹ (300,3 g.L⁻¹) preparada em tampão tris-maleato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 contendo MgCl₂.6H₂O 50 mmol.L⁻¹ e CoCl₂.6H₂O 2,5 mmol.L⁻¹. Barras de erro: desvio padrão das triplicatas. 126

Figura 6.2. Ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten para a reação de isomerização de frutose \rightleftharpoons glicose, catalisada por xilose isomerase a (\circ) 35 e (\square) 60 °C. Intervalo S₀: 18 – 540 g.L⁻¹, tampão tris-maleato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 contendo MgCl₂.6H₂O 50 mmol.L⁻¹ e CoCl₂.6H₂O 2,5 mmol.L⁻¹. Barras de erro: desvio padrão das triplicatas. 127

Figura 6.3. Influência do íon Ca²⁺ (2, 4 e 8 g.L⁻¹) sobre as velocidades iniciais de isomerização de frutose \rightleftharpoons glicose a (A) 35 °C e (B) 60 °C. Intervalo S₀: 18 – 540 g.L⁻¹, tampão tris-maleato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 contendo MgCl₂.6H₂O 50 mmol.L⁻¹ e CoCl₂.6H₂O 2,5 mmol.L⁻¹. Legenda: (\circ) sem inibidor, Ca²⁺ (\square) 2 g.L⁻¹, (Δ) 4 g.L⁻¹ (∇) 8 g.L⁻¹. Barras de erro: desvio padrão das triplicatas. 129

Figura 6.4. Modelo cinético de Michaelis-Menten para reação de isomerização de xilose xilulose a (Δ) 35 e (\circ) 60 °C. Intervalo S₀: 15 – 300 g.L⁻¹, tampão tris-maleato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 contendo 50 mmol.L⁻¹ MgCl₂.6H₂O e 2,5 mmol.L⁻¹ CoCl₂.6H₂O. Barras de erro: desvio padrão das triplicatas. 131

- Figura 6.5.** Influência do íon Ca^{2+} (2 – 16 g.L^{-1}) nas taxas iniciais de isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose a 35 °C. Intervalo S_0 : 15 – 300 g.L^{-1} , tampão tris-maleato 50 mmol.L^{-1} pH 7,0 contendo 50 mmol.L^{-1} de $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ e 2,5 mmol.L^{-1} de $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$. Legenda: (\square) sem inibidor, Ca^{2+} (\circ) 2 g.L^{-1} , (Δ) 4 g.L^{-1} (∇) 8 g.L^{-1} e (\diamond) 16 g.L^{-1} . Barras de erro: desvio padrão das triplicatas. 132
- Figura 6.6.** Influência da xilobiose (X_2) (1,6, 3,4, 6,5 e 9,1 g.L^{-1}) nas velocidades iniciais de isomerização da xilose \rightleftharpoons xilulose catalisada por XI a 35 °C. Intervalo S_0 : 15 – 300 g.L^{-1} , tampão tris-maleato 50 mmol.L^{-1} pH 7,0 contendo 50 mmol.L^{-1} de $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ e 2,5 mmol.L^{-1} $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$. Legenda: (\circ) sem inibidor, X_2 (\square) 1,6 g.L^{-1} , (Δ) 3,4 g.L^{-1} (∇) 6,5 g.L^{-1} e (\diamond) 9,1 g.L^{-1} . Barras de erro: desvio padrão das triplicatas. 134
- Figura 6.7.** Ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten para reação de isomerização de xilose xilulose a 35 °C em pH (\circ) 7,0 e (\square) 5,6. Intervalo S_0 : 15 – 300 g.L^{-1} , tampão tris-maleato 50 mmol.L^{-1} pH 7,0 contendo 50 mmol.L^{-1} $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ e 2,5 mmol.L^{-1} $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$. Barras de erro: desvio padrão das triplicatas. 135
- Figura 6.8.** Efeito da adição de íons Ca^{2+} (4 g.L^{-1}) e X_2 (4 g.L^{-1}) sobre a atividade de isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose catalisada pela XI solúvel em pH 5,6 e T: 35°C. Ajuste do modelo de inibição (A) competitiva causada por íons Ca^{2+} , (B) incompetitiva causada por X_2 , (C) inibição mista causada por Ca^{2+} e X_2 . (D) sobreposição das curvas de inibição apresentadas em (A), (B) e (C). Intervalo S_0 : 18-540 g.L^{-1} , tampão citrato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 5,6 contendo 50 mmol.L^{-1} de $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ e 2,5 mmol.L^{-1} de $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ 136
- Figura 7.1.** Esquema simplificado do metabolismo de xilose e glicose pela integração das vias glicolítica e pentose fosfato..... 142
- Figura 7.2.** Microreatores utilizados nas reações SHIF e SHF do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar..... 149
- Figura 7.3.** Sistema utilizado para reações de SHIF e SHF com controle de pH. (A) Detalhe do reator de leito fixo preenchido com os grânulos de biocatalisador e substrato, (B) reator encamisado lidado conectado ao sistema de controle do pH do meio reacional (pHstato) e (C) sistema completo utilizado nos ensaios de SHIF e SHF do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar..... 150
- Figura 7.4.** Concentrações de produtos xilose, xilulose, xilitol, glicerol e etanol (g.L^{-1}) e do pH (A) e dos XOS (g.L^{-1}) (B) ao longo do processo SHIFa partir de xilana de eucalipto utilizando biocatalisador contendo 5% m.m^{-1} xilanases, 5% m.m^{-1} β -xilosidase, 10 m.m^{-1} XI e 10% m.m^{-1} de levedura, em batelada a 150 rpm e 35°C..... 156
- Figura 7.5.** Concentrações de produtos xilose, xilulose, xilitol, glicerol e etanol (g.L^{-1}) e do pH (A) e dos XOS (g.L^{-1}) (B) ao longo do processo SHIF (ensaio controle) a partir de xilana de eucalipto utilizando biocatalisador contendo 5% m.m^{-1} xilanases, 10 m.m^{-1} XI e 10% m.m^{-1} de levedura, em batelada a 150 rpm e 35°C. 157
- Figura 7.6.** Concentrações de glicose, xilose, xilulose, xilitol, glicerol, etanol e ácido acético (g.L^{-1}) e pH (A) e XOS (g.L^{-1}) (B) ao longo do ensaio SHIF do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar, com intervenção em 24h horas para adição de levedura livre, com aumento do pH. Biocatalisador composto de 10,2% m.m^{-1} de derivado xilanolítico Multifect, 0,5% m.m^{-1} de derivado XI e 0,43% m.m^{-1} de derivado de β -xilosidase, 10% m.m^{-1} de *S. cerevisiae*. Processo realizado a 35 °C e 150 rpm. 160
- Figura 7.7.** Concentrações de glicose, xilose, xilulose, xilitol, glicerol, etanol e ácido acético (g.L^{-1}) e pH (A) e XOS (g.L^{-1}) (B) ao longo do ensaio controle –SHIF (ausência do

complexo xilanolítico Multifect) do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar, com intervenção em 24h horas para adição de levedura livre, com aumento do pH. Biocatalisador composto de 0,5% m.m⁻¹ de derivado XI e 0,43% % m.m⁻¹ de derivado de β-xilosidase, 10% m.m⁻¹ de *S. cerevisiae*. Processo realizado a 35 °C e 150 rpm. 161

Figura 7.8. Massa de CO₂ (g) liberada ao longo do tempo nos processos SHIF (■) e SHF (●) do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar (35 °C, 150 rpm e pH 5,6). Biocatalisador composto de 5% m.m⁻¹ de derivado xilanolítico Multifect, 2,0% m.m⁻¹ de derivado XI e 0,5% % m.m⁻¹ de derivado de β-xilosidase, 10% m.m⁻¹ de *S. cerevisiae* selvegem ou recombinante. Processo realizado a 35 °C e 150 rpm. 166

Figura 7.9. Concentrações de (A) xilose e xilulose (g.L⁻¹), e de (B) glicose, arabinose, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol (g.L⁻¹) e de (C) XOs (g.L⁻¹) ao longo do tempo (h) no ensaio SHIF, com controle de pH, do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar. Biocatalisador composto dos derivados Multifect (5% m.m⁻¹), β-xilosidase (0,5% m.m⁻¹), XI (2,0% m.m⁻¹) e 15% m.m⁻¹ de levedura *Sc-lta*. Ensaio realizado a 35 °C e pH 5,6. 170

Figura 7.10. Concentrações de (A) xilose, xilulose (g.L⁻¹) e de (B) glicose, arabionose, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol (g.L⁻¹) e de (C) XOS (g.L⁻¹) ao longo do tempo (h) ao longo do ensaio SHF com controle de pH do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar. Biocatalisador composto dos derivados Multifect 5% m.m⁻¹, β-xilosidase 0,5% m.m⁻¹, XI 2,0% m.m⁻¹ e 15% m.m⁻¹ de levedura *Sc-T18*. Ensaio realizado em reator de leito fixo com recirculação a 35 °C pH 5,6..... 172

Figura 8.1. Esquema de degradação enzimática de arabinoglucuronoxilana por xilanases de famílias de GH 10 e 11. Ácido glucurônicos e acetilações não apresentados. A hidrólise para monossacarídeos requer ação de dois tipos de α-L-arabinofuranosidases e β-xilosidase 182

Figura 8.2. Influência do pH sobre a atividade catalítica das xilanases de (A) *Aspergillus niger*, (B) *Aspergillus ochraceus* e (C) *Aspergillus phoenicis*. Atividade catalítica determinada pela hidrólise de xilana de madeira de bétula a 1% m.v⁻¹ (10 g.L⁻¹) a 50 °C, tampões 50 mmol.L⁻¹: citrato de sódio pH 4,0 e 5,0, fosfato de sódio pH 6,0, 7,0 e 8,0. Atividades normalizadas em relação à máxima atividade medida. ... 188

Figura 8.3. Evolução da hidrólise de xilana de madeira de faia (25 g / L) em função do tempo catalisada por complexos xilanolíticos de (A) *A. niger*, (B) *A. ochraceus* e (C) *A. phoenicis* (150 UI.g_{xilana}⁻¹) - 50 °C pH 5,6. 190

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 2.3 Efeito dos pré-tratamentos sobre os rendimento de solubilização da xilana de cana-de-açúcar..... | 49 |
| Tabela 3.1. Composição química (% em massa) de polpa de eucalipto de duas diferentes indústrias de papel / celulose..... | 60 |
| Tabela 4.1. Efeito da matriz e dos grupos ativadores do suporte sobre o rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados de β -xilosidase. | 84 |
| Tabela 4.2. Influência da carga enzimática sobre os parâmetros de imobilização da β -xilosidase imobilizada em agarose-glioxil, agarose-glutaraldeído e quitosana-glutaraldeído..... | 88 |
| Tabela 5.1. Parâmetros de imobilização do complexo xilanólítico Multifect CX XL em suportes agarose-glioxil e quitosana-glutaraldeído. Carga proteica oferecida: $1 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ | 109 |
| Tabela 5.2. Influência da carga enzimático sobre os parâmetros de imobilização do complexo xilanólítico Multifect CX XL em suporte quitosana-glutaraldeído. | 112 |
| Tabela 5.3. Influência da temperatura sobre as atividades recuperadas dos derivados Multifect imobilizados em quitosana-glutaraldeído. Atividade de hidrólise da xilana de eucalipto medidas a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ | 113 |
| Tabela 5.4. Perfil de XOS produzidos após 24h de hidrólise enzimática do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar ($67,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) catalisada pela ação da xilanase Multifect livre, imobilizada e combinada com o derivado de β -xilosidase (ambos em alta carga, $50 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$)..... | 114 |
| Tabela 6.1. Parâmetros cinéticos da isomerização de frutose \rightleftharpoons glicose e xilose \rightleftharpoons xilulose catalisado por xilose isomerase a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ | 128 |
| Tabela 7.1. Atividades dos derivados e percentagem mássica componentes dos catalisadores da SHIF. | 155 |
| Tabela 7.2. Atividades das enzimas imobilizadas ($\text{U} \cdot \text{mL}_{\text{Reator}}^{-1}$) e percentagem mássica de cada componente dos do biocatalisdor utilizados na SHIF. | 159 |
| Tabela 7.3. Parâmetros da SHIF e SHIF-Controle do licor hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar antes e após a intervenção para adição de mais células de levedura. | 163 |
| Tabela 7.4. Atividades dos derivados e percentagem mássica componentes dos catalisadores da SHIF e SHF | 165 |
| Tabela 7.5. Concentrações de carboidratos e produtos formados nas reações de SHIF e SHF. | 166 |
| Tabela 7.6. Concentrações de xilose e XOS presentes no início e após 24 horas de corrida dos processos SHIF (levedura comercial) e SHF (levedura recombinante) | 167 |
| Tabela 7.7. Parâmetros de fermentação calculados após 24 horas de corrida dos processos SHIF(levedura comercial) e SHF (levedura recombinante) do licor hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar, realizados em microreatores, a pH 5,6, $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150 rpm. | 167 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 7.8. Parâmetros de fermentação da SHIF com controle de pH do licor hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar realizadas em reator de leito fixo a 35 °C..... | 171 |
| Tabela 7.9. Parâmetros de fermentação da SHF com controle de pH do licor hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar a 35 °C..... | 173 |
| Tabela 8.1. Concentrações de proteínas totais e atividades específicas (endoxilanasase e β -xilosidase) dos complexos xilanolíticos de <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> e <i>A. phoenicis</i> | 187 |
| Tabela 8.2. Concentrações de proteínas totais e atividades específicas (endoxilanasase) dos complexos xilanolíticos de <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> e <i>A. phoenicis</i> na hidrólise da xilana de bétula (10 g.L ⁻¹ pH 5,6 50 °C) | 189 |
| Tabela 8.3. Perfil de xiloligossacarídeos após 24h de hidrólise da fração solúvel de xilana de madeira de faia (25 g.L ⁻¹) catalisada pelos complexos xilanolíticos de <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> e <i>A. phoenicis</i> (150 UI.g _{xilana}) - 50 °C pH 5,6. | 189 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|--|
| AF | Açúcares fermentativos |
| Aga-Glio | Agarose ativada com grupos glioxil |
| Aga-Glut | Agarose ativada com grupos aldeído (via reação com glutaraldeído) |
| Ara | Arabinose |
| ART | Açúcares redutores totais |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNS | Ácido dinitrossalicílico |
| DTG | Análise termogravimétrica derivada |
| EtOH | Etanol |
| F _s | Fator de estabilização |
| FT-IR | Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourie |
| Gal | Galactose |
| Glic | Glicose |
| GlicOH | Glicerol |
| GlucA | Ácido Glucurônico |
| HMF | Hidroximetil furfural |
| HOAc | Ácido acético |
| IXI-Quit | Xilose isomerase imobilizada em gel de quisotana |
| MeGlucA | Ácido Metil Glucurônico |
| Mult-Quit | Complexo xilanolítico Multifect CX XL A03139 imobilizado em gel de quitosana |
| p-NPX | 4-Nitrofenil β-D-xilopiranosideo |
| Quit-Glio | Quitosana ativada com grupos glioxil |
| Quit-Glut | Quitosana ativada com grupos aldeído (via reação com glutaraldeído) |
| RID | Detector de índice de refração |
| RMN | Espectroscopia por ressonância magnética nuclear |
| SHF | Fermentação e hidrólise simultâneas |
| SHIF | Hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas |
| SIF | Isomerização e fermentação simultâneas |
| T ₁₈ | Levedura <i>Saccharoyces cerevisiae</i> modificada geneticamente |
| TGA | Análise termogravimétrica |
| U | Unidade(s) de atividade enzimática -μmol/min |

| | |
|----------------|---|
| UI | Unidade(s) de atividade enzimática internacional - $\mu\text{mol}/\text{min}$ |
| X ₂ | Xilobiose |
| X ₃ | Xilotriose |
| X ₄ | Xilotetraose |
| X ₅ | Xilopentaose |
| X ₆ | Xilohexaose |
| XI (GI) | Xilose (glicose) isomerase solúvel |
| XiOH | Xilitol |
| XOS | Xilooligosacarídeos |
| β -Aga | β -xilosidase imobilizada em gel de agarose |
| β -Quit | β -xilosidase imobilizada em gel de quitosana |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO..... | 26 |
| 1.1 Introdução e Motivação..... | 26 |
| 1.2 Referências | 31 |
| | |
| CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DA XILANA/OLIGÔMEROS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR..... | 34 |
| 2.1 Introdução | 34 |
| 2.2 Material e Métodos | 39 |
| 2.2.1 Materiais..... | 39 |
| 2.2.2 Métodos analíticos..... | 43 |
| 2.2.3 Cálculo de rendimentos dos pré-tratamentos..... | 44 |
| 2.3 Resultados e Discussão | 46 |
| 2.3.1 Caracterização dos bagaços de cana-de-açúcar in natura e explodido | 46 |
| 2.3.2 Efeito dos pré-tratamentos sobre a solubilização da xilana dos bagaços de cana-de-açúcar..... | 46 |
| 2.4 Conclusão | 50 |
| 2.5 Referências | 51 |
| | |
| CAPÍTULO 3: XILANA DE EUCALIPTO: SUBSTRATO PRODUZIDO <i>IN-HOUSE</i> PARA SUBSTITUIR XILANA DE BÉTULA NA AVALIAÇÃO DE XILANASES ... | 55 |
| 3.1 Introdução | 55 |
| 3.2 Material e Métodos | 57 |
| 3.2.1 Materiais..... | 57 |
| 3.2.2 Métodos..... | 57 |
| 3.2.3 Métodos analíticos..... | 58 |
| 3.3 Resultados e Discussão | 59 |
| 3.3.1 Efeito da extração com solvente | 59 |
| 3.3.2 Efeito do agente precipitante e do pH final da solução de extração | 61 |
| 3.3.3 Solubilização de xilana de eucalipto | 64 |
| 3.3.4 Validação de protocolo de extração / purificação de xilana..... | 66 |
| 3.4 Conclusão | 70 |
| 3.5 Referências | 70 |
| | |
| CAPÍTULO 4: IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE β-XILOSIDASE MULTIMÉERICA DE BACILLUS SUBTILLIS PARA PRODUÇÃO DE XILOSE | 74 |
| 4.1 Introdução | 74 |
| 4.2 Material e Métodos | 76 |
| 4.2.1 Materiais..... | 76 |
| 4.2.2 Métodos..... | 77 |

| | |
|---|------------|
| 4.3 Resultados e Discussão | 83 |
| 4.3.1 Influência da matriz do suporte e do método de ativação na imobilização da β -xilosidase | 83 |
| 4.3.2 Caracterização dos derivados..... | 89 |
| 4.3.3 Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada | 90 |
| 4.3.4 Hidrólise da xilana de milho e reuso do catalisador | 93 |
| 4.4 CONCLUSÃO | 95 |
| 4.5 REFERÊNCIAS | 96 |
| | |
| CAPÍTULO 5: IMOBILIZAÇÃO DA XILANASE MULTIFECT PARA PRODUÇÃO DE XILOSE E XOS | 100 |
| 5.1 Introdução | 100 |
| 5.2 Material e Métodos | 103 |
| 5.2.1 Materiais | 103 |
| 5.2.2 Métodos..... | 104 |
| 5.2.3 Métodos analíticos..... | 107 |
| 5.3 Resultados e Discussão | 109 |
| 5.3.1 Imobilização do complexo Multifect em suporte agarose-glioxil e quitosana-glutataldeído | 109 |
| 5.3.2 Influência da carga enzimática no rendimento de imobilização e retenção da atividade | 111 |
| 5.3.3 Hidrólise do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar pela Multifect livre e imobilizada..... | 113 |
| 5.4 Conclusão | 115 |
| 5.5 Referências | 116 |
| | |
| CAPÍTULO 6: EFEITO DO CÁLCIO E XILOOLIGOSACARÍDEOS NA ATIVIDADE DA ISOMERIZAÇÃO DE XILOSE \rightleftharpoons XILULOSE CATALISADA POR XILOSE ISOMERASE | 119 |
| 6.1 Introdução | 119 |
| 6.2 Material e Métodos | 121 |
| 6.2.1 Material..... | 121 |
| 6.2.2 Métodos..... | 122 |
| 6.2.3 Métodos analíticos..... | 124 |
| 6.3 Resultados e Discussão | 125 |
| 6.3.1 Influência do pH e da temperatura sobre a atividade da xilose isomerase | 125 |
| 6.3.2 Efeito do Ca^{2+} na reação de isomerização de frutose \rightleftharpoons glicose | 126 |
| 6.3.3 Efeito do íon Ca^{2+} na isomerização da xilose \rightleftharpoons xilulose | 130 |
| 6.3.4 Efeito do XOS na isomerização da xilose \rightleftharpoons xilose | 133 |
| 6.3.5 Efeito combinado do pH, íons Ca^{2+} e XOS na isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose | 134 |
| 6.4 Conclusão | 137 |

| | |
|--|------------|
| 6.5 Referências | 138 |
| CAPÍTULO 7: ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE XILOSE E XILOOLIGÔMEROS USANDO XILANASES, XILOSE ISOMERASE E LEVEDURA CO-IMOBILIZADAS | 141 |
| 7.1 Introdução | 141 |
| 7.2 Material e Métodos | 145 |
| 7.2.1 Materiais..... | 145 |
| 7.2.2 Métodos..... | 146 |
| 7.2.3 Métodos analíticos..... | 151 |
| 7.2.4 Calculo dos parâmetros de fermentação | 153 |
| 7.3 Resultados e Discussão | 154 |
| 7.3.1 Ensaio preliminares do processo <i>SHIF</i> com xilana de eucalipto | 154 |
| 7.3.2 Ensaio <i>SHIF</i> com licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar | 158 |
| 7.3.3 Ensaio <i>SHIF</i> e <i>SHF</i> do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar em microreatores..... | 164 |
| 7.3.4 Ensaio <i>SHIF</i> e <i>SHF</i> do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fixo com recirculação e controle de pH..... | 169 |
| 7.4 Conclusão | 175 |
| 7.5 Referências | 177 |
| CAPÍTULO 8: ESTUDOS PRELIMINARES DOS DESEMPENHOS DE COMPLEXOS COMERCIAIS E DE XILANASE PRODUZIDOS IN-HOUSE PARA A HIDROLISE DA BIOMASSA HEMICELULÓSICA..... | 181 |
| 8.1 Introdução | 181 |
| 8.2 Material e Métodos | 184 |
| 8.2.1 Material..... | 184 |
| 8.2.2 Métodos..... | 184 |
| 8.3 Resultados e Discussão | 187 |
| 8.3.1 Caracterização dos complexos enzimáticos | 187 |
| 8.3.2 Hidrólise da fração solúvel de xilana de madeira de faia | 189 |
| 8.4 Conclusão | 191 |
| 8.5 Referências | 191 |
| CAPÍTULO 9: SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO | 194 |
| ANEXO..... | 196 |

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO

A biomassa lignocelulósica, tal como bagaço de cana-de-açúcar, madeira e resíduos da agricultura, é matéria prima atraente para a produção de bioetanol devido a sua elevada concentração de açúcares potencialmente fermentescíveis (até 70% de celulose e hemicelulose), grande disponibilidade, baixo custo e por não competirem com a produção de alimentos (MATSUSHIKA et al., 2009).

No Brasil, o bagaço da cana-de-açúcar é o maior resíduo agroindustrial. A safra de cana-de-açúcar 2018/2019 está estimada pela CONAB em 616 milhões de toneladas (CONAB, 2018), resultando na geração de 185 milhões de toneladas de bagaço*, os quais, mesmo tendo uma parcela destinada à geração de energia, ainda representam um valioso recurso para a produção de etanol (CERQUEIRA LEITE et al., 2009). A utilização dos açúcares fermentescíveis requer, contudo, uma etapa de pré-tratamento para ruptura e separação dos polímeros componentes da matriz lignocelulósica. Os mais empregados envolvem o uso de ácido, vapor, solventes orgânicos e agentes alcalinos (CANILHA et al., 2012; GÍRIO et al., 2010; SANTOS et al., 2012).

A viabilidade econômica da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos aumenta muito com a utilização tanto das hexoses quanto das pentoses provenientes, respectivamente, das frações celulósica e hemicelulósica da biomassa vegetal (SILVA et al., 2012). A fermentação alcoólica da glicose é um processo já estabelecido e otimizado, utilizando linhagens de leveduras adaptadas ao ambiente industrial. Entretanto, o aproveitamento das pentoses provenientes da hemicelulose, embora crucial, permanece como um grande desafio.

Atualmente, o organismo mais utilizado para produção de etanol a partir de hexoses é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, devido a sua robustez, tolerância a altas concentrações de açúcar e seu elevado rendimento em etanol (ZHANG et al., 2010). Todavia, a forma selvagem de *S. cerevisiae* apresenta a limitação de não metabolizar xilose, o principal produto da fração hemicelulósica do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (MANZANARES, 2010).

Uma alternativa seria o uso de microrganismos que naturalmente fermentam xilose, tais como *Scheffersomyces stipitis*, *Pachysolen tannophilus* ou *Scheffersomyces shehatae*. Contudo a aplicação desses microrganismos é limitada devido a suas baixas

* O bagaço corresponde a aproximadamente 30% da cana-de-açúcar moída.

tolerâncias a etanol, baixas velocidades de fermentação, inibição por produtos formados no pré-tratamento e necessidade de um controle rigoroso da microaeração no meio reacional (OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008).

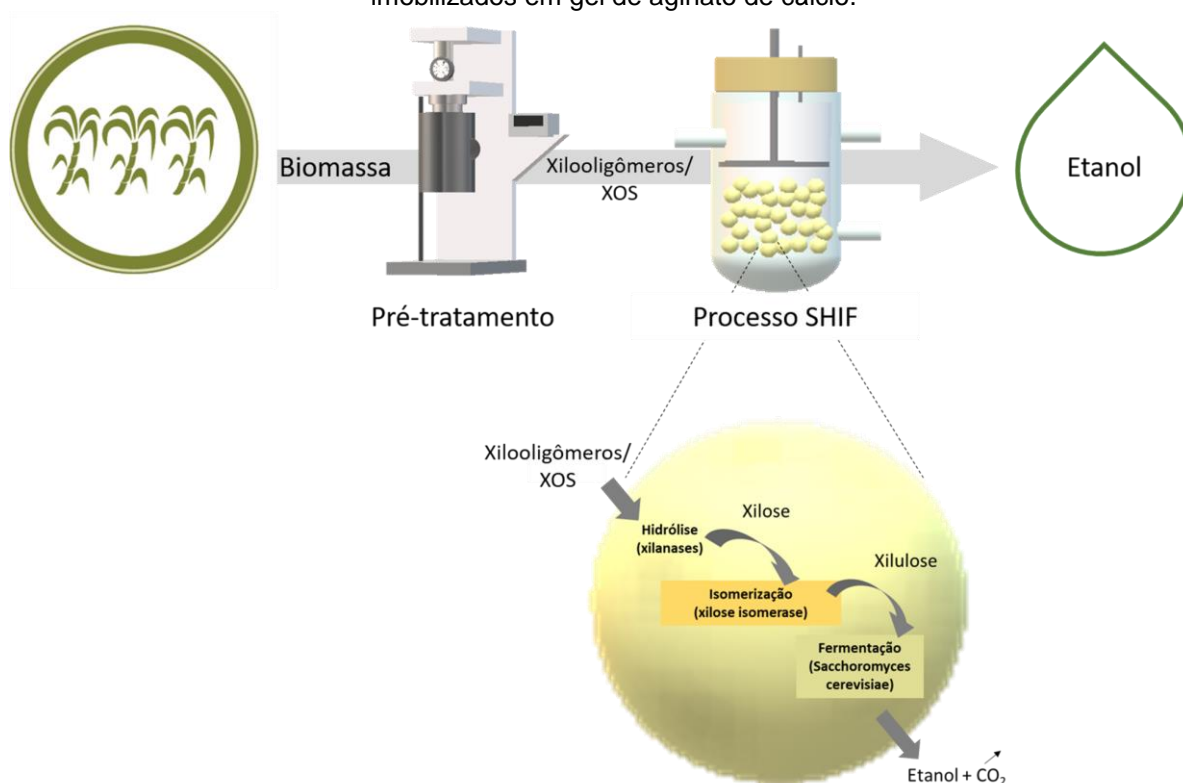
O desenvolvimento de linhagens recombinantes robustas de levedura que metabolizem xilose é objeto de grande atenção nas últimas décadas (DEMEKE et al., 2013a; GONÇALVES et al., 2014; HECTOR et al., 2011; PARK et al., 2013). Entretanto, a estabilidade das cepas em longas jornadas de operação, sensibilidade frente a produtos de degradação da biomassa no pré-tratamento e a homeostase ainda são gargalos importantes na aplicação industrial (LIAN; MISHRA; ZHAO, 2018). *S. cerevisiae*, contudo, é capaz de fermentar o isômero de xilose: a xilulose. Desta forma, outra alternativa seria isomerizar a xilose a xilulose *ex-vivo*, possibilitando assim ser metabolizada a etanol. A enzima xilose isomerase, também conhecida como glicose isomerase, é amplamente utilizada na indústria para a produção de xarope de frutose a partir de amido de milho (GIORDANO; GIORDANO; COONEY, 2000; MOSIER; LADISCH, 2008) e catalisa também a isomerização reversível de xilose a xilulose, a qual possui uma relação de equilíbrio xilose : xilulose da ordem de 5:1 a 35 °C (GONG, 1983). Visando consumo total da xilose para viabilizar sua aplicação industrial, essa relação de equilíbrio deve ser deslocada para a produção de xilulose. Uma solução é a isomerização e fermentação simultâneas da xilose - *SIF* (do inglês *Simultaneous Isomerization and Fermentation*), na qual a xilulose produzida pela enzima é continuamente consumida pela levedura.

Silva et al. (2012) realizaram a produção de etanol a partir de xilose utilizando xilose isomerase (XI) imobilizada em gel de quitosana e coimobilizada com *S. cerevisiae* em gel de alginato de cálcio. Com essa proposta, obteve-se um rendimento de $0,34 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilose}}^{-1}$ e produtividade de $1,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico ácido de bagaço de cana-de-açúcar não destoxificado. Contudo, a baixa velocidade de fermentação de pentoses por *S.cerevisiae* (~10x inferior, de acordo com Senac e Hahn-Hägerdal, 1990) e a alta concentração de xilose no meio tornou o sistema suscetível de contaminação por microrganismos consumidores de xilose.

Uma forma de controlar o desenvolvimento de contaminantes seria utilizar um substrato de difícil assimilação, como xilooligômeros, obtidos pela solubilização de hemicelulose em condições brandas (Figura 1.1). Os heteropolissacarídeos que constituem a hemicelulose, dos quais xilana é o principal, são polímeros insolúveis de xilose, com grau de polimerização em torno de 100 unidades (GRAY; CONVERSE; WYMAN, 2007). Assim, a extração de xilana na forma de oligômeros deve ser feita em condições que permitam a quebra de um número suficiente de ligações glicosídicas, reduzindo a massa molecular do polímero e assim solubilizando-o, mas sem avançado grau de hidrólise evitando geração de altas concentrações de xilose. Desta forma, o material obtido é composto de grandes oligômeros,

não diretamente consumíveis por bactérias. O processamento desse material a xilose irá requerer a presença de novas enzimas, xilanases, que deverão estar também imobilizadas no catalisador. A incorporação de um complexo de xilanases e enzimas auxiliares (desramificantes) no sistema catalítico utilizado por Silva et al. (2012) resultou na patente de Giordano et al. (2014) “*SISTEMA CATALÍTICO E PROCESSO DE OBTENÇÃO DE BIOETANOL 2G A PARTIR DE XILANA/OLIGÔMEROS DE XILOSE*”, depositada em 19/09/2014 com o número BR 10 2014 023395 4. Esse processo, conhecido como hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas – *SHIF* (do inglês *Simultaneous Hydrolysis, Isomerization and Fermentation*) (Figura 1.1), vem sendo estudado a fim de produzir etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 0.1. Esquema do processo de hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas (*SHIF*) utilizando biocatalisador contendo derivados de xilanase, xilose isomerase e *S. cerevisiae* co-imobilizados em gel de aginato de cálcio.



Fonte: arquivo pessoal.

Os estudos iniciais do processo *SHIF* realizados pelo grupo de pesquisa LABENZ (DEQ UFSCar) comprovaram a viabilidade deste processo para a produção de etanol (MILESSI-ESTEVEES et al., 2019). No entanto, um obstáculo surgiu quando, após 8 horas de reação *SHIF* (XOS de bétula 73 g.L⁻¹, biocatalisador composto de 5% m.m⁻¹ xilanase, 15%

m.m⁻¹ de XI e 10% m.m⁻¹, *S. cerevisiae* 50 g.L⁻¹, 150 rpm e 32°C) observou-se uma estagnação da reação, ao se atingir 2,93 g.L⁻¹ de etanol, acompanhado do acúmulo de xilose (2,95 g.L⁻¹) e de xilobiose (8,02 g.L⁻¹), enquanto as concentrações de XOS de cadeias maiores permaneceram inalteradas.

Por um lado, a possível explicação poderia ser atribuída a deficiências na etapa de hidrólise. A presença de xiloligossacarídeos, especialmente xilobiose e xilotriose, bem como a alteração do pH no microambiente devido às novas reações de hidrólise de xiloligômeros que agora ocorrem no ambiente intra-gel, pode estar causando a estagnação observada nos experimentos. A enzima β -xilosidase, responsável pela hidrólise da xilobiose em xilose, é a última a atuar na hidrólise dos substratos xilana e XOS. Devido às longas cadeias e à presença de várias ramificações, a β -xilosidase inicia sua ação apenas mais tarde no processo de hidrólise, após a ação das endoxilanases e enzimas auxiliares que atuam nas ramificações (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016). Essa enzima possui uma estrutura complexa e delicada, com baixa estabilidade sob condições de processo (DIOGO et al., 2015). Outra limitação, ainda, pode estar na pequena quantidade dela em complexos xilanolíticos.

Por outro lado, o acúmulo de xilose pode indicar uma redução da atividade da xilose isomerase. O passo de isomerização é crucial para a produção de etanol, pois é responsável pela alimentação da xilulose para o microrganismo fermentativo. Embora em pHs ácidos a velocidade de isomerização seja consideravelmente baixa (cerca de 5% da velocidade máxima), nos ensaios *SIF* de Silva et al. (2012) não foram observados problemas de estagnação, havendo o consumo de toda a xilose oferecida. Desta forma, pode-se inferir que alguma molécula ou condição operacional ligada à hidrólise da xilana poderia estar inibindo XI. Milessi-Esteves et al. (2019) verificaram o efeito negativo da presença de íons Ca²⁺ sobre a atividade de XI na isomerização de frutose a glicose, a pH 7,0 a 60 °C. A existência de cálcio no interior do biocatalisador é inevitável, estando presente no gel de alginato e aparecendo gradualmente conforme o consumo de CaCO₃ responsável pela manutenção do pH no interior do grânulo de catalisador (MILESSI et al., 2018). O efeito combinado do pH ácido (5,6) e presença de íons Ca²⁺ poderiam estar causando efeitos inibitórios na enzima XI, acarretando a estagnação da etapa de fermentação. Outra possível explicação estaria relacionada aos efeitos inibitórios causados pela presença de subprodutos da reação de hidrólise (xilooligossacarídeos, XOS). Os efeitos inibitórios de íons em solução já foi reportado na literatura (KOVALEVSKY et al., 2010), contudo o efeito de oligômeros de xilose sobre a atividade da XI ainda carecem de estudos mais aprofundados.

Nesse contexto, o objetivo geral desse trabalho foi avaliar a produção de etanol via hidrólise, isomerização e fermentação simultânea (*SHIF*) a partir de xilooligômeros de bagaço de cana-de-açúcar utilizando um biocatalisador composto pelas enzimas xilanase e xilose isomerase encapsuladas com *Saccharomyces cerevisiae* em grânulos (*beads*) de gel

de alginato de cálcio. Esse trabalho teve como base os demais estudos realizados pelo grupo Labenz do Departamento de Engenharia Química da UFSCar, considerando as contribuições dos trabalhos realizados por Aquino (2013), Moraes (2013), Silva (2013), Suarez (2014), Milessi (2017) e Baldez (2018). Foram então realizados estudos mais aprofundados das etapas de hidrólise e isomerização do complexo processo proposto, com vistas ao aumento da conversão de xilooligômeros em etanol.

O trabalho encontra-se dividido em nove capítulos:

O CAPÍTULO 2 aborda o preparo do substrato utilizado para as reações *SHIF*. Foram realizados quatro pré-tratamentos distintos do bagaço de cana-de-açúcar, onde foram avaliados os rendimentos de extração de hemicelulose em termos de XOS e xilose monomérica.

O CAPÍTULO 3 descreve a obtenção e aplicação da xilana de eucalipto como substrato para avaliação da atividade de xilanases. A descontinuidade da xilana de bétula no mercado criou a necessidade de um substituto equivalente a fim de que os trabalhos em andamento e futuros pudessem ter continuidade.

O CAPÍTULO 4 aborda o estudo da imobilização da β -xilosidase de *Bacillus subtilis* purificada, uma enzima multimérica recombinante e de baixa estabilidade térmica.

No CAPÍTULO 5 estão descritos os estudos preliminares realizados com os complexos xilanolíticos produzidos *in-house* de *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus phoenicis*. Foram avaliados os perfis de atividade em função de pH e de XOS ao longo da hidrólise da xilana de faia.

O estudo de imobilização do complexo xilanolítico Multifect CX XL A03139 encontra-se descrito no **Erro! Fonte de referência não encontrada.** Foram avaliados os efeitos das técnicas de imobilização (unipontual e multipontual) e da carga proteica oferecida sobre os parâmetros de imobilização. Finalmente, o desempenho desse derivado foi avaliado em ensaios de hidrólise licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar

No CAPÍTULO focou-se na etapa de isomerização. As hipóteses de inibição da XI por íons Ca^{2+} e XOS levantadas nos trabalhos anteriores foram investigadas mais a fundo, principalmente tendo em vista a atividade da enzima na isomerização de xilose a xilulose. O estudo cinético da reação de isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose foi realizado nas condições descritas na literatura (pH 7,0 e 60 °C) e condições de *SHIF* (pH 5,6 e 35 °C), estimando-se os parâmetros cinéticos ($V_{\text{Máx}}$ e K_i) da reação. As inibições causadas por Ca^{2+} , XOS, $\text{Ca}^{2+} + \text{XOS}$, em pH 5,6 e 35 °C, sobre a velocidade de reação de isomerização foram estudadas, o que permitiu ajuste de modelos cinéticos de inibição para cada situação.

No CAPÍTULO apresentam-se os resultados obtidos ao aplicar-se o conhecimento adquirido nos estudos anteriores na operação do processo *SHIF*. Nos primeiros ensaios, utilizou-se como substrato xilana de eucalipto, sendo todos os demais estudos

realizados com o licor rico em xilooligômeros obtido do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar. Nesse capítulo, mostra-se ainda o desempenho da produção de etanol a partir de xilooligômeros pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente (contendo genes de XI), co-imobilizada com os derivados de endoxilanase e β -xilosidase. Nesse último processo, aqui denominado SHF, ocorre apenas hidrólise e fermentação, uma vez que a isomerização é realizada *in vivo*, pela levedura recombinante.

1.2 Referências

- AQUINO, P. M. **Produção de etanol a partir de xilose com glicose isomerase e *Saccharomyces cerevisiae* coimobilizadas em gel de alginato**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.
- BALDEZ, T. O. **Estudo cinético da hidrólise de xilooligômeros por xilanases e β -xilosidase na forma livre e imobilizada**. 2018. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.
- BHOSALE, S. H.; RAO, M. B.; DESHPANDE, V. V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 2, p. 280–300, 1996.
- BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, 2016.
- CANILHA, L. et al. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–15, 2012.
- CERQUEIRA LEITE, R. C. DE et al. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**, v. 34, n. 5, p. 655–661, 2009.
- CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar: Terceiro levantamento**, V. 5, dezembro de 2018 - Safra 2018/19, n. 3. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2018. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 25/02/2019.
- DEMEKE, M. M. et al. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 89, 2013.
- DIOGO, J. A. et al. Development of a chimeric hemicellulase to enhance the xylose production and thermotolerance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 69, p. 31–37, 2015.
- Fundação Universidade Federal de São Carlos. GIORDANO, R. L. C. et al. **Sistema catalítico e processo de obtenção de bioetanol 2g a partir de xilana/oligômeros de xilose**. BR n. PI BR 10 2014 023395 4 A2. 19 set. 2014.

GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C.; COONEY, C. L. A study on intra-particle diffusion effects in enzymatic reactions: glucose-fructose isomerization. **Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 2, p. 0159–0166, 2000.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GONÇALVES, D. L. et al. Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. **Enzyme and microbial technology**, v. 63, p. 13–20, 2014.

GONG, C. S. Recent Advances in D-Xylose Conversion by Yeasts. In: **Annual Reports on Fermentation Processes**. Tsao, G. T. (Ed.). New York: Academic Press, 1983. p. 253–297.

GRAY, M. C.; CONVERSE, A. O.; WYMAN, C. E. Solubilities of Oligomer Mixtures Produced by the Hydrolysis of Xylans and Corn Stover in Water at 180 °C. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 8, p. 2383–2391, 2007.

HECTOR, R. E. et al. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism requires gluconeogenesis and the oxidative branch of the pentose phosphate pathway for aerobic xylose assimilation. **Yeast** (Chichester, England), v. 28, n. 9, p. 645–60, 2011.

KOVALEVSKY, A. Y. et al. Metal Ion Roles and the Movement of Hydrogen during Reaction Catalyzed by D-Xylose Isomerase: A Joint X-Ray and Neutron Diffraction Study. **Structure**, v. 18, n. 6, p. 688–699, 2010.

LIAN, J.; MISHRA, S.; ZHAO, H. Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: New tools and their applications. **Metabolic Engineering**, v. 50, p. 85–108, 2018.

MANZANARES, P. Integrated hydrolysis, fermentation and co-fermentation of lignocellulosic biomass. In: WALDRON, K. (Ed.). **Bioalcohol Production: Biochemical conversion of lignocellulosic biomass**. Sawston: Woodhead Publishing, 2010. p. 205–223.

MATSUSHIKA, A. et al. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 84, n. 1, p. 37–53, 2009.

MILESSI-ESTEVEZ, T. et al. An Innovative Biocatalyst for Continuous 2G Ethanol Production from Xylo-Oligomers by *Saccharomyces cerevisiae* through Simultaneous Hydrolysis, Isomerization, and Fermentation (SHIF). **Catalysts**, v. 9, n. 3, p. 225, 2019.

MILESSI, T. S. et al. Influence of key variables on the simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose by a native *Saccharomyces cerevisiae* strain co-encapsulated with xylose isomerase for 2G ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 277–283, 2018.

MILESSI, T. S. S. **Produção de etanol 2g a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente modificada imobilizadas**. 2017. 190 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

MORAES, G. S. **Influência da linhagem da levedura e das condições de cultivo no processo de isomerização e fermentação**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em

Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. Bioproducts and Biofuels. In: MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. (Eds.). **Modern Biotechnology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008. p. 49–72.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n. 1, p. 7, 2008.

PARK, J.-Y. et al. Expression of bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae* under galactose supplemented **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 3, p. 528–532, 2013.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SENAC, T.; HAHN-HÄGERDAL, B. Intermediary Metabolite Concentrations in Xylulose- and Glucose-Fermenting *Saccharomyces cerevisiae* Cells. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 1, p. 120–6, 1990.

SILVA, C. R. et al. An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor. **Enzyme and microbial technology**, v. 50, n. 1, p. 35–42, 2012.

SILVA, C. R. **Produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana usando glicose isomerase coimobilizada com *Saccharomyces cerevisiae***. 2013. 138 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

SUAREZ, C. A. G. **Otimização da produção de etanol 2G a partir de hexoses e pentoses**. 165 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

ZHANG, T. et al. Bioethanol production from hydrolysates of inulin and the tuber meal of Jerusalem artichoke by *Saccharomyces* sp. W0. **Bioresource technology**, v. 101, n. 21, p. 8166–70, 2010.

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DA XILANA/OLIGÔMEROS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

2.1 Introdução

As questões ambientais, econômicas e sociais alarmantes geradas pelo uso maciço de recursos fósseis têm incentivado intensas pesquisas sobre fontes alternativas de matérias-primas. O desenvolvimento de indústrias com base em materiais sustentáveis, produtos químicos e os biocombustíveis dependem principalmente da biomassa lignocelulósica (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016).

Materiais lignocelulósicos são atraentes matérias-primas devido sua elevada disponibilidade, baixo custo e por não competirem diretamente com a produção de alimentos (ARORA; BEHERA; KUMAR, 2015; NIGAM; SINGH, 2011). A bioconversão de lignocelulosicos em líquidos e gases são abordagens promissoras para biocombustíveis sustentáveis, produtos bioquímicos e biomateriais combinados no conceito integrado de biorrefinaria.

Biomassas lignocelulósicas como bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, palha de arroz, talo de algodão e serragem de madeira são matérias-primas atraentes para a produção de bioetanol devido ao baixo custo, ampla disponibilidade e elevada concentração de açúcares potencialmente fermentescíveis (MATSUSHIKA et al., 2009). A composição varia de acordo o material de origem, sendo os principais componentes celulose (33-51%), hemicelulose (19-34%) e lignina (20-30%), além de uma pequena fração composta de extrativos e minerais (QUINTERO; RINCÓN; CARDONA, 2011; VAN MARIS et al., 2006).

No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar é um dos mais abundantes resíduos da agricultura. A composição do bagaço está em torno de 38-45% de celulose, 22-27% de hemicelulose, 19-32% de lignina e o restante de cinzas e extrativos, sendo que estas variam de acordo com as condições climáticas, de cultivo, da variedade da cana e uso de fertilizantes (CANILHA et al., 2012; LIMA et al., 2014).

Segundo o levantamento divulgado pela CONAB, a produção de cana-de-açúcar estimada para a safra 2018/2019 é de 615,84 milhões de toneladas (CONAB, 2018). Cerca de 92% do bagaço produzido no Brasil é destinado à geração de energia elétrica pelo processo de cogeração (CERQUEIRA LEITE et al., 2009). Num cenário onde o excedente fosse destinado à produção de biocombustíveis, 2,5 milhões de toneladas de etanol poderiam

ser produzidos, considerando que a celulose e hemicelulose juntas constituem cerca 70% da biomassa.

Os polímeros de carboidratos (celulose e hemicelulose) encontram-se em uma estrutura complexa e recalcitrante. A celulose é o polímero mais abundante da Terra, sendo um dos principais componentes da parede celular dos vegetais; composta por longas cadeias lineares de glicose unidas por ligações glicosídicas β -(1,4) (HEINZE; LIEBERT, 2012; RUBIN, 2008). A hemicelulose por sua vez é composta por polímeros heterogêneos de açúcares (β -D-xilose, α -L-arabinose, β -D-manose, α -D-galactose, etc), que se ligam tanto às cadeias de celulose quanto à lignina, criando uma complexa malha que provê firmeza estrutural ao material. Os componentes da hemicelulose mais importantes são glicomananas e xilanas, sendo as últimas as mais abundantes (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HEINZE, 2005).

A xilana é um polissacarídeo ramificado cuja cadeia principal é constituída de resíduos D-xilopiranosil com ligação β -(1,4), apresentando um grau de polimerização entre 100 e 200 unidades (ROWELL, 2012). Variações estruturais ocorrem devido a diferenças dos tipos de cadeias laterais (e.g grupos acetil, ácidos urônicos, arabinose, galactose, etc.), distribuição, localização e/ou tipos e distribuição de ligações glicosídicas na cadeia principal (EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HEINZE, 2005).

A fração hemicelulósica é altamente suscetível a ataque químico, calor e pela presença de diferentes ramificações. Sob condições brandas e controladas, a solubilização eficientemente de frações da hemicelulose pode ser realizada. Esses oligômeros de xilose de baixo grau de polimerização (2-7 unidades) chamados de xilooligossacarídeos (XOS) têm atraído a atenção devido ao seu elevado valor de mercado e variedade de aplicações na indústria de alimentos como ingredientes para alimentos saudáveis, bebidas e em preparações alimentares especiais para idosos e crianças, etc; bem como farmacêutica, como os componentes ativos de preparações simbióticas (BIAN et al., 2012; CARVALHO et al., 2013; GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJÓ, 1999).

A fim de poderem ser assimilados no processo de fermentação, os açúcares fermentescíveis precisam ser liberados da matriz lignocelulósica. Portanto, uma ou mais etapas de pré-tratamento devem ser aplicadas à biomassa. O método aplicado deve ser capaz de quebrar a estrutura formada pela lignina, romper a estrutura cristalina da celulose e despolimerizar a hemicelulose; de modo que agentes químicos (ácidos) ou enzimas possam acessar facilmente ao polissacarídeos a fim de hidrolisá-los (BEHERA et al., 2014).

Vários métodos têm sido utilizados, podendo os tratamentos serem físicos, químicos, físico-químicos e/ou biológicos de acordo com a variedade de biomassa utilizada (CANILHA et al., 2012; SANTOS et al., 2012). A escolha de um pré-tratamento em particular é importante, haja visto cada um ter diferentes mecanismos de ação que afetará a estrutura

da parede celular, as espécies químicas a serem liberadas e os co-produtos inibitórios a serem gerados (ESPIRITO SANTO et al., 2018; SEIDL; GOULART, 2016).

Diferentemente da celulose, a hemicelulose é solubilizada com maior facilidade devido sua baixa cristalinidade e menor grau de polimerização (ROWELL, 2012). Um dos pré-tratamentos mais conhecidos e aplicados consiste na hidrólise de lignocelulósicos empregando ácidos inorgânicos (e.g. H_2SO_4 , HCl, HNO_3 , etc.). Operando em elevadas temperaturas, a aplicação de ácidos diluídos leva a hidrólise e solubilização das cadeias de polissacarídeos, liberando açúcares fermentescíveis na forma monomérica (glicose e xilose). Embora elevados rendimentos possam ser alcançados a um custo reduzido, a formação de compostos inibidores do metabolismo microbiano como ácido acético, furfural e 5-hidroximetil furfural (HMF) são desvantagens relacionadas ao pré-tratamento ácido (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Soma-se ainda a necessidade de equipamentos construídos com materiais resistentes à corrosão e ataque ácido bem como o tratamento dos resíduos tóxicos gerados após a hidrólise, que requerem atenção por serem fontes poluidoras do meio ambiente (KUMARI; SINGH, 2018). Alternativas ao uso de ácidos que vêm ganhando destaque são pré-tratamentos que apresentem menor produção de inibidores, nos quais primeiramente ocorre uma solubilização branda dos componentes da biomassa seguido por uma etapa de hidrólise enzimática para obtenção dos açúcares fermentescíveis.

Outro tratamento químico extensivamente utilizado é o alcalino, tendo suas origens no branqueamento utilizado pela industrial de papel e celulose patenteado por Watt em 1854 (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016). Reagentes alcalinos como hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, hidróxido de potássio, solução de amônia aquosa, hidróxido de amônio e peróxido de hidrogênio, individualmente ou combinados, têm sido utilizados como solvente (GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJÓ, 1999). Durante o pré-tratamento alcalino, a parede celular lignocelulósica fica inchada e a área superficial interna aumenta devido a reações de solvatação. Ao mesmo tempo, o agente alcalino remove os grupos acetil e promove a saponificação das ligações éster formadas pelos ácidos 4-O-metil-D-glucurônicos ligados ao esqueleto da xilana, produzindo grupo carboxilas carregados e clivando as ligações formadas com a lignina e outras hemiceluloses. A remoção resultante de lignina e hemicelulose destrói a matriz celulose-hemicelulose-lignina e provoca o rompimento de ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose reduzindo assim o grau de polimerização, cristalinidade e área superficial (KUMARI; SINGH, 2018). Dentre as opções de pré-tratamentos químicos, o alcalino é o método mais eficaz para quebra das ligações éster entre a lignina, hemicelulose e celulose, sem que ocorra a fragmentação dos polímeros de hemicelulose (BEHERA et al., 2014; MCINTOSH; VANCOV, 2010).

O tratamento hidrotérmico da biomassa tem sido amplamente explorado devido aos custos e impactos ambientais reduzidos, com a vantagem do uso de água agindo como

solvente e meio reacional sem a necessidade de adição de catalisador (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016). Este pré-tratamento utiliza apenas água em elevadas temperatura e pressão, provocando principalmente a solubilização da hemicelulose e também extrativos, açúcares e pequenos fragmentos de lignina (VÁZQUEZ et al., 2005). O método baseia-se na auto-hidrólise da água, que hidrolisa as ligações da hemicelulose, liberando ácidos presentes nas ramificações, facilitando a quebra das ligações éter presentes na biomassa (BEHERA et al., 2014; ROOS et al., 2009). Esses ácidos por sua vez agem como catalisadores atuando na reação de formação e remoção de oligossacarídeos, e permanecendo ativos ainda da hidrólise da hemicelulose a açúcares monoméricos, que podem ser subsequentemente degradados a aldeídos (isto é, furfural a partir de pentoses e HMF para hexoses) (MOSIER, 2005). A temperatura (160 °C – 240 °C) e o tempo de residência são fatores determinantes dos tipos e a quantidades de constituintes liberados da biomassa (YU et al., 2010). Após o término, duas fases distintas são obtidas: uma fração sólida rica em celulose contendo a lignina não solubilizada; e uma fração líquida rica principalmente em xilana (xilooligômeros e xilooligossacarídeos).

Dentre as tecnologias descritas na literatura, o tratamento organossolve mostra-se promissor por atuar na hidrólise dos polissacarídeos e deslignificação da biomassa simultaneamente (ROMANÍ et al., 2019). Etanol, metanol, acetona e etilenoglicol são exemplos de alguns solventes que podem ser utilizados (KUMARI; SINGH, 2018). Este processo remove a lignina extensivamente e resulta em quase completa solubilização da hemicelulose pela hidrólise de ligações de lignina, bem como ligações éster do ácido 4-O-metilglucurônico entre a lignina e a hemicelulose; hidrolisando também as ligações glicosídicas presentes na hemicelulose e parcialmente na celulose, dependendo dos parâmetros do processo (ZHAO; CHENG; LIU, 2009). A redução do teor de lignina na parede celular ocorre pela quebra de ligações de éter α -aril éter e arilglicerol- β -aril éter (β -O-4) de macromoléculas de lignina, conferindo mudanças significativas em sua estrutura, incluindo aumento dos grupos fenólicos, e diminuindo o peso molecular médio da lignina (GILARRANZ; RODRÍGUEZ; OLIET, 2000; ROWELL, 2012). Em geral, a recuperação completa de solvente (etanol) é uma questão crítica para a viabilidade econômica do processo, haja visto que este pode agir como inibidor das enzimas responsáveis pela hidrólise enzimática, na fermentação ou digestão anaeróbica (BEHERA et al., 2014). Embora os custos envolvidos possam ser superiores aos demais, diversos produtos de valor agregado derivados de lignina podem contribuir para a viabilidade econômica do pré-tratamento organossolve no contexto das biorrefinarias integradas (ESPIRITO SANTO et al., 2018).

A explosão a vapor é um método termo-mecânico-químico promissor para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. Esse método possibilita um aumento de área superficial da biomassa (necessário para o ataque enzimático, especialmente para a

celulose), devido à desintegração de componentes estruturais da lignocelulose pelo aquecimento a vapor (termo), cisalhamento (mecânico) e a auto-hidrólise de ligações glicosídicas (químico) (SEIDL; GOULART, 2016). A biomassa moída é aquecida pelo vapor saturado em alta pressão (160 – 260 °C, 20 – 50 bar) por um período variando entre apenas alguns segundos a minutos; sendo a reação interrompida e a pressão liberada ao valor da atmosfera local, resultando na evaporação de umidade do material e assimilação de matriz lignocelulósica (KUMARI; SINGH, 2018). A eficiência da explosão a vapor é afetada por vários fatores, como tamanho de partícula, umidade do material, tempo de residência e temperatura aplicada. O tratamento a vapor é um dos processos mais econômicos com menor necessidade energética. Contudo, a matriz lignina-carboidrato não é completamente desintegrada, não havendo a completa solubilização da hemicelulose. Outros inconvenientes incluem a produção de furfural e HMF, conhecidos inibitórios de microrganismos, sendo a sua remoção necessária antes da hidrólise enzimática (BEHERA et al., 2014; GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJO, 1999; RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016).

O objetivo geral desse trabalho é avaliar o processo *SHIF* para a produção de etanol a partir de xilooligômeros/xilooligossacarídeos (XOS) do bagaço de cana-de-açúcar, tendo como base os conhecimentos adquiridos nos estudos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa Labenz do Departamento de Engenharia Química da UFSCar. Silva (2013) observaram que embora houvesse produção de etanol em reações de isomerização e fermentação simultâneas (*SIF*), as baixas velocidades de fermentação da levedura e as elevadas concentrações de xilose disponível favoreceram o desenvolvimento de microrganismos contaminantes no meio reacional. Milessi-Esteves et al. (2019) solucionaram esse problema utilizando XOS, um substrato de difícil assimilação dos microrganismos contaminantes, obtidos da pré-hidrólise enzimática da xilana de bétula, aprimorando consideravelmente a tecnologia de produção de etanol do processo como um todo.

Em vista disso, embora muitos pré-tratamentos sejam relatados na literatura como eficientes para a extração da xilana, não existe um consenso entre qual o melhor ou mais adequado para o bagaço de cana-de-açúcar. Contudo, baseado nos estudos descritos anteriormente pode-se estabelecer como características desejáveis do substrato a ser usado nas reações de *SHIF* a elevada concentração em termos de XOS, com mínima formação de xilose disponível. Nesse contexto, a primeira etapa realizada deste trabalho foi avaliar a capacidade de solubilização da xilana do bagaço de cana-de-açúcar empregando quatro pré-tratamentos distintos: extração a quente diretamente na fração sólida do bagaço submetido à explosão a vapor, hidrotérmico, organossolve e alcalino. O bagaço *in natura*, as frações líquidas e sólida foram caracterizados quimicamente após cada tratamento, permitindo assim obter os rendimentos de extração em termos de XOS e xilose, bem como avaliar os teores dos demais compostos solubilizados (lignina, furfural e HMF).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Materiais

BIOMASSA: O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e a fração sólida do pré-tratamento explosão a vapor (190 °C, 12 bar, 15 min) foram doados pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba – SP. Ambos materiais contendo aproximadamente 50% de umidade foram armazenados a -20 °C, em sacos contendo 20 kg cada. Os ensaios de pré-tratamento foram realizados com biomassa contendo umidade 10 – 15% (secagem em estufa a 45 °C), sendo as umidades determinadas utilizando um determinador de umidade (ID50, Marte). As biomassas foram previamente moídas em moinho de facas tipo Willey (TE-650/1 Tecnal, Brasil) e peneirados a fim de obter um granulometria ≤ 3 mm. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Extração da hemicelulose de cana-de-açúcar

Extração da xilana residual via lavagem da fração sólida do bagaço explodido

A extração da hemicelulose do bagaço de cana explodido realizada segundo a metodologia descrita por Nascimento (2011), com adaptações. Em um béquer foram adicionados 2,5 g de bagaço explodido (massa seca), sendo o béquer então mantido sob aquecimento a 70 °C em banho termostático. Adicionou-se então água destilada (70°C) na proporção 1:5 m.v⁻¹, sendo então a mistura mantida a 70 °C por 5 minutos. Em seguida o material foi filtrado a vácuo e a fração líquida permeada (licor da lavagem) foi recolhido. O material foi lavado uma segunda vez com o mesmo volume de água destilada a 60 °C, sendo a água de lavagem armazenada em frasco separado a 4 °C. A umidade do material retido foi determinada a fim de se calcular o rendimento da recuperação de sólidos.

Pré-tratamento alcalino da biomassa

Foram realizados pré-tratamentos alcalinos do bagaço *in natura* segundo as melhores condições para extração da hemicelulose descritas por Nascimento (2011), com pequenas modificações. A biomassa moída (umidade 10 – 15%) foi suspensa em solução NaOH 4% m.v⁻¹ em frascos erlenmeyer, mantendo a proporção 1:10 m.v⁻¹. Após o fechamento dos frascos com papel alumínio, o material foi autoclavado por 1 hora a 121 °C e 1 atm.

Após a descompressão da autoclave, o material foi filtrado sob vácuo em funil de vidro sinterizado. A fração líquida (licor alcalino) foi recolhida e armazenada a 4 °C. Os sólidos retidos foram lavados com água destilada a 60 °C (mesma relação m.v⁻¹ utilizada no pré-tratamento) para remoção da hemicelulose e lignina depositadas nas fibras. A água de lavagem foi recolhida e armazenada separadamente a 4 °C. A umidade do material retido foi determinada a fim de se calcular o rendimento de recuperação de sólidos.

O pH do licor negro foi ajustado para pH 5.5 com adição de ácido cítrico 1 mol.L⁻¹, sendo em seguida centrifugado a 4 °C, 12857 x g por 25 minutos. A lignina precipitada foi descartada e o licor armazenado para posterior análise de carboidratos.

Pré-tratamento hidrotérmico da biomassa

O pré-tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica foi realizado em reator de aço de alta pressão com volume 5 L (Modelo 4580 HP/H, Parr Instrument Company, Moline, EUA), munido de controle de agitação mecânica, temperatura e pressão. As condições utilizadas foram descritas por Silva (2015), onde 100 g de biomassa (base seca) foram misturadas em água destilada no vaso de reator na proporção 1:10 m.v⁻¹. Sob agitação constante (200 rpm), a temperatura do sistema foi elevada gradualmente até 195 °C, onde foi mantida constante por 10 minutos e então resfriado lentamente até 60 °C. A fração líquida (licor hidrotérmico) foi separada por filtração a vácuo e armazenada a 4 °C. Os sólidos retidos foram lavados com água destilada a 60 °C, mantendo a mesma relação m.v⁻¹ utilizada no pré-tratamento, sendo a água de lavagem recolhida e armazenada separadamente a 4 °C para posterior análise. A umidade do material retido foi determinada a fim de se calcular o rendimento da recuperação de sólidos

Pré-tratamento organossolve da biomassa

O pré-tratamento organossolve das biomassas lignocelulósicas foi realizado no mesmo reator de alta pressão descrito no item anterior. Foram utilizadas as condições otimizadas para a produção de XOS descritas por Wolf (2011), sendo a proporção biomassa (massa seca) 1:10 m.v⁻¹, solução etanol 50% v.v⁻¹, 170 °C, 200 rpm, 60 minutos.

Após o período de 60 minutos a 170 °C, o reator foi resfriado lentamente até 60°C, sendo então o material filtrado a vácuo e a fração líquida (licor organossolve) recolhida. Os sólidos retidos foram lavados com solução etanol 50% (v.v⁻¹) a 60 °C, mantendo a mesma relação m.v⁻¹ utilizada no pré-tratamento. A água de lavagem foi recolhida e armazenada separadamente a 4 °C. A umidade do material retido foi determinada a fim de se calcular o rendimento da recuperação de sólidos.

O licor negro foi rotaevaporado a 50 °C sob vácuo para remoção do etanol presente, sendo o volume final metade do inicial. Em seguida a solução foi centrifugada a 4 °C, 12857 x g por 25 minutos. A lignina precipitada foi descartada e o licor armazenado para posterior análise de carboidratos.

Caracterização química da biomassa lignocelulósica

Os materiais lignocelulósicos foram caracterizados quanto ao teor de carboidratos, ácidos orgânicos, cinzas, extrativos, lignina solúvel e insolúvel de acordo com a metodologia por Sluiter et al. (2012), com adaptações.

Determinação do teor de extrativos

Em um cartucho de celulose, foram adicionados 4 g (massa seca) de biomassa. A fim de evitar perdas de massa ao longo dos refluxos, o cartucho foi envolto em malha fina, mantendo-se as extremidades firmemente amarradas. A extração foi realizada ao longo de 8 horas utilizando etanol 95% v.v⁻¹ como solvente para remoção dos extrativos constituídos de grande variedade de compostos orgânicos.

O solvente dos extrativos, recolhido em um balão previamente seco e tarado, foi rotaevaporado a 60 °C. O resíduo contendo os extrativos foi seco no próprio balão em estufa a 60 °C até massa constante. O teor de extrativos foi determinado pela relação entre a massa seca de extrativos de acordo com a Equação 2.1.

$$\% \text{ Extrativos} = \frac{M_{\text{inicial,seca}} - M_{\text{final,seca}}}{M_{\text{inicial,seca}}} \quad (2.1)$$

Hidrólise total ácida

Em frascos erlenmeyer, 2 g de biomassa *in natura* seca ou pré-tratada (10% de umidade, moídas e peneiradas 20 mesh) foram suspensas em 10 mL de H₂SO₄ 72% v.v⁻¹. O material foi agitado vigorosamente com bastão de vidro por 7 minutos em banho termostaticado a 45 °C. Em seguida, foram adicionados 275 mL de água destilada, sendo então os frascos autoclavados a 121 °C, 1 atm por 30 minutos. Após a descompressão e resfriamento, os materiais foram filtrados em papel filtro qualitativo previamente seco (e tarado) em estufa 105 °C. A fração líquida permeada na filtração foi coletada e o volume completado para 500 mL com água destilada. A fração líquida foi armazenada para posterior determinação das concentrações de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural (HMF) via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a lignina solúvel determinada espectrofotometricamente. A fração insolúvel foi seca a 105 °C e armazenada para determinação dos teores de lignina insolúvel e cinzas.

Teor de cinzas

Para a determinação de cinzas totais, 2 g de biomassa (massa seca) foram transferidos para um cadinho de porcelana previamente seco a 105 °C e tarado. A amostra foi calcinada em mufla (modelo 3000-10P, Tecnal, Brasil) a 300 °C por 30 minutos (rampa de aquecimento 30 °C.min⁻¹), seguida por 2 horas a 800 °C (30 °C.min⁻¹). As cinzas da biomassa pré-tratada foram determinadas da mesma forma, sendo o material do retido nos filtros após o pré-tratamento (fração sólida) utilizados para a calcinação. O teor de cinzas foi determinado de acordo com a Equação 2.2.

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{M_C}{M_A} \times 100 \quad (2.2)$$

onde: % Cinzas: teor de cinzas (%);

M_C: massa de cinzas (g);

M_A: massa da amostra seca (g).

Teor de lignina insolúvel em ácido

O teor de lignina insolúvel foi determinado pelo método de Klason (KIRK; OBST, 1988). O material retido no filtro de papel foi lavado com 1,5 L de água destilada, transferido para pesa-filtro e seco até massa constante em estufa a 105 °C. O teor de lignina insolúvel foi calculado de acordo com a Equação 2.3.

$$\% L_{Ki} = \frac{M_K - M_{Cinzas}}{M_A} \times 100 \quad (2.3)$$

sendo: %L_{Ki}: teor de lignina insolúvel;

M_K: massa de lignina insolúvel (g);

M_A: massa da amostra seca (g).

2.2.2 Métodos analíticos

Determinação das concentrações de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e HMF

As concentrações de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e HMF foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Waters e2695 equipado com detectores de índice de refração (45 °C) e UV-VIS ($\lambda = 210$ nm). Glicose, celobiose, xilose, arabinose e ácido acético presentes na fração líquida do hidrolisado foram determinadas em coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Richmond, EUA) operando a 45 °C com solução de H₂SO₄ 5 mmol.L⁻¹ sob fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. Furfural e HMF foram determinados em coluna C₁₈ (Sunfire Waters, Milford, EUA) a 25 °C conectada ao detector UV/VIS 274 nm, utilizando solução de acetonitrila:água 1:8 (v.v⁻¹) contendo 1% (v.v⁻¹) de ácido acético, com vazão de 0,8 mL.min⁻¹. Todas as amostras foram filtradas previamente em filtro PVDF 0,22 μ m.

Determinação do teor de lignina solúvel em ácido na fração líquida

Em um balão volumétrico, uma alíquota de 5 mL da fração líquida do hidrolisado ácido foi diluída em 25 mL de água destilada, sendo em seguida o pH da solução elevado para próximo de 12 com adição de solução NaOH 6,5 mol.L⁻¹. O volume final foi completado para 100 mL com água destilada e a absorbância medida em 280 nm. O cálculo da lignina solúvel foi determinado segundo a Equação 2.4:

$$C_{\text{lig,sol}} = 4,187 \times 10^{-2}(A_T - A_{\text{pd}}) - 3,279 \times 10^{-4} \quad (2.4)$$

onde: $C_{\text{lig,sol}}$: concentração de lignina solúvel em ácido (g.L^{-1});

A_T : absorvância da solução de lignina contendo os produtos de degradação;

A_{pd} : absorvância de furfural e HMF;

A_{pd} : $C_1 \cdot \epsilon_1 + C_2 \cdot \epsilon_2$;

C_1 e C_2 : concentrações de furfural e HMF determinados por CLAE (g.L^{-1})

ϵ_1 e ϵ_2 : absorvâncias de furfural e HMF, respectivamente 146,85 e 114,00 $\text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

2.2.3 Cálculo de rendimentos dos pré-tratamentos

Rendimento mássico do pré-tratamento (fração sólida)

$$R_{\text{FS}}(\%) = \frac{M_{\text{Final}}}{M_{\text{Inicial}}} \times 100 \quad (2.5)$$

sendo: R_{FS} : rendimento mássico do pré-tratamento (%) referente à fração sólida;

M_{Final} : massa seca final do bagaço após o pré-tratamento;

M_{Inicial} : massa seca do bagaço *in natura*.

Rendimento mássico do pré-tratamento (fração líquida)

$$R_{\text{FL}}(\%) = 1 - R_{\text{FS}} \quad (2.6)$$

onde: R_{FL} : rendimento mássico do pré-tratamento (%) referente à fração líquida (solubilizada)

Rendimento de extração em xilose (fração líquida)

$$R_{\text{Xilose}}(\%) = \frac{C_{\text{Xilose}} \times V_{\text{Coletado}}}{m_{\text{bagaço in natura}} \times Y_{\text{xilose,i}} - m_{\text{bagaço pré-tratado}} \times Y_{\text{xilose,f}}} \times 100 \quad (2.7)$$

sendo: R_{Xilose} : rendimento de extração em xilose (%);

C_{Xilose} : concentração de xilose medida na fração líquida (licor, g.L⁻¹);

V_{Coletado} : volume de licor coletado ao término do pré-tratamento (L);

$M_{\text{bagaço in natura}}$: massa do bagaço in natura (g);

$y_{\text{xilose,i}}$: teor de xilose no bagaço *in natura* (%);

$M_{\text{bagaço pré-tratado}}$: massa do bagaço pré-tratado (g);

$y_{\text{xilose,f}}$: teor de xilose no bagaço pré-tratado (%);

Rendimento de extração em XOS (fração líquida)

$$R_{\text{XOS}}(\%) = \frac{(C_{\text{Xilose,i}} - C_{\text{Xilose,hid}}) \times V_{\text{Coletado}}}{m_{\text{bagaço in natura}} \times Y_{\text{xilose,i}} - m_{\text{bagaço pré-tratado}} \times Y_{\text{xilose,f}}} \times 100 \quad (2.7)$$

sendo: R_{XOS} : rendimento de extração em XOS (%);

C_{Xilose} : concentração de xilose medida na fração líquida (licor, g.L⁻¹);

C_{Xilose} : concentração de xilose medida na fração líquida após hidrólise ácida (licor, g.L⁻¹);

V_{Coletado} : volume de licor coletado ao término do pré-tratamento (L);

$M_{\text{bagaço in natura}}$: massa do bagaço in natura (g);

$y_{\text{xilose,i}}$: teor de xilose no bagaço *in natura* (%);

$M_{\text{bagaço pré-tratado}}$: massa do bagaço pré-tratado (g);

$y_{\text{xilose,f}}$: teor de xilose no bagaço pré-tratado (%);

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Caracterização dos bagaços de cana-de-açúcar *in natura* e explodido

O bagaço de cana-de-açúcar, sendo um material lignocelulósico, é constituído por frações de celulose, hemicelulose lignina e materiais inorgânicos. A fim de avaliar a eficiência dos pré-tratamentos para a extração da xilana, é vital que a biomassa de partida (matéria prima) seja primeiramente caracterizada quimicamente. Desta forma, o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e a fração sólida do bagaço pré-tratado via explosão térmica (fornecida pelo CTC – Piracicaba, SP) foram submetidos a ensaios de caracterização química conforme descrito anteriormente. A Tabela 2.1 apresenta as composições percentuais dos principais constituintes de cada biomassa estudada.

O bagaço *in natura* apresentou um elevado teor de carboidratos em sua composição, sendo cerca de 40% na forma de celulose, 29% de hemicelulose, bem como de um elevado teor de lignina presente (20%). Os resultados obtidos estão de acordo com os reportados na literatura por Canilha et al. (2011); Da Silva et al. (2010) e Gouveia et al. (2009). Não foram detectados ácidos urônicos na biomassa. A presença de arabinose (3%) na composição confirmou o perfil de arabinoxilana da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar (GÍRIO et al., 2010). Conforme descrito por Biely, Singh e Puchart (2016), a localização das ramificação de arabinose (posições 2-O e/ou 3-) sem a presença de ácidos glucurônicos pode afetar o desempenho de algumas xilanas, especialmente as da família GH30, que dependem dos ácidos para orientar o acoplamento à cadeia principal. O elevado teor de carboidratos confirma o potencial do bagaço, um resíduo do processamento da cana de açúcar, como matéria-prima em processos biotecnológicos.

Quanto à fração sólida do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado via explosão térmica, é possível observar que os teores de celulose foram muito próximos dos encontrados no bagaço *in natura*. O pré-tratamento de explosão a vapor tem como principal característica a desconstrução da matriz lignocelulósica durante a etapa de descompressão, separando as fibras individuais com mínima perda de material (MABEE et al., 2006). Esses resultados estão conformidade com os descritos por Nascimento et al. (2016) para a fração sólida do bagaço pré-tratado em condições similares.

2.3.2 Efeito dos pré-tratamentos sobre a solubilização da xilana dos bagaços de cana-de-açúcar

A solubilização das cadeias de xilana consiste em uma das etapas fundamentais para a aplicação do bagaço como matéria-prima para processos biotecnológicos como a

SHIF. Nesse contexto, foram avaliadas as eficiências de quatro pré-tratamentos distintos visando a solubilização da hemicelulose na forma de XOS e monômeros de xilose. Conforme observado na Tabela 2.1, os quatro pré-tratamentos estudados foram eficientes quanto à solubilização da hemicelulose presente na biomassa. O rendimento mássico dos pré-tratamentos foi em torno de 65%, sendo o máximo alcançado na lavagem do bagaço (proporção 1:5 v.v⁻¹).

Dentre os tratamentos estudados, o hidrotérmico se destaca em termos de remoção seletiva da hemicelulose, onde apenas 8% da hemicelulose permaneceu na fração sólida, sendo a celulose e a lignina preservadas quase integralmente. Esses resultados estão de acordo com os descritos por Silva, (2015), onde cerca de 36% da biomassa foi solubilizada durante o pré-tratamento hidrotérmico (195 °C, 10 min), preservando a celulose e lignina e removendo preferencialmente a fração hemicelulósica.

Os tratamentos organossolve e alcalino removeram quantidades semelhantes de hemicelulose, restando cerca de 50% na fração sólida. Todavia, observa-se que a lignina foi solubilizada juntamente com a hemicelulose no tratamento alcalino, enquanto no tratamento organossolve está permaneceu na fração sólida (também chamada de celulignina), estando os resultados em conformidade com os descritos por Nascimento et al. (2016). Em ambos tratamentos, não houve perda significativa da celulose. Wolf, (2011) reporta resultados similares para o pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar, onde não houve degradação significativa tanto da celulose como da hemicelulose, sendo o licor rico em xilooligossacarídeos.

O pré-tratamento via explosão a vapor modifica significativamente a estrutura da biomassa, ocorrendo a desintegração componentes estruturais da lignocelulose e aumentando a área superficial existente na biomassa (BEHERA et al., 2014). A lavagem com água destilada, embora simplória, foi capaz de arrastar a hemicelulose eficientemente. Contudo, observa-se que todo o ácido acético formado no pré-tratamento foi medido no licor, sendo algo importante a ser considerado nas etapas de fermentação realizadas posteriormente uma vez que esse pode negativamente o desempenho de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989).

Tabela 2.1. Composição química do bagaço de cana in natura e das frações sólidas após os pré-tratamentos para solubilização da hemicelulose. Valores corrigidos pelos rendimentos mássicos de cada pré-tratamento.

| Rendimento (%) → Componente (%) | Bagaço | Bagaço | Fração sólida após pré-tratamento | | Lavagem bagaço explodido | | |
|------------------------------------|------------------|------------|-----------------------------------|--------------|--------------------------|------------|------------|
| | <i>In natura</i> | Explodido | Hidrotérmico | Organossolve | Alcalino | (1:5 m/v) | (1:10 m/v) |
| | ----- | ----- | 65,6 | 64,4 | 57,4 | 71,0 | 67,0 |
| Celulose | 38,9 ± 0,6 | 43,2 ± 1,4 | 35,1 ± 0,6 | 29,5 ± 0,1 | 31,0 ± 1,1 | 34,1 ± 1,1 | 35,5 ± 1,1 |
| como glicose | 34,7 ± 0,6 | 42,8 ± 1,4 | 34,3 ± 0,6 | 28,2 ± 0,1 | 29,5 ± 1,1 | 33,2 ± 1,1 | 34,8 ± 1,1 |
| como celobiose | 3,6 ± 0,1 | ND | 0,6 ± 0,0 | 0,8 ± 0,0 | 1,1 ± 0,0 | 0,4 ± 0,0 | 0,4 ± 0,0 |
| como HMF | 0,6 ± 0,0 | 0,4 ± 0,0 | 0,2 ± 0,0 | 0,5 ± 0,0 | 0,4 ± 0,0 | 0,4 ± 0,0 | 0,3 ± 0,0 |
| Hemicelulose | 28,2 ± 0,4 | 29,2 ± 0,3 | 8,8 ± 0,3 | 14,8 ± 0,7 | 13,1 ± 0,4 | 10,6 ± 0,4 | 9,2 ± 0,2 |
| como xilose | 20,9 ± 0,4 | 15,5 ± 0,3 | 7,3 ± 0,3 | 12,2 ± 0,7 | 10,2 ± 0,4 | 8,4 ± 0,4 | 7,4 ± 0,2 |
| como arabinose | 3,2 ± 0,1 | 1,3 ± 0,1 | 0,9 ± 0,0 | 1,5 ± 0,0 | 2,5 ± 0,1 | 1,2 ± 0,1 | 1,0 ± 0,1 |
| como ácido acético | 2,6 ± 0,1 | 10,9 ± 0,2 | 0,5 ± 0,0 | 1,2 ± 0,1 | 0,3 ± 0,0 | 0,7 ± 0,0 | 0,7 ± 0,0 |
| como furfural | 1,5 ± 0,0 | 1,4 ± 0,1 | 0,2 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,1 ± 0,0 | 0,2 ± 0,0 | 0,2 ± 0,0 |
| Extrativos | 5,0 ± 0,1 | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| Lignina total | 19,7 ± 1,7 | 21,8 ± 0,4 | 22,9 ± 0,9 | 17,4 ± 0,4 | 10,2 ± 0,3 | 28,8 ± 0,7 | 26,9 ± 0,6 |
| solúvel | 1,8 ± 1,6 | ND | 6,5 ± 0,2 | 7,8 ± 0,3 | 6,9 ± 0,2 | 9,9 ± 0,1 | 8,7 ± 0,2 |
| insolúvel | 17,8 ± 0,7 | 21,8 ± 0,4 | 16,4 ± 0,9 | 9,6 ± 0,3 | 3,2 ± 0,1 | 18,9 ± 0,7 | 18,2 ± 0,5 |
| Cinzas | 5,8 ± 1,5 | 2,6 ± 0,8 | 2,7 ± 0,1 | 2,6 ± 0,1 | 2,0 ± 0,1 | 1,9 ± 0,0 | 2,2 ± 0,2 |
| Total | 97,6 ± 2,4 | 96,8 ± 1,7 | 69,6 ± 1,1 | 64,3 ± 0,9 | 56,3 ± 1,3 | 75,2 ± 1,4 | 73,8 ± 1,3 |

ND: Não detectado;

NA: Não avaliado.

A Tabela 2.3 apresenta os rendimentos de extração (%) em termos de XOS e xilose. De modo geral, observa-se que as os quatro pré-tratamentos estudados atingiram resultados semelhantes em termos de solubilização de biomassa ($R_{Total} \sim 35\%$). Os pré-tratamentos hidrotérmico, organossolve e lavagem do bagaço explodido apresentaram elevado rendimento em termos de xilooligômeros extraídos. Embora a extração de XOS pela lavagem do bagaço de tenha sido relativamente alta, observa-se que uma elevada quantidade de xilose formada no pré-tratamento também foi extraída nas lavagens. Similarmente, cerca de 20% da xilana extraída no tratamento hidrotérmico estava presente na forma monomérica no licor hidrotérmico. A presença de xilose em altas concentrações pode ser vantajosa em processos fermentativos, possibilitando que parte do substrato esteja disponível para a ação de enzimas e/ou microrganismos logo no início da reação. Por outro lado, as elevadas concentrações de xilose no meio reacional deixam o sistema mais sujeito ao desenvolvimento de microrganismos contaminantes (SILVA et al., 2012).

Tabela 0.1 Efeito dos pré-tratamentos sobre os rendimento de solubilização da xilana de cana-de-açúcar.

| Pré-tratamento | R_{XOS} (%) | R_{Xilose} (%) | R_{Total} (%) | XOS (g.L ⁻¹) | Ácido acético (g.L ⁻¹) | Furfural (g.L ⁻¹) | HMF (g.L ⁻¹) |
|--|---------------|------------------|-----------------|--------------------------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Hidrotérmico (195 °C/10 min) | 68,5 ± 4,4 | 18,8 ± 5,3 | 34,4 ± 1,3 | 14,5 ± 0,7 | 1,5 ± 0,2 | 0,3 ± 0,0 | 0,71 ± 0,0 |
| Organossolve (170 °C/60 min/ 50 % etanol v.v ⁻¹) | 44,8 ± 2,5 | 2,9 ± 0,09 | 35,6 ± 0,8 | 14,8 ± 4,1 | 0,5 ± 0,1 | 0,1 ± 0,0 | 0,04 ± 0,0 |
| Alcalino (NaOH 4%, 121°C, 1 atm/30 min) | 28,6 ± 2,1 | ND | 42,6 ± 2,9 | 6,0 ± 0,7 | 2,6 ± 0,2 | ND | ND |
| Lavagem bagaço explodido (1:5 m.v ⁻¹) | 73,0 ± 2,5 | 41,8 ± 1,3 | 28,9 ± 0,6 | 8,0 ± 0,5 | 2,2 ± 0,1 | 0,5 ± 0,0 | 0,45 ± 0,03 |
| Lavagem bagaço explodido (1:10 m.v ⁻¹) | 63,8 ± 2,5 | 32,3 ± 1,7 | 33,0 ± 2,4 | 4,2 ± 0,0 | 1,1 ± 0,0 | 0,2 ± 0,0 | 0,28 ± 0,01 |

R_{XOS} : rendimento em xilooligômeros (%);

R_{Xilose} : rendimento em xilose (%);

R_{Total} : rendimento em termos de solubilização da biomassa (%);

ND: Não detectado.

O licor obtido a partir do pré-tratamento organossolve mostrou-se interessante devido à elevada solubilização da xilana na forma de XOS e baixas concentrações de xilose e ácido acético. Contudo, cerca de 30% da lignina total foi solubilizada no licor, o que poderia prejudicar a hidrólise enzimática devido adsorção da enzima (BERLIN et al., 2005). Somando-

se os custos do uso de etanol envolvidos e das etapas pós-tratamento (rotaevaporação, centrifugação, etc.), o licor organossolve fica em desvantagem em comparação aos obtidos nos demais pré-tratamentos.

O tratamento do bagaço com NaOH em alta temperatura resultou na maior solubilização da xilana disponível ($42,6 \pm 2,9\%$), sendo ela obtida majoritariamente na forma de XOS, sem formação de xilose ou degradação em furfural. Contudo, assim como no caso do pré-tratamento organossolve, ~60% da lignina da biomassa foi extraída para o licor. Um fator comumente desmerecido são as perdas de carboidrato nas etapas de neutralização. Embora necessária para a remoção da lignina solúvel, a redução do pH do licor ocasiona não apenas a precipitação (insolubilização) da lignina mas também de parte da xilana extraída. Em meio alcalino, a maioria dos grupos acetil presentes nas ramificações é perdido devido a reações de desesterificação (saponificação), resultando cadeias de xilana parcial ou totalmente insolúveis em $\text{pH} \leq 8$, possibilitando que parte das cadeias de carboidratos se agrupem em soluções de pH ácido-neutro, favorecendo a sua precipitação (EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HEINZE, 2005).

O elevado rendimento de extração de XOS somados à menor necessidade de etapas após a realização do pré-tratamento hidrotérmico, custo relativamente baixo e ausência de lignina solubilizada no licor foram fatores decisivos para a escolha do licor hidrotérmico como substrato para a produção de etanol 2G nos ensaios *SHIF* realizados posteriormente. Embora moderadamente alta, a presença de xilose no licor pode de certa forma ser vantajosa, pois permite que as etapas de isomerização e fermentação estejam em funcionamento desde o início do processo. As moléculas de xilose já presentes no licor serão isomerizadas em xilulose pela enzima xilose isomerase, sendo esta então consumida pela levedura para produção de etanol. Paralelamente, as cadeias de xilana e XOS serão hidrolisadas pela ação de enzimas do complexo xilanolítico, liberando xilose no interior do biocatalisador.

2.4 Conclusão

Hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar foi extraída utilizando quatro tratamentos diferentes: lavagem da fração sólida do bagaço explodido, pré-tratamento hidrotérmico, organossolve e alcalino. Embora os rendimentos em termos solubilização/extração da hemicelulose tenham sido próximos entre si, o licor hidrotérmico mostrou-se como a solução mais adequada devido à elevada extração de XOS ($68,5 \pm 4,4\%$), moderado teor de xilose monomérica ($18,8 \pm 5,3\%$) e quantidade nula de lignina solubilizada, tendo sido, assim, selecionado para obtenção de substrato para o processo *SHIF*.

2.5 Referências

- ARORA, R.; BEHERA, S.; KUMAR, S. Bioprospecting thermophilic/thermotolerant microbes for production of lignocellulosic ethanol: A future perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 699–717, 2015.
- BEHERA, S. et al. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 91–106, 2014.
- BERLIN, A. et al. Weak Lignin-Binding Enzymes: A Novel Approach to Improve Activity of Cellulases for Hydrolysis of Lignocellulosics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, n. 1–3, p. 0163–0170, 2005.
- BIAN, J. et al. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 638–645, 2012.
- BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, 2016.
- CANILHA, L. et al. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1467–1475, 6 set. 2011.
- CANILHA, L. et al. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–15, 2012.
- CARVALHO, A. F. A. et al. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 75–85, 2013.
- CERQUEIRA LEITE, R. C. DE et al. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**, v. 34, n. 5, p. 655–661, 2009.
- CONAB, C. N. D. A. **Acompanhamento de safra brasileira - Cana-de-açúcar**. Terceiro levantamento, dezembro 2018 - safra 2018/2019. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cana>>. Acesso em: 27/02/2019.
- DA SILVA, A. S. et al. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7402–7409, 2010.
- EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z.; HEINZE, T. Hemicellulose. In: HEINZE, T. (Ed.). **Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 1–67.
- ESPIRITO SANTO, M. et al. Structural and compositional changes in sugarcane bagasse subjected to hydrothermal and organosolv pretreatments and their impacts on enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 113, p. 64–74, 2018.
- GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 74, n. 11, p. 1101–1109, 1999.

GHOSE, T. K.; BISARIA, V. S. Measurement of hemicellulase activities: Part I Xylanases. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 12, 1987.

GILARRANZ, M. A.; RODRÍGUEZ, F.; OLIET, M. Lignin Behavior During the Autocatalyzed Methanol Pulp of Eucalyptus globulus Changes in Molecular Weight and Functionality. **Holzforschung**, v. 54, n. 4, 4 2000.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500–1503, 2009.

HEINZE, T.; LIEBERT, T. Celluloses and Polyoses/Hemicelluloses. In: Matyjaszewski, K., Möller, M., (Eds.). **Polymer Science: A Comprehensive Reference**. Amsterdam: Elsevier Science, 2012. V. 10. p. 83–152.

KIRK, T. K.; OBST, J. R. Lignin determination. In: WOOD, W. A.; KELLOGG, S. T. (Eds.). **Methods in Enzymology**. San Diego: Academic Press. Inc, 1988. p. 87–101.

KUMARI, D.; SINGH, R. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 877–891, 2018.

LIMA, M. A. et al. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 10, 2014.

MABEE, W. E. et al. Updates on Softwood-to-Ethanol Process Development. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129, n. 1–3, p. 55–70, 2006.

MATSUSHIKA, A. et al. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 37–53, 2009.

MCINTOSH, S.; VANCOV, T. Enhanced enzyme saccharification of Sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6718–6727, 2010.

MILESSI-ESTEVEZ, T. et al. An Innovative Biocatalyst for Continuous 2G Ethanol Production from Xylo-Oligomers by *Saccharomyces cerevisiae* through Simultaneous Hydrolysis, Isomerization, and Fermentation (SHIF). **Catalysts**, v. 9, n. 3, p. 225, 2019.

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

MOSIER, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

NASCIMENTO, V. M. **Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. 2011. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

NASCIMENTO, V. M. et al. Alkaline pretreatment for practicable production of ethanol and xylooligosaccharides. **Bioethanol**, v. 2, n. 1, 2016.

- NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 1, p. 52–68, 2011.
- PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31–31, n. 5–6, p. 547–550, 1989.
- QUINTERO, J. A.; RINCÓN, L. E.; CARDONA, C. A. Biofuels. [s.l.] Elsevier, 2011.
- RABEMANOLONTSOA, H.; SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 83–91, 2016.
- ROMANÍ, A. et al. Valorization of Eucalyptus nitens bark by organosolv pretreatment for the production of advanced biofuels. **Industrial Crops and Products**, v. 132, p. 327–335, 2019.
- ROOS, A. A. et al. Extraction of water-soluble hemicelluloses from barley husks. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 763–769, 2009.
- ROWELL, R. **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**. 2 Ed. Boca Raton: CRC Press, 2012. 703 p.
- RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 841–845, 14 2008.
- SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.
- SEIDL, P. R.; GOULART, A. K. Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 2, p. 48–53, 2016.
- SILVA, C. R. et al. An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, n. 1, p. 35–42, 2012.
- SILVA, G. M. **Avaliação de diferentes configurações de hidrólise enzimática e fermentação utilizando bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etano 2G**. 2015. 125 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.
- SLUITER, A. et al. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure**. NREL - National Renewable Energy Laboratory, 2012.
- TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621–1651, 2008.
- VAN MARIS, A. J. A. et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, n. 4, p. 391–418, 11 2006.
- VÁZQUEZ, M. J. et al. Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: evaluation of operational strategies. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 8, p. 889–896, 2005.

WOLF, L. D. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooliômeros**. 2011. 147f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

YU, G. et al. Pretreatment of Rice Straw by a Hot-Compressed Water Process for Enzymatic Hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 2, p. 539–551, 2010.

ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 815–827, 2009.

CAPÍTULO 3[†]: XILANA DE EUCALIPTO: SUBSTRATO PRODUZIDO *IN-HOUSE* PARA SUBSTITUIR XILANA DE BÉTULA NA AVALIAÇÃO DE XILANASES

3.1 Introdução

A xilana é um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza, cuja a estrutura é composta de uma cadeia principal de resíduos D-xilopiranosil (xilose) unidos por ligações β -(1,4), contendo cadeias laterais que variam dependendo da variedade da biomassa. A madeira de bétula, uma glucuronoxilana, apresenta o segundo oxigênio (2-O) substituído por 4-O-metil-D-glucuronopiranosose ou D-glucuronopiranosose nas cadeias laterais. Arabinoxilanas, como aveia e bagaço de cana-de-açúcar, podem ter 3-O e/ou 2,3-di-O-L-arabinofuranose ligados ao esqueleto. Arabinoglucuronoxilanas como o trigo podem ter a cadeia principal substituída por L-arabinofuranose na posição 3 ou em ambas as posições 3 e 2, bem como resíduos laterais de ácido 2-O-metilglucurônico ou ácido glucurônico. Além disso, os grupos acetil podem ser ligados aos resíduos de arabinose ou xilose em porcentagens variadas (BIELY, 2003; EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HEINZE, 2005).

A degradação da xilana abrange uma ampla variedade de aplicações, incluindo branqueamento de celulose, digestão de ração animal, biocombustíveis, produção de xilooligossacarídeos, etc. (MILESSI et al., 2016; PENG et al., 2009). Estudos sobre sistemas enzimáticos microbianos capazes de despolimerizar xilana vegetal são importantes para a consolidação de uma economia renovável baseada na biomassa de subprodutos industriais florestais, agrícolas, madeireiros, papel e celulose (DODD; CANN, 2009). Na maioria dos estudos publicados, o método IUPAC usual para quantificar a atividade da endoxilanase é a medição das velocidades iniciais de hidrólise de 4-O-metilglucuronoxilana de bétula catalisada pela enzima sob condições padrão. No entanto, xilana de bétula tornou-se comercialmente indisponível pela maioria dos fornecedores. A xilana de madeira de faia, uma glucuronoxilana alternativa que pode ser usada para avaliar a atividade de xilanases, retornou recentemente ao mercado e é vendida por apenas um fornecedor a um preço relativamente alto. A falta de substratos resultou em uma demanda crescente por fontes alternativas de xilana (MCCLEARY; MCGEOUGH, 2015).

[†] Os resultados apresentados nesse capítulo encontram-se publicados em revista indexada: CORRADINI, F. A. S. et al. Eucalyptus xylan: An in-house-produced substrate for xylanase evaluation to substitute birchwood xylan. **Carbohydrate Polymers**, v. 197, p. 167–173, 2018.

A fim de preencher a lacuna deixada pela xilana de bétula, o substrato substituto deve ser prontamente disponível ou pode ser facilmente produzido internamente, em escala de laboratório. Sua composição e estrutura devem ser similares às da xilana de bétula, resultando em desempenhos enzimáticos equivalentes. Ainda mais importante, uma vez que este substrato seja obtido, é essencial que os resultados possam ser comparados com aqueles obtidos em estudos publicados anteriormente e aqueles já em andamento usando bétula.

Xilana foi extraída com sucesso de diferentes fontes de biomassa, como milho (OLIVEIRA et al., 2010), cana-de-açúcar (BIAN et al., 2012), talo de algodão (GOKSU et al., 2007) e eucalipto (PINTO; EVTUGUIN; NETO, 2005; SILVA et al., 2017). Entre estes, a xilana de eucalipto é particularmente interessante, uma vez que a composição química da madeira de eucalipto é próxima da composição de madeira de bétula. O eucalipto compreende 12,1 a 20,8% de xilose, 0,5 a 1,0% de arabinose, 1,0 a 2,0% de manose, 1,1 a 2,2% de galactose, 2,1 a 6,1% de ácido urônico e 2,8 a 3,6% de ácido acético (ALVES et al., 2010; KABEL et al., 2002; MIRANDA; PEREIRA, 2002), enquanto a bétula possui 18,5 a 24,9% de xilose, 0,3 a 0,5% de arabinose, 1,7 a 3,2% de manose, 0,7 a 1,3% de galactose, 3,6 a 6,3% de ácido úrico e 3,7 a 3,9% ácido acético (FENGEL; WEGNER, 1983; GÍRIO et al., 2010). Considerando a proximidade em termos de conteúdo de xilose, o eucalipto (Euc) destaca-se como possível fonte de extração de xilana. Embora alguns estudos tenham explorado a madeira bruta de eucalipto e a polpa branqueada, não há registros de estudos na literatura utilizando esta xilana extraída e purificada em vez de xilana de bétula como substrato para medir as atividades de endoxilanase. Considerando que a celulose branqueada de eucalipto é uma matéria-prima obtida das indústrias de celulose/papel, ela pode estar facilmente disponível em todo o mundo.

Neste contexto, um protocolo para a produção *in house* de um substituto eficiente para a xilana de bétula a ser usado para medir a atividade da endoxilanase foi estudado. A polpa branqueada de eucalipto (holocelulose), um material amplamente disponível em várias partes do mundo, foi escolhida como matéria-prima. O efeito dos parâmetros de extração e purificação foram avaliados. Métodos analíticos (espectroscopia no infravermelho, termogravimetria e RMN) foram utilizados para a caracterização. As xilanas obtidas foram testadas como substratos para a três diferentes xilanases comerciais, e os resultados foram comparados com os obtidos usando a xilana de bétula comercial descontinuada.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Materiais

Polpas de celulose de eucalipto branqueadas foram gentilmente doadas pela Suzano Papel e Celulose S.A. – Brasil (SUZ) e pela Empresa Internacional Paper Papel e Celulose – Brasil (IPAPER). Os materiais foram reduzidos a partículas finas (≤ 20 mesh) em um moinho de facas tipo Willey (Tecnal, Piracicaba, Brasil). Xilana de bétula foi adquirida da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). Preparações comerciais de enzimas Multifect CX XL A03139 ($46 \pm 2,0$ UI.mg⁻¹), Acelerase XY A03304 ($646 \pm 4,0$ UI.mg⁻¹) foram doadas pela Dupont/Genencor (Palo Alto, CA, EUA) a Novo NS22036 (646 ± 25 UI.mg⁻¹) pela Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). Todos os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

3.2.2 Métodos

Extração da xilana de eucalipto

Primeiramente, a polpa de eucalipto foi caracterizada quimicamente de acordo com a metodologia do NREL (SLUITER et al., 2012), conforme explicado no CAPÍTULO 2. As extrações da xilana foram realizadas com NaOH 4% m.v⁻¹ ou DMSO (1:20 m.v⁻¹, 250 rpm, 25 °C, 20h), seguindo as metodologias de Saarnio, Wathen e Gustafsson (1954), e Hägglund, Lindberg e McPherson (1956), respectivamente. Após filtração (*Mesh* 500), o extrato alcalino foi acidificado com H₂SO₄ 70% v.v⁻¹ ou HCl 70% v.v⁻¹ até atingir pH 3,0; ou com ácido acético (HOAc) até atingir pH de 5,0 a 7,0 e então armazenado a 4 °C por 14 horas. A xilana extraída com DMSO foi acidificado com HOAc até se atingir um pH de 5,0 e então foi precipitada com etanol absoluto (2:1 $V_{\text{etanol}}:V_{\text{solução extraída}}$). Os precipitados formados foram separados por centrifugação (4435 x g, 4 °C, 30 min), lavados com solução etanol-água (1:1 v:v), depois com etanol absoluto para deslocar a água, liofilizado e peneirado (*mesh* 50).

Solubilização da xilana

A xilana extraída em solução alcalina foi solubilizada através de tratamento térmico a 121 °C e 1 atm em autoclave, em triplicata. As suspensões de xilana foram preparadas a 2% m.v⁻¹ em água destilada e autoclavadas por 15 a 30 minutos após atingir a temperatura ajustada. Imediatamente após a descompressão, as suspensões foram homogeneizadas vigorosamente e resfriadas naturalmente até temperatura ambiente (25 °C). Cada suspensão foi diluída 1:2 v.v⁻¹ com tampão citrato de sódio 100 mM pH 5,5 e usada

como substrato para medir a atividade de xilanases. As partículas insolúveis foram separadas usando papel de filtro (diâmetro de poro de 12 μm) sob filtração a vácuo; sendo a fração solúvel de xilana usada para medidas de atividade.

3.2.3 Métodos analíticos

Atividade de xilanase e teor de proteínas totais

As atividades de xilanase foram determinadas em triplicata de acordo com a metodologia IUPAC, calculando a velocidade inicial de hidrólise de xilana por uma quantidade conhecida de enzima (GHOSE; BISARIA, 1987). A xilana de bétula foi usada como substrato de referência para todos os ensaios com xilana de eucalipto.

A medida de atividade era iniciada pela adição de xilanase diluída ao meio reacional contendo xilana (1% m.v⁻¹) em tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 5,5, mantendo-se sob agitação mecânica por 10 minutos a 50 °C. Alíquotas foram retiradas a cada 2 minutos e os açúcares redutores (ART) liberados foram quantificados pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS) (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992). Uma unidade de atividade (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para libertar um μmol de xilose por minuto em condições de ensaio.

As concentrações de proteína foram determinadas usando o método de Bradford (1976). As atividades enzimáticas foram expressas como atividades específicas (UI.mg⁻¹ proteína) para comparar o desempenho das xilanases tanto na suspensão como no substrato filtrado.

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e espectroscopia de RMN

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foi utilizada para caracterizar a composição química da xilana de bétula e de eucalipto. As análises foram realizadas em equipamento Bruker Vertex 70 equipado com um cristal de diamante, operado no modo ATR na faixa de frequência 4000 – 400 cm⁻¹, com uma resolução de 4 cm⁻¹; sendo realizadas 32 varreduras.

As medidas de RMN foram realizadas utilizando um espectrômetro de RMN Bruker Avance III (9,4 Tesla / 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C) equipado com uma sonda BBI de 5 mm. As amostras foram medidas em DMSO-*d*₆ a 80 °C. Os espectros de correlação

de ^{13}C – ^1H heteronucleares (HSQC) foram registados utilizando um programa de pulsos Bruker de rotina (hsqcetgp), com $d1 = 1\text{s}$, $\text{TDF1} = 256$ e $\text{TDF2} = 4\text{K}$. Os sinais $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ do solvente $\text{DMSO-}d_6$ (δ 39,5 / 2,50) foram utilizados como referência interna.

Análise térmica de xilana

Análises termogravimétricas (TGA) e termogravimétricas derivada (DTG) da xilana foram realizadas em um analisador termogravimétrico/diferencial simultâneo Shimadzu DTG-60H. Dez miligramas de xilana foram primeiramente secos a $110\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min ($30\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), seguido de decomposição térmica até $900\text{ }^\circ\text{C}$ a uma taxa de $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Os ensaios foram realizados sob pressão atmosférica com um fluxo de nitrogênio de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Quantificação de carboidratos e produtos de degradação

Carboidratos, furfural e 5-hidroximetil furfural (HMF) foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, Shimadzu, Japão), antes e após a hidrólise ácida ($72\%\text{ H}_2\text{SO}_4\text{ v.v}^{-1}$, $121\text{ }^\circ\text{C}$, 30-60 minutos). Xilose, glicose, ácido glucurônico e ácido acético foram quantificados usando uma coluna BioRad Aminex HPX-87H ($300 \times 7,8\text{ mm}$) acoplada a um detector de índice de refração (RID) a $50\text{ }^\circ\text{C}$ (coluna a $65\text{ }^\circ\text{C}$, $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ H}_2\text{SO}_4$ eluindo em fluxo de $0,6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). Furfural e HMF foram quantificados usando a coluna Waters SunFire C_{18} ($4,6 \times 150\text{ mm}$) a $40\text{ }^\circ\text{C}$ e detector UV-Visível (λ 274 nm), usando solução de acetonitrila-água ($1: 8\text{ v.v}^{-1}$) + HOAc ($1\%\text{ v.v}^{-1}$) eluindo em um fluxo de $0,8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Efeito da extração com solvente

Antes dos experimentos de extração, as composições das polpas de holocelulose de eucalipto de duas indústrias distintas de papel/celulose foram caracterizadas quimicamente. Embora o processo industrial *Kraft* possa diferir de empresa para empresa, a celulose de eucalipto da SUZ apresentou uma composição química semelhante à da IPAPER (Tabela 3.1). Os teores de carboidratos foram semelhantes, sendo a celulose o polímero principal ($\sim 72\%$) e a xilose como principal constituinte da fração hemicelulósica das polpas. Teores menores de arabinose e ácido glucurônico presentes como ácido 4-O-metilglucurônico (MeGlcA) (conforme sugerido pelo RMN apresentado posteriormente) e HOAc também

estavam presentes. Embora a quantidade de xilose presente na holocelulose seja ligeiramente inferior em comparação à madeira não branqueada, como bétula e faia (FENGEL; WEGNER, 1983), a polpa de eucalipto branqueada tem a vantagem de ter um baixo teor de lignina (cerca de 25 vezes menor), tornando-se um material interessante para a extração de xilana.

Tabela 3.1. Composição química (% em massa) de polpa de eucalipto de duas diferentes indústrias de papel / celulose.

| | SUZ | IPAPER |
|------------------------|------------|------------|
| Celulose | 72,2 ± 0,3 | 72,5 ± 1,0 |
| como glicose | 70,9 ± 0,3 | 71,1 ± 1,0 |
| como celobiose | 0,7 ± 0,0 | 0,8 ± 0,0 |
| como HMF | 0,7 ± 0,0 | 0,7 ± 0,0 |
| Hemicelulose | 18,9 ± 0,3 | 18,4 ± 0,2 |
| como xilose | 16,5 ± 0,1 | 16,1 ± 0,2 |
| como arabinose | 0,2 ± 0,0 | 0,1 ± 0,0 |
| como ácido acético | 0,6 ± 0,0 | 0,6 ± 0,1 |
| como ácido glucurônico | 0,4 ± 0,0 | 0,4 ± 0,0 |
| como furfural | 1,4 ± 0,0 | 1,3 ± 0,1 |
| Lignina | 3,7 ± 0,1 | 3,2 ± 0,3 |
| Cinzas | 1,1 ± 0,1 | 1,0 ± 0,1 |
| Total | 94,6 ± 2,1 | 93,0 ± 2,8 |

As soluções de DMSO e NaOH foram testadas como solventes para isolar a xilana da polpa branqueada de eucalipto. Observou-se um maior rendimento de extração quando NaOH foi utilizado, sendo extraído 43% da xilana da polpa na fase líquida, comparado a apenas 11% quando o DMSO foi utilizado. A análise por HPLC mostrou que nenhum dos compostos utilizados para a extração degradou os carboidratos em furfural ou HMF. O rendimento da extração alcalina está de acordo com os métodos relatados por Gabriellii et al. (2000) onde 55% de xilana de madeira de álamo-trêmulo (*Populus tremuloides*) foram extraídos com 4% m.v⁻¹ de NaOH a temperatura ambiente. Rowley et al. (2013) relataram o maior rendimento de 8,7% ao extrair xilana de palha de milho branqueada usando DMSO. Embora os rendimentos possam ser muito menores em comparação com outras técnicas de extração, as extrações com DMSO preservam os grupos acetil na estrutura nativa de xilana, resultando em uma forma mais intacta e solúvel em água, como relatado por Hägglund, Lindber e McPherson, (1956). A extração alcalina remove maior quantidade de xilana e galactoglucomanas mais solúveis; no entanto, a maioria dos grupos acetil são perdidos

devido a reações de desesterificação (saponificação), resultando em maiores rendimentos de extração e cadeias de xilana menos ramificadas (EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000; FENGEL; WEGNER, 1983). Levando isso em consideração, e analisando o maior rendimento de extração, as extrações de xilana seguintes foram realizadas usando solução de NaOH.

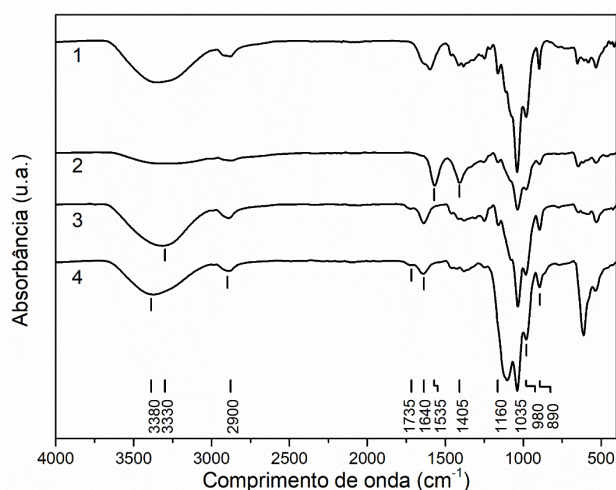
3.3.2 Efeito do agente precipitante e do pH final da solução de extração

Após a extração, uma etapa de precipitação para purificar a xilana extraída com álcali foi realizada. O pH das soluções foi reduzido para 5,0 pela adição de HOAc e para 3,0 com ácido clorídrico (70% v.v⁻¹) e ácido sulfúrico (70% v.v⁻¹) diluídos. A acidificação precipitou eficientemente a xilana extraída, sendo que após a centrifugação 1,7% (m.v⁻¹) de xilana permaneceram em solução após precipitação com HCl, 1,6%, após com H₂SO₄ e 0,12% com HOAc. Atividade de xilanase foi medida em cada uma das amostras de xilana precipitadas (após serem liofilizadas) utilizando a xilanase Multifect e comparada com as atividades medidas na xilana de bétula. As atividades utilizando a xilana de eucalipto (Euc-xilana) precipitadas com HCl ou H₂SO₄ foram semelhantes, isto é, $17,3 \pm 0,2$ e $17,8 \pm 0,2$ UI.mg⁻¹, respectivamente. A atividade medida na xilana precipitada com HOAc foi de $34,4 \pm 0,6$ UI.mg⁻¹, a qual foi a mais próxima da medida utilizando xilana de bétula descontinuada ($46,0 \pm 2,0$ UI.mg⁻¹).

A análise por FT-IR dos espectros de xilana precipitadas com ácido foi semelhante aos padrões de sinal de xilana de bétula (Figura 3.1), dominada por estiramentos e vibrações da ligação glicosídica, C–O–C da xilana a 1035 cm⁻¹ (CHAIKUMPOLLERT; METHACANON; SUCHIVA, 2004), e as bandas típicas de C–C, C–O e C–OH a 1160, 980 e 890 cm⁻¹, respectivamente (KAČURÁKOVÁ et al., 1999). A absorção em 3380–3330 cm⁻¹ correspondeu à vibração do estiramento de O–H da xilana, bem como as em resultado das interações de hidrogênio entre as moléculas de água; a banda a 2900 cm⁻¹ representa as vibrações do estiramento C–H (SUN et al., 2004). Os pequenos picos de ombro a 1735 cm⁻¹, devido ao alongamento C=O, indicaram a presença de grupos acetil na xilana precipitada com H₂SO₄ e HCl, mas não na xilana precipitada com HOAc (BIAN et al., 2010b). As bandas de 1575 e 1405 cm⁻¹ representando o estiramento simétrico de –COO do ácido glucurônico na forma sal ou ácida eram claramente visíveis apenas na xilana bétula e xilana precipitada com HOAc (BIAN et al., 2010a; BIELY et al., 2015). Esses resultados sugerem que, durante a etapa de purificação, a adição de ácidos fortes, como o HCl e o H₂SO₄, afeta a estrutura química das cadeias de xilana, especialmente a remoção de ramificações. O HOAc não afetou em grande parte a estrutura da xilana, deixando o substrato estruturalmente mais próximo da bétula comumente utilizada para as medições da atividade da xilanase. Juntamente com as

alterações químicas na Euc-xilana, a afinidade das enzimas xilanase pelo substrato também foi afetada. Sabe-se que a ação da xilanase na cadeia de xilana não é aleatória, mas as ligações selecionadas para a hidrólise dependem de vários fatores, como natureza do substrato, comprimento da cadeia, grau de ramificação e presença de substituintes (BIELY, 2003; LI et al., 2000; POLIZELI et al., 2005). Portanto, a seleção do agente precipitante deve ser feita com cuidado, tendo em vista a preservação das características da xilana obtida, especialmente se esta for aplicada como substrato para medir a atividade enzimática. Para continuação do estudo, a extração de xilana foi realizada pela precipitação com HOAc.

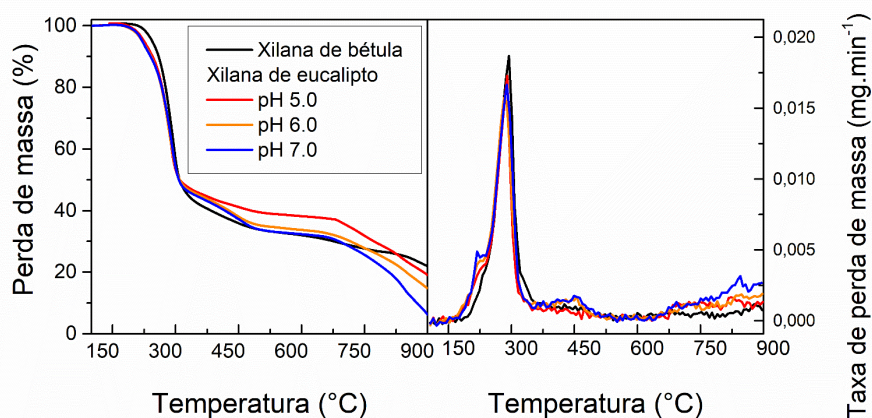
Figura 3.1 Espectro de FT-IR para (1) bétula comercial e xilana de eucalipto precipitada com (2) HOAc, (3) HCl e (4) H₂SO₄.



A utilização de HOAc como agente precipitante permite a purificação de xilana em diferentes pHs finais, o que pode levar a diferentes quantidades de sal (acetato de sódio) formando junto à xilana em pó (LI et al., 2000). A fim de investigar a influência do sal na xilana, extrações em bateladas foram realizadas a 25 °C por 20 horas e as soluções tiveram seus valores de pH ajustados para 5,0, 6,0 e 7,0 pela lenta adição de HOAc. Análises TGA/DTG, bem como a análise do conteúdo inorgânico residual (cinzas) de cada xilana foram realizadas. A xilana de bétula foi utilizada como material de referência. As curvas de TGA apresentaram comportamento semelhante, com a principal fase de perda de massa ocorrendo em temperaturas entre 220 e 320 °C (Figura 3.2). As curvas de DTG foram semelhantes, com um pico exotérmico a 290 °C, correspondendo à pirólise da hemicelulose, que também está presente na xilana de bétula (YU et al., 2017). Em xilanas precipitadas até pH 5,0, 18,3% da massa seca correspondente foram cinzas. Um aumento para pH 6,0 reduziu as cinzas para 14,0%, e para pH 7,0, este conteúdo caiu para 6,2%. Fica claro que quanto menor o pH final, maior o teor de sal na xilana seca. A xilana de bétula apresentou 21,9% da massa em cinzas

no final do processo. Após análise por TGA da xilana do bagaço de cana-de-açúcar (isolado com KOH 10% e neutralizado com HOAc, pH 5,8), Bian et al. (2012) relataram que aproximadamente 20% dos sólidos remaneceram ($T = 600\text{ }^{\circ}\text{C}$); sendo o comportamento atribuído à presença de sais que se formaram durante as extrações e produtos da decomposição pirolítica da hemicelulose.

Figura 3.2. Curvas de TGA (A) e DTG (B) para xilana de bétula e de eucalipto. Xilanas de eucalipto foram extraídas com $4\% \text{ m.v}^{-1} \text{ NaOH}$ (25°C , 20h) e precipitadas com pH final entre 5,0 – 7,0 com HOAc.

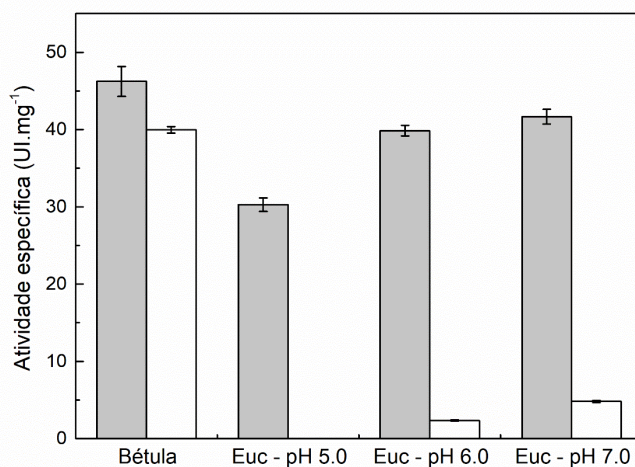


O passo de precipitação consiste em uma reação de neutralização, com a formação de sal como o produto de reação. Parte deste sal permanece junto da xilana, mesmo após a centrifugação e secagem, o que tem implicações nas atividades enzimáticas, uma vez que pode eventualmente diminuir a concentração inicial de carboidratos disponíveis. A velocidade da reação é uma função da concentração do substrato. Portanto, se resultados/ensaios diferentes estão sendo comparados, a concentração real do substrato deve ser a mesma (COOK; CLELAND, 2007).

As atividades das xilanases foram medidas utilizando as xilanas (10 g.L^{-1} , precipitadas a pH 5,0-7,0). A Figura 3.3 mostra as atividades medidas nas suspensões de xilana e comparou-se com as atividades quando se utilizou xilana de bétula (10 g.L^{-1}) como substrato. Como esperado, um aumento na precipitação do ponto final de pH 5,0 para 6,0 resultou na melhoria da atividade enzimática medida na suspensão. No entanto, embora o teor de sal em Euc-pH 6 seja quase 2 vezes da quantidade em Euc-pH 7, as atividades nas suspensões usando a mesma concentração de xilanas obtidas por precipitação a pH 6,0 ou 7,0 não mostraram diferença significativa e foram próximas ao obtido com xilana de bétula. No entanto, quando as soluções foram filtradas, observou-se uma expressiva queda de atividade nos sobrenadantes de Euc, enquanto as atividades medidas no filtrado de bétula foram equivalentes às de suas suspensões. Esses resultados sugerem que a atividade medida nas suspensões é, de fato, uma combinação da hidrólise das frações solúvel e

insolúvel de xilana. Embora a xilana de bétula seja parcialmente solúvel, a Euc-xilana permanece em grande parte em suspensão. A xilana potencial em cada substrato filtrado (obtido após hidrólise ácida) foi: $3,26 \pm 0,12 \text{ g.L}^{-1}$ para xilana de bétula e $0,21 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}$, $0,22 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$, e $0,41 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$ para as xilanas Euc-pH 5,0, 6,0 e 7,0, respectivamente. As concentrações de xilanas medidas em cada filtrado estão de acordo com as atividades enzimáticas usando as frações solúveis como substrato. Além disso, é importante apontar que diferentes xilanases podem ter comportamentos distintos ao hidrolisar um substrato. Embora a xilanase Multifect hidrolise preferencialmente a fração solúvel de xilana, outras endoxilanases como as *Bacillus subtilis* são capazes de hidrolisar as frações solúvel e insolúvel do substrato (MILESSI et al., 2016; PUCHART et al., 2018). A baixa solubilidade da Euc-xilana pode limitar sua aplicação como substrato para xilanases, impedindo seu uso em estudos de imobilização, por exemplo. Portanto, a solubilidade da xilana foi investigada mais a fundo.

Figura 3.3. Efeito do pH do ponto final de precipitação da Euc-xilana nas atividades da xilanase Multifect, medida na suspensão (cinza) e no sobrenadante filtrado (branco). A xilana de bétula não-autoclavada foi utilizada como referência.

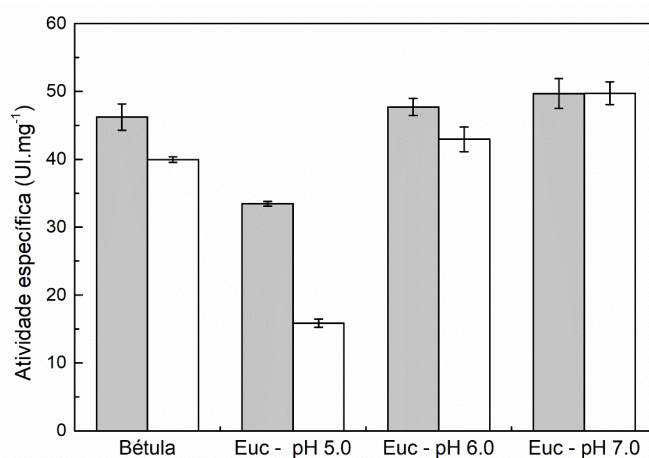


3.3.3 Solubilização de xilana de eucalipto

As suspensões de xilana de eucalipto foram submetidas a tratamento térmico a $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em autoclave por 15 minutos. As concentrações de xilana solúvel aumentaram de $0,23 \pm 0,01$ para $1,64 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$, $0,22 \pm 0,01$ para $3,95 \pm 0,15 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,40 \pm 0,01$ para $4,13 \pm 0,22 \text{ g.L}^{-1}$ para as xilanas Euc pH 5,0, 6,0 e 7,0, respectivamente. As concentrações de xilana no caso de Euc pH 6,0 e 7,0 foram ligeiramente superiores à concentração da fração xilana solúvel de bétula não autoclavada ($3,28 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}$). A atividade medida no sobrenadante filtrado de xilana Euc - pH 5,0 aumentou após o tratamento térmico, sendo aproximadamente

metade daquela obtida na suspensão, como visto na Figura 3.4. A melhoria na solubilidade foi mais pronunciada para Euc-pH 6,0, onde 90% da atividade medida na suspensão foi detectada no substrato filtrado. Para a Euc-pH 7,0, as atividades medidas na suspensão e nas frações filtradas foram equivalentes e ambas maiores que as da xilana de bétula. Esses resultados indicam que a xilana de eucalipto extraída requer uma etapa adicional de solubilização antes de seu uso como substrato.

Figura 3.4. Solubilização de Euc-xilana (121 °C, 1 atm, 15 min). Atividade enzimática medida com xilanase Multifect na suspensão (cinza) e o sobrenadante filtrado (branco). A xilana de bétula não-autoclavada foi utilizada como referência.



A solubilidade da xilana é afetada pelo grau de polimerização, grau de substituição e tipo de ramificação (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010). Dependendo do tipo de ramificação presente na cadeia, a interação das grandes cadeias de xilose pode mudar. A xilana é um polissacarídeo ramificado composto por um esqueleto formado por resíduos de xilopiranosil (xilose) com ligação β -(1,4). A xilana de bétula é uma glucuronoxilana, com MeGlcA ligado ao O-2 da xilose do esqueleto de xilana (SARASWAT; BISARIA, 2000; ZHANG et al., 2011). A xilana de eucalipto é uma glucuronoxilana, com MeGlcA, bem como grupos acetil ligados à cadeia principal. Apesar das composições similares, a distribuição das cadeias glicosídicas laterais pode diferir dependendo da fonte da xilana (HUISMAN; SCHOLS; VORAGEN, 2000). A presença de ramificações desempenha um papel importante nas propriedades físico-químicas, principalmente, na solubilidade do polissacarídeo. Se a xilana apresentar menor frequência de substituição, maior a probabilidade de associação de cadeias de xilana entre si ocorrerá devido às ligações de hidrogênio intra e intermoleculares que são nativas ou criadas durante as etapas de extração e secagem da produção de xilana (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HEINZE, 2005; GOMES; CHIMPHANGO; GÖRGENS, 2015). Embora consideradas ligações mais fracas, o movimento

Browniano das moléculas de água não é suficiente para quebrar as interações entre as cadeias de xilana ressuspensa em tampão. O tratamento físico, como o aquecimento em autoclave, possibilita a quebra das interações de hidrogênio entre as cadeias de carboidratos, permitindo sua liberação e aumentando a solubilização da xilana (PICOUT et al., 2003). Assim, o aumento da atividade enzimática observado após a autoclavagem da Euc-xilana é devido ao aumento na concentração de xilana solúvel disponível no meio reacional.

Embora vários autores tenham explorado a extração de polissacarídeos a partir de eucalipto, até onde sabemos, nenhum deles testou a xilana purificada para a medida da atividade da xilanase. Como o objetivo desta etapa do trabalho é obter um substrato equivalente à xilana de bétula, o valor de pH final de 6,0 foi selecionado para experimentos posteriores, considerando os resultados equivalentes àqueles observados para xilana de bétula em termos de concentrações de açúcar solúvel e atividades enzimáticas, tanto no caso da suspensão como do sobrenadante filtrado.

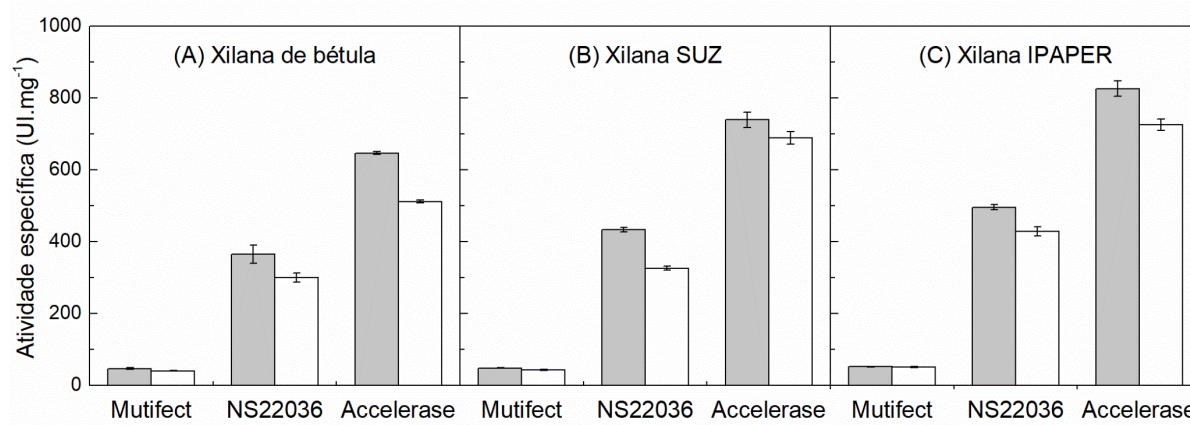
O efeito do tempo de exposição a 121 °C em xilana precipitado até pH 6,0 foi avaliado. O tratamento térmico promoveu um aumento na atividade medida na suspensão. A concentração de xilana da fração solúvel apresentou um aumento acentuado de $0,22 \pm 0,01$ g.L⁻¹ para $3,96 \pm 0,15$ g.L⁻¹ após 15 min de autoclavagem a 121 °C. A extensão da exposição a 30 minutos aumentou a concentração de xilana para $4,41 \pm 0,20$ g.L⁻¹, enquanto a atividade enzimática permaneceu basicamente a mesma que a medida para o substrato autoclavado de 15 min. Furfural não foi detectado em qualquer experimento. As atividades medidas para os sobrenadantes filtrados foram equivalentes às medidas com a fração solúvel de xilana de bétula não autoclavada. Assim, um tratamento de 15 minutos foi considerado suficiente para romper as ligações entre as cadeias de xilana e solubilizá-la de modo a ser eficientemente usada como um substrato de xilanase.

3.3.4 Validação de protocolo de extração / purificação de xilana

A validação do protocolo de extração / purificação foi realizada com polpa de eucalipto branqueada fornecida pela empresa International Paper (IPAPER), seguindo as condições otimizadas obtidas nos experimentos anteriores: extração com NaOH 4% m.v⁻¹ a 25 °C por 20 h; precipitação com HOAc para um valor de pH final de 6,0; liofilização; e solubilização em autoclave (121 °C, 1 atm, 15 min). A concentração de xilana após o tratamento térmico aumentou de $0,89 \pm 0,00$ para $4,54 \pm 0,13$ g.L⁻¹ no sobrenadante filtrado após hidrólise ácida, apresentando um comportamento semelhante ao observado no caso do xilana Euc-SUZ.

Os complexos enzimáticos Multifect, Accelerase e NS22036 foram utilizados para verificar a eficácia do Euc-xilana como substrato para a determinação da atividade da xilanase. Como se pode ver na Figura 3.5, os três complexos enzimáticos hidrolisaram a xilana de bétula essencialmente à mesma taxa que a Euc-xilana extraída das polpas SUZ e IPAPER. As atividades da Multifect que foram medidas usando as duas Euc-xilanas foram consideradas equivalentes às observadas no caso de xilana de bétula, tanto na suspensão como no sobrenadante filtrado. As xilanases NS22036 e Accelerase mostraram atividades similares no caso das Euc-xilanas SUZ e IPAPER, e ambos foram levemente superiores às atividades medidas no caso de xilana de bétula (substrato controle).

Figura 3.5. Atividades enzimáticas de xilanases comerciais em (A) xilana de bétula não autoclavada, Euc-xilana (B) SUZ e (C) IPAPER antes e depois da solubilização (121 ° C, 1 atm, 15 minutos) na suspensão (cinza) e o sobrenadante filtrado (branco).

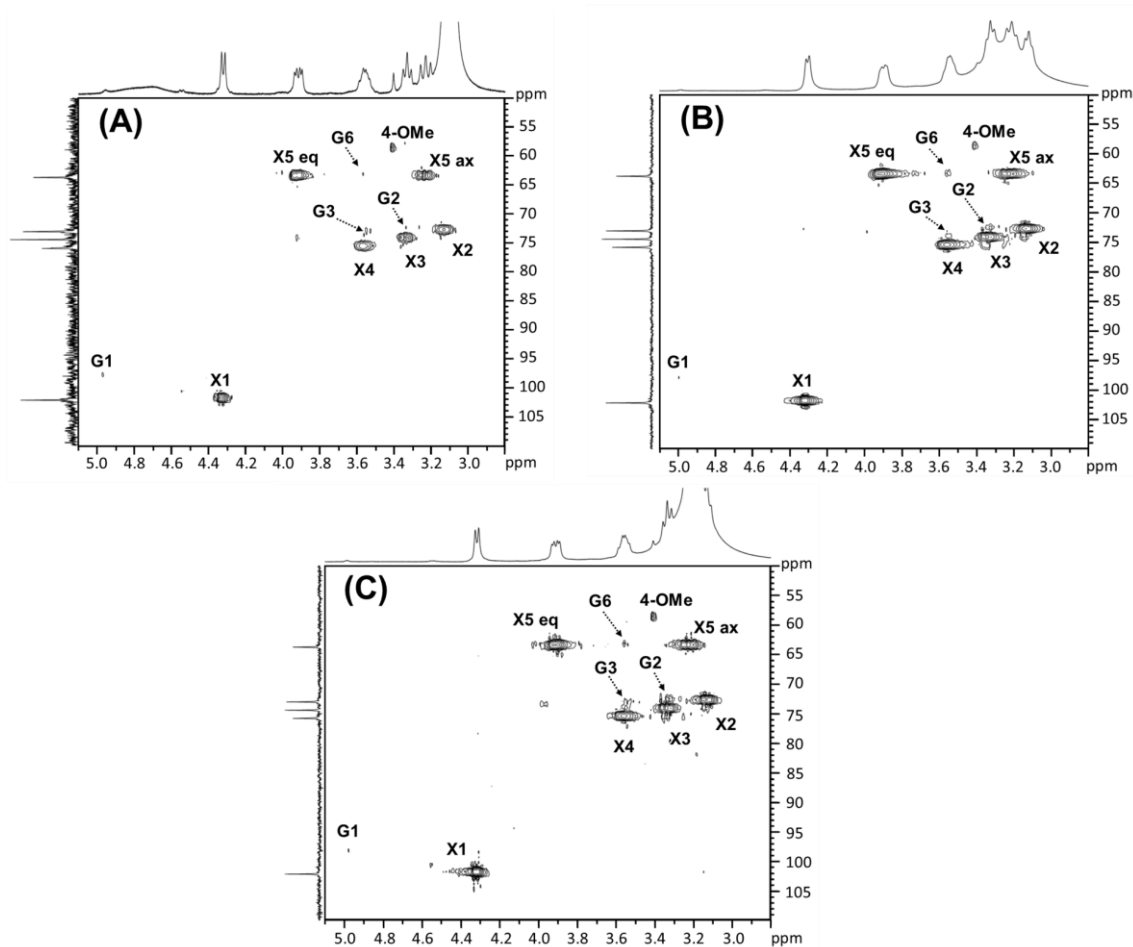


A Figura 3.5 também indica que as atividades da Accelerase e da NS22036 foram maiores do que as do complexo xilanólítico Multifect para todos os substratos. Estas preparações enzimáticas compreendem uma mistura de endoxilanas, exoxilanas, β -xilosidases e enzimas acessórias. Embora a atividade medida seja uma combinação da ação dessas enzimas, quando as taxas iniciais são determinadas, a atividade medida é na realidade principalmente devido à ação da endoxilanase (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016). Segundo Dodd e Cann, (2009), a atividade da β -xilosidase é o último passo na hidrólise do polímero xilana, que requer a quebra de longas cadeias de xilana para oligômeros menores por endoxilanas, eventualmente formando xilobiose, a fim de iniciar sua ação catalítica. Embora a Multifect inclua endoxilanas, uma alta concentração de β -xilosidase está presente em sua mistura, o que explica sua menor atividade em comparação com as outras preparações de xilanase.

O comportamento observado de diferentes complexos enzimáticos, isto é, a hidrólise de xilanas de bétula e eucalipto com a mesma velocidade, é devido às suas estruturas químicas semelhantes, o que foi confirmado por análise de espectroscopia de RMN. O espectro de ^1H (ver Figura 1 do Anexo) de fragmentos de oligômeros pode ser utilizado para identificar domínios estruturais específicos presentes nas xilanas poliméricas. Nas três amostras diferentes, os sinais relevantes ocorreram na região do anel de prótons (δ 4,50-3,00 ppm), onde os picos de ressonância da maioria dos prótons apareceram, embora alguns dos sinais fossem sobrepostos e difíceis de discernir. Para melhor compreender a estrutura ramificada das hemiceluloses, utilizou-se espectroscopia de ^{13}C RMN (ver Figura 2 do Anexo). Os espectros de RMN de ^{13}C das frações hemicelulósicas mostram cinco sinais fortes proximais a 101,4; 75,2; 73,7; 72,3 e 63,1 ppm, os quais são atribuídos às unidades de carbonos C-1, C-4, C-3, C-2 e C-5, respectivamente, com ligação β -(1,4)-D-xilopiranosil (BIELY et al., 2015).

O HSQC 2D foi utilizado para identificar os vários elementos estruturais semelhantes da xilana (Figura 3.6), e as atribuições dos sinais estão listadas na Tabela 1 do anexo. É possível observar que todas as três xilanas apresentaram os mesmos cinco picos cruzados com em relação a X_1 , X_2 , X_3 e X_4 . A presença do grupo metil de 4-O-metil-D-GlcA foi confirmada em todas as amostras por um pequeno sinal correspondente a 58,3-58,6 / 3,40 ppm. De acordo com Teleman et al. (2000), a origem do pico transversal observado nas Euc-xilanas a 174/1,64 ppm é incerta, provavelmente devido à liberação de grupos O-acetil ou da etapa de precipitação (sais formados durante a neutralização). Estes resultados mostram claramente que, em termos de estrutura química, a xilana de eucalipto tem o mesmo esqueleto linear (1,4)-D-xilana que está presente em xilana de bétula, bem como as unidades ramificadas de ácido metilglucurônico.

Figura 3.6. Espectros de RMN-HSQC de (A) xilana de bétula, Euc-xilanas (B) SUZ e (C) IPAPER em DMSO-d₆ a 80 °C.



Dada a similaridade estrutural dos dois polissacarídeos, a interação enzima-substrato observada na hidrólise da xilana de bétula deve ser mantida quando a xilana de eucalipto é utilizada. Conseqüentemente, as atividades enzimáticas medidas pela mesma enzima devem essencialmente ter os mesmos valores que foram observados nos resultados apresentados anteriormente (ver Figura 3.5).

Portanto, o protocolo de escala laboratorial apresentado aqui permitiu a avaliação das atividades de xilanases utilizando a xilana obtida a partir de polpa de eucalipto, um material amplamente disponível. Esta xilana purificada pode ser usada como substituto eficiente do substrato para a xilana de bétula comercialmente descontinuado, possibilitando a comparação direta das atividades de xilanases, tanto em estudos passados como futuros.

3.4 Conclusão

A fração de xilana foi extraída com sucesso da polpa branqueada de eucalipto. As condições otimizadas foram: extração com NaOH 4% m.v⁻¹ a 25 °C por 20 h; precipitação com HOAc até pH final de 6,0; lavagem com etanol:H₂O 1:1 (v:v), seguido de lavagem com etanol absoluto e, finalmente, liofilizado. O pH final da precipitação teve um impacto significativo na formação de sal, com pHs mais baixos levando a maiores teores de sal. A solubilidade da xilana em tampão foi significativamente aumentada após o tratamento térmico (121 °C, 1 atm, 15 min). Esse protocolo foi validado utilizando polpa de diferentes fornecedores e a análise enzimática utilizando o substrato obtido mostrou que as atividades enzimáticas de três preparações comerciais de xilanase foram equivalentes às medidas com a xilana de bétula comercial como substrato. A análise RMN provou que as xilanas de bétula e eucalipto compartilham uma estrutura química semelhante. O protocolo aqui desenvolvido permitiu, assim, obtenção no laboratório de um substrato com idênticas características da xilana comercial de bétula e que pode ser reproduzido em qualquer país que produza ou possa obter polpa branqueada de eucalipto.

3.5 Referências

ALVES, E. F. et al. Carbohydrate composition of eucalyptus, bagasse and bamboo by a combination of methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 4, p. 1097–1101, 2010.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.

BIAN, J. et al. Isolation and fractionation of hemicelluloses by graded ethanol precipitation from *Caragana korshinskii*. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 6, p. 802–809, 2010a.

BIAN, J. et al. Fractional isolation and structural characterization of hemicelluloses from *Caragana korshinskii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 753–760, 2010b.

BIAN, J. et al. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 638–645, 2012.

BIELY, P. Xylanolytic Enzymes. In: WHITAKER; VORAGEN; WONG (Eds.). **Handbook of food enzymology**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 879–916.

BIELY, P. et al. The role of the glucuronoxylan carboxyl groups in the action of endoxylanases of three glycoside hydrolase families: A study with two substrate mutants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1850, n. 11, p. 2246–2255, 2015.

- BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, 2016.
- 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.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4754–66, 2010.
- CHAIKUMPOLLERT, O.; METHACANON, P.; SUCHIVA, K. Structural elucidation of hemicelluloses from Vetiver grass. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 2, p. 191–196, 2004.
- COOK, P. F.; CLELAND, W. W. **Enzyme kinetics and mechanism**. London; New York: Garland Science, 2007.
- DODD, D.; CANN, I. C. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 2–17, 2009.
- EBRINGEROVÁ, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n. 9, p. 542–556, 2000.
- EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z.; HEINZE, T. Hemicellulose. In: HEINZE, T. (Ed.). **Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 1–67.
- FENGEL, D.; WEGNER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin; New York: Walter de Gruyter, 1983.
- GABRIELI, I. et al. Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose from aspen wood. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, n. 4, p. 367–374, 2000.
- GHOSE, T. K.; BISARIA, V. S. Measurement of hemicellulase activities: Part I Xylanases. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 12, 1987.
- GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.
- GOKSU, E. I. et al. Production and Characterization of Films from Cotton Stalk Xylan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10685–10691, 2007.
- GOMES, K. R.; CHIMPHANGO, A. F. A.; GÖRGENS, J. F. Modifying solubility of polymeric xylan extracted from Eucalyptus grandis and sugarcane bagasse by suitable side chain removing enzymes. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 177–185, 2015.
- HÄGGLUND, E.; LINDBERG, B.; MCPHERSON, J. Dimethylsulphoxide, a Solvent for Hemicelluloses. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 10, p. 1160–1164, 1956.
- HUISMAN, M. M.; SCHOLS, H.; VORAGEN, A. G. Glucuronoarabinoxylans from maize kernel cell walls are more complex than those from sorghum kernel cell walls. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, n. 3, p. 269–279, 2000.
- KABEL, M. A. et al. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, n. 1, p. 47–56, 2002.

KAČURÁKOVÁ, M. et al. Characterisation of xylan-type polysaccharides and associated cell wall components by FT-IR and FT-Raman spectroscopies. **Food Hydrocolloids**, v. 13, n. 1, p. 35–41, 1999.

LI, K. et al. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1–2, p. 89–94, 2000.

MCCLEARY, B. V.; MCGEOUGH, P. A Comparison of Polysaccharide Substrates and Reducing Sugar Methods for the Measurement of endo-1,4- β -Xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 177, n. 5, p. 1152–1163, 2015.

MILESSI, T. S. S. et al. Immobilization and stabilization of an endoxylanase from *Bacillus subtilis* (XynA) for xylooligosaccharides (XOs) production. **Catalysis Today**, v. 259, p. 130–139, 2016.

MIRANDA, I.; PEREIRA, H. Kinetics of ASAM and Kraft Pulping of Eucalypt Wood (*Eucalyptus globulus*). **Holzforschung**, v. 56, n. 1, p. 85–90, 2002.

OLIVEIRA, E. E. et al. Xylan from corn cobs, a promising polymer for drug delivery: Production and characterization. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5402–5406, 2010.

PENG, F. et al. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6305–6317, 2009.

PICOUT, D. R. et al. Pressure Cell Assisted Solubilization of Xyloglucans: Tamarind Seed Polysaccharide and Detarium Gum. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 3, p. 799–807, 2003.

PINTO, P.; EVTUGUIN, D.; NETO, C. Structure of hardwood glucuronoxylans: modifications and impact on pulp retention during wood kraft pulping. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 4, p. 489–497, 2005.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

PUCHART, V. et al. Action of different types of endoxylanases on eucalyptus xylan in situ. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 4, p. 1725–1736, 2018.

ROWLEY, J. et al. Efficient extraction of xylan from delignified corn stover using dimethyl sulfoxide. **3 Biotech**, v. 3, n. 5, p. 433–438, 2013.

SAARNIO, J.; WATHEN, K.; GUSTAFSSON, C. Structure of an Acidic Xylan Isolated from Birch Wood Hemicellulose. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 8, p. 825–828, 1954.

SARASWAT, V.; BISARIA, V. S. Purification, Characterization and Substrate Specificities of Xylanase Isoenzymes from *Melanocarpus albomyces* IIS 68. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n. 6, p. 1173–1180, 2000.

SILVA, F. F. et al. Isolation and purification of concentrated and non-concentrated hemicellulose alkaline extracts. **Separation and Purification Technology**, v. 173, p. 233–239, 2017.

SLUITER, A. et al. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure**. NREL - National Renewable Energy Laboratory, 2012.

SUN, J. et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 195–204, 2004.

TELEMAN, A. et al. Characterization of acetylated 4-O-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 329, n. 4, p. 807–815, 2000.

YU, J. et al. Cellulose, xylan and lignin interactions during pyrolysis of lignocellulosic biomass. **Fuel**, v. 191, p. 140–149, 2017.

ZHANG, J. et al. Thermostable recombinant xylanases from *Nonomuraea flexuosa* and *Thermoascus aurantiacus* show distinct properties in the hydrolysis of xylans and pretreated wheat straw. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, p. 12, 2011.

CAPÍTULO 4: IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE β -XILOSIDASE MULTIMÉRICA DE BACILLUS SUBTILLIS PARA PRODUÇÃO DE XILOSE

4.1 Introdução

Xilana é o principal componente encontrado na fração hemicelulósica de tecidos vegetais. Esse complexo heteropolímero é composto por um esqueleto de unidades de D-xilopirranose (xilose) unidos por ligações glicosídicas β -(1,4) (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; SAHA, 2003), podendo apresentar diferentes ramificações, compostas por pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-manose, D-glicose, D-galactose) e/ou ácidos urônicos (ácidos D-glucurônico, D-4-O-metilglucurônico e D-galacturônico) (EBRINGEROVÁ; HRMÁDKOVÁ; HEINZE, 2005). Outros carboidratos como L-ramnose e L-fucose podem também estar presentes em pequenas quantidades, além das hidroxilas dos açúcares poderem estar parcialmente acetiladas (GÍRIO et al., 2010).

Dada a diversidade de estruturas de xilana existentes, a completa e eficiente hidrólise desse heteropolímero requer a ação combinada das principais enzimas de degradação da cadeia principal, incluindo endo-1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) e β -d-xilosidases (EC 3.2.1.37) e enzimas que atuam nas cadeias laterais, incluindo as α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -glucuronidasas (EC 3.2.1.139), acetil-xilan esterase (EC 3.1.1.72), e feruloil esterases (EC 3.1.1.73) (BIELY, 2003; BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; TERRASAN et al., 2016a). Endo-1,4-xilanases são as principais enzimas responsáveis pela degradação da cadeia principal do polímero em xilooligossacarídeos (XOS) de diferentes comprimentos de cadeia. Por sua vez, β -xilosidases hidrolisam em monossacarídeos os xilooligossacarídeos (X_{2-4}) a partir das extremidades não redutoras, permitindo então a aplicação da xilose liberada em processos industriais subsequentes como a fermentação para a produção de biocombustíveis e outros bioprodutos (JORDAN; WAGSCHAL, 2010).

Embora atualmente boa parte dos trabalhos foquem sua aplicação na produção de biocombustíveis, β -xilosidases são utilizadas em uma grande variedade de processos em escala industrial, como processamento de polpa de madeira para produção de papel e celulose (DHIMAN; SHARMA; BINDU, 2008), melhoramento da qualidade nutricional de massas de panificação (DORNEZ et al., 2007), produção de xilose para posterior redução a xilitol (POLIZELI et al., 2005), extração e liberação de aroma e sabor na produção de vinhos (MANZANARES; RAMÓN; QUEROL, 1999) etc.

Complexos xilanolíticos são produzidos principalmente por microrganismos que atuam na decomposição das paredes celulares das plantas, como fungos filamentosos, bactérias aeróbias e anaeróbias, insetos e protozoários (POLIZELI et al., 2005; WILSON, 2011). Contudo, os elevados custos envolvidos nas etapas de produção, purificação e difícil recuperação da enzima ativa ao término da reação constituem um obstáculo para aplicação mais ampla em processos biotecnológicos (BRENA; GONZALEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). Em muitos casos, as formas nativas das enzimas são instáveis nas condições onde irão operar, estando mais suscetíveis a sofrer distorções estruturais devido a elevadas temperaturas, pHs extremos ou presença de solventes (MATEO et al., 2007; TROBO-MASEDA et al., 2018). A existência de múltiplas subunidades na estrutura enzimática constitui um fator adicional a ser considerado, haja visto que a primeira etapa do processo de inativação de enzimas multiméricas é a perda do correto enovelamento da estrutura ou a dissociação das subunidades que a compõem (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009).

Uma maneira de superar essas limitações seria imobilizar a enzima em um suporte sólido/insolúvel. A formação de ligações covalentes entre enzima e suporte em condições controladas aprimora a estabilidade operacional térmica devido à preservação estrutural, além de permitir a reutilização do biocatalisador em muitos ciclos operacionais (ADRIANO et al., 2008; MATEO et al., 2005; SHELDON; VAN PELT, 2013). No caso de enzimas multiméricas, a formação de múltiplas ligações covalentes entre as subunidades da enzima e o suporte ativado tem se mostrado uma ferramenta poderosa para a estabilização de proteínas, uma vez que todos os grupos envolvidos na imobilização mantêm suas posições relativas inalteradas, mesmo na presença de agentes capazes de provocar a distorção da estrutura tridimensional (BOLIVAR et al., 2010). Uma outra estratégia faria uso da existência de dois ou mais grupos amino-terminais (pKa 7,0-8,0), o que permite a imobilização a pH neutro ou levemente alcalino (TROBO-MASEDA et al., 2018). No evento dos resíduos terminais estarem localizados no mesmo plano, a ligação simultânea ao suporte resulta em uma imobilização semelhante à multipontual (BOLIVAR et al., 2009).

A β -xilosidase de *Bacillus subtilis* consiste em uma enzima multimérica, sendo a estrutura tridimensional composta por 4 subunidades contendo 533 aminoácidos cada. Cada subunidade apresenta seu próprio sítio ativo, sendo o acesso do substrato realizado através de uma pequena cavidade presente na superfície (DIOGO et al., 2015). A natureza multimérica desta enzima consiste em uma informação de extrema relevância, especialmente quando o objetivo é a sua estabilização através de técnicas de imobilização. Conforme explicado por Fernandez-Lafuente (2009), a estabilização de enzimas multiméricas não é algo trivial, haja visto que a primeira etapa do processo de inativação de tais enzimas é a perda do enovelamento correto ou dissociação das subunidades que constituem a estrutura quaternária

da enzima. Portanto, é fundamental evitar a dissociação das subunidades enzimáticas, preservando sua estrutura e atividade catalítica (TROBO-MASEDA et al., 2018).

Existem relativamente poucos trabalhos sobre a imobilização de β -xilosidase em diferentes suportes (BENASSI et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2018; GUERFALI et al., 2009; SMAALI et al., 2009). Benassi et al. (2013) imobilizaram a β -xilosidase de *Aspergillus niger* em gel de agarose ativadas com grupos amino (MANAE-Agarose). De Oliveira et al. (2018) aplicaram os derivados preparados com a enzima de *Trichoderma reesei* imobilizada em gel de agarose ativadas com grupos glioxil e recoberta com polietilenoamina (PEI) na hidrólise de xilana de bétula. Guerfali et al. (2009) avaliaram a imobilização da β -xilosidase de *Talaromyces thermophilus* empregando diferentes metodologias (ligação iônica, covalente e encapsulamento) em diferentes suportes, podendo o derivado ser reutilizado em 25 bateladas sem perda significativa de atividade.

Nesse contexto, o presente capítulo teve como objetivo avaliar as imobilizações covalentes da β -xilosidase recombinante purificada de *Bacillus subtilis* em pHs neutro e alcalino. Foram empregados dois suportes diferentes: géis de agarose e quitosana com ativações distintas (grupos glioxil e glutaraldeído), visando o aumento da estabilidade térmica da enzima bem como sua reutilização. Foram avaliados os perfis de pH e temperatura, bem como a estabilidade térmica dos derivados obtidos. Finalmente, os melhores derivados foram utilizados para a hidrólise da xilana de milho, um substrato natural rico em xilooligossacarídeos, em bateladas sucessivas.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Materiais

A β -xilosidase recombinante purificada e concentrada de *Bacillus subtilis* expressa em *Escherichia coli* foi fornecida pelo Laboratório de Fábricas Celulares (LAFAC) do DEQ-UFSCar. O 4-Nitrofenil-p-D-xilopiranídeo (p-NPX) foi adquirido da Goldbio (St. Louis, EUA). Glicidol e etilenodiamina (EDA) eram da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Quitosana (85% desacetilação) da Polymar (Fortaleza, Brasil). Agarose 6% (6 BCL Sepharose™) da GE Healthcare Life Science (Buckinghamshire, Inglaterra) Borohidreto de sódio da Vetec (São Paulo, Brasil) e (meta) periodato de sódio da Synth (Diadema, Brasil). A xilana de milho foi adquirida da Carl Roth (Karlsruhe, Alemanha). Todos os demais reagentes químicos possuíam grau analítico.

4.2.2 Métodos

Expressão e purificação da β -xilosidase GH43 recombinante

A cepa recombinante que expressa β -xilosidase GH43 de *Bacillus subtilis* foi desenvolvida por Diogo et al. (2015). O fragmento de β -xilosidase GH43 (NCBI-GI: 255767415) foi inserido no vetor de expressão pET28a(+) com calda de hexa-histidina N-terminal. O plasmídeo recombinante foi inserido em células *Escherichia coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pRARE2.

A expressão da β -xilosidase recombinante foi realizada em um biorreator de tanque agitado de escala de bancada de 5,0 L com um volume de trabalho de 4,0 L. A batelada foi realizada em meio HDF (HORTA et al., 2012) usando 40 g.L⁻¹ de glicerol como fonte de carbono e suplementada com 30 mg.L⁻¹ de canamicina e 45 mg.L⁻¹ de cloranfenicol. O pH foi controlado a 6,7 por adição automática de NH₄OH (5%, v.v⁻¹) e H₂PO₄ (21%, v.v⁻¹). A concentração de oxigênio dissolvido (OD) foi monitorada e mantida a 30% por um controlador que ajustou automaticamente a velocidade de agitação (entre 200 e 800 rpm) e a taxa de fluxo de ar (entre 0,3 e 0,6 SLPM). O *software* SuperSys_HCDC foi utilizado para aquisição de dados on-line e controles automáticos de pH e OD. (HORTA et al, 2011; HORTA et al, 2012).

Durante a fase de crescimento a temperatura foi mantida a 37 °C. Quando a DO₆₀₀ do meio de cultura atingiu o valor de 4,0, a temperatura foi decrescida para 25 °C e 1 mmol.L⁻¹ de isopropil-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) foi adicionado. O estágio de indução foi realizado por quase 12 h.

As células foram separadas por centrifugação e 100 g (base úmida) de células sedimentadas (*pellet*) foram ressuspendidas em 1 L de tampão de lise (fosfato de sódio 10 mmol.L⁻¹, PMSF 1 mmol.L⁻¹ e Triton X-100 a 0,1%, pH 7,4). A suspensão de células foi homogeneizada utilizando um misturador (CAT Ingenieurbüro, Alemanha), seguido do rompimento celular realizado em um sistema homogeneizador contínuo de alta pressão (APV Gaulin, MA, EUA) operado por 6 min a 500 bar e 1 L.min⁻¹ (FIGUEIREDO et al., 2017).

Após centrifugação (90 min, 17.000 × g, 4 °C), o sobrenadante foi aplicado em coluna de cromatografia de afinidade com ácido nítrico nitrilotriacético (Ni-NTA) previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (CV) de tampão fosfato 40 mM (pH 7,4), imidazol 5 mmol.L⁻¹ e NaCl 50 mmol.L⁻¹. A β -xilosidase recombinante ligada foi eluída com imidazol 300 mmol.L⁻¹ no mesmo tampão.

Uma etapa de diafiltração com membrana de 20 kDa (Pellicon 1, Millipore, EUA) foi realizada a fim de remover o excesso de imidazol e trocar o tampão da solução enzimática (fosfato de sódio 50 mM pH 6,0). Após 6 ciclos (seis vezes o volume total), o sistema passou

a ser operado no modo de ultrafiltração, estando a solução enzimática final concentrada 20 vezes.

Medida da atividade enzimática e proteínas totais

A atividade da β -xilosidase foi determinada em uma cubeta de quartzo, medindo-se o aumento de absorbância a 405 nm causado pela liberação de 4-nitrofenol ($\epsilon = 1950 \text{ M} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) durante a hidrólise da solução de 4-nitrofenil β - xilopiranosídeo (p-NPX) 5 mmol.L⁻¹ pH 6,0 a 35 °C (DIOGO et al., 2015). Uma unidade de hidrólise da atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de 4-nitrofenol por minuto sob as condições da experiência. A quantificação das proteínas totais foi realizada pelo método proposto por Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Ativação de suportes baseados em agarose

Agarose ativada com grupos glioxil

O suporte de glioxil-agarose foi preparado pela eterificação de agarose com glicidol seguida de oxidação com metaperiodato de sódio, de acordo com a metodologia descrita por Guisán (1988). Agarose a 6% foi suspensa em água destilada ($286 \mu\text{L} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$) em banho de gelo. A solução de NaOH 1,7 N gelada (contendo 28,5 mg de NaBH₄ por mililitro de solução) foi adicionada à suspensão de agarose ($476 \mu\text{L} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$). O glicidol foi então adicionado lentamente à solução ($343 \mu\text{L} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$). A suspensão foi mantida sob agitação mecânica suave a 25 °C durante 16 horas. O suporte eterificado (gliceril-agarose) foi então lavado excessivamente com água destilada sob filtração a vácuo. Posteriormente, o gel de gliceril-agarose foi suspenso em água ($14,3 \text{ mL} \cdot \text{g}_{\text{ge}}^{-1}$). Para oxidação em gel, 214 μg de NaIO₄ por microequivalente dos grupos aldeídos desejados foi adicionado a cada mL de gel. Depois 2 horas de agitação suave, o gel de agarose-glioxil foi lavado com água destilada sob vácuo e utilizado nos ensaios de imobilização. Os grupos glioxil formados foram quantificados por iodometria, de acordo com a metodologia adaptada de Pereira (1996).

Agarose ativada com glutaraldeído

A primeira etapa do preparo dos suportes agarose-glutaraldeído constituiu na aminação do gel agarose-glioxil conforme a metodologia descrita por Fernandez-Lafuente et al. (1993), seguida pela ativação com glutaraldeído de acordo com o procedimento descrito por Fernández-Lafuente, Rodriguez e Guisán (1998). Um grama de gel agarose-glioxil (previamente ativada com meta-periodato de sódio) foi suspensa em 5,72 mL de etilenodiamina 2 mol.L⁻¹ pH 10,0 (preparado previamente a frio), sendo mantido sob agitação mecânica suave por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 57,14 mg de NaBH₄, permanecendo a suspensão sob agitação por mais 2 horas. O suporte agarose-amino (MANAE) foi lavado com tampão acetato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 4,0 (30 mL.g_{gel}⁻¹), seguido por lavagem com tampão borax 100 mmol.L⁻¹ pH 9,0 (30 mL.g_{gel}⁻¹) e água destilada em abundância. Para a ativação com glutaraldeído, foram oferecidos 0,8% (v.v⁻¹) de reagente por mL de solução tampão fosfato de sódio 200 mmol.L⁻¹ pH 7,0, mantendo-se a proporção 1:10 (m.v⁻¹). A suspensão foi mantida sob agitação orbital constante por 14 horas a 25 °C. Após o término da ativação, o gel agarose-glutaraldeído foi lavado excessivamente com água destilada e usado imediatamente nos ensaios de imobilização.

Preparo e ativação de suportes baseados em quitosana

Quitosana ativada com grupos glioxil

O gel de quitosana foi preparado de acordo com a metodologia de Silva et al. (2012). O pó de quitosana (2,0% m.v⁻¹) foi solubilizado em ácido acético a 2% (v.v⁻¹) e homogeneizado durante 30 minutos à temperatura ambiente, e depois aquecido a 50 °C. Para cada mL de solução de quitosana foram adicionados 1,5 mL de KOH 0,5 mol.L⁻¹, mantendo a agitação por 1 hora para coagular a quitosana. A ativação foi realizada seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente.

Quitosana ativada com glutaraldeído

O gel de quitosana foi ativado com glutaraldeído seguindo a metodologia descrita por Budriene et al. (2005). A solução de glutaraldeído a 0,8% (v.v⁻¹) foi preparada em tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0, ao qual foram adicionados 10 g de gel de quitosana (10% m.v⁻¹) e mantidos em agitação mecânica por 30 minutos a 50 °C. Imediatamente após

a ativação, o suporte foi lavado minuciosamente com água destilada até pH 7,0, seguido da imobilização da enzima para o suporte.

Imobilização da β -xilosidase

As imobilizações da β -xilosidase ($1 \text{ mg}_{\text{prot}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$) em suportes ativado com glutaraldeído e glioxil foram realizadas em pH 7,0 (tampão fosfato de sódio $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) e pH 10,05 (tampão $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ carbonato-bicarbonato de sódio), respectivamente. Para cada ensaio de imobilização, o suporte foi suspenso em solução enzimática ($1:10 \text{ m}_{\text{gel}} \cdot \text{V}_{\text{solução}}^{-1}$) e a suspensão foi mantida sob agitação orbital suave (60 rpm) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Amostras do sobrenadante foram coletadas em intervalos periódicos para medir a atividade enzimática remanescente e proteína total. Ao final da imobilização, as bases de *Schiff* foram convertidas em amins secundárias e os grupos aldeídos remanescentes em grupos álcool pela redução com NaBH_4 ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}_{\text{suspensão}}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 min). Ensaios controle foram realizados com a enzima solúvel nas mesmas condições utilizadas nos ensaios de imobilização.

A atividade enzimática aparente dos derivados (Atv_{App} , $\text{U} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$) foi medida e comparada com a atividade teoricamente imobilizada (Atv_{Teo} , $\text{U} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$). Os parâmetros de imobilização foram calculados de acordo com Adriano et al. (2008), definidos como rendimento de imobilização em termos de atividade enzimática (RI_{Atv}), rendimento de imobilização em termos de proteínas (RI_{Prot}) e atividade recuperada (A_{Rec}), conforme expresso nas Equações 4.1-4.3, respectivamente.

$$\text{RI}_{\text{Atv}} = \left(1 - \frac{\text{Atividade}_{\text{Sobrenadante}}^{\text{Final}} (\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})}{\text{Atividade}_{\text{Controle}}^{\text{Final}} (\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})} \right) \quad (4.1)$$

$$\text{RI}_{\text{Prot}} = \left(1 - \frac{\text{C}_{\text{Sobrenadante}}^{\text{Final}} (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})}{\text{C}_{\text{Controle}}^{\text{Final}} (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})} \right) \quad (4.2)$$

$$A_{\text{Rec}} = \left(\frac{\text{Atividade}_{\text{Gel}}^{\text{Aparente}} (\text{U} \cdot \text{g}_{\text{Gel}}^{-1})}{\text{Atividade teóricamente imobilizada} (\text{U} \cdot \text{g}_{\text{Gel}}^{-1})} \right) \quad (4.3)$$

Influência da carga de enzima no processo de imobilização

Efeito da quantidade de proteína imobilizada nos suportes foi avaliado usando diferentes concentrações de proteína por massa de suporte: 1, 5, 10, 25 e 50 mg de enzima por grama de suporte. As concentrações totais de proteína imobilizada e atividades remanescentes foram acompanhadas ao longo dos experimentos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Influência do pH e temperatura na atividade da enzima solúvel e imobilizada

As propriedades catalíticas da β -xilosidase solúvel e dos derivados (baixa carga, $1 \text{ mg}_{\text{prot.}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$) tais como temperatura e pH, foram determinados como a atividade relativa na faixa de pH entre 4,0 e 10,0 (tampões acetato de sódio pH 4,0 e 5,0, fosfato de sódio de 6,0 a 8,0 e bicarbonato-carbonato pH 9,0 e 10,0) e temperatura variando 10 a 70 °C no mesmo procedimento mencionado acima. As atividades máximas foram definidas como 100% de atividade relativa.

Ensaio de estabilidade térmica

A enzima solúvel e as suspensões dos derivados de baixa carga ($1 \text{ mg}_{\text{prot.}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$) foram incubados em tampão fosfato de sódio $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 6,0 a 35°C e 50 °C. Alíquotas foram retiradas em intervalos regulares para quantificação da atividade enzimática conforme descrito anteriormente. A atividade residual foi calculada como a razão entre a atividade em um dado tempo e atividade no início da incubação. De acordo com os dados experimentais de inativação térmica, foram ajustados os modelos uma única etapa proposto por Sadana e Henley (1987) e modelo de não-linear de inativação de segunda ordem. O fator de estabilização (F_S) foi definido como a razão entre a meia-vida do derivado imobilizado e a meia-vida da enzima solúvel nas mesmas condições.

Hidrólise da xilana de milho

Os ensaios de hidrólise total foram realizados com a β -xilosidase solúvel, os derivados agarose-glioxil e quitosana-glutaraldeído baixa carga ($1 \text{ mg}_{\text{prot.}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$), sendo oferecida a concentração de $1 \text{ U} \cdot \text{mL}_{\text{Reator}}^{-1}$. As hidrólises foram realizadas utilizando xilana solúvel de milho como substrato, preparada em tampão fosfato de sódio $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 6,0.

O substrato preparado continha 20,55 g.L⁻¹ de xilobiose (X₂), 14,58 g.L⁻¹ de xilotriose (X₃), 6,46 g.L⁻¹ de xilotetraose (X₄) e 3,81 g.L⁻¹ de xilopentaose (X₅). As reações foram realizadas a 35 °C sob agitação mecânica por 4 horas. Em intervalos regulares, amostras foram retiradas para a quantificação dos produtos formados via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Quantificação dos produtos de hidrólise

As concentrações de xilose, X₂, X₃, X₄ e X₅ foram determinadas por CLAE, utilizando a coluna Waters Sugar-Pak™ I (300 x 6,5 mm) conectada a um detector de índice de refração (45 °C), usando água ultrapura como fase móvel com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ a 80 °C. As amostras coletadas foram previamente diluídas e filtradas (filtro PVDF 0,22 µm). As concentrações dos compostos foram obtidas a partir de curvas de calibração obtidas pela injeção de padrões analíticos com concentrações conhecidas.

Ensaio de estabilidade operacional dos derivados (reciclo/reuso)

Os ensaios de reuso foram realizados utilizando 5 mL de xilana de milho solúvel (40 g.L⁻¹) em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ (6,0) a 35 °C, sob agitação constante. Os derivados agarose-glioxil e quitosana glutaraldeído baixa carga foram utilizados, oferecendo-se 1 U.mL_{Reator}⁻¹. Entre cada ciclo de reação, os derivados foram recuperados por filtração e lavados duas vezes com tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹ (pH 6,0) a 25 °C e, depois, adicionou-se nova solução de substrato para repetição de ciclo.

Análise e modelagem da estrutura tridimensional da β-xilosidase

As previsões da estrutura foram realizadas utilizando o portal de simulação de modelo de proteína Swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/>). A estrutura de β-xilosidase de *Bacillus subtilis* (variedade 168) (PDB 1YIF) foi utilizada como modelo (PATSKOVSKY; ALMO, 2005). As figuras foram preparadas usando o software de modelagem molecular PyMOL (versão 1.7.4.5, Schrodinger LLC, Nova Iorque, EUA).

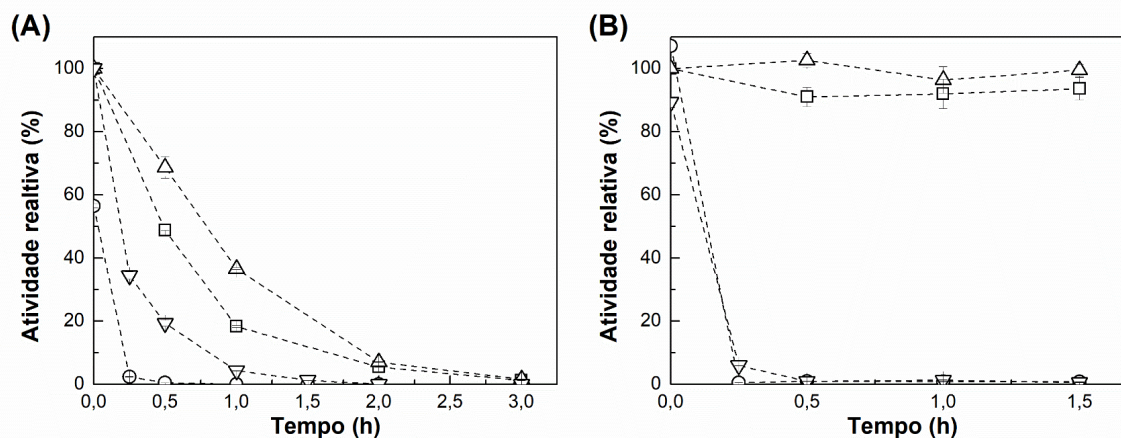
4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Influência da matriz do suporte e do método de ativação na imobilização da β -xilosidase

Dois estratégias foram utilizadas para a imobilização: a primeira utiliza suportes ativado com grupos glioxil, que permitem a imobilização multipontual em pH alcalino (pH 10,05) através de ligações covalentes entre os resíduos ϵ -lisina presentes na superfície da enzima e grupos aldeído do suporte (MATEO et al., 2006). A segunda estratégia focou na imobilização da enzima em suportes ativado com 0,8% (v.v⁻¹) de glutaraldeído, através da formação de ligação covalente entre o grupo amino-terminal da enzima com o grupo aldeído presente no suporte (BARBOSA et al., 2014). Os ensaios de imobilização foram realizados em suportes de agarose 6-BCL ativada com grupos glioxil (Aga-glio) e com glutaraldeído (Aga-glut), sendo os mesmos ativadores utilizados para os suportes de quitosana 2% m.v⁻¹ (Quit-glio e Quit-Glut), conforme descrito anteriormente na seção de métodos.

Inicialmente foi oferecido apenas 1 mg_{proteína}.g_{suporte úmido}⁻¹ (32 U.g_{suporte}⁻¹) para os quatro suportes estudados. A Figura 4.1 apresenta o perfil de imobilização para os suportes preparados em agarose e quitosana ativado com grupos glioxil e glutaraldeído. Observa-se que em curto período de incubação em pH 10,05 (Figura 4.1.A) houve uma rápida queda da atividade enzimática medida nos sobrenadantes devido à ligação da enzima ao suporte.

Figura 4.1. Cinética de imobilização de β -xilosidase. (A) Variação da atividade enzimática residual relativa (%) em função do tempo nos ensaios de imobilização da β -xilosidase em suportes ativado com grupos glioxil: (○) sobrenadante, Aga-glio, (▽) sobrenadante, Quit-glio, (□) solução controle Aga-glio e (△) solução controle Quit-glio. Condições de imobilização: tampão bicarbonato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 10,05 a 25 °C. (B) Atividade enzimática residual, suportes ativado com glutaraldeído: (○) sobrenadante, Aga-glut, (▽) sobrenadante, Quit-glio, (□) solução controle Aga-glio e (△) solução controle Quit-glio. Condições de imobilização: tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0 a 25 °C. Barra de erro: desvio padrão das triplicatas.



Todavia, observa-se também paralelamente uma queda da atividade devido à inativação da enzima nas condições de imobilização, estando a enzima solúvel completamente inativada após três horas de incubação. Comportamentos similares foram observados por Pedroche et al. (2007) durante a imobilização de tripsina e quimotripsina em suportes de agarose 4% e 10%, respectivamente; onde verificou-se a baixa estabilidade das enzimas em pHs alcalinos. Por outro lado, os ensaios de imobilização realizados em pH neutro não afetaram significativamente a atividade da enzima solúvel, sendo observado um rápido desaparecimento da atividade no sobrenadante em virtude da ligação da enzima ao suporte (Figura 4.1.B).

A Tabela 4.1 apresenta os resultados de rendimento de imobilização em termos de atividade (RI_{ATV}) e proteína (RI_{PROT}), atividade recuperada (A_{REC}) e atividade enzimática medida nos derivados (A_{DER}) para os diferentes métodos de imobilização e suportes utilizados neste trabalho. Com exceção do derivado β -quit-glio, os demais derivados alcançaram aproximadamente 100% de rendimento de imobilização, em termos de atividade e de proteínas.

Tabela 4.1. Efeito da matriz e dos grupos ativadores do suporte sobre o rendimento de imobilização e atividade recuperada dos derivados de β -xilosidase.

| Parâmetro de imobilização | Derivado de β -xilosidase | | | |
|---------------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Aga-glio | Aga-glut | Quit-glio | Quit-glut |
| $RI_{ATV}(\%)^a$ | 100,0 \pm 0,0 | 100,0 \pm 0,0 | 79,0 \pm 3,0 | 99,85 \pm 0,1 |
| $RI_{PROT}(\%)^b$ | 100,0 \pm 0,0 | 95,1 \pm 0,3 | 12,2 \pm 0,7 | 95,3 \pm 4,7 |
| $A_{REC}(\%)^c$ | 215,4 \pm 4,3 | 272,0 \pm 8,8 | 0,0 | 89,0 \pm 2,0 |
| $A_{DER}(\text{U/g})^d$ | 69,4 \pm 1,4 | 86,2 \pm 3,0 | ND ^e | 32,2 \pm 0,0 |

^a $RI_{ATV}(\%)$: rendimento de imobilização em termos de atividade enzimática;

^b $RI_{PROT}(\%)$: rendimento de imobilização em termos de proteína imobilizada;

^c $A_{REC}(\%)$: atividade recuperada;

^d $A_{DER}(\%)$: atividade medida no derivado após a imobilização enzimática;

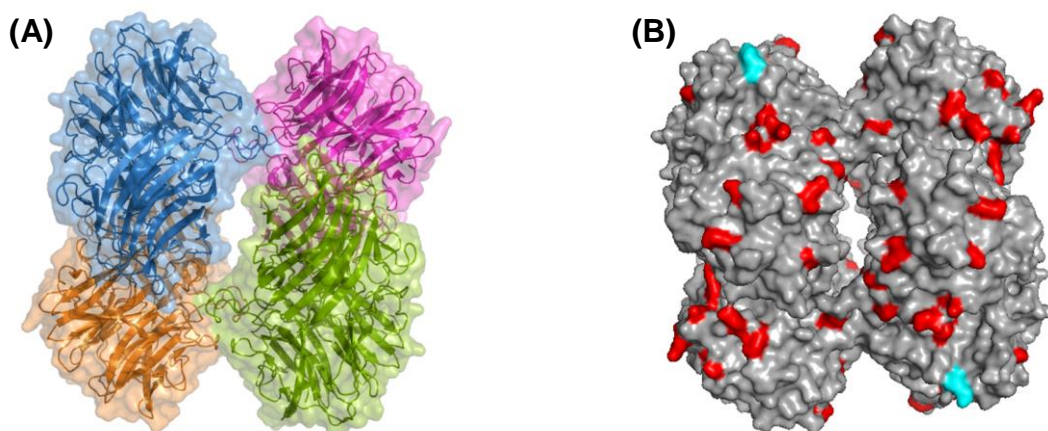
^e ND: Atividade enzimática não detectada.

Embora existam trabalhos na literatura descrevendo imobilizações de β -xilosidases e enzimas multiméricas bem-sucedidas (BOLIVAR et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2018; ROCHA-MARTIN et al., 2014), as atividades recuperadas foram inesperadas. Ambas as ativações da agarose estudadas resultaram na superativação da enzima, sendo observadas atividades recuperadas acima de 100%. Esses resultados apontam para uma elevada estabilização das subunidades que compõem a β -xilosidase, refletindo inclusive em seu desempenho catalítico. O elemento chave para a explicação desses resultados reside na técnica de imobilização empregada. A imobilização multipontual sob condições alcalinas em suporte agarose altamente ativado com grupos glicil provavelmente formou múltiplas

ligações covalentes entre o grupo ϵ -NH₂ dos resíduos de lisina localizados na superfície da enzima e os grupos glioxil (aldeídos lineares capazes de formar bases de *Schiff* com grupos amino) muito estáveis no suporte.

A estrutura da β -xilosidase de *Bacillus subtilis* apresenta 4 subunidades idênticas em sua estrutura, cada uma com um sítio ativo independente (Figura 4.2.A). A análise da estrutura tridimensional baseada na modelagem computacional (código de acesso ao PDB 1YIF) mostrou que a enzima possui 116 resíduos de lisinas distribuídos ao longo das quatro subunidades da enzima, conforme mostrado na Figura 4.2.B (destaque em vermelho). Alguns desses resíduos encontram-se próximos entre si no mesmo plano e distantes da cavidade de acesso ao sítio ativo. A elevada densidade de lisinas favorece a formação de ligações multipontuais entre a enzima e o suporte em condições alcalinas (pH \geq 10.05), onde esses resíduos encontram-se parcialmente desprotonados e, conseqüentemente, suscetíveis a formar ligações com os grupos glioxil presentes na superfície do suporte (GUISÁN, 1988).

Figura 4.2. (A) Representação em fitas da estrutura tridimensional da β -xilosidase de *Bacillus subtilis* (1YIF no PDB), contendo as 4 subunidades apresentadas em cores distintas. (B) Representação da superfície das 4 subunidades da β -xilosidase. Em vermelho são os resíduos de lisina e em azul amino terminais de cada subunidade (os demais encontram-se na face oposta da enzima).



Os resultados dos ensaios de imobilização mostraram que tanto a ativação do gel de agarose com grupos glioxil como glutaraldeído resultaram em derivados com considerável melhora na atividade catalítica, com atividades recuperadas superiores a 200%. Foram usados também suportes ativados com glutaraldeído, um reagente bifuncional capaz de realizar fixação da enzima ao suporte através do seu grupo amino mais reativo (geralmente o amino terminal) sob condições de imobilização moderadas, isso é, pH neutro (BARBOSA et al., 2014; MATEO et al., 2005). Proteínas compostas por várias cadeias enzimáticas possuem vários grupos amino terminais que, estando localizados no mesmo plano, possibilitam uma interação simultânea com uma superfície plana (i.e. suporte), permitindo a imobilização em

pH neutro semelhante à multipontual (BOLIVAR et al., 2009). Adicionalmente, a morfologia interna do suporte é um dos fatores que certamente contribuem para esses resultados, uma vez que o gel de agarose possui elevada área superficial, diâmetro de poro adequado para a imobilização de proteínas, boas propriedades mecânicas e facilidade de ativação química (GUISÁN, 1988). Os resultados obtidos estão em conformidade com outros trabalhos de imobilização de enzimas multiméricas em gel de agarose encontrados na literatura, que reportam consideráveis melhoras em termos de estabilidade frente a pH e temperatura (BNCOR et al., 2003; BOLIVAR et al., 2009, 2010; ROCHA-MARTIN et al., 2014; TROBOMASEDA et al., 2018).

Quando o suporte quitosana-glioxil foi utilizado não houve atividade enzimática nos derivados. Embora um rendimento de imobilização relativamente alto tenha sido alcançado (79%), apenas 12% das proteínas oferecidas foram efetivamente ligadas ao suporte. Esses resultados podem ser atribuídos à modificação causada pelo processo de oxidação dos grupos gliceril a glioxil realizados imediatamente antes da imobilização, ocorrendo uma diminuição significativa do diâmetro dos poros do suporte. Neste caso, as enzimas não seriam capazes de acessar as partes mais internas do gel e se ligarem aos grupos reativos ali presentes. Um comportamento e resultados semelhantes foram descritos por Rodrigues et al. (2008) para a imobilização de lipase B de *Candida antarctica* (CALB), onde foram obtidos apenas 5% de rendimento de imobilização e 5% de atividade recuperada após 5 horas de incubação.

Nas imobilizações empregando suporte de quitosana-glutaraldeído, um rendimento de imobilização de ~100% foi obtido em termos de atividade e de proteína, sendo a 89% da atividade da enzima recuperada. Embora a disponibilidade de grupos reativos na superfície da quitosana seja inferior quando comparada à agarose, os dados experimentais indicam que todas as proteínas oferecidas foram imobilizadas ao suporte. Esses resultados estão de acordo com os reportados por Silva et al. (2012), que também atingiram a completa imobilização de glicose isomerase, uma enzima composta de quatro subunidades, em gel de quitosana ativado com glutaraldeído. A não totalidade da recuperação da atividade oferecida nos derivados pode ser atribuída à provável imobilização da enzima ao suporte via ligação covalentes pelo resíduo amino terminal das várias subunidades que compõem a estrutura quaternária da enzima, conforme discutido anteriormente. Embora a utilização do reagente glutaraldeído seja recorrente em trabalhos de imobilização, os mecanismos de reações com as cadeias laterais dos aminoácidos não é completamente compreendido (MIGNEAULT et al., 2004). A elevada reatividade dos grupos aldeídos presentes nas superfícies dos suportes ativados com glutaraldeído pode eventualmente levar sua interação com os demais resíduos de aminoácidos presentes na superfície da enzima, provocando a formação de múltiplas

ligações entre a enzima e o suporte e, resultando em rigidificação e estabilização da enzima e aumentando sua estabilidade operacional (BOLIVAR et al., 2009).

Os ensaios realizados com baixa carga enzimática ($1 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$) apresentam bons resultados do ponto de vista de imobilização para enzimas multiméricas. Contudo, os valores de atividade recuperada foram inferiores aos obtidos para os derivados β -aga-glu nas mesmas condições, conforme discutido anteriormente. Dois efeitos podem estar contribuindo para a redução da eficiência do catalisador: atrasos devido a transferência de massa (difusão) através dos poros e/ou distorção da estrutura da enzima imobilizada devido à formação de várias ligações com o glutaraldeído, um reagente altamente reativo (BARBOSA et al., 2014).

A fim de verificar essas hipóteses, foram realizados ensaios com maiores cargas proteicas oferecidas, variando-se de 1 a 50 mg de proteína e mantendo-se fixas as quantidades de suporte (1 g). Para esses ensaios foram utilizados os suportes de agarose ativados por grupos glioxil e glutaraldeído; assim como a quitosana ativada com glutaraldeído. Baseados nos resultados negativos obtidos anteriormente, o suporte quitosana-glioxil não foi mais utilizado nas etapas subsequentes deste trabalho. A Tabela 4.2 apresenta os resultados das imobilizações em termos de rendimentos de imobilização (em termos de atividade e proteína), atividades recuperadas e atividades dos derivados. Os resultados obtidos mostraram que, embora a concentração de proteína oferecida tenha aumentado gradualmente, os três suportes estudados foram capazes de acomodar a totalidade de enzimas oferecidas, conforme indicado pelos valores de RI_{ATV} e RI_{PROT} elevados ($\geq 95\%$).

As atividades recuperadas medidas nos derivados reduziram gradativamente conforme o aumento da carga enzimática oferecida nos ensaios. Esse comportamento foi observado não apenas no derivado β -quit-glu, mas também nos demais suportes de agarose. Esses resultados demonstram que as menores atividades recuperadas são de fato devido a efeitos de transporte de massa, capazes de mascarar as atividades medidas nos derivados (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017). Observa-se que os efeitos foram mais significativos nos derivados preparados em quitosana-glutaraldeído, algo esperado devido ao menor diâmetro de poro comparado ao dos suportes de agarose (VIEIRA; BEPPU, 2006).

Limitações difusionais são fenômenos recorrentes em ensaios de imobilização de enzimas, uma vez que a relação entre o diâmetro de poro do suporte, tamanho da enzima e sua carga estão diretamente relacionados aos efeitos de transferência de massa (ILLANES et al., 2010). Milessi et al. (2016) descrevem uma redução significativa das atividades recuperadas dos derivados de endoxilase de *Bacillus subtilis* imobilizada em suporte agarose-glioxil. Gómez et al. (2016) também observaram uma redução da atividade medida nos derivados de β -gal-3 preparados em agarose-glioxil contendo maior carga enzimática. Efeitos semelhantes também foram verificados por Adriano et al. (2005) no aumento da carga

enzimática oferecida na imobilização de penicilina G acilase em gel de agarose ativado com glutaraldeído.

Tabela 4.2. Influência da carga enzimática sobre os parâmetros de imobilização da β -xilosidase imobilizada em agarose-glioxil, agarose-glutaraldeído e quitosana-glutaraldeído.

| Carga enzimática oferecida (mg _{proteína} -g _{suporte} ⁻¹) | Parâmetro | Derivado de β xilosidase | | |
|--|-------------------------------------|--------------------------------|--------------|-------------|
| | | Aga-Glio | Aga-Glut | Quit-Glut |
| 1,0 | RI _{Atv} (%) ^a | 100,0 ± 0,0 | 100,0 ± 0,0 | 99,85 ± 0,1 |
| | RI _{Prot} (%) ^b | 100,0 ± 0,0 | 95,1 ± 0,3 | 95,3 ± 4,7 |
| | A _{REC} (%) ^c | 215,4 ± 4,3 | 272,0 ± 8,8 | 89,0 ± 2,0 |
| | A _{DER} (U/g) ^d | 69,4 ± 1,4 | 86,2 ± 3,0 | 32,2 ± 0,0 |
| 5,0 | RI _{Atv} (%) | 99,7 ± 0,1 | 99,5 ± 0,4 | 100,0 ± 0,0 |
| | RI _{Prot} (%) | 98,6 ± 0,6 | 99,5 ± 0,4 | 99,8 ± 0,4 |
| | A _{REC} (%) | 222,2 ± 9,5 | 203,6 ± 7,9 | 79,9 ± 2,5 |
| | A _{DER} (U/g) | 357,0 ± 15,5 | 326,3 ± 11,4 | 128,7 ± 4,0 |
| 10,0 | RI _{Atv} (%) | 99,8 ± 0,0 | 99,7 ± 0,3 | 99,9 ± 0,0 |
| | RI _{Prot} (%) | 98,7 ± 1,0 | 99,4 ± 0,5 | 98,9 ± 0,9 |
| | A _{REC} (%) | 175,4 ± 3,1 | 147,2 ± 3,2 | 63,9 ± 2,5 |
| | A _{DER} (U/g) | 564,0 ± 9,7 | 472,8 ± 11,8 | 205,7 ± 8,0 |
| 25,0 | RI _{Atv} (%) | 96,5 ± 2,5 | 99,9 ± 0,1 | 99,9 ± 0,1 |
| | RI _{Prot} (%) | 99,4 ± 0,1 | 99,2 ± 0,3 | 99,1 ± 0,2 |
| | A _{REC} (%) | 57,1 ± 3,2 | 72,7 ± 3,9 | 52,1 ± 2,2 |
| | A _{DER} (U/g) | 434,7 ± 17,2 | 584,3 ± 31,7 | 99,9 ± 0,1 |
| 50,0 | RI _{Atv} (%) | 94,9 ± 3,2 | 99,3 ± 0,1 | 98,6 ± 0,2 |
| | RI _{Prot} (%) | 99,6 ± 0,1 | 99,5 ± 0,1 | 97,9 ± 0,8 |
| | A _{REC} (%) | 42,0 ± 1,5 | 47,3 ± 2,3 | 27,8 ± 0,3 |
| | A _{DER} (U/g) | 654,1 ± 13,2 | 756,8 ± 36,0 | 441,3 ± 5,5 |

^a RI_{ATV} (%): rendimento de imobilização em termos de atividade enzimática;

^b RI_{PROT} (%): rendimento de imobilização em termos de proteína imobilizada;

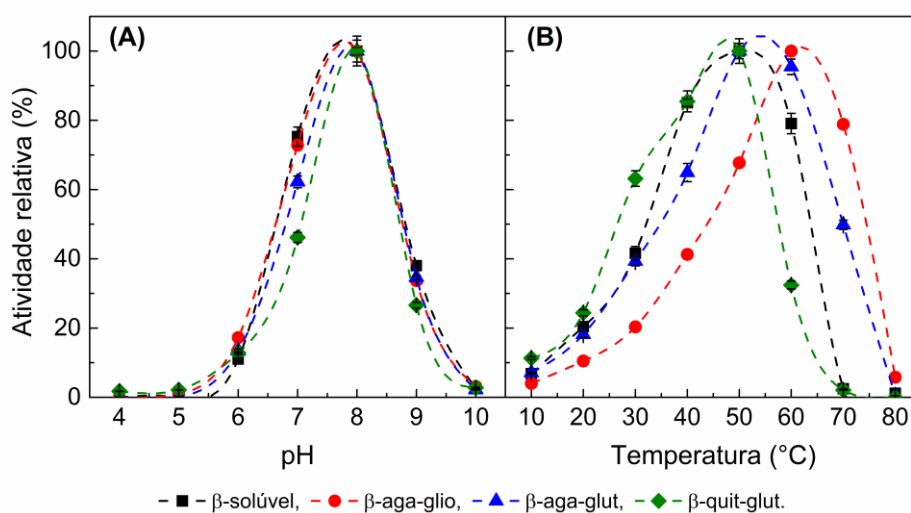
^c A_{REC} (%): atividade recuperada;

^d A_{DER} (%): atividade medida no derivado após a imobilização enzimática.

4.3.2 Caracterização dos derivados

O estudo do efeito do pH sobre as atividades da β -xilosidase livre e imobilizada foi realizado através da hidrólise do substrato p-NPX na faixa entre pH 4,0 e 10,0, a 35 °C (Figura 4.3.A). A β -xilosidase livre apresentou a máxima atividade catalítica em pH 8,0, sendo esse comportamento também observado em todos os derivados. Esses resultados indicam que o processo de imobilização não afetou as condições nativas da enzima quanto ao pH de máxima atividade catalítica.

Figura 4.3. Influência do pH (A) e temperatura (B) na atividade da β -xilosidase livre e imobilizada em suportes Aga-glio, Aga-glut e Quit-glut. (A) Atividades enzimáticas medidas a 35 °C, substrato p-NPX 5 mmol.L⁻¹ preparado nos tampões 50 mmol.L⁻¹: citrato de sódio pHs 4 e 5, fosfato de sódio pHs 6-8, bicarbonato de sódio pH 9 e 10. (B) Atividades medidas a 10 - 80°C em substrato p-NPX 5 mmol, tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 6,0.



Contudo, os perfis encontrados nesse trabalho diferem dos apresentados por Diogo et al. (2015), que observaram a máxima atividade em pH 6,5 ao caracterizar um híbrido de endo- β -xilosidase de *Bacillus subtilis*. Embora os valores de máxima atividade sejam próximos entre si, a discrepância observada pode ser atribuída às diferentes metodologias utilizadas para medida da atividade enzimática em função do pH. Diversos autores descrevem a medida da absorbância referente ao produto formado apenas após um determinado período de incubação em temperaturas pré-estabelecidas (em geral acima de 40 °C) (DIOGO et al., 2015; MORANA et al., 2006; PEDERSEN et al., 2007; TERRASAN et al., 2016b).

Todavia, neste trabalho a variação da absorbância em função da hidrólise do substrato foi registrada ao longo de todo o período de incubação, mantendo-se um curto intervalo entre as medidas (2 segundos). Conforme será discutido adiante, a β -xilosidase de *Bacillus subtilis* apresenta baixíssima estabilidade térmica em temperaturas acima de 45 °C, razão pela qual as medidas de atividade foram fixadas em 35 °C. De fato, nos ensaios de

caracterização realizados em temperaturas mais elevadas, observou-se que a faixa linear (intervalo de medida com maior confiança) consistia em apenas poucos segundos após o início da reação, havendo uma nítida queda na inclinação da curva Abs vs. tempo em função da inativação da enzima presente em solução. Desta forma, portanto, os perfis descritos em alguns trabalhos da literatura podem estar subestimados, o que possibilitaria a aplicação dessas enzimas em processos operando em pHs e temperaturas mais elevados.

Na Figura 4.3 também é possível observar que, de maneira geral, os derivados preparados mantiveram o comportamento catalítico nativo da enzima livre, com exceção do derivado β -aga-glio. A máxima atividade catalítica foi medida em 45 °C para a enzima livre e para os derivados β -aga-glut e β -quit-glut, estando em conformidade com a temperatura de máxima atividade de 45 °C descrita por Diogo et al. (2015). Contudo, pode-se observar um deslocamento da máxima atividade medida nos derivados β -aga-glio, cuja máxima atividade foi medida em 60 °C, sendo superior em 15° comparado à enzima livre. O aumento da temperatura de máxima atividade catalítica de β -xilosidases em decorrência da imobilização também foi observado por outros autores (MORANA et al., 2006; TERRASAN et al., 2016a).

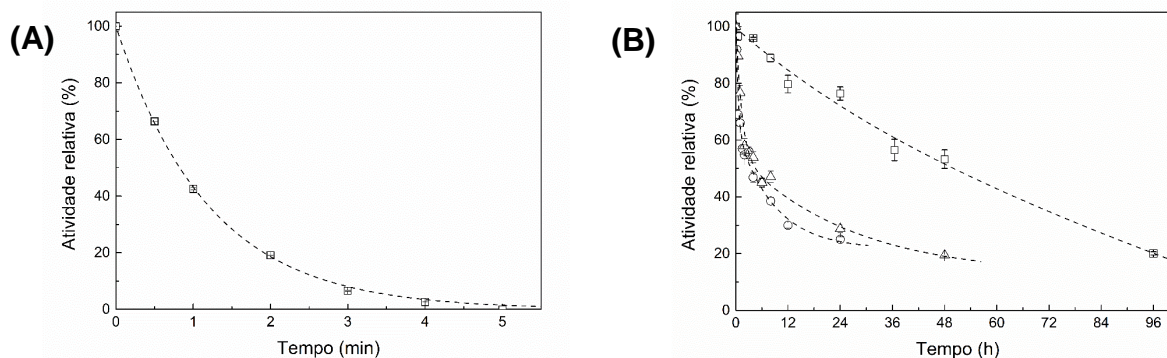
Conforme será discutido adiante, a β -xilosidase apresenta baixa estabilidade em temperaturas acima de 45 °C, ocorrendo uma rápida desnaturação, sendo mais acelerada em temperaturas elevadas. A imobilização desta enzima multimérica em suporte agarose ativado com grupos glioxil permitiu a formação de múltiplas ligações covalentes entre a enzima e o suporte, provocando o enrijecimento da estrutura tridimensional da enzima. As múltiplas ligações covalentes multipontuais existentes entre enzima e o suporte se mantêm basicamente inalteradas na presença de agentes de distorção como calor, solventes orgânicos, valores de pH, etc., reduzindo mudanças estruturais capazes de provocar a inativação da enzima e aumentando consideravelmente a sua estabilidade (MATEO et al., 2007).

4.3.3 Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada

A estabilidade térmica dos derivados obtidos é uma importante variável a ser estudada, que permite avaliar o comportamento dos derivados ao serem incubados em condições semelhantes às aplicadas em processos biotecnológicos. As atividades da β -xilosidase livre e dos 3 derivados foram acompanhadas ao longo do tempo, sendo apresentadas na Figura 4.4. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 6,0 a 50 °C, condições comumente aplicadas em processos que utilizam complexos xilanolíticos (i.e. coquetéis enzimáticos compostos de endo-, exoxilanase e β -xilosidase). Conforme observado na Figura 4.4.A, é notável a baixíssima estabilidade térmica

da enzima livre ao ser incubada a 50 °C, onde o tempo de meia vida foi de apenas 50 segundos (calculados a partir do ajuste não-linear do modelo de inativação de 1° ordem aos dados experimentais).

Figura 4.4. Inativação térmica da β -xilosidase livre (A) e imobilizada (B) em suportes Aga-glio (\square), Aga-glut (\circ) e Quit-glut (\triangle). Condições experimentais: 50°C, tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 6.0. Atividades medidas pela hidrólise do p-NPX 5 mmol.L⁻¹ a 35 °C. As atividades iniciais foram definidas como 100% de atividade relativa.



Para os derivados β -aga-glio, β -aga-glut e β -quit-glut incubados 50 °C, pode-se observar que a inativação em decorrência da elevada temperatura foi mais lenta que a observada com a enzima livre (Figura 4.4.B). Os tempos de meia vida foram obtidos a partir do ajuste não-linear do modelo de inativação de 2° ordem aos dados experimentais; bem como os respectivos fatores de estabilização calculados em relação a enzima livre. O derivado β -aga-glio apresentou a maior estabilidade comparado aos demais derivados estudados, com tempo de meia vida de 50h, 3605 vezes mais estável que a enzima livre nas mesmas condições. A formação de múltiplas ligações entre a enzima e o suporte é necessária para aumentar a estabilidade térmica da β -xilosidase (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009). Conforme discutido anteriormente, a β -xilosidase apresenta uma elevada quantidade de resíduos ϵ -lisinas em sua superfície (Figura 4.1.A) além do grupo amino-terminal, que possibilitaram as múltiplas ligações covalentes ao suporte, enrijecendo sua estrutura tridimensional e ocasionando sua maior estabilidade térmica.

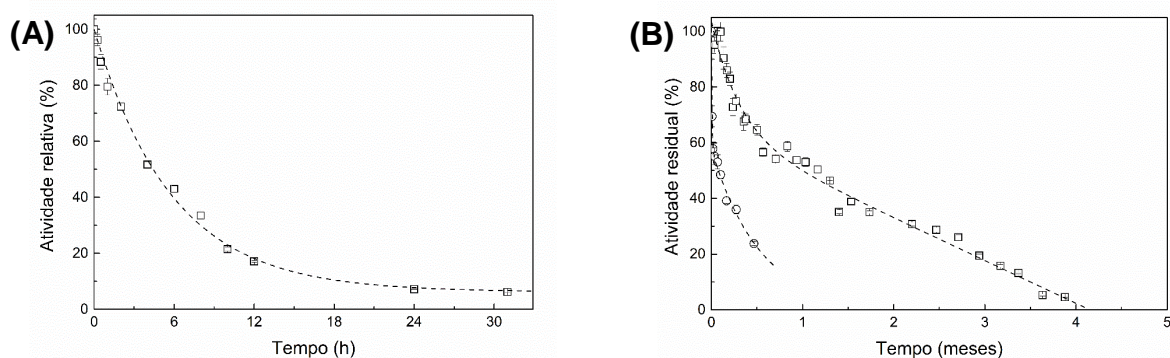
Observa-se também que os derivados preparados em suportes ativado com glutaraldeído foram capazes de aumentar a estabilidade da enzima, embora não tão significativamente como o derivado β -aga-glio. Dentre os derivados estudados, o preparado em β -aga-glut foi o que apresentou o menor fator de estabilização, sendo 252x mais estável que a enzima livre, com o tempo de meia vida calculado em 3,5h a 50 °C. O derivado β -quit-glut apresentou um desempenho superior, sendo 326x mais estável que a enzima livre ($t_{1/2}$ vida = 4,5h). Esses resultados são significativos, uma vez que apontam para a possibilidade do

uso da β -xilosidase imobilizadas em quitosana, um suporte de baixo custo, em processos realizados a elevadas temperaturas por períodos prolongados.

Um dos principais objetivos da imobilização de enzimas é a possibilidade de reutilização dos biocatalisadores por períodos de tempo sob condições industriais (GUISAN, 2006). Nesse sentido, pretende-se utilizar os derivados de β -xilosidase obtidos nesse estudo como parte da composição dos biocatalisadores do processo de hidrólise, isomerização e fermentação simultânea (*SHIF*), desenvolvida pelo grupo de pesquisa LABENZ (MILESSI-ESTEVEZ et al., 2019). Considerando os longos períodos aos quais os derivados encapsulados em alginato de cálcio irão atuar nesse processo, foram avaliadas as estabilidades dos derivados preparados em β -aga-glio e β -quit-glut a 35 °C e pH 6,0.

As curvas de inativação térmica em função do tempo encontram-se na Figura 4.5. Conforme esperado, a redução da temperatura de incubação do ensaio para 35 °C retardou a inativação da enzima livre, sendo o tempo de meia vida calculado em 4,4 horas. Nas mesmas condições, foi notável a estabilidade dos derivados β -aga-glio, cujos ensaios de inativação foram acompanhados por 4 meses (3100 horas). Este derivado apresentou um tempo de meia vida 164x superior ao obtido pela enzima livre. Por outro lado, os derivados β -quit-glut apresentaram um tempo de meia-vida 12x superior ao da enzima livre. Esses resultados indicam que ambas estratégias de imobilização adotadas nesse trabalho resultaram na estabilização e, conseqüentemente, aumento da estabilidade térmica da β -xilosidase nas temperaturas estudadas. Os resultados indicam também que a imobilização em suporte agarose-glioxil através de múltiplas ligações covalentes levou aos maiores fatores de estabilização, aumentando consideravelmente a estabilidade térmica da β -xilosidase. Contudo, foi notável a estabilização da enzima imobilizada em quitosana ativada com gluteraldeído, um suporte de baixo custo e de fácil preparação.

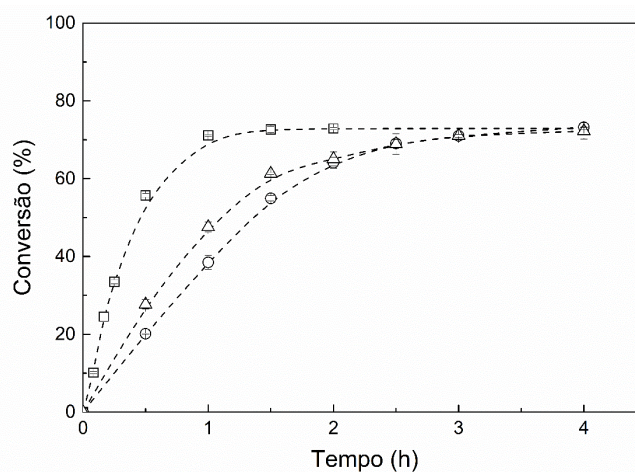
Figura 4.5. Inativação térmica da β -xilosidase livre (A) e dos derivados (B) β -aga-glio (\square) e β -quit-glut (\circ). Condições experimentais: 35 °C, tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 6.0. Atividades medidas pela hidrólise do p-NPX a 35 °C. As atividades iniciais foram definidas como 100% de atividade relativa.



4.3.4 Hidrólise da xilana de milho e reuso do catalisador

Visando a possível aplicação destes derivados em processos multi-enzimáticos integrados (tal como a *SHIF*), os derivados de β -xilosidase preparados em suportes agarose-glioxil e quitosana-glutaraldeído ($1 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$) foram aplicados em reações de hidrólise de xilana de milho nas condições próximas às empregadas em processos de produção de etanol 2G: pH 6,0 e $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (MILESSI et al., 2018; SILVA et al., 2012). A xilana de milho consiste em um substrato completamente solúvel, composto majoritariamente de xilobiose ($17,6 \pm 0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e xilooligossacarídeos ($12,9 \pm 0,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de xilotriose, $5,6 \pm 0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de xilotetraose, $3,2 \pm 0,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de xilopentaose e $2,2 \pm 0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de xilohexaose) e isento de xilose. A Figura 4.6 apresenta os perfis conversão dos XOS em xilose em função do tempo para as reações catalisadas pela enzima livre e pelos derivados. Observa-se que hidrólise da xilana de milho foi realizada mais rapidamente com a enzima solúvel, atingindo a máxima conversão de $72,9 \pm 0,3\%$ após a primeira hora de reação; com produção de $19,9 \pm 0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de xilose. Conversões equivalentes foram obtidas após 3,5 horas de reação realizadas com os derivados: β -aga-glio $73,2 \pm 0,1\%$ e β -quit-glu $72,2 \pm 2,1\%$, produzindo $22,1 \pm 0,3$ e $22,6 \pm 1,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de xilose, respectivamente. Em nenhum dos ensaios obteve-se a completa hidrólise dos XOS em xilose monomérica. A presença de ramificações nas cadeias de XOS limita a ação de enzimas xilanolíticas, dificultando a completa degradação dos oligômeros em xilose (DODD; CANN, 2009).

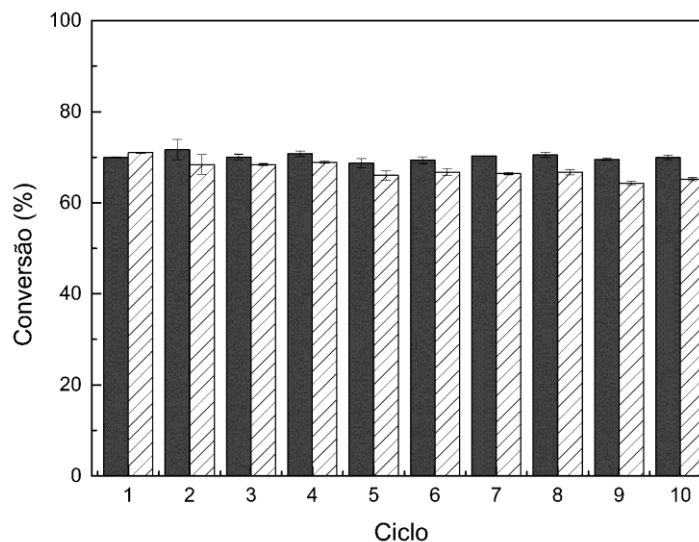
Figura 4.6. Curso de tempo da hidrólise da xilana de milho ($40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) catalisada pela β -xilosidase livre (\square) e imobilizada em suporte Aga-glio (\circ) e Quit-glu (\triangle) realizados em pH 5,6 a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Concentração de catalisador: $1 \text{ UI} \cdot \text{mL}_{\text{reator}}^{-1}$. Barras de erro: desvio padrão dos ensaios.



Embora o substrato seja completamente solúvel, a hidrólise foi realizada mais rapidamente pela enzima solúvel que pelos derivados. Esses resultados são esperados, haja visto a maior acessibilidade das enzimas livres às cadeias de XOS em solução. Embora um tempo maior de reação tenha sido necessário, ambas reações realizadas com os derivados foram capazes de hidrolisar e atingir conversões equivalentes às obtidas com a enzima livre. Esse comportamento pode ser explicado por possíveis resistências à transferência de massa, haja visto que a mesma atividade teórica foi oferecida para a enzima livre e derivados ($1 \text{ UI} \cdot \text{mL}_{\text{Reator}}^{-1}$). Conforme discutido anteriormente, a avaliação dos parâmetros de imobilização não indicaram a presença de efeitos difusivos para os ensaios com os derivados preparados com $1 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$ para a hidrólise do substrato sintético. Contudo, é sabido que enzimas atuam de maneiras diferentes conforme o substrato oferecido, resultando em diferentes respostas catalíticas na hidrólise de substrato sintético e natural (STAN TSAI, 1997). Desta forma, a utilização da xilana de milho, um substrato de cadeia polimérica mais longa que o substrato sintético, ocorreu mais lentamente através da liberação das unidades de xilose a partir da extremidade não redutora dos xilooligossacarídeos (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016). Apesar desse fato, os resultados indicam que ambos os derivados foram capazes de hidrolisar efetivamente a xilana de milho em período relativamente curto.

A fim de avaliar a reutilização dos derivados, foram realizados ciclos de hidrólise da xilana de milho catalisada pelos derivados β -aga-glio e β -quit-glut. Cada ciclo foi realizado por quatro horas. Conforme mostrado na Figura 4.7, é notável que após 10 ciclos consecutivos as conversões dos derivados β -aga-glio permaneceram constantes em $\sim 70\%$, sem que ocorresse a perda de atividade catalítica dos derivados ao longo de cada ciclo. Para as bateladas catalisadas pelo derivado β -quit-glut, uma pequena queda de conversão para $65,2\%$ na décima batelada foi observada, possivelmente devido a inativação térmica ao longo da incubação nas condições do ensaio. Os resultados obtidos demonstram que tanto o derivado preparado pela técnica de imobilização multipontual em suporte ativado com grupos glioxil como o ativado com glutaraldeído apresentaram desempenhos semelhantes nas reações de hidrólise ao longo de 10 ciclos consecutivos. Os resultados indicam a excelente reusabilidade e estabilidade dos derivados β -aga-glio para a hidrólise de XOS. Adicionalmente, os derivados β -quit-glut se mostraram atraentes do ponto de vista econômico, haja visto a possibilidade de aplicação de um catalisador de β -xilosidase similar ao β -aga-glio com custos consideravelmente inferiores, embora de menor estabilidade térmica.

Figura 4.7. Ciclos consecutivos de hidrólise de xilana de milho (40 g.L^{-1}) catalisada pelos derivados β -aga-glio (preenchido) e β -quit-glut (vazado) realizados em pH 5,6 a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Concentração de catalisador: $1 \text{ U.mL}_{\text{Reator}}^{-1}$. Após cada ciclo de hidrólise (4h), o sobrenadante foi filtrado e os derivados lavados com tampão fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 6,0 $25 \text{ }^\circ\text{C}$; e uma nova batelada iniciada. Barras de erro: desvio padrão dos ensaios.



4.4 CONCLUSÃO

Esta etapa do trabalho teve como objetivo a obtenção de um biocatalisador de β -xilosidase com elevada atividade catalítica e estabilidade térmica a fim de ser encapsulado junto com os demais derivados do biocatalisador de *SHIF*. As duas estratégias estudadas permitiram imobilizar completamente a β -xilosidase multimérica, sem perdas em termos de atividade catalítica. Os melhores derivados foram obtidos com os suportes agararose-glioxil e quitosana-glutaraldeído; sendo 3605 e 326 vezes mais estáveis que a enzima solúvel, respectivamente. Estes resultados podem ser atribuídos à formação de múltiplas ligações covalentes entre as subunidades da enzima e a superfície do interna do suporte, resultando na estabilização da complexa estrutura tridimensional da enzima. Sob condições experimentais próximas de *SHIF* ($35 \text{ }^\circ\text{C}$ pH 6,0) a máxima conversão de 70% foi atingida após 4h de reação, sem queda significativa de conversão após 10 ciclos de hidrólise consecutivos. Os resultados obtidos mostraram que ambos suportes utilizados resultaram em biocatalisadores heterogêneos com alta atividade catalítica e estabilidade operacional. Essas características são altamente importantes para a aplicação deste biocatalisador de β -xilosidase em bioprocessos que requerem a degradação de XOS (X_2 - X_4), inclusive em escalas industriais.

4.5 REFERÊNCIAS

ADRIANO, W. S. et al. Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 4, p. 529–538, 2005.

ADRIANO, W. S. et al. Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 8, p. 2170–2179, 2008.

BARBOSA, O. et al. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Adv.**, v. 4, n. 4, p. 1583–1600, 2014.

BASTIDA, A. et al. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486–493, 1998.

BENASSI, V. M. et al. Immobilization and biochemical properties of a β -xylosidase activated by glucose/xylose from *Aspergillus niger* USP-67 with transxylosylation activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 93–101, 2013.

BETANCOR, L. et al. Preparation of a Stable Biocatalyst of Bovine Liver Catalase Using Immobilization and Postimmobilization Techniques. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 3, 2003, p. 763–767.

BIELY, P. Xylanolytic Enzymes. In: WHITAKER; VORAGEN; WONG (Eds.). **Handbook of food enzymology**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 879–916.

BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, nov. 2016.

BLANCO, R. M.; GUISÁN, J. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, n. 6, p. 360–366, 1989.

BOLIVAR, J. M. et al. Purification and stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* via oriented multisubunit plus multipoint covalent immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1–4, p. 158–163, 2009.

BOLIVAR, J. M. et al. Heterofunctional supports for the one-step purification, immobilization and stabilization of large multimeric enzymes: Amino-glyoxyl versus amino-epoxy supports. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 10, p. 1692–1698, 2010.

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.

BRENA, B.; GONZALEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of enzymes: a literature survey. **Methods in Molecular Biology**, v. 1051, p. 15–31, 2013.

BUDRIENE, S. et al. β -Galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. **Central European Journal of Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 95–105, 2005.

DE OLIVEIRA, S. M. et al. Covalent immobilization-stabilization of β -1,4-endoxylanases from *Trichoderma reesei*: Production of xylooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 64, p. 170–176, 2018.

HIMAN, S. S.; SHARMA, J.; BINDU, B. Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: A review. **BioResources**, v. 3, p. 1377–1402, 2008.

DIOGO, J. A. et al. Development of a chimeric hemicellulase to enhance the xylose production and thermotolerance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 69, p. 31–37, 2015.

DORNEZ, E. et al. Impact of Wheat Flour-Associated Endoxylanases on Arabinoxylan in Dough after Mixing and Resting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 7149–7155, 2007.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z.; HEINZE, T. Hemicellulose. In: HEINZE, T. (Ed.). **Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 1–67.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 7, p. 546–550, 1993.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6–7, p. 405–418, 2009.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUEZ, V.; GUISÁN, J. M. The coimmobilization of d-amino acid oxidase and catalase enables the quantitative transformation of d-amino acids (d-phenylalanine) into α -keto acids (phenylpyruvic acid). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 1–2, p. 28–33, 1998.

FERNANDEZ-LOPEZ, L. et al. Effect of protein load on stability of immobilized enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 18–25, 2017.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GÓMEZ, S. et al. Stabilization of β -Gal-3 ATCC 31382 on agarose gels: synthesis of β -(1→3) galactosides under sustainable conditions. **RSC Advances**, v. 6, n. 83, p. 79554–79562, 2016.

GUERFALI, M. et al. Catalytic properties of the immobilized *Talaromyces thermophilus* β -xylosidase and its use for xylose and xylooligosaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1–4, p. 242–249, 2009.

GUISÁN, J. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 6, p. 375–382, 1988.

GUISAN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa: Humana Press, 2006. 450 p.

ILLANES, A. et al. Diffusional restrictions in glyoxyl-agarose immobilized penicillin G acylase of different particle size and protein loading. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1, 15, 2010.

- JORDAN, D. B.; WAGSCHAL, K. Properties and applications of microbial β -D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1647–1658, 2010.
- MANZANARES, P.; RAMÓN, D.; QUEROL, A. Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the production of β -D-xylosidase activity. **International journal of food microbiology**, v. 46, n. 2, p. 105–12, 1999.
- MATEO, C. et al. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 4, p. 456–462, 2005.
- MATEO, C. et al. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 274–280, 2006.
- MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.
- MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790–6, 798–802, nov. 2004.
- MILESSI-ESTEVEZ, T. et al. An Innovative Biocatalyst for Continuous 2G Ethanol Production from Xylo-Oligomers by *Saccharomyces cerevisiae* through Simultaneous Hydrolysis, Isomerization, and Fermentation (SHIF). **Catalysts**, v. 9, n. 3, p. 225, 2019.
- MILESSI, T. S. et al. Influence of key variables on the simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose by a native *Saccharomyces cerevisiae* strain co-encapsulated with xylose isomerase for 2G ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 277–283, 2018.
- MILESSI, T. S. S. et al. Immobilization and stabilization of an endoxylanase from *Bacillus subtilis* (XynA) for xylooligosaccharides (XOs) production. **Catalysis Today**, v. 259, p. 130–139, 2016.
- MORANA, A. et al. Immobilization and characterization of a thermostable β -xylosidase to generate a reusable biocatalyst. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 6, p. 1205–1213, 2006.
- PATSKOVSKY, Y.; ALMO, S. C. Crystal structure of β -1,4-xylosidase from *Bacillus subtilis*. TO BE PUBLISHED, 2005.
- PEDERSEN, M. et al. Identification of thermostable β -xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 5, p. 743–748, 27, 2007.
- PEDROCHE, J. et al. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1160–1166, 2007.
- PEREIRA, G. H. A. **Estudo da imobilização multipontual da penicilina G acilase em sílica ativada com grupos glioxil**. 1996. 78f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

ROCHA-MARTIN, J. et al. Selective oxidation of glycerol to 1,3-dihydroxyacetone by covalently immobilized glycerol dehydrogenases with higher stability and lower product inhibition. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 445–453, 2014.

RODRIGUES, D. S. et al. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 3–4, p. 100–109, 2008.

SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. **Biotechnology and bioengineering**, v. 30, n. 6, p. 717–23, 20,1987.

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

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SILVA, C. R. et al. An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor. **Enzyme and microbial technology**, v. 50, n. 1, p. 35–42, 2012.

SMAALI, I. et al. Biocatalytic conversion of wheat bran hydrolysate using an immobilized GH43 β -xylosidase. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 338–344, 2009.

STAN TSAI, C. Molecular modelling studies of lysozyme catalysed hydrolysis of synthetic substrates. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 29, n. 2, p. 325–334, 1997.

TERRASAN, C. R. F. et al. Co-immobilization and stabilization of xylanase, β -xylosidase and α -l-arabinofuranosidase from *Penicillium janczewskii* for arabinoxylan hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 5, p. 614–623, 2016a.

TERRASAN, C. R. F. et al. β -xylosidase from *Selenomonas ruminantium*: Immobilization, stabilization, and application for xylooligosaccharide hydrolysis. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 34, n. 4, p. 161–171, 2016b.

TROBO-MASEDA, L. et al. Stabilization of multimeric sucrose synthase from *Acidithiobacillus caldus* via immobilization and post-immobilization techniques for synthesis of UDP-glucose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 2, p. 773–787, 2018.

VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M. Interaction of natural and crosslinked chitosan membranes with Hg(II) ions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 279, n. 1–3, p. 196–207, 2006.

WILSON, D. B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 259–263, 2011.

CAPÍTULO 5: IMOBILIZAÇÃO DA XILANASE MULTIFECT PARA PRODUÇÃO DE XILOSE E XOS

5.1 Introdução

O conceito de biorefinaria integrada tem direcionado muita atenção ao aproveitamento da fração hemicelulósica da biomassa vegetal, uma vez que os produtos obtidos apresentam grande aplicação para a produção de biocombustíveis, bioenergia além de várias biomoléculas de alto valor agregado como xiloligossacarídeos (XOS) (MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

A xilana é o principal componente da hemicelulose (EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000). Esse heteropolímero é formado predominantemente de D-xilose, embora também possa conter L-arabinose, D-galactose, grupos acetil, feruloil e urônicos, (GÍRIO et al., 2010). A quantidade de cada componente varia de espécie para espécie e até mesmo de planta para a planta. Portanto, a hemicelulose não é um composto químico bem definido, mas uma classe de componentes poliméricos de fibras vegetais (BAJPAI, 2014a; POLIZELI et al., 2005).

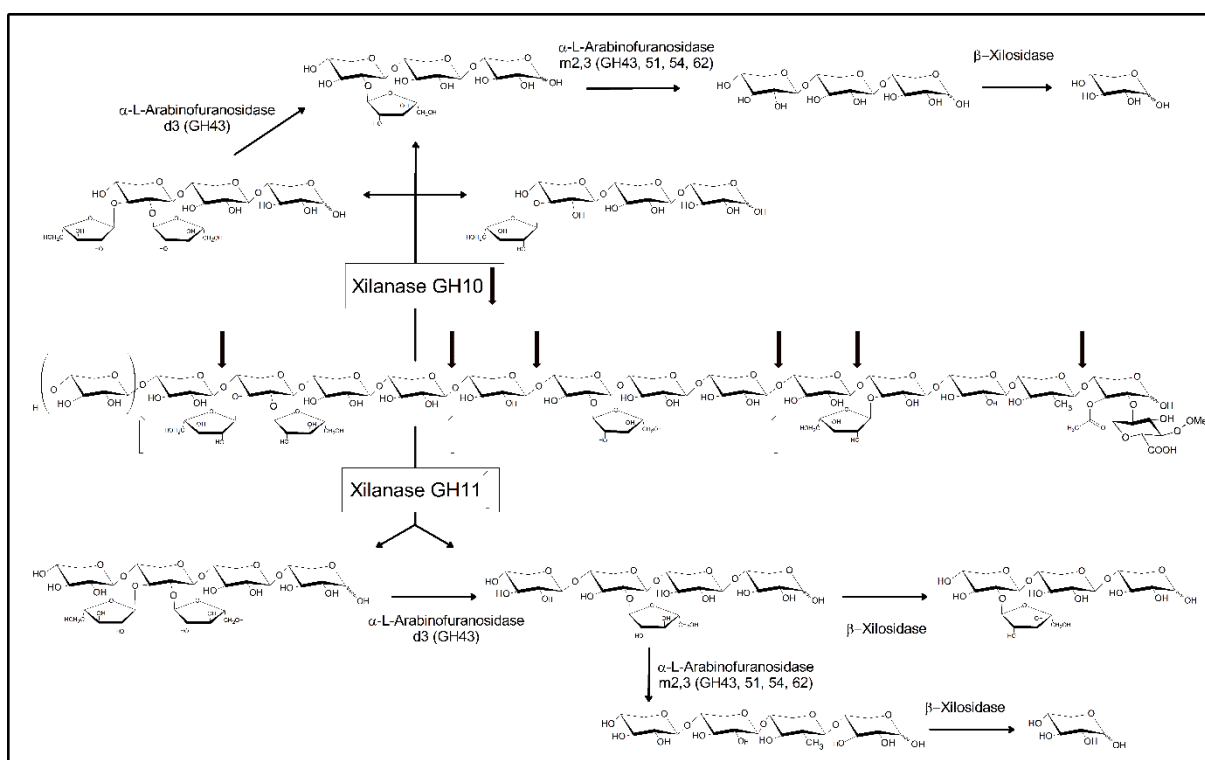
A desconstrução das cadeias de xilana para os carboidratos constituintes (principalmente xilose) consiste em uma etapa fundamental a fim de possibilitar o seu aproveitamento em processos subsequentes, como por exemplo a produção de etanol (DODD; CANN, 2009). Devido à heterogeneidade e complexa natureza química da xilana, a sua completa despolimerização requer a ação de um complexo contendo várias enzimas hidrolíticas, com diversas especificidades e modos de ação (BAJPAI, 2014b). Complexos enzimáticos contendo xilanases são produzidos principalmente por microrganismos que atuam na decomposição das paredes celulares das plantas (filamentosos, bactérias, leveduras, insetos e protozoários) entre eles podemos citar os gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fibrobacter*, *Clostridium* e *Bacillus* (POLIZELI et al., 2005; WILSON, 2011).

De acordo com Biely (2003), são necessárias ao complexo xilanolítico uma mistura de enzimas com diferentes funcionalidades, incluindo endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8), β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -glucuronidases (EC 3.2.1.139), esterases que atuem nos grupos acetil (EC 3.1.1.72) e de ácido ferúlico e cumárico (EC 3.1.1.73). Com base em suas sequências de aminoácidos, dobras estruturais e mecanismos de catálise, xilanases foram classificadas em diversas famílias das glicosil hidrolases - GH (do inglês *glycoside hydrolase*) (CANTAREL et al., 2009).

Endo-1,4- β -xilanases são as principais enzimas envolvidas na despolimerização da xilana, clivando as ligações glicosídicas no esqueleto principal de xilose e reduzindo o grau

de polimerização do substrato (BIELY et al., 1997). Conforme mostrado na Figura 5.1, o ataque enzimático às cadeias de xilana não ocorre aleatoriamente. As ligações selecionadas para a hidrólise dependem da natureza da molécula de substrato, isto é, do comprimento da cadeia, o grau de ramificação e a presença de substituintes ligados à cadeia principal (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; LI et al., 2000).

Figura 5.1. Esquema de degradação enzimática de arabinoglucuronoxilana por xilanases de famílias de GH 10 e 11. Ácido glucurônicos e acetilações não apresentados. A hidrólise para monossacarídeos requer ação de dois tipos de α -L-arabinofuranosidases e β -xilosidase



Fonte: Baseado em Biely, Singh e Puchart (2016); Dodd e Cann (2009); Ebringerová, Hromádková e Heinze (2005) e Polizeli et al. (2005).

As famílias de xilanases GH10 e 11 diferem quanto ao número de sítios de ligação que possuem: a GH10 se liga a quatro ou cinco posições na cadeia principal, enquanto as da GH11 se liga a sete posições (BIELY et al., 1997; DODD; CANN, 2009). De acordo com Biely, Singh e Puchart (2016), o modo de clivagem de enzimas das famílias GH10, GH11 e GH30 diferem principalmente no modo de reconhecimento da ramificação ligada à cadeia principal durante o processo de formação dos complexos enzima-substrato. Com exceção da extremidade redutora, xilanases da família GH10 requerem dois resíduos de xilose não substituídos consecutivos para atacar a cadeia principal xilana, e são capazes de clivar a ligação glicosídica do resíduo xilopiranosil contendo a ramificação. Xilanases GH11 requerem três resíduos xilopiranosil não substituídos em série e atacam uma cadeia de xilana antes da

xilopiranosose substituída (MASLEN et al., 2007). O mecanismo de ação indica que enzimas GH 10 são capazes de hidrolisar ligações da xilose mais próximas dos resíduos da cadeia lateral, liberando produtos mais curtos do que as enzimas GH 11. O perfil dos produtos de hidrólise por xilanases, portanto, será grandemente influenciado pelo grau de substituição da xilana e o seu reconhecimento pelas xilanases.

β -D-xilosidases liberam monômeros de xilose a partir da extremidade não redutora de xilooligossacarídeos, estando agrupadas em cinco famílias diferentes: GH3, 39, 43, e 54 (HENRISSAT, 1991). Conforme as endoxilanases atuam sucessivamente na quebra da cadeia polimérica de xilana em fragmentos menores, há um aumento do número total de extremidades não-redutoras disponíveis para hidrólise por β -xilosidases (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016). Segundo Polizeli et al. (2005), o acúmulo de xilooligômeros pode levar à inibição das endoxilanases. A ação da β -D-xilosidases na hidrólise desses produtos é de grande importância, removendo a causa da inibição e aumentando a eficiência de hidrólise da xilana.

Não menos importante também são as enzimas consideradas “acessórias”. As acetil esterases (EC 3.1.1.6) removem os grupos O-acetil nas posições 2 e/ou 3 do resíduo β -D-xilopiranosil da cadeia de xilana (BIELY, 2003). A eliminação das acetilações facilita a ação de endoxilanases, uma vez que os grupos laterais acetilados podem interferir no acoplamento das enzimas que clivam a cadeia principal (impedimento estérico). Arabinases (EC 3.2.1.55) removem ramificações de arabinose ligadas à cadeia principal, sendo classificadas nas famílias GH43, 51, 54 e 62 (DODD; CANN, 2009). De acordo com a especificidade posicional e necessidade de uma hidroxila vicinal livre no resíduo xilopiranosil, α -L-arabinofuranosidases podem ser divididas em dois grupos. O grupo principal consiste de enzimas ativas em resíduos xilopiranosil monossustituídos por arabinose na posição 2 ou 3 (mostradas como m2,3 α -L-arabinofuranosidases na Figura 4.1). O grupo menor inclui enzimas referidas como α -L-arabinofuranosidases d3 que atuam especificamente nos resíduos xilopiranosil duplamente arabinosilados, liberando seletivamente apenas a arabinose ligada à posição α -1,3, deixando a outra ligada à cadeia principal na posição α -1,2 (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016).

Arabinoglucuronoxilana podem apresentar ácido urônico ou ácido metil glucurônico (MeGlucA) como ramificação. A ligação α -1,2 com o O-2 do resíduo xilopiranosil é uma das ligações glicosídicas mais ácidas e estáveis em paredes celulares de plantas e é hidrolisada por α -glucuronidases (EC 3.2.1.139) (BAJPAI, 2014b). Segundo Biely, Singh e Puchart (2016) dois tipos de α -glucuronidases microbianas foram reconhecidos até agora. As mais conhecidas são α -glucuronidases classificados na família GH67, que podem liberar MeGlucA apenas a partir de oligossacarídeos que contenham um ácido urônico no resíduo xilopiranosil da extremidade não redutora. Essas enzimas são incapazes desramificar

polissacarídeos ou oligossacarídeos em que o MeGlcA esteja ligado a resíduos internos da cadeia principal. A outra classe α -glucuronidases classificadas na família GH115. Além da capacidade para catalisar a mesma reação que as enzimas GH67, essas α -glucuronidases também liberaram MeGlcA ligados a resíduos internos de oligo- e polissacarídeos.

Milessi (2017) realizou um estudo detalhado de oito complexos xilanólíticos comerciais e preparados *in house* visando a aplicação destes na etapa de hidrólise de *SHIF*. Os resultados apontaram que dentre as xilanases estudadas, o complexo comercial Multifect CX XL A03139 foi o mais adequado, tendo em vista a maior conversão da xilana de faia em termos de xilose liberada. Esse complexo foi imobilizado em suporte quitosana ativada com glutaraldeído seguindo o mesmo protocolo adotado em outros estudos realizados pelo grupo, sendo então aplicados em reações de *SHIF* da xilana de faia (MILESSI-ESTEVEES et al., 2019). Contudo, o processo de imobilização ainda carecia de maiores estudos. Nesse contexto, o objetivo dessa etapa do projeto foi a obtenção de um derivado de xilanase de alta atividade catalítica, a fim de ser utilizado na composição dos grânulos de biotacalisador da *SHIF*.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Materiais

O complexo xilanólítico comercial Multifect CX XL A03139 foi gentilmente doado pela Dupont/Genencor (Palo Alto, EUA). A β -xilosidase de *Bacillus subtilis* recombinante expressa em *Escherichia coli* foi produzida e purificada pelo grupo LAFAC do DEQ UFSCar (São Carlos, Brasil). O 4-Nitrofenil-p-D-xilopiranosídeo (p-NPX) foi adquirido da Goldbio (St. Louis, EUA). Glicidol foi da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Quitosana (85% desacetilação) da Polymar (Fortaleza, Brasil). Agarose 6% (6 BCL Sepharose™) da GE Healthcare Life Science (Buckinghamshire, Inglaterra). Borohidreto de sódio da Vetec (Duque de Caxias, Brasil) e (meta) periodato de sódio da Synth (Diadema, Brasil). O licor hidrotérmico foi preparado de acordo com a metodologia descrita no CAPÍTULO 2, sendo rotaevaporado em seguida para concentração do teor de carboidratos. O substrato xilana de eucalipto foi preparado conforme descrito no CAPÍTULO 3. O derivado de β -xilosidase utilizado nos ensaios de hidrólise do licor hidrotérmico foi preparado conforme descrito no CAPÍTULO 4. Todos os demais reagentes químicos possuíam grau analítico.

5.2.2 Métodos

Preparo do gel quitosana-glutaraldeído

O gel de quitosana foi preparado conforme a metodologia descrita por Budriene et al. (2005). Quitosana em pó 2,5% m.m⁻¹ foi solubilizada em ácido acético 2% (m.v⁻¹) e homogeneizada por 30 minutos a 25 °C sob agitação mecânica. A solução foi aquecida a 50 °C e foram adicionados 1,5 mL de KOH 0,5 mol.L⁻¹ para cada mL de solução de quitosana, sendo então mantido sob agitação por 30 minutos. Em seguida, o material foi filtrado e lavado com água destilada até a neutralização do pH neutro e armazenado ativação posterior.

Para a ativação, uma solução de glutaraldeído 0,8% (v.v⁻¹) foi preparada em tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0. A 90 mL desta solução foram adicionados 10 g de gel de quitosana (filtrado), sendo a suspensão mantida sob agitação mecânica suave por 30 minutos a 50 °C. Imediatamente após a ativação, o suporte foi lavado exaustivamente com água destilada até a neutralização, seguido da imobilização da enzima ao suporte.

Preparo do gel agarose-glioxil

Suportes agarose glioxil foram preparados pela eterificação da agarose com glicidol seguida pela oxidação com metaperiodato de sódio, de acordo com a metodologia descrita por Guisán (1988). Agarose 6% foi suspensa em água destilada (286 µL.g_{gel}⁻¹) em banho de gelo. Solução de NaOH 1,7 mol.L⁻¹ (preparada previamente a frio e contendo 28,5 mg de borohidreto de sódio por mililitro de solução) foi adicionada à solução. Posteriormente, adicionou-se lentamente glicidol à solução (343 µL.g_{gel}⁻¹). A suspensão foi mantida sob agitação mecânica suave, à temperatura ambiente, por 16 horas. O suporte eterificado (agarose-gliceril) foi então lavado com água destilada sob filtração a vácuo, e suspenso novamente em água destilada na razão $V_{\text{suporte}}:V_{\text{suspensão}}$ 1:10.

Na oxidação do gel, para cada mL de suporte foram adicionados 214 µg de metaperiodato por microequivalente de grupos aldeídos desejados. Em seguida, sob agitação suave por 2 horas, o gel agarose-glioxil foi lavado com água destilada, seco a vácuo e armazenado a 4 °C. A quantificação dos grupos aldeídos formados foi realizada por iodometria, de acordo com a metodologia adapta de Pereira (1996).

Imobilização do complexo xilanolítico

Os ensaios de imobilização foram realizados segundo o protocolo descrito por Guisán, (1988). Nos ensaios com os dois suportes estudados, foram oferecidos inicialmente a carga enzimática de $1,0 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$. Nos ensaios subsequentes com o suporte quitosana-glutaraldeído, foram avaliadas as cargas de 1 a $50 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$. Em todos os ensaios, o suporte foi suspenso em uma solução enzimática respeitando a relação $v_{\text{gel}}:V_{\text{solução}}$ 1:10. As imobilizações em gel agarose-glioxil foram realizadas em pH 10,05 (tampão carbonato-bicarbonato de sódio $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). A suspensão foi mantida sob agitação orbital suave (60 rpm) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo amostras retiradas em intervalos periódicos para acompanhamento do desaparecimento de proteínas totais e atividade enzimática do sobrenadante. Uma alíquota da solução enzimática inicial (sem adição do suporte) foi incubada nas mesmas condições e suas atividades foram medidas, sendo então utilizadas como controle da imobilização. Ao término da imobilização os grupos aldeído remanescentes foram reduzidos com borohidreto de sódio ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 min) e as bases de Schiff foram convertidas em ligações amina secundárias.

As imobilizações em suporte quitosana-glutaraldeído foram realizadas em tampão fosfato de sódio $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7,0 (BARBOSA et al., 2014), a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação orbital (60 rpm) constante. O suporte foi suspenso na solução enzimática mantendo a proporção suporte:suspensão 1:10 $\text{m} \cdot \text{v}^{-1}$, e posto sob agitação mecânica suave a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Amostras foram coletadas em intervalos periódicos e a atividade enzimática e proteína total foram medidas. Após os procedimentos de imobilização e da etapa de redução com borohidreto de sódio, os derivados foram lavados com tampão de citrato $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 4,8 em excesso e armazenados até à utilização.

As atividades enzimáticas aparentes (Atv_{App} , $\text{U} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$) nos derivados foram medidas e comparadas com as atividades teoricamente imobilizadas (Atv_{Teo} , $\text{U} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$). Os parâmetros de imobilização foram calculados de acordo com Adriano et al. (2008), definidos como rendimento de imobilização em termos de atividade enzimática (RI_{Atv}), rendimento de imobilização em termos de proteínas (RI_{Prot}) e atividade recuperada (A_{Rec}), conforme expresso nas Equações 5.1-5.3, respectivamente. A proteína desaparecida medida foi usada como fator de validação para os cálculos descritos.

$$\text{RI}_{\text{Atv}} = \left(1 - \frac{\text{Atividade}_{\text{Sobrenadante}}^{\text{Final}} (\text{UI} \cdot \text{mL}^{-1})}{\text{Atividade}_{\text{Controle}}^{\text{Final}} (\text{UI} \cdot \text{mL}^{-1})} \right) \quad (5.1)$$

$$RI_{Prot} = \left(1 - \frac{C_{Sobrenadante}^{Final} \text{ (mg. mL}^{-1}\text{)}}{C_{Controle}^{Final} \text{ (mg. mL}^{-1}\text{)}} \right) \quad (5.2)$$

$$A_{Rec} = \left(\frac{\text{Atividade}_{Gel}^{Aparente} \text{ (UI. g}_{gel}^{-1}\text{)}}{\text{Atividade teóricamente imobilizada (UI. g}_{gel}^{-1}\text{)}} \right) \quad (5.3)$$

Hidrólise enzimática do licor hidrotérmico

Ensaio de hidrólise do licor rico em XOS (concentrado 5x) obtido pelo pré-tratamento hidrotérmico (pH 5,6, ajustado com NaOH 1 mol.L⁻¹) do bagaço de cana-de-açúcar (67,7 g.L⁻¹, sendo 22,5 g.L⁻¹ de xilose, 16,1 g.L⁻¹ de X₂, 9,2 g.L⁻¹ de X₃, 8,5 g.L⁻¹ de X₄ e 6,4 g.L⁻¹ de X₆, 1,01 g.L⁻¹ de HMF e 0,81 g.L⁻¹ de furfural) foram realizados com o complexo Multifect livre e imobilizado em quitosana-glutaraldeído em alta carga (50 mg_{proteína.g_{gel}⁻¹}). A carga enzimática oferecida nos ensaios foi de 5 U.mL_{reator}⁻¹ (30 U.g_{xos}⁻¹). Nos ensaios realizados com complementação de β-xilosidase, as reações contaram com a adição de 1 U.mL_{reator}⁻¹ (23 U.g_{xos}⁻¹) do derivado de β-xilosidase preparado em quitosana-glioxil alta carga (50 mg_{proteína.g_{gel}⁻¹}). A reação foi conduzida sob agitação constante a 35 °C por 24 horas em estufa para hibridação equipada com carrossel de agitação 360° com controle de temperatura (Modelo MA 430/1, Maconi, Piracicaba, Brasil). Após o término, as concentrações de xilose e XOS produzidos nas reações foram quantificados por CLAE.

Eletroforese SDS-PAGE

Os complexos xilanólicos estudados foram avaliados por eletroforeses SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%, seguindo as condições desnaturantes descritas por Laemmli (1970) em sistema MiniProtean (Bio-Rad) por 90 minutos a 160V. O gel foi corado em corante *Comassie Brilliant Blue G-250* e as massas moleculares das enzimas presentes nas amostras foram determinadas utilizando marcador molecular Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit (GE Healthcare, Inglaterra), na faixa 97 a 14.4 kDa.

5.2.3 Métodos analíticos

Medida de atividade de endoxilanase

A atividade da xilanase foi medida de acordo com metodologia descrita por Bailey, Biely e Poutanen, (1992) adaptado por Corradini et al. (2018), calculando as velocidades iniciais da reação de hidrólise da xilana de eucalipto (10 g.L⁻¹, tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 5,6) catalisada por uma quantidade conhecida de enzima. A enzima solúvel ou imobilizada foi adicionada ao meio reacional e incubada por 10 min a 50 °C. Alíquotas foram retiradas a cada 2 minutos e os açúcares redutores liberados quantificados pelo método DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberação de um μmol de xilose por minuto nas condições de ensaio (pH 5,6; 50 °C).

Medida da atividade de β -xilosidase

A atividade da β -xilosidase foi determinada em uma cubeta de quartzo, medindo-se o aumento de absorvância a 410 nm causado pela liberação de 4-nitrofenol ($\epsilon = 1950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) durante a hidrólise da solução de 4-nitrofenil β - xilopiranosídeo (p-NPX) 5 mmol.L⁻¹ pH 6,0 a 35 °C (DIOGO et al., 2015). Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de 4-nitrofenol por minuto sob as condições de ensaio.

Determinação da concentração de proteínas totais

A quantificação das proteínas totais foi realizada pelo método proposto por Bradford, (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão analítico.

Hidrólise ácida total

A fim de estimar a concentrações teóricas e xilose e XOS necessárias para o cálculo de rendimento, o licor hidrotérmico foi submetido à hidrólise ácida, conforme descrito no item 2.2.3 do CAPÍTULO 2. Em um tubo de ensaio contendo 5 mL do licor diluído foram adicionados 174 μL de H₂SO₄ 72% (v.v⁻¹), o qual foi mantido a 121 °C 1 atm por 1 hora em autoclave. Após a descompressão, a solução foi neutralizada com CaCO₃, filtrada e as concentrações de carboidratos determinadas por CLAE.

A concentração obtida nas análises de CLAE representam o máximo teórico de xilose que pode ser obtido nas reações de hidrólise do substrato. O máximo teórico de XOS foi calculado de acordo com a Equação 5.4 (WOLF, 2011):

$$C_{XOS \text{ Teórico}} = (C_{Xilose}^{\text{Após hidrólise ácida}} - C_{Xilose}^{\text{Inicial}}) \times 0,88 \quad (5.4)$$

Quantificação dos produtos de hidrólise

As concentrações de xilose e XOS (X₂ a X₆) foram determinadas por CLAE, utilizando a coluna Waters Sugar-Pak™ I (300 x 6,5 mm) conectada ao detector de índice de refração (45 °C), usando água ultrapura como fase móvel com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ a 80 °C. As amostras coletadas foram previamente diluídas e filtradas (filtro PVDF 0,22 µm). As concentrações dos compostos foram obtidas a partir de curvas de calibração obtidas pela injeção de padrões analíticos com concentrações conhecidas.

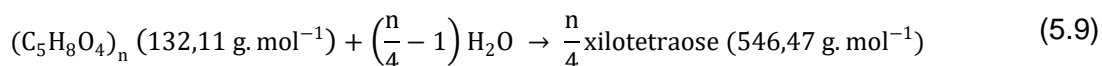
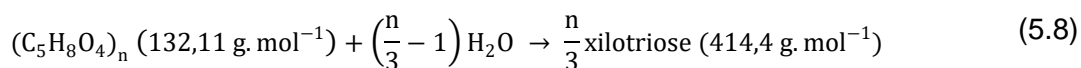
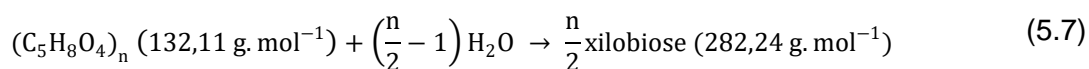
Cálculo dos rendimentos em xilose, XOS e total

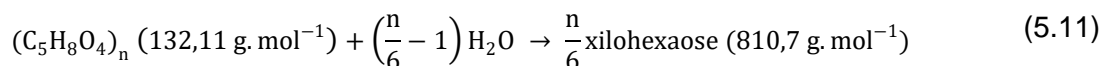
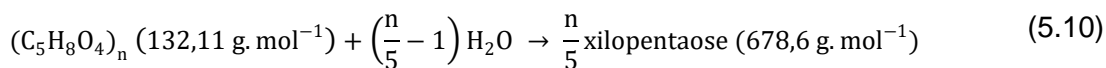
Os rendimentos da hidrólise total do licor em xilose e XOS foram calculados de acordo com as equações descritas por Wolf (2011) e Milessi et al. (2016), tendo como base os máximos teóricos obtidos pela hidrólise ácida do substrato. O rendimento em xilose foi determinado utilizando da Equação 5.5:

$$\text{Rendimento em xilose} = \frac{C_{Xilose}^{\text{Inicial}} - C_{Xilose}^{\text{Final}}}{C_{Xilose} \text{ (teórico total)}} \times 100 \quad (5.5)$$

Os rendimentos em XOS foram calculados conforme a Equação 5.6, considerando-se os fatores estequiométricos de cada xilooligosacarídeo (f_{X2} – f_{X6}), determinados de acordo com as Equações 5.6-5.11.

$$\text{Rendimento em XOS} = \frac{f_{X_2} \cdot C_{X_2} + f_{X_3} \cdot C_{X_3} + f_{X_4} \cdot C_{X_4} + f_{X_5} \cdot C_{X_5} + f_{X_6} \cdot C_{X_6}}{C_{XOS} \text{ (teórico total)}} \times 100 \quad (5.6)$$





$$f_{X_2} = \frac{132,11 \times 2}{282,24} = 0,936 \quad f_{X_3} = \frac{132,11 \times 3}{414,4} = 0,956 \quad f_{X_4} = \frac{132,11 \times 4}{546,47} = 0,967$$

$$f_{X_5} = \frac{132,11 \times 5}{678,6} = 0,973 \quad f_{X_6} = \frac{132,11 \times 6}{810,7} = 0,978$$

O rendimento total foi determinado utilizando a Equação 5.12:

$$\text{Rendimento total} = \frac{(C_{xilose} + \sum C_{XOS})}{C_{XOS \text{ Teórico}}} \times 100 \quad (5.12)$$

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Imobilização do complexo Multifect em suporte agarose-glioxil e quitosana-glutaraldeído

Os ensaios de imobilização do complexo xilanolítico Multifect CX XL foram realizados utilizando como suportes os géis agarose-glioxil e quitosana-glutaraldeído. Esses ensaios permitiram avaliar duas estratégias de imobilização: multiplontual (pH 10,05) ou unipontual (pH 7,0) em suportes ativados com glioxil e glutaraldeído, respectivamente. Em ambos os ensaios, foram oferecidos $1 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$. A Tabela 5.1 apresenta os resultados obtidos em termos de rendimento de imobilização e atividade recuperada.

Tabela 5.1. Parâmetros de imobilização do complexo xilanolítico Multifect CX XL em suportes agarose-glioxil e quitosana-glutaraldeído. Carga proteica oferecida: $1 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$.

| | Suporte | |
|---|-----------------|-------------------------|
| | Agarose-glioxil | Quitosana-glutaraldeído |
| RI_{Atv} (%) | 46,4 ± 0,3 | 64,2 ± 0,9 |
| RI_{Prot} (%) | 52,31 ± 3,6 | 74,9 ± 1,7 |
| A_{Rec} (%) | 57,7 ± 2,9 | 51,0 ± 1,0 |
| A_{Der} (UI/g_{gel}) | 8,83 ± 0,4 | 10,8 ± 0,1 |

RI_{Atv}: Rendimento de imobilização em termos de atividade imobilizada (%);

RI_{Prot}: Rendimento de imobilização em termo de proteína imobilizada (%);

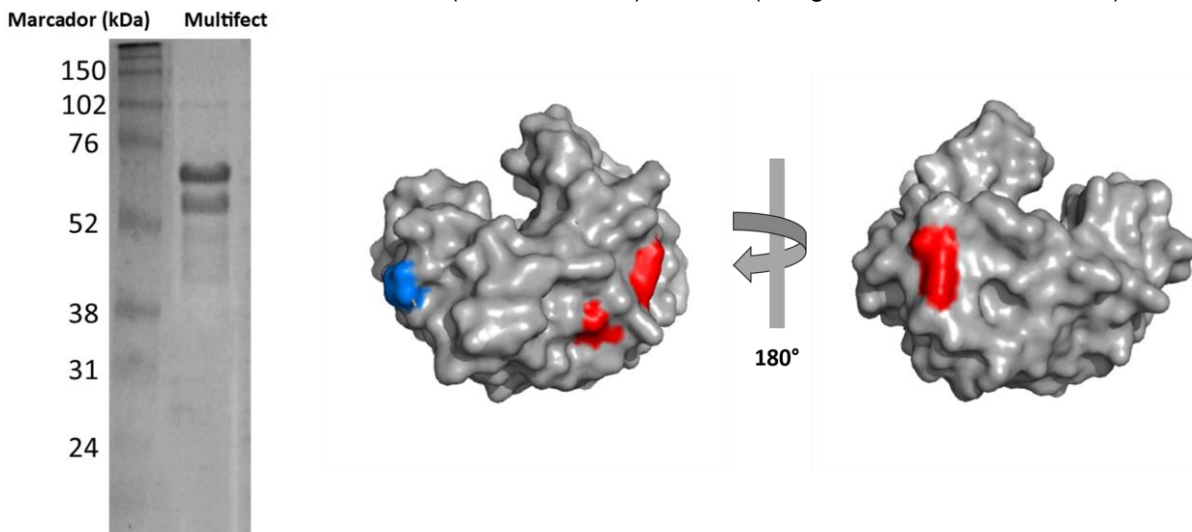
A_{Rec}: Atividade recuperada (%);

A_{Der}: Atividade medida nos derivados (UI.g_{gel}⁻¹, 50°C, pH 5,6).

As estratégias utilizadas possibilitaram a imobilização de pelo menos parte das enzimas que compõem o complexo Multifect. O rendimento de imobilização do complexo xilanolítico em quitosana ativada com glutaraldeído foi superior ao obtido nas imobilizações em suporte agarose-glioxil, tanto em termos de atividade como proteínas. Contudo, as atividades recuperadas nos derivados foram semelhantes, medindo-se cerca de 50% da atividade teoricamente imobilizada.

Segundo informado pela fabricante Genencor, o complexo Multifect é obtido a partir de uma cepa de *Trichoderma reesei* modificada geneticamente. Conforme observado na eletroforese SDS-PAGE, o complexo apresenta poucas enzimas em sua composição (Figura 5.2.A) (RUMPAGAPORN et al., 2015). A Figura 5.2.B apresenta a modelagem da superfície da endoxilanase de *Trichoderma reesei* (código de acesso PDB: 2DFB, WATANABE et al., 2006). Observa-se a existência de apenas 3 resíduos lisina na superfície da enzima, estando dois deles localizados próximos em uma face da enzima e o terceiro na face oposta. O processo de imobilização em suportes ativado com glioxil requer a formação de pelo menos duas ligações simultâneas (bases de *Schiff* reversíveis) entre os grupos aldeído-glioxil e o ϵ -NH₂ dos resíduos de lisina (GUISÁN, 1988). A baixa concentração de lisinas disponíveis na superfície da enzima pode ter sido responsável pelos rendimentos de imobilização obtidos nesse trabalho. Um comportamento semelhante foi descrito por Manrich et al. (2010), onde a saída encontrada para vencer esse obstáculo foi realizar a modificação química da xilanase Novo NS50014 por reação com etilenodiamina, adicionando grupos adicionais de amina à superfície da enzima a fim de possibilitar a imobilização multipontual em suporte agarose-glioxil.

Figura 5.2. (A) Eletroforese SDS-PAGE do complexo xilanolítico Multifect CX XL. (B) A representação da superfície da endoxilanase de *Trichoderma reesei*. Resíduos de lisina destacados em vermelho sítio ativo amarelo e resíduo treonina (amino-terminal) em azul (código de acesso PDB: 2DFB).



As duas estratégias de imobilização estudadas nessa etapa do trabalho apresentaram resultados semelhantes em termos de rendimento e atividade medida nos derivados. Contudo, tendo em vista os menores custos do suporte, menor número de etapas envolvidas no processo de imobilização a estabilidade do complexo xilanolítico Multifect nas condições operadas na *SHIF* (Baldez, 2018), o suporte quitosana-glutaraldeído foi escolhido para a continuidade do estudo de obtenção do derivado de xilanase a ser utilizado no biocatalisador.

5.3.2 Influência da carga enzimática no rendimento de imobilização e retenção da atividade

Aquino (2013) e Milessi et al. (2018) demonstraram que o biocatalisador composto de 10% de levedura e 20% de enzima imobilizada foi o mais adequado nos ensaios de isomerização e fermentação simultâneas (*SIF*), utilizando xilose isomerase imobilizada em quitosana-glutaraldeído e *S. cerevisiae*, ambos encapsulados em gel de alginato de cálcio. Segundo esses autores, o uso de grandes quantidades (isto é, 20% da composição dos grânulos de biocatalisador) de enzima parece ser necessária para garantir alta seletividade ao etanol e manter o sistema em funcionamento por longos períodos.

Contudo, no caso da *SHIF* o derivado de xilanase compreende apenas parte do percentual de enzima do biocatalisador, sendo necessário ter em mente que o derivado de xilose isomerase também será incluído nos grânulos. Desta forma, o derivado a ser utilizado deve apresentar uma elevada atividade catalítica por grama de suporte, a fim de minimizar a quantidade (em massa) de xilanase necessária. Nesse sentido, foram realizados ensaios de imobilização aumentando-se a carga de proteínas oferecidas, mante-se fixa a massa de suporte quitosana-glutaraldeído (1 g_{gel}). A Tabela 5.2 apresenta os parâmetros de imobilização referentes aos ensaios com diferentes cargas enzimáticas oferecidas.

Os resultados obtidos apontam que o suporte quitosana-glutaraldeído também foi capaz de acomodar o mesmo teor de proteína oferecido até a carga de 10 mg de proteínas, mantendo o mesmo rendimento de imobilização em termos de atividade. Embora tenha ocorrido um aumento da atividade medida nos suportes, a queda da atividade recuperada foi notável. Ao serem oferecidos 50 mg de proteína (para a mesma massa de suporte, 1 g), foram obtidos catalisadores com elevada atividade catalítica ($164 \text{ UI.g}_{\text{gel}}^{-1}$), embora as atividades recuperadas tenham reduzido dramaticamente de 51% para 22,5%. Em nenhuma condição estudada foi possível medir a atividade teoricamente imobilizada em sua totalidade.

Tabela 5.2. Influência da carga enzimática sobre os parâmetros de imobilização do complexo xilanolítico Multifect CX XL em suporte quitosana-glutaraldeído.

| Carga oferecida (mg_{proteína}·g_{gel}⁻¹) | RI_{Atv} (%) | RI_{Prot} (%) | A_{Rec} (%) | A_{Der} (UI·g_{gel}⁻¹) |
|---|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|--|
| 1,0 | 64,2 ± 0,3 | 74,9 ± 1,7 | 51,0 ± 1,0 | 10,8 ± 0,1 |
| 5,0 | 79,5 ± 0,5 | 82,7 ± 0,8 | 31,2 ± 1,2 | 35,0 ± 1,6 |
| 10,0 | 79,1 ± 0,9 | 85,4 ± 1,5 | 26,2 ± 1,6 | 50,0 ± 2,8 |
| 50,0* | 43,3 | 71,4 | 18,1 | 163,5 ± 2,1 |

*: Apenas um ensaio de imobilização realizados nessa condição;

RI_{Atv}: Rendimento de imobilização em termos de atividade imobilizada (%);

RI_{Prot}: Rendimento de imobilização em termo de proteína imobilizada (%);

A_{Rec}: Atividade recuperada (%);

A_{Der}: Atividade medida nos derivados (UI·g_{gel}⁻¹, 50°C, pH 5,6).

A concentração de proteínas na solução de imobilização (carga enzimática) pode afetar a distribuição das enzimas imobilizadas no suporte. Quanto mais concentrada a solução de imobilização mais heterogênea será a distribuição interna das enzimas imobilizadas, que tendem a se acumular na camada mais superficial da partícula de suporte ativado, interferindo tanto na quantidade de enzima imobilizada como na atividade medida (RODRIGUES et al., 2008). Atrasos difusionais vêm como consequência direta da distribuição desigual da enzima no interior de biocatalisadores altamente carregados, uma vez que ocorre uma redução significativa do volume dos poros disponíveis para o acesso das moléculas de substrato e de produto (SINGH et al., 2013). Outra possível justificativa estaria relacionada às distorções causadas à estrutura tridimensional da enzima devido às ligações formadas com o suporte. Consequentemente, a acessibilidade e acomodação do substrato pode não ser tão favorável, acarretando em uma diminuição na atividade enzimática medida no derivado (CHUI; WAN, 1997).

Em muitos casos, o que se mede nos derivados é a velocidade aparente de reação, sendo a velocidade intrínseca muito maior do que a com que o substrato e/ou o produto difundem no interior do suporte. A redução da temperatura possibilita a equiparação da velocidade intrínseca de reação com a de difusão, podendo-se assim medir toda a atividade imobilizada (SHULER; KARGI, 2002). A fim de verificar qual justificativa melhor explicaria as baixas atividades recuperadas observadas, as atividades da enzima livre e dos derivados preparados com 1 e 50 mg_{proteína}·g_{gel}⁻¹ foram medidas em temperatura mais baixa (35 °C). Os resultados obtidos encontram-se alistados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Influência da temperatura sobre as atividades recuperadas dos derivados Multifect imobilizados em quitosana-glutaraldeído. Atividade de hidrólise da xilana de eucalipto medidas a 35 °C.

| Derivado (mg _{proteína} ·g _{gel} ⁻¹) | A _{Teo} (U·g _{gel} ⁻¹) | A _{Der} (U·g _{gel} ⁻¹) | A _{Rec} (%) |
|---|--|--|----------------------|
| 1,0 | 7,7 ± 0,1 | 3,6 ± 0,0 | 47,1 ± 0,0 |
| 50,0* | 220,3 | 53,0 ± 2,2 | 21,4 |

*: Apenas um ensaio de imobilização realizados nessa condição;
A_{Teo}: Atividade teoricamente imobilizada nos derivados (U·g_{gel}⁻¹);
A_{Der}: Atividade medida nos derivados (U·g_{gel}⁻¹, 35 °C, pH 5,6);
A_{Rec}: Atividade recuperada (%).

Pode-se observar que a redução da temperatura para a 35 °C não resultou em uma melhora significativa da atividade recuperada nos derivados, indicando que as perdas de atividade devem ter sido causadas provavelmente pela distorção da estrutura da enzima devido à formação de ligações com o suporte durante a imobilização. Embora seja amplamente utilizado em estudos de imobilização, a química da ativação do glutaraldeído não foi completamente elucidada, havendo uma variedade de estruturas de glutaraldeído formadas em condições usuais de ativação de suporte, como mono e di-hidratos, bem como hemiacetal cíclico e oligômeros (WALT; AGAYN, 1994). Os grupos ε-amino das lisinas têm pKa maior que 9,5, mas presume-se que em pHs mais baixos, a pequena porcentagem das aminas presente em sua forma desprotonada seja suficiente para reagir com o glutaraldeído, deslocando o equilíbrio da forma ácida para a desprotonada, possibilitando assim que mais ligações sejam formadas (MIGNEAULT et al., 2004). Presume-se então que este seja o provável fenômeno que esteja ocorrendo durante a imobilização do complexo xilanolítico Multifect e acarretando em derivados com baixas atividades recuperadas.

5.3.3 Hidrólise do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar pela Multifect livre e imobilizada

A primeira etapa do processo *SHIF* consiste na hidrólise das cadeias de xilooligômeros presentes no licor em frações menores (XOS), chegando a monômeros de xilose que poderão ser utilizados nas etapas subsequentes. Os trabalhos realizados por Milessi, (2017) e Baldez, (2018) avaliaram vários complexos xilanolíticos comerciais e indicaram o Multifect CX XL como candidato mais adequado para uso na *SHIF*, tendo como fator determinante a elevada concentração de xilose formada nas reações de hidrólise da

xilana de bétula e de eucalipto, respectivamente, ambas glururonoxilanas. Todavia, o substrato a ser utilizado no processo *SHIF* é a fração líquida do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, sendo esse rico em XOS derivados de arabinoglucuronoxilanas (BIAN et al., 2012; CANILHA et al., 2012; CARVALHO et al., 2013; GÍRIO et al., 2010).

A fim de avaliar o perfil de XOS obtidos nesta hidrólise, foram realizados ensaios de hidrólise utilizando o licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar (67,7 g.L⁻¹). As reações foram conduzidas nas condições mais próximas das utilizadas na *SHIF* (pH 5,6, 35 °C), sendo a carga enzimática fixada em 5 U.mL_{reator}⁻¹ (30 U.g_{XOS}⁻¹). A título de comparação, foram realizadas hidrólises com a enzima livre, os derivados alta carga e uma combinação dos derivados Multifect com a β-xilosidase imobilizada em agarose-gloxil (ambos em alta carga, 50 mg_{proteína.ggel}⁻¹). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Perfil de XOS produzidos após 24h de hidrólise enzimática do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar (67,7 g.L⁻¹) catalisada pela ação da xilanase Multifect livre, imobilizada e combinada com o derivado de β-xilosidase (ambos em alta carga, 50 mg_{proteína.ggel}⁻¹).

| Enzima | Concentração de carboidratos (g.L ⁻¹) | | | | | Rendimentos (%) | | |
|--------------------------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|------------|------------|
| | X ₆ | X ₅ | X ₄ | X ₃ | X ₂ | Xilose | XOS | Xilose |
| Livre | ND | 3,4 ± 0,1 | 1,7 ± 0,1 | 6,4 ± 0,3 | 17,4 ± 0,7 | 24,5 ± 0,2 | 58,7 ± 2,3 | 8,5 ± 0,3 |
| Quit-Mult | ND | 3,1 ± 0,2 | 1,3 ± 0,1 | 5,3 ± 0,1 | 18,1 ± 0,7 | 28,8 ± 1,0 | 56,3 ± 1,7 | 12,9 ± 0,7 |
| Quit-Mult + β-xilosidase | ND | 3,1 ± 0,2 | 0,9 ± 0,0 | 4,4 ± 0,0 | 7,4 ± 0,2 | 46,5 ± 1,2 | 32,1 ± 0,5 | 34,2 ± 1,4 |

ND: Não detectado.

Observa-se que o perfil de XOS obtidos nas reações catalisadas com a enzima livre e o derivado foram muito próximos, tanto em termos de concentrações dos XOS obtidos como nas conversões alcançadas. Os rendimentos globais de hidrólise foram semelhantes aos obtidos nos trabalhos anteriores do grupo. Baldez (2018) estudou a hidrólise da xilana de eucalipto (8,8 g.L⁻¹, pH 5,6, 32 °C) com o complexo Multifect livre. A conversão máxima alcançada foi de 44%, produzindo xilose e XOS na ordem de 1 g.L⁻¹. Utilizando a enzima livre, Milessi (2017) obteve 79% de conversão da xilana de faia (25,4 g.L⁻¹, 24h, pH 5,6, 50°C), sendo a fração majoritária composta de xilose (13,2 g.L⁻¹) e X₂ (6,5 g.L⁻¹). Contudo, o produto majoritário obtido nesse trabalho foi xilobiose, diferentemente dos estudos anteriores onde elevadas concentrações de xilose foram obtidas, provavelmente devido às diferentes naturezas dos substratos.

A concentração de xilose obtida também indica que tanto a endoxilanase como a β-xilosidase estavam imobilizadas nos suportes, sendo a ação de ambas necessárias para a *SHIF*. Contudo, a concentração elevada de xilobiose remanescente mostra que a completa

hidrólise dos XOS do licor em xilose não pode ser alcançada apenas com as enzimas imobilizadas nos derivados, sendo necessária a adição de β -xilosidase ao sistema reacional. Os ensaios de hidrólise do licor hidrotérmico catalisado pela combinação dos derivados Multifect com os derivados de β -xilosidase de *Bacillus subtilis* confirmaram essa hipótese. A concentração de xilose foi consideravelmente superior nesses ensaios ($46,5 \text{ g.L}^{-1}$), elevando o rendimento para 34% em xilose. Observa-se também a queda da concentração de X_2 , restando $7,4 \text{ g.L}^{-1}$ após 24h de reação, confirmando a importância da complementação com derivados de β -xilosidase preparados a parte. Contudo, embora uma considerável melhoria em termos de rendimento tenha sido obtida, a imobilização do complexo Multifect CX XL ainda carece de estudos complementares, empregando outras estratégias de imobilização a fim de alcançar a completa despolimerização da xilana de bagaço de cana-de-açúcar.

É importante ressaltar que quando foi estudada a seleção do complexo xilanolítico a ser imobilizado para o processo *SHIF*, utilizou-se como principal critério de seleção a maior geração de xilose, portanto, maior presença de β -xilosidase. Tempos depois, obteve-se o clone de β -xilosidase e foi possível produzir, purificar, caracterizar e imobilizar a enzima, que mostrou alto desempenho na hidrólise de xilobiose, podendo ser adicionada ao biocatalisador para melhorar a conversão em xilose.

A seleção do complexo xilanolítico pode então agora se basear em outro critério, por exemplo, a de maior conversão em xilobiose. Essa etapa poderá, assim, ser otimizada, ao se prosseguir no estudo desse processo.

5.4 Conclusão

A primeira etapa do processo *SHIF* consiste na hidrólise dos XOS presentes no licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar, catalisada pela ação combinada de um conjunto de enzimas presentes no complexo xilanolítico, especialmente endoxilanase e β -xilosidase. O complexo comercial Multifect CX XL A03139 foi imobilizado em géis agarose-glioxil e quitosana-glutaraldeído. Os resultados obtidos com as duas metodologias estudadas foram semelhantes, sendo a atividade do derivado em quitosana ligeiramente superior. Embora o aumento da carga enzimática oferecida tenha permitido a obtenção de um derivado com maior atividade catalítica, as atividades recuperadas não passaram de 50%. Medidas de atividade da enzima livre e dos derivados a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ mostraram não haver limitações difusionais nos derivados, sendo a formação de múltiplas ligações com o suporte a provável justificativa. Os ensaios de hidrólise de longa duração mostraram a capacidade dos derivados de Multifect preparados em quitosana-glutaraldeído (alta carga, $50 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$) de hidrolisar o licor hidrotérmico em XOS menores ($X_{<6}$), obtendo rendimentos em XOS de 56,3 % e de xilose de

12,9 %. Contudo, a elevada concentração de xilobiose (28,8 g.L⁻¹) acumulada indica a necessidade de β -xilosidase, a fim de propiciar a produção de xilose. Ensaios de hidrólise complementados com derivado β -xilosidase (alta carga, 50 mg_{proteína}.g_{gel}⁻¹, agarose-glioxil) aumentaram a os rendimentos de xilose 34,2%, produzindo 46,5 g.L⁻¹ de xilose e reduzindo o acúmulo de xilobiose para 7,4 g.L⁻¹. Embora os rendimentos de hidrólise sejam razoáveis, estudos complementares com outras técnicas de imobilização do complexo Multifect CX XL são necessários a fim de alcançar a completa despolimerização da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar.

5.5 Referências

ADRIANO, W. S. et al. Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 8, p. 2170–2179, 2008.

AQUINO, P. M. DE. **Produção de etanol a partir de xilose com glicose isomerase e *Saccharomyces cerevisiae* coimobilizadas em gel de alginato**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, maio 1992.

BALDEZ, T. O. **Estudo cinético da hidrólise de xilooligômeros por xilanasas e β -xilosidase na forma livre e imobilizada**. 2018. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

BARBOSA, O. et al. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Adv.**, v. 4, n. 4, p. 1583–1600, 2014.

BIAN, J. et al. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 638–645, 2012.

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.

BUDRIENE, S. et al. β -Galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. **Central European Journal of Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 95–105, 2005.

CANILHA, L. et al. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–15, 2012.

CARVALHO, A. F. A. et al. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 75–85, 2013.

CHUI, W. K.; WAN, L. S. C. Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 14, n. 1, p. 51–61, 1997.

CORRADINI, F. A. S. et al. Eucalyptus xylan: An in-house-produced substrate for xylanase evaluation to substitute birchwood xylan. **Carbohydrate Polymers**, v. 197, p. 167–173.

DIOGO, J. A. et al. Development of a chimeric hemicellulase to enhance the xylose production and thermotolerance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 69, p. 31–37, 2015.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GUISÁN, J. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 6, p. 375–382, 1988.

LI, K. et al. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1–2, p. 89–94, jul. 2000.

MANRICH, A. et al. Immobilization and Stabilization of Xylanase by Multipoint Covalent Attachment on Agarose and on Chitosan Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1, p. 455–467, 2010.

MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790–6, 798–802, 2004.

MILESSI-ESTEVEZ, T. et al. An Innovative Biocatalyst for Continuous 2G Ethanol Production from Xylo-Oligomers by *Saccharomyces cerevisiae* through Simultaneous Hydrolysis, Isomerization, and Fermentation (SHIF). **Catalysts**, v. 9, n. 3, p. 225, 2019.

MILESSI, T. S. et al. Influence of key variables on the simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose by a native *Saccharomyces cerevisiae* strain co-encapsulated with xylose isomerase for 2G ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 277–283, 2018.

MILESSI, T. S. S. et al. Immobilization and stabilization of an endoxylanase from *Bacillus subtilis* (XynA) for xylooligosaccharides (XOs) production. **Catalysis Today**, v. 259, p. 130–139, 2016.

MILESSI, T. S. S. **Produção de etanol 2g a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente modificadas imobilizadas**. 2017. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

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

PEREIRA, G. H. A. **Estudo da imobilização multipontual da penicilina G acilase em sílica ativada com grupos glioxil.** 1996. 78f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.

RODRIGUES, D. S. et al. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 3–4, p. 100–109, 2008.

RUMPAGAPORN, P. et al. Structural features of soluble cereal arabinoxylan fibers associated with a slow rate of in vitro fermentation by human fecal microbiota. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 191–197, 2015.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering: Basic concepts.** 2 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2002. 479 p.

SINGH, R. K. et al. From protein engineering to immobilization: promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 1, p. 1232–1277, 2013.

WALT, D. R.; AGAYN, V. I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 13, n. 10, p. 425–430, 1994.

WATANABE, N. et al. Structure of an orthorhombic form of xylanase II from *Trichoderma reesei* and analysis of thermal displacement. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 62, n. 7, p. 784–792, 2006.

WOLF, L. D. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooliômeros.** 2011. 147f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

CAPÍTULO 6: EFEITO DO CÁLCIO E XILOOLIGOSACARÍDEOS NA ATIVIDADE DA ISOMERIZAÇÃO DE XILOSE \rightleftharpoons XILULOSE CATALISADA POR XILOSE ISOMERASE

6.1 Introdução

A xilose isomerase (XI) é uma enzima industrialmente importante, responsável pela isomerização reversível de xilose em xilulose. A enzima possui uma estrutura delicada de aproximadamente 173 kDa, distribuídos em 4 subunidades idênticas de aproximadamente 47 kDa cada (JÄNIS et al., 2008). Íons bivalentes como Mg^{2+} , Mn^{2+} e Co^{2+} atuam como cofatores importantes da enzima, sendo alguns deles componentes essenciais no meio reacional. No entanto, os íons Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Ni^{2+} são relatados como inibidores da atividade de XI (BHOSALE; RAO; DESHPANDE, 1996).

A enzima também catalisa a isomerização da glicose a frutose, que é utilizada para a produção de xarope de milho rico em frutose, fazendo da XI uma das enzimas com os maiores mercados da indústria alimentícia (BHOSALE; RAO; DESHPANDE, 1996; MOSIER; LADISCH, 2008). No entanto, a aplicação da XI não é restrita à indústria alimentícia. Silva et al. (2012) utilizaram a XI como componente de um biocatalisador para a produção de etanol. Em consonância com esta aplicação, uma melhoria deste biocatalisador foi desenvolvida e aplicada pelo grupo de pesquisa LABENZ do Departamento de Engenharia Química da UFSCar. A sua aplicação no processo de Hidrólise, Isomerização e Fermentação Simultânea (SHIF) visa a produção de bioetanol 2G. Esse processo multienzimático emprega um biocatalisador composto por xilanases, xilose isomerase (XI) e levedura co-imobilizada em gel de alginato de cálcio, utilizando como matéria-prima os xilooligômeros obtidos a partir do pré-tratamento da biomassa. Uma vez dentro do biocatalisador, os xilooligômeros são hidrolisados em pequenos xilooligossacarídeos (XOS) e eventualmente em xilose pela ação de um complexo xilanolítico (xilanases). Em seguida, a xilose gerada é isomerizada em xilulose pela enzima xilose isomerase, e depois convertida em etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Os ensaios publicados por Milessi-Esteves et al. (2019) mostraram a capacidade desse processo para a produção de etanol. No entanto, um obstáculo surgiu quando após 4 horas de reação SHIF (xilana faixa 73 g.L⁻¹, 5% m.v⁻¹ xilanase, 15% m.v⁻¹ XI e 10% m.v⁻¹ S.

cerevisiae, 150 rpm e 32 °C) houve estagnação da produção de etanol, não havendo alteração das concentrações de xilose e xilobiose (X_2) nas horas seguintes.

Considerando a complexidade do processo *SHIF*, algumas possíveis explicações para a interrupção da produção de etanol foram levantadas. Uma das hipóteses reside na etapa de isomerização, onde é possível uma redução da atividade de XI causada pelos efeitos inibitórios dos íons cálcio. Íons bivalentes são frequentemente listados na literatura como inibidores da atividade XI (BHOSALE; RAO; DESHPANDE, 1996; KOVALEVSKY et al., 2010), embora seu mecanismo de inibição careça de explicação mais aprofundada. A presença de Ca^{2+} no meio reacional *SHIF* não pode ser ignorada. Se, por um lado, os íons Ca^{2+} em solução agem como inibidores de XI; por outro, ele é necessário como um dos micronutrientes da levedura e para manutenção da integridade do gel de alginato de cálcio que envolve enzimas e levedura. Além da suplementação do meio reacional, o cálcio também é incluído no interior do biocatalisador como carbonato de cálcio (4 g.L^{-1}) para atuar como controlador de pH (MILESSI et al., 2018). Assim, considerando a presença inevitável de Ca^{2+} no sistema de reação *SHIF*, a inibição causada pelo Ca^{2+} foi investigada na atividade XI solúvel. Quando se utiliza xilose como substrato (processo *SIF*), a concentração inicial de Ca^{2+} no meio não parece afetar a isomerização, pois ocorre total conversão da xilose (SILVA et al., 2012; MILESSI et al., 2018). Contudo, a etapa de hidrólise pode estar requerendo uma maior liberação desse íon, tanto pela hidrólise em si, quanto pela possível liberação de ácido acético. Milesi-Esteves et al. (2019) verificaram que ocorre redução da velocidade com que a reação de isomerização de frutose \rightleftharpoons glicose ocorre na presença de Ca^{2+} (60 °C, pH 7,0), sendo a queda mais significativa com aumento da concentração do íon. Contudo, a reação de maior interesse é a isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose. Portanto, é de suma importância estudar o efeito do aumento da concentração desse íon na velocidade de isomerização de xilose a xilulose, nas condições de operação do processo *SHIF*.

A xilose é o principal bloco de construção de cadeia polimérica de xilana. Esse abundante açúcar, presente em hemiceluloses, pode ser diretamente fermentado a etanol por alguns microrganismos que conseguem assimilar pentoses (OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008). Contudo, o microrganismo tradicionalmente utilizado na indústria do etanol de primeira geração, *Sacharomyces cerevisiae*, não consome xilose, apenas seu isômero xilulose. A utilização de xilose para produção de etanol por essa levedura requer então primeiro sua isomerização (MILESSI et al., 2018). A xilose também é um precursor para a síntese de compostos químicos como xilitol (VENKATESWAR RAO et al., 2016) e ácidos orgânicos (ácido succínico) (LIU et al., 2013), que são produtos de valor agregado na indústria bioquímica. No contexto da *SHIF*, a xilose é o produto final das reações de hidrólise dos xilooligômeros presentes na fração líquida biomassa pré-tratada (MILESSI-ESTEVEES et al., 2019). Na medida em que as cadeias são hidrolisadas pelas enzimas endoxilanasas,

pequenos xilooligossacarídeos (contendo 2–7 unidades de xilose, X_2 - X_7) são formados, sendo aos poucos hidrolisados até xilose pela ação combinada de xilanases e β -xilosidase (BAJPAI, 2014b).

O acúmulo de XOS ao longo das reações de hidrólise pode levar à inibição de endoxilanases, sendo portanto vital a presença da enzima β -xilosidase para hidrolisar esses produtos, removendo a causa da inibição e aumentando a eficiência de hidrólise da xilana (POLIZELI et al., 2005; SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997). Nos ensaios da *SHIF* de bétula (5% m.m⁻¹ xilanase, 15% m.m⁻¹ XI e 10% m.m⁻¹ de levedura, 150 rpm e 32 °C e pH 5,7), Milesi (2017) observou o aumento da concentração de xilobiose ao longo das reações, alcançando 8 g.L⁻¹ após 8 horas. A elevada concentração de XOS no meio, em especial X_2 , pode estar afetando a atividade catalítica da XI no interior do biocatalisador. Não existem trabalhos na literatura descrevendo a inibição causada por XOS sobre a atividade de xilose isomerase, uma vez que essa é uma circunstância específica do processo que está sendo aqui estudado. Decidiu-se, assim, também investigar esta segunda hipótese nesta etapa do trabalho, estudando-se o efeito da presença de XOS no meio reacional sobre a atividade de isomerização catalisada por XI.

Inicialmente, foi realizado um estudo cinético comparativo das reações de isomerização de frutose \rightleftharpoons glicose e de xilose \rightleftharpoons xilulose, obtendo-se as velocidades iniciais das duas reações na presença de diferentes concentrações iniciais de substrato e de íons Ca^{2+} . Em um segundo momento, foi estudada a influência de XOS (essencialmente X_2) sobre a velocidade de isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose a 35 °C. Finalmente, as cinéticas de isomerização nas condições de *SHIF* (35 °C, pH 5,6) sem aditivos (reação controle), na presença de Ca^{2+} e XOS isolados bem como o efeito combinado de Ca^{2+} + XOS foram estudadas a fim de estudar os efeitos da presença destes sobre os parâmetros cinéticos da reação.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Material

A xilose isomerase (EC 5.3.1.5, D-xilose cetol isomerase) produzida por *Streptomyces rubiginosus*, comercialmente disponível como GENSWEET SGI foi fornecida pela Dupont/Genencor International (Palo Alto, EUA), contendo 419 mg_{proteína}.mL⁻¹ com atividade de 4524 \pm 247 UI.mL⁻¹ (medida em frutose 2 mol.L⁻¹, pH 7,0, 60 °C) e 11498 \pm 489 UI.mL⁻¹ (xilose 2 mol.L⁻¹, pH 7,0, 60 °C). A xilanase NS22036 com atividade de 7696 UI.mL⁻¹ (pH 5,6, 50 °C) foi da Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). Frutose, cloreto de cálcio dihidratado, cloreto de cobalto hexahidratdo, cloreto de magnésio hexahidratdo, etanol anidro

e o ácido sulfúrico foram da Synth (Diadema, Brasil). A xilose era da Vetec (Duque de Caxias, Brasil). Xilana de madeira de faia, carbazol e cloridrato de L-cisteína monohidratada foram da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Xilobiose, xilotriose, xilotetraose, xilopentose e xilohexose utilizados como padrão para análise por HPLC foram do Megazymes International Group (Bray, Irlanda). O kit enzimático GOD-PAD (glicose-oxidase/peroxidase) foi adquirido da Gold Analisa (Belo Horizonte, Brasil). Todos os outros reagentes químicos eram de grau analítico.

6.2.2 Métodos

Preparo de solução rica em xilobiose

A solução rica em XOS foi preparada de acordo com Milessi, (2017). Oito gramas de xilana de madeira de faia foram dissolvidos em tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 5,6 e mantidos sob agitação mecânica suave a 50 °C por 2 horas. Após centrifugação (10414 xg, 20 min a 25 °C), o sobrenadante foi recuperado e então filtrado sob vácuo (diâmetro de poro de 12 µm). A hidrólise de xilana foi realizada pela xilanase solúvel NS22036 (150 UI.mL⁻¹ xilana⁻¹) a 50 °C por 24 horas sob agitação mecânica suave. No final da reação, a solução foi mantida a 94 °C durante 5 minutos para inativação térmica da enzima e armazenada a 4 °C para uso posterior. As concentrações de XOS foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo quantificados 1,4 g.L⁻¹ de xilose, 14 g.L⁻¹ de xilobiose, 0,7 g.L⁻¹ de xilotriose, 0,3 g.L⁻¹ de xilotetraose; não havendo xilopentose e xilohexose na solução. Para todos os efeitos, neste trabalho a solução de XOS foi considerada como contendo apenas xilobiose, sendo os demais XOS presentes considerados desprezíveis (devido às baixas concentrações iniciais e após a diluição com os substratos).

Estudo cinético das reações de isomerização

As cinéticas de isomerização de frutose \rightleftharpoons glicose e xilose \rightleftharpoons xilulose foram avaliadas pelo método das velocidades iniciais. Os ensaios foram realizados variando-se a temperatura e concentração de substrato. Em todos os experimentos, os produtos da reação foram quantificados colorimetricamente utilizando o kit enzimático GOD-PAP para quantificação da glicose e o método cisteína-carbazol para a xilulose (DISCHE; BORENFREUND, 1951). Todos os experimentos foram realizados ao menos em triplicata.

Efeito da concentração de substrato

O efeito da concentração de substrato foi avaliado em reações de isomerização de frutose \rightleftharpoons glicose e xilose \rightleftharpoons xilulose. As velocidades iniciais de isomerização foram tomadas em concentrações de substrato entre 0,1 – 3,0 mol.L⁻¹ (18 - 540 g_{frutose}.L⁻¹, 15 – 300 g_{xilose}.L⁻¹), preparado em pH 7,0 (tampão tris-maleato 50 mmol.L⁻¹, contendo MgCl₂.6H₂O 50 mmol.L⁻¹ e CoCl₂.6H₂O 2,5 mmol.L⁻¹) nas temperaturas de 35 e 60 °C. No caso das reações utilizando xilose como substrato, as medidas também foram realizadas nas condições de SHIF (tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 5,6 + MgCl₂.6H₂O 50 mmol.L⁻¹ + CoCl₂.6H₂O 2,5 mmol.L⁻¹, 35°C).

Influência de íons Ca²⁺ sobre a isomerização de frutose \rightleftharpoons glicose e xilose \rightleftharpoons xilulose

Para o estudo da influência dos íons Ca²⁺ nas reações de isomerização, os substratos frutose e glicose foram preparados conforme descrito no item contendo 2-16 g.L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O. As velocidades iniciais de reação foram tomadas nas temperaturas de 35 e 60 °C.

Influência de xilobiose sobre a isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose

A influência da xilobiose (1,6 – 9,1 g.L⁻¹) sobre as velocidades de isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose foi estudada na temperatura de 35 °C. A solução xilobiose (XOS) preparada anteriormente foi diluída no tampão de atividade correspondente a cada condição estudada (tampão tris-maleato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 ou citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 5,6, ambos contendo MgCl₂.6H₂O 50 mmol.L⁻¹ e CoCl₂.6H₂O 2,5 mmol.L⁻¹). Os substratos foram então preparados adicionando-se xilose nas concentrações 0,1 – 2,0 mol.L⁻¹ (15 – 300 g.L⁻¹), levando-se em consideração a concentração de xilose advinda do licor.

Efeito combinado de íons Ca²⁺, xilobiose e pH sobre a isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose

O efeito combinado da presença de íons Ca²⁺ (4 g.L⁻¹) e X₂ (4 g.L⁻¹) em pH 5,6 foi avaliado em reações de isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose a 35 °C, variando-se a concentração de substrato entre 0,1 – 2,0 mol.L⁻¹ (15 – 300 g.L⁻¹).

6.2.3 Métodos analíticos

Medida da atividade de xilose isomerase

A atividade de isomerização foi avaliada utilizando-se duas metodologias diferentes, de acordo com o substrato da reação estudada. A reação de isomerização de frutose \rightleftharpoons glicose, o substrato (frutose) foi preparado a 2 mol.L⁻¹ em tampão tris-maleato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 contendo MgCl₂.6H₂O 50 mmol.L⁻¹ e CoCl₂.6H₂O 2,5 mmol.L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição da enzima convenientemente diluída em 5 mL de solução de frutose a 60 °C. Em intervalos regulares, amostras de 100 µL foram retiradas e transferidas para microtubos contendo 100 µl de HCl 1 mol.L⁻¹ (para inativar a enzima). A concentração de glicose foi determinada colorimetricamente empregando o kit enzimático GOD-PAP. Uma unidade de atividade (UI) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de glicose por minuto nas condições do ensaio (LADISCH; EMERY; RODWELL, 1977).

Para a medida de atividade de isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose, o substrato de xilose a 2 mol.L⁻¹ em tampão tris-maleato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 contendo MgCl₂.6H₂O 50 mmol.L⁻¹ e CoCl₂.6H₂O 2,5 mmol.L⁻¹, seguindo o mesmo procedimento de reação descrito acima. A quantificação da xilulose liberada foi realizada pelo método da cisteína-carbazol (DISCHE; BORENFREUND, 1951).

Determinação da concentração de proteínas totais

A quantificação das proteínas totais foi realizada pelo método proposto por Bradford (1976). A albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como padrão de calibração.

Ajuste dos modelos e estimativa de parâmetros cinéticos

Os seguintes modelos cinéticos foram ajustados aos dados experimentais de velocidades iniciais: Michaelis-Menten clássico (MM), MM com inibição competitiva, incompetitiva e mista (Equações 6.1 - 6.4, respectivamente). O ajuste das equações e a estimativa dos parâmetros foram realizados utilizando o software OriginPro 9[®] (Northampton, EUA), utilizando um algoritmo de interação não-linear pelo modelo de Levenberg Marquadt.

$$V = \frac{V_{M\acute{a}x} \times C_S}{K_M + C_S} \quad (6.1)$$

$$V = \frac{V_{M\acute{a}x} \times C_S}{(\alpha \times K_M) + C_S}; \alpha = 1 + \frac{C_I}{K_I} \quad (6.2)$$

$$V = \frac{V_{M\acute{a}x} \times C_S}{K_M + (\alpha' \times C_S)}; \alpha' = 1 + \frac{C_I}{K_I} \quad (6.3)$$

$$V = \frac{V_{M\acute{a}x} \times C_S}{(\beta \times K_M) + (\beta' \times C_S)}; \beta = 1 + \frac{C_{I,1}}{K_{I,1}} \text{ e } \beta' = 1 + \frac{C_{I,2}}{K_{I,2}} \quad (6.4)$$

onde: V: velocidade de formao de glicose ou xilulose (g.L⁻¹.min⁻¹);

V_{Max}: velocidade máxima de formao do produto (g.L⁻¹.min⁻¹);

K_M:  a constante de Michaelis-Menten (g.L⁻¹);

K_i: constante de inibio (g.L⁻¹).

Quantificao de XOS

A concentrao de XOS foi determinada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O cromatógrafo Waters e2695 foi equipado com a coluna Sugar-Pak I (300 x 6,5 mm) (Waters, Milford, EUA) a 80 C, ligada a um detector de ndice de refrao (RID). gua ultrapura foi usada como fase móvel, eluindo em um fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. As amostras foram filtradas previamente em membranas PVDF de 0,2 m.

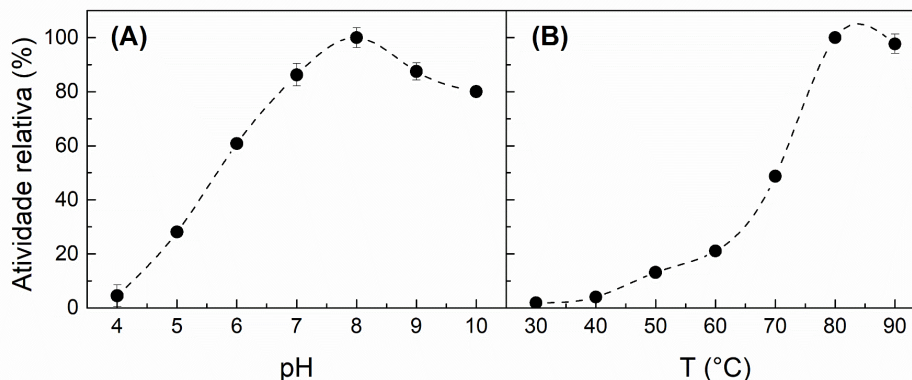
6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Influência do pH e da temperatura sobre a atividade da xilose isomerase

As atividades da XI solúvel foram determinadas em diferentes pHs (4,0 – 10,0) e temperaturas (30 – 90 C). Os resultados estão apresentados na Figura 6.1. Observa-se que a máxima atividade catalítica foi observada em pH 8,0 e temperatura de 85 C. Os valores de máxima atividade encontrados estão de acordo com os observados por Silva (2013) para a XI de *Streptomyces rubiginosus*, medidos com frutose como substrato. A máxima atividade em temperaturas elevadas é interessante do ponto de vista industrial, sendo explorado em processos industriais que empregam a XI imobilizada (MOSIER; LADISCH, 2008). A 60 C e pH 5,0, XI apresenta 19% da atividade observada no pH de máxima 8,0. Pode-se, portanto, prever que a combinao das variáveis temperatura e pH resultará em efeitos ainda mais negativos sobre a atividade em condioes de SHIF. Todavia, as baixas velocidades

apresentadas no pH e temperatura de *SHIF* já foram contornadas por Silva et al. (2012), através do uso da XI imobilizada com alta carga enzimática, possibilitando alcançar atividades enzimáticas adequadas.

Figura 6.1. (A) Atividade relativa da xilose isomerase solúvel em função do pH (T: 60 °C). Condições: xilose 2 mol.L⁻¹ (300,3 g.L⁻¹) preparada nos tampões 50 mmol.L⁻¹ citrato de sódio (pH 4,0 e 5,0), tris-maleato (pH 6,0, 7,0 e 8,0) e carbonato-bicarbonato de sódio (pH 9,0 e 10,0), contendo MgCl₂.6H₂O 50 mmol.L⁻¹ e CoCl₂.6H₂O 2,5 mmol.L⁻¹. (B) Efeito da temperatura sobre a atividade catalítica da XI solúvel. Atividades determinadas em função das velocidades iniciais de isomerização de xilose ⇌ xilulose. Condições: xilose 2 mol.L⁻¹ (300,3 g.L⁻¹) preparada em tampão tris-maleato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 contendo MgCl₂.6H₂O 50 mmol.L⁻¹ e CoCl₂.6H₂O 2,5 mmol.L⁻¹. Barras de erro: desvio padrão das triplicatas.

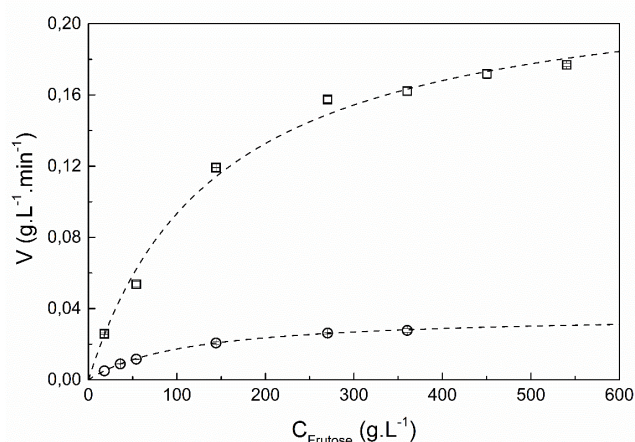


6.3.2 Efeito do Ca²⁺ na reação de isomerização de frutose ⇌ glicose

O efeito do Ca²⁺ foi verificado medindo-se as velocidades iniciais de isomerização de frutose em glicose a 35 e 60 °C catalisada por XI solúvel. A temperatura mais baixa é correspondente à utilizada nos experimentos *SHIF*, enquanto a maior permite a comparação com os dados apresentados na literatura. Para cada grupo de ensaios individuais, as concentrações de Ca²⁺ foram mantidas fixas enquanto a concentração inicial de substrato (glicose) variou de 18 a 540 g.L⁻¹ (0,1 – 3 M). XI foi diluída 100x (4,0 mg_{proteína}.mL⁻¹, 115 UI.mL⁻¹, 23,0 UI.mL_{reator}⁻¹) no tampão de atividade a fim de respeitar a hipótese de C_S >>> C_{Enz}, presente no modelo cinético de Michaelis-Menten (SCHULZ, 1994).

Como visto na Figura 6.2, o modelo cinético de Michaelis-Menten ajustou-se adequadamente os dados experimentais para cada temperatura. A 35 °C, a V_{Máx} estimada foi de 0,04 ± 0,00 g.L⁻¹.min⁻¹ e K_M de 113,80 ± 5,81 g.L⁻¹ com R² de 0,997. Para a reação realizada a 60 °C, a V_{Máx} estimada foi de 0,23 ± 0,01 g.L⁻¹.min⁻¹ e K_M de 145,09 ± 11,07 g.L⁻¹ com R² de 0,997. A velocidade máxima a 60 °C foi maior que a 35 °C, seguindo o comportamento esperado previsto pela teoria cinética de Arrhenius.

Figura 6.2. Ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten para a reação de isomerização de frutose \rightleftharpoons glicose, catalisada por xilose isomerase a (○) 35 e (□) 60 °C. Intervalo S₀: 18 – 540 g.L⁻¹, tampão tris-maleato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 contendo MgCl₂.6H₂O 50 mmol.L⁻¹ e CoCl₂.6H₂O 2,5 mmol.L⁻¹. Barras de erro: desvio padrão das triplicatas.



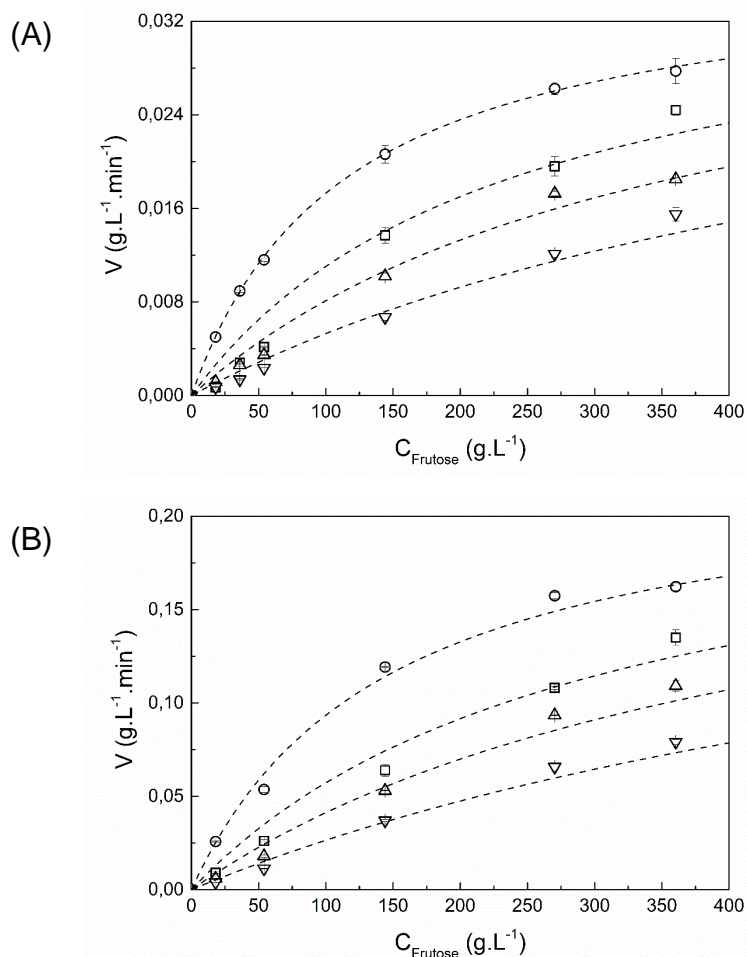
A Tabela 6.1 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos $V_{M\acute{a}x}$ e K_M , obtidos no ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten às velocidades iniciais de isomerização na presença de diferentes concentrações dos substratos frutose e xilose. As discrepâncias entre os resultados obtidos nesse trabalho e os da literatura podem ser explicadas pelas diferentes condições reacionais utilizadas em cada ensaio. Nos vários trabalhos reportados são utilizadas diferentes temperaturas, faixa de concentração de substrato, pH, concentração e tipo de cofatores.

A adição de cálcio ao meio reacional resultou em redução das velocidades de isomerização a 35 e 60 °C, seguindo o comportamento observado por Milessi-Esteves et al. (2019). Conforme observado na Figura 6.3, a redução das velocidades foi mais severa em maiores concentrações de Ca^{2+} . Para os ensaios realizados com adição de cálcio ao meio reacional, o modelo de inibição competitiva, mantendo-se fixos os valores obtidos no ajuste anterior (sem adição de cálcio), representou bem os dados experimentais obtidos. Para os valores de $V_{M\acute{a}x}$ e K_M reportados acima (sem a presença de inibidores), a 35 °C, o K_i estimado foi de $1,88 \pm 0,1$ g.L⁻¹ e $1,87 \pm 0,06$ g.L⁻¹ a 60 °C.

Tabela 6.1. Parâmetros cinéticos da isomerização de frutose \rightleftharpoons glicose e xilose \rightleftharpoons xilulose catalisado por xilose isomerase a 60 °C.

| Substrato | T (°C) | Microranismo de origem | $V_{M\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{catalisador}}^{-1}$) | K_M ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) | Condições reacionais | Referência |
|-----------|--------|--------------------------------------|--|--|--|---|
| Frutose | 60 | <i>Streptomyces phaeochromogenes</i> | $1,9 \times 10^2$ | 0,45 | Tris 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6,85, 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | HOUNG et al. (1993) |
| Frutose | 60 | <i>Streptomyces olivochromogenes</i> | $48,0 \times 10^2$ | 0,20 | Tris-HCl 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,5+ 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl_2 | SUEKANE; TAMURA; TOMIMURA, (1978) |
| Frutose | 60 | <i>Arthrobacter N.R.R.L. B3728</i> | $282,0 \times 10^2$ | 0,25 | Tris-HCl 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8,0 + 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 | SMITH; RANGARAJ AN; HARTLEY, (1991) |
| Xilose | 60 | <i>Streptomyces olivochromogenes</i> | $218,4 \times 10^2$ | 0,033 | Tris-HCl 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,5 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ | SUEKANE; TAMURA; TOMIMURA, (1978) |
| Xilose | 30 | <i>Arthrobacter N.R.R.L. B3728</i> | $121,25 \times 10^2$ | 0,003 | Tris-HCl 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8,0 + 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 | SMITH; RANGARAJ AN; HARTLEY, (1991) |
| Frutose | 60 | | $2,40 \times 10^2$ | 0,81 | Tris-maleato 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ | |
| Xilose | 35 | <i>Streptomyces rubiginosus</i> | $1,31 \times 10^2$ | 0,39 | pH 7,0 + 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 2,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | Este trabalho |
| Xilose | 60 | | $7,21 \times 10^2$ | 0,61 | | |

Figura 6.3. Influência do íon Ca^{2+} (2, 4 e 8 g.L^{-1}) sobre as velocidades iniciais de isomerização de frutose \rightleftharpoons glicose a (A) 35 °C e (B) 60 °C. Intervalo S_0 : 18 – 540 g.L^{-1} , tampão tris-maleato 50 mmol.L^{-1} pH 7,0 contendo $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ 50 mmol.L^{-1} e $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mmol.L^{-1} . Legenda: (○) sem inibidor, Ca^{2+} (□) 2 g.L^{-1} , (△) 4 g.L^{-1} (▽) 8 g.L^{-1} . Barras de erro: desvio padrão das triplicatas.



A alta estereoespecificidade em relação aos substratos de XI já está esclarecida e bem explicada na literatura. A enzima inicia a catálise da isomerização de α -piranose a α -furanose, abrindo a forma cíclica, que é a estrutura ativa do substrato (ASBÓTH; NÁRAY-SZABÓ, 2000; CARRELL et al., 1989; COLLYER; HENRICK; BLOW, 1990). O mecanismo geral de inibição competitiva por moléculas semelhantes ao substrato decorre da semelhança estrutural entre o inibidor e o substrato, a qual permite que o inibidor se ligue ao sítio ativo. Uma vez formado o complexo enzima-inibidor, o desempenho da enzima é comprometido até que o inibidor se dissocie. A inibição competitiva está relacionada à quantidade de inibidor ligado ao sítio ativo. Contudo, em altas concentrações de substrato, embora haja a competição com o substrato, o efeito causado pelo inibidor é pouco significativo devido à grande quantidade de substrato disponível no meio reacional. Embora a presença do inibidor não afete a velocidade máxima de reação, a constante de afinidade aparente (K_M) aumenta linearmente com a concentração do inibidor, refletindo o aumento da concentração de

substrato necessária para atingir a velocidade máxima na presença do inibidor (PELLEY, 2012; COOK; CLELAND, 2007).

A redução aqui observada das velocidades, contudo, foi causada pela presença de íons cálcio no meio reacional, que não é um substrato da enzima. Cálcio e frutose são duas substâncias químicas distintas, sendo a primeira um elemento químico e a segunda um carboidrato. No entanto, o modelo cinético de inibição competitiva foi capaz de descrever adequadamente o fenômeno bioquímico observado. Como descrito por Kovalevsky et al. (2010), para ser totalmente ativa, a XI requer dois íons metálicos em posições específicas no interior do sítio ativo da enzima. O íon Mg^{2+} geralmente ocupa a posição M_1 , ligado aos resíduos Glu217, Glu181, Asp 245, e Asp287; estando então mais próximo à His. A outra posição (M_2) pode ser ocupada por uma variedade de íons bivalentes.

A presença do íon Mg^{2+} na estrutura da enzima é fundamental, pois atua diretamente no mecanismo catalítico da enzima. Uma vez dentro do sítio ativo da enzima, Kovalevsky et al. (2010) descreve o íon Mg^{2+} atuando na abertura do anel e na isomerização do carboidrato. O íon Ca^{2+} em solução é capaz de ocupar a mesma posição M_1 anteriormente ocupada por Mg^{2+} . Embora cálcio e magnésio pertençam à mesma família periódica e em solução apresentem a mesma carga, o Ca^{2+} possui um raio iônico maior[‡], alterando a interação eletrostática “correta” com o substrato, o que acaba afetando a atividade da enzima.

Estando o sítio M_1 ocupado por Ca^{2+} , uma nova espécie de XI estará disponível no meio reacional além da “isomerase de xilose nativa”, (isto é, contendo os sítios M_1 ocupados por Mg^{2+}). As consequências da presença das duas espécies de XI refletem diretamente na velocidade da reação, uma vez que as enzimas que contêm cálcio têm sua atividade catalítica comprometida. Portanto, a competição do cálcio no sítio ativo não ocorre com o substrato, mas com o sítio metálico ocupado pelo Mg^{2+} , que é essencial para a máxima atividade catalítica da enzima. Rangarajan e Hartley (1992) também verificaram a redução de atividade característica de inibição competitiva na isomerização de frutose a glicose por XI de *Arthrobacter*, atribuindo esse mesmo comportamento de competição entre Mg^{2+} e Ca^{2+} pelo(s) mesmo(s) sítio(s) metálico(s) da enzima.

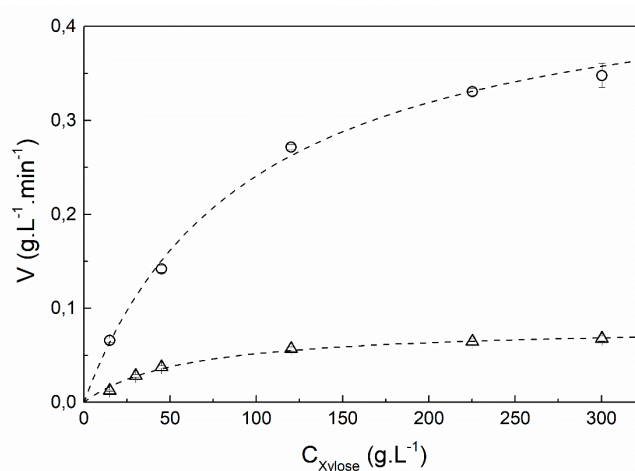
6.3.3 Efeito do íon Ca^{2+} na isomerização da xilose \rightleftharpoons xilulose

Uma vez verificado o efeito inibidor do cálcio na isomerização da frutose em glicose, foram realizados experimentos utilizando xilose, o substrato natural da xilose isomerase. Inicialmente, as reações de isomerização foram realizadas a 35 °C e 60 °C sem a

[‡] Os raios iônicos tabelados do Mg^{2+} e Ca^{2+} são 79 e 106 pm, respectivamente. (ATKINS; JONES, 2006).

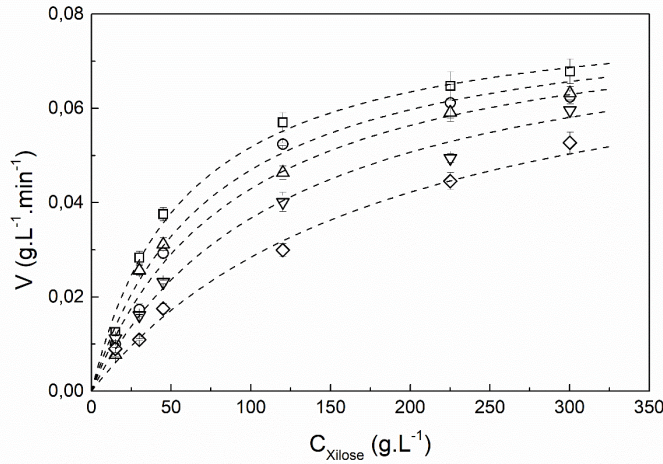
presença de cálcio, a fim se estimarem os parâmetros $V_{M\acute{a}x}$ e K_M . A Figura 6.4 mostra o ajuste do modelo clássico de Michaelis-Menten aos dados experimentais. A 60 °C, a $V_{M\acute{a}x}$ estimada foi de $0,47 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e K_M de $95,87 \pm 4,97 \text{ g.L}^{-1}$. Como esperado, a redução da temperatura para 35 °C reduziu $V_{M\acute{a}x}$ para $0,08 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e K_M para $58,40 \pm 3,49 \text{ g.L}^{-1}$. A comparação entre os K_M estimados com os substratos xilose e frutose confirma a maior afinidade do XI em relação à furanose do que a piranose.

Figura 6.4. Modelo cinético de Michaelis-Menten para reação de isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose a (Δ) 35 e (\circ) 60 °C. Intervalo S_0 : 15 – 300 g.L^{-1} , tampão tris-maleato 50 mmol.L^{-1} pH 7,0 contendo 50 mmol.L^{-1} $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ e 2,5 mmol.L^{-1} $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$. Barras de erro: desvio padrão das triplicatas.



A presença de Ca^{2+} também afetou a velocidade de isomerização da xilose em xilulose, apresentando a característica de inibição competitiva. Como visto na Figura 6.5, o efeito de inibição torna-se mais significativo em concentrações superiores a 8 g.L^{-1} . A constante de inibição estimada (K_i) de $7,17 \pm 0,33 \text{ g.L}^{-1}$ ($V_{M\acute{a}x}$ e K_M foram mantidas as estimadas sem inibidor durante o ajuste global). O modelo foi capaz de descrever a inibição competitiva ($R^2 = 0,980$), podendo-se novamente atribuir a competição entre os íons bivalentes Mg^{2+} e Ca^{2+} pelo sítio M_1 no interior do sítio ativo da enzima (RANGARAJAN; HARTLEY, 1992), conforme discutido anteriormente.

Figura 6.5. Influência do íon Ca^{2+} (2 – 16 g.L^{-1}) nas taxas iniciais de isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose a 35 °C. Intervalo S_0 : 15 – 300 g.L^{-1} , tampão tris-maleato 50 mmol.L^{-1} pH 7,0 contendo 50 mmol.L^{-1} de $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ e 2,5 mmol.L^{-1} de $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$. Legenda: (\square) sem inibidor, Ca^{2+} (\circ) 2 g.L^{-1} , (Δ) 4 g.L^{-1} (∇) 8 g.L^{-1} e (\diamond) 16 g.L^{-1} . Barras de erro: desvio padrão das triplicatas.



A produção de etanol no processo *SHIF* depende diretamente da etapa de isomerização. A concentração de Ca^{2+} presente na matriz do gel de alginato pode ser considerada baixa. Contudo, devido à liberação de íons H^+ nas reações que ocorrem paralelamente, pode estar ocorrendo maior liberação desse íon pela dissociação de CaCO_3 que é adicionado aos grânulos na concentração de 4 g.L^{-1} para evitar queda do pH dentro do microambiente do biocatalisador (MILESSI et al., 2018). A análise dos resultados obtidos permite afirmar que a velocidade de reação de isomerização da xilose à xilulose é reduzida na presença dos íons cálcio, embora os efeitos de inibição não aparentem ser tão severos a ponto de provocar a total parada da reação.

No entanto, vale ressaltar que os ensaios de inibição foram realizados em pH 7,0 (condições padrão de medição de atividade). Conforme relatado por Jänis et al. (2008), em pHs mais baixos há uma redução significativa da atividade catalítica da enzima devido à perda reversível de íons metálicos, dissociação de uma ou mais subunidades enzimáticas e/ou agregação enzimática irreversível. Portanto, é muito provável que a realização da isomerização em pH 5,6 resulte na sinergia dos efeitos do pH e da inibição causada pelo cálcio, afetando ainda mais a velocidade da reação. Foram, assim, realizados experimentos adicionais em pH 5,6 (pH de *SHIF*) para investigar a combinação dessas duas variáveis.

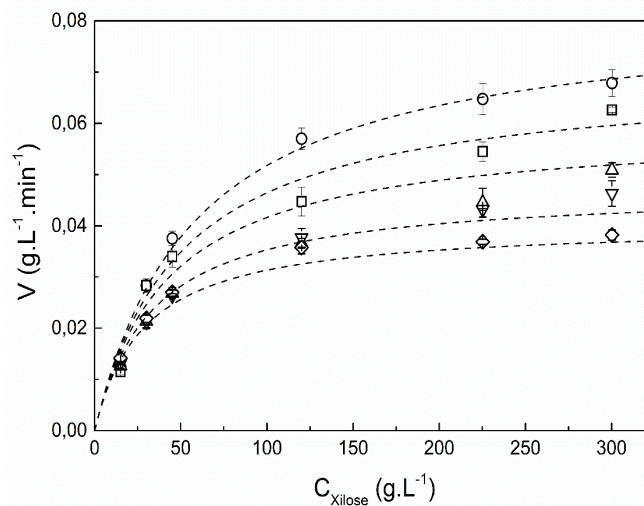
6.3.4 Efeito do XOS na isomerização da xilose \rightleftharpoons xilose

Embora o equilíbrio químico xilose : xilulose seja desfavorável (5,4: 1 a 35 °C), a reação pode ser deslocada através da remoção de xilulose do meio reacional, realizada pela reação de fermentação. Contudo, a baixa velocidade de consumo de xilulose por *S. cerevisiae* deixa o processo vulnerável à contaminação bacteriana do meio reacional, especialmente se a xilose for utilizada como substrato inicial para a produção de bioetanol (SENAC; HAHN-HÄGERDAL, 1990; SILVA et al., 2012). Uma das características do processo *SHIF* é o uso de xilooligômeros, um substrato que não é facilmente metabolizado pelos microrganismos contaminantes (MILESSI-ESTEVES et al., 2019). A utilização de xilooligômeros requer um passo de hidrólise, que é realizado pelo complexo xilanolítico presente no interior do biocatalisador. Uma vez dentro do grânulo de biocatalisador, os xilooligômeros sofrem a ação de várias enzimas que compõem o complexo xilanolítico, como exoxilanase, endoxilanase, β -xilosidase e várias enzimas auxiliares (como glucuronidase, esterases, arabinofuranosidase, etc.) (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016). A despolimerização das cadeias de xilooligômeros ocorre de forma ordenada, com uma redução gradual no tamanho das cadeias, como resultado da ação conjunta das enzimas. No entanto, essa etapa faz surgir no meio reacional moléculas não existentes quando se parte de xilose como substrato (*SIF*), os produtos e/ou subprodutos da hidrólise das cadeias de xilana. Pequenos xilooligossacarídeos como xilobiose (X_2) ou xilotriose (X_3) poderiam estar interagindo com a XI, alterando seu desempenho catalítico.

Foi decidido, então, investigar o efeito da presença de X_2 na velocidade de isomerização de xilose em xilulose, a 35 °C (pH 7,0). Xilobiose, um substrato extremamente caro para ser utilizado em ensaios cinéticos, foi obtido através da hidrólise de xilana com o complexo xilanolítico NS22036, cuja ação gerava principalmente xilobiose, com pequena produção de xilose (Milessi, 2017). Partia-se assim de uma solução concentrada de X_2 , diluída convenientemente para a concentração desejada, e adicionando-se xilose de modo a se obter as desejadas concentrações de substrato. Após as diluições, as concentrações dos outros XOS no meio foram consideradas insignificantes. A adição de X_2 resultou em uma redução da velocidade máxima de reação de isomerização (Figura 6.6), sendo esse efeito mais pronunciado em maiores concentrações de X_2 . Pode-se afirmar, no entanto, que as velocidades nas menores concentrações de substrato foram pouco afetadas. Esse comportamento observado é característico na presença de inibidores incompetitivos (VOET; VOET, 2011), sendo que esse modelo realmente representou adequadamente os dados experimentais ($R^2 = 0,973$), possibilitando estimar um K_i de $8,8 \pm 0,37 \text{ g.L}^{-1}$. Segundo Eun (1996), a inibição incompetitiva é um fenômeno recorrente encontrado em enzimas com dois ou mais substratos. O inibidor liga-se a um local distinto do sítio ativo do substrato e, ao

contrário dos inibidores competitivos, liga-se apenas ao complexo enzima-substrato. Como leva mais tempo para o substrato ou produto deixar o local ativo, a $V_{M\acute{a}x}$ aparente é inferior à $V_{M\acute{a}x}$ intrínseca.

Figura 6.6. Influência da xilobiose (X_2) (1,6, 3,4, 6,5 e 9,1 g.L⁻¹) nas velocidades iniciais de isomerização da xilose \rightleftharpoons xilulose catalisada por XI a 35 °C. Intervalo S_0 : 15 – 300 g.L⁻¹, tampão tris-maleato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 contendo 50 mmol.L⁻¹ de MgCl₂.6H₂O e 2,5 mmol.L⁻¹ CoCl₂.6H₂O. Legenda: (○) sem inibidor, X_2 (□) 1,6 g.L⁻¹, (△) 3,4 g.L⁻¹ (▽) 6,5 g.L⁻¹ e (◇) 9,1 g.L⁻¹. Barras de erro: desvio padrão das triplicatas.



As curvas de velocidade na presença de X_2 mostram que os efeitos inibitórios são mais significativos em concentrações de xilose superiores a 50 g.L⁻¹. Essas concentrações no processo *SHIF* nunca seriam atingidas, pois ocorre isomerização e consumo desta.

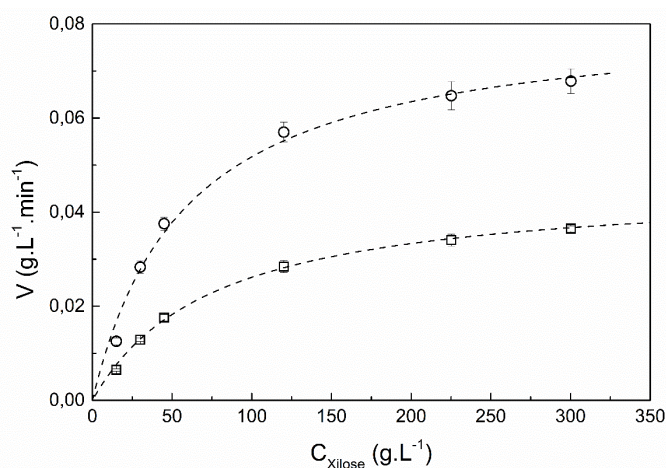
6.3.5 Efeito combinado do pH, íons Ca²⁺ e XOS na isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose

O processo *SHIF* compreende três etapas em série. Idealmente, deve-se buscar uma condição operacional onde a fermentação seja a etapa controladora global da *SHIF*. A temperatura e pH de processo foram escolhidas em função dos máximos catalíticos da levedura: faixas de máximas atividade de pH entre 4,0-5,0 e temperatura entre 30 e 35 °C, dependendo da linhagem (SILVA et al., 2012).

Os efeitos da adição de íons Ca²⁺ e X_2 sobre a atividade de XI foram estudados primeiramente em pH 7,0 a 35 °C. A seguir, então, foram realizados ensaios de isomerização a pH 5,6, 35 °C, para se avaliarem nas condições operacionais de processo os efeitos de pH combinados com os de Ca²⁺ e X_2 . Primeiramente, as velocidades iniciais de isomerização foram determinadas para diferentes concentrações iniciais de substrato, e o modelo cinético de Michaelis-Menten foi ajustado aos dados experimentais, conforme apresentado na Figura

6.7. Pode-se observar que o modelo descreveu adequadamente a reação ($R^2 = 0,993$), podendo-se estimar $V_{M\acute{a}x}$ em $0,05 \text{ g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e K_M $76,02 \text{ g.L}^{-1}$. A redução do pH de 7,0 para 5,6 levou a uma queda de aproximadamente 50% da velocidade máxima com que a reação ocorre, provocando também o aumento do K_M da reação. Esse comportamento era esperado, devido às condioes de operação serem muito abaixo dos pH e temperatura de máxima atividade encontrados e reportados pela literatura (RANGARAJAN; HARTLEY, 1992; SILVA et al., 2012; SMITH; RANGARAJAN; HARTLEY, 1991; SUEKANE; TAMURA; TOMIMURA, 1978).

Figura 6.7. Ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten para reação de isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ em pH (\circ) 7,0 e (\square) 5,6. Intervalo S_0 : $15 - 300 \text{ g.L}^{-1}$, tampão tris-maleato 50 mmol.L^{-1} pH 7,0 contendo $50 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ e $2,5 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$. Barras de erro: desvio padrão das triplicatas.

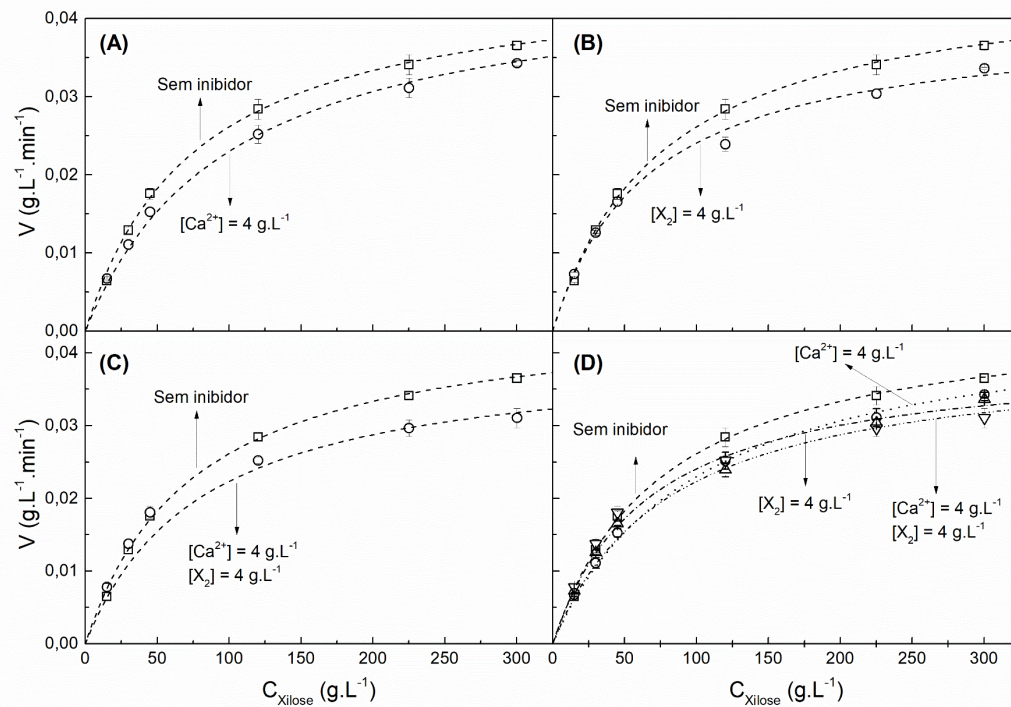


Enzimas são poderosos e eficientes catalisadores biológicos, porém sensíveis quanto ao pH e temperatura de operação. A mudana do pH reacional afeta diretamente o estado de ionização das cadeias laterais dos aminoácidos da enzima, podendo provocar a dissociação das subunidades que compõem a estrutura tridimensional, refletindo em sua atividade catalítica. Em casos mais severos, a alteração do pH leva à completa e irreversível inativação da enzima (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009).

Os resultados obtidos mostraram que a redução do pH e temperatura causou uma queda significativa da atividade da XI em relação às máximas obtidas nas condioes ideais da enzima (ver Seção 6.2.1). Esperava-se, ainda, que a introdução de íons Ca^{2+} e X_2 ao meio reacional agravasse ainda mais a redução de atividade catalítica da enzima. A fim de verificar esses efeitos, foram realizados ensaios de isomerização em pH 5,6 e $35 \text{ }^\circ\text{C}$ em meio dopados apenas com íons Ca^{2+} ou X_2 e, finalmente, contendo ambos inibidores. Os resultados são apresentados na Figura 6.8. A adição de 4 g.L^{-1} de Ca^{2+} ao substrato levou a uma queda da velocidade de isomerização, seguido o mesmo comportamento observado anteriormente. O

modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição competitiva ajustou-se adequadamente aos dados experimentais ($R^2 = 0,987$), com K_i estimado em $12,62 \pm 1,23 \text{ g.L}^{-1}$ (Figura 6.8.A). Os ensaios na presença de X_2 (4 g.L^{-1}) apresentaram a redução da velocidade máxima de reação (Figura 6.8.B), seguindo o comportamento similar aos observados anteriormente em pH 7,0. Novamente, o modelo de inibição incompetitiva foi o que melhor descreveu o comportamento dos dados experimentais ($R^2 = 0,981$), com K_i estimado em $26,39 \pm 3,731 \text{ g.L}^{-1}$.

Figura 6.8. Efeito da adição de íons Ca^{2+} (4 g.L^{-1}) e X_2 (4 g.L^{-1}) sobre a atividade de isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose catalisada pela XI solúvel em pH 5,6 e $T: 35^\circ\text{C}$. Ajuste do modelo de inibição (A) competitiva causada por íons Ca^{2+} , (B) incompetitiva causada por X_2 , (C) inibição mista causada por Ca^{2+} e X_2 . (D) sobreposição das curvas de inibição apresentadas em (A), (B) e (C). Intervalo S_0 : 18-540 g.L^{-1} , tampão citrato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 5,6 contendo 50 mmol.L^{-1} de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.



A presença simultânea de íons Ca^{2+} (4 g.L^{-1}) e X_2 (4 g.L^{-1}) no meio reacional provocou uma queda mais acentuada das velocidades de isomerização, conforme esperado (Figura 6.8.C). Nesse caso, o modelo de inibição mista foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais ($R^2 = 0,971$), onde pode-se atribuir o caráter competitivo aos íons Ca^{2+} e o incompetitivo à X_2 . Os parâmetros K_{i_1} e K_{i_2} foram de $19,18 \pm 3,36 \text{ g.L}^{-1}$ e $28,33 \pm 3,382 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. A sobreposição das curvas de inibição mostra que a combinação dos efeitos do pH e a presença de Ca^{2+} e X_2 a 35°C são mais graves quando combinados do que separadamente, evidenciando o sinergismo entre as variáveis. É importante ressaltar, contudo, que eles são menos severos para baixas concentrações de xilose, a 35°C , condição operacional do processo SHIF.

Os resultados obtidos, assim, permitem afirmar que, embora significativos, os efeitos de inibição não devem ser responsáveis pela estagnação da produção de etanol no processo *SHIF*. A isomerização deve continuar ocorrendo, embora mais lentamente. Assim, o acúmulo de xilose observado por Milessi-Esteves et al, 2019, não pôde ser explicado pela inativação de XI, requerendo continuidade dos estudos das várias etapas do processo, onde os vários biocatalisadores presentes na *SHIF* operem juntos ou separados.

6.4 Conclusão

Foram avaliados os efeitos da presença de íons cálcio e xilobiose sobre a atividade de isomerização catalisada pela enzima xilose isomerase solúvel. Os experimentos realizados com cálcio mostraram uma redução na atividade de isomerização de frutose \rightleftharpoons glicose e xilose \rightleftharpoons xilulose. Para ambos os substratos, o modelo de inibição competitiva foi adequadamente ajustado aos dados experimentais ($R^2 > 0,997$), sendo estimado o K_i de $2,08 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,95 \pm 0,06 \text{ g.L}^{-1}$ a 35 e 60 °C (pH 7,0), respectivamente. A competição real ocorre entre os cofatores metálicos Ca^{2+} e Mg^{2+} presentes no meio reacional. Para a isomerização da frutose \rightleftharpoons glicose, os parâmetros cinéticos foram: a 35 °C (pH 7,0), $V_{\text{Máx}} = 0,04 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e $K_M = 125,51 \pm 5,88 \text{ g.L}^{-1}$ (R^2 de 0,997). Para a reação realizada em pH 7,0 e 60 °C, $V_{\text{Máx}} = 0,22 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e $K_M = 126,36 \pm 10,70 \text{ g.L}^{-1}$ (R^2 de 0,997). A inibição competitiva causada pela presença de íons Ca^{2+} também foi observada nas reações de isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose, sendo o efeito mais severo conforme o aumento da concentração de inibidor. Os parâmetros cinéticos calculados foram: em pH 7,0 e 60 °C, a $V_{\text{Máx}} = 0,47 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e $K_M = 95,87 \pm 4,97 \text{ g.L}^{-1}$. Em pH 7,0 e 35 °C, $V_{\text{Máx}} = 0,08 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e $K_M = 58,40 \pm 3,49 \text{ g.L}^{-1}$. O valor de K_i estimado a 35 °C e pH 7,0 foi de $7,17 \pm 0,33 \text{ g.L}^{-1}$. A presença de xilobiose no meio reacional resultou na redução da taxa máxima de isomerização da xilose em xilulose (35 °C, pH 7,0), sendo este comportamento representado pelo modelo de inibição incompetitiva (K_i de $8,8 \pm 0,37 \text{ g.L}^{-1}$, $R^2 = 0,973$). Embora a inibição de XI pela xilobiose represente um obstáculo, os efeitos inibitórios terão maior influência sobre a velocidade de reação nas concentrações de xilose mais elevadas ($C_S > 50 \text{ g.L}^{-1}$). Devido à natureza dinâmica do *SHIF*, com suas reações ocorrendo sequencialmente e em paralelo, altas concentrações de X_2 são improváveis de serem atingidas até o ponto de inibição. Ensaio realizados em condições de *SHIF* mostraram a sinergia entre os efeitos inibitórios e variáveis operacionais (pH 5,6 35 °C), sendo a queda de velocidade agravada na presença de íons Ca^{2+} (4g.L^{-1}) e X_2 (4g.L^{-1}). Os resultados obtidos indicam que, embora significativos, os efeitos de inibição causados por Ca^{2+} e X_2 não são responsáveis pela estagnação da produção de etanol no processo *SHIF* e que esse processo requer continuidade dos estudos para se obter completa conversão de xilooligômeros em etanol.

6.5 Referências

- ASBÓTH, B.; NÁRAY-SZABÓ, G. Mechanism of action of D-xylose isomerase. **Current protein & peptide science**, v. 1, n. 3, p. 237–54, 2000.
- ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química**: questionando a vida moderna e o meio ambiente. 3. ed. Porto Alegre: BOOKMAN COMPANHIA ED, 2006.
- BAJPAI, P. Microbial Xylanolytic Systems and Their Properties. In: _____. **Xylanolytic Enzymes**. Amsterdam: Academic Press, 2014b. p. 19–36.
- BHOSALE, S. H.; RAO, M. B.; DESHPANDE, V. V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 2, p. 280–300, 1996.
- BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, 2016.
- 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.
- CARRELL, H. L. et al. X-ray analysis of D-xylose isomerase at 1.9 Å: native enzyme in complex with substrate and with a mechanism-designed inactivator. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 12, p. 4440–4, 1989.
- COLLYER, C. A.; HENRICK, K.; BLOW, D. M. Mechanism for aldose-ketose interconversion by D-xylose isomerase involving ring opening followed by a 1,2-hydride shift. **Journal of molecular biology**, v. 212, n. 1, p. 211–35, 1990.
- COOK, P. F.; CLELAND, W. W. **Enzyme kinetics and mechanism**. London, Garland Science, 2007. 416 p.
- DISCHE, Z.; BORENFREUND, E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. **The Journal of biological chemistry**, v. 192, n. 2, p. 583–7, 1951.
- EUN, H.-M. Enzymes and Nucleic Acids. In: **Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology**. Cambridge: Academic Press, 1996. p. 1–108.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6–7, p. 405–418, 2009.
- GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C.; COONEY, C. L. A study on intra-particle diffusion effects in enzymatic reactions: glucose-fructose isomerization. **Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 2, p. 0159–0166, 2000.
- HOUNG, J.-Y. et al. Analysis of substrate protection of an immobilized glucose isomerase reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, n. 4, p. 451–458, 1993.
- JÄNIS, J. et al. Characterization of the pH-dependent dissociation of a multimeric metalloprotein *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase by ESI FT-ICR mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 10, p. 1376–1380, 2008.

- KOVALEVSKY, A. Y. et al. Metal Ion Roles and the Movement of Hydrogen during Reaction Catalyzed by D-Xylose Isomerase: A Joint X-Ray and Neutron Diffraction Study. **Structure**, v. 18, n. 6, p. 688–699, 2010.
- LADISCH, M. R.; EMERY, A.; RODWELL, V. W. Economic Implications of Purification of Glucose Isomerase prior to Immobilization. **Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development**, v. 16, n. 3, p. 309–313, 1977.
- LIU, R. et al. Efficient succinic acid production from lignocellulosic biomass by simultaneous utilization of glucose and xylose in engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 84–91, 2013.
- MILESSI-ESTEVEZ, T. et al. An Innovative Biocatalyst for Continuous 2G Ethanol Production from Xylo-Oligomers by *Saccharomyces cerevisiae* through Simultaneous Hydrolysis, Isomerization, and Fermentation (SHIF). **Catalysts**, v. 9, n. 3, p. 225, 2019.
- MILESSI, T. S. et al. Influence of key variables on the simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose by a native *Saccharomyces cerevisiae* strain co-encapsulated with xylose isomerase for 2G ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 277–283, 2018.
- MILESSI, T. S. S. **Produção de etanol 2g a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente modificadas imobilizadas**. 2017. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.
- MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. Bioproducts and Biofuels. In: MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. (Eds.). **Modern Biotechnology**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2008. p. 49–72.
- OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n. 1, p. 7, 2008.
- PELLEY, J. W. Enzymes and Energetics. In: _____. **Elsevier's Integrated Review Biochemistry**. 2. Ed. Maryland Heights: Mosby, 2012. p. 29–37.
- POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.
- RANGARAJAN, M.; HARTLEY, B. S. Mechanism of D-fructose isomerization by *Arthrobacter* D-xylose isomerase. **The Biochemical journal**, v. 283 (Pt 1), p. 223–33, 1992.
- SCHULZ, A. R. **Enzyme Kinetics**. From Diastase to Multi-enzyme System. New York: Cambridge University Press, 1994. 260 p.
- SENAC, T.; HAHN-HÄGERDAL, B. Intermediary Metabolite Concentrations in Xylulose- and Glucose-Fermenting *Saccharomyces cerevisiae* Cells. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 1, p. 120–6, 1990.
- SILVA, C. R. et al. An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor. **Enzyme and microbial technology**, v. 50, n. 1, p. 35–42, 2012.

SILVA, C. R. **Produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana usando glicose isomerase coimobilizada com *Saccharomyces cerevisiae***. 2013. 138 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

SLININGER, P. J. et al. Stoichiometry and Kinetics of Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 589, n. 1 Biochemical E, p. 25–40, 1990.

SMITH, C. A.; RANGARAJAN, M.; HARTLEY, B. S. D-Xylose (D-glucose) isomerase from *Arthrobacter* strain N.R.R.L. B3728. Purification and properties. **The Biochemical journal**, v. 277 (Pt 1), p. 255–61, 1991.

SUEKANE, M.; TAMURA, M.; TOMIMURA, C. Physico-chemical and Enzymatic Properties of Purified Glucose Isomerases from *Streptomyces olivochromogenes* and *Bacillus stearothermophilus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, n. 5, p. 909–917, 1978.

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

VENKATESWAR RAO, L. et al. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 299–310, 2016.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 4. Ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2011. 1428 p.

CAPÍTULO 7: ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE XILOSE E XILOOLIGÔMEROS USANDO XILANASES, XILOSE ISOMERASE E LEVEDURA CO-IMOBILIZADAS

7.1 Introdução

No cenário mundial, o Brasil se destaca pelo considerável progresso feito na substituição de combustíveis fósseis pelo bioetanol renovável da cana-de-açúcar, fonte de energia limpa e sustentável (GÍRIO et al., 2010). Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de etanol de a partir de cana-de-açúcar. Na safra de 2018/19, 8,63 milhões de hectares foram cultivados, sendo colhidos 615,84 milhões de toneladas de cana-de-açúcar.

O bagaço da cana é um sub-produto da produção de etanol e de açúcar que é usado principalmente como um insumo para a produção de bioeletricidade e de bioetanol 2G (CERQUEIRA LEITE et al., 2009). Segundo Carpio e Souza (2017), a produção de etanol de segunda geração é uma alternativa estratégica para aumentar a produção de etanol com vantagens ambientais e econômicas. Nesse sentido, há atualmente grande interesse em desenvolver tecnologias para a obtenção de etanol de segunda geração a partir da conversão de celulose e hemicelulose do bagaço.

O bagaço tem em sua composição 38-45% de celulose (polímero de glicose), 22-27% de hemicelulose (heteropolímero contendo principalmente xilana, um polímero xilose), 19-32% de lignina (polímero fenilpropano) e cinzas e extrativos remanescentes; que podem variar de acordo com as condições climáticas, técnicas de cultivo, variedade da cana e o uso de fertilizantes (CANILHA et al., 2012; GÍRIO et al., 2010). Após uma etapa de hidrólise, os açúcares fermentescíveis liberados da celulose e hemicelulose (majoritariamente glicose e xilose, respectivamente) podem ser bioconvertidos em etanol pela ação de microrganismos capazes de fermentá-los.

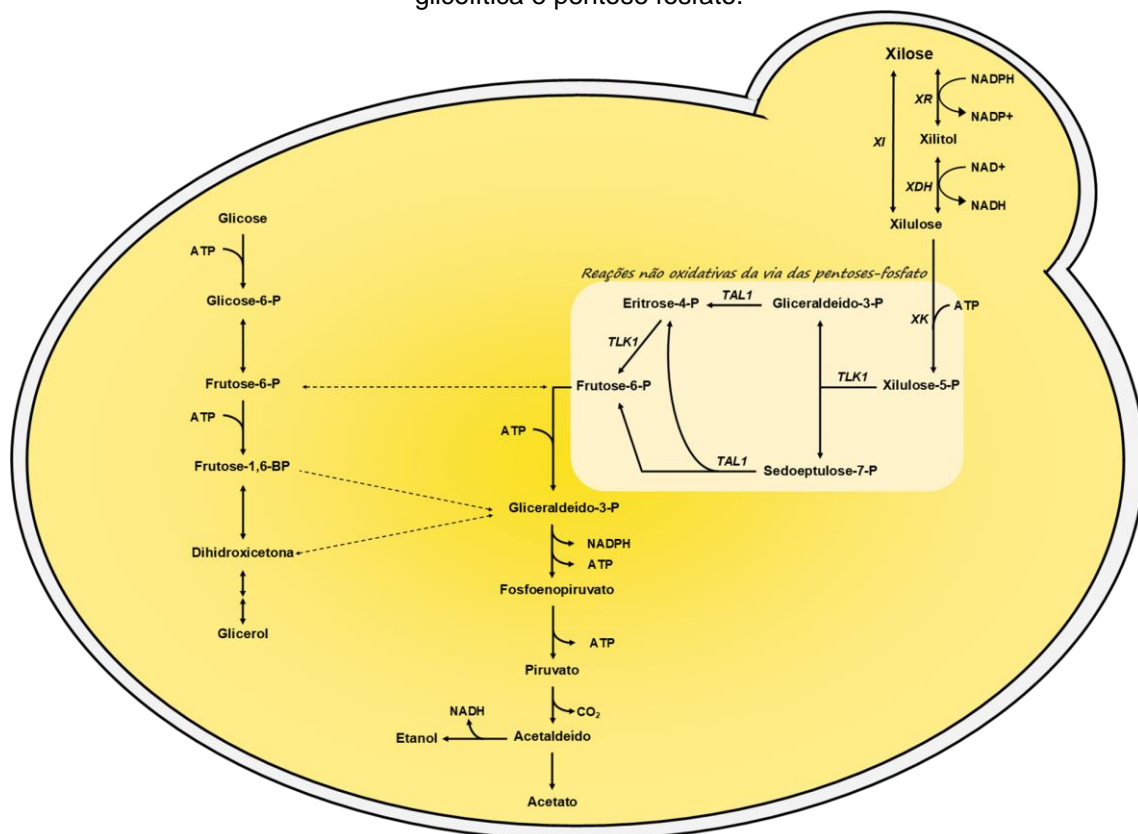
A fermentação alcoólica de glicose pode ser considerada como estabelecida e otimizada, utilizando cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* adaptadas ao ambiente industrial, apresentando alta taxa de fermentação, rendimento superior de etanol, elevada tolerância ao etanol, aos inibidores e a altas concentrações de açúcar no meio reacional (ZHANG et al., 2010). Contudo, a forma selvagem de *S. cerevisiae* é incapaz de metabolizar eficientemente a D-xilose, que é o principal componente da fração hemicelulósica do pré-

tratamento da biomassa lignocelulósica (MANZANARES, 2010), razão pela qual a fermentação de pentoses por esse microrganismo ainda é um desafio a ser superado.

Estudos disponíveis na literatura relatam o uso industrial de microrganismos capazes de fermentar pentoses em etanol como *Scheffersomyces stipitis* e *Pachysolen tannophilus* (DOS SANTOS et al., 2016; HAHN-HÄGERDAL et al., 1994). Entretanto, a aplicação desses microrganismos é limitada devido à baixa tolerância ao etanol, baixas velocidades de fermentação, inibição por produtos formados durante o pré-tratamento e a necessidade de um controle rigoroso do oxigênio no meio reacional (OOLFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008).

A xilose para ser transformada em etanol segue por um caminho muito mais longo comparado ao metabolismo fermentativo da glicose, envolvendo diversas enzimas e gasto de ATP (Figura 7.1) (CHIANG et al., 1981).

Figura 7.1. Esquema simplificado do metabolismo de xilose e glicose pela integração das vias glicolítica e pentose fosfato.



Fonte: Adaptado de Hector et al. (2011); Jeffries (2006) e Nelson; Lehninger e Cox (2008)
 Nota: XI – xilose isomerase, XR – xilose redutase, XDH – xilitol desidrogenase, XK – xiluloquinase, TLK1 – transcetolase, TAL1 – transaldolase.

Segundo Hector et al. (2011), na maioria das leveduras que naturalmente assimilam xilose o metabolismo desta pentose ocorre pela via de redução / oxidação. A xilose é primeiro convertida em xilitol pela ação da enzima xilose redutase (XR) na presença de NADH e/ou NADPH, dependendo do microrganismo. Em seguida, a enzima xilitol desidrogenase (XDH) converte o xilitol em xilulose, que pode ser fosforilada pela xiluloquinase (XK) para gerar a xilulose-5-fosfato, que é um intermediário da via das pentoses-fosfato. A molécula fosforilada pode ser convertida em gliceraldeído-3-fosfato ou frutose-6-fosfato pelas reações não-oxidativas da via das pentoses-fosfato (NELSON; LEHNINGER; COX, 2013). Esses intermediários dão origem ao piruvato, que poderá então ser processado da mesma maneira que na fermentação alcoólica, formando etanol em condições anaeróbicas ou podendo ser canalizada para a cadeia respiratória na presença de oxigênio, gerando energia para o crescimento celular (JEFFRIES, 2006).

Fica claro que a presença das enzimas xilose isomerase (XI) ou XR+XDH é essencial para que a xilose seja assimilada pela *S. cerevisiae*. De acordo com Toivari et al. (2004), *S. cerevisiae* chega a possuir os genes necessários para metabolizar xilose, porém apresentam baixíssimas atividades de XR e XDH. Soma-se a isso a ausência de transportadores específicos de xilose, sendo a captação de pentoses mediada pelos mesmos transportadores das hexoses (HXTs e GAL 2), o que torna o transporte lento e não eficiente, representando assim um fator limitante e impedindo que a levedura cresça em xilose (REIDER APEL et al., 2016). Apesar de não assimilar eficientemente xilose, *S. cerevisiae* é capaz de fermentar seu isômero, a xilulose. Nesse sentido, o uso dessa levedura no processo de produção de etanol 2G requer uma etapa de isomerização de xilose em xilulose, podendo a reação ser realizada *ex vivo* (utilizando a enzima xilose isomerase, XI) ou através do uso de levedura modificada geneticamente, ocorrendo a reação de isomerização *in vivo*.

Silva et al. (2012) relatam a produção de etanol a partir de xilose utilizando xilose isomerase imobilizada em quitosana e coimobilizada com *S. cerevisiae* em gel de alginato de cálcio. Embora o equilíbrio químico xilose : xilulose seja desfavorável (3,5: 1 a 60 °C) (CHIANG et al., 1981), a reação é deslocada pelo processo simultâneo de isomerização e fermentação - *SIF* (do inglês *Simultaneous Isomerization and Fermentation*,). Os autores demonstraram que a conversão contínua de xilulose em etanol permitiu o consumo completo da xilose disponível. Segundo os autores, 12 g.L⁻¹ de etanol foram produzidos a partir de 65 g.L⁻¹ de xilose (pH 5,6 a 35 °C). Todavia, devido a velocidade de fermentação de xilulose ser inferior à da glicose (~10x inferior, de acordo com Senac; Hahn-Hägerdal, 1990), houve acúmulo de xilose e crescimento de microrganismos contaminantes no meio reacional.

Uma forma de controlar o desenvolvimento de contaminantes seria utilizar um substrato de difícil assimilação, tais como xilooligômeros obtidos pela solubilização de hemicelulose sob condições brandas. A utilização desse substrato implica uma etapa de

hidrólise adicional no processo de produção de etanol 2G, catalisada pela ação de enzimas xilanases (endoxilanae, exoxilanae e β -xilosidase), atuando em conjunto na despolimerização das cadeias dos xilooligômeros até xilose (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016). A inserção dessas enzimas no biocatalisador proposto por Silva et al. (2012) resultou em novo biocatalisador para ser usado em reações de hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas - *SHIF* (do inglês *Simultaneous Hydrolysis, Isomerization and Fermentation*) para produção de etanol 2G, patenteado por Giordano et al. (2014).

Milessi-Esteves et al. (2019) estudaram a reação de *SHIF* de licor de xilooligômeros de xilana de bétula (pH 5,6 a 35°C). Não houve contaminação microbiana no meio reacional. Todavia, apenas 3 g.L⁻¹ etanol foram produzidos, havendo acúmulo da xilose liberada na etapa de hidrólise. Segundo os autores, a etapa de isomerização é a mais afetada pelas condições de operação do processo (pH 5,6 e 35 °C), estando essa condição muito abaixo das quais são registradas as máximas atividades catalíticas da enzima XI. Soma-se a isso possíveis efeitos de inibição causados por íons Ca²⁺ e/ou xilooligossacarídeos (XOS) em solução, que levam a um bloqueio da isomerização e, conseqüentemente, da produção de etanol.

Considerando os resultados promissores obtidos por Milessi-Esteves et al. (2019) utilizando o biocatalisador multienzimático encapsulado com *S. cerevisiae* para produção de etanol 2G, esta etapa do trabalho focou na realização de reações de *SHIF* utilizando como substrato o licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar rico em xilooligômeros.

Os ensaios iniciais tiveram como objetivo estudar o efeito da incorporação da enzima β -xilosidase de *Bacillus subtilis* na composição do biocatalisador de *SHIF*, sobre o perfil de produtos de reação (em especial xilose e xilobiose), testando assim a hipótese de que as baixas estabilidade e concentração dessa enzima no biocatalisador estariam bloqueando a hidrólise e, conseqüentemente, o fornecimento de xilose para as reações seguintes (isomerização e fermentação).

A hipótese seguinte foi proporção inadequada de cada componente. Foram, assim, avaliados também os efeitos de modificações nas proporções de cada derivado e levedura sobre a produção de etanol, tendo como base as atividades enzimáticas medidas nas condições de *SHIF* (pH 5,6 e 35 °C).

Visando confirmar se a etapa de isomerização não era a responsável pelo bloqueio do processo, conforme indicado nos resultados mostrados no CAPÍTULO 6, foi estudado o desempenho de uma *S.cerevisiae* geneticamente modificada para fazer a isomerização *in vivo* e, que portanto, poderia consumir diretamente a xilose produzida na hidrólise. Foram assim realizados ensaios de hidrólise e fermentação simultâneas - *SHF* (do inglês *Simultaneous Hydrolysis and Fermentation*) do licor hidrotérmico utilizando um biocatalisador contendo os derivados xilanólíticos de Multifect CX XL e β -xilosidase de *Bacillus*

subtilis encapsulados com *S. cerevisiae* GSE16-T18, uma variedade modificada geneticamente capaz de assimilar xilose diretamente.

Finalmente, visando eliminar a variável pH no processo, foram realizados ensaios de *SHIF* e *SHF* em reator de leito fixo com recirculação do meio reacional e controle de pH. Essa abordagem permite controlar os efeitos danosos da queda de pH ao longo da reação sobre os catalisadores, e avaliar se essa variável pode estar relacionada às baixas conversões em etanol reportada nos trabalhos anteriormente realizados pelo grupo.

7.2 Material e Métodos

7.2.1 Materiais

Foram fornecidos pela Dupont/Genencor International (Palo Alto, EUA) o complexo xilanolítico comercial Multifect CX XL A03139 (atividade de $2170 \pm 52 \text{ UI.mL}^{-1}$, medida na hidrólise de xilana de eucalipto $10 \text{ g.L}^{-1} \text{ m.v}^{-1}$ pH 5,6 a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, $58,6 \text{ mg}_{\text{proteína.mL}^{-1}}$) e a xilose isomerase de *Streptomyces rubiginosus*, comercialmente disponível como GENSWEET SGI, com atividade de $11498 \pm 489 \text{ UI.mL}^{-1}$ (xilose 2 mol.L^{-1} , pH 7,0, $60 \text{ }^\circ\text{C}$). A endoxilanase recombinante de *Bacillus subtilis* (502 UI.mL^{-1} e $9,2 \text{ mg}_{\text{proteína.mL}^{-1}}$) foi doada pela Verdartis (Ribeirão Preto, SP, Brasil). A β -xilosidase de *Bacillus subtilis* recombinante expressa em *Escherichia coli* foi produzida e purificada pelo grupo LAFAC do DEQ UFSCar (São Carlos, Brasil). O 4-Nitrofenil-p-D-xilopiranosídeo (p-NPX) foi adquirido da Goldbio (St. Louis, EUA). Frutose, glicose, carbonato de cálcio, cloreto de cobalto hexahidratado, cloreto de magnésio heptahidratado, cloreto de cálcio dihidratado, sulfato de magnésio hexahidratado, fosfato de potássio monobásico anidro, hidróxido de sódio, etanol anidro e o ácido sulfúrico foram da Synth (Diadema, Brasil). A xilose e o borohidreto de sódio foram da Vetec (Duque de Caxias, Brasil). Glicidol, xilitol, carbazol e cloridrato de L-cisteína monohidratada foram da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Peptona foi gentilmente doado pelo grupo Kerry (Colorado, EUA) e o extrato de levedura Oxoid/Fisher Thermo Scientific (Hampshire, Inglaterra). Quitosana (85% desacetilação) da Polymar (Fortaleza, Brasil). Agarose 6% (6 BCL Sepharose™) da GE Healthcare Life Science (Buckinghamshire, Inglaterra). Xilobiose, xilotriose, xilotetraose, xilopentose e xilohexose utilizados como padrão para análise por HPLC foram do Megazymes International Group (Bray, Irlanda). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* Itaiquara® (Tapiratiba, Brasil) utilizada nos os experimentos *SHIF* foi adquirida no comercio local como células de levedura recém-comprimidas, sendo utilizado como comprado, sem propagação ou ativação prévia. A levedura *S. cerevisiae* modificada geneticamente GSE16-T18 foi gentilmente cedida pelo grupo do Prof. Johan M. Thevelein da KU Leuven/VIB (Leuven, Bélgica).

O licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar rico em xilooligômeros foi preparado de acordo com a metodologia descrita no CAPÍTULO 2, sendo rotaevaporado em seguida para concentração do teor de carboidratos. O pH do licor foi ajustado para 5,6 pela adição de CaCO_3 e, após a separação dos sólidos por filtração a vácuo, suplementado com $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), ureia ($3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). A esterilização do substrato foi realizada através de filtração a vácuo em membrana de acetato-celulose $0,22 \mu\text{m}$. O substrato xilana de eucalipto foi preparado conforme descrito no CAPÍTULO 3. Todos os outros reagentes químicos eram de grau analítico.

7.2.2 Métodos

Cultivo da levedura geneticamente modificada

A levedura *S. cerevisiae* recombinante GSE16-T18 utilizada nos ensaios de fermentação foi preparada de acordo com Milessi (2017). O pré-inóculo foi obtido pela adição de uma alçada da cultura estoque em 3 mL de YPDX 2% contendo $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de ampicilina e deixado em incubadora rotatória (*shaker*) por 12h, 200 rpm e 30°C . O inóculo foi cultivado em frascos de 1L, onde o pré-inóculo foi transferido para 250 mL de YPDX 2% e $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de ampicilina. Os frascos foram mantidos a 30°C e 200 rpm por 24h. As células foram então recuperadas por centrifugação ($3765 \times g$ por 30 min a 4°C) e utilizadas nos ensaios fermentativos.

Produção do biocatalisador

Preparo do gel de agarose

O gel de agarose glioxil utilizado como suporte foi preparado pela eterificação da agarose com glicidol seguida pela oxidação com metaperiodato de sódio, de acordo com a metodologia descrita por Guisán (1988). Agarose 6% foi suspensa em água destilada ($286 \mu\text{L} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$) em banho de gelo. Solução de NaOH $1,7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (preparada previamente a frio e contendo 28,5 mg de borohidreto de sódio por mililitro de solução) foi adicionada à solução. Posteriormente, adicionou-se lentamente glicidol à solução ($343 \mu\text{L} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$). A suspensão foi mantida sob agitação mecânica suave, à temperatura ambiente, por 16 horas. O suporte

eterificado (agarose-gliceril) foi então lavado com água destilada sob filtração a vácuo, e suspenso novamente em água destilada na razão $V_{\text{suporte}} : V_{\text{suspensão}} = 1:10$.

Para a oxidação do gel, para cada mL de suporte foram adicionados 214 μg de metaperiodato por microequivalente de grupos aldeídos desejados. Em seguida, sob agitação suave por 2 horas, o gel agarose-glioxil foi lavado com água destilada, seco a vácuo e armazenado a 4°C. A quantificação dos grupos aldeídos formados foi quantificada por iodometria, de acordo com a metodologia adaptada de Pereira (1996).

Preparo do gel de quitosana 2% m.v⁻¹ ativado com glutaraldeído 0,8% m.v⁻¹

O gel de quitosana foi preparado conforme a metodologia descrita por Budriene et al. (2005). Quitosana em pó 2,5% m.m⁻¹ foi solubilizada em ácido acético 2% (m.v⁻¹) e homogeneizada por 30 minutos a 25 °C sob agitação mecânica. A solução foi aquecida a 50 °C e foram adicionados 1,5 mL de KOH 0,5 mol.L⁻¹ para cada mL de solução de quitosana, sendo então mantido sob agitação por 30 minutos. Em seguida, o material foi filtrado e lavado com água destilada até a neutralização do pH neutro e armazenado para ativação posterior.

Para a ativação, uma solução de glutaraldeído 0,8% v.v⁻¹ foi preparada em tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0. A 90 mL desta solução foram adicionados 10 g de gel de quitosana (filtrado), sendo a suspensão mantida sob agitação mecânica suave por 30 minutos a 50 °C. Imediatamente após a ativação, o suporte foi lavado exaustivamente com água destilada até a neutralização, seguido da imobilização da enzima ao suporte.

Imobilização das enzimas

A imobilização da isomerase de xilose foi realizada em gel de quitosana-glutaraldeído (2% m.v⁻¹) de acordo com Silva et al. (2012). A solução enzimática foi preparada em tampão Tris-maleato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 contendo 5 mmol.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O e 2,5 mmol.L⁻¹ de CoCl₂.6H₂O de modo a fornecer 50 mg_{proteína.gsuporte⁻¹}. O suporte foi adicionado à solução enzimática na proporção de 1:10 (m.v⁻¹). Após 20 horas de imobilização a 25 °C sob agitação orbital suave (60 rpm), foi adicionado boro-hidreto de sódio (1 mg.mL_{suspensão⁻¹}) e a suspensão mantida sob agitação suave por 30 min em banho de gelo. Os derivados foram filtrados e lavados sob vácuo, primeiro com tampão Tris-maleato 200 mmol.L⁻¹ (pH 7,0), depois com água ultrapura, e finalmente com tampão Tris-maleato 50 mmol.L⁻¹ (pH 7,0), de modo a remover o boro-hidreto e a enzima adsorvida.

O complexo xilanólíticos Multifect CX XL e a endoxilanase de *Bacillus subtilis* foram imobilizados em quitosana-glutaraldeído 2% seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, com modificações. As imobilizações foram realizadas tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0 a 25 °C e sob agitação constante (60 rpm). Foram oferecidas as cargas enzimáticas de 20 e 50 mg_{proteína.gsuporte⁻¹}, mantendo-se em 1:10 (m.v⁻¹) a relação de massa de suporte para volume de solução enzimática. Após 24h a imobilização foi encerrada, sendo então adicionado borohidreto de sódio (1 mg.mL_{suspensão⁻¹}) e a reação de redução conduzida por 30 min a 4 °C. Os derivados foram extensivamente lavados com água ultrapura e tampão citrato 50 mmol.L⁻¹ pH 4,8; sendo então armazenados até a utilização.

A β-xilosidase de *Bacillus subtilis* foi imobilizada em agarose-glioxil de acordo com Guisán (1988). A solução enzimática foi preparada em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 10,05 de modo a oferecer 50 mg_{proteína.gsuporte⁻¹}. O suporte foi ressuspenso na solução enzimática na proporção de 1:10 (m.v⁻¹), e a imobilização realizada ao longo de 24h sob agitação orbital constante (60 rpm) por 24h. A imobilização foi encerrada pela adição de borohidreto de sódio (1 mg.mL_{suspensão⁻¹}), sendo a reação de redução realizada por 30 min a 4 °C. Os derivados foram extensivamente lavados com água ultrapura, tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 6,0 e armazenados até a utilização.

Coimobilização dos derivados e levedura em gel de alginato de cálcio

Os grânulos de biocatalisador foram preparados através do encapsulamento dos derivados enzimáticos e da levedura em gel de alginato cálcio, conforme a metodologia descrita em Silva et al. (2012). Uma solução de alginato de sódio (1% m.v⁻¹) contendo a levedura *S. cerevisiae* (selvagem ou recombinante) e os derivados de XI, xilanase e de β-xilosidase foi cuidadosamente gotejada em uma solução de CaCl₂ 0,25 mol.L⁻¹ + MgCl₂ 0,25 mol.L⁻¹. Partículas esféricas (Ø = 1 – 1,5 mm) foram produzidas utilizando uma extrusora pneumática (TROVATI; GIORDANO; GIORDANO, 2009). Todo procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar (ESCO, Horsham, PA, EUA), sendo o alginato de sódio e a solução de coagulação previamente esterilizados a 121 °C por 20 min. Após a imobilização, os grânulos de biocatalisador foram mantidos em solução de cura (4 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 10 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 3 g.L⁻¹ de ureia, 0,2 g.L⁻¹ de CoCl₂ e 4 g.L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O) por 12 a 16 h a 4 °C.

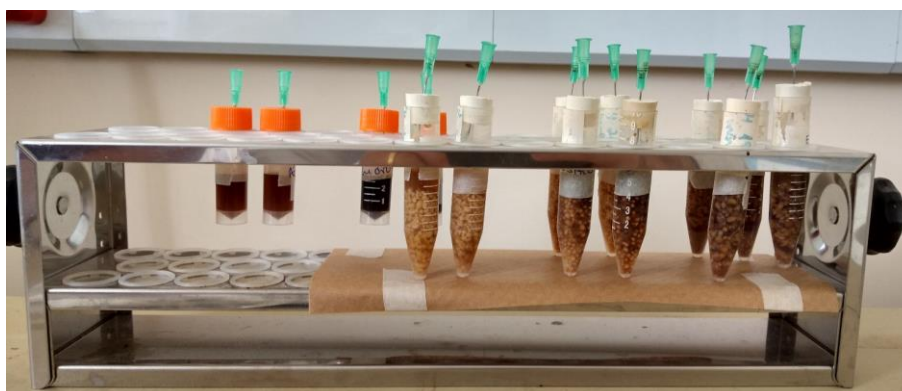
Ensaio de hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas (SHIF) em microreatores

Os ensaios de *SHIF* foram realizados em incubadora (*shaker*, 35 °C e 150 rpm), utilizando microreatores selados com um volume total de reação de 4 mL (relação biocatalisador : substrato de 1:1 m.v⁻¹, 2 g de biocatalisador e 2 mL de substrato, densidade do grânulo de 1 g.cm³). As amostras foram coletadas em intervalos regulares para determinação pH, consumo de substratos e formação de produtos via CLAE.

Ensaio de hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas (SHIF) e de hidrólise e fermentação simultâneas (SHF) em microreatores

Os ensaios de *SHIF* e *SHF* foram realizados em microreatores com via de escape para os gases produzidos na reação (Figura 7.2). Nesses ensaios, o volume total de reação foi de 6 mL (relação biocatalisador : substrato de 1:1 m.v⁻¹, 3 g de biocatalisador e 3 mL de substrato). Os tubos foram mantidos em incubadora (*shaker*, 35 °C e 150 rpm). As perdas de massas devido ao escape do CO₂ formado foram acompanhadas ao longo dos ensaios até não haver variação significativa. As perdas de massa dos tubos contendo apenas substrato foram utilizadas como controle de evaporação. Ao término dos ensaios, os tubos foram abertos e a os sobrenadantes recolhidos para determinação do pH, consumo de substratos e formação de produtos via CLAE.

Figura 7.2. Microreatores utilizados nas reações *SHIF* e *SHF* do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar.

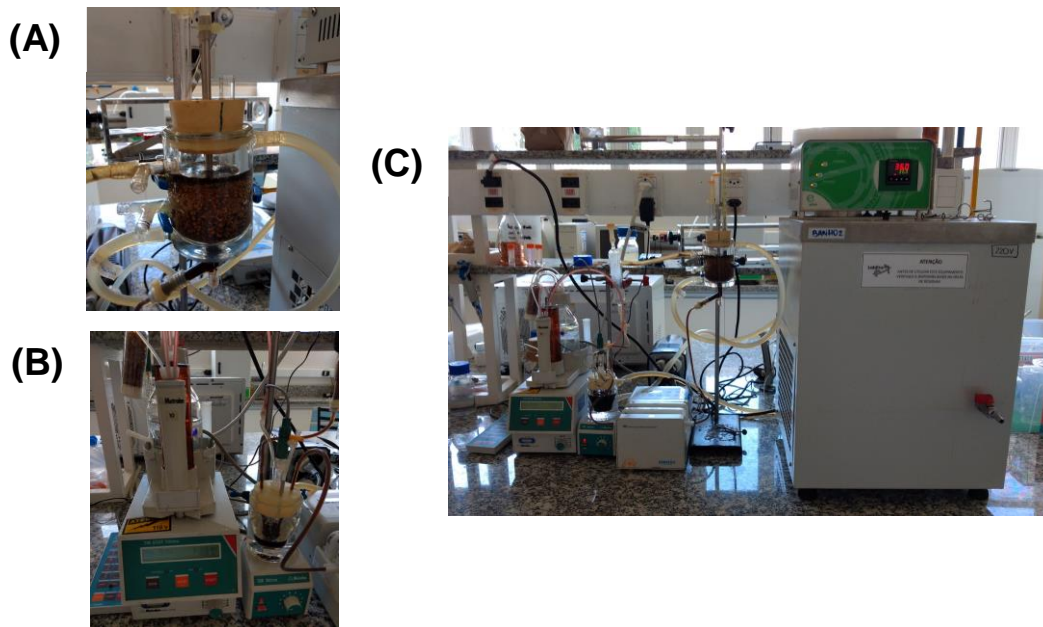


Fonte: Arquivo pessoal.

Ensaio de hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas (SHIF) e de hidrólise e fermentação simultâneas (SHF) em reator de leito fixo em sistema com controle de pH

Os ensaios de *SHIF* e *SHF* do licor hidrotérmico foram realizados em reator de leito fixo encamisado. O reator com volume útil de 100 mL continha uma tela de aço inox para contenção dos grânulos de biocatalisador (Figura 7.3.A). A tampa do reator continha três pequenos orifícios, sendo um para saída do CO_2 produzido, um para entrada de ar e um contendo um poço de vidro (tudo de ensaio) ocupado pelo termômetro. A alimentação era realizada pela parte inferior e o efluente escoava por uma abertura na lateral superior esquerda para o tubo coletor. Por ação da gravidade, o meio reacional seguia para o segundo reator (Figura 7.3.B), onde o equipamento pHstato (Titrimo 718, Metrohm, Herisau, Suíça) realizava continuamente a medida e controle do pH, ajustando conforme a necessidade para o valor programado ($\text{pH} = 5,6$) pela adição de solução NaOH 0,5M, sendo o meio então bombeado de volta para o reator. A Figura 7.3.C apresenta o sistema montado e funcionamento na reação de *SHIF*.

Figura 7.3. Sistema utilizado para reações de *SHIF* e *SHF* com controle de pH. (A) Detalhe do reator de leito fixo preenchido com os grânulos de biocatalisador e substrato, (B) reator encamisado conectado ao sistema de controle do pH do meio reacional (pHstato) e (C) sistema completo utilizado nos ensaios de *SHIF* e *SHF* do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar.



Nota: 1.Reator; 2. Tubo coletor de meio; 3. Reator de controle/ajuste de pH; 5. pHstato; 6. Bomba peristáltica; 7. Banho termostático. Fonte: Arquivo pessoal.

7.2.3 Métodos analíticos

Medida da atividade de endoxilanase

A atividade da xilanase foi medida de acordo com metodologia descrita por Bailey, Biely e Poutanen, (1992) com modificações, calculando as velocidades iniciais da reação de hidrólise da xilana de eucalipto (10 g.L^{-1} , tampão citrato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 5,6) catalisada por uma quantidade conhecida de enzima. A enzima solúvel ou imobilizada foi adicionado ao meio reacional e incubada por por 10 min a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Alíquotas foram retiradas a cada 2 minutos e os açúcares redutores liberados quantificados pelo método DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberação de $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de xilose por minuto nas condições de ensaio (pH 5,6; 50°C).

Medida da atividade de β -xilosidase

A atividade da β -xilosidase foi determinada em uma cubeta de quartzo, medindo-se o aumento de absorbância a 410 nm causado pela liberação de 4-nitrofenol ($\epsilon = 1950 \text{ L.mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) durante a hidrólise da solução de 4-nitrofenil β - xilopiranosídeo (p-NPX) 5 mmol.L^{-1} pH 6,0 a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (DIOGO et al., 2015). Uma unidade de hidrólise da atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de 4-nitrofenol por minuto sob as condições de ensaio.

Medida da atividade de xilose isomerase

Para a medida de atividade de isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose, o substrato de xilose foi preparado a 2 mol.L^{-1} em tampão tris-maleato 50 mmol.L^{-1} pH 7,0 contendo $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ 50 mmol.L^{-1} e $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$. A reação foi iniciada pela adição do derivado em 5 mL de solução de frutose a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Em intervalos regulares, amostras de $100 \text{ } \mu\text{L}$ foram retiradas e transferidas para microtubos contendo $100 \text{ } \mu\text{l}$ de HCl 1 mol.L^{-1} (para inativar a enzima). A concentração de xilose foi determinada colorimetricamente pelo método da cisteína-carbazol (DISCHE; BORENFREUND, 1951). Uma unidade de atividade (UI) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de glicose por minuto nas condições do ensaio.

Medida da concentração de proteínas totais

A quantificação das proteínas totais foi realizada pelo método proposto por Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Medida da viabilidade celular

A viabilidade das células de levedura foi avaliada por coloração com azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer. Na análise da viabilidade de células imobilizadas, antes da coloração com azul de metileno os grânulos de biocatalisador foram dissolvidos em citrato de sódio 8% (m.v⁻¹) na proporção 100 mg de grânulos por mL de solução sob agitação mecânica em vortex a temperatura ambiente. A viabilidade celular foi definida como a razão entre células viáveis e células totais (viáveis e não viáveis) computadas em um espaço definido da câmara de contagem (SILVA, 2013).

Quantificação das concentrações de xilooligossacarídeos, açúcares, etanol e xilitol

As concentrações de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetil furfural (HMF) foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Waters e2695 equipado com detectores de índice de refração (45 °C) e UV-VIS ($\lambda = 210$ nm). Glicose, xilose, arabinose e ácido acético presentes nos sobrenadantes foram determinadas em coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad, Richmond, EUA) operando a 45 °C com solução de H₂SO₄ 5 mmol.L⁻¹ sob fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. Furfural e HMF foram determinados em coluna C₁₈ (Sunfire, Waters, Milford, EUA) a 25 °C conectada ao detector UV/VIS 274 nm, utilizando solução de acetonitrila : água 1:8 v.v⁻¹ contendo 1% de ácido acético, com vazão de 0,8 mL.min⁻¹. As concentrações de xilose, xilulose e XOS (X₂ a X₆) foram determinadas utilizando a coluna Sugar-PakTM I (300 x 6,5 mm, Waters, Milford, EUA) conectada ao detector de índice de refração (45 °C), usando água ultrapura como fase móvel com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ a 80 °C. Todas as amostras coletadas foram previamente diluídas e filtradas (filtro PVDF 0,22 μ m). As concentrações dos compostos foram obtidas a partir curvas de calibração obtidas pela injeção de padrões analíticos com concentrações conhecidas.

7.2.4 Calculo dos parâmetros de fermentação

Os ensaios fermentativos foram avaliados a partir de parâmetros como conversão de substrato (%), rendimento ($g_{\text{produto}} \cdot g_{\text{AF}}^{-1}$) e produtividade volumétrica ($g_{\text{etanol}} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$), de acordo com as Equações 7.1 – 7.4 (SHULER; KARGI, 2002).

Conversão do substrato – X

$$X [\%] = \frac{C_{\text{Total}} - C_{\text{Final}}}{C_{\text{Total}}} \times 100 \quad (7.1)$$

onde: C_{Total} : concentração de açúcares fermentescíveis totais (determinados via hidrólise total) ($g \cdot L^{-1}$);

C_{Final} : concentração de açúcares fermentescíveis no final da reação (determinados via hidrólise total) ($g \cdot L^{-1}$).

Fator de rendimento – $Y_{P/S}$

$$Y_{P/S} [g_{\text{Produto}} \cdot g_{\text{AF}}^{-1}] = \frac{\Delta C_P}{-\Delta C_S} = \frac{(C_{P \text{ Final}} - C_{P \text{ Inicial}})}{(C_{\text{Total}} - C_{\text{Final}})} \quad (7.2)$$

onde: $C_{P \text{ Final}}$: concentração do produto formado no tempo t ($g \cdot L^{-1}$);

$C_{P \text{ Inicial}}$: concentração do produto no início do processo ($g \cdot L^{-1}$);

C_{Total} : concentração de açúcares fermentescíveis totais (determinados via hidrólise total) ($g \cdot L^{-1}$);

C_{Final} : concentração de açúcares fermentescíveis no final da reação (determinados via hidrólise total) ($g \cdot L^{-1}$).

Produtividade volumétrica do processo

$$Q_P [g_{\text{Produto}} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}] = \frac{(C_{P \text{ Final}} - C_{P \text{ Inicial}})}{\Delta t} \quad (7.3)$$

Onde: $C_{P \text{ Final}}$: concentração do produto formado no tempo t ($g \cdot L^{-1}$);

$C_{P \text{ Inicial}}$: concentração do produto no início do processo ($g \cdot L^{-1}$);

Δt : tempo de processo (h).

Seletividade em etanol

$$S [g_{Etanol} \cdot g_{xilitol}^{-1}] = \frac{C_{Etanol}}{C_{xilitol}} \quad (7.4)$$

onde: C_{Etanol} : concentração de etanol ($g \cdot L^{-1}$);

$C_{xilitol}$: concentração de xilitol ($g \cdot L^{-1}$).

7.3 Resultados e Discussão

7.3.1 Ensaios preliminares do processo *SHIF* com xilana de eucalipto

As condições estabelecidas nos trabalhos realizados por Aquino (2013), Silva (2013) e Milessi (2017) do grupo LABENZ do DEQ UFSCar serviram como ponto de partida para um ensaio preliminar de *SHIF* utilizando como substrato a xilana de eucalipto. A escolha do substrato teve como fator determinante a descontinuidade das xilanas de bétula e de faia no mercado, bem como os perfis de hidrólise das xilanases obtidos nesse substrato (ver CAPÍTULO 3). Os grânulos de biocatalisador foram preparados contendo os derivados do complexo xilanolítico Multifect CXXL ($10 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$) e xilose isomerase ($50 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$), ambos preparados em gel de quitosana-glutaraldeído, endoxilanase de *Bacillus subtilis* e o derivado de β -xilosidase de *Bacillus subtilis* ($5 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$) preparado em gel de agarose-glioxil; coimobilizados em alginato de cálcio com a levedura *S. cerevisiae* comercial (Itaiquara). Grânulos de biocatalisador sem adição de β -xilosidase foram utilizados como condição controle. Vale ressaltar que nesses ensaios os derivados foram preparados com a mesma carga enzimática oferecida nos experimentos realizados em trabalhos anteriores no grupo LABENZ, a fim de facilitar a comparação dos resultados. A Tabela 7.1 apresenta as atividades medidas nos derivados e as composições utilizadas para a confecção dos grânulos dos catalisadores. A concentração de levedura utilizada foi de $50 \text{ g}_{\text{seca}} \cdot \text{L}^{-1}$.

Tabela 7.1. Atividades dos derivados e percentagem mássica dos componentes dos catalisadores da *SHIF*.

| Componente | <i>SHIF</i> | | <i>SHIF-Controle</i> | |
|--|------------------------|---|------------------------|---|
| | % (m.m ⁻¹) | Atividade* (U.mL _{Reator} ⁻¹) | % (m.m ⁻¹) | Atividade* (U.mL _{Reator} ⁻¹) |
| Xilanase Multifect | 2,5 | 0,09 | 2,5 | 0,09 |
| Xilanase <i>B. subtilis</i> | 5,0 | 0,15 | 5,0 | 0,15 |
| β -xilosidase <i>B. subtilis</i> | 2,5 | 5,08 | ----- | ----- |
| Xilose isomerase | 10,0 | 7,40 | 10,0 | 7,40 |
| <i>S. cerevisiae</i> | 10,0 | ----- | 10,0 | ----- |
| CaCO ₃ | 0,5 | ----- | 10, | ----- |
| Alginato de cálcio | 1,0 | ----- | 1,0 | ----- |

*: As medidas das atividades foram realizadas nas condições de *SHIF*: pH 5,6 a 35 °C.

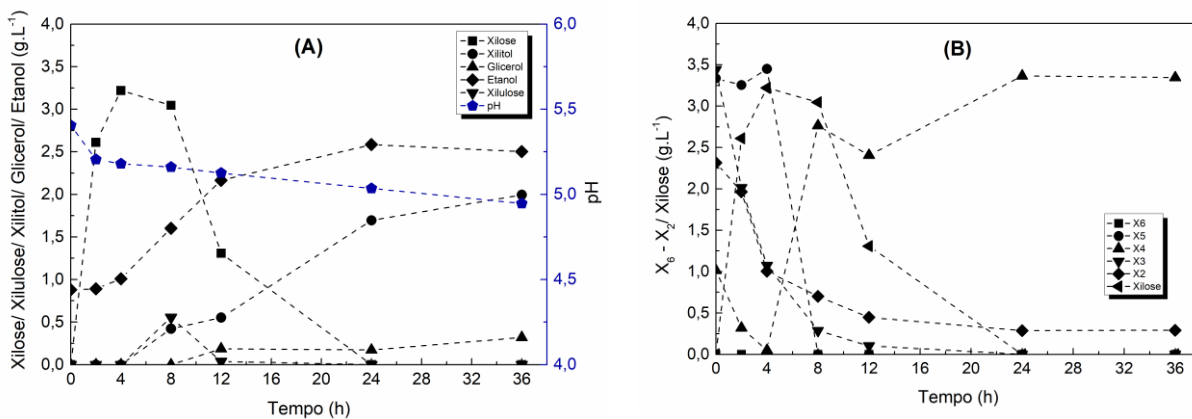
** : Gel de quitosana-glutaraldeído sem enzima foi utilizado em vez do derivado.

A xilana de eucalipto foi preparada a 120 g.L⁻¹ em tampão citrato de sólido 50 mmol.L⁻¹ pH 5,6 e autoclavada por 15 min (121 °C 1 atm) para solubilizar as cadeias de xilana. Em seguida, o substrato foi submetido a uma etapa de pré-hidrolisade catalisada pela ação da endoxilanase de *B. subtilis* (solúvel, 150 UI.mL⁻¹) a 50 °C por 1h, mimetizando a composição molar de xilooligómeros obtidos através de pré-tratamento de bagaço de cana de açúcar. Esse procedimento aumentava a concentração de XOS com cadeias menores e consequentemente facilitava o acesso enzimático no processo de *SHIF*. Ao término, a solução foi mantida a 94 °C por 5 min para inativar a endoxilanase solúvel presente no substrato.

Os ensaios foram realizados em incubadora rotatória (*Shaker*) a 35 °C sob agitação constante (150 rpm). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 7.4. Ao longo da reação houve produção de etanol, atingindo 2,5 g.L⁻¹ após 36h. Xilitol e glicerol também foram produzidos, sendo as concentrações de 2,0 e 0,3 g.L⁻¹ no fim do processo. A seletividade da produção de etanol em relação ao xilitol (S) foi de 1,25. Xilose foi produzida nas primeiras 4h de reação (3,2 g.L⁻¹), sendo então totalmente consumida após 24h de reação. Ao longo do processo não houve acúmulo de xilulose, indicando que toda a xilulose formada na etapa de isomerização foi consumida pela levedura. Contudo, conforme observado na Figura 7.4.B, os XOS já existentes no substrato (formados na pré-hidrólise enzimática) foram hidrolisados, com exceção da xilotetraose (X₄). Pode-se observar que diferentemente dos ensaios *SHIF* descritos por Milessi (2017), não houve acúmulo de xilobiose (X₂) no meio reacional, demonstrando que realmente era necessária a adição/suplementação de β -xilosidase na composição dos grânulos de biocatalisador. A produtividade do processo foi de

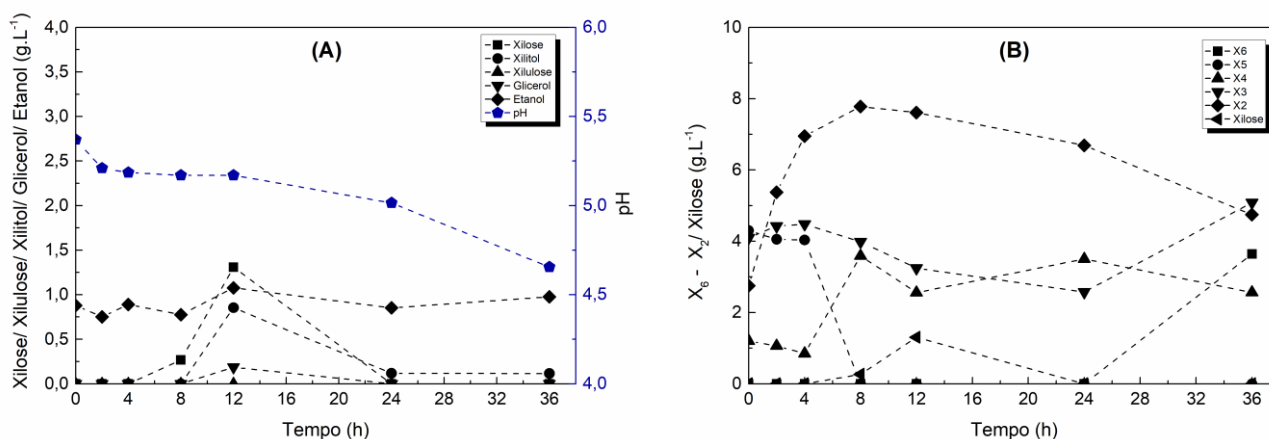
0,07 g.L⁻¹.h⁻¹, o fator de rendimento ($Y_{P/S}$) de 0,05 g.g⁻¹, calculado em função da xilose potencial.

Figura 7.4. Concentrações de produtos xilose, xilulose, xilitol, glicerol e etanol (g.L⁻¹) e do pH (A) e dos XOS (g.L⁻¹) (B) ao longo do processo SHIF a partir de xilana de eucalipto utilizando biocatalisador contendo 5% m.m⁻¹ xilanases, 5% m.m⁻¹ β-xilosidase, 10 m.m⁻¹ XI e 10% m.m⁻¹ de levedura, em batelada a 150 rpm e 35°C.



Os resultados obtidos no experimento controle, sem adição/suplementação de β-xilosidase ao biocatalisador de *SHIF*, confirmaram que o acúmulo de xilobiose pode ser resolvido com a inclusão de mais esse derivado enzimático no biocatalisador. Mais que isso, os resultados do experimento controle, mostrados na Figura 7.5.A, indicam que esse procedimento é essencial, pois a produção de etanol, xilitol e glicerol ao longo das 36h de reação foi muito menor que no ensaio com adição da enzima. Observa-se também que houve um consumo de xilitol e glicerol pela levedura em virtude da ausência de carboidratos metabolizáveis no meio reacional. A concentração de etanol, embora baixa, permaneceu constante, indicando que pode ter havido problema com essa análise, pois deveria ter sido também consumido. As curvas de XOS ao longo do processo justificam esses resultados. Pode-se observar que, embora as endoxilanases estivessem atuando na hidrólise dos XOS presentes no substrato, houve acúmulo de X₂ ao longo de todo o processo. Conforme discutido no **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, embora o complexo Multifect possua enzimas β-xilosidase na sua composição, a quantidade disponível em solução e, obviamente, no derivado obtido após a imobilização em suportes de quitosana-glutaraldeído, são insuficientes para realizar a completa hidrólise do substrato de *SHIF*. Ao ser feita a comparação direta com os ensaios *SHIF* apresentados na Figura 7.5, fica clara então a necessidade da suplementação do biocatalisador com a β-xilosidase a fim de evitar o acúmulo de X₂ e X₃ ao longo da reação.

Figura 7.5. Concentrações de produtos xilose, xilulose, xilitol, glicerol e etanol (g.L^{-1}) e do pH (A) e dos XOS (g.L^{-1}) (B) ao longo do processo *SHIF* (ensaio controle) a partir de xilana de eucalipto utilizando biocatalisador contendo $5\% \text{ m.m}^{-1}$ xilanases, 10 m.m^{-1} XI e $10\% \text{ m.m}^{-1}$ de levedura, em batelada a 150 rpm e 35°C .



Ambos ensaios apresentaram queda de pH, sendo essa maior no ensaio controle. Esse mesmo comportamento foi observado por Milesi (2017) ao longo dos ensaios de *SHIF* de xilana de bétula e faia. A xilana de eucalipto, assim como as xilanas de faia e bétula, possuem grupos acetil ligados à cadeia principal de resíduos xilopiranosil (EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HEINZE, 2005), que são liberados conforme a ação das enzimas xilanases presentes no biocatalisador, ocasionando então a queda do pH observada nos experimentos.

Após os ensaios os grânulos dos biocatalisadores foram desmanchados para avaliação da viabilidade celular das leveduras, sendo esta superior a 90% tanto na *SHIF* como na *SHIF*-Controle.

A baixa produção de etanol obtidas nesses ensaios indicam que o processo *SHIF* ainda carece de aprimoramento. A análise dos produtos de reação mostrou, contudo, que não houve acúmulo de xilose e de xilulose ao longo das reações, indicando que a etapa de isomerização não foi bloqueada ou responsável pela baixa produção de etanol. Embora o substrato utilizado nesses ensaios tenha sido submetido a uma etapa de pré-hidrólise, os xilooligômeros formados possivelmente possuíam cadeias mais longas que as obtidas com xilana de bétula e sem adição de β -xilosidase (MILESE-ESTEVES, 2019). O complexo Multifect parece atuar com mais dificuldade na xilana de eucalipto. Além disso, foi utilizada uma baixa concentração de xilanases no reator. Assim, uma vez que o real substrato a ser utilizado no processo *SHIF* é a fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar, obtido através do pré-tratamento da biomassa, conforme discutido no CAPÍTULO 2 deste trabalho, passou-se a realizar os ensaios seguintes utilizando o licor hidrotérmico como substrato e concentrações mais altas de xilanases.

Considerando-se que a concentração de xilose potencial oferecida foi de $46,7 \text{ g.L}^{-1}$, deve haver uma possível deficiência na etapa de hidrólise catalisada pelas enzimas xilanases. Dentre as enzimas utilizadas, os derivados de xilanase foram os que apresentaram as menores atividades. O aumento da quantidade oferecida em massa desse derivado poderia ser uma solução para essa limitação. Contudo, de acordo com Aquino (2013) e Milessi et al. (2018), a quantidade máxima possível de enzima a ser inserida no gel de alginato de cálcio não deve ultrapassar 20% da massa total de biocatalisador. Tendo em vista a necessidade das demais enzimas para que a *SHIF* possa ocorrer, a saída mais viável seria então a utilização, nos ensaios seguintes, de derivados contendo elevada atividade xilanolítica (isto é, preparados com alta carga de proteínas por grama de suporte).

7.3.2 Ensaios *SHIF* com licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar

Uma das possíveis justificativas para as baixas concentrações de etanol na *SHIF* pode estar relacionada à etapa de hidrólise catalisada pelo derivado de xilanase. À luz dos resultados e considerações feitas na seção anterior, algumas modificações foram feitas para a realização dos novos ensaios, visando a melhoria da produção de etanol. A primeira modificação se refere à troca do substrato, sendo utilizado o licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar (concentrado 5x), com pH ajustado para 5,6 pela adição de NaOH $6,5 \text{ mol.L}^{-1}$. A segunda modificação feita está relacionada aos derivados de xilanase. Nesses ensaios, foram utilizados os derivados de xilanase Multifect preparados em gel de quitosana-glutaraldeído com alta carga enzimática ($50 \text{ mg}_{\text{proteína.g}_{\text{suporte}}^{-1}}$), conforme descrito no **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

A terceira, e talvez mais importante, modificação feita foi a alteração das proporções de derivados utilizados na confecção dos grânulos de biocatalisador. Nos ensaios descritos no item 7.3.1, a proporção utilizada de cada derivado teve como base a fração mássica máxima assimilável pelo gel. Contudo, houve clara discrepância em termos de atividade das enzimas, estando as atividades de xilanase muito inferiores às da β -xilosidase e de XI (ver Tabela 7.1). Uma vez que nos ensaios anteriores não houve acúmulo de X_2 e xilose, e a baixa conversão da quantidade inicial de xilooligômeros em X_2 indicaram a necessidade de aumentar a quantidade de xilanase utilizada nos biocatalisadores. Sendo assim, as quantidades dos derivados de xilanase, β -xilosidase e de XI foram decididas em termos de atividade oferecida por mL de reator.

A Tabela 7.2 apresenta as atividades oferecidas e os teores mássicos correspondentes aos derivados e levedura utilizados na confecção dos biocatalisadores. O ensaio controle foi realizado utilizando o biocatalisador sem adição dos derivados de xilanase.

O substrato utilizado nesses ensaios continha uma elevada concentração de xilose e XOS inicial (1,53 g.L⁻¹ de glicose, 12,7 g.L⁻¹ de xilose, 5,1 g.L⁻¹ de X₂, 2,8 g.L⁻¹ de X₃, 2,6 g.L⁻¹ de X₄, 1,8 g.L⁻¹ de X₅ e 4,0 g.L⁻¹ de X₆, 1,0 g.L⁻¹ de HMF e 0,81 g.L⁻¹ de furfural). Desta forma, possíveis diferenças nas concentrações de XOS e etanol entre os ensaios com e sem xilanases possibilitariam avaliar a influência do aumento de atividade dos derivados de xilanase utilizados.

Tabela 7.2. Atividades das enzimas imobilizadas (U.mL_{Reator}⁻¹) e percentagem mássica de cada componente do biocatalisador utilizado na SHIF.

| Componente | SHIF | | SHIF-Controle | |
|---------------------------------|------------------------|---|------------------------|---|
| | % (m.m ⁻¹) | Atividade* (U.mL _{Reator} ⁻¹) | % (m.m ⁻¹) | Atividade* (U.mL _{Reator} ⁻¹) |
| Xilanase Multifect | 10,2 | 1,28 | 10,2** | ----- |
| β-xilosidase <i>B. subtilis</i> | 0,43 | 0,91 | 0,43 | 0,91 |
| Xilose isomerase | 0,50 | 0,41 | 0,50 | 0,41 |
| <i>S. cerevisiae</i> | 10,0 | ----- | 10,0 | ----- |
| CaCO ₃ | 0,5 | ----- | 1,0 | ----- |
| Alginato de cálcio | 1,0 | ----- | 1,0 | ----- |

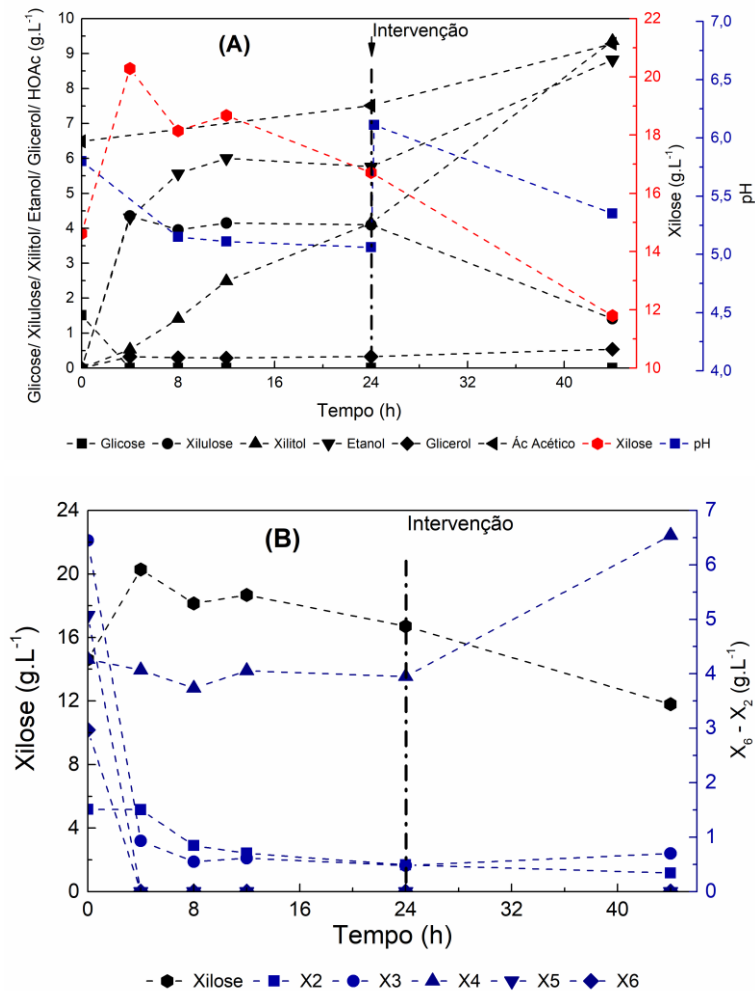
*: As medidas das atividades foram realizadas nas condições de SHIF: pH 5,6 a 35 °C.

** : Gel de quitosana-glutaraldeído sem enzima foi utilizado em vez do derivado.

A Figura 7.6 apresenta o acompanhamento dos ensaios SHIF do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar. Pode-se observar que houve aumento em termos de produção de etanol, atingindo-se 5,76 g.L⁻¹ em 12 h de reação. Nas 12 horas seguintes a concentração de etanol estagnou, mas as de xilitol e glicerol continuaram aumentando atingindo 4,15 g.L⁻¹ e 0,33 g.L⁻¹, respectivamente. A seletividade em etanol do processo foi de 1,388 g_{etanol}.g_{xilitol}⁻¹, não havendo melhora em comparação aos ensaios anteriores. Todavia, a produtividade (para as primeiras 24h) foi favorecida, sendo 0,240 g.L⁻¹.h⁻¹ e Y_{P/S} de 0,153 g_{etanol}.g_{AF}⁻¹§.

§ Fator de rendimento calculado em função dos açúcares fermentescíveis (glicose e xilose) consumidos.

Figura 7.6. Concentrações de glicose, xilose, xilulose, xilitol, glicerol, etanol e ácido acético (g.L^{-1}) e pH (A) e XOS (g.L^{-1}) (B) ao longo do ensaio *SHIF* do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar, com intervenção em 24h horas para adição de levedura livre, com aumento do pH. Biocatalisador composto de 10,2% m.m^{-1} de derivado xilanólico Multifect, 0,5% m.m^{-1} de derivado XI e 0,43% m.m^{-1} de derivado de β -xilosidase, 10% m.m^{-1} de *S. cerevisiae*. Processo realizado a 35 °C e 150 rpm.

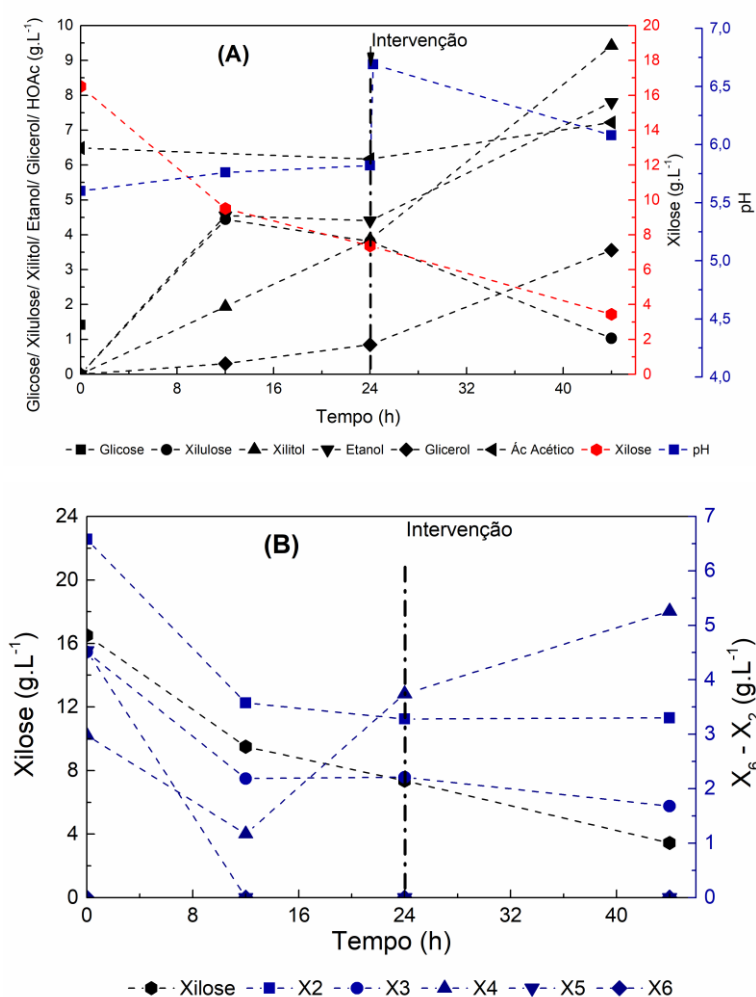


Novamente observou-se queda do pH do meio reacional, provavelmente devido a liberação dos grupos acetil presentes nos xilooligômeros do substrato. Ao se observar a curva de xilose ao longo tempo, nota-se um aumento da concentração nas primeiras 4h de reação, sendo então lentamente consumida nas próximas 20h de reação. Um comportamento similar foi observado para a xilulose. As análises dos XOS ao longo da reação (Figura 7.6.B) mostram que houve acúmulo apenas de X4, com consumo das demais frações. Esses resultados confirmam novamente a importância da presença de derivados de β -xilosidase para que os XOS ($X_{<3}$) sejam efetivamente convertidos em xilose no interior do biocatalisador.

Os resultados obtidos no ensaio *SHIF*-Controle encontram-se na Figura 7.7. Nesses ensaios pode-se observar o consumo contínuo da xilose disponível no meio reacional ao longo de todo o ensaio, sendo que o mesmo comportamento foi observado para X_2 e X_3 (Figura 7.7.B).

Diferentemente do ensaio *SHIF*, não houve queda do pH do meio reacional, algo esperado devido à ausência de xilanases no biocatalisador. Após 24h de reação, as concentrações de etanol, xilitol e glicerol produzidos foram de 4,40, 3,87 e 0,14 g.L⁻¹, respectivamente. A seletividade em etanol para a reação controle foi de 1,137 g_{etanol}.g_{xilitol}⁻¹. A produtividade após 24h de reação foi de 0,183 g.L⁻¹.h⁻¹ e o Y_{P/S} de 0,103 g_{etanol}.g_{AF}⁻¹.

Figura 7.7. Concentrações de glicose, xilose, xilulose, xilitol, glicerol, etanol e ácido acético (g.L⁻¹) e pH (A) e XOS (g.L⁻¹) (B) ao longo do ensaio controle –*SHIF* (ausência do complexo xilanolítico Multifect) do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar, com intervenção em 24h horas para adição de levedura livre, com aumento do pH. Biocatalisador composto de 0,5% m.m⁻¹ de derivado XI e 0,43% % m.m⁻¹ de derivado de β-xilosidase, 10% m.m⁻¹ de *S. cerevisiae*. Processo realizado a 35 °C e 150 rpm.



Os parâmetros de fermentação da reação *SHIF*-controle foram ligeiramente inferiores aos da *SHIF* contendo as xilanases. Ao se observar as curvas apresentadas na Figura 7.7.A é possível ver que entre 8 e 24 horas, quando ocorre a estabilização da produção de etanol, as curvas de xilulose e xilose passam a se manter aproximadamente paralelas. Nota-se, portanto, um claro acúmulo não apenas de xilose, mas também de xilulose nesse

período do processo *SHIF*. Segundo Gong (1983), a 35 °C, a etapa de isomerização obedecerá a relação de equilíbrio de xilose:xilulose de 5:1. A observação de que a relação xilose : xilulose a partir das 8h de reação estavam próximas à esperada para o equilíbrio (4:1) mostra que a etapa de isomerização permaneceu ativa, tanto é que a produção de xilitol e glicerol continuaram aumentando.

Embora *S. cerevisiae* seja capaz de fermentar xilulose, a velocidade de assimilação dessa pentose por parte do microrganismo é consideravelmente inferior comparada a da glicose (SENAC; HAHN-HÄGERDAL, 1990). Nesse sentido, se a limitação da *SHIF* estivesse relacionada à velocidade de fermentação, o aumento da concentração de levedura no reator provocaria o consumo da xilulose disponível e, conseqüentemente deslocaria o equilíbrio, destravando então a reação de forma geral. A fim de verificar essa hipótese, foram realizadas intervenções nos ensaios de *SHIF* para adição de levedura livre ao sistema reacional. Foram adicionados 2 mL de solução de levedura concentrada, elevando a concentração de levedura de 50 g.L⁻¹ para 100 g.L⁻¹. Vale ressaltar que foi necessário transferir as reações para um tubo maior (de um criotubo de 5 mL para um tubo de fundo cônico de 15 mL). Em decorrência das intervenções, os pHs dos meios foram elevados para ~ pH 6,5.

Os comportamentos das reações *SHIF* e *SHIF*-Controle após a intervenção estão apresentadas nas Figuras 7.6 e 7.7, respectivamente. Em ambos os ensaios, a adição de mais células de levedura levou ao consumo da xilose e xilulose disponível no meio reacional. Para a *SHIF*, houve um consumo de 4,9 g.L⁻¹ de xilose e 2,7 g.L⁻¹ de xilulose, sendo a concentração de etanol ao término do processo 8,82 g.L⁻¹. Houve também um aumento da produção de xilitol e glicerol, sendo as concentrações finais de 9,36 g.L⁻¹ e 3,46 g.L⁻¹, respectivamente. A seletividade em etanol reduziu para 0,942 g_{etanol}.g_{xilitol}⁻¹, sendo a produtividade do período de intervenção (20h) de 0,153 g.L⁻¹.h⁻¹ e o fator de rendimento de 0,221 g_{etanol}.g_S⁻¹. O mesmo comportamento foi observado nas reações de *SHIF*-Controle, havendo um consumo de xilose e xilulose no meio reacional, utilizadas principalmente para a produção de xilitol (9,42 g.L⁻¹), etanol (7,80 g.L⁻¹) e glicerol (3,56 g.L⁻¹). A maior produção de xilitol implicou redução da seletividade em etanol (0,828 g_{etanol}.g_{xilitol}⁻¹). Todavia, não houve variação da produtividade após a intervenção, sendo o fator de rendimento de 0,170 g_{etanol}.g_{AF}⁻¹. Nos dois processos, houve um aumento da concentração de ácido acético em solução, sendo a queda do pH do meio reacional mais severa na reação de *SHIF*, causada pela hidrólise inicial dos xilooligômeros. No ensaio controle, onde apenas a ação da β-xilosidase é possível, o aumento da concentração deve ocorrer por conta da fermentação. Ao término do processo, a viabilidade celular de ambos os ensaios foi superior a 95%. Os parâmetros fermentativos encontram-se alistados na Tabela 7. 3.

Tabela 7.3. Parâmetros da *SHIF* e *SHIF*-Controle do licor hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar antes e após a intervenção para adição de mais células de levedura.

| Ensaio | $Y_{\text{Etanol/AF}^*}$ (g.g ⁻¹) | $Y_{\text{Xilitol/AF}^*}$ (g.g ⁻¹) | $Y_{\text{Glicerol/AF}^*}$ (g.g ⁻¹) | $S_{\text{Etanol/Xilitol}}$ (g.g ⁻¹) | Q_{Etanol} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) |
|-----------------|--|---|--|---|--|
| SHIF | 0,153 | 0,111 | 0,009 | 1,388 | 0,240 |
| SHIF-Controle | 0,103 | 0,090 | 0,020 | 1,137 | 0,183 |
| Pós-intervenção | | | | | |
| SHIF | 0,221 | 0,235 | 0,087 | 0,942 | 0,153 |
| SHIF-Controle | 0,170 | 0,206 | 0,078 | 0,828 | 0,170 |

*: Fatores de rendimento calculados em função dos açúcares fermentescíveis (glicose e xilose) consumidos.

Os principais produtos nas duas fermentações foram etanol e xilitol, com formação de glicerol em baixas concentrações. Houve produção de ácido acético devido às reações de fermentação e à liberação dos grupos acetil das ramificações dos xilooligômeros. Embora a formação de etanol tenha ocorrido, houve maior favorecimento à conversão da xilose em xilitol, possivelmente devido ao aumento do pH ou à oxigenação ocorrida durante a troca de tubo na intervenção. A disponibilidade de oxigênio durante o processo de fermentação da xilose e xilulose influencia diretamente na seletividade dos produtos finais (etanol/xilitol) devido ao balanço redox celular (MONTAÑO, 2013).

Os resultados obtidos nessa última *SHIF* mostraram que as intervenções aplicadas nas reações de *SHIF/SHIF*-Controle favoreceram o consumo da xilulose disponível, deslocando o equilíbrio químico, o que permitiu isomerização da xilose acumulada no meio reacional. Esses resultados indicam, pois, que as baixas velocidades da etapa de fermentação possivelmente podem estar provocando a estagnação do processo *SHIF* observada tanto neste trabalho como nos trabalhos realizados anteriormente pelo grupo. No evento dessa hipótese ser verdadeira, uma saída possível seria aumentar a quantidade de células presentes no interior do biocatalisador até o limite máximo, gerando um grânulo de biocatalisador com elevada concentração celular.

Outra possibilidade seria o uso de outro microrganismo para realizar a fermentação, como por exemplo um microrganismo que seja capaz de assimilar a xilose gerada na etapa de hidrólise. O sistema catalítico desenvolvido por Giordano et al. (2014) prevê o possível uso da levedura modificada geneticamente como parte integrante do biocatalisador, possibilitando que a etapa de isomerização seja realizada *in vivo* dentro do processo de produção de etanol 2G. Milessi (2017) obteve elevados rendimentos em ensaios de fermentação utilizando a levedura GSE16-T18, uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae*

modificada para o consumo de xilose, desenvolvida pelo grupo de pesquisa do Prof. Johan M. Thevelein (Leuven, Bélgica) . Essa cepa foi obtida através da inserção de genes de XI de *Clostridium phytofermentans* na levedura *Ethanol Red* (utilizada industrialmente na produção de etanol 1G) por meio de técnicas de análise poligênica e adaptação evolutiva (DEMEKE et al., 2013b).

Nesse sentido, a próxima etapa desse trabalho foi avaliar a influência do uso de levedura recombinante na etapa de fermentação para produção de etanol a partir dos xilooligômeros presentes no licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar.

7.3.3 Ensaios *SHIF* e *SHF* do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar em microreatores

Para o efeito da levedura utilizada na etapa de fermentação, foram utilizadas duas variedades de levedura *Saccharomyces cerevisiae*: a selvagem comercializada pela Itaiquara® (Sc-Ita) e a modificada geneticamente GSE16-T18 (Sc-T18). Com o uso de um microrganismo capaz de assimilar diretamente xilose, não foi necessária adição dos derivados de XI na confecção dos biocatalisadores, sendo utilizado apenas os derivados xilanolítico Multifect (preparado em gel de quitosana-glutaraldeído) e de β -xilosidase (imobilizada em gel agarose-glioxil), ambos preparados em alta carga ($50 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$). As reações realizadas com esse biocatalisador foram denominadas de hidrólise e fermentação simultâneas *SHF* (do inglês *Simultaneous Hydrolysis and Fermentation*).

Ensaios fermentativos foram realizados utilizando o licor hidrotérmico rico em xilooligômeros de bagaço de cana-de-açúcar, contendo $3,11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glicose, $23,09 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de xilose, $15,70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de X_2 , $8,14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de X_3 , $5,16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de X_4 , $1,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de HMF, $0,93 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de furfural e $6,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido acético. É importante ressaltar que esses ensaios foram realizados em caráter preliminar, para comparação das reações de *SHIF* e *SHF* utilizando o licor hidrotérmico. Os ensaios foram realizados em microreatores tampados com via para escape do CO_2 formado ao longo das reações (Figura 7.5), contendo 3 g de biocatalisador e 3 mL de substrato (V_{Total} de 6 mL, considerando-se a densidade dos grânulos de $\sim 1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$). As reações foram realizadas a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação orbital de 150 rpm em *shaker*. As perdas de massa em decorrência do escape do CO_2 formado nas fermentações foram acompanhadas ao longo dos ensaios, sendo os produtos da reação analisados por CLAE apenas após a estabilização das perdas de massa, indicando o término/estagnação da reação. A percentagem mássica de levedura foi aumentada de $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ para $75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ nas duas reações estudadas. A Tabela 7.4 apresenta as composições mássicas e as atividades dos derivados utilizados para a confecção dos grânulos de biocatalisador.

Tabela 7.4. Atividades dos derivados e percentagem mássica dos componentes dos catalisadores da *SHIF* e *SHF*

| Componente | <i>SHIF</i> | | <i>SHF</i> | |
|--|------------------------|---|------------------------|---|
| | % (m.m ⁻¹) | Atividade ^a (U.mL _{Reator} ⁻¹) | % (m.m ⁻¹) | Atividade ^a (U.mL _{Reator} ⁻¹) |
| Xilanase Multifect | 5,0 | 1,40 | 5,0 | 1,40 |
| β -xilosidase <i>B. subtilis</i> | 0,5 | 1,07 | 0,5 | 1,07 |
| Xilose isomerase | 2,0 | 1,49 | 2,0 | ----- ^b |
| <i>S. cerevisiae</i> | 15,0 | ----- ^c | 15,0 | ----- ^d |
| CaCO ₃ | 0,5 | ----- | 0,5 | ----- |
| Alginato de cálcio | 1,0 | ----- | 1,0 | ----- |

^a: As medidas das atividades foram realizadas nas condições de *SHIF*: pH 5,6 a 35 °C;

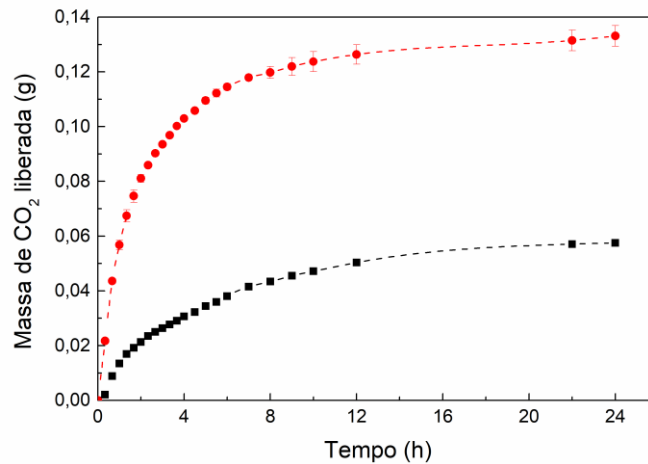
^b: Gel de quitosana-glutaraldeído sem enzima foi utilizado em vez dos derivados;

^c: levedura *S. cerevisiae* selvagem comercial Itaiquara[®];

^d: levedura *S. cerevisiae* modificada geneticamente GSE16-T18.

A Figura 7.8 apresenta os perfis de perda de massa (escape de CO₂) ao longo das reações de *SHIF* e *SHF* do licor hidrotérmico. Embora ambas reações utilizassem o mesmo substrato, é notável o melhor desempenho do processo utilizando o microrganismo recombinante, o que indica a capacidade da levedura fermentar eficientemente tanto a xilose disponível no meio como a gerada na etapa de hidrólise. Para a reação de *SHF*, a perda de massa devido escape de CO₂ ocorreu mais rapidamente nas 4 primeiras horas de reação, passando então a ocorrer mais lentamente até as 24 horas de reação. Observa-se uma perda de massa em decorrência do CO₂ formado na reação de *SHIF*, ocorrendo porém a uma velocidade inferior à observada na *SHF*. Esse comportamento era esperado, haja visto a necessidade da xilose ser isomerizada em xilulose na etapa de isomerização antes de seguir para a fermentação.

Figura 7.8. Massa de CO₂ (g) liberada ao longo do tempo nos processos *SHIF* (■) e *SHF* (●) do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar (35 °C, 150 rpm e pH 5,6). Biocatalisador composto de 5% m.m⁻¹ de derivado xilanólico Multifect, 2,0% m.m⁻¹ de derivado XI e 0,5% % m.m⁻¹ de derivado de β-xilosidase, 10% m.m⁻¹ de *S. cerevisiae* selvagem ou recombinante. Processo realizado a 35 °C e 150 rpm.



Após a estabilização das perdas de massa, os sobrenadantes dos microreatores foram analisados por CLAE e os grânulos de biocatalisador desmanchados para avaliação da viabilidade celular. A Tabela 7.5 apresentam as concentrações dos carboidratos, produtos e o pH medidos após 24h de reação. Observa-se uma melhora considerável em termos de produção etanol, chegando a 15,03 g.L⁻¹ nas reações de *SHF* e 5,87 g.L⁻¹ na *SHIF*. Houve um maior consumo de xilose na reação de *SHF*, restando apenas 6,47 g.L⁻¹ de xilose ao término da reação. A produção de xilitol foi 4,3 vezes superior na reação de *SHIF*; sendo o comportamento inverso quanto ao glicerol formado nas reações. Conforme apresentado na Tabela 7.6, as concentrações de XOS em ambos os ensaios foram semelhantes, sendo ligeiramente superior no ensaio de *SHIF*

Tabela 7.5. Concentrações de carboidratos e produtos formados nas reações de *SHIF* e *SHF*.

| Amostra | Glicose (g.L ⁻¹) | Xilose (g.L ⁻¹) | Xilitol (g.L ⁻¹) | Xilulose (g.L ⁻¹) | Glicerol (g.L ⁻¹) | Ác Acético (g.L ⁻¹) | Etanol (g.L ⁻¹) | pH _{final} |
|-------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| Substrato | 3,11 | 23,09 | 0,00 | 4,33* | 0,11 | 6,70 | 0,00 | 5,69 |
| SHIF Sc-Ita | 0,00 | 29,45 | 4,33 | 6,74 | 0,33 | 10,23 | 5,87 | 5,04 |
| SHIF Sc-T18 | 0,00 | 6,47 | 1,00 | 4,21 | 4,36 | 10,28 | 15,03 | 5,02 |

*: Concentração determinada baseada no pico existente nos cromatogramas do substrato.

Tabela 7.6. Concentrações de xilose e XOS presentes no início e após 24 horas de corrida dos processos *SHIF* (levedura comercial) e *SHF* (levedura recombinante)

| Amostra | Xilose (g.L ⁻¹) | X ₂ (g.L ⁻¹) | X ₃ (g.L ⁻¹) | X ₄ (g.L ⁻¹) |
|-------------|--------------------------------|--|--|--|
| Substrato | 23,09 | 15,70 | 8,14 | 5,16 |
| SHIF Sc-Ita | 29,45 | 12,59 | 9,56 | 5,36 |
| SHIF Sc-T18 | 6,47 | 8,68 | 8,07 | 5,11 |

Os parâmetros de fermentação calculados para os processos *SHIF* e *SHF* encontram-se na Tabela 7.7. Em termos de *SHIF*, as alterações aplicadas na composição do catalisador não levaram à melhora, sendo os fatores de rendimento, seletividade e produtividade próximos aos obtidos no experimento anterior. Por outro lado, a melhora alcançada nos ensaios com a levedura recombinante foi notável. Após 24h, o ensaio com a levedura recombinante consumiu 80% da xilose teoricamente disponível, com uma produtividade maior que a *SHIF* (0,626 g.L⁻¹.h⁻¹), e a seletividade em etanol de 15,014 g_{Etanol}.g_{Xilitol}⁻¹. O rendimento em etanol foi de 0,362 g_{Etanol}.g_{AF}⁻¹, o qual corresponde a 71% do rendimento teórico (0,51 g_{Etanol}.g_{AF}⁻¹).

Tabela 7.7. Parâmetros de fermentação calculados após 24 horas de corrida dos processos *SHIF* (levedura comercial) e *SHF* (levedura recombinante) do licor hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar, realizados em microreatores, a pH 5,6, 35 °C e 150 rpm.

| Ensaio | Y _{Etanol/AF} [*] (g.g ⁻¹) | Y _{Xilitol/AF} [*] (g.g ⁻¹) | Y _{Glicerol/AF} [*] (g.g ⁻¹) | S _{Etanol/Xilitol} (g.g ⁻¹) | Q _{Etanol} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) |
|-------------|---|--|---|---|--|
| <i>SHIF</i> | 0,142 | 0,104 | 0,008 | 1,356 | 0,202 |
| <i>SHF</i> | 0,362 | 0,024 | 0,105 | 15,014 | 0,626 |

*: Fatores de rendimento calculados em função dos açúcares fermentescíveis (glicose e xilose) consumidos.

Ao final dos processos, a viabilidade celular da levedura comercial Sc-Ita foi de 95% e da recombinante Sc-T18 de 30%. Esses resultados indicam que embora a levedura geneticamente modificada tenha melhorado a produção de etanol, mesmo imobilizada, teve grande perda de viabilidade celular ao longo das 24h de reação. Uma desvantagem da modificação genética da levedura para fermentar xilose é a perda de características importantes, como por exemplo a robustez da levedura parental ao ácido acético e ao etanol (DEMEKE et al., 2013b; MILESSI, 2017). É provável então que a elevada concentração de ácido acético inicialmente presente no licor hidrotérmico utilizado como substrato (6,70 g.L⁻¹) tenha afetado as leveduras, especialmente a Sc-T18.

A presença de ácido acético nos hidrolisados lignocelulósicos, liberados no pré-tratamento da biomassa ou ao longo das reações de hidrólise, pode reduzir significativamente a capacidade fermentativa da levedura. O ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, furfural e hidroximetil furufural (HMF) são frequentemente listados como inibidores de microrganismos fermentativos. O ácido acético é um ácido fraco (pKa de 4,76 a 25 °C), cuja forma protonada é capaz de se difundir através da membrana plasmática e chegar ao citosol (KRISCH; SZAJANI, 1997). Em decorrência do pH neutro intracelular, o ácido se dissocia em íons acetato e H⁺, provocando a redução do pH intracelular e prejudicando a síntese de DNA, RNA e o funcionamento das enzimas intracelulares (SWINNEN et al., 2014). A redução do pH intracelular é contornada pelo bombeamento dos prótons pela enzima ATPase de membrana, às custas da hidrólise de adenosina trifosfato (ATP). Concentrações suficientemente elevadas podem ocasionar esgotamento da capacidade de bombeamento de prótons, levando a acidificação do meio intracelular, com consequente perda de viabilidade celular (VIEGAS; SA-CORREIA, 1991). Segundo Pampulha e Loureiro-Dias (1989), a presença de etanol potencializa o efeito do ácido acético como inibidor da fermentação e de agente responsável pela acidificação intracelular.

Em ambos os processos, pode-se notar a queda do pH do meio reacional, reduzindo de 5,6 para ~5,0 nos dois casos. De fato, ao longo de todos os ensaios *SHIF/SHF* realizados pelo grupo LABENZ esse foi um problema recorrente. Segundo Chiang et al. (1981), a produção de etanol por *S. cerevisiae* em temperatura menor ou igual a 35 °C deve ser realizada em pHs ácidos, uma vez que a operação em pHs próximos ao neutro (6,0 – 7,0), em temperaturas até 35 °C, favorece a geração de coprodutos como xilitol e glicerol. Do ponto de vista do favorecimento da seletividade em etanol das reações, a queda do pH ao longo da reação poderia até ser vantajosa. Contudo, conforme explicado por Nigam (2001), os estudos de fermentação devem ser conduzidos a um pH de cerca de 2 unidades superior ao valor de pKa do ácido acético (4,76 a 25 °C) para minimizar a efeito inibitório dele.

As etapas reacionais que precedem a fermentação também devem ser consideradas. Conforme discutido nos CAPÍTULO 4 e **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, os derivados utilizados nas etapas de hidrólise contendo endoxilanasas e β -xilosidase apresentam máxima atividade catalítica em pH 5,5 e 8,0, respectivamente. A XI possui a máxima atividade catalítica em pH 8,0, havendo uma redução significativa de atividade nas condições de *SHIF* (ver CAPÍTULO 6). Assim, enquanto a queda do pH favorecerá a atividade da endoxilanasase e a seletividade em etanol, os desempenhos da β -xilosidase e da XI serão seriamente comprometidos. Desta forma, fica claro que o pH utilizado nas reações é uma relação de compromisso entre as exigências das enzimas e da levedura.

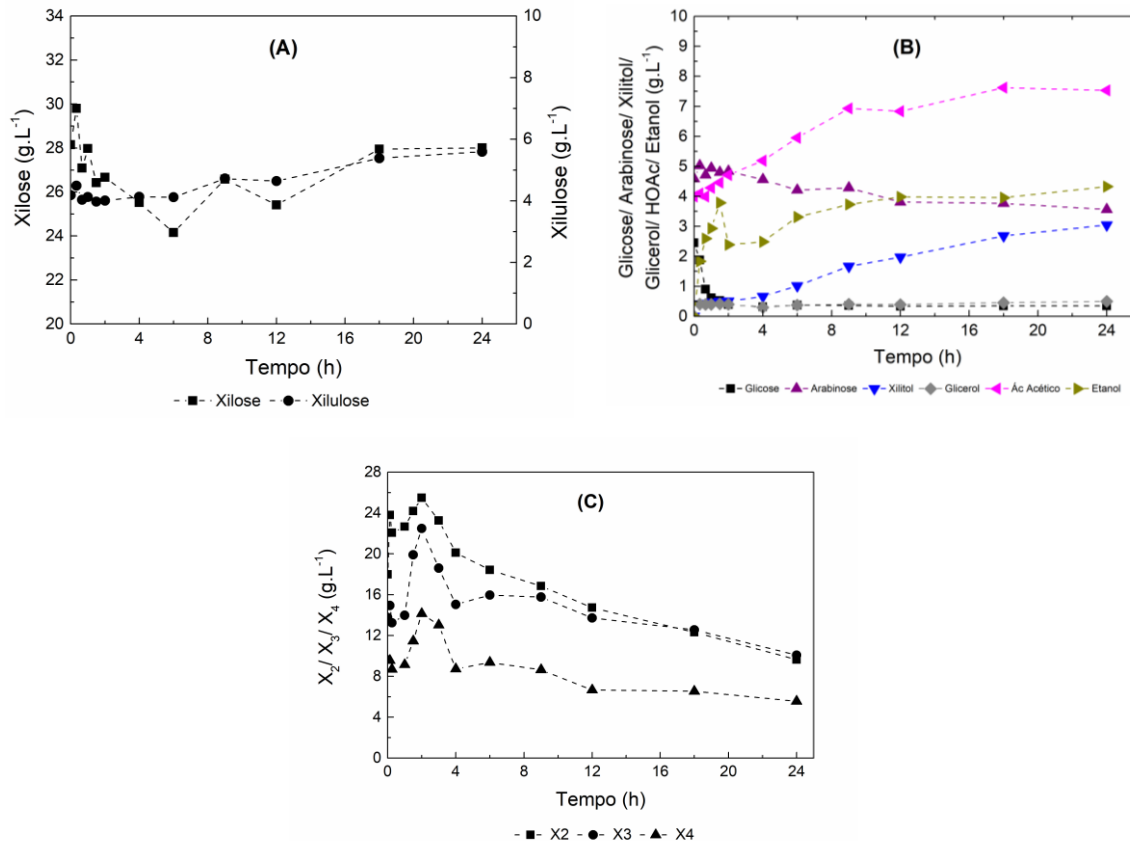
7.3.4 Ensaio *SHIF* e *SHF* do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fixo com recirculação e controle de pH

Segundo Aquino (2013), a adição de CaCO_3 na composição dos grânulos é importante para manutenção do pH intrapartícula. Contudo, as quedas de pH dos sobrenadantes, observada nos ensaios anteriores, também ocorre no interior dos grânulos de catalisador. Considerando os efeitos prejudiciais causados pela queda do pH ao sistema reacional das reações *SHIF/SHF*, uma possível estratégia a ser utilizada seria o monitoramento e controle do pH em um valor pré-estabelecido.

Ensaio *SHIF* foram realizados em reator de leito fixo operando com recirculação do meio reacional (ver Figura 7.3.A). O licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar rico em xilooligômeros era bombeado a uma vazão de $3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (fluxo ascendente) ao reator encamisado com volume útil de 100 mL dotado de uma tela para contenção dos grânulos (Figura 7.3.B), sendo o tempo de residência de 33 min. O reator foi preenchido com 50 g de biocatalisador e alimentado com 100 mL de substrato, resultando na proporção $V_{\text{biocatalisador}} : V_{\text{substrato}} 1:2$. Após passar pelo leito formado pelos grânulos de biocatalisador, o sobrenadante era direcionado para tubo reservatório (coletor) e então fluía por ação da gravidade para o reator de ajuste de pH, também encamisado mantido sob agitação magnética constante. O pHstato ligado ao reator monitorou continuamente o pH (fixado em 5,6), ajustando-o automaticamente para o valor programado pela adição de solução de $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Os ensaios de *SHIF* foram realizados utilizando os grânulos de biocatalisador confeccionados segundo as composições detalhadas na Tabela 7.4. As reações foram conduzidas a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e acompanhadas ao longo de 24h. O substrato foi o mesmo licor hidrotérmico utilizado nas reações anteriores (ver Seção 7.3.3). A Figura 7.9 apresenta os perfis de consumo do substrato e formação de produtos ao longo da reação.

Figura 7.9. Concentrações de (A) xilose e xilulose (g.L^{-1}), e de (B) glicose, arabinose, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol (g.L^{-1}) e de (C) XOs (g.L^{-1}) ao longo do tempo (h) no ensaio *SHIF*, com controle de pH, do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar. Biocatalisador composto dos derivados Multifect ($5\% \text{ m.m}^{-1}$), β -xilosidase ($0,5\% \text{ m.m}^{-1}$), XI ($2,0\% \text{ m.m}^{-1}$) e $15\% \text{ m.m}^{-1}$ de levedura *Sc-lta*. Ensaio realizado a 35°C e pH 5,6.



Houve pouca variação da concentração de xilose ao longo da reação, estando por volta de $26,5 \text{ g.L}^{-1}$ após 24h. A xilulose em solução apresentou um comportamento similar ao da xilose, sendo a concentração média de $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ ao longo do ensaio. Xilitol e glicerol foram produzidos ao longo da reação, $3,05$ e $0,51 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente; sendo ambas concentrações inferiores às registradas no ensaio realizado nos microreatores. Todavia, houve pouca melhoria em termos de produção de etanol, sendo a máxima concentração alcançada de $4,70 \text{ g.L}^{-1}$. Conforme apresentado na Figura 7.9.C, não ocorreu estabilização de hidrólise dos XOs ao longo da reação, indicando que a enzima β -xilosidase permaneceu ativa.

A Tabela 7.8 alista os parâmetros da fermentação calculados para a *SHIF* com controle de pH. Nota-se que houve pouca diferença em comparação aos ensaios realizados de *SHIF* nos microreatores; sendo apenas o fator de rendimento em etanol ligeiramente superior. Nakata, Miyafuji e Saka (2009) estudaram a produção de etanol de faia do Japão (*Fagus crenata*) pré-tratada hidrotérmicamente utilizando as enzimas β -xilosidase de *Trichoderma viride*, XI de *Streptomyces murinus* e *S. cerevisiae*. Nota-se a ausência de enzimas endoxilanases, estando a etapa de hidrólise limitada à ação β -xilosidase nas

extremidades não redutoras. Segundo os autores, os melhores resultados (0,62 g.L⁻¹ de etanol, 13% do rendimento teórico) foram obtidos em pH 5,0, 30°C após 100h. Portanto, o biocatalisador contendo enzimas imobilizadas e leveduras co-encapsuladas que foi estudado nesse trabalho foi significativamente mais eficiente do que o uso de enzimas e microrganismos em sua forma solúvel, levando a um melhor rendimento e produtividade.

Tabela 7.8. Parâmetros de fermentação da *SHIF* com controle de pH do licor hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar realizadas em reator de leito fixo a 35 °C.

| Ensaio | Y _{Etanol/AF} [*] (g.g ⁻¹) | Y _{Xilitol/AF} [*] (g.g ⁻¹) | Y _{Glicerol/AF} [*] (g.g ⁻¹) | S _{Etanol/Xilitol} (g.g ⁻¹) | Q _{Etanol} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) |
|--------|---|--|---|---|--|
| SHIF | 0,182 | 0,118 | 0,020 | 1,539 | 0,196 |

*: Fatores de rendimento calculados em função dos açúcares fermentescíveis (glicose e xilose) consumidos.

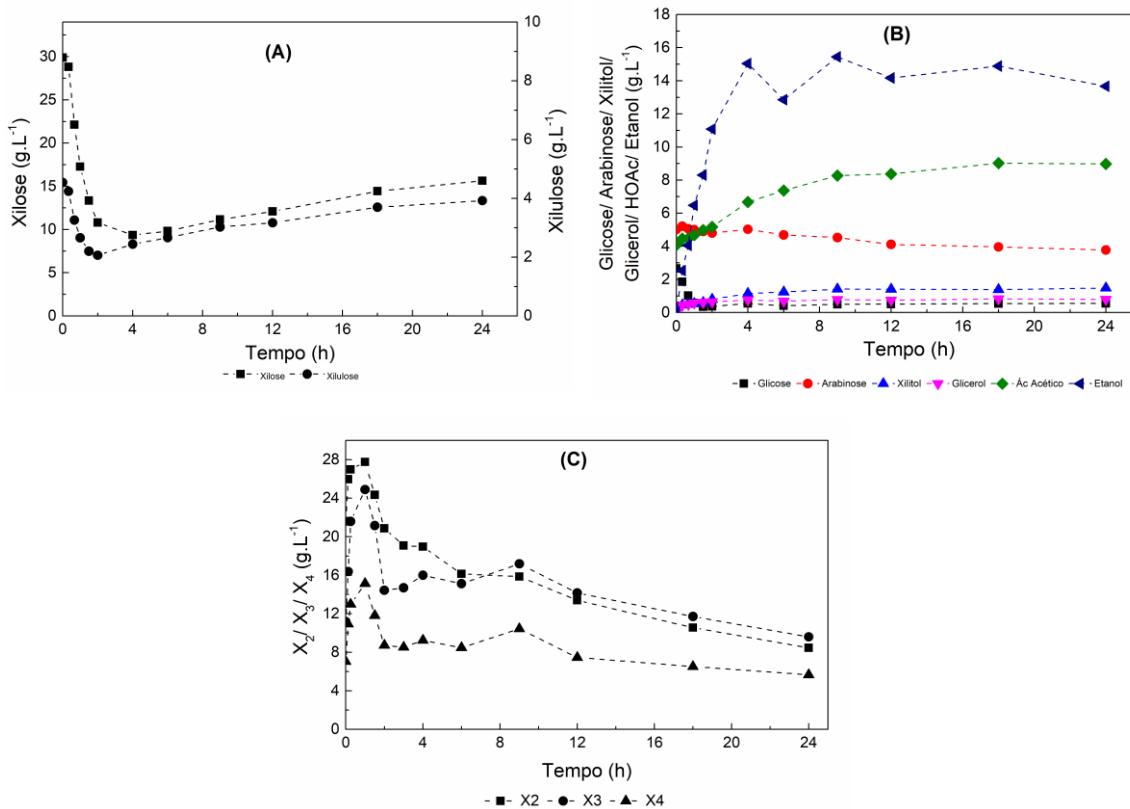
Todavia, não se observou melhoras significativas em relação aos resultados descritos por Milessi-Esteves et al. (2019) para a *SHIF* de bétula suplementada com íons Mg²⁺, utilizando um biocatalisador contendo derivados de xilanase Multifect, XI e levedura de *S. cerevisiae* Itaiquara® encapsulados em gel de alginato de cálcio, operando a 32 °C e pH 5,6. Segundo os autores, a produção de etanol no processo foi de 3,1 g.L⁻¹ após 12h de reação, com Y_{P/S} de 0,39 g.g⁻¹ e seletividade em etanol de 3,12 g_{etanol}.g_{xilitol}⁻¹. É perceptível a similaridade entre os resultados obtidos aqui com aquele trabalho, tanto em termos de concentração de etanol produzido bem como no acúmulo de xilose no meio reacional ao longo da reação. Embora os autores não apresentem a concentração de xilulose no sobrenadante, os resultados da *SHIF* desse trabalho mostraram que xilose e xilulose encontravam-se em concentrações próximas ao equilíbrio, ou seja, a velocidade de isomerização, mesmo a pH em torno de 5,5 e a 35 graus, ainda é mais rápida que a de fermentação de xilulose, controladora do processo.

Outro fenômeno a ser estudado é a mudança no metabolismo da levedura comercial, que sempre parece ocorrer após poucas horas de fermentação, iniciando-se a produção de xilitol concomitante à de etanol, o que reduz a produção de etanol. Em ensaios *SIF* já foi observado que a seletividade etanol/xilitol sempre é mais alta para concentrações mais altas de xilulose. Esses resultados apontam assim para outro desafio: uma vez as condições operacionais para total conversão de xilooligômeros forem definidas, o foco deverá ser mantido no problema da seletividade etanol/xilitol.

Por outro lado, o uso do controle de pH melhorou os resultados da *SHF*. As reações foram realizadas no mesmo sistema e condições utilizados para a *SHIF*: 50 g de biocatalisador (5% m.m⁻¹ derivados Multifect, 0,5% m.m⁻¹ β-xilosidase, 2,0% m.m⁻¹ XI e 15% m.m⁻¹ de levedura *Sc-Ita*), a 35 °C e pH 5,6. O substrato foi o mesmo licor hidrotérmico

utilizado nas reações anteriores (ver Seção 7.3.3). Os perfis de consumo do substrato e formação de produtos ao longo da reação estão apresentados na Figura 7.10. Após 24h de reação foram produzidos 13,39 g.L⁻¹ de etanol e apenas 1,46 g.L⁻¹ de xilitol e 0,79 g.L⁻¹ de glicerol. Evidentemente, a levedura recombinante deve ter sido manipulada para resolver também o problema da produção indesejada de xilitol. O perfil de XOS encontra-se apresentado na Figura 7.10.B. Nota-se que a β -xilosidase continuou ativa ao longo da reação, sendo as cadeias de XOS hidrolisadas a xilose durante todo o processo.

Figura 7.10. Concentrações de (A) xilose, xilulose (g.L⁻¹) e de (B) glicose, arabinose, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol (g.L⁻¹) e de (C) XOS (g.L⁻¹) ao longo do tempo (h) ao longo do ensaio *SHF* com controle de pH do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar. Biocatalisador composto dos derivados Multifect 5% m.m⁻¹, β -xilosidase 0,5% m.m⁻¹, XI 2,0% m.m⁻¹ e 15% m.m⁻¹ de levedura *Sc-T18*. Ensaio realizado em reator de leito fixo com recirculação a 35 °C pH 5,6.



A Tabela 7.9 apresenta os parâmetros de fermentação para o processo *SHF* com controle de pH. Observa-se um aumento expressivo da seletividade em etanol, sendo 6,8 vezes superior ao da reação sem controle de pH realizada nos microreatores, confirmando que com a levedura recombinante não há problema de seletividade etanol/xilitol. A produção de glicerol também foi inferior, sendo de apenas 0,021 g.L⁻¹ após 24h. Observa-se também que após 12 horas, a levedura recombinante também para de produzir etanol: a hidrólise de xilooligômeros continua, mas a concentração de xilose e de xilulose aumentam, indicando

continuidade da ação (aqui desnecessária) de XI, sendo claramente a levedura a responsável pela estagnação da produção de etanol. O fator de rendimento em etanol foi ligeiramente superior ao dos ensaios anteriores, sendo de $0,362 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_s^{-1}$, representando 77% do rendimento teórico.

Tabela 7.9. Parâmetros de fermentação da SHF com controle de pH do licor hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar a 35 °C.

| Ensaio | $Y_{\text{Etanol/AF}}^*$ (g.g ⁻¹) | $Y_{\text{Xilitol/AF}}^*$ (g.g ⁻¹) | $Y_{\text{Glicerol/AF}}^*$ (g.g ⁻¹) | $S_{\text{Etanol/Xilitol}}$ (g.g ⁻¹) | Q_{Etanol} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) |
|--------|--|---|--|---|--|
| SHF | 0,391 | 0,038 | 0,021 | 9,181 | 0,558 |

*: Fatores de rendimento calculados em função dos açúcares fermentescíveis (glicose e xilose) consumidos.

Os resultados da SHF podem ser comparados com os reportados para a reação de fermentação e isomerização simultâneas (SIF, do inglês *Simultaneous Isomerization and Fermentation*). Silva et al. (2012) estudaram a SIF de 65 g.L⁻¹ de xilose a 30 °C, usando um biocatalisador contendo $32,5 \times 10^3 \text{ UI} \cdot \text{L}^{-1}$ XI** e 20 g.L⁻¹ de levedura co-imobilizada em gel de alginato de cálcio, obtendo 12,0 g.L⁻¹ de etanol, 1,46 g.L⁻¹ de xilitol, 2,5 g.L⁻¹ de glicerol e 1,9 g.L⁻¹ de ácido acético (acetato) em 48h de reação. No entanto, a etapa de isomerização foi um fator limitante devido à queda do pH de 5,3 (inicial) para 4,8 (final). Milessi et al. (2018) incorporaram CaCO₃ nos grânulos de biocatalisador SIF para controlar o pH do processo. Os biocatalisadores foram preparados com 20% de XI imobilizada em quitosana e 10% de levedura. Observaram-se então rendimento em etanol de $0,35 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilose}}^{-1}$ (69% do rendimento teórico) e 2 g.L⁻¹.h⁻¹ de produtividade. No entanto, em ambos os estudos o longo tempo necessário para *S. cerevisiae* fermentar a xilulose torna o processo de SIF vulnerável à contaminação por bactérias capazes de metabolizar a xilose.

A utilização de CaCO₃ se mostrou eficiente para o controle de pH no processo SIF (MILESSI et al., 2018), mas não conseguiu impedir a queda do pH quando a hidrólise de XOS foi incorporada ao processo (SHIF e SHF). Foi assim necessário controle do pH para eliminar essa variável no estudo. Esse controle do pH melhorou os resultados nos dois processos onde ocorria hidrólise de XOS - SHIF e SHF, mas o acúmulo de xilose e xilulose continuou ocorrendo em ambos, com conversão incompleta de substrato e estagnação na produção de etanol.

A possibilidade do acúmulo observado estar ligado à queda da viabilidade celular foi descartada após as análises de viabilidade celular: as leveduras de SHIF (Sc-Ita) estavam acima de 90%, enquanto as da SHF (Sc-T18) eram de 50%. Embora as condições de ensaio

** Atividade determinada pelas velocidades iniciais de isomerização de frutose a glicose em pH 7,0 a 60°C.

tenham afetado mais significativamente o OGM, a melhor produção de etanol ainda foi obtida com esse biocatalisador. A elevada viabilidade celular da *S. cerevisiae* selvagem, após longos períodos de reação, já era esperada, considerando a robustez dessa levedura amplamente utilizada na produção de etanol 1G (RAO et al., 2008).

Os ensaios realizados até agora permitiram um grande aumento do conhecimento desses complexos processos, *SHIF* e *SHF*, mas, infelizmente, ainda não se sabe o porquê do interrompimento da produção de etanol nos ensaios *SHIF* após algumas horas de reação, e portanto, não se conseguiu ainda destravar o processo. Esse problema não ocorreu nem nos ensaios *SIF* reportados por Silva (2013) e Aquino (2013), nem nos realizados como controle da ação do biocatalisador, todos eles alcançando conversões de xilose próximas de 100%.

Evidentemente a etapa de hidrólise afeta uma das etapas seguintes. Os estudos já realizados e mostrados nos capítulos anteriores e neste indicam que a isomerização, mesmo que mais lenta, continua ocorrendo, bem como a hidrólise. Apenas nos últimos ensaios, iniciaram-se estudos para investigar possíveis inibidores da etapa fermentativa, surgidos devido à hidrólise os XOS.

Uma possível justificativa seria o aumento da concentração de ácido acético no sobrenadante ao longo das reações de *SHIF* e *SHF*. Conforme discutido na Seção 7.3.3, a presença de ácido acético tem um efeito negativo sobre a reação de fermentação, causando a inibição e pode até levar à perda de viabilidade celular. O ácido acético é um ácido fraco gerado pela desacetilação da hemicelulose durante o pré-tratamento. O substrato utilizado apresentava inicialmente $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético, aumentando para $7,5$ e $9,0 \text{ g.L}^{-1}$ na *SHIF* e *SHF*, respectivamente. Esse aumento da concentração de ácido está provavelmente associado à liberação dos grupos acetil ramificados às cadeias de xilooligômeros ao longo da etapa de hidrólise.

O sistema utilizado nos experimentos *SHIF/SHF* mostrou-se capaz de manter o pH reacional no valor de 5,6, que é maior que o pKa do ácido acético ($4,76$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$), estando então as moléculas de ácido acético presentes em grande quantidade na forma de ânion de acetato. O ânion acetato não pode penetrar na levedura, mas a grande quantidade produzida implica aumento da quantidade da forma protonada e nociva. Essa substância, portanto, poderia estar afetando o consumo de xilose/xilulose pelas duas leveduras testadas. A confirmação dessa hipótese irá requerer estudos mais aprofundados, através da realização de ensaios de fermentação de xilulose na presença de diferentes concentrações de ácido acético utilizando a levedura selvagem.

Uma das formas de se contornar os efeitos do ácido acético seria aumentar o pH de reação para o valor de $7,0$, garantindo-se assim que a moléculas de ácido acético estarão majoritariamente presentes na forma ânions de acetato, de menor toxicidade para as leveduras (MOLLAPOUR; SHEPHERD; PIPER, 2009; NIGAM, 2001). Essa estratégia poderia

ser viável para a levedura recombinante, que tem alta seletividade etanol/xilitol, mas não é interessante para a levedura não modificada, para a qual essa seletividade diminui com o aumento do pH (CHIANG et al., 1981).

Outra alternativa seria o uso de um licor rico em xilooligômeros com menores teores ou isento de grupos acetil ramificados. Dentre os pré-tratamentos estudados neste trabalho (ver CAPÍTULO 2), o tratamento alcalino da biomassa com solução de NaOH 4% (m.v⁻¹) em autoclave (121 °C, 1 atm, 1h) apresentou elevada solubilização da hemicelulose sem degradação dos XOS (NASCIMENTO et al., 2016). Agentes alcalinos como NaOH são capazes de hidrolisar as ligações éster entre a hemicelulose e compostos parietais, removendo eficientemente os grupos acetil ligados à cadeia principal (BIAN et al., 2012; BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; JACOBS; DAHLMAN, 2001). Todavia, é fundamental a realização de etapas adicionais de tratamento do substrato no sentido de remoção da lignina solubilizada e de íons acetato formados durante o pré-tratamento.

7.4 Conclusão

Etanol foi produzido a partir do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar rico em xilooligômeros utilizando o processo de hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas (*SHIF*), mas observou-se ocorrer interrupção dessa produção após algumas horas. Passou-se então a se investigar as possíveis causas dessa estagnação. Ensaio preliminares utilizando a xilana de eucalipto mostraram que a suplementação do biocatalisador com derivados β -xilosidase era necessária a fim de aumentar a produção de xilose e reduzir o acúmulo de xilobiose/xilotriose no meio reacional, pois a quantidade dessa enzima já existente no complexo xilanolítico Multifect não era suficiente. Isso foi feito, utilizando-se um biocatalisador com a seguinte composição: 7,5% m.m⁻¹ xilanolítico Multifect, 2,5% m.m⁻¹ de β -xilosidade, 10% m.m⁻¹ de XI co-imobilizados com 10% m.m⁻¹ de *S.cerevisiae* em gel de alginato de cálcio. O substrato usado passou a ser o licor hidrotérmico de bagaço de cana. Embora a adição tenha resolvido o problema de acúmulo de xilobiose, a produção de etanol permaneceu baixa (2,5 g.L⁻¹) e acreditava-se que a baixa atividade do complexo xilanolítico que foi utilizada podia ser responsável por esses resultados. Decidiu-se então modificar a composição do biocatalisador, em função das atividades das enzimas.

O novo biocatalisador testado no ensaio *SHIF* teve aumento na quantidade de endoxilanasas: 10,2% m.m⁻¹ de derivado endoxilanse, 0,5% m.m⁻¹ de derivado XI, 0,43% m.m⁻¹ de derivado de β -xilosidase e 10% m.m⁻¹ de *S. cerevisiae*. Observou-se então uma pequena melhora na produção de etanol nos ensaios *SHIF* do licor hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar, obtendo-se 5,76 g.L⁻¹ de etanol em 24h. Contudo, o acúmulo de xilose e xilulose voltou a ocorrer. Intervenção no processo, com adição de leveduras livres, com

aumento da concentração de levedura no reator (de 50 g.L⁻¹ para 100 g.L⁻¹), alavancaram a produção de etanol para 8,82 g.L⁻¹, elevando o rendimento de 0,153 para 0,221 g_{etanol}.g_{AF}⁻¹ (43% do teórico). Esses resultados foram a primeira indicação de que a etapa de fermentação poderia ser a responsável pela interrupção do processo, havendo necessidade de aumento da concentração de leveduras na composição de biocatalisador.

Novo ensaio *SHIF* utilizando o biocatalisador com 15% de levedura (5,0% m.m⁻¹ de derivado endoxilânase, 2,0% m.m⁻¹ de derivado XI, 0,5% m.m⁻¹ de derivado de β-xilosidase e 15% m.m⁻¹ de *S. cerevisiae*) não mostrou variação significativa em termos de produção de etanol (5,87 g.L⁻¹ após 24h), havendo novamente acúmulo de xilose e xilulose no meio reacional.

Realizou-se, em paralelo, um ensaio com um novo biocatalisador: ao invés da levedura comercial foi encapsulada com os derivados enzimáticos a levedura *S. cerevisiae* geneticamente modificada (GSE16-T18) capaz de assimilar xilose (não requerendo, portanto, ação de XI). Esse novo biocatalisador conseguiu elevar consideravelmente a produção de etanol, chegando a 15,03 g.L⁻¹, já em 12 horas, com rendimento de 0,362 g_{etanol}.g_{AF}⁻¹ (71% do rendimento teórico). Contudo, também nesses ensaios não houve conversão completa de substrato, observando-se ainda acúmulo de xilose, embora inferior à observada na *SHIF*. Outra importante observação foi uma acentuada redução do pH do meio reacional de 5,6 para ~5,0, tanto no ensaio de *SHIF* como na *SHF*, que, provavelmente, era devida à expressiva formação de ácido acético nas etapas de hidrólise.

Decidiu-se, então, controlar o pH no ensaio seguinte para eliminar essa variável do estudo. No ensaio realizado em reator de leito fixo, o pH foi mantido no valor de 5,6. No processo *SHIF* obteve-se estagnação da concentração de etanol por volta de 4g/L, rendimento de 0,18 g_{etanol}.g_{AF}⁻¹ (36% do rendimento teórico), produtividade de 0,2 g.L⁻¹.h⁻¹ em 24 horas, seletividade de 1,54 g_{etanol}.g_{xilitol}⁻¹. As análises dos sobrenadantes mostraram uma elevada concentração de xilose e xilulose, estando as concentrações próximas da relação de equilíbrio.

Os melhores resultados foram obtidos no processo *SHF* (com *S. cerevisiae* T18), atingindo-se 14 g/L em 12 horas (rendimento foi de 0,39 g_{etanol}.g_{AF}⁻¹ (77% do rendimento teórico), seletividade de 9,18 g_{etanol}.g_{xilitol}⁻¹ e produtividade de 0,56 g.L⁻¹.h⁻¹, em 24 h). Ao final dos ensaios, 95% da levedura selvagem permaneceu viável, restando apenas 50% da modificada geneticamente. A estagnação da produção foi causada por morte celular. O que quer que esteja afetando a levedura, impede-a especificamente de continuar a consumir xilose/xilulose. Ácido acético é conhecido inibidor de fermentação e é formado em altas concentrações na etapa de hidrólise de XOS, sendo assim um bom candidato a inibidor dos processos *SHIF* e *SHF*.

7.5 Referências

- AQUINO, P. M. **Produção de etanol a partir de xilose com glicose isomerase e *Saccharomyces cerevisiae* coimobilizadas em gel de alginato**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.
- BIAN, J. et al. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 638–645, 2012.
- BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, 2016.
- 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.
- BUDRIENE, S. et al. β -Galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. **Central European Journal of Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 95–105, 2005.
- CANILHA, L. et al. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–15, 2012.
- CARPIO, L. G. T.; SIMONE DE SOUZA, F. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions. **Renewable Energy**, v. 111, p. 771–780, 2017.
- CERQUEIRA LEITE, R. C. DE et al. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**, v. 34, n. 5, p. 655–661, 2009.
- CHIANG, L. C. et al. d-Xylulose Fermentation to Ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 42, n. 2, p. 284–9, 1981.
- DEMEKE, M. M. et al. Combining inhibitor tolerance and D-xylose fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulose-based bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 120, 2013.
- DIOGO, J. A. et al. Development of a chimeric hemicellulase to enhance the xylose production and thermotolerance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 69, p. 31–37, 2015.
- DISCHE, Z.; BORENFREUND, E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *The Journal of biological chemistry*, v. 192, n. 2, p. 583–7, 1951.
- DOS SANTOS, L. V. et al. Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 40–57, 2016.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z.; HEINZE, T. Hemicellulose. In: HEINZE, T. (Ed.). **Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. p. 1–67.

Fundação Universidade Federal de São Carlos. GIORDANO, R. L. C. et al. **Sistema catalítico e processo de obtenção de bioetanol 2g a partir de xilana/oligômeros de xilose**. BR n. PI BR 10 2014 023395 4 A2. 19 set. 2014.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, jul. 2010.

GONG, C. S. Recent Advances in D-Xylose Conversion by Yeasts. In: **Annual Reports on Fermentation Processes**. Tsao, G. T. (Ed.). New York: Academic Press, 1983. p. 253–297.

GUISÁN, J. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 6, p. 375–382, 1988.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 11, p. 933–943, 1994.

HECTOR, R. E. et al. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism requires gluconeogenesis and the oxidative branch of the pentose phosphate pathway for aerobic xylose assimilation. **Yeast** (Chichester, England), v. 28, n. 9, p. 645–60, 2011.

JACOBS, A.; DAHLMAN, O. Characterization of the Molar Masses of Hemicelluloses from Wood and Pulps Employing Size Exclusion Chromatography and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 3, p. 894–905, 2001.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 320–326, 2006.

KRISCH, J.; SZAJANI, B. Ethanol and acetic acid tolerance in free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti*. B. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 6, p. 525–528, 1997.

MANZANARES, P. Integrated hydrolysis, fermentation and co-fermentation of lignocellulosic biomass. In: WALDRON, K. (Ed.). **Bioalcohol Production: Biochemical conversion of lignocellulosic biomass**. Swaston: Woodhead Publishing, 2010. p. 205–223.

MILESSI-ESTEVEZ, T. et al. An Innovative Biocatalyst for Continuous 2G Ethanol Production from Xylo-Oligomers by *Saccharomyces cerevisiae* through Simultaneous Hydrolysis, Isomerization, and Fermentation (SHIF). **Catalysts**, v. 9, n. 3, p. 225, 2019.

MILESSI, T. S. et al. Influence of key variables on the simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose by a native *Saccharomyces cerevisiae* strain co-encapsulated with xylose isomerase for 2G ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 277–283, 2018.

MILESSI, T. S. S. **Produção de etanol 2g a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente modificada imobilizadas**. 2017. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

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

MOLLAPOUR, M.; SHEPHERD, A.; PIPER, P. W. Presence of the Fps1p aquaglyceroporin channel is essential for Hog1p activation, but suppresses Slr2(Mpk1)p activation, with acetic acid stress of yeast. **Microbiology**, v. 155, n. 10, p. 3304–3311, 1 2009.

MONTAÑO, I. D. C. **Aplicação de técnicas de modelagem e simulação para a produção de etanol de segunda geração**. 2013. 126 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

NAKATA, T.; MIYAFUJI, H.; SAKA, S. Ethanol production with β -xylosidase, xylose isomerase, and *Saccharomyces cerevisiae* from the hydrolysate of Japanese beech after hot-compressed water treatment. **Journal of Wood Science**, v. 55, n. 4, p. 289–294, 2009.

NASCIMENTO, V. M. et al. Alkaline pretreatment for practicable production of ethanol and xylooligosaccharides. **Bioethanol**, v. 2, n. 1, 2016.

NELSON, D. D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6. ed. New York: W.H. Freeman, 2008. 1250 p.

NIGAM, J. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 17–27. 2001.

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31–31, n. 5–6, p. 547–550, 1989.

PEREIRA, G. H. A. **Estudo da imobilização multipontual da penicilina G acilase em sílica ativada com grupos glioxil**. 1996. 78f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.

RAO, K. et al. A Novel Technique that Enables Efficient Conduct of Simultaneous Isomerization and Fermentation (SIF) of Xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, n. 1–3, p. 101–117, 2008.

REIDER APEL, A. et al. Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose/xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 19512, 2016.

SENAC, T.; HAHN-HÄGERDAL, B. Intermediary Metabolite Concentrations in Xylulose- and Glucose-Fermenting *Saccharomyces cerevisiae* Cells. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 1, p. 120–6, 1990.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering: Basic concepts**. 2 ed ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 576 p.

SILVA, C. R. et al. An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor. **Enzyme and microbial technology**, v. 50, n. 1, p. 35–42, 2012.

SILVA, C. R. **Produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana usando glicose isomerase coimobilizada com *Saccharomyces cerevisiae***. 2013. 138 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

SWINNEN, S. et al. The fraction of cells that resume growth after acetic acid addition is a strain-dependent parameter of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 4, p. 642–653, jun. 2014.

TOIVARI, M. H. et al. Endogenous Xylose Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3681–3686, 2004.

TROVATI, J.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Improving the Performance of a Continuous Process for the Production of Ethanol from Starch. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 156, n. 1–3, p. 76–90, 2009.

VIEGAS, C. A.; SA-CORREIA, I. Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. **Journal of General Microbiology**, v. 137, n. 3, p. 645–651, 1991.

ZHANG, T. et al. Bioethanol production from hydrolysates of inulin and the tuber meal of Jerusalem artichoke by *Saccharomyces sp. W0*. **Bioresource technology**, v. 101, n. 21, p. 8166–70, 2010.

CAPÍTULO 8: ESTUDOS PRELIMINARES DOS DESEMPENHOS DE COMPLEXOS COMERCIAIS E DE XILANASE PRODUZIDOS IN-HOUSE PARA A HIDROLISE DA BIOMASSA HEMICELULÓSICA

8.1 Introdução

O conceito de refinaria integrada tem direcionado muita atenção ao aproveitamento da fração hemicelulósica da biomassa vegetal, uma vez que os produtos obtidos apresentam grande aplicação para a produção de biocombustíveis, bioenergia além de várias biomoléculas de alto valor agregado como xiloligossacarídeos (XOS) (MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

A xilana é o principal componente da hemicelulose (EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000). Esse heteropolímero é formado predominantemente de D-xilose, embora também possa conter L-arabinose, D-galactose, grupos acetil, feruloil e urônicos, (GÍRIO et al., 2010). A quantidade de cada componente varia de espécie para espécie e até mesmo da planta para a planta. Portanto, a hemicelulose não é um composto químico bem definido, mas uma classe de componentes poliméricos de fibras vegetais (BAJPAI, 2014a; POLIZELI et al., 2005).

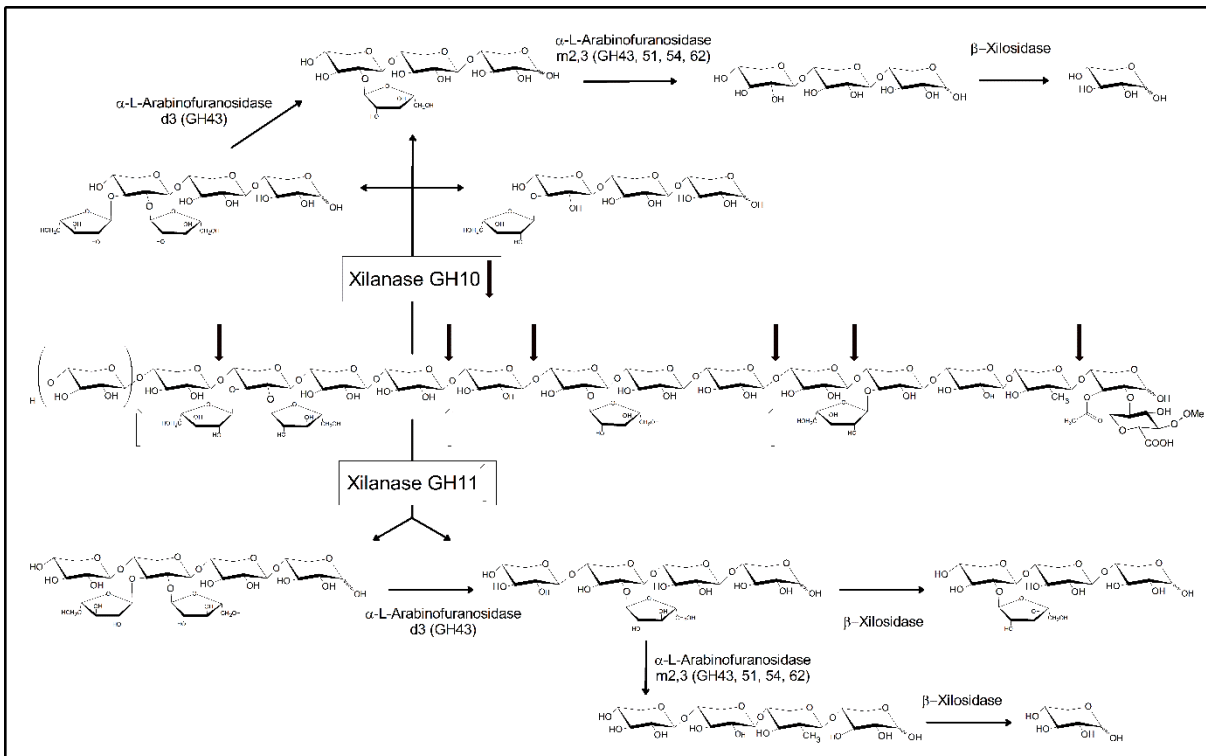
A desconstrução das cadeias de xilana para os carboidratos constituintes (principalmente xilose) consiste em uma etapa fundamental a fim de possibilitar o seu aproveitamento em processos subsequentes, como por exemplo a produção de etanol (DODD; CANN, 2009). Devido à heterogeneidade e complexa natureza química da xilana, a sua completa despolimerização requer a ação de um complexo contendo várias enzimas hidrolíticas, com diversas especificidades e modos de ação (BAJPAI, 2014b). Complexos enzimáticos contendo xilanases são produzidos principalmente por microrganismos que atuam na decomposição das paredes celulares das plantas (fungos filamentosos, bactérias, leveduras, insetos e protozoários) entre eles podemos citar os gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fibrobacter*, *Clostridium* e *Bacillus* (POLIZELI et al., 2005; WILSON, 2011).

De acordo com Biely (2003), são necessárias ao complexo xilanolítico uma mistura de enzimas com diferentes funcionalidades, incluindo endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8), β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -glucuronidases (EC 3.2.1.139), esterases que atuem nos grupos acetil (EC 3.1.1.72) e de ácido ferúlico e cumárico (EC 3.1.1.73). Com base em suas sequências de aminoácidos,

dobras estruturais e mecanismos de catálise, xilanases foram classificadas em diversas famílias das glicosil hidrolases - GH (do inglês *glycoside hydrolase*) (CANTAREL et al., 2009).

Endo-1,4- β -xilanases são as principais enzimas envolvidas na despolimerização da xilana, clivando as ligações glicosídicas no esqueleto principal de xilose e reduzindo o grau de polimerização substrato (BIELY et al., 1997). Conforme mostrado na Figura 8.1, o ataque enzimático às cadeias de xilana não ocorre aleatoriamente. As ligações selecionadas para a hidrólise dependem da natureza da molécula de substrato, isto é, do comprimento da cadeia, o grau de ramificação e a presença de substituintes ligados à cadeia principal (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; LI et al., 2000).

Figura 8.1. Esquema de degradação enzimática de arabinoglucuronoxilana por xilanases de famílias de GH 10 e 11. Ácido glucurônico e acetilações não apresentados. A hidrólise para monossacarídeos requer ação de dois tipos de α -L-arabinofuranosidases e β -xilosidase



Fonte: Baseado em Biely, Singh e Puchart (2016); Dodd e Cann (2009); Ebringerová, Hromádková e Heinze (2005) e Polizeli et al. (2005).

β -D-xilosidases liberam monômeros de xilose a partir da extremidade não redutora de xilooligossacarídeos, estando agrupadas em cinco famílias diferentes: GH3, 39, 43, e 54 (HENRISSAT, 1991). Conforme as endoxilanases atuam sucessivamente na quebra da cadeia polimérica de xilana em fragmentos menores, há um aumento do número total de extremidades não-redutoras disponíveis para hidrólise por β -xilosidases (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016). Segundo Polizeli et al. (2005), o acúmulo de xilooligômeros pode levar à

inibição das endoxilanasas. A ação da β -D-xilosidases na hidrólise desses produtos é de grande importância, removendo a causa da inibição e aumentando a eficiência de hidrólise da xilana.

Não menos importante também são as enzimas consideradas “acessórias”. As acetil esterases (EC 3.1.1.6) removem os grupos O-acetil nas posições 2 e/ou 3 do resíduo β -D-xilopiranosil da cadeia de xilana (BIELY, 2003). A eliminação das acetilações facilita a ação de endoxilanasas, uma vez que os grupos laterais acetilados podem interferir no acoplamento das enzimas que clivam a cadeia principal (impedimento estérico). Arabinases (EC 3.2.1.55) removem ramificações de arabinose ligadas à cadeia principal, sendo classificadas nas famílias GH43, 51, 54 e 62 (DODD; CANN, 2009). De acordo com a especificidade posicional e necessidade de uma hidroxila vicinal livre no resíduo xilopiranosil, α -L-arabinofuranosidases podem ser divididas em dois grupos. O grupo principal consiste de enzimas ativas em resíduos xilopiranosil monossustituídos por arabinose na posição 2 ou 3 (mostradas como m_{2,3} α -L-arabinofuranosidases na Figura 8.1). O grupo menor inclui enzimas referidas como α -L-arabinofuranosidases d₃ que atuam especificamente nos resíduos xilopiranosil duplamente arabinosilados, liberando seletivamente apenas a arabinose ligada à posição α -1,3, deixando a outra ligada à cadeia principal na posição α -1,2 (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016).

Arabinoglucuronoxilanas podem apresentar ácido urônico ou ácido metil glucurônico (MeGlcA) como ramificação. A ligação α -1,2 com o O-2 do resíduo xilopiranosil é uma das ligações glicosídicas mais ácidas e estáveis em paredes celulares de plantas e é hidrolisada por α -glucuronidasas (EC 3.2.1.139) (BAJPAI, 2014b). Segundo Biely, Singh e Puchart (2016) dois tipos de α -glucuronidasas microbianas foram reconhecidos até agora. As mais conhecidas são α -glucuronidasas classificadas na família GH67, que podem liberar MeGlcA apenas a partir de oligossacarídeos que contenham um ácido urônico no resíduo xilopiranosil da extremidade não redutora. Essas enzimas são incapazes desramificar polissacarídeos ou oligossacarídeos em que o MeGlcA esteja ligado a resíduos internos da cadeia principal. A outra classe α -glucuronidasas classificadas na família GH115. Além da capacidade para catalisar a mesma reação que as enzimas GH67, essas α -glucuronidasas também liberaram MeGlcA ligados a resíduos internos de oligo- e polissacarídeos.

O perfil de carboidratos liberados está diretamente relacionado às enzimas presentes no complexo das xilanasas empregadas na reação de hidrólise. Assim, a conversão de substrato e a seletividade do complexo são parâmetros fundamentais a serem avaliados em processos que utilizem xilanasas. Em trabalho paralelo realizado no grupo, foram avaliados os desempenhos de vários complexos xilanólíticos comerciais. A disponibilização de diversos fungos produtores de xilanasas pela Profa. Maria de Lourdes T. M. Polizelli, FCFRP-USP, e a possibilidade destes serem cultivados no DEQ/UFSCar, abriu uma nova

frente de trabalho, analisando-se agora o desempenho de xilanases produzidas *in-house*. Dessa forma, ampliava-se o leque de complexos enzimáticos a serem testados quanto às suas capacidades de converter xilana em xilose e poderem ser utilizados no processo SHIF. Buscava-se, para isso, alta conversão de xilana em xilose. Este capítulo aborda, pois, os estudos preliminares realizados utilizando preparações de xilanase produzidos *in-house* (*Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus phoenicis*).

8.2 Material e Métodos

8.2.1 Material

Os extratos xilanolíticos de *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus phoenicis* foram obtidos através de cultivos, gentilmente realizados e doados pelo grupo da Profa. Dra. Maria L. T. M. Polizeli da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, Brasil). Os caldos de cultura foram preparados utilizando xilana de madeira de bétula como indutor. Xilana de bétula, xilana de faia, 4-nitrofenil β -xilopiranosídeo (p-NPX) e albumina sérica bovina foram da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

8.2.2 Métodos

Solubilização da xilana de faia

A xilana de faia foi preparada conforme descrito por Milessi (2017). Oitenta gramas de xilana de madeira de faia foram dissolvidos em tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 5,6 e mantidos sob agitação mecânica suave a 50 °C por 2 horas. Após centrifugação (10414 x g, 20 min a 25 °C), o sobrenadante foi recuperado e então foi filtrado sob vácuo (diâmetro de poro de 12 μ m). A concentração de XOS potencial foi estimada de acordo com a concentração de xilose liberada após a hidrólise ácida total com H₂SO₄ 72% v.v⁻¹, determinada via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Hidrólise enzimática da xilana de faia

Ensaio de hidrólise da xilana de faia (25 g.L⁻¹) foram realizados com os complexos xilanolíticos de *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. phoenicis*. A carga enzimática oferecida nos ensaios foi de 150 UI.g_{xos}⁻¹. A reação foi conduzida sob agitação constante a 50 °C por 24 horas em estufa para hibridação equipada com carrossel de agitação 360° com controle de

temperatura (Modelo MA 430/1, Maconi, Piracicaba, Brasil). Amostras dos sobrenadantes foram coletadas para quantificação das concentrações de xilose e XOS produzidos ao longo das reações via CLAE.

Concentração dos complexos enzimáticos por ultrafiltração tangencial

Os caldos da enzima foram concentrados 15x por centrifugação em tubos Centricon® (Burlington, EUA) a 4 °C, 2057 x g por 60 min, conforme as orientações do fabricante.

Medida da atividade enzimática de endoxinalase

A atividade da xilanase foi medida de acordo com metodologia descrita por Bailey, Biely e Poutanen, (1992), calculando as velocidades iniciais da reação de hidrólise da xilana de bétula (10 g.L⁻¹, tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 6,0) catalisada por uma quantidade conhecida de enzima. A enzima solúvel ou imobilizada foi adicionada ao meio reacional e incubada por 10 min a 50 °C. Alíquotas foram retiradas a cada 2 minutos e os açúcares redutores liberados quantificados pelo método DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberação de 1 µmol de xilose por minuto nas condições de ensaio (pH 5,6; 50°C).

Medida da atividade enzimática de β-xilosidase

A atividade da β-xilosidase foi determinada em uma cubeta de quartzo, medindo-se o aumento de absorvância a 405 nm causado pela liberação de 4-nitrofenol ($\epsilon = 1950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) durante a hidrólise da solução de 4-nitrofenil β- xilopiranosídeo (p-NPX) 5 mmol.L⁻¹ pH 6,0 a 50 °C (DIOGO et al., 2015). Uma unidade de hidrólise da atividade (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um µmol de 4-nitrofenol por minuto sob as condições da experiência.

Determinação da concentração de proteínas totais

A quantificação das proteínas totais foi realizada pelo método proposto por Bradford, (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão analítico.

Quantificação dos produtos de hidrólise

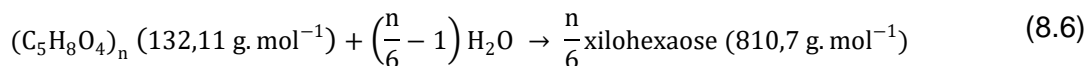
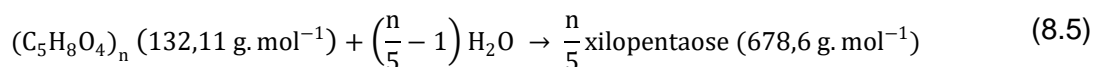
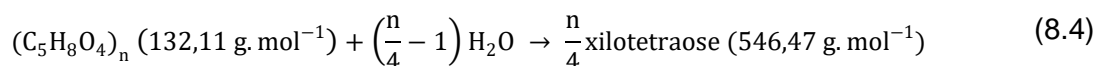
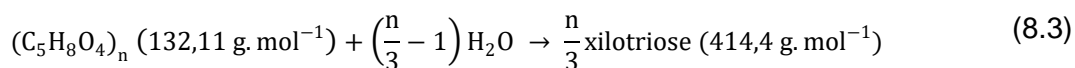
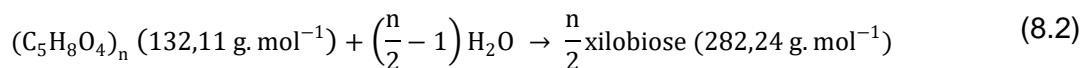
As concentrações de xilose e XOS (X_2 a X_6) foram determinadas por CLAE, utilizando a coluna Waters Sugar-Pak™ I (300 x 6,5 mm) conectada ao detector de índice de refração (45 °C), usando água ultrapura como fase móvel com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ a 80 °C. As amostras coletadas foram previamente diluídas e filtradas (filtro PVDF 0,22 µm). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir curvas de calibração obtidas pela injeção de padrões analíticos com concentrações conhecidas.

Cálculo dos rendimentos em xilose e XOS

Os rendimentos da hidrólise em xilose e XOS foram calculados de acordo com as equações descritas por Wolf, (2011) e Milessi et al. (2016), tendo como base os máximos teóricos obtidos pela hidrólise ácida do substrato. O rendimento em xilose foi determinado utilizando a Equação 8.1:

$$\text{Rendimento em xilose} = \frac{C_{\text{Xilose}}^{\text{Inicial}} - C_{\text{Xilose}}^{\text{Final}}}{C_{\text{Xilose}}^{\text{(teórico total)}}} \times 100 \quad (8.1)$$

Os rendimentos em XOS foram calculados considerando-se os fatores estequiométricos de cada xilooligosacarídeo ($f_{X_2} - f_{X_6}$, Equações 8.2 a 8.6), determinados de acordo com as Equações 8.7-8.11, sendo assim possível calcular a conversão da xilana (Equação 8.12):



$$f_{X_2} = \frac{132,11 \times 2}{282,24} = 0,936 \quad (8.7)$$

$$f_{X_3} = \frac{132,11 \times 3}{414,4} = 0,956 \quad (8.8)$$

$$f_{X_4} = \frac{132,11 \times 4}{546,47} = 0,967 \quad (8.9)$$

$$f_{X_5} = \frac{132,11 \times 5}{678,6} = 0,973 \quad (8.10)$$

$$f_{X_6} = \frac{132,11 \times 6}{810,7} = 0,978 \quad (8.11)$$

$$\text{Rendimento em XOS} = \frac{f_{X_2} \cdot C_{X_2} + f_{X_3} \cdot C_{X_3} + f_{X_4} \cdot C_{X_4} + f_{X_5} \cdot C_{X_5} + f_{X_6} \cdot C_{X_6}}{C_{\text{XOS (teórico total)}}} \times 100 \quad (8.12)$$

8.3 Resultados e Discussão

8.3.1 Caracterização dos complexos enzimáticos

A Tabela 8.1 apresenta os valores de concentração de proteínas e atividades enzimáticas (endoxilanase e β -xilosidase) medidas nos extratos enzimáticos fornecidos pelo grupo de Ribeirão Preto. Observa-se que as atividades específicas das endoxilanase medidas foram consideravelmente altas, sendo os valores alavancados pelas baixas concentrações de proteína. Dentre os extratos estudados, o de *A. niger* apresentou a maior atividade de β -xilosidase, sendo o dobro das medidas nos caldos de *A. ochraceus* e *A. phoenicis*. Todavia, esses valores de atividades medidas nos extratos podem ser considerados significativamente baixos em comparação a outros complexos xilanolíticos disponíveis.

Tabela 8.1. Concentrações de proteínas totais e atividades específicas (endoxilanase e β -xilosidase) dos complexos xilanolíticos de *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. phoenicis*.

| Xilanase | Concentração de proteínas (mg.mL ⁻¹) | Atividades específicas (UI.mg _{proteína} ⁻¹) | |
|---------------------|--|---|-----------------------|
| | | Endoxilanase* | β -xilosidase** |
| <i>A. niger</i> | 0,05 ± 0,01 | 399,40 ± 0,80 | 17,05 ± 0,05 |
| <i>A. ochraceus</i> | 0,04 ± 0,00 | 570,00 ± 1,40 | 8,87 ± 0,03 |
| <i>A. phoenicis</i> | 0,05 ± 0,00 | 506,00 ± 1,30 | 8,03 ± 0,01 |

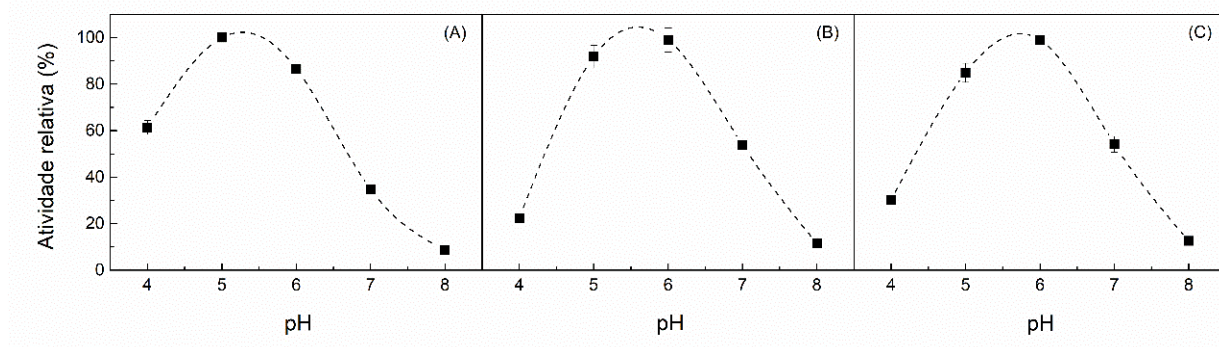
*: Atividade medida pela hidrólise de xilana de bétula 10 g.L⁻¹ pH 5,6 a 50 °C;

** : Atividade medida pela hidrólise de p-NPX 5 mmol.L⁻¹ pH 6,0 a 50 °C.

O efeito do pH sobre as atividades catalíticas da endoxilanase foi avaliado para o intervalo de pH 4,0 a 8,0 a 50 °C para os extratos enzimáticos de *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. phoenicis*. Como visto na Figura 8.2, todos os complexos enzimáticos apresentaram as máximas atividades catalíticas em pH ácido (~ 5,5). Em pH neutro, a xilanase de *A. niger* apresentou 35% da atividade máxima, enquanto as xilanases de *A. ochraceus* e *A. phoenicis* retiveram aproximadamente 59%. Esses resultados estão de acordo com os relatados por Michelin et al. (2014) que descreveram a atividade máxima da endoxilanase de

A. ochraceus em pH ácido (pH 6,0). Da mesma forma, Pedersen et al. (2007) mediram a atividade máxima em pH 5,0 usando a endoxilanase de *A. niger*. Em relação ao *A. phoenicis*, Rizzatti et al. (2004) relataram a atividade máxima em pH 4,5 para a endoxilanase produzida intra e extracelular. O fato das máximas atividades serem registradas em pHs ácidos são interessantes, especialmente do ponto de vista de aplicação destas enzimas xilanolíticas na reação de *SHIF*, que opera em pHs ácido (pH 5,6) (MILESSI-ESTEVEZ et al., 2019).

Figura 8.2. Influência do pH sobre a atividade catalítica das xilanases de (A) *Aspergillus niger*, (B) *Aspergillus ochraceus* e (C) *Aspergillus phoenicis*. Atividade catalítica determinada pela hidrólise de xilana de madeira de bétula a 1% m.v⁻¹ (10 g.L⁻¹) a 50 °C, tampões 50 mmol.L⁻¹: citrato de sódio pH 4,0 e 5,0, fosfato de sódio pH 6,0, 7,0 e 8,0. Atividades normalizadas em relação à máxima atividade medida.



Um dos grandes empecilhos de aplicação dos extratos xilanolíticos fornecidos foram as baixas concentrações de proteína em solução, estando os extratos enzimáticos com elevada diluição vinda da etapa de cultivo do microrganismo. Desta forma, a viabilidade de aplicação desses complexos xilanolíticos requer uma etapa de concentração das enzimas antes de sua aplicação em processos biotecnológicos.

Os extratos enzimáticos foram concentrados 15 vezes pela técnica de ultrafiltração em membrana de 10 kDa, realizados em tubos Centricon[®] sob centrifugação de 2057 x g a 4°C. Conforme apresentado na Tabela 8.2, houve um aumento considerável das concentrações de proteínas e das atividades enzimáticas, sendo as atividades específicas equiparáveis às medidas em extratos comerciais como Multifect CX XL A03139 (46 ± 2,0 UI.mg_{proteína}⁻¹) e Accelerase XY A03304 (646 ± 4,0 UI.mg_{proteína}⁻¹). Desta forma foi possível dar o prosseguimento aos ensaios utilizando esses complexos enzimáticos concentrados.

Tabela 8.2. Concentrações de proteínas totais e atividades específicas (endoxilanase) dos complexos xilanolíticos de *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. phoenicis* na hidrólise da xilana de bétula (10 g.L⁻¹ pH 5,6 50 °C)

| Xilanase | Concentração de | | Atividades específicas (UI.mg _{proteína} ⁻¹) | |
|---------------------|----------------------------------|--|---|--|
| | proteínas (mg.mL ⁻¹) | | de endoxilanase* | |
| <i>A. niger</i> | 1,37 ± 0,03 | | 154,94 ± 0,30 | |
| <i>A. ochraceus</i> | 1,10 ± 0,02 | | 147,24 ± 0,20 | |
| <i>A. phoenicis</i> | 1,28 ± 0,03 | | 124,41 ± 0,30 | |

*: Atividade medida pela hidrólise de xilana de bétula 10 g.L⁻¹ pH 5,6 a 50 °C;

8.3.2 Hidrólise da fração solúvel de xilana de madeira de faia

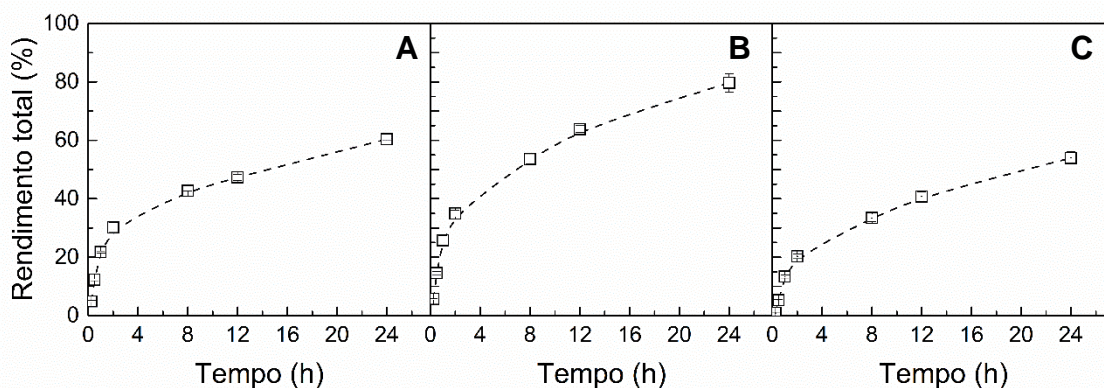
Os extratos de *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. phoenicis* foram utilizados para hidrolisar a fração solúvel de xilana de madeira de faia (25 g.L⁻¹, tampão de citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 5,6, 50 °C). A Tabela 8.3 apresenta o perfil e rendimento em XOS e xilose após 24h de reação. Os três complexos enzimáticos apresentaram conversões acima de 60%. O rendimento mais elevado de 93% foi alcançado quando *A. ochraceus* foi utilizado, sendo os demais de 71% e 67% obtidos com *A. niger* e *A. phoenicis*, respectivamente. Quando a xilose é o produto desejado, o complexo de *A. niger* obteve os melhores resultados em comparação com os outros complexos, produzindo 9,6 g.L⁻¹ após 24h de reação. Considerando a produção de XOS, os melhores resultados foram obtidos com o complexo de *A. ochraceus*, que produziu 12,9 g.L⁻¹ de X₂, 2,5 g.L⁻¹ de X₃, 0,3 g.L⁻¹ de X₄, 0,12 g.L⁻¹ de X₅ e 0,18 g.L⁻¹ de X₆. Estes resultados são semelhantes aos obtidos com complexos comerciais de xilanas na hidrólise da xilana de faia descritos por Milessi (2017), nas mesmas condições aplicadas nesse trabalho. Segundo a autora, dentre os complexos xilanolíticos estudados a maior conversão de 79% foi alcançada utilizando o complexo comercial Multifect CX XL, onde foram produzidos 13,24 g.L⁻¹ de xilose, 6,48 g.L⁻¹ de X₂, 1,85 g.L⁻¹ de X₃, 0,31 g.L⁻¹ de X₄ e 0,18 g.L⁻¹ de X₅.

Tabela 8.3. Perfil de xiloligossacarídeos após 24h de hidrólise da fração solúvel de xilana de madeira de faia (25 g.L⁻¹) catalisada pelos complexos xilanolíticos de *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. phoenicis* (150 UI.g_{xilana}) - 50 °C pH 5,6.

| Xilanase | Concentrações (g.L ⁻¹) | | | | | | Rendimento (%) | |
|---------------------|------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|
| | Xilose | X ₂ | X ₃ | X ₄ | X ₅ | X ₆ | XOS | Total |
| <i>A. niger</i> | 9,6 | 6,8 | 2,5 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 37,4 | 71,2 |
| <i>A. ochraceus</i> | 8,1 | 12,9 | 3,3 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 64,4 | 93,0 |
| <i>A. phoenicis</i> | 7,1 | 7,5 | 2,8 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 42,3 | 67,3 |

A Figura 8.3 mostra o curso da hidrólise de xilana de faia catalisada pelos complexos xilanólíticos estudados. Pode-se observar que todos os complexos enzimáticos foram estáveis a 50 °C durante as 4 horas iniciais. Após 8 horas de reação, as velocidades das reações de *A. niger* e *A. phoenicis* foram consideravelmente menores, acompanhando o lento aumento em termos de conversão. Por outro lado, não pôde ser detectado a estabilização da conversão nos ensaios com o complexo *A. ochraceus*, indicando que, se mais tempo fosse permitido, a conversão total provavelmente seria alcançada.

Figura 8.3. Evolução da hidrólise de xilana de madeira de faia (25 g / L) em função do tempo catalisada por complexos xilanólíticos de (A) *A. niger*, (B) *A. ochraceus* e (C) *A. phoenicis* ($150 \text{ UI.gxilana}^{-1}$) - 50 °C pH 5,6.



Os excelentes resultados obtidos nessa etapa desse trabalho desmostram o potencial dos complexos xilanólíticos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*, cujos desempenhos são equivalentes e até mesmo superiores aos apresentados por algumas preparações comerciais de xilanase que vinham sendo testadas no grupo para hidrólise do mesmo substrato. O complexo produzido por *A. ochraceus* se destaca dos demais devido às elevadas conversões obtidas, tanto em termos de xilose como xilobiose liberadas em solução, sendo o complexo produzido por esse microrganismo muito promissor.

Os resultados descritos nesse capítulo foram realizados em caráter preliminar e não puderam ser aprofundados. Após obtenção dos resultados descritos anteriormente, buscou-se o fungo *A. Ochraceus* para ser cultivado nos laboratórios do DEQ/UFSCar, visando aumento de escala para obtenção de complexo xilanólítico mais concentrado e em maior quantidade. Infelizmente, não foi possível reproduzir os resultados iniciais, obtidos com o extrato fornecido e usado nos ensaios de conversão mostrados na Figura 8.3. Apesar de várias tentativas terem sido feitas, infelizmente não foi possível reproduzir o desempenho daquele extrato. Uma possível justificativa seria a cultura estoque utilizada para propagação do fungo não ser a mesma que foi utilizada nos cultivos que originaram os extratos enzimáticos inicialmente caracterizados. Os resultados de atividade enzimática obtidos são

semelhantes aos descritos por Michelin et al. (2010, 2012a, 2012b, 2014). Desta forma, uma saída seria utilizar a cultura estoque descrita pelos autores (número 604), que se encontra depositada na Coleção de Culturas Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil). Diante dessa dificuldade, decidiu-se dar prosseguimento aos trabalhos utilizando o complexo xilanólico comercial Multifect CX XL A03139 para os ensaios de *SHIF*.

8.4 Conclusão

Complexos xilanólicos de *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. phoenicis* foram estudados para a hidrólise de xilana de bétula e madeira de faia. Os três complexos apresentaram maiores atividades de endoxilanase em pH ácido (pH 5,6), enquanto *A. niger* apresentou a maior atividade de β -xilosidase. No entanto, devido ao baixo teor de proteína nos caldos de cultivo (alta diluição), foi necessário um passo de concentração antes de sua aplicação em ensaios de longa duração. A hidrólise a longo prazo da xilana de madeira de faia atingiu conversões superiores a 60%, comparáveis às obtidas em preparações comerciais de xilanase. Dentre os complexos estudados, *A. niger* apresentou alto rendimento de xilose (9,6 g.L⁻¹), enquanto que *A. ochraceus* apresentou melhor produção de XOS com 13 g.L⁻¹ de X₂, 3 g.L⁻¹ de X₃ e 0,4 g.L⁻¹ de X₄. Os complexos de xilanas produzidos por fungos do gênero *Aspergillus* apresentaram grande potencial para aplicação em processos biotecnológicos que envolvem o uso de hemicelulose.

8.5 Referências

- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.
- BAJPAI, P. Xylan. In: _____. **Xylanolytic Enzymes**. Amsterdam: Cademic Press, 2014a. p. 9–18.
- BAJPAI, P. Microbial Xylanolytic Systems and Their Properties. In: _____. **Xylanolytic Enzymes**. Amsterdam: Cademic Press, 2014b. p. 19–36.
- BIELY, P. et al. Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n. 1–3, p. 151–166, set. 1997.
- BIELY, P. Xylanolytic Enzymes. In: WHITAKER; VORAGEN; WONG (Eds.). **Handbook of food enzymology**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 879–916.
- BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, 2016.

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.

CANTAREL, B. L. et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. Database, p. D233–D238, 2009.

DIOGO, J. A. et al. Development of a chimeric hemicellulase to enhance the xylose production and thermotolerance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 69, p. 31–37, 2015.

DODD, D.; CANN, I. C. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 2–17, 2009.

EBRINGEROVÁ, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n. 9, p. 542–556, 2000.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z.; HEINZE, T. Hemicellulose. In: HEINZE, T. (Ed.). **Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 1–67.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **The Biochemical journal**, v. 280 (Pt 2), p. 309–16, 1991.

LI, K. et al. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1–2, p. 89–94, 2000.

MASLEN, S. L. et al. Structure elucidation of arabinoxylan isomers by normal phase HPLC–MALDI-TOF/TOF-MS/MS. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 5, p. 724–735, 2007.

MICHELIN, M. et al. Production and properties of xylanases from *Aspergillus terricola Marchal* and *Aspergillus ochraceus* and their use in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, n. 7, p. 813–821, 2010.

MICHELIN, M. et al. Xylanase and β -Xylosidase Production by *Aspergillus ochraceus*: New Perspectives for the Application of Wheat Straw Autohydrolysis Liquor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 336–347, 2012a.

MICHELIN, M. et al. A novel xylan degrading β -d-xylosidase: purification and biochemical characterization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 3179–3186, 2012b.

MICHELIN, M. et al. Purification and Biochemical Properties of Multiple Xylanases from *Aspergillus ochraceus* Tolerant to Hg²⁺ Ion and a Wide Range of pH. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 1, p. 206–220, 2014.

MILESSI-ESTEVES, T. et al. An Innovative Biocatalyst for Continuous 2G Ethanol Production from Xylo-Oligomers by *Saccharomyces cerevisiae* through Simultaneous Hydrolysis, Isomerization, and Fermentation (SHIF). **Catalysts**, v. 9, n. 3, p. 225, 2019.

MILESSI, T. S. S. et al. Immobilization and stabilization of an endoxylanase from *Bacillus subtilis* (XynA) for xylooligosaccharides (XOs) production. *Catalysis Today*, v. 259, p. 130–139, 2016.

MILESSI, T. S. S. **Produção de etanol 2g a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente modificada imobilizadas**. 2017. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

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

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 68, n. 3, p. 587–597, 2007.

PEDERSEN, M. et al. Identification of thermostable β -xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, v. 29, n. 5, p. 743–748, 2007.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 67, n. 5, p. 577–591, 27 2005.

RIZZATTI, A. C. S. et al. Influence of temperature on the properties of the xylanolytic enzymes of the thermotolerant fungus *Aspergillus phoenicis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 31, n. 2, p. 88–93, 2004.

WILSON, D. B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology*, v. 14, n. 3, p. 259–263, 2011.

WOLF, L. D. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooliômeros**. 2011. 147f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

CAPÍTULO 9: SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO

O processo *SHIF* estudado nesse projeto se destaca como uma abordagem inovadora e promissora para produção de etanol 2G a partir da biomassa lignocelulósica. Todas as etapas realizadas nesse projeto e descritas ao longo desse trabalho mostraram que a produção de etanol 2G utilizando o processo *SHIF* não é uma tarefa trivial.

Os resultados obtidos até o momento não permitem afirmar que os processos *SHIF* e *SHF* serão aplicáveis na indústria para a fermentação de pentoses. O processo *SHF* atingiu produção de etanol três vezes maior que o obtido no processo *SHIF*, mas a fragilidade operacional da levedura recombinante é um desafio ainda não superado. Assim, ambos os processos são complexos e envolvem um grande número de variáveis, o que impediu que se chegasse ao diagnóstico da causa da estagnação e se pudesse propor soluções para os problemas detectados. Ambos requerem continuidade do estudo. Assim, do ponto de vista tecnológico, ainda não se tem essa definição. Se este estudo estivesse sendo realizado na indústria, neste ponto, novos ensaios estariam sendo planejados e executados, ou se desistiria. Felizmente, ele está sendo realizado na academia. É importante ressaltar, por isso, a enorme fonte de aprendizado desses processos, que se mostraram extremamente interessantes do ponto de vista de formação de pesquisadores. O estudo deles vem permitindo, e ainda permitirá, grande aumento no conhecimento de todos os pesquisadores com eles envolvidos, e a propagação desse conhecimento por meio de publicações, algumas já realizadas, e muitas ainda em preparação.

A seguir estão alistadas algumas sugestões para trabalhos futuros em continuidade dos estudos do processo *SHIF* e *SHF*:

- ✓ Realizar estudos mais aprofundados de imobilização do complexo xilanolítico Multifect CX XL A03139 a fim de se obter um derivado com maior atividade enzimática nas condições de *SHIF/SHF* (35 °C, pH 5,6);
- ✓ Avaliar o uso de diferentes complexos xilanolíticos imobilizados como elevada atividade catalítica para realização da etapa de hidrólise;

- ✓ Realizar estudos da cinética de hidrólise catalisado pelos derivados de endoxilanase e β -xilosidase, a fim de se obter os parâmetros cinéticos das reações nas condições de SHIF (35°C, pH 5,6);
- ✓ Realizar ensaios de isomerização de xilose \rightleftharpoons xilulose de longa duração (alcançar o equilíbrio) a fim de avaliar e reparametrizar as constantes estimadas nas reações catalisadas pela XI;
- ✓ Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de ácido acético sobre a fermentação de xilulose utilizando a levedura selvagem;
- ✓ Avaliar o efeito do aumento do pH sobre os perfis de consumo de carboidratos/formação de produtos em ensaios de SHIF e SHF a 35°C;
- ✓ Obtenção de modelos cinéticos para as etapas de (1) conversão de xilooligômeros/xilooligossacarídeos a xilobiase, catalisada por xilanases; (2) conversão de xilobiase a xilose, catalisada por β -xilosidase; (3) conversão de xilose a xilulose, catalisada por xilose isomerase e (4) fermentação de xilulose a etanol por *S. cerevisiae*;
- ✓ A partir dos modelos cinéticos, definir a composição ideal do biocatalisador, otimizando as cargas enzimáticas a fim de alcançar maiores rendimentos e produtividades, bem como superar a diferença entre as faixas ótimas de pH para cada etapa do processo;
- ✓ Realização de ensaios SHIF em operação contínua após otimização da composição do biocatalisador e de cada etapa do processo (hidrólise, isomerização e fermentação) utilizando levedura selvagem e recombinante;
- ✓ Realizar a modelagem matemática do reator em operação contínua contendo os grânulos de biocatalisador, a fim de se otimizar as condições operacionais adequadas, tais como temperatura, pH, concentração de catalisador, concentração de XOS na alimentação, tempo de residência, etc.

ANEXO

Figura 1. Expansão dos espectros de ^1H -RMN das xilanas (A) bétula, (B) Euc SUZ e (C) Euc IPAPER.

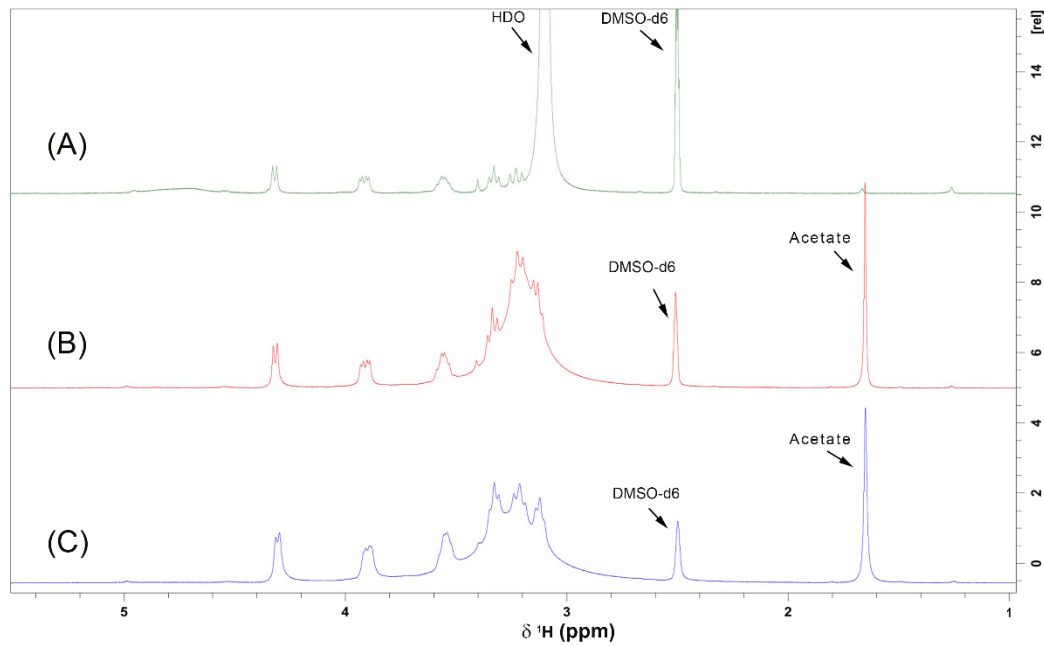


Figura 2. Expansão dos espectros de ^{13}C -RMN das xilanas (A) bétula, (B) Euc SUZ e (C) Euc IPAPER.

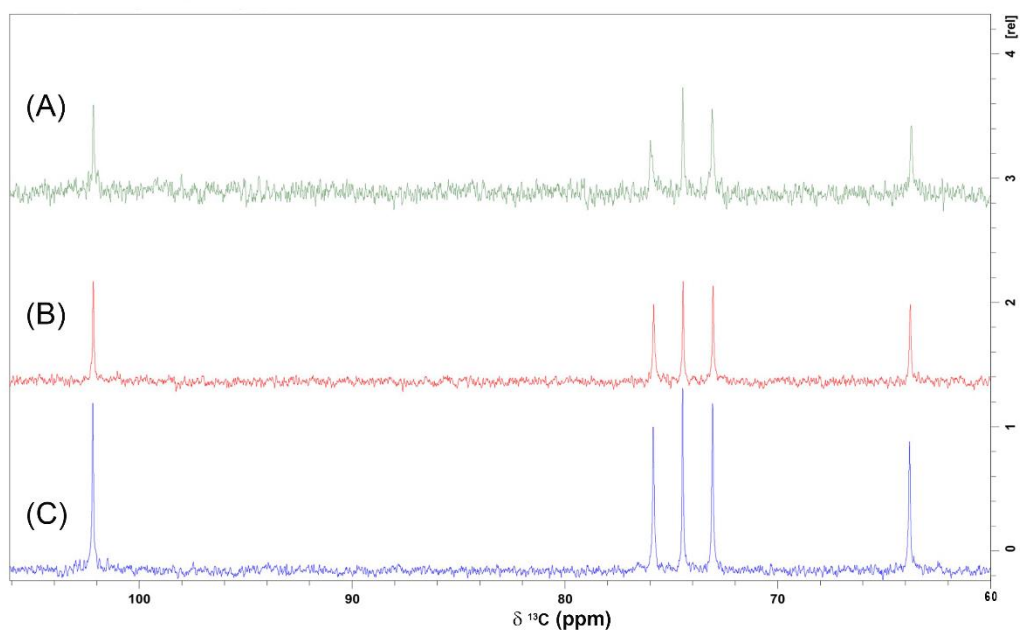


Tabela 1. Deslocamentos químicos de ^1H and ^{13}C no espectro de RMN das xilanas de bétula e eucalipto SUZ e IPAPER

| XXilana | Atribuições | | | | | | | | |
|---------|--------------------------------|-------|-----------------|------|-------------|------------------|------------------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5eq ^c | 5ax ^d | 6 | OCH3 |
| Bétula | X ^a ^{13}C | 101.4 | 72.4 | 73.7 | 75.2 | 63.0 | 63.0 | - | - |
| | ^1H | 4.31 | na ^e | 3.33 | 3.60 - 3.50 | 3.91 | 3.23 | - | - |
| | G ^b ^{13}C | 98.3 | 72.5 | 73.6 | - | - | - | 63.3 | 58.3 |
| | ^1H | 4.97 | 3.27 | 3.56 | - | - | - | 3.57 | 3.40 |
| SUZ | X ^a ^{13}C | 101.5 | 72.3 | 73.7 | 75.6 | 63.1 | 63.1 | - | - |
| | ^1H | 4.31 | 3.12 | 3.33 | 3.60 - 3.50 | 3.90 | 3.21 | - | - |
| | G ^b ^{13}C | 98.1 | 72.5 | 73.9 | - | - | - | 63.4 | 58.6 |
| | ^1H | 5.00 | 3.33 | 3.55 | - | - | - | 3.56 | 3.40 |
| IPAPER | X ^a ^{13}C | 101.4 | 72.3 | 73.7 | 75.1 | 63.1 | 63.1 | - | - |
| | ^1H | 4.31 | 3.07 - 3.15 | 3.33 | 3.60 - 3.50 | 3.90 | 3.15 - 3.26 | - | - |
| | G ^b ^{13}C | 98.1 | 72.5 | 74.1 | - | - | - | 63.2 | 58.6 |
| | ^1H | 4.98 | 3.32 | 3.55 | - | - | - | 3.56 | 3.40 |

^aX-(1→4)-β-D-Xylp, ^bG-4-O-Methy-α-D-GlcpA, ^ceq – equatorial, ^dax – axial, ^ena – não designado (encoberto pelo sinal de HDO).