

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**TESE DE DOUTORADO**

**“PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE  
LIGNOCELULÓSICOS PRÉ-TRATADOS COM XILANASES IMOBILIZADAS  
E ESTABILIZADAS”**

SÃO CARLOS, SP

28 DE FEVEREIRO DE 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ANNY MANRICH**

**PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE  
LIGNOCELULÓSICOS PRÉ-TRATADOS COM XILANASES  
IMOBILIZADAS E ESTABILIZADAS**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós Graduação em Engenharia  
Química, para obtenção do título de  
mestre em Engenharia Química

*Orientação: Prof.Dra.Raquel de Lima  
Camargo Giordano*

SÃO CARLOS  
2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M285px

Manrich, Anny.

Produção de xilo-oligossacarídeos a partir de lignocelulósicos pré-tratados com xilanases imobilizadas e estabilizadas / Anny Manrich. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

103 f.

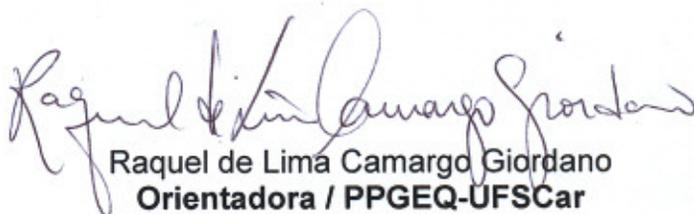
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Engenharia bioquímica. 2. Imobilização de enzimas. 3. Xilooligossacarídeos. I. Título.

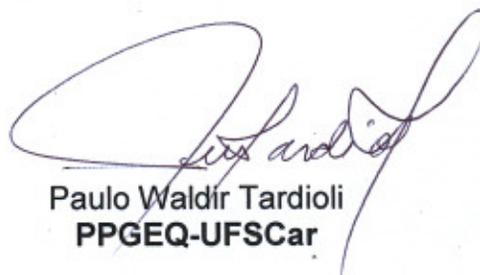
CDD: 660.63 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **ANNY MANRICH**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 28 DE FEVEREIRO DE 2012.

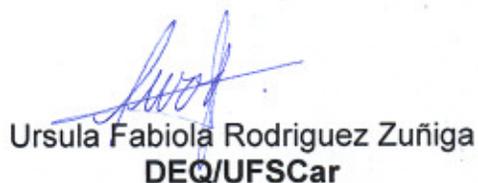
BANCA EXAMINADORA:



Raquel de Lima Camargo Giordano  
Orientadora / PPGEQ-UFSCar



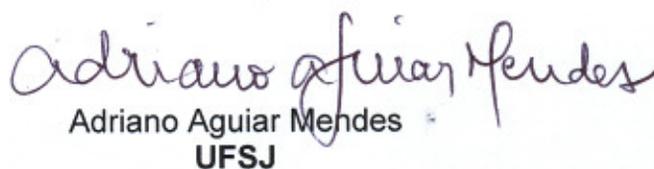
Paulo Waldir Tardioli  
PPGEQ-UFSCar



Ursula Fabiola Rodriguez Zuñiga  
DEQ/UFSCar



Cristiane Sanchez Farinas  
EMBRAPA



Adriano Aguiar Mendes  
UFSJ

Uma ensolarada manhã de primavera. A chuva do dia anterior dava trégua a frágeis corpinhos de quatro anos, ainda mais judiados por repetidas doenças respiratórias. Havíamos sofrido ensolação no passeio em visitação ao magestoso reino de Ludwig II. A gripe foi inevitável e remédios, apesar de doces, não escondiam a aspereza de uma vida semi-enclausurada.

Os gêmeos, se continuassem a recusar o apetitoso pedaço de porco do almoço, teriam que ser limitados a um domingo no sofá, porque a vontade de comer não vinha, mesmo após dias.

De repente, o avô. De repente, o Barrigão.

De sua energia sem igual, cujas fontes se encontram em verdades por nós desconhecidas, palavras de entusiasmo e alegria, capazes de transformar nuvens pretas em arco-íris, iniciaram um processo de conversão fazendo dos gêmeos novas pessoas, novas almas. Em meio a colchões e travesseiros de nossa sala de estar-jantar, que à noite se transformavam em camas no único quarto de dormir, trapezistas de circo se apresentavam com seus saltos inéditos. Bailarinas, malabaristas, equilibristas e mágicos, em um elenco completo.

A cada rodopio, uma garfada. A cada volta da bicicleta, um sorriso. E a barriga ia se enchendo. De seus rostos, antes abatidos e sem luz, via-se sorrisos.

Eram novas crianças. Era um novo dia. Nesse dia, o táxi nos levou a um imenso estacionamento de carros de coleção, modelos antigos, que não mais existem. E em uma tenda instalada no parque, sanfonas nos ofereceram música, como se fôssemos os únicos da platéia. Eu, tentando agora descrever como vivenciei a felicidade que brotou naqueles dois garotinhos, posso somente emocionar-me.

Foi um dia eterno, daqueles em que milagres acontecem. Mas neste dia o milagre não aconteceu simplesmente. Ele se fez acontecer. Por palavras e gestos de amor verdadeiro.

# **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a meus filhos gêmeos

Bernardo

Tobias

Com muito amor

Que descubram a cada renovar do dia que a vida lhes foi presenteada para que em si se construa sua beleza.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

A meus pais

a meu pai Silvio Manrich

por me perdoar

amar

encorajar

fortalecer

alegrar

sempre.

a minha mãe Sati Manrich

por seu amor

carinho

consolo

paciência

exemplo

sempre.

## **AGRADECIMENTOS**

Especialmente agradeço a meus irmãos Christian Manrich e Eiric Manrich, por serem meus grandes amigos do coração.

Agradeço a minha orientadora Raquel Giordano, por seus ensinamentos e por sua compreensão comigo.

Agradeço aos professores Roberto Giordano, Paulo Tardioli, Doris Schieder e Rubens Monti.

Aos técnicos Amadeus, Tiago, Thaís e Aline.

Agradeço a meus colegas de trabalho e ex-colegas de trabalho, Cristine, Cláudia (Miau), Dasciana, Aline, Daniela, Wellington, William, Sandrinha, Adriano, Andréa, Cíntia, Antônio Carlos, Maurício, Diogo, Lucia, Gislene, Ursula, Viviane, Mayerlenis, Agnes, Ana Maria, Chanel, Adilson, Thiago, Vinícius, Leandro, Patrícia, Guilherme, Carlos, Inti, Lionete, Mirella, Edson, Marcelo, João Paulo, João Antônio, Paula, e Carolina, por momentos de descontração e trabalho juntos.

Agradeço com carinho a meus amigos da Alemanha, Irmgard, Johannes, Friederike, Daniela, Doris, Bernd, Thomas, Michaela, Andre, Stefan, por me receberem de braços abertos e me fazerem sentir em casa.

Agradeço a meus familiares, Camila e Melissa, Marília e Nicole, minhas tias Rosa, Lúcia, Kita e Lu, minha avó Chieko, por momentos em que dividimos alegria e esperança.

Agradeço a meus amigos Eliane, Célia e Charles e Cris.

Agradeço a Bernardo e a Tobias, por serem meus filhos e por me amarem como eu sou.

Agradeço a Deus pela vida e por minha vida.

## RESUMO

A endo-xilanase; cuja função é romper ligações  $\beta$ -1,4-xilanosídicas de cadeias de xilana, principal componente da hemicelulose de plantas; é uma importante enzima industrial. A partir da xilana nobres produtos podem ser obtidos, dentre eles os xilooligossacarídeos (XOS), cadeias curtas formadas por unidades de xilose (2 a 7 unidades). Os XOS são reconhecidos por trazerem benefícios à saúde e são considerados ingredientes prebióticos. A obtenção de XOS se dá pela hidrólise da xilana, ácida ou enzimática. O processo enzimático é mais adequado sob ponto de vista ambiental e pela melhor qualidade do produto gerado.

Neste trabalho, cujo objetivo foi obter XOS hidrolisados a partir de material lignocelulósico com uso de endo-xilanase imobilizada, foram utilizadas biomassa de pó de serra de madeira de faia (madeira dura) e de bagaço de cana de açúcar. Estudou-se os pré-tratamentos hidrotérmico com uso de micro-ondas, organossolve-etanol sem catalisador e extração alcalina com NaOH. Com os processos organossolve realizados em bagaço de cana de açúcar e em biomassa de faia pôde-se recuperar, na forma de xilana solúvel, 43% e 45% das matérias primas, respectivamente, quando se aplicaram as condições de processo de 60 min, 50% de etanol (v/v) e 170°C ou 180°C. Semelhantemente eficiente, o tratamento de bagaço de cana de açúcar com NaOH 4% a 121°C por 60 min resultou em uma extração de 53%.

Ensaio de análise de três xilanases comerciais e uma xilanase sintetizada por *B.subtilis* indicaram que a última, e as xilanases NOVOZYMES NS 50014 e NS 22036 produziram preferencialmente XOS e produziram xilose em concentrações reduzidas.

Através da técnica por imobilização multipontual, imobilizaram-se enzimas comerciais NS 50014 e NS 22036 em agarose-glioxil 10 BCL e 6BCL, respectivamente. A transformação química dessas proteínas através de reação de aminação com EDA; introduzindo-se grupos amino adicionais nas xilanases; foi aplicada e com ela a estabilidade térmica das enzimas foi possibilitada, apesar de ter causado perda de sua atividade catalítica.

A xilanase NS 50014 aminada e imobilizada em agarose-glioxil atingiu um fator de estabilidade de 40 vezes em relação à enzima solúvel diluída, com  $\tau_{1/2}$  de 30 horas a 70°C, enquanto que a NS 22036 120 vezes, com  $\tau_{1/2}$  de 24 horas na mesma temperatura.

Verificou-se, portanto, que é possível se produzir XOS a partir de xilana extraída de materiais lignocelulósicos com enzima imobilizada, pois a hidrólise de xilana de pó de serra de faia tratado com processo organosolv foi hidrolisada pelo derivado de xilanase NS 50014 e analogamente, o derivado da xilanase NS 22036 foi utilizado na hidrólise de xilana de bagaço de cana de açúcar extraído com tratamento alcalino. Em ambos os casos, produziu-se XOS em grandes concentrações e xilose em pouca quantidade.

## SUMMARY

Endoxylanase, an important industrial enzyme, cleaves  $\beta$ -1,4-xylanosidic bounds in xylan chains, main plant hemicellulose component. Xylan can be explored to produce many products, among them xylo-oligosaccharides, XOS, made of xylose monomers (2 to 7 units). XOS are considered to be prebiotic ingredients and can improve human's health. XOS are produced by xylan hydrolysis, and enzymatic hydrolysis is considered to be the most advisable to reach better product with less environmental prejudice.

Beechwood and sugarcane bagasse were used in this work to produce XOS. Pretreatments explored to solubilize xylan from lignocellulosic material were autohydrolysis with microwave application, organosolv without catalyst and alkaline NaOH pretreatment. Organosolv-ethanol pretreatment was able to extract circa 45% of xylan in oligomeric form, when using 180°C, 60 min and 50% ethanol (v/v). Alkaline pretreatment extracted 53% of xylan from biomass.

Two xylanases were considered to be applicable for XOS production over enzymatic hydrolysis, the commercial NOVOZYNS NS 22036 and a xylanase from *B.subtilis*. there was low production of monomers after enzymatic hydrolysis.

Commercial enzymes produced by NOVOZYNS NS 50014 and NS 22036 were immobilized onto glyoxyl-agarose gels 10 BCL and 6 BCL by multipoint covalent immobilization technique. Chemical amination using ethilendiamine was applied to introduce amine groups on the enzyme surface, which caused enzymatic inactivation. These procedures could improve enzymatic stability of endoxylanases, in 40 times for the NS 50014, with a  $\tau_{1/2}$  of 30 h and in 120 times for the NS 22036, with  $\tau_{1/2}$  of 24 hours, at 70°C.

It is demonstrated in this work, that the enzymatic hydrolysis using immobilized and stabilized endoxylanases of substrates extracted from pretreated lignocellulosic material is possible in order to produce XOS.

# Índice

Capítulo 1	1
1. Introdução	1
Capítulo 2	5
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. Enzimas	5
2.1.1. Xilanases	6
2.1.2. Xilanas	9
2.2. Imobilização de enzimas	12
2.3. Materiais Lignocelulósicos	17
2.3.1. Pó de Serra de Madeira	18
2.3.2. Bagaço de Cana-de Açúcar	18
2.4. Pré-tratamentos do Material Lignocelulósico	19
2.4.1. Processos físicos	24
2.4.2. Processos físico-químicos:	24
2.4.3. Processos Químicos	25
2.4.4. Processos Biológicos	26
2.5. Pré-tratamento Organossolve	26
2.6. Xilo-oligossacarídeos (XOS)	30
2.6.1. Obtenção de XOS a partir de Materiais Lignocelulósicos	32
Capítulo 3	33
3. Materiais e Métodos	33
3.1. Materiais	33
3.1.1. Enzimas utilizadas:	33
3.1.2. Substratos	33
3.1.3. Suportes	33
3.1.4. Matérias Primas fontes de Biomassa	33
3.1.5. Materiais Específicos	33
3.1.6. Reagentes	34
3.2. Métodos	34
3.2.1. Determinação da atividade enzimática da xilanase	34
3.2.2. Determinação da concentração protéica da xilanase	34
3.2.3. Diálise da enzima comercial com uso de membranas de diálise	34
3.2.4. Diálise da xilanase com uso de dispositivo de ultrafiltração	35
3.2.5. Aminoação da xilanase	35
3.2.6. Determinação de valores máximos de temperatura e atividade da xilanase	35
3.2.7. Imobilização de xilanase	35
3.2.8. Inativação térmica da xilanase	37
3.2.9. Influência do etanol sobre a atividade enzimática.....	37
3.2.10. Adsorção da enzima solúvel em lignina insolúvel.....	37
3.2.11. Seleção da enzima	37
3.2.12. Ativação do suporte gel de agarose (formação de glioxil-agarose)	37
3.2.13. Secagem e fracionamento do pó de serra de madeira	38
3.2.14. Determinação de massa seca da matéria prima	38
3.2.15. Determinação e caracterização de conteúdo de açúcar	38
3.2.16. Análise de Açúcares	38

3.2.17. Pré-tratamento de pó de serra de madeira de choupo negro e faia em reator microondas.	39
3.2.18. Pré-tratamento do pó de serra de madeira de choupo negro e de faia pelo processo Organossolvee	40
3.2.19. Hidrólise de extratos líquidos pré-tratados do pó de serra de madeira de faia com xilanase livre e imobilizada.	40
3.2.20. Enxágüe dos derivados usados e do derivado “novo”	40
3.2.21. Extração de xilana do bagaço de cana-de-açúcar pelo tratamento Organossolve	41
3.2.22. Definição do Grau de Severidade (DS)	41
3.2.23. Extração da xilana de bagaço de cana de açúcar por tratamento alcalino	42
3.2.24. Hidrólise da xilana bagaço de cana de açúcar	42
3.2.25. Reciclo da enzima imobilizada	43
Capítulo 4	44
4. Resultados e Discussão	44
4.1. Desenvolvimento de protocolo para obtenção de derivado ativo e estável de xilanase: imobilização de xilanase NS50014	44
4.1.1. Caracterização da xilanase comercial e xilanase dialisada	44
4.1.2. Imobilização da xilanase em gel de agarose-glioxil	46
4.1.3. Inativação térmica das xilanases	47
4.2. Estudo da extração de oligômeros de material lignocelulósico e da viabilidade de utilização como substrato na produção de XOS com xilanase imobilizada	51
4.2.1. Caracterização de açúcares da biomassa	51
4.2.2. Pré-tratamentos de pó de serra de madeira de faia: microondas e organossolve	55
4.2.3. Hidrólise com uso de xilanase livre e imobilizada dos extratos de pó de serra de faia solubilizados após tratamentos com microondas e organossolve	56
4.2.4. Metodologia para avaliação imparcial das atividades residuais de enzimas imobilizadas após experimentos de hidrólise	60
4.3. Estudo da extração de oligômeros de bagaço de cana de açúcar usando-se tratamento organossolve (etanol) e seleção de endoxilanases para produção de XOS	64
4.3.1 Extração de xilo-oligômeros por Organossolve	65
4.3.2. Caracterização enzimática	67
4.3.3. Seleção da xilanase	69
4.3.4. Uso da xilanase selecionada para produção de XOS	70
4.3.5 Aplicação da enzima selecionada para hidrólise de xilana do extrato solúvel obtido com realização de pré-tratamento organossolve de bagaço de cana de açúcar	74
4.4. Imobilização de xilanase selecionada NS 22036 e sua aplicação em bateladas repetidas na hidrólise de oligômeros obtidos por extração alcalina de xilana de bagaço de cana de açúcar	76
4.4.1. Extração de xilana do bagaço de cana de açúcar com uso de NaOH	76
4.4.2. Atividade enzimática após etapas de diálise e aminação	78
4.4.3. Imobilização da xilanase	79

4.4.4. Influência da temperatura e do pH na atividade enzimática da xilanase solúvel e xilanase imobilizada	81
5. Conclusões principais deste trabalho	90
6. Referências Bibliográficas	92

# 1 *Capítulo 1*

## 2 1 Introdução

3 A pressão causada pelo aumento da demanda de recursos naturais e de produtos de  
4 transformação destes e a conseqüente crescente agressão ambiental, verificados por  
5 efeito do aumento populacional fez surgir e desenvolver-se a indústria verde (Green  
6 Chemistry) ou tecnologia verde (Green Technology). Este conceito, utilizado pela  
7 primeira vez em 1991 nos Estados Unidos, baseia-se no desenvolvimento de  
8 alternativas para os produtos químicos sintéticos, aplicando-se caminhos novos ou  
9 existentes, mas que não utilizem reagentes tóxicos ou solventes ou não gerem  
10 subprodutos ou co-produtos tóxicos; ou ainda no desenvolvimento de produtos  
11 químicos ou materiais úteis de tal forma que eles são menos tóxicos para a saúde e o  
12 meio ambiente, ou mais seguros com relação a seu potencial de causar acidentes  
13 ([http://opensourceecology.org/wiki/Green\\_Chemistry](http://opensourceecology.org/wiki/Green_Chemistry)).

14 O avanço do desenvolvimento industrial atual e da última década está intimamente  
15 relacionado com esse conceito, e a indústria se vê invadida por processos e produtos  
16 alternativos possibilitados pela biotecnologia. Alternativas industriais onde são  
17 aplicados microrganismos e enzimas substituem processos clássicos que são cada vez  
18 mais podados por legislações ambientais em diversos países (*Gavrilescua e Chistib,*  
19 2005). Alguns exemplos disso são: produção enzimática de acrilamida a partir da  
20 acetonitrila com uso da nitril-hidratase produzida por *B.subtilis*, processo antes  
21 catalisado por cobre ou ácido sulfúrico; aplicação de celulase na substituição de  
22 peróxido de hidrogênio para o branqueamento feito de têxteis; substituição de dióxido  
23 de cloro na indústria de papel pelas xilanases para o branqueamento de polpa; adição de  
24 fosfatase na ração de suínos para melhora nutricional com fósforo, no lugar da  
25 alimentação com fósforo inorgânico e conseqüente poluição ambiental (através do  
26 excesso de P das fezes do animal); diminuição da temperatura de limpeza de roupas pela  
27 presença de lipases nos detergentes domésticos, em substituição a aditivos fosfatados  
28 (*Wardencki et.al.; 2005*).

29 Com base em processos biotecnológicos também progride a pesquisa e a indústria da  
30 transformação de materiais lignocelulósicos em combustíveis, principalmente o bioetanol  
31 e outros derivados. Posto que, por sua vez, a busca de fontes de energia alternativas ao

32 petróleo e outros fósseis que fossem renováveis, abundantes e baratas impulsionou a  
33 utilização de biomassa, matérias primas de origem vegetal, consideradas resíduos ou  
34 não, para colaborar na redução da emissão de CO<sub>2</sub> na atmosfera, principais causadoras  
35 do efeito estufa, necessidade imposta pela sociedade e por leis ambientais (*Sousa et.al.;*  
36 *2009*).

37 Resíduos das práticas agrícolas e florestais são considerados as principais fontes de  
38 biomassa, de cujos componentes primários celulose, hemicelulose e lignina se obtêm  
39 valiosos produtos. Os custos relacionados a transformação da biomassa a combustível e  
40 químicos são demasiadamente altos; fato que exige que todos os seus componentes  
41 sejam explorados de forma máxima. Muitos esforços se vêem empregados na indústria e  
42 na pesquisa para o ideal aproveitamento da celulose, porém pouca atenção tem sido  
43 dada à hemicelulose, presente numa fração de aproximadamente 30% nos materiais  
44 lignocelulósicos. No entanto, para que o etanol de origem celulósica seja viável  
45 economicamente, derivados da hemicelulose, devem ser considerados e uma indústria  
46 embasada nas pentoses desenvolvida (*Dumon, et.al.; 2011*).

47 As unidades formadoras da hemicelulose podem ser divididas em pentoses, (xilose e  
48 arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos e deoxi-hexisoses,  
49 como ilustrado na figura 1: As xilanas diferem estruturalmente nos tamanhos e tipos de  
50 cadeia lateral que apresentam (ou ramificação), sua distribuição e localização. Elas são:  
51 glicurono-xilanas, (arabino) glicurono-xilanas, (glicurono) arabino-xilanas,  
52 arabinoxilanas e hetero-xilanas.(Nabarlatz, 2007). Xilana, formada por unidades de  
53 xilose é, depois da celulose, o polissacarídeo mais abundante na madeira e nos resíduos  
54 agrícolas. Os carboidratos dão à hemicelulose caráter hidrofílico; alguns de seus radicais  
55 laterais lhe dão caráter hidrofóbico. Esse heteropolímero, por isso, tem uma função  
56 adesiva na célula vegetal, formando uma interface entre a lignina (hidrofóbica) e outros  
57 polissacarídeos, por interações covalentes e não-covalentes (*Medeiros, 2007*).

58 Por sua vez, para se facilitar a obtenção da hemicelulose, o substrato dessas enzimas, o  
59 material lignocelulósico há de ser necessariamente pré-tratado. O pré-tratamento da  
60 biomassa desmembra seus componentes através da aplicação seqüencial de processos  
61 físicos, químicos ou biológicos, e ainda de técnicas mistas. O pré-tratamento é uma  
62 etapa chave para a utilização da biomassa como fonte de energia e químicos, visto que  
63 são processos caros e visto que a celulose, hemicelulose e lignina, que compõem os

64 materiais lignocelulósicos estão intimamente ligados por complexas ligações químicas.  
65 Ideal é um pré-tratamento que separe eficazmente celulose, hemicelulose e lignina,  
66 liberando-os sem danificá-los ou destruí-los. Além disso, deve ser de baixo custo e não  
67 poluente (*Thaharzedah, et.a., 2008, Parveen et.al., 2009, Arato et.al., 2005*).

68 O fracionamento da xilana, principal componente da hemicelulose, se dá pela ação de  
69 xilanases. Essas hidrolases vêm sendo utilizadas em vários segmentos da indústria:  
70 papel, panificação, bebidas, alimentos e ração animal, farmacêutica e química fina  
71 (*Dhiman, et.al.;2008*). Diversos microrganismos são capazes de sintetizar diversas  
72 variações de xilanases, graças à abundância e variabilidade encontrada na natureza, em  
73 forma de diferentes composições da xilana e da capacidade de fungos e bactérias de  
74 desenvolver diferentes estratégias de hidrólise de suas cadeias (*Wong, et.al., 1988*). São  
75 encontrados 4 principais tipos de xilana: O-acetil-4-O-metilglucoronxilana, xilana típica  
76 da madeira dura,; arabino-4-O-metilglucoronxilana, encontrada em madeira mole, o  
77 arabino-xilooligosacarídeo, do farelo de trigo, e a arabinxilana, encontrada em  
78 gramíneas. A partir delas, produtos de nobre valor podem ser gerados, como bioetanol  
79 com base em fermentação de xilose por microrganismos modificados; xilose e xilitol,  
80 importantes edulcorantes; biopolímeros usados em filmes biodegradáveis e /ou  
81 alimentícios; e xilo-oligossacarídeos (XOS), formados por cadeias curtas (2 a 7  
82 unidades) de xilose (e suas variações, como arabino-xilo-oligossacarídeo) (*Nabarlatz,*  
83 *2007*).

84 Os xilo-oligossacarídeos têm ganhado força na indústria alimentícia e farmacêutica,  
85 junto com outros oligossacarídeos, que são considerados ingredientes prebióticos. Os  
86 alimentos prebióticos e/ ou com adição de compostos prebióticos, bem como os  
87 sinbióticos (mistura de prebióticos com bactérias probióticas) têm alavancado a  
88 inovação do setor alimentício nas últimas décadas. O consumo de prebióticos traz  
89 diversos benefícios à saúde, desencadeados pelo aumento da população de bactérias  
90 probióticas, como bifidobactérias e bactérias lácteas. Por não serem absorvidos no  
91 estômago, são metabolizados por esses microrganismos, que então produzem ácidos  
92 graxos de cadeia curta, responsáveis por melhorar o estado de saúde do ser humano  
93 como um todo (*Goldman, 2008*).

94 Xilo-oligossacarídeos são obtidos enzimaticamente a partir da hemicelulose originária  
95 na biomassa, através do rompimento interno de suas cadeias, ou seja, empregando-se

96 uma endoxilanase. A hidrólise ácida também é empregada para fracionar eficazmente a  
97 xilana e é bastante comum, apesar de desencadear destruição dos açúcares com  
98 consequente geração de compostos tóxicos como furfural e hidroximetil-furfural, bem  
99 como derivados de lignina e de monossacarídeos, que devem ser separados do produto.

100 É justificável, portanto, a produção de xilo-oligossacarídeos pela rota enzimática, que se  
101 enquadra nos moldes da tecnologia verde (*Wardencki e Curylo, 2005*). Essa opção é  
102 deixada de lado num processo industrial visto que os custos relativos às enzimas  
103 sobrecarregam o processo. Para aliviar esse problema, são desenvolvidas enzimas  
104 imobilizadas. Técnicas avançadas tornam as enzimas insolúveis, presas a um  
105 transportador e, com isso, elas podem ser facilmente separadas do meio em que operam  
106 e ser reutilizadas. Além disso, a imobilização é capaz de aumentar o tempo de vida útil  
107 de uma enzima, por conferir-lhe estabilidade química e térmica, tornando-a menos  
108 sujeita a agressões provenientes do meio de reação (*Rodrigues et.al.; 2008*). Uma  
109 técnica de imobilização aplicada com sucesso para estabilizar diversas enzimas é a  
110 imobilização covalente em suporte microporoso, que liga a enzima através de fortes e  
111 irreversíveis ligações covalentes entre sítios ativos presentes na enzima e grupos  
112 químicos do suporte. Usa-se sílica, quitosana e agarose, bem como membranas  
113 poliméricas como suportes. A agarose ativada com glicidol, formando terminações  
114 aldeído em sua superfície é denominada agarose-glioxil e vem sendo vastamente  
115 utilizada para estabilizar enzimas, principalmente através da ligação multipontual. A  
116 técnica por imobilização multipontual é a ligação enzima-suporte ocorrida em diversos  
117 pontos simultaneamente e exige a existência de abundantes grupos químicos sobre a  
118 superfície do catalisador (*Mateo et.al., 2007*).

119 Neste trabalho, foram estudados diferentes aspectos do processo de produção de XOS a  
120 partir de materiais lignocelulósicos. O objetivo principal foi contribuir para a geração de  
121 um produto nobre derivado de materiais lignocelulósicos considerados resíduos e com  
122 isso contribuir para a agregação de valor à hemicelulose na cadeia produtora de  
123 bioetanol e derivados químicos de origem renovável. Para isso, buscou-se, inicialmente,  
124 desenvolver um derivado enzimático de endoxilanase ativo e estável para a aplicação de  
125 rota enzimática no processo de produção de XOS em substituição à rota química. A  
126 seguir, buscou-se estudar métodos para extração controlada de oligômeros de xilana, a  
127 partir de madeira e bagaço de cana de açúcar. Finalmente, as endoxilanasas

128 (imobilizadas) e os métodos de extração e matérias-primas selecionadas foram  
129 utilizados para produção de XOS em bateladas sequenciais.

130

131

## 132 *Capítulo 2*

### 133 2. Revisão Bibliográfica

#### 134 2.1. Enzimas

135 Enzimas são proteínas produzidas pelas células para com a função de catalisar reações  
136 biológicas. Elas possuem alto poder catalítico e especificidade, atuando em meio  
137 aquoso, sob condições brandas. Possuem assim alto potencial de aplicação na indústria  
138 na substituição parcial ou total de processos químicos de alto impacto ambiental.

139 Mais de 500 produtos comerciais distintos distribuídos em 50 tipos de aplicações  
140 compõem o cenário atual de enzimas industriais e representaram, no ano de 2010, um  
141 mercado global de US\$3,3 bilhões, com expectativas de alcançar a marca de US\$4,4  
142 bilhões em 2015 (*MarketResearch.com*). As enzimas têm estado presentes em processos  
143 industriais desde a década de 1960, sendo as hidrolases (75% do total) suas principais  
144 representantes (*Dhiman, 2008*). Elas detêm o poder de substituir processos químicos  
145 satisfazendo a necessidade por parte das empresas de adotarem rotas ambientalmente  
146 mais benignas na produção de bens de consumo. Proteases são empregadas, por  
147 exemplo, na área de detergentes, celulases e amilases na indústria têxtil, alfa-amilase na  
148 panificação, beta-glucanase na indústria de sucos, entre outros (*Dhiman, 2008*).

##### 149 2.1.1. Xilanases

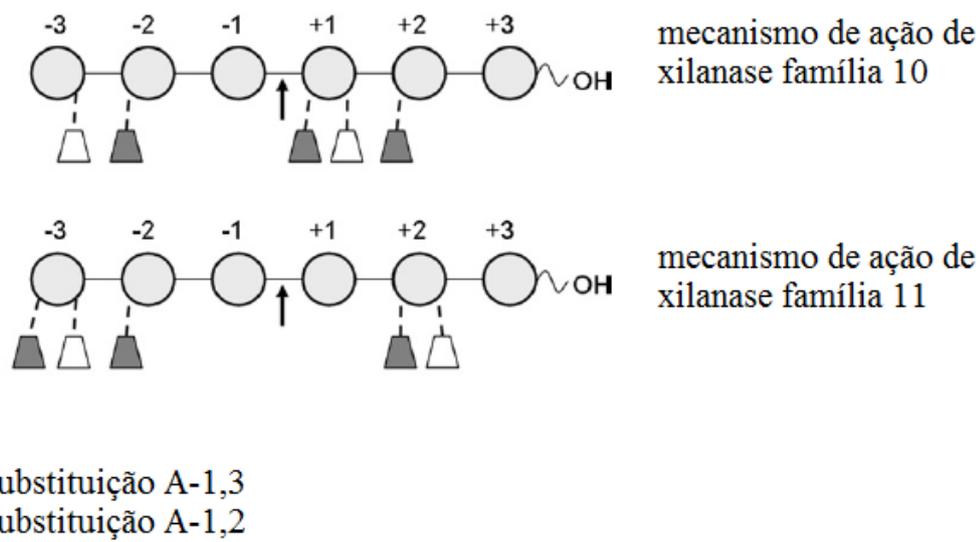
150 Xilanases, ou  $\beta$ -1,4-D-xilanase, hidrolisa ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas entre unidades de  
151 xilose, a pentose constituinte do polímero xilana. Principal forma da hemicelulose, a  
152 xilana é um complexo polissacarídeo com ramificações que, juntamente com a celulose  
153 e a lignina, compõe as células vegetais (*Nabarlantz, 2007*).

154 Xilanas distribuídas na natureza diferem nos seus graus de polimerização, no número e  
155 tipos de ramificação, podendo ter radicais acetil (de ácido acético), radicais de  
156 arabinose, ácido glucorônico, galactose e xilose, com suas combinações. A  
157 heterogeneidade dentro das diversas constituições, bem como a proteção adicional  
158 estabelecida por ligações da xilana com a lignina e a celulose nas células vegetais pode

159 representar uma barreira, exigindo de micro-organismos capacidades múltiplas na  
160 produção de enzimas xilanolíticas (Wong, *et.al.*, 1988; Dumon *et.al.*, 2011).

161 Os dois principais grupos que constituem o sistema de hidrólise de xilana são: endo-1,4-  
162  $\beta$  D-xilanases (EC 3.2.1.8) aleatoriamente clivam a cadeia de xilana principal,  
163 reduzindo seu grau de polimerização e gerando XOS e  $\beta$ -D-xilosidases (EC 3.2.1.37),  
164 responsáveis pela liberação de monômeros de xilose a partir do final não redutor de  
165 xilo-oligosaccharides (Collins *et al.* 2005, Polizeli *et al.*, 2005). Simplificadamente,  
166 endoxilanases (EXs) foram classificadas em dois grupos principais, família 10 e família  
167 11, mais estudados. Eles diferem em suas propriedades físico-químicas, tais como ponto  
168 isoelétrico e massa molecular e semelhanças em suas sequencias de aminoácidos  
169 (Kolenová, 2006, Dumon *et.al.*, 2011). A massa molecular do domínio catalítico de xilanases  
170 de família 10 é geralmente  $\geq 30$  kDa o valor de pI é geralmente baixo. Em contraste,  
171 xilanases pertencentes à família 11 são caracterizadas por um menor domínio catalítico  
172 com MM  $\geq 20$  kDa e seu pI assume valores mais elevados. Membros da família de 10  
173 exibem maior versatilidade catalítica e especificidade menor do que a família substrato  
174 11 EXs (Wong *et al.*, 1988; P. Biely, 1997; Christakopoulos, *et al.*; 2003, Dumon *et.al.*, 2011). Embora  
175 ambos os tipos de EXs mostrem preferência para atacar as ligações glicosídicas internas  
176 em xilanas, a estrutura dos produtos finais de hidrólise de heteroxilanas sugere que EXs  
177 da família 10 são capazes de clivar as ligações na cadeia principal de xilana mais perto  
178 de substitutos, e libera XOS mais curtos, portanto, possuem várias atividades catalíticas  
179 que são compatíveis com as da  $\beta$ -xilosidase (Kolenová, 2006, p. Biely, 1997). O mecanismo  
180 de ação de endoxilanases de família 10 e de família 11 é mostrado na figura 2.1.

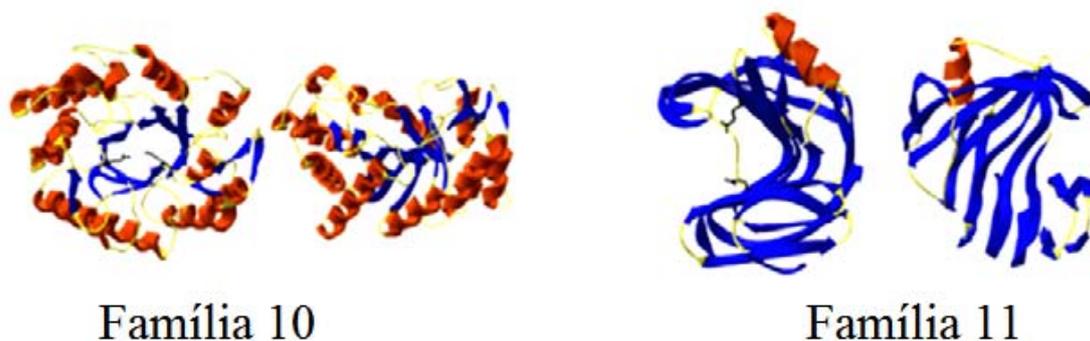
181 Figura 2.1.: Capacidade hidrolítica das xilanases 10 e 11 sobre arabinoxilanas (Dumon  
182 *et.al.*, 2011).



183

184 Além disso, xilanases de família 10 e 11 diferem bastante de um ponto de vista  
 185 estrutural. Uma estrutura típica de xilanases de família 10 é a conformação tipo  $\alpha$ - $\beta$  em  
 186 forma de barril, que pode estar associada a outros domínios funcionais, enquanto que  
 187 para as xilanases de família 11 exibem uma estrutura globular comparada a uma mão  
 188 direita parcialmente fechada. A figura 2.2 apresenta ambas as configurações (*Dumon*  
 189 *et.al., 2011*).

190 Figura 2.1.2. Estrutura tridimensional de xilanases das famílias 10 e 11.



191

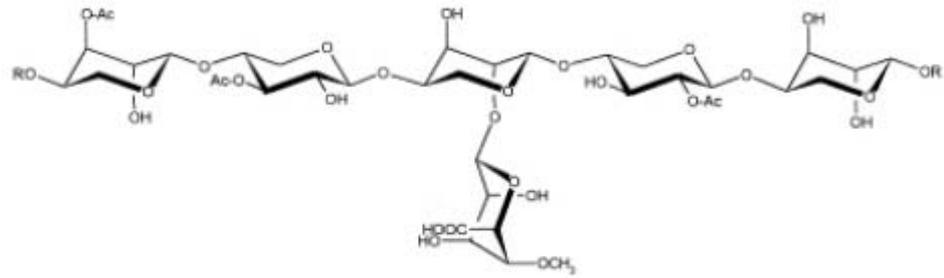
192 Muitos microrganismos produzem duas ou mais formas de xilanases, que podem ter  
 193 diversas propriedades físico-químicas, estruturais, atividades específicas e de  
 194 rendimentos (*Collins, et. al., 2005*). Essa multiplicidade está relacionada com base em  
 195 mecanismos de hidrólise tipos endo / exo (ou seja, ataque a ligações internas / ataques  
 196 longitudinais), à presença ou ausência de atividades para liberação de resíduos

197 arabinosil de arabinoxilanas, ou à habilidade para atacar xilana / xilodextrinas para  
198 liberação de resíduos de xilose (Wong *et.al.*, 1988, Adelsberger, *et.al.*, 2004). Apesar de  
199 a grande maioria dos autores relatarem sobre a existência, dentre as endoxilanas, das  
200 famílias 10 e 11, algumas singularidades em modo de ação e sequencia de aminoácidos  
201 são relatadas, por alguns autores, como base para a existência de outras classes de  
202 endoxilanas, GH 5,7,8 e 48. Dentre essas, destaca-se a família 5. (Vršanská, *et.al.*;  
203 2007). EX de família 5 assemelham-se com EX da família 10, em suas propriedades  
204 catalíticas e estruturas terciárias. Ambas fazem parte de um clan maior de enzimas cuja  
205 arquitetura  $\alpha/\beta$  barril é octo-pregueada (Vršanská, *et.al.*; 2007; Dominguez *et.al.*, 1995).  
206 Ao se analisar as estruturas terciárias das EX 10 e 11 nota-se claramente que evoluíram  
207 de ancestrais diferentes (Dominguez *et.al.*, 1995). Geralmente, possuem PI ácido ou  
208 neutro e massa molecular variando entre 23 e 48 kD (Darlymple *et.al.*, 1997). São capazes  
209 de atacar resíduos de D-xilopiranosil que possuam ramificações acetil - ou outras  
210 ramificações (Vršanská, *et.al.*; 2007) - da xilana em posições 2 e 3 (Darlymple *et.al.*,  
211 1997).

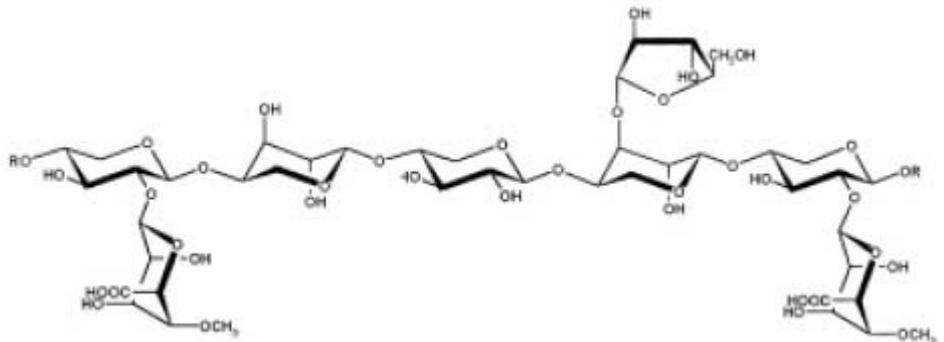
#### 212 2.1.1. Xilanas

213 A cadeia principal de xilana pode ter grau de polimerização entre 150 a 200 unidades e,  
214 dependendo dos compostos que constituem as suas ramificações, ela possui  
215 características e denominações diferentes (Beg *et al.* 2001; Nabarlatz, 2007). As  
216 diversas variedades de xilana encontradas na natureza estão mostradas na figura 2.3  
217 abaixo. O-acetil-4-O-metilglucoronxilana (a) é típico da madeira dura, que possui um  
218 número grande de grupos acetil em sua estrutura. Arabino-4-O-metilglucoronxilana (b)  
219 é encontrado em madeira mole, o arabino-xilo-oligosacarideo (c) é a xilana de farelo de  
220 trigo, bastante estudada por suas características benéficas à saúde e a (d) arabinoxilana  
221 caracteriza a biomassa de gramíneas (Beg *et al.* 2001; Nabarlatz, 2007).

222 Figura 2.3. Tipos de Xilana: (a) O-acetil-4-O-metilglucoronxilana (madeira dura), (b)  
223 arabino-4-O-metilglucoronxilana (madeira mole), (c) arabino-xilo-oligosacarideo  
224 (farelo de trigo), (d) arabinoxilana (gramíneas) (Nabarlatz, 2007).

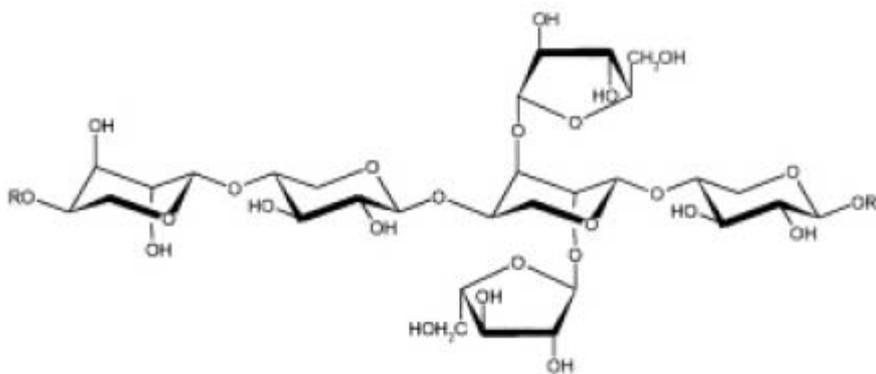


a)

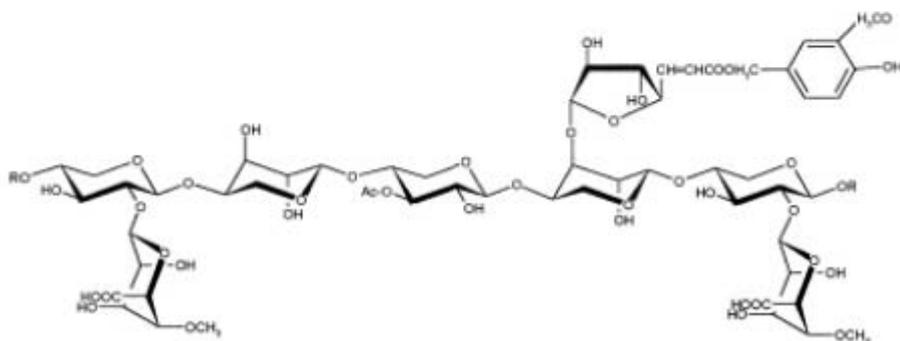


b)

225



c)



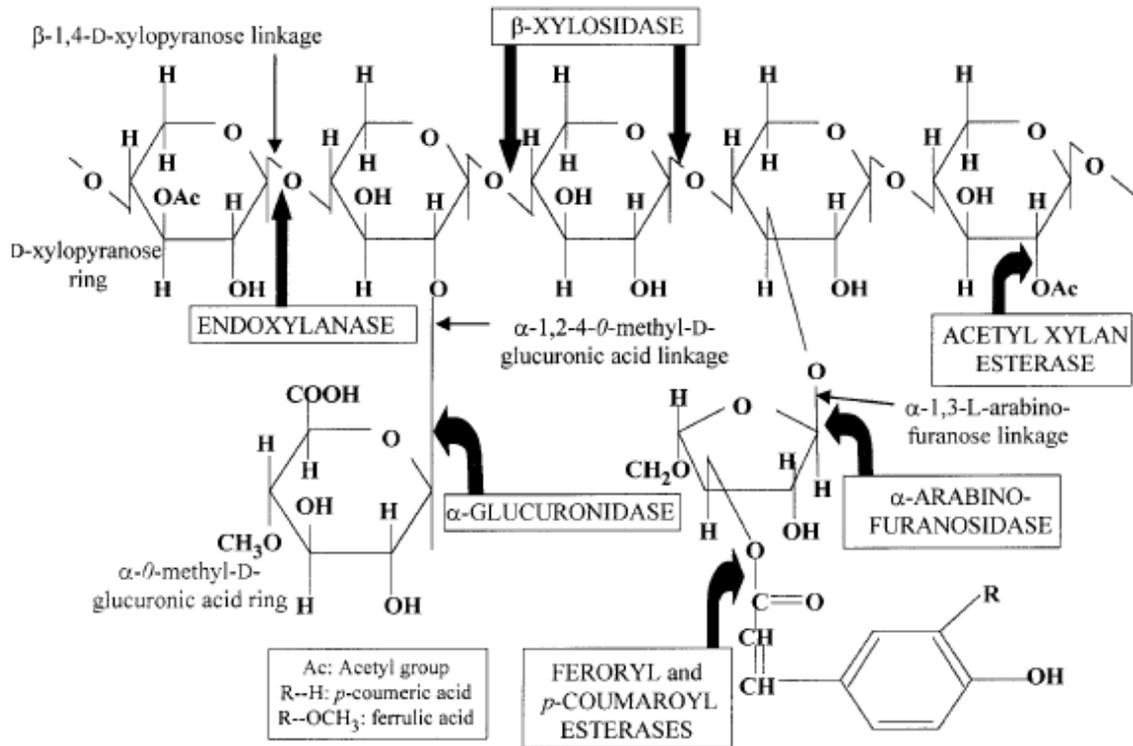
d)

226

227 Para realizar a hidrólise completa de todas as formas de xilana em monômeros,  
 228 considerando que diferentes fontes de biomassa possuem distintos grupos em suas

229 ramificações é necessário recorrer a um composto enzimático formado de diversas  
 230 enzimas, dentre as quais está a  $\beta$ -1-4-endoxilânase. A Figura 2.4 a seguir apresenta as  
 231 diferentes enzimas que fazem parte do complexo enzimático de hidrólise das várias  
 232 formas de xilana encontradas na natureza (Beg *et al.*, 2001).

233 Figura 2.4. Complexo enzimático de degradação da xilana (Beg *et al.* 2001).



234

235 Xilanases hidrolisam com certa especificidade as ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas,  
 236 produzindo xilo-oligômeros de diferentes tamanhos. As enzimas são agrupadas como  
 237 “exo” ou “endo” xilanases, dependendo de atuarem na porção terminal do  
 238 polissacarídeo ou em ligações internas, respectivamente (Karni *et al.*, 1993, Adsul *et al.*,  
 239 2004).

240 As ligações xilanosídicas em lignocelulose não são todas equivalentes e igualmente  
 241 disponíveis para enzimas xilanolíticas. A acessibilidade de algumas ligações muda  
 242 durante o curso da hidrólise. Na composição do sistema enzimático, cada enzima possui  
 243 uma função especializada, sendo esta diversidade uma estratégia que o micro-organismo  
 244 pode usar para conseguir hidrólise total da xilana (Medeiros, 2007).

245 Embora as xilanases disponíveis comercialmente ou produzidas em laboratório possam  
246 ser majoritariamente endo ou exo-enzimas, possivelmente sempre as duas estarão  
247 presentes nos complexos enzimáticos. Assim, estudo das condições de hidrólise é  
248 importante para o controle do produto desejado.

249 A principal aplicação da xilanase é na indústria de papel, permitindo a diminuição do  
250 emprego de cloro nos processos de clareamento de polpa. É também utilizada na  
251 indústria de alimentos, para aprimoramento nutricional da ração animal; no  
252 melhoramento de características de massa, na panificação; na produção de xilo-  
253 oligosacarídeos (aditivos alimentícios) e também na extração de café e óleos vegetais  
254 (*Cherry,2002, Dhiman,2008, Polizeli,2005. Beg,2001*).

## 255 2.2. Imobilização de enzimas

256 Enzimas são potentes e específicos catalisadores, mas elas são solúveis em meio  
257 aquoso, caras e frágeis, operacionalmente, o que muitas vezes pode inviabilizar  
258 economicamente o processo enzimático. O custo de produção em escala industrial é  
259 estimado em 250-1000 €/kg, para a enzima não purificada (*Tufvesson et.al.,2011*). Nos  
260 moldes atuais de produção de bioetanol, por exemplo, as enzimas podem representar até  
261 50% do custo total de processo. A redução deste valor pode ter efeito decisivo para  
262 viabilizar a obtenção desse combustível a partir de materiais lignocelulósicos  
263 (*Cleantech magazine, Março/Abril 2010. Copyright Cleantech Investor Ltd.*). Essencial  
264 é que as enzimas sejam estáveis e possam ser recuperadas para serem novamente  
265 utilizadas em processos sequenciais. A ligação covalente destas a suportes e a utilização  
266 de estratégias de estabilização da enzima irá permitir a reutilização do catalisador e,  
267 consequentemente, reduzir os custos da hidrólise enzimática. A imobilização  
268 multipontual, em especial, onde vários grupos de uma mesma molécula de enzima se  
269 ligam a diferentes grupos reativos produzidos no suporte vem sendo usada com grande  
270 sucesso para aumento da estabilidade da enzima (*Tardioli et al., 2003 a,b, Rodrigues et.al,*  
271 *2007, Manrich et. l., 2008, Adriano et al., 2008, Manrich et al., 2010*).

272 Existem basicamente quatro métodos tradicionais distintos para imobilização da  
273 enzima, a ligação a um suporte, o encapsulação e as enzimas reticuladas (CLEAs ou  
274 CLECs (*Kim, S.W.;2004*).

275 Ligação a um suporte pode ser de natureza física (na qual atuam forças de interação  
276 hidrofóbica ou de Van der Waals), iônica ou covalente. Ligação física é normalmente  
277 muito fraca e não capaz de manter a ligação da enzima a sua carregador em condições  
278 de operação industrial. Assim também é a ligação covalente, porém esta é mais forte  
279 que a primeira. A ligação covalente garante que o catalisador não escape do suporte  
280 através de sua ligação de natureza irreversível. A desvantagem, neste caso, é que tanto  
281 enzima quanto suporte não são recuperáveis em sua natureza original e a técnica leva na  
282 maior parte das vezes, a perdas excessivas de atividade enzimática (*J. Bryjak, e Kolarz,*  
283 *1998*). Suportes usados são, por exemplo, sílica, quitosana, zeólitas e agarose (*Sheldon,*  
284 *2007*).

285 Aprisionamento consiste da inclusão de uma enzima em uma grade polimérica  
286 (polímero orgânico, membrana ou microcápsula), onde normalmente se realiza  
287 adicionalmente ligação covalente para fortalecer a interação entre enzima e suporte e  
288 aprisionando a enzima no suporte. A diferença deste método para a ligação covalente é  
289 que no aprisionamento o suporte necessariamente deve ser sintetizado em presença da  
290 enzima (*Sheldon, 2007*). A figura 2.5 ilustra o aprisionamento de uma enzima dentro de  
291 uma rede de nanotubos (*Miyaki, et.al., 2011*)

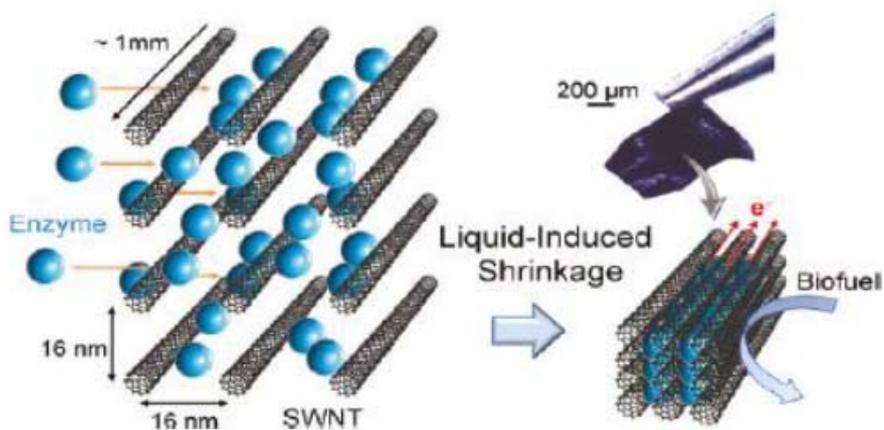


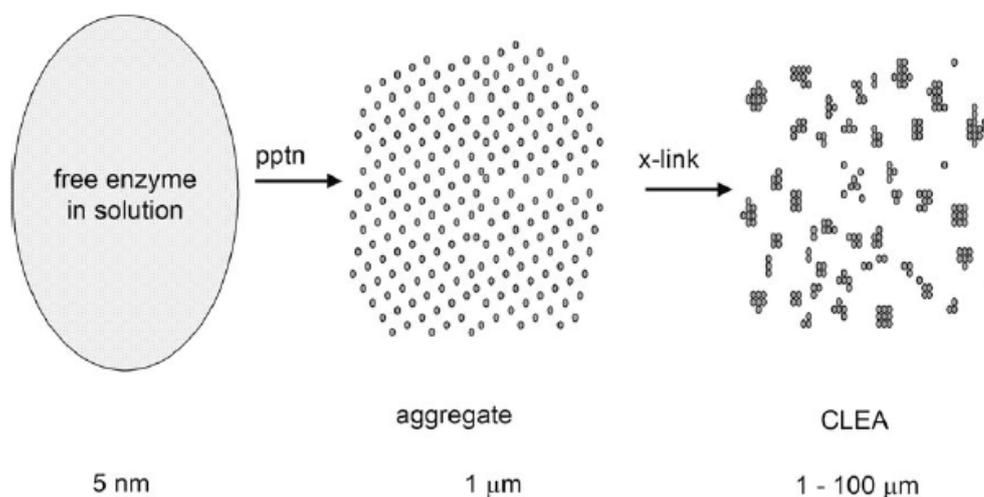
Diagrama esquemático de aprisionamento enzima dentro de uma rede de nanotubos de carbono. técnica: encolhimento por indução líquida.

292

293 reticulação é a técnica de preparação de agregados ou cristais de enzima, usando um  
294 agente bifuncional, formando macropartículas. Neste caso, não se utiliza um carregador  
295 ou suporte. Esta abordagem oferece vantagens claras: a atividade da enzima altamente  
296 concentrada no catalisador, estabilidade, alta e baixos custos de produção devido à

297 exclusão de um suporte. A ligação enzimas via reação de seus grupos funcionais  
298 superficiais, por exemplo NH<sub>2</sub>, com emprego de agente bifuncional como glutaraldeído,  
299 consiste na preparação de CLECs (crosslinked enzyme crystals). Essa técnica pode ser  
300 muito trabalhosa, demorada e depender de experimentos de tentativa e erro,  
301 apresentando neste contexto desvantagem em relação aos cada vez mais explorados  
302 CLEAs. Os CLEAs (cross-linked enzyme aggregates) são agregados de proteínas  
303 (enzimas) formados pelo agrupamento de interação não-covalente causadas por adição  
304 de sais ou solventes orgânicos no meio, sem causar interferência em sua estrutura  
305 tridimensional (*Sheldon, 2007*). O método de crosslinking por CLEA é mostrado na  
306 figura 2.6.

307 Figura 2.6.: Exemplo de preparação de CLEA. (*Sheldon, 2007*).



308

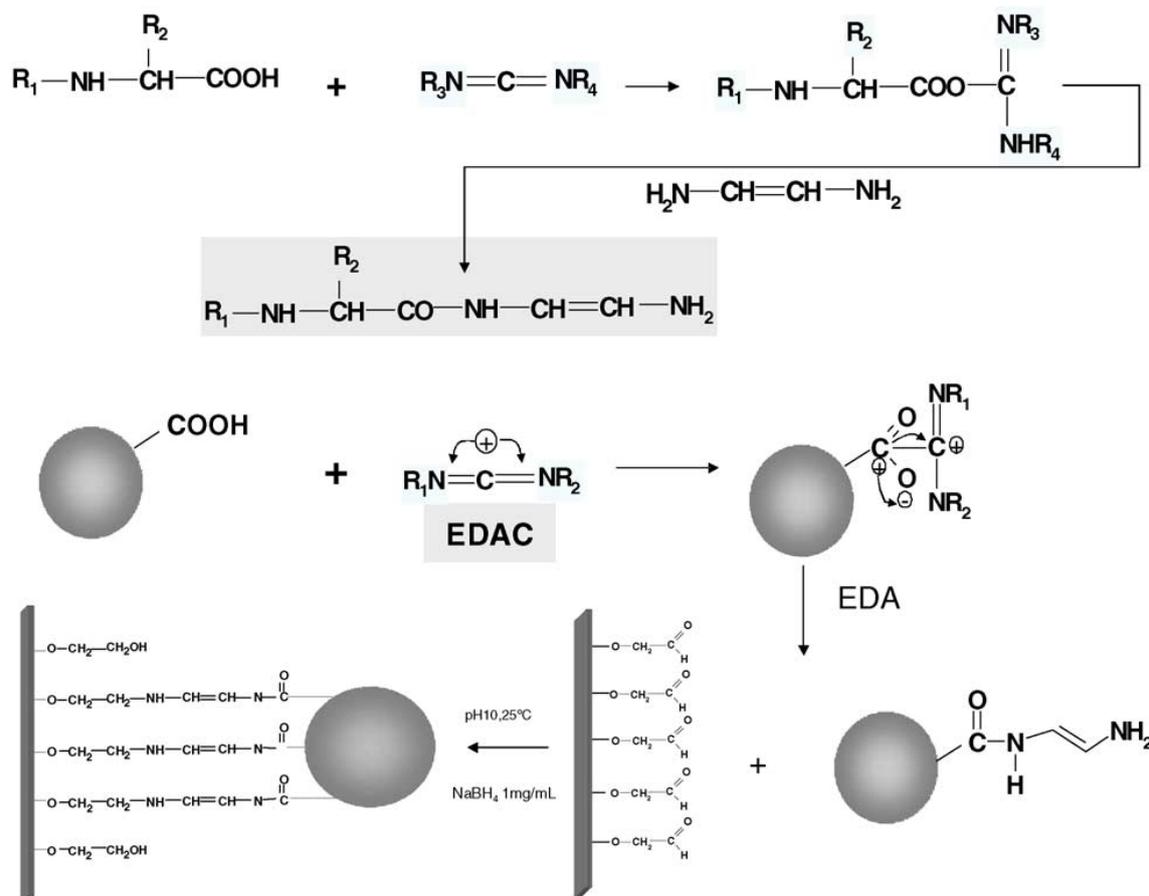
309 Adequadas técnicas de imobilização de enzimas podem conferir aos biocatalisadores  
310 propriedades não somente de insolubilização e reutilização, mas também de operação  
311 por tempos prolongados e em altas temperaturas. A determinação de suporte e método  
312 de imobilização deve ser cuidadosamente estudada para cada enzima e aplicação,  
313 considerando as características químicas e estruturais do conjunto e o mecanismo de  
314 ligação entre eles (*Lopez-Gallego, et.al., 2005*).

315 Um sistema de imobilização e estabilização desenvolvido por Guisán em 1988,  
316 consolidado por diversos autores (*Fernandez-Lafuente et.al., 1992, Tardioli et.al., 2003*  
317 *a,b*) consiste na ligação de grupos amino da enzima (encontrados no aminoácido lisina)

318 a grupos aldeído introduzidos na superfície de um suporte poroso, como gel de agarose,  
319 por ativação com glicidol e outros agentes (epicloridrina e glutaraldeído). Quando são  
320 efetivadas em número adequado, essas ligações tornam a molécula da enzima mais  
321 rígida, protegendo-a de perdas de atividades causadas por alterações conformacionais  
322 em sua estrutura tridimensional provocadas por efeito de calor, solventes e íons  
323 presentes no meio de reação (*Blanco, 1989; Lopez-Gallego et.al., 2005*).

324 Certas proteínas, no entanto, não dispõem de número suficiente de lisina em regiões  
325 acessíveis. Nesses casos, estabilização por ligação multipontual pode ser utilizada após  
326 uma etapa de modificação da enzima, através de alterações em sua sequência de  
327 aminoácidos por uso de engenharia genética ou por reações químicas, que introduzem  
328 grupos amino adicionais na superfície da proteína. Possível estratégia, aminação de  
329 grupos carboxílicos de aminoácidos como ácidos glutâmico e aspártico da superfície da  
330 enzima com etilenodiamina, foi proposta por Hoare and Koshland, em 1967 e descrita  
331 também por Lopez-Gallego et.al. (2005). A Figura 2.7 mostra a sequência de reações da  
332 técnica de aminação.

333 Figura 2.7: Reação de aminação e consecutiva imobilização por ligação covalente em  
334 agarose glioxil.



336 Muitos autores reportam a aplicação de xilanases imobilizadas para uso em processos  
 337 industriais, porém a estabilização destas enzimas é pouco relatada (*Beg et.al., 2001; Ai,*  
 338 *et.al., 2005, Cano e Palet, 2007*). A reutilização em processos sequenciais do  
 339 biocatalisador imobilizado também é um problema. Uma exceção é o trabalho reportado  
 340 por Kapoor and Kuhad em 2007, onde se obteve recuperação de 70% da atividade do  
 341 derivado de xilanase após sete ciclos de reação. A Tabela 2.1 abaixo apresenta alguns  
 342 exemplos encontradas na literatura de tentativas de imobilização e estabilização de  
 343 xilanases.

344 Tabela. 2.1: Técnicas utilizadas para imobilizar e estabilizar xilanases reportadas na  
 345 literatura.

Autor	Método de imobilização	Suporte	RI% (rendim. Imob.)	Fator de estabilização	Reciclos
-------	------------------------	---------	---------------------	------------------------	----------

---

<b>Cano et al. 2007</b>	Ligação covalente	Membranas poliméricas acrilato	100	n.a.	1
<b>Komesu et al. 2009</b>	Ligação covalente e diferentes agentes ativantes	diferentes géis de quitosana	Máx. 87	máx. 1.3	n.a.
<b>Ai et al. 2005</b>	Ligação covalente	Eudragit S-100	90	aumentou	4
<b>Maalej- Achouri et al. 2009</b>	Crosslinking	gelatina	89	aumentou	13
<b>Kapoor e Kuhad, 2007</b>	Encapsulamento Adsorção Lig. Covalente e lig. iônica	gelatina quitina géis poliméricos	n.a. n.a. n.a.	cerca de 1.2	6

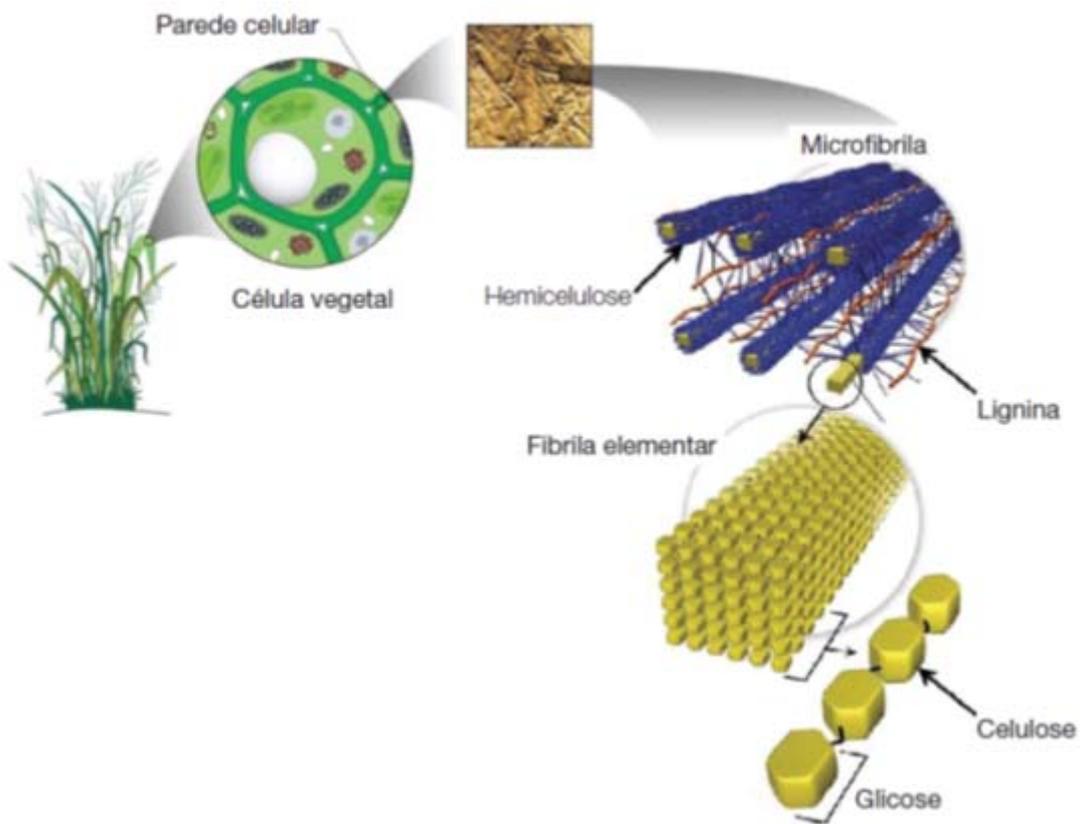
---

346

### 347 2.3. Materiais Lignocelulósicos

348 Materiais lignocelulósicos consistem do material que compõe toda parede celular  
 349 vegetal, que inclui primeiramente celulose (30-50%), hemicelulose (15-35%) e lignina  
 350 (10-30%) (*Sousa, et.al. 2009*). Também denominado de biomassa, é atualmente  
 351 considerado em o todo mundo como a principal fonte capaz de substituir materiais  
 352 fósseis, gerando combustíveis e precursores para as indústrias alimentícia, química e  
 353 farmacêutica. Sob este ponto de vista, uma exploração superior de todos os seus  
 354 componentes pode reduzir os custos relacionados com a produção de bioetanol,  
 355 principal substituto de combustível líquido derivado do petróleo; proporcionando  
 356 vantagens econômicas ao mesmo tempo em que contribui na redução de resíduos.  
 357 (*Sedlmeyer, 2011*). Principais fontes de lignocelulose são práticas agrícolas, oriundas de  
 358 manutenção de florestas e processamento de madeiras, totalizando cerca de 40 milhões  
 359 de toneladas de resíduos sólidos por ano (*Cano e Palet, 2007*). A figura 2.8. ilustra a  
 360 estrutura do complexo formado por celulose, hemicelulose e lignina.

361 Figura 2.8. Arquitetura da parede celular vegetal (adaptado de  
362 <http://genomics.energy.gov>).



363

### 364 2.3.1. Pó de Serra de Madeira

365 Dois tipos de madeira foram testados neste trabalho, o álamo, e a faia. As características  
366 da madeira de álamo não diferem muito entre os seus diferentes tipos ou cultivo.  
367 Geralmente as espécies de álamo possuem toda a madeira muito mole, e pertencem ao  
368 grupo de árvores de folha caduca cuja madeira é uma das mais moles. Madeira das  
369 árvores de folha caduca pode ser mole ou dura. Choupo negro, *Populus nigra*, é uma  
370 das espécies de madeira nativas alemãs, mas por volta de 1700 o choupo negro começou  
371 a ser fortemente hibridizados naturalmente com outras espécies não nativas do gênero  
372 *Populus*, que eram cultivadas. Na Alemanha, todas as espécies são chamadas de  
373 "Pappel" com exceção do *Tremulus populus*, chamado "Aspe". Faia, uma madeira dura  
374 típica alemã, é também uma árvore de folha caduca, cujas folhas se tornam muito verdes  
375 no verão de toda a Europa central. É a árvore de folha caduca mais importante da  
376 Alemanha, onde a espécie mais comum possui madeira avermelhada, a *Fagus silvatica*

377 (Rotbuche). São árvores imponentes que podem atingir 40 m de altura e largura de 1,5  
378 m, vivendo por aproximadamente 300 anos. (Grosser, 2006; von Wühlisch, G, 2006).

379 As típicas formas de xilana encontradas em madeira dura e madeira mole são,  
380 respectivamente, O-acetil-4-O-metilglucoronoxilana e arabino-4-O-arabino-  
381 metilglucoronoxilana (Polizeli, et.al., 2005; Nabarlantz, 2007).

### 382 2.3.2. Bagaço de Cana-de Açúcar

383 O nome científico da cana de açúcar é *Saccharum officinarum*. Segundo Banerjee e  
384 Pandey (2002). Ela é proveniente do Sudoeste asiático, recebe classificação dentro da  
385 família *Proaceae*, assim como o milho, sorgo, arroz e outras plantas da ordem das  
386 gramíneas. O bagaço de cana de açúcar apresenta 32-48 % de celulose, 19-24 % de  
387 hemicelulose, 23-32% de lignina, 3,2 a 5,5 % de cinzas. Em geral o processamento de  
388 uma tonelada de cana de açúcar gera cerca de 280 Kg de bagaço com 50% de umidade  
389 previsão safra 2010 2011 625 milhões de toneladas (CONAB, 2011).

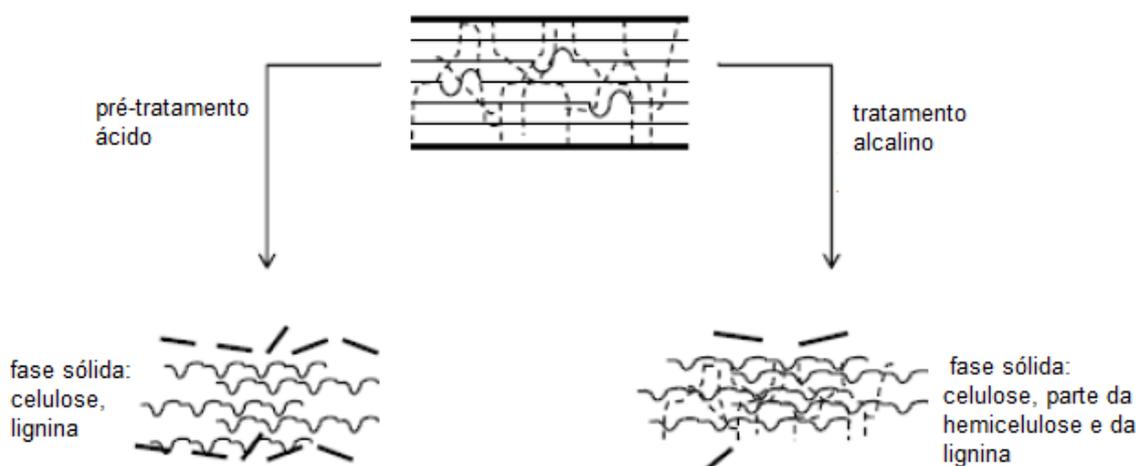
390 A xilana apresenta-se na cana de açúcar principalmente em forma de L-arabino-(4-O-  
391 metil-D-glucorono)-xilana (Peng et.al., 2009), a mesma encontrada para as madeiras  
392 moles; apesar de a arabinoxilana ser a forma mais comum de xilana dentre as gramíneas  
393 em geral (Nabarlantz, 2007). Brienzo et.al., 2010 determinou a composição da  
394 hemicelulose de bagaço de cana de açúcar, constatando proporções de 80,9% de xilose,  
395 3,8% de arabinose, 4,2% de glicose e 3,2% de ácido urônico; e sugeriu uma razão  
396 existente Xilose/arabinose e Xilose/ ácido.urônico de aproximadamente 20:1, na matéria  
397 prima analisada.

### 398 2.4. Pré-tratamentos do Material Lignocelulósico

399 As propriedades inerentes da lignocelulose representam uma barreira a ações de  
400 enzimas e microrganismos que realizam hidrólise e fermentação, respectivamente Logo  
401 a sua complexa matriz, fortemente atrelada em cadeias de celulose recobertas de lignina  
402 e ligadas pela hemicelulose, deve ser rompida, para que cada um de seus componentes  
403 seja desmembrado e possa ser separadamente utilizado. Capazes de atingir esse  
404 objetivo, os chamados pré-tratamentos; processos considerados custosos, desafiadores e  
405 muito complicados, visto a diversidade das diferentes fontes de biomassa conhecidas  
406 (Thaharzedah, e Karimi 2008, Kumar e Barret, 2009, Arato et.al., 2005.); têm sido

407 empregados. Considerado também como operação unitária protagonista no conjunto de  
408 processos que irão fragmentar a biomassa em seus derivados comercialmente atraentes,  
409 o pré-tratamento, quando idealizado, é capaz de: aumentar a porosidade do material  
410 lignocelulósico, diminuir a cristalinidade da celulose, evitar degradação ou perda de  
411 carboidratos, evitar formação de produtos inibitórios a processos de hidrólise e  
412 fermentação, ser efetivo economicamente e permitir aumento de escala (*Thaharzedah, e*  
413 *Karimi 2008, Kumar e Barret, 2009, Arato et.al., 2005*). A figura 2.9. mostra como a  
414 biomassa é desmembrada por efeito do pré-tratamento.

415 Figura 2.9. Desmembramento da biomassa causado pelo pré-tratamento (*Keshwani,*  
416 *2009*).



417  
418 As diversas possibilidades de pré-tratar a lignocelulose, ou abrir a sua complexa matriz  
419 são divididas em quatro grandes grupos, englobando processos físicos, físico-químicos,  
420 químicos e biológicos. Os principais métodos de pré-tratamento aparecem resumidos  
421 abaixo, onde são mostradas suas características. Esta tabela foi extraída e adaptada de  
422 (*Thaharzedah, e Karimi 2008, Kumar e Barret, 2009, Arato et.al., 2005*)

423 Tabela 2.2. Resumo dos principais tipos de pré-tratamento e seus efeitos esperados  
424 (*Thaharzedah, e Karimi 2008, Kumar e Barret, 2009, Arato et.al., 2005*).

Métodos	Procedimentos/Agentes	Considerações	Exemplos de materiais pre-tratados	Referências
<b>Métodos Físico-Químicos:</b>				
Explosão de Vapor (Steam Explosion)	Vapor saturado a T 160-290°C, alta pressão por alguns segundos a minutos alta pressão por alguns segundos a minutos	Permite tratamento de larga escala sólida, há hidrólise de 80 a 100% da hemicelulose, destruição parcial da xilana, alta recuperação de xilose. Há geração de substâncias inibidoras e depolimerização parcial de celulose. Não há solubilização de lignina. permite alta conversão posterior de celulose	Madeiras moles (eucalipto, choupo, coníferas), bagaço, palhas de arroz, trigo, gramíneas, caroços de oliva	Ballestores et al. (2001, 2002, 2004), Belkacemi et al (1997, 2002), De Bari et al., (2002), Hamelink et al., (2005), Lynd et al., (2002), Nakamura et al.,(2001), entre outros
Água quente líquida	Água pressurizada T 170-230°C, 1-45 min., conteúdo sólido <20%	Redistribuição da lignina, com parcial solubilização, hidrólise de 80 a 100% da hemicelulose com alta recuperação, >50% oligômeros de xilose. Hidrólise parcial de celulose, mas permite alta conversão posterior de celulose	Bagaço, palha de milho, fibra de alfafa	Ballestores et al. (2002), Koegl et al., (1999), Laser et al., (2002), Lynd et al., (2002), entre outros
Explosão com Amônia (AFEX)	1-2 kg ammonia/kg matéria seca, 90°C, 30 min, alta pressão	Necessidade de recuperação da amônia, hidrólise de até 60% da hemicelulose com >90% oligômeros, hidrólise parcial da celulose, baixa formação de inibidores, parcial solubilização da lignina, permite alta conversão posterior de celulose	Bagaço, palha de milho, palha de arroz e trigo, gramíneas, madeira mole	Dale et al., (1996), Lynd et al.,(2002), Sun and Cheng,(2002)
Explosão com CO2	4 Kg CO2/kg fibra, alta pressão	Baixa formação de inibidores, permite alta conversão posterior de celulose	Bagaço, alfafa, papel reciclado	Sun and Cheng,(2002)

## Métodos Químicos:

Ozonólise	Ozônio, temperatura e pressão ambientes	Não há formação de inibidores, cerca de 57% de conversão posterior da celulose, degradação da lignina	Pó de serra de choupo, pinus, bagaço, palha de trigo, palha de algodão	Sun and Cheng,(2002)
Hidrólise com ácido diluído	0,75-5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCl ou HNO <sub>3</sub> , p~1MPa, permite processo contínuo ou batelada, T=160-200°C,	Necessidade de neutralização de pH, hidrólise de 80%-100% da hemicelulose com alguma degradação, hidrólise parcial da celulose, não h solubilização da lignina, permite alta conversão	Bagaço, palha de milho, palha de arroz e trigo, gramíneas	Hamelinck et al. (2005), Lynd et al.(2002), Martinez et al.(2000), Rodríguez-Chong et al.,(2004), Saha et al.(2005), Schell et al.(2003), Sun and Cheng,(2002), Wooley et al.,(1999)
Hidrólise com ácido concentrado	10-30% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 170-190°C, 1:1,6 relação solido:líquido,	Necessidade de recuperação do ácido, tempo de residência maior comparado a hidrólise com ácido diluído	Pó de serra de choupo, bagaço	Cuzens e Miller (1997), Teixeira et al., (1999)
Hidrólise alcalina	NaOH diluído, 24h, 60°C, Ca(OH) <sub>2</sub> , 4h, 120°C, pode ser complementado com adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (0,5-2,15vo.%) a baixa temperatura (35°C)	Custos de reator mais baixos comparados a tratamento ácido, > 50% hidrólise da hemicelulose, 60-75% reuperação da xilose, baixa formação de inibidores, expansão da celulose, até 55% de remoção da lignina	madeiras duras, bagaço, palha de milho e palhas em geral, folhas de cana	Hamelinck et al. (2005), Hari Krisshna et al. (1998), Kaar e Hotzapple (2002), Lynd et al.(2002), Saha e Cotta(2006), Sun and Cheng,(2002), Teixeira et al. 1999)

Deslignificação oxidativa	Peroxidase e 2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 20°C, 8h	Quase total solubilização da hemicelulose, possível conversão da celulose em até 95%, 50% de solubilização da lignina	Bagaço	Sun and Cheng,(2002)
Oxidação úmida	1,2MPa pressão de oxigênio, 195°C, 15 min, adição de água e pequenas quantidades de NaCO <sub>3</sub> ou H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Solubilização da maior parte da hemicelulose, formação de inibidores, degradação da lignina	palha de milho de trigo	Bjerre et al., (1996), Vargas et al.(2004)
Organosolv	Uso de solventes orgânicos (metanol, etanol, acetona, etileno glicol) ou suas misturas com ou sem adição de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ou HCl, 185-230°C, 30-60 min, pH 2-3,4	Com uso de ácido, há solubilização da maior parte da hemicelulose em forma de xilose, formação de inibidores, solubilização da lignina com separação da hemicelulose. Sem uso de ácido, há hidrólise com baixa formação de xilose. Necessidade de recuperação do solvente	Madeira moles e misturas de madeiras moles	Lynd et al.(2002), Pan et al.(2005), Rezzoug e Capart (1996), Sun e Cheng (2002)
Tratamentos biológicos (fungos)	Fungos amarelo, branco ou vermelho	Fungos produtores de celulasas, hemicelulasas e enzimas degradadoras de lignina (ligninases, lignina peroxidases, lacases)	palha de milho de trigo	Sun and Cheng,(2002), Tenderdy e Szakars (2003)

#### 2.4.1. Processos físicos

O pré-tratamento da biomassa pela de redução de tamanho por corte, moagem, trituração e outros é normalmente realizado através de moinho de bola e moinho de bola vibratório. Selecionam-se partículas de tamanhos entre 10 e 30 mm após o material ser cortado (picado) e ente 0,2 e 2 mm após trituração e moagem. Com isso, tem-se a redução da cristalinidade da celulose. (Sanchez, et.al., 2008; Kumar, et.al., 2009).

#### 2.4.2. Processos físico-químicos:

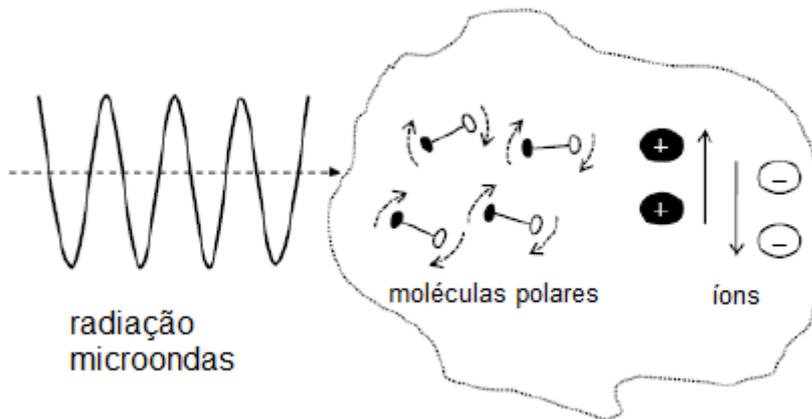
Serão discutidos os principais processos físico-químicos utilizados recorrentemente para pré-tratamento da lignocelulose.

*Explosão em vapor (Steam Explosion):* tem sido o mais empregado, apesar de gerar produtos inibidores por degradação de carboidratos. Emprega-se vapor saturado e alta pressão, com conseqüente redução da mesma, onde se tem a abertura da matriz lignocelulósica, diminuição da cristalinidade da celulose, parcial hidrólise da hemicelulose e da lignina.

*Hidrotermal:* neste caso usa-se água quente a altas temperaturas e pressões, porém não há explosão da matriz. A geração de inibidores não é significativa e há uma boa recuperação de pentoses.

*Tratamento hidrotermal com uso de micro-ondas:* o efeito da irradiação por micro-ondas em si não é capaz de alterar a estrutura da matéria, porém se ela possui íons e moléculas polares, essa irradiação pode acelerar processos químicos, físicos e biológicos. A grande vantagem em sua aplicação é a redução de energia requerida no processo, à uniformidade do processo e o total controle que se tem dele, sendo possível sua instantânea ativação e desativação (Keshwani, 2009). A energia de micro-ondas vem sendo usada, na qual mostra um efeito positivo no aumento da digestibilidade da celulose (Zheng et.al., 2009). Abaixo se encontra ilustrado (figura 2.10) o efeito da radiação micro-ondas sobre íons e moléculas polares.

Figura 2.10.: Esquematisação da radiação micro-ondas e seu efeito (Keshwani, 2009).



### 2.4.3. Processos Químicos

*Hidrólise ácida diluída:* são utilizados normalmente HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em concentrações diluídas (0,75 a 5%) em temperaturas que variam entre 160 e 200°C. Em condições ótimas, oferece boa abertura da matriz, diluição parcial da hemicelulose e da lignina, porém há também hidrólise de celulose e perda de carboidratos. Para cada material devem ser estudadas condições ótimas de processo.

*Hidrolise ácida concentrada:* existe aumento de custo devido à necessidade de recuperação do ácido emprego de equipamentos adequados, pois pode haver corrosão pelo ácido.

*Hidrólise alcalina:* é realizado em condições de pressão e temperatura mais baixas, podendo ser feita a temperatura ambiente. Há despolimerização de carboidratos, redução de cristalinidade da celulose, e clivagem da lignina. Emprega-se normalmente o hidróxido de sódio como agente, mas podem ser utilizados também hidróxido de amônio e cálcio. Há baixa formação de inibidores.

*Organossolve:* essencialmente este processo envolve simultânea pré-hidrólise e deslignificação da biomassa, através do uso de solventes orgânicos, sendo os mais comumente empregados o etanol e o metanol. Utiliza-se também a adição de ácido diluído para hidrolisar as cadeias de hemicelulose, mas neste caso há geração de inibidores e parcial hidrólise da celulose. Tem sido reconhecido como uma estratégia promissora com grande potencial de utilização em plantas de biorrefinarias integradas (Arato *et.al.*, 2005).

*Auto-hidrólise:* neste processo, água e biomassa são os únicos reagentes. Quando ácido é utilizado na extração, há maior solubilização da hemicelulose, porém com geração de grande quantidade de monômeros (xilose) e coprodutos indesejáveis (furfural, hidroximetil-furfural, ácidos orgânicos) (Nabarlatz, 2007, Akpinar et.al., 2007, Rivas et.al., 2002). Na auto-hidrólise, ou processo hidrotermal, há eliminação do uso de solventes corrosivos, mas depende da utilização de equipamentos específicos de operação a alta temperatura. Produtos formados são basicamente oligômeros de xilose e ácido acético. Empregando-se condições amenas de processo, pode-se evitar ao máximo a geração de monômeros, mas não há extração completa da hemicelulose. Para tanto, tem-se usado a auto-hidrólise seguida da hidrólise ácida fraca, gerando-se xilose que pode ser fermentada para produção de etanol e xilitol (Nabalatz, 2007, Rivas et.al., 2002).

#### 2.4.4. Processos Biológicos

Fungos que degradam a lignocelulose através de suas enzimas hidrolíticas são utilizados nestes considerados processos longos, custosos e lentos. No entanto, muitos autores relatam o uso de fungos brancos, vermelhos e amarelos conjuntamente com outros tipos de pré-tratamentos (físicos e químicos) para maximizar a sacarificação da biomassa (. Além disso, o tratamento biológico com fungos é considerado um método ambientalmente amigável um processo que não requer energia elevada para a remoção da (*Okano et al.,2005*).

#### 2.5. Pré-tratamento Organossolve

Costuma-se designar algumas vezes “pré-tratamento” a deslignificação da biomassa pré-tratada com etanol, para se seguir com a hidrólise enzimática da celulose. Sabe-se que a presença de lignina reduz a eficiência catalítica e é considerada uma das maiores barreiras da hidrólise de lignocelulósicos com uso de enzimas, porque interações hidrofóbicas entre lignina e celulasas causam adsorção da enzima. (*Ruiz et.al., 2011, Nakagame,2010*).

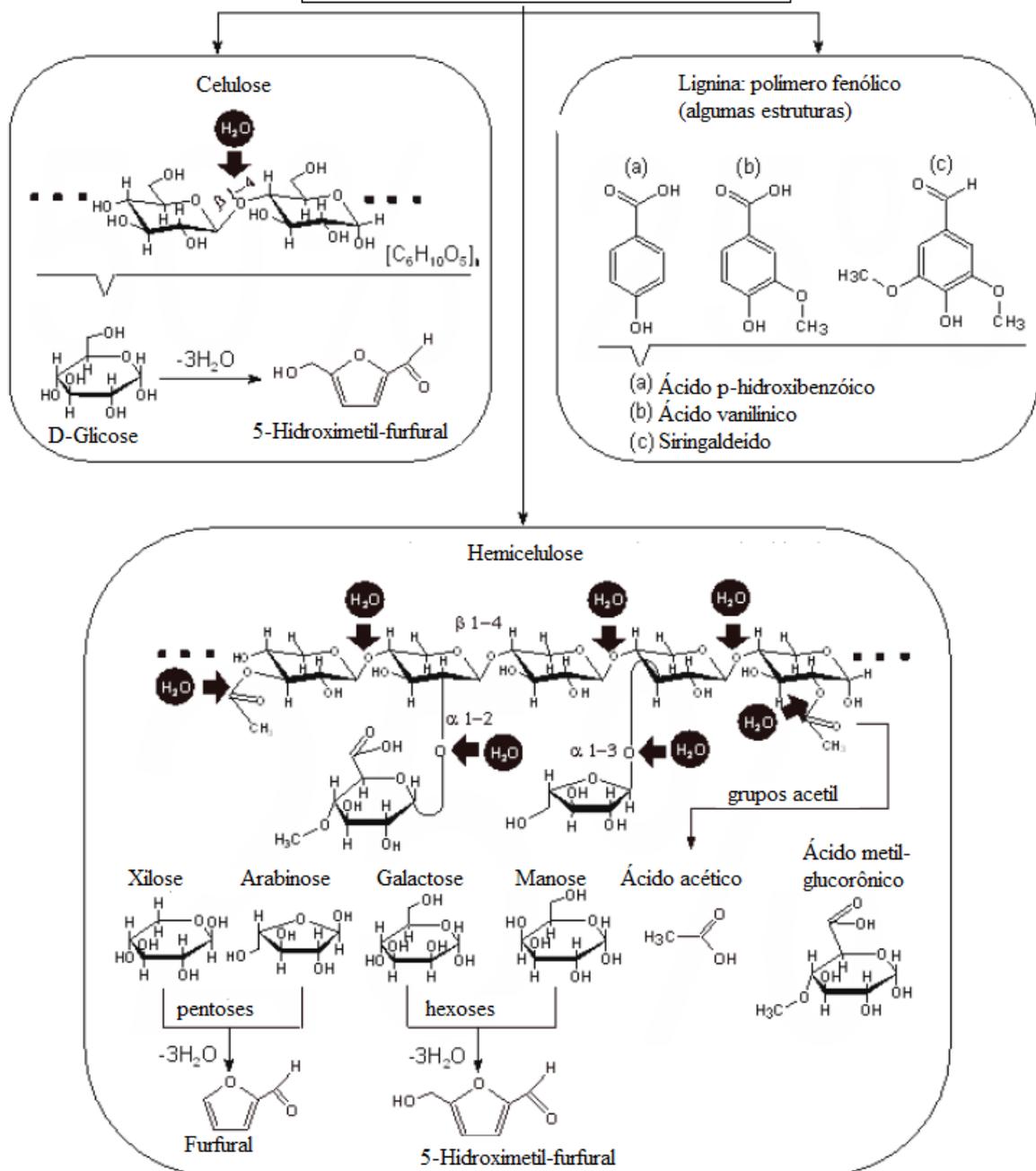
O organossolve é um processo muito utilizado quando se deseja recuperar separadamente os principais três componentes da biomassa, sem agressiva danificação das estruturas da celulose, hemicelulose e lignina. Neste caso, aplica-se o conceito de biorrefinaria. Nela, as frações lignocelulósicas tornam-se ingredientes na geração de

combustíveis e químicos, capazes de substituir derivados do petróleo. Uma otimização integral de todos esses componentes é explorada em sequencias de tratamento físicos e químicos e tem o propósito de maximizar o valor de cada fração de biomassa. (*Ligero et.al., 2011; Sedlmeyer,2011; Sousa, et.al.,2009*).

Mesmo sendo o pré-tratamento por organossolve mais custoso, sua aplicação pode ser alavancada futuramente com instalação de plantas de biorrefinaria (*Zhao, et.al.,2009*). Esse processo possibilita a recuperação da lignina, ingrediente precursor de diversos produtos como vanilina, siringaldeído, benzeno, dispersantes, emulsificantes, antioxidantes, pesticidas, fertilizantes, entre outros (*Ruiz et.al, 2011*). A figura 1 traz um exemplo da aplicação de biorrefinaria para o bagaço de cana de açúcar (traduzido de *Marton et.al., 2006*).

Figura 2.5.1.: Produtos de biorrefinaria de lignocelulósico abastecida de bagaço de cana de açúcar (*Marton, et.al., 2006*).

Biorefinaria Química de Lignocelulósicos  
de bagaço de cana de açúcar



Marton, et al., 2006; *Evaluation of the activity of charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysates for xylitol production*; Braz.Jour.Chem.Engin.23,1(9-21)

Para se produzir bioetanol a partir de celulose, este pré-tratamento é uma boa opção quando se deseja seguir a rota enzimática de transformação de celulose em glicose (que irá posteriormente ser fermentada). A explicação encontra-se no fato de os conteúdos de lignina nas fibras de celulose da biomassa pré-tratada são menores em pré-tratamento por organossolve do que em outros pré-tratamentos (hidrotérmico e ácido, por exemplo) porque ele é capaz de quebrar ligações tipo  $\alpha$ -aril eter e arilglicerol- $\beta$ -aril eter ( $\beta$ -O-4)

na macromolécula de lignina. Isso provoca mudanças significativas na estrutura da lignina, incluindo diminuição do número de seus grupos fenólicos e metoxil e diminuindo sua massa molecular (*Nakagame e Seiji, 2010*). Consequentemente, escolhidas condições adequadas de processo pode extrair lignina, sem causar graves destruições dos açúcares. A degradação dos açúcares é evidente com uso de catalisador ácido no processo, ou mesmo quando se empregam temperaturas muito elevadas de pré-tratamento (*Pan. et.al., 2006*). Nesse caso, há conversão de glicose e xilose a produtos como furfural, hidroximetil-furfural (HMF) ácidos leuvinico e fórmico, entre outros.

Geralmente, a xilana eficientemente extraída da biomassa com emprego de agente alcalino KOH ou NaOH, é convertida enzimaticamente a XOS por ação de xilanases que possuem baixa atividade exo-xilanase (ou  $\beta$ -xilosidase), ou seja, que clivam a cadeia de xilana gerando concentração mínima de xilose. (*Aachary, et.al., 2011*). Combinando-se essas duas etapas de processo, muitos materiais lignocelulósicos puderam ser até o presente momento, utilizados como fontes de XOS: casca de aveia, madeiras mole e dura, bagaço de milho, palha de trigo e bagaço de cana. (*Aachary et.al., 2011; Manrich, et.al., 2011*).

A tabela 2 abaixo reporta alguns exemplos de aplicações de processos utilizados com objetivo de se extrair xilana para a produção de xilo-oligossacarídeos e a fonte lignocelulósica escolhida para este fim.

Tabela 2. Exemplos de processos utilizados para a extração de xilana e biomassa escolhida.

<b>Autor</b>	<b>Processo</b>	<b>Rendimento</b>	<b>Biomassa</b>
<b>Akpinar et al. 2007</b>	Extração alcalina NaOH 24%, 3h, 35C	0,4g xilana em 2g biomassa inicial	Talo de algodão
<b>Lee et al. 2005</b>	Amônia aquosa 15% 60°C 12h	15%	Talo de algodão
<b>Zhu et al. 2006</b>	Amônia aquosa 15% 90°C 24h	26,4%	Palha de milho
<b>Nabarlatz et al 2005</b>	Auto-hidrólise 190°C, 19-300min	42-63%	Casca de amêndoa

## 2.6. Xilo-oligossacarídeos (XOS)

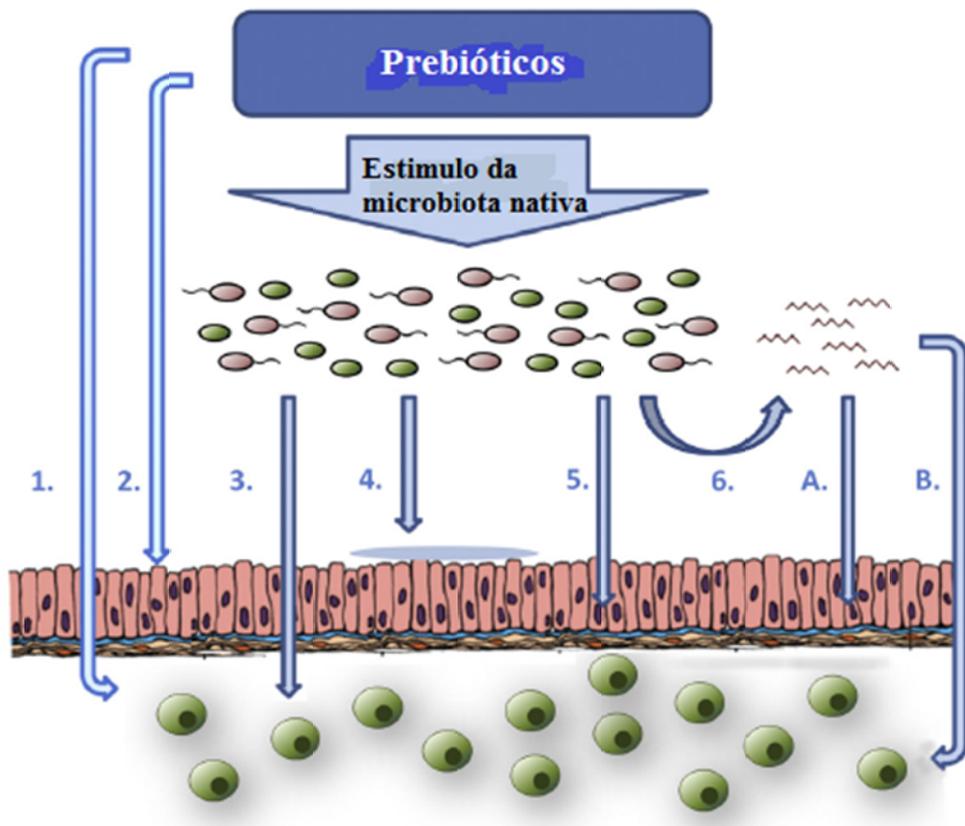
A partir da xilana, uma série de produtos economicamente importantes, tais como xilose e xilitol podem ser obtidos. Foram focados neste trabalho os xilo-oligossacarídeos (XOS), cadeias curtas de xilose, formadas por 2 a 7 unidades, cujas características vem conquistando espaço crescente na indústria farmacêutica, química fina e como ingrediente alimentar. O mercado europeu de prebióticos, cujo preço estima-se ser de US \$ 22/kg, foi projetado para atingir US \$ 179 milhões em 2010 (FAO, 2007), e a produção de oligossacarídeos no Japão já envolve 20 empresas nos dias de hoje (*The world prebiotic ingredient market, brochure 2010: <http://www.ubicconsulting.com/template/fs/documents/Nutraceuticals/The-World-Prebiotic-Ingredient-Market.pdf>*).

Os XOS são reconhecidos por muitos estudiosos como prebióticos, nutrientes com um potencial de ação sobre a fisiologia humana, visto que não servem de substrato para as enzimas do trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis, sendo seletivamente fermentados por alguns tipos de bactérias intestinais, principalmente bifidobactérias e lactobacilos. Assim, são processados no intestino grosso, estimulando a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), e irão favorecer a saúde e o bem-estar como um todo (Gullón, 2011; Achary e Prapulla, 2011; FAO, 2007; Roberfroid, 2007).

Os benefícios citados referentes à ingestão frequente de XOS na dieta alimentar são diversos, além do já mencionado estímulo da flora intestinal seletiva. Eles possuem efeito antioxidante, promovem o aumento da atividade biológica do cálcio no organismo, estimulam a atividade imunológica com efeito antitumoral, (Nabarlatz, 2007, Tuohy et al. 2005. Campbell et al. (1997) alimentaram ratos com dieta contendo 6% (m/m) de XOS durante 14 dias e verificou um aumento significativo da concentração de *bifidobacteria* fecal e cecal. Van Craeyveld, et al. (2008) verificaram um aumento entre 1 e 1,5 unidades  $\log_{10}$  na concentração de *bifidobacteria* cecal de ratos alimentados durante 14 dias com XOS de cadeia curta e com AXOS, arabino-xilo-oligosacarídeos, extraídos de cereais. Em estudos recentes, XOS têm apresentado maior efeito sobre o aumento no crescimento de espécies de *bifidobacteria* sendo preferencialmente fermentados quando comparados com açúcares prebióticos usados como referência, como os fruto-oligosacarídeos (2 a 10 moléculas de sacarose, nas quais uma ou duas outras unidades de frutose são adicionadas por ligações  $\beta$ -(2-1)à molécula

de frutose e da sacarose) (Sousa *et.al.*, 2011). Os efeitos da ingestão de prebióticos ligados ao metabolismo estão resumidos na figura 2.12 (Licht *et.al.* 2011).

Figura 2.6.1. Estímulo da microbiota intestinal causado pelo consumo de prebióticos (Licht, *et.al.*; 2011)



1. Estímulo das células imunológicas diretamente por prebióticos
2. Irritação das células epiteliais diretamente por prebióticos
3. Estímulo das células imunológicas pela microbiota nativa
4. Estímulo de produção de mucina (glicoproteína) pela microbiota nativa
5. Estímulo de genes/proteínas do tecido conjuntivo pela microbiota nativa
6. Estímulo de produção de SCFA (ácidos graxos de cadeia curta), que leva a:
  - A. Regulação de síntese e crescimento de células do tecido conjuntivo células epiteliais diferenciadas
  - B. Regulação de células do sistema de resposta imune(citocinas)

2.6.1. Obtenção de XOS a partir de Materiais Lignocelulósicos Para que uma extração suficiente da hemicelulose ou xilana da biomassa seja efetivada sem resultar em maiores danificações à sua estrutura, alguns pré-tratamentos específicos são indicados, mais comumente a extração branda ou moderada com NaOH, extração moderada usando-se amônia aquosa com ou sem complementação da energia do ultrassom e o organossolve. Auto-hidrólise e tratamento hidrotermal, ambos com emprego de água em contato com a matéria prima a altas temperaturas, que podem variar de 120 a 240°C, durante períodos que podem ir de poucos minutos ou algumas horas, são relatos com frequência como ferramenta para se separar xilana da lignocelulose. Esses processos, no entanto, conduzem à monomerização da xilana a xilose com rápida transformação desta em furfural e outros compostos de degradação. (*Moniz, 2009; Borrega, 2011*).

## Capítulo 3

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Materiais

##### 3.1.1. Enzimas utilizadas:

Extratos comerciais de xilanase NS50014 e NS 22036 foram gentilmente doada pela Novozymes A/S (Dinamarca), extrato comercial Genencor XY foi gentilmente doado pela DuPont Industrial Bioscience (Estados Unidos). Xilanase não comercial extraído de *Bacillus subtilis* (X-Bs) foi gentilmente doada pelo Departamento de Biologia Molecular e Celular e Agentes Patogênicos (FMRP-USP), da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brasil.

##### 3.1.2. Substrato

Xilana de bétula (birchwood xylan) foi adquirida da Sigma Aldrich S.A. (USA).

##### 3.1.3. Suportes

Agarose 10BCL e 10BCL foi adquirida da Amersham Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Suécia) ou da ABT-Sepabeads (Espanha)

##### 3.1.4. Matérias Primas fontes de Biomassa

Pó de serra de madeira dos gêneros choupo negro (Schwarzpappel) e faia (Buche) foram coletadas no início da primavera europeia (especificamente no mês de maio) de carpinteiros da região próxima de Straubing, Alemanha. Bagaço de cana de açúcar *in natura* foi gentilmente doado pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) de Piracicaba- SP

##### 3.1.5. Materiais Específicos

Membranas de diálise de proteínas, de acetato de celulose, com tamanho de poro de 14 kD foram fornecidas pela Sigma-Aldrich (Estados Unidos). Dispositivos de ultrafiltração (Vivaspin 20) foram adquiridos da GE Healthcare (Estados Unidos).

### 3.1.6. Reagentes

Padrões de glicose, xilose, xilobiose, xilotriose, xilotetraose, arabinose, manose e galactose foram adquiridos da Megazymes (Irlanda). 1-etil-3-(3-dimetil amiopropil) carbodi-imida (EDAC), boridreto de sódio, glicidol, PEG (polietileno-glicol de MM 20g/mol) e etilenodiamina (EDA) foram fornecidos pela Sigma Aldrich S.A. (USA). Etanol 95% e ácido sulfúrico foram adquiridos da Roth GmbH (Alemanha) ou da Quemis (Brasil). Os demais reagentes foram utilizados de grau analítico.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Determinação da atividade enzimática da xilanase

A atividade da xilanase foi determinada medindo-se a liberação de açúcares redutores ao longo do tempo de hidrólise de xilana de bétula (1% m/v), catalisada pela enzima. Açúcares redutores foram quantificados usando-se o método dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Xilana de bétula diluída em tampão acetato 50mM pH 5.0 foi incubada a 50°C com adição de soluções enzimáticas diluídas por 10 min. Uma unidade de atividade (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de xilose em 1 min nas condições de ensaio (pH 5,0; 50°C).

### 3.2.2. Determinação da concentração protéica da xilanase

Concentração de proteína dos extratos enzimáticos de xilanase foi determinado segundo a metodologia proposta por Bradford (Bradford, 1976), usando-se como referência a albumina de soro bovina (BSA).

### 3.2.3. Diálise da enzima comercial com uso de membranas de diálise

Para se eliminar aditivos (conservantes e protetores enzimáticos) comumente encontrados em extratos comerciais da enzima, foi realizada a diálise.

Usando-se procedimento padrão de diálise com uso de membranas, 10mL de preparado comercial foi dialisado usando-se membrana de acetato de celulose e incubada em 1L de 5 mM de tampão acetato de potássio pH 7, a 4°C, por 24 h, com trocas de volume a cada 8 h.

#### *3.2.4. Diálise da xilanase com uso de dispositivo de ultrafiltração*

Na tentativa de aprimorar o procedimento de diálise das xilanases, os extratos enzimáticos foram centrifugada em dispositivo de ultrafiltração (Vivaspin 20, GE Healthcare), com adição de volume de água destilada em proporção  $1/10$ , por 4 ciclos de 60 minutos a 6000 g até que o volume recuperado fosse reduzido 90% do volume inicial de cada ciclo. No início cada ciclo, água destilada era novamente adicionada.

#### *3.2.5. Aminoação da xilanase*

A modificação química proposta por Hoare e Koshland (*Hoare e Koshland, 1967*) foi adotada usando-se 0.6mL de enzima comercial adicionada a 5.4mL de 1M EDA a pH 4.75. EDAC sólido (10mM) foi adicionado a solução. Após 120 min de reação com agitação suave a 25°C, a solução foi dialisada como descrito acima. A enzima aminada foi imediatamente imobilizada. Aminoação em presença de polietileno-glicol (PEG de MM 20g/mol) foi realizada semelhantemente, adicionando-se o reagente em concentração 1:10 (mg PEG/mg proteína). Acompanhou-se, durante a reação, a atividade enzimática da xilanase.

#### *3.2.6. Determinação de valores máximos de temperatura e atividade da xilanase*

Atividade enzimática das enzimas comerciais e dialisadas foram determinadas como acima descrito (item 3.2.1), usando-se diferentes soluções tampão (de 3 até 11, a 50°C) e diferentes temperaturas (de 20°C a 90°C, a pH 5.0). Para a xilanase NS 50014 foram também determinadas atividades enzimáticas da enzima imobilizada ( $0.010g \pm 0.002$ ) e de enzima imobilizada após esta ser adicionada de 10µL de PEG (polietileno-glicol de MM 20g/mol), variando-se as condições de temperatura e pH, como descrito acima.3.2.7. *Imobilização de xilanase*

Gel glioxil-agarose altamente ativados foi suspenso em solução enzimática NS 50014 ou NS 22036 usando-se relação enzima:suspensão de 1:10, preparada em 100mM tampão bicarbonato de sódio pH 10.05, contendo carga enzimática de 5mg proteína/g gel. Essa suspensão foi mantida sob agitação durante 24 h, em temperatura ambiente. Ao final da reação, boridreto de sódio foi adicionado à suspensão (1mg/mL de suspensão) sob agitação, durante 30min. Finalmente, a enzima imobilizada em agarose-glioxil foi filtrada e lavada com 500mL de água destilada.

A imobilização da enzima NS 50014 foi acompanhada medindo-se a atividade enzimática no sobrenadante de reação e na suspensão, e a concentração protéica do sobrenadante, ao longo do tempo. Além disso, possíveis inativações enzimáticas foram investigadas medindo-se atividade em uma suspensão de enzima em mesmas condições de reação (branco).

#### *Parâmetros de Imobilização*

Rendimento de de imobilização  $Y_{IU}$  (%) foi calculado após a determinação do número de unidades de enzima que desapareceu no sobrenadante de imobilização, tendo em conta a diluição da solução de imobilização; devido à adição do suporte e inativação de enzimas e a possível inativação devido às condições de imobilização (verificados na amostra branco (tampão +enzima)), de acordo com a equação 1.

$$Y_{IU} (\%) = \left( 1 - \frac{(ES_{tf})d}{EB_{tf}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

$ES_{tf}$  = Concentração da enzima em unidades no sobrenadante, ao final do tempo de imobilização

$EB_{tf}$  = Concentração da enzima em unidades, do branco, ao final do tempo de imobilização

$d$  = fator de diluição - (volume de solução de imobilização + volume da água (umidade) na massa do suporte adicionado)/ volume da solução enzimática de imobilização.

*Atividade Recuperada - RA*(%) foi calculada após se determinar a atividade da enzima imobilizada  $A_{der}$  (UI/g derivado) e comparando-a com as unidades de enzima teoricamente imobilizada, equação 2 ().

$$RA(\%) = \left( \frac{A_{der}}{A_t} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

$A_t$  = Unidades de enzima teoricamente imobilizadas (UI/g suporte), foi calculada aplicando-se  $Y_{IU}$  a carga enzimática oferecida, unidades enzima/g suporte.

### 3.2.8. Inativação térmica da xilanase

Enzimas livre e imobilizadas foram incubadas em tampão fosfato de sódio 5mM pH 7.0 e mantidas a 70°C. Alíquotas de solução e suspensão enzimática foram retiradas e medida a atividade enzimática como já descrito previamente, até que se determinasse o seu tempo de meia-vida ( $\tau_{1/2}$ ).

### 3.2.9. Influência do etanol sobre a atividade da enzima solúvel

Xilanase solúvel foi incubada à temperatura ambiente em tampão acetato 50 mM pH 5,0 ou no mesmo tampão contendo 7% (v/v) de etanol. Alíquotas foram retiradas e atividade residual foi determinada com o tempo.

### 3.2.10. Adsorção de enzima solúvel na presença de lignina insolúvel.

Lignina recuperada depois de extração de etanol por rota-destilação de um volume de licor negro extraído de madeira de faia pré-tratada foi deixada à temperatura ambiente durante a evaporação de umidade total. 200mg de lignina seca foi adicionada a 50 mL de tampão acetato 200mM pH 5,0 contendo 5% (v / v) xilanase solúvel. A concentração de proteína foi acompanhada durante 24 h.

### 3.2.11. Seleção da enzima

Perfis de produtos de hidrólise de xilana de bétula (10g/L, pH 5.0) das enzimas comerciais e dialisada e da xilanase cultivada usando carga de 90 UI/mL foram analisadas quanto a concentração de xilo-oligômeros e monômeros.. Reações de hidrólise de xilana foram conduzidas por 6 horas a 50°C.

### 3.2.12. Ativação do suporte gel de agarose (formação de glioxil-agarose)

Seguindo-se o protocolo proposto por *Guisán* (1988), o gel de agarose foi suspenso em água (30mL/105 g de agarose) e mantido em banho de gelo. Uma solução de NaOH 1.7 mol/L contendo 28.5mg de boridreto de sódio por mililitro de solução foi preparada em banho de gelo e adicionada a suspensão (50mL de NaOH/105 g de agarose). Em seguida, glicidol foi gotejado lentamente na suspensão (36 mL/105 g agarose). A suspensão foi mantida sob agitação a 25°C por 16h. Após isso, gel agarose-gliceril foi suspenso em água (895 mL/105 g de gliceril-agarose), adicionado de

periodato de sódio (3.21 g/105 g de agarose-gliceril) e mantido sob agitação por 2 h. Ao final o gel glioxil-agarose foi lavado exaustivamente com água e estocado a 4°C.

### *3.2.13. Secagem e fracionamento do pó de serra de madeira*

Amostras de pó de serra de gêneros choupo negro e de faia foram espalhados sobre superfícies para serem secadas em temperatura ambiente, durante aproximadamente 2 semanas, até que se atingisse umidade constante. O material foi então separado e classificado usando-se uma peneira automática modelo AS 200 da Retsch (Alemanha). Partículas com dimensões acima de 2 mm foram descartadas e as abaixo de 2 mm foram utilizadas. O procedimento seguiu a normatização alemã DIN CEN/TS 15149-2006.

### *3.2.14. Determinação de massa seca da matéria prima*

A massa seca do pó de serra foi medida com uso de uma balança de massa úmida MA35 Sartorius AG (Alemanha), com fonte de calor infravermelho à temperatura de aquecimento de 120°C. Amostras pesavam entre 0.95 g e 1.00 g.

### *3.2.15. Determinação e caracterização de conteúdo de carboidratos.*

Conteúdo de carboidratos na matéria prima foi determinado após realizar-se hidrólise com ácido sulfúrico. Amostras de 0.3 g de pó de serra de madeira, ou amostras de resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos foram submetidas inicialmente à hidrólise com ácido sulfúrico 72%, por 10 minutos, a 30°C e agitados com bastão de vidro a cada 10 min. Após esse período, foram adicionados 87 mL de água, até que uma concentração de ácido sulfúrico 4% fosse atingida. Para avaliar o tempo ótimo de hidrólise em autoclave com ácido sulfúrico, amostras foram então autoclavadas por 30 min, em sequência centrifugadas (20 min, 20°C e 2500g) para segregação de material insolúvel. A fração solúvel foi neutralizada e analisada. A fração sólida era novamente adicionada de 87 mL de ácido sulfúrico 4% e autoclavada por mais 30 ou 90 minutos. O tempo estabelecido depois de realizada a investigação de tempo ótimo de hidrólise foi de 60 min.

### *3.2.16. Análise de Açúcares*

Análises de glicose, xilose, galactose, arabinose e manose foram efetuadas em coluna de troca iônica Pb HPX 87 H Aminex (Bio-read Laboratories, Estados Unidos) em HPLC,

cromatografia líquida de alta resolução, com controlador Shimadzu LC-20A (Japão), com detector de índice de refração RID-10A, a 60°C. Usou-se como referência padrões de monossacarídeos. A fase móvel consistiu de água destilada com fluxo de 0.5mL.min<sup>-1</sup>. A quantificação de açúcares foi realizada para a matéria prima *in natura* e a biomassa pré-tratada, e também após hidrólise ácida completa com ácido sulfúrico dos açúcares extraídos após pré-tratamento, para se realizar o balanço de monossacarídeos totais que permaneceram em forma oligomérica (xilo-oligossacarídeos) após o pré-tratamento do pó de serra. A hidrólise ácida era realizada com ácido sulfúrico 72% (g/g) a 120°C durante 60 minutos em tubos de ensaios resistentes a pressão, colocados em banho de óleo.

Análise de concentrações de XOS, xilose, arabinose e ácido acético foram realizadas em uma coluna H Supelcogel C-610H-59320 U (Sigma-Aldrich, EUA) através de troca iônica por cromatografia de alto desempenho (HPLC), controlador Waters; detector índice de refração (RID) 410 e fase móvel H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% (v/v). Temperatura de ensaio usada foi 30 C e fluxo de 0,8mL.min<sup>-1</sup>. Para que as análises em HPLC pudessem ser realizadas, houve a necessidade de prévia purificação da hemicelulose, da seguinte forma: evaporação de todo o volume da amostra do extrato solúvel obtido no pré-tratamento (para eliminação total de etanol presente) e re-suspensão do volume em água destilada. Depois disso, a amostra foi centrifugada e filtrada com filtro C18 Sepak ® (Waters) e em seguida filtrada usando-se filtros de tamanho de poro 0.20µm (Sartorius). Com a evaporação total do líquido de extração, seguida de re-suspensão em água e centrifugação da amostra, esta perdeu a turbidez, observada na solução extraída pós processo organossolve. Houve eliminação de lignina, já mencionada anteriormente no texto como um dos principais fatores de inibição enzimática.

Conteúdo de açúcares foi analisado da matéria prima bruta, e dos extratos solubilizados pelo pré-tratamento antes e depois de realizada hidrólise completa ácida com ácido sulfúrico 72% (relação mássica) dos oligômeros e monômeros gerados. O conteúdo de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar foi determinado segundo descritos em protocolos NREL para determinação de carboidratos de material lignocelulósico.

*3.2.17. Pré-tratamento de pó de serra de madeira de choupo negro e faia em reator micro-ondas.*

Amostras de biomassa seca (3.5g) foram adicionadas em frascos padrão do reator. Água destilada foi adicionada até se completar uma massa total de 35 g. Colocou-se em cada recipiente um agitador magnético, de forma que as amostras eram mantidas sob agitação magnética durante o ensaio no reator. Os recipientes foram então fechados, pressionados e travados; e posicionados homogeneamente no reator (o qual era capaz de girar as amostras, mudando-as de posição). As condições de reação foram: 20 min a 150°C, 30 min a 130°C e 45 min a 120°C. Tempos de aquecimento e resfriamento eram de 10 min e potência aplicada foi de 1000W em todos os casos. Após a reação, o material solúvel e o resíduo sólido foram recolhidos, após serem separados com uso de malha de nylon (20 DEN).

### *3.2.18. Pré-tratamento do pó de serra de madeira de choupo negro e de faia pelo processo Organosolve*

Os procedimentos experimentais seguiram protocolos descritos por Araque et.a. (2008). Amostras de 100g de matéria prima seca foram adicionadas em 800 mL de solução etanol:água 50% (v/v). O material foi autoclavado por 60 min a 180°C em reator de alta padrão de 2L Parr (Estados Unidos). A pressão máxima de operação foi de 17 bar. Após procedimento, amostras foram filtradas sob vácuo e lavadas duas vezes com solução de etanol 50% (v/v) a 60°C para se evitar deposição de lignina solubilizada sobre as fibras celulósicas. O material era recolhido (licor negro) e adicionado ao volume extraído no pré-tratamento e o resíduo sólido era lavado com água destilada. Evaporava-se o etanol da solução extraída com uso de roto-evaporador a 60°C e 240 mbar, até retirada de um volume final de 375 mL, contendo 82% etanol (v/v). Após evaporação de etanol, o licor tornou-se de cor marrom. Este substrato foi chamado S2. S2 foi deixado à temperatura ambiente até a evaporação total de etanol e da água. Para avaliar a influência de etanol sobre a reação de hidrólise, o ensaio seguinte foi realizado: água destilada foi utilizada para re-suspender os sólidos nas mesmas proporções encontrados em S2. A solução re-suspensa foi centrifugada (5.000g, 15 min, 4 ° C) e a lignina precipitada foi separada. Este substrato foi chamado S1A: re-suspensão em água destilada pura. S1E: re-suspensão em um de 7% (v / v) de etanol: solução de água. S2, S1A e S1E foram utilizados como substratos para gerar XOS usando xilanase solúvel e imobilizada.

### *3.2.19. Hidrólise de extratos líquidos pré-tratados do pó de serra de madeira de faia com xilanase livre e imobilizada.*

Quantidades de derivado de xilanase (xilanase imobilizada em agarose-glixil) de 0.27g ou volumes de 0.43  $\mu$ L de enzima solúvel, correspondentes a uma carga enzimática de 20UI por grama de biomassa original, foram adicionadas a 10mL de extrato líquido pré-tratado e incubado a 60°C por 72 h com agitação de 130 rpm em shaker. Amostras foram coletadas ao longo do tempo de reação para a quantificação de açúcares. Reação foi finalizada através de imediata imersão e agitação das amostras em banho de gelo a 0°C seguido do congelamento das amostras. Ao término da reação, enzima imobilizada foi filtrada e lavada com água destilada. Os substratos líquidos extraídos do pó de serra foram também enzimaticamente hidrolisados sem prévia purificação ou alteração do meio. Para ser usada como referência (controle), foi preparada uma solução de xilana de bétula com 10g/L de concentração em tampão citrato 50mM pH 3.5 com a mesma carga enzimática.

A atividade enzimática remanescente dos derivados utilizados nas diversas hidrólises e comparada com a atividade uma amostra de derivado denominado de “novo” ou ainda não utilizado foi analisada.

### *3.2.20. Lavagem dos derivados usados e do derivado “novo”*

Após se empregar xilanase imobilizada na hidrólise de soluções extraídas da biomassa nos processos de pré-tratamento, uma amostra de 1g de cada derivado “usado” e “novo” foi lavado separadamente com 5mL de solução de etanol 50% (v/v) por 60 min a 50°C em shaker. Nesta etapa, leu-se a absorbância a 280nm do sobrenadante e da suspensão das amostras antes e depois do procedimento de lavagem.

### *3.2.21. Extração de xilana do bagaço de cana-de-açúcar pelo tratamento Organossolve*

o bagaço de cana-de-açúcar doado pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) continha 29,4% de hemicelulose. Uma relação sólido: líquido foi fixado em como sendo 1:10 (m:v). Usando e 50% de etanol (v / v), três diferentes graus de severidade (DS) foram avaliados: 150° C, 30min (DS 4.1); 170 ° C, 70 min, (DS 5.1) e 190 ° C, 90 min (DS 5.9) Três concentrações de etanol foram testados: 30, 50 e 70% de etanol (v / v) para o SD 4.1. Extrato solúvel cujas condições de pré-tratamento resultaram em melhor rendimento e produção xilana em forma de XOS, somados a mínima geração de monômeros foi escolhido para ser hidrolisada por enzimas.

### 3.2.22. Grau de Severidade (DS)

O grau de severidade do pré-tratamento, descrito por Overende Chornet (1987) é o parâmetro de medida da gravidade do pré-tratamento em função do tempo e da temperatura de reação e também do tempo em que a temperatura permanece acima de 100°C.

$$\log(r_o) = \log \left[ t \cdot \exp \left( \frac{(T - T_{ref})}{14,75} \right) \right] \quad (3.1)$$

Sendo:

$\log(r_o)$  = grau de severidade

T = temperatura (°C) e  $T_{ref}$  = 100°C

t = tempo de reação (min)

Para realizar o tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar, para se determinar o grau de severidade de cada pré-tratamento levou-se em consideração não só o tempo estabelecido para cada reação após atingir a temperatura desejada, mas também se monitorou o tempo das rampas de aquecimento, que variou em média de 80 a 108 min.

### 3.2.23. Extração da xilana de bagaço de cana de açúcar por tratamento alcalino

Matéria prima foi previamente caracterizada de acordo com protocolo NREL (TP-510-42618) específico para material lignocelulósico. A xilana foi extraída da biomassa por pré-tratamento alcalino usando NaOH com concentrações de 1,4 e 7% (m/v). O bagaço (proporção sólido:líquido de 1:10(m/v)) foi autoclavado a 121°C e 1 atm por tempos que variaram entre 15 e 90 min. Em seguida, a fase sólida foi separada da fase líquida e esta foi estocada a 4°C. Antes de ser hidrolisada enzimaticamente, a solução foi ajustada até pH 5,0 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e em seguida centrifugada. Parte da lignina precipitou e foi eliminada. Não ocorreu total precipitação da lignina neste pH.

### 3.2.24. Hidrólise da xilana do bagaço de cana de açúcar

A xilana extraída por tratamento alcalino com NaOH foi hidrolisada por enzima livre e imobilizada a 50°C durante 4 h. A carga enzimática utilizada foi de 20 UI por grama de matéria prima tratada. As suspensões enzima-substrato foram incubadas em reatores encamisados. A umidade do derivado de xilanase utilizado foi medido em aparelho medidor de atividade de água modelo 4TEV (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, Estados Unidos) e controladas para permanecerem com valor de  $0,994 \pm 0,001$ .

#### *3.2.25. Reciclo da enzima imobilizada*

Cinco hidrólises consecutivas foram efetuadas a 50°C e pH 5,0. A cada ciclo, a enzima imobilizada foi filtrada e lavada, com a remoção de alíquotas para o controle de umidade (determinou-se a umidade do derivado a cada ciclo) e medida de atividade remanescente. O acompanhamento da hidrólise da xilana a XOS foi acompanhado durante o último ciclo, do qual retirava-se amostras do meio reativo ao longo do tempo para determinação de concentração de açúcares.

## *Capítulo 4. Resultados e Discussão*

### *4.1. Desenvolvimento de protocolo para obtenção de derivado ativo e estável de xilanase: imobilização de xilanase NS50014*

#### *4.1.1. Caracterização da xilanase comercial e xilanase dialisada*

Enzima comercial e dialisada continham, respectivamente, 13.4 e 7 mg de proteína/mL. As atividades enzimáticas de ambas foram medidas em diferentes temperaturas (Figura 4.1.1) e diferentes valores de pH (Figura 4.1.2). Apesar de os perfis de temperatura da enzima comercial e da enzima dialisada demonstrarem comportamento semelhante, isso não aconteceu ao se variar o pH. A enzima comercial mostrou-se ser estável entre valores de pH de 4 a 10, enquanto a dialisada apresenta um perfil em formato de sino, com máximo ao redor do valor 7. Essa diferença pode ser evidência de aditivos protetores presentes na preparação comercial, que são eliminados durante a diálise. O efeito protetor de um estabilizante pode ser verificado no gráfico 4.3, onde a xilanase imobilizada é adicionada de 10 $\mu$ L de PEG e sua atividade enzimática é medida. Em altas temperaturas (acima de 70°C) ocorre aumento da atividade enzimática. Além da estabilização causada pela imobilização, o PEG age também como preservativo da enzima. Com isso, o efeito do calor promove maior difusão de substratos sem que ocorra desconfiguração da enzima e consequente diminuição de sua atividade catalítica.

Figura 4.1: Influência da temperatura da xilanase solúvel dialisada (*círculo cheios*) e não dialisada (*círculos vazios*).

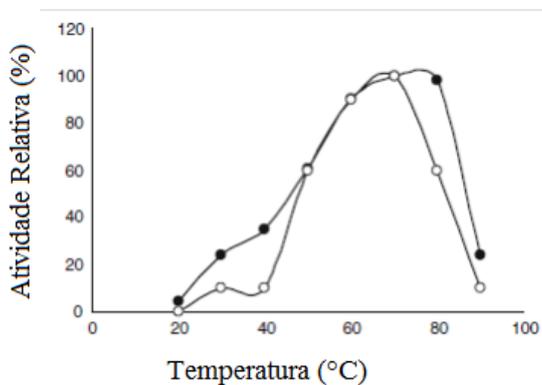


Figura 4.2: Influência da variação de pH do meio sob atividades enzimáticas de xilanase dialisada (*círculos cheios*) e não dialisada (*círculos vazios*).

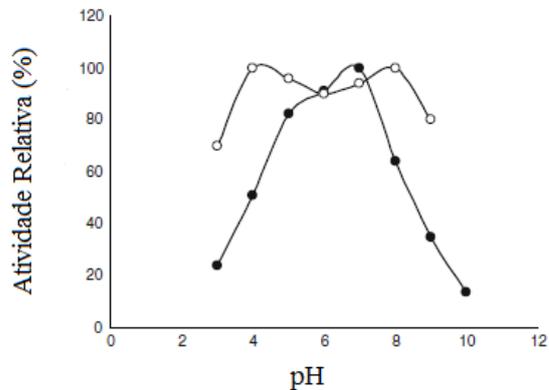
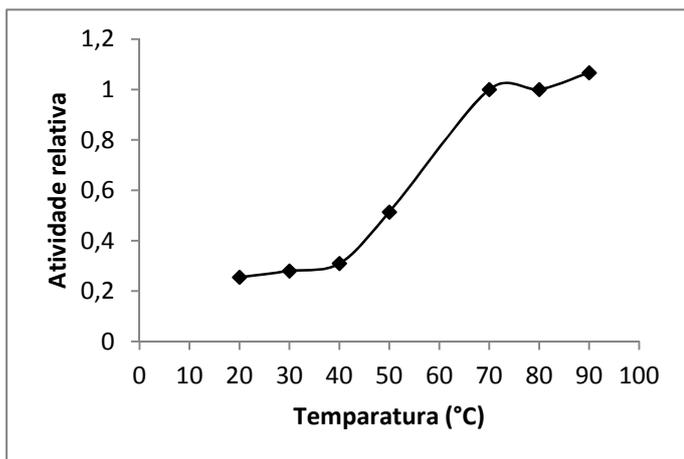


Figura 4.3.: Influência da temperatura da xilanase imobilizada adicionada de PEG.



#### 4.1.2. Imobilização da xilanase em gel de agarose-glioxil

Tentou-se realizar imobilização da xilanase comercial e dialisada em agarose-glioxil, através da técnica usual por ligação covalente multipontual. A baixa recuperação de imobilização (cerca de 10%) indicou que a enzima muito provavelmente continha um número bastante reduzido de resíduos lisina em sua superfície, conseqüentemente, um número muito reduzido de grupos amino disponíveis para a imobilização covalente.

Em tentativa seguinte, realizou-se a aaminação seguida de imobilização. No processo de aaminação química é realizada, grupos carboxílicos presentes nos resíduos ácidos glutâmico e aspártico reagem com o etilenodiamina, disponibilizando grupos amino adicionais na superfície da proteína, além dos poucos presentes, dos aminoácidos lisina. Isso permite que um número maior de ligações seja efetivada entre enzima e suporte. No caso da xilanase NS 50014 aminada e subseqüentemente dialisada significou uma recuperação de 100% da atividade enzimática (conforme mostrado na figura 4.1.) e aumento da estabilidade térmica da enzima, comparada com sua forma livre comercial (20 vezes) e livre dialisada (40 vezes).

No entanto, a reação de aaminação, que deve ser seguida de diálise, significou uma perda de quase 70% da atividade enzimática. O PEG, polietilenoglicol, um polímero estabilizante, foi utilizado (1:10 mg, PEG:MG proteína) na tentativa de se reduzir a perda de atividade durante a aaminação. Isso de fato aconteceu. Com o uso de PEG envolvendo as moléculas de enzima, como um agente protetor da estrutura tridimensional da proteína, a perda total foi de cerca de 50%. O derivado obtido, após aaminação sem PEG, possuía uma atividade enzimática de 20UI/g. Resultados mostrados na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Perda de atividade da xilanase comercial durante etapas de aaminação e diálise

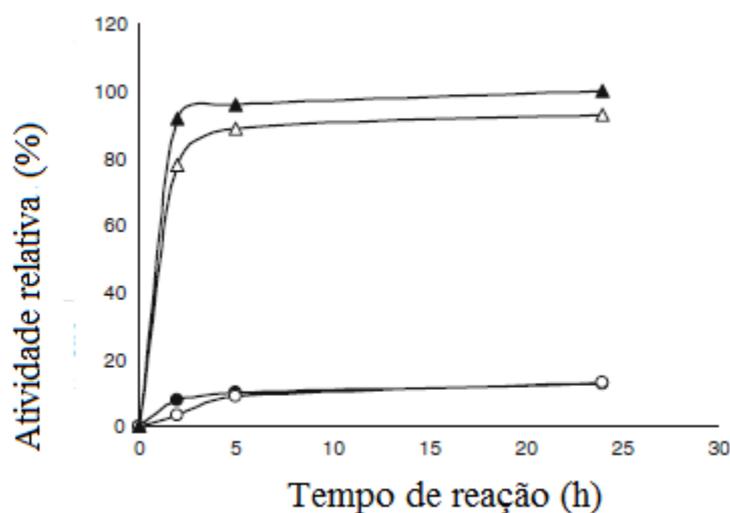
Enzima	Atividade relativa inicial	Atividade relativa após aaminação	Arividade rrelativa após diálise
Xilanase +PEG	1	0,86	0,52

Xilanase commercial	1	0,55	0,32
------------------------	---	------	------

Durante imobilização de xilanase comercial e aminada (com e sem adição de PEG), a atividade do sobrenadante do meio durante a imobilização foi acompanhada.

Os ensaios realizados, medindo-se atividade do sobrenadante (enzima ainda em solução que não foi imobilizada) mostraram que a aminação da enzima com e sem adição de PEG resultaram em uma rápida imobilização, sendo que a ausência do PEG permitiu uma atividade recuperada de 100%. Os resultados são mostrados na Figura 4.4. Uma explicação para esse decréscimo se dá ao impedimento estérico por parte do plímero que se interage com a enzima por pontes de hidrogênio.

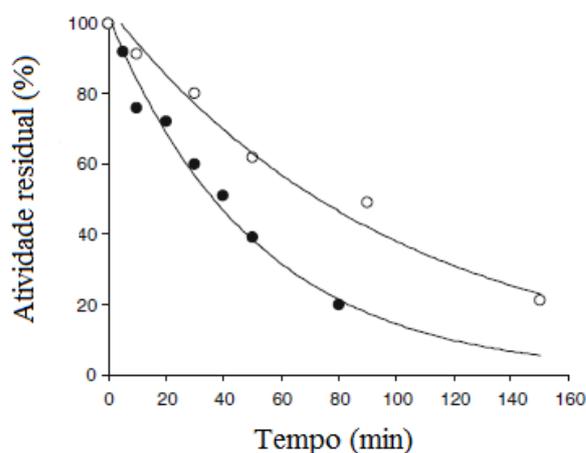
Figura 4.4. Taxa de imobilização da xilanase comercial (*círculos cheios*), dialisada (*círculos vazios*), aminada sem uso de PEG (*triângulos cheios*) e dialisada em presença de PEG (*triângulos vazios*).



#### 4.1.3. Inativação térmica das xilanases

Ensaio de inativação térmica de enzimas solúveis comercial e dialisada, bem como de enzimas comercial imobilizada e dialisada imobilizada foram realizadas a 70°C em pH 7. Os resultados são mostrados nas figuras 4.5 e 4.6.

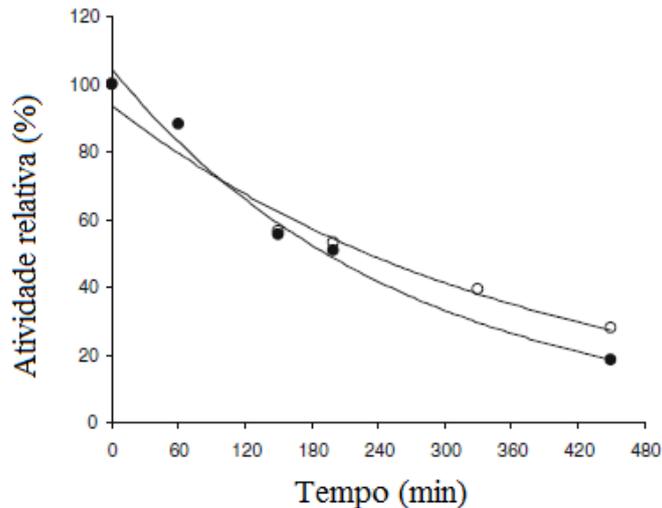
Figura 4.5.: Inativação térmica a 70°C e pH 7,0, de de xilanase comercial solúvel (círculos vazios) e xilanase dialisada solúvels (círculos cheios).



Foram realizados ensaios de inativação térmica a 70°C e pH 7,0 das enzimas, solúvel comercial, solúvel dialisada e enzimas imobilizadas em agarose-glioxil com e sem previa aminação. Resultados medindo-se o tempo de meia vida ( $\tau_{1/2}$ ) foram de 90 e 45 minutos para enzimas solúvel comercial e dialisada, respectivamente.

Na figura 4.6 é apresentada a inativação térmica das xilanses imobilizadas, em sua forma comercial e em sua forma previamente dialisada, sem presença de agentes protetores. Perfis são semelhantes são observados, indicando que a exclusão prévia de agentes protetores não foi relevante para o fator de estabilização. O processo de imobilização de ambas as xilanses (comercial e dialisada) representou apenas um baixo avanço na estabilidade térmica da enzima, cujo tempo de meia vida que alcançou 3,5 horas.

Figura 4.6.: Inativação térmica, a 70°C e pH 7,0, de xilanase dialisada imobilizada (círculos vazios) e xilanase comercial dialisada (círculos cheios).

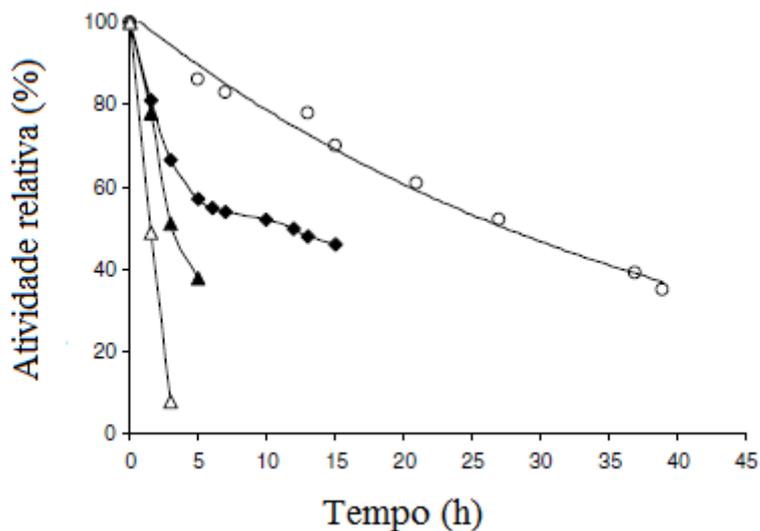


Esse baixo fator de estabilização indica que a imobilização, mesmo sendo efetiva em sua função de insolubilizar a enzima, não obteve sucesso na estabilização térmica. São reportados, por exemplo, aumentos de tempos de meia vida, através de imobilização multipontual, de 500 vezes para a Alcalase, 8.000 vezes para a Penicilina G Acilase e 9.000 vezes para a quimotripsina (Mateo *et. al.*, 2007; Adriano *et.al.*, 2008), o que indica claramente que um grande número de grupos lisina (ou amino) encontrava-se disponível para a imobilização multipontual. Tentou-se, portanto, com a reação de aminação da xilanase NS 50014 e o aumento no número de grupos amino em sua superfície, que um ( $\tau_{1/2}$ ) de valor mais expressivo fosse atingido, capaz de permitir processos enzimáticos mais longos ou a reutilização da xilanase em vários ciclos.

O tempo de meia vida ( $T_{1/2}$ ) das enzimas aminada com presença de PEG e em ausência de PEG foram, respectivamente, 6 h e 30 h, esta última representando aumento, em relação a enzima livre dialisada, de 40 vezes. Os resultados são mostrados na figura 4.7. Há de se verificar que houve um aumento da estabilização, porém a adição de PEG durante a reação de aminação não se mostrou favorável à etapa de imobilização, todavia importante para se evitar maiores perdas de atividade.

É possível que o PEG tenha envolvido a molécula de enzima de forma a protegê-la excessivamente, não permitindo que a reação de aminação fosse efetiva. Com isso, a xilanase foi parcialmente aminada e o número de grupos amino gerados neste caso foi menor e não suficiente comparado com o processo sem uso de PEG, onde ocorreu aminação completa.

Figura 4.7. Inativação térmica da xilanase comercial solúvel (triângulos cheios), dialisada solúvel (triângulos vazios), aminada em presença de PEG (quadrados cheios) e aminada sem adição de PEG (círculos vazios).



As xilanases são consideradas enzimas importantes para aplicação industrial em várias áreas. Tornar esta enzima insolúvel e termicamente estável representaria a diminuição de custos de processos usando xilanase. A imobilização da preparação comercial da xilanase NS 50014 em agarose glioxil representou uma melhora pouco positiva no fator de estabilização da enzima. Com a introdução de grupos amino adicionais na superfície enzimática através da realização de reação de aaminação da proteína, com ou sem adição de PEG na reação, obteve-se sucesso na estabilização, possibilitando a enzima se ligar ao suporte e realizar, desta forma, uma ligação multipontual ao suporte. A utilização de PEG, apesar de diminuir a grande perda de atividade catalítica da xilanase durante a aaminação, não foi favorável ao ganho de estabilidade térmica, podendo ter evitado a formação de grupos amino na enzima. A enzima aminada sem presença de PEG, em seguida dialisada e imobilizada em glioxil-agarose, foi 40 vezes mais estável do que a enzima solúvel dialisada, a 70°C e pH 7.0, indicando este como um bom procedimento para imobilização da xilanase NS 50014.

## *4.2. Estudo da extração de xilana de material lignocelulósico e da viabilidade de utilização como substrato na produção de XOS com xilanase imobilizada*

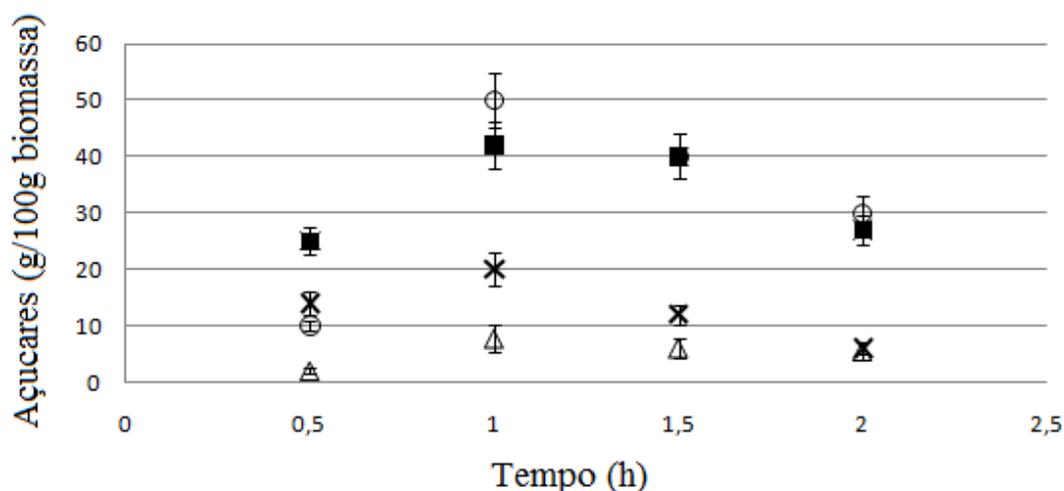
Nesta etapa do trabalho, estudaram-se duas espécies de madeira nativas da Europa central, cujo pó de serra (resíduo do trabalho de carpintaria) foi recolhido durante o mês de maio (primavera) por carpinteiros do sul da Alemanha. As espécies foram: álamo ou choupo negro (Schwarzpappel) e faia (Buche). Esse material foi processado para se extrair xilana através de dois pré-tratamentos: hidrotermal com irradiação micro-ondas e organossolve etanol-água, após investigação de suas composições. Seleccionadas a melhor fonte e o melhor pré-tratamento para obtenção de xilana, esta foi enzimaticamente hidrolisada com xilanase NES 50014 livre e imobilizada (sem presença de PEG), desenvolvida na primeira etapa do projeto.

Esta etapa do projeto foi realizada em dois institutos no centro de ciências de Straubing, pertencente à Universidade Técnica de Munique, Alemanha: Instituto de Química e Recursos Biogênicos e Instituto de Recursos e Tecnologia Energética, com colaboração de Prof<sup>a</sup> Doris Schieder. Fomentada pelo DAAD, (Deutscher Akademischer Austausch Dienst), Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico, esta etapa foi um trabalho de um doutorado sanduíche na Alemanha, de durabilidade de 12 meses.

### *4.2.1. Caracterização de açúcares da biomassa*

A análise da composição de açúcares inicial da biomassa é importante para se conhecer a eficiência de cada pré-tratamento. Para isso, é realizada hidrólise da matéria prima. A duração deste procedimento determina sua agressividade no sentido de se extraírem os açúcares. Caso seja curto demais, é possível que não ocorra extração eficiente de toda hemicelulose. Caso muito longo, o processo pode destruir açúcares tanto da hemicelulose quanto da celulose, transformando-os a produtos de degradação, como furfural e hidroximetilfurfural. Se possível, faz-se otimização deste tempo de hidrólise. A autoclavagem foi realizada em tempos crescentes, de 30 a 120 min, a 120°C, após as quais se analisava concentração de açúcares. A figura 4.8 mostra resultados dos diferentes tratamentos.

Figura 4.8. Verificação de tempo ótimo de hidrólise ácida da matéria prima.



Depois desta etapa, o tempo de hidrólise foi especificado para 60 min para todas as análises. Os resultados das caracterizações de ambas as madeiras estão mostrados na tabela 4.2..

Tabela 4.2.: Composição das matérias primas de faia e choupo negro após 60 min de hidrólise em autoclave 120°C, ácido sulfúrico 72% (médias de triplicatas).

Pó de serra de faia (g/100g material prima)					
Glicose	Xilose	Galactose	Arabinose	Manose	Total
40.8	20.4	0.33	0.63	0.67	62.8
Pó de serra de choupo negro (g/100g material prima)					
Glicose	Xilose	Galactose	Arabinose	Manose	Total
47.6	7.8	1.1	0.04	11.7	68.2

Conteúdos de xilose e glicose, em base mássica, são relatados para o choupo negro como sendo de, respectivamente, 39,6 a 46,9% e 10,2-20,1% (*Grous et.al., 1986; Pan et.al., 2006*); enquanto que para a faia são relatados 45,4 ± 1,9% de glicose e 27,9 ± 6,8% e xilose em sua composição (*Godin, et.al., 2010*). Neste trabalho, foram medidas

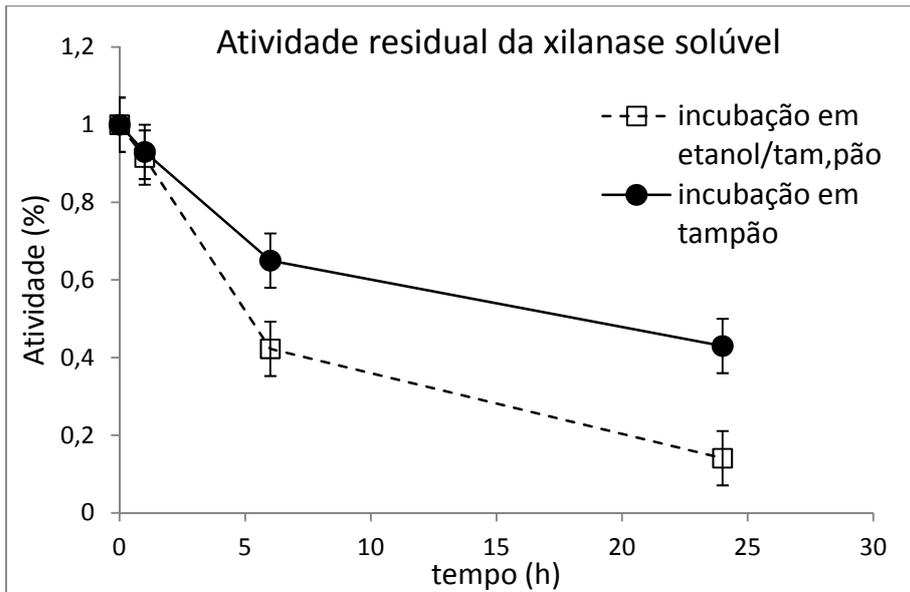
concentrações de glicose e xilose para o choupo de 49,7-50,0% e 7,3-8,3%, respectivamente. Para a faia foi obtido 39,1-42,0% de glicose e 16,3-25% de xilose. Esses valores estão de acordo com os citados na literatura. Kordsachia 2011 analisou em um trabalho realizado em 2011, 3 espécies de coníferas e 4 espécies de árvores de folha caduca encontradas na Alemanha. Valores de monossacarídeos encontrados na madeira de faia foram semelhantes aos encontrados neste trabalho, porém para o choupo, há uma diferença bastante significativa. Aqui, obtiveram-se valores muito altos de manose (média de 11,7%), enquanto que Kordsachia 2011 obteve cerca de 3,7% apenas. No entanto, foi o monômero mais freqüente depois da xilose (20,9%) e glicose (70,9%) e este autor analisa álamo não especificando se é a espécie aqui estudada (choupo negro). Ele também cita como sendo a glucomanan-xilana mais comumente encontrada em madeira mole de coníferas. Muitos autores citam que madeiras moles têm maiores teores de hemicelulose e resinas e há autores que apresentam a xilana de madeira mole como sendo glucomanan-xilana (*Sjostrom 1993*); Supõe-se, com esse resultado, que a espécie de álamo estudada neste trabalho também contém glucomanan-xilana.

O conteúdo de xilana (lida em forma de xilose) da madeira de faia é maior, o que a torna uma fonte mais adequada de xilo-oligossacarídeos do que a madeira de álamo. A faia foi, portanto, escolhida para as seguintes etapas do trabalho.

#### *4.2.2. Influência do etanol sobre a atividade enzimática*

Atividade residual da xilanase solúvel incubada em soluções tampão contendo ou não 7% de etanol foram medidos com o tempo e a sua atividade residual relativa foi calculada. Os resultados são mostrados na Figura 4.9

Figura 4.9: Influência do etanol sobre a actividade enzimática da xilanase solúvel.

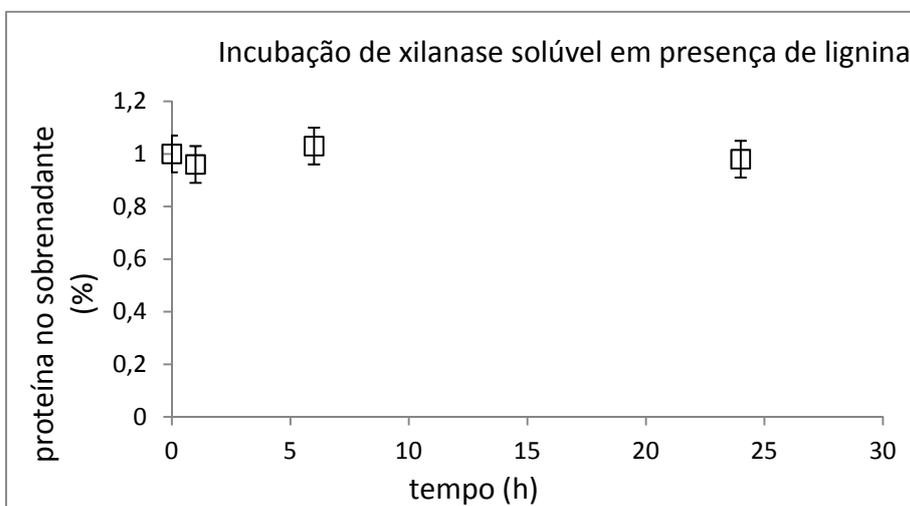


Resultados demonstram que a presença de etanol acelera a perda de atividade da enzima a temperatura ambiente. De fato, o efeito inibitório do etanol sobre a enzima é relatada por alguns autores (Tabakoff, et.al., 1985; Kumar e Barrett 2009).

#### 4.2.3. Adsorção de xilanase solúvel em lignina insolúvel.

Lignina seca extraída depois de realizado pré-tratamento organossolve da madeira de faia, foi adicionada a uma solução tampão acetato de enzima-à temperatura ambiente e proteína foi controlada durante o tempo. Os resultados mostrados na Figura 4.10 indicam que não há evidência de adsorção da proteína na lignina insolúvel após 24 h de ensaio, sob estas condições de ensaio,

Figura 4.10: Investigação de adsorção da xilanase solúvel em lignina seca



Este ensaio não descarta, no entanto, a adsorção da xilanase na lignina (solúvel) sob outras condições experimentais.

#### 4.2.4. Pré-tratamentos de pó de serra de madeira de faia: micro-ondas e organossolve

Mono e oligossacarídeos extraídos do pó de madeira de faia através do tratamento hidrotérmico usando-se micro-ondas para três condições e extraídos com processo organossolve são apresentados na tabela 4.3. Os valores obtidos são comparados aos da matéria prima.

Tabela 4.3.: Oligo-, monossacarídeos e valores de pH para o pó de serra de faia após pré-tratamento organossolve e tratamentos em microondas. Média de triplicatas.

	Matéria prima- pó de serra <i>in natura</i>	Organossolve	Microondas 150°C - 10 min	Microondas 130°C - 30 min	Microondas 120°C - 60 min
Oligosacarídeos (g/100g±) 0.5)	20	10.05	1.20	4.20	6.11
Monosacarídeos (g/100g±) 0.5)	0	0.12	0.35	2.65	1.12
pH (± 0,05)		3.77	2.90	3.15	3.20

Tempo e temperatura contribuem para a severidade do tratamento. Resultados encontrados na tabela 4.3 mostram que a extração de xilana aumenta para períodos longos de ação de micro-ondas, a temperaturas mais baixas (120-130°C). Os valores de pH medidos após incubação com micro-ondas decresceram de 3,2 a 120°C até 2,9 a 150°C. A hemicelulose é a fração do material lignocelulósico mais facilmente atacado por ácidos. A xilana de madeira dura apresenta diversas ramificações O-Acetil em sua cadeia principais e esses grupos são rapidamente solubilizados devido ao pré-tratamento e com a liberação de ácido acético. No caso, não há adição de ácido ao meio de tratamento, no entanto o hidrônio ( $H^3+$ ) atua na hemicelulose catalisando reações de quebras iniciais, depois das quais rapidamente são liberados ânions acetato (Nabarlatz,

2007). Isso pode explicar o decréscimo da quantidade de xilana de 6,1 a 4,2 a 1,2%, quando há aumento de temperatura de 120, a 130 a 150°C. Cabe aqui mencionar o pH medido na madeira de faia em sua forma natural, citada na literatura como sendo de cerca 5,5. Ácidos orgânicos presentes das madeiras contribuem para a característica ácida da polpa (Koch , *et.al.* 2002). Supõe-se que esses ácidos venham a contribuir no processo de rompimento de cadeias de açúcares. Mtui, 2009 relata que o tratamento com radiação micro-ondas usando-se potência de 700 W em tempos variados resultou perda de massa devido à degradações de celulose, hemicelulose e da lignina.

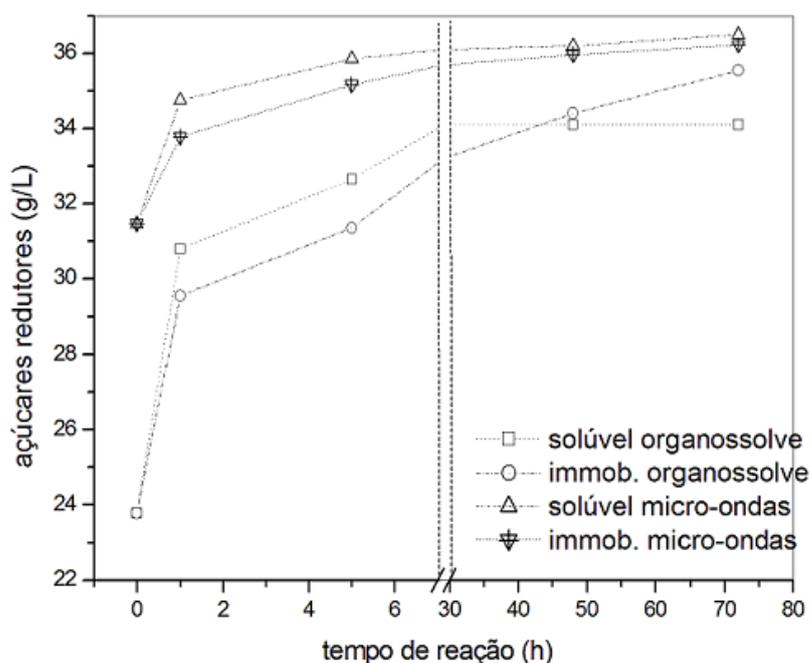
Para extração de xilana em forma de xilo-oligossacarídeos, escolheu-se a condição menos severa estudada, 120°C, por 60 min. O extrato solúvel aqui obtido será submetido a hidrólise enzimática. O processo organossolve com uso de etanol a 180°C por 60 min pôde extrair 50% da xilana em forma oligomérica e o pH final foi de 3,77. A presença de etanol pode no meio pode ter contribuído para esses resultados positivos. O etanol dissolve a lignina e reduz a atividade química da água, reduzindo, conseqüentemente, a formação de monômeros (Pan *et.al.*, 2006). O extrato obtido por organossolve será então, na etapa seguinte, enzimaticamente hidrolisado.

#### *4.2.5. Hidrólise com uso de xilanase livre e imobilizada dos extratos de pó de serra de faia solubilizados após tratamentos com micro-ondas e organossolve*

Após a seleção dos procedimentos de extração de açúcares, foi realizada hidrólise por incubação do meio da seguinte forma: os substratos (incluindo substratos organossolve S2, S1A e S1E) foram incubados a 60°C por 72 h com xilanases livres e imobilizada contendo carga enzimática de 20 UI por grama original de pó de serra. A figura 4.11 traz os perfis das primeiras 6 h e últimas 42 h de reação para extratos de madeira S2 e micro-ondas.

Pode ser observado, na figura 4.11 que o substrato (S2) obtido por microondas fornece um substrato cuja concentração de açúcares redutores é mais alta inicialmente, resultante da maior quebra ocorrida durante o processo. Isso gerou cadeias mais curtas de carboidratos e em maior número. Mesmo tendo concentração inicial de açúcares mais alta do que o solubilizado por microondas, o extrato obtido com tratamento organossolve apresenta AR menor.

Figura 4.11. Hidrólise de extratos solubilizados de pó de serra de faia por organossolve (180°C, 60 min) e aplicação de microondas (120°C, 60 min), com uso de xilanase livre e imobilizada, a 60°C por 72 horas de reação.(círculos cheios: microondas-enz.imobilizada; círculos vazios: microondas-enz.livre; quadrados cheios: organossolve-enz.livre; quadrados vazios: organossolve-enz.imobilizada).



As velocidades iniciais de hidrólise com xilanase imobilizada são menores do que as observadas para a livre (figura 4.8). Esse fenômeno geralmente ocorre quando se compara catalisadores homogêneos e não-homogêneos, devido à resistência ao transporte de massa na difusão de oligômeros pela camada externa até os poros e a superfície externa do suporte (onde a enzima se encontra imobilizada). Observa-se também na figura 4.8 que as velocidades iniciais de reação são menores para o solubilizado extraído por micro-ondas do que para o solubilizado organossolve. Neste caso, o valor mais baixo do pH do meio bem como a concentração menor de açúcar total no solubilizado por micro-ondas podem ter contribuído para isso. Pode-se imaginar que as concentrações de açúcares redutores lidas nos ensaios são demasiado elevadas, porque essa quantidade de açúcar total não foi encontrado na análise da matéria-prima *in natura*. Dentre os ensaios de atividade enzimática para determinação endoxylanases, DNS e Somogyi Nelson são os mais referidos, sendo que o último é 10 vezes mais sensível do que o anterior, que superestima a atividade catalítica da xilanase (Bailey

et.al., 1992; Jeffries et.al .; 1998). Somogyi Nelson, por sua vez, pode subestimar a atividade de xilanases.

#### 4.2.6. Hidrólise dos extratos organossolve de pó se serra de faia com xilanase solúvel e imobilizada – Comparação entre os substratos S1E, S1A e S2.

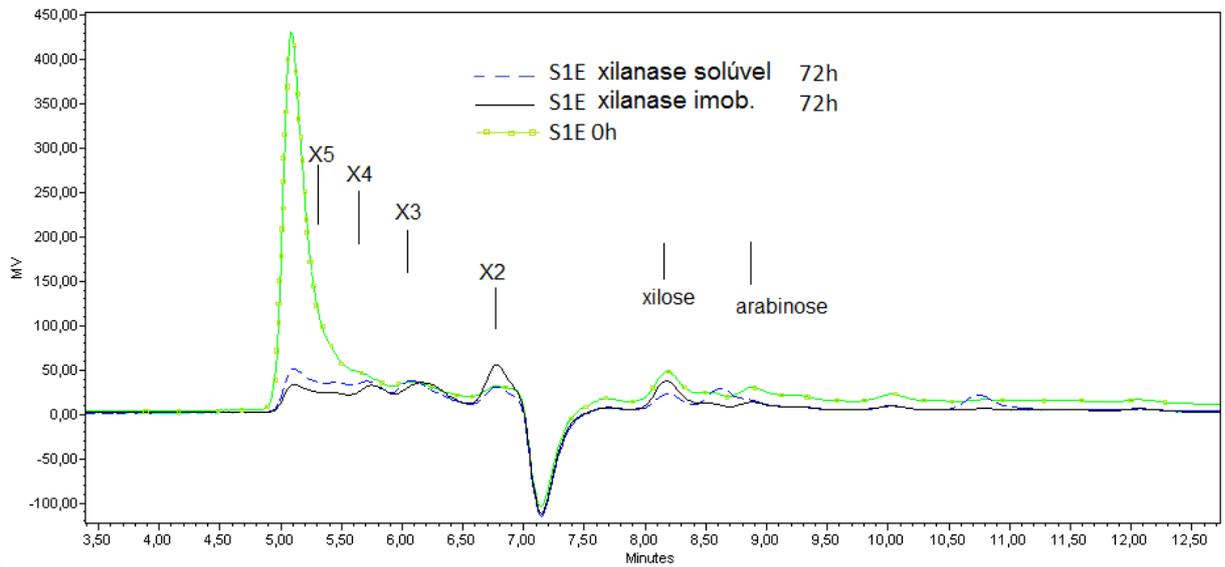
Um volume de extrato de pó de serra de madeira de faia após pré-tratamento organossolve foi deixado secar à temperatura ambiente e os sólidos foram re-suspensos em solução de água contendo ou não 7% de etanol(S1E e S1A, respectivamente), a solução foi centrifugada e separado da lignina precipitada. As 72 horas de hidrólise enzimática foram seguidas em termos de XOS medidos por comcromatografia. Para se realizar a análise em HPLC foi necessário filtrar a solução utilizando filtros C18 Sepak®(Waters) e filtro comum de 0.20µm (Sartorius). Cromatogramas mostrando XOS de cadeia curta, < 0,20 µM (tamanho de poro do filtro) após hidrólise enzimática são mostrados na Figura 4.12: 4.12.a: S1A e b: S1E utilizando a enzima solúvel e imobilizada após 72 h de reação, respectivamente; c: S2 utilizando solúvel e enzima imobilizada após 24 h de reacção. Xilose total e xilobiose gerada após 72 h dehidrólise são mostrados na tabela 4.4 abaixo.

Tabela 4.4. As concentrações de xilobiose e xilose medida após 72h de hidrólise com xilanase solúvel e imobilizada de diferentes substratos.

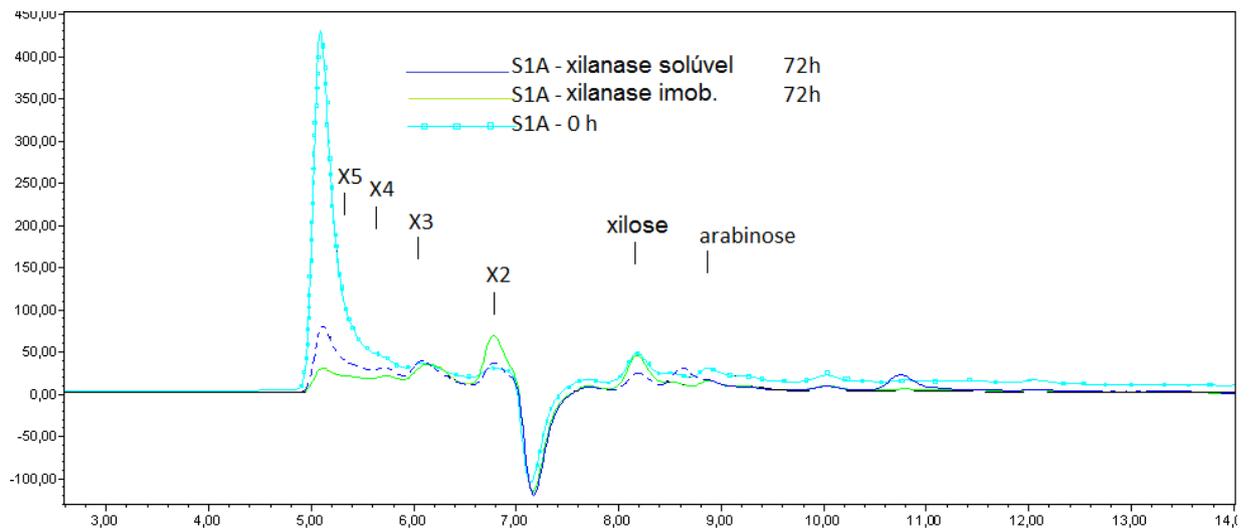
Substrato	Total xilobiose (X2) (g/L)	Total xilose (g/L)
S1A xilanase solúvel	2.06	0.2
S1A xilanase imobilizada	2.90	0.5
S1E xilanase solúvel	0.4	0.1
S1E xilanase imobilizada	0.72	0.32
S2 xilanase solúvel	0.8	0.39
S2 xilanase imobilizada	2.68	0.47

Figura 4.12: Hidrólise enzimática de extrativos de pó de serra de madeira. 4.12.a: S1A e b: S1E utilizando a enzima solúvel e imobilizada após 72 h de reação, respectivamente; c: S2 utilizando solúvel e enzima imobilizada após 24 h de reação.

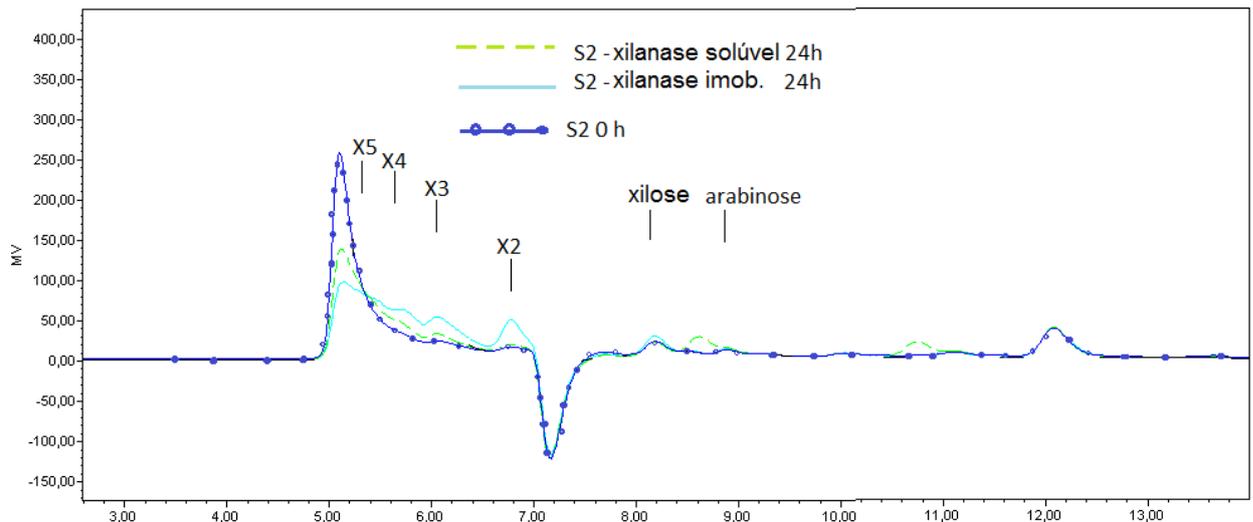
a)



b)



c)



Resultados das concentrações totais XOS de cadeia curta produzido ao longo do tempo e após 72 horas de hidrólise, lidos nos cromatogramas relativos a todos os substratos, S1A, S1E e S2 mostram melhor desempenhada xilanase imobilizada quando comparado com enzima solúvel. Os produtos xilobiose e xilose foram também gerados em quantidade mais elevada quando usada a enzima imobilizada. É evidente que o substrato mais adequado quando se comparam S1A com S1E foi o S1A, o qual não continha etanol em sua composição, mesmo quando a xilanase solúveis foi utilizada. Este resultado está de acordo com o anterior (Figura 4.9) que mostra a influência negativa do etanol sobre a actividade enzimática. É possível diminuir o efeito de inativação enzimática causado pelo solvente quando se realiza a imobilização da enzima.

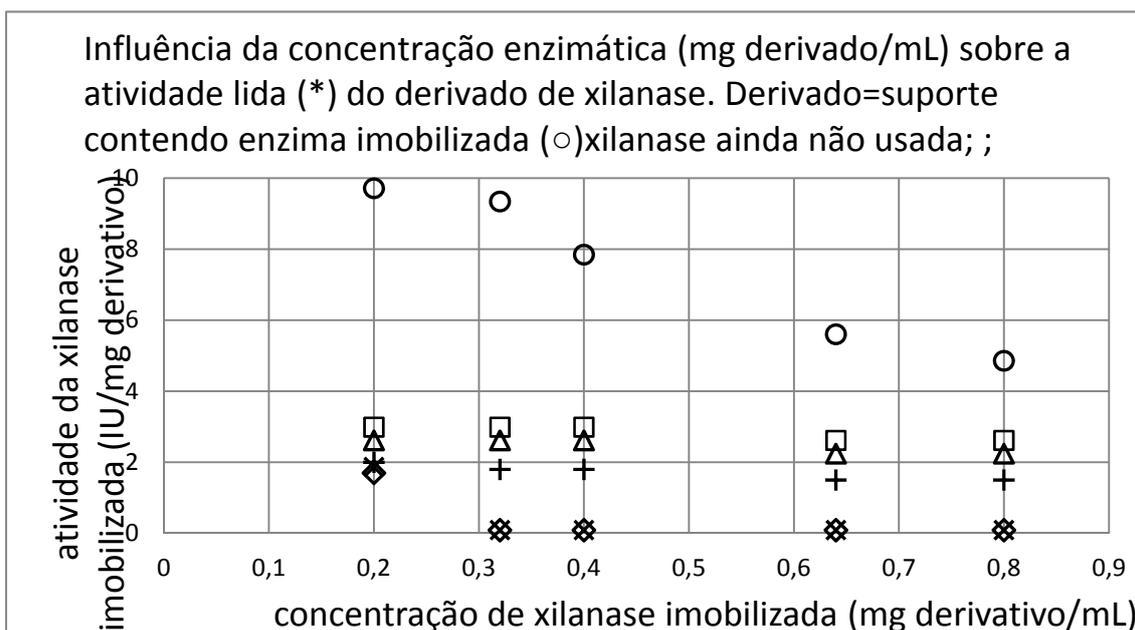
#### 4.2.7. Metodologia para avaliação imparcial das atividades residuais de enzimas imobilizadas após experimentos de hidrólise

A estabilidade operacional é um importante fator a se investigar quando de aplicam enzimas imobilizadas. Devem-se identificar quaisquer influências do meio de reação sobre as propriedades catalíticas da enzima, sempre que se almeja operar em processos industriais. A atividade residual da xilanase imobilizada após 72 h de hidrólise dos três substratos estudados (dois solubilizados de pó de serra e xilana de bétula) foi, portanto, verificada. A fim de se assegurar que a atividade medida foi imparcial, diferentes concentrações de enzima foram usadas, até que se atingisse uma atividade (unidades UI) invariante da massa de derivado (grama de enzima imobilizada). Quando a atividade da enzima é especificada, assume-se implicitamente que o mecanismo pseudo-estacionário de Briggs-Haldane é válido para o caso. A atividade é calculada após medidas as

velocidades iniciais da reação enzimática em condições padrão e dividindo-as pela concentração de enzima. Consequentemente, a velocidade inicial de reação irá variar linearmente com a concentração da enzima, devendo ser mantidas constantes as demais condições (concentração inicial de substrato, pH, temperatura, tampão). Ainda assim, deve se atender a premissa de que a concentração de substrato é muito maior do que a concentração da enzima. A figura 4.11 exibe os resultados das atividades enzimáticas para os derivados utilizados nas diferentes hidrólises e para o derivado “novo”. Os resultados indicam que, para o derivado novo, cargas enzimáticas mais baixas que 0,2 mg<sub>derivado</sub> /mL devem ser utilizadas para se medir a real atividade enzimática. No caso dos demais derivados, já usados, concentrações ainda maiores, de até acima de 0.4 mg<sub>derivado</sub> /mL forneceram perfis lineares de relação entre concentração de enzima e reação inicial de hidrólise. A real atividade enzimática pôde ser medida para todas essas concentrações.

Devido à inativação da enzima durante a reação, os derivados testados de xilanase continham valores de atividade menores do que a encontrada para a enzima imobilizada “nova”. Deve-se considerar, portanto, a concentração de 0.2 mg<sub>derivativo</sub> /mL na qual o derivado “novo” e os demais derivados têm sua verdadeira atividade catalítica medida e ela não está mascarada pela influência da concentração do substrato do meio, que deve acessar a enzima ativa. A figura 4.13 demonstra este fato.

Figura 4.13.: Influência da concentração de enzima (mg derivados/ mL) na atividade medida do derivado de xilanase.



A perda de atividade verificada após utilização dos derivados para as hidrólises em diferentes substratos demonstra uma tendência significativa, por parte da xilanase NS 50014 imobilizada em agarose-glioxil, de perder atividade catalítica quando submetida a processos hidrolíticos nessas condições e por longos períodos. Essa tendência foi verificada mesmo quando o substrato hidrolisado foi a xilana de bétula (substrato comercial usado como controle). A perda de atividade depois de 72 horas de hidrólise foi de cerca de 70% para o substrato de xilana de bétula. Isso sugere que as condições de operação e do meio (pH 3,5, 60°C, 72 horas) afetaram negativamente muito mais do que outros fatores como a presença de lignina e íons. Esses outros fatores podem ter sido responsáveis pela maior perda catalítica medida no derivado após aplicação com extrato solúvel por processo organossolve, que, comparado às aplicações nos demais substratos, apresentou maior perda. É importante verificar que nenhuma alteração foi feita no meio, que ainda continha de etanol residual. O etanol pode atuar como inibidor da enzima (Tabakoff, B., et al., 1985; Kumar e Barrett 2009). Alguns autores também verificaram que altas concentrações de lignina no meio afetaram negativamente a hidrólise e a fermentação de extratos solubilizados pelo processo organossolve (Araque et al., 2008; Kumar e Barrett 2009).

Desejou-se investigar, então, se a presença de lignina aumentou o efeito prejudicial sobre a enzima em relação a perdas de atividade. Os conteúdos de lignina de soluções filtradas de etanol/água utilizadas para a lavagem dos derivados foram avaliados, bem como suspensões de derivados em água, medindo-se a absorvância a 280 nm (Parasuraman et al., 2007; Iiyama e Wallis, 1990). Esses valores variaram, para as águas de enxágüe dos derivados utilizados em substrato com bétula de xilana (absorvância mais baixa), substrato solubilizado de faia por microondas (valor intermediário) e substrato solubilizado de faia por organossolve (valor mais alto). A concentração mais alta de lignina, correspondente ao maior valor de absorvância, corresponde à maior perda de atividade verificada no derivado usado, de solubilizado por organossolve. No entanto, a atividade enzimática foi mais drasticamente afetada pelas outras características do meio (60°C pH 5) do que pela lignina em si, visto que o tempo de meia vida da xilanase imobilizada foi de 30 horas em pH 7,0 a 70°C, previamente reportado no item 4.1.3.

Perfis de hidrólise mostrando redução de concentração açúcar durante a reação enzimática (Figura 4.11) indicam que após 6 horas de hidrólise houve uma conversão

em torno de 90% utilizando-se a enzima solúvel, mas de cerca de 80% quando se utilizou a enzima imobilizada. Uma mesma produtividade só seria possível, portanto, com uso de xilanase imobilizada se for usada uma concentração maior deste derivado. No entanto, a enzima imobilizada pode ser recuperada, um procedimento que não pode ser feito com o catalisador solúvel. Também é importante notar que a utilização da enzima imobilizada no meio bruto, diretamente após o pré-tratamento de madeira, foi viável sem a necessidade de ajustes de pH ou desintoxicação do meio. Realizar a hidrólise enzimática em pH neutro certamente permitiria atingir a mesma conversão num tempo mais curto, o que aumentaria o número de ciclos que a enzima poderia suportar. Além disso, o pH baixo pode ter afetado negativamente a estabilidade térmica da enzima. Portanto, a definição de valores de pH neutro pode não só aumentar as taxas de reação, mas também diminuir a perda de atividade durante a hidrólise a 60 ° C.

### *4.3. Estudo da extração de xilana de bagaço de cana de açúcar usando-se tratamento organossolve (etanol) e seleção de endoxilanases para produção de XOS*

Na sessão 4.1 descreveu-se a obtenção de um biocatalisador estável de endoxilanase; na sessão 4.2 demonstrou-se que era possível a extração de oligômeros de xilana de um material lignocelulósico típico, bem como a eficiência do biocatalisador obtido para a hidrólise desses oligômeros. Ficou, pois, demonstrada a viabilidade técnica da rota enzimática para produção desse importante produto a partir de material lignocelulósico.

O interesse neste trabalho foi testar o bagaço de cana como matéria-prima, devido à grande importância no Brasil desse sub-produto da indústria alcooleira. Os resultados do capítulo 4.2. mostraram que o tratamento organossolve é mais efetivo que o hidrotérmico para a extração de oligômeros e foi, portanto, aplicado para o bagaço de cana. Para esta nova matéria-prima, buscaram-se agora condições experimentais que permitissem a máxima extração com mínima formação de monômeros, testando-se diferentes condições de temperatura, tempo e concentração de etanol. Por outro lado, a xilanase utilizada nas sessões 4.1 e 4.2 não estava mais sendo disponibilizada pela empresa NOVOZYMES. Foi necessária assim a busca por outras xilanases que tivesse propriedades adequadas para a produção de XOS. A seleção foi feita dentro de um grupo seletivo de três xilanases disponíveis no mercado e uma xilanase de *Bacillus subtilis* recombinante.

Vários autores estudaram diferenças entre xilanases. Endoxilanases de *Thermoascus aurantiacus* (família 10) e da família *Sporotrichum termóphile* (família 11) investigados na hidrólise de substrato comercial xilana de bétula (birchwood xylan) para produção de XOS (Christakopoulos, et al., 2003) mostraram respostas distintas. Xilanase de *T. aurantiacus* liberou fragmentos mais curtos, em contraste com a enzima de *S. termóphile*. Em outro estudo (Jiang et.al., 2004), xilanase recombinante de *Thermotoga marítima* gerou preferencialmente xilobiose e xilose, sendo que a xilose representou 66% dos produtos. Endoxilanases de outras fontes mostraram predisposição para gerar preferivelmente xilotriose ou uma mistura de XOS com grau de polimerização  $\leq 2$  (Aachary e Prapulla, 2010).

Há de se perceber, portanto, que não basta simplesmente nomear uma xilanase que esteja disponível no mercado para assumir uma função hidrolítica num processo, quando se deseja produzir XOS de qualidade aceitável. Além de um estudo sobre sua capacidade específica de clivagem, uma averiguação cautelosa de todas as características da enzima, consideradas simultaneamente como uma proteína que deve ser imobilizada em um suporte sólido e ser capaz de atuar em meio parcialmente hostil deve ser feita. O objetivo nesta etapa de trabalho foi de estudar o desempenho de três xilanases comerciais diferentes e uma xilanase recombinante de *Bacillus subtilis* para a produção de XOS de xilana extraída do bagaço de cana, após a realização de pré-tratamento pelo processo organossolve.

#### 4.3.1 Extração de xilo-oligômeros por Organossolve

Extração do bagaço de cana foi realizada cerca de cinco condições diferentes e três graus distintos de severidade (DS). A Tabela 4.3 apresenta as frações de xilana, monômeros e XOS obtidas após os ensaios. Tratamentos de severidade crescente, não só levaram a diminuição do grau de polimerização da xilana, mas também ao aumento da decomposição de XOS em xilose e a diminuição da fração de hemicelulose em frações sólidas e líquidas. Ou seja, supõe-se que altas temperaturas tenham causado a degradação da xilana total remanescente do bagaço. Por outro lado, quando se usou o DS de 4,1; 70% ou mais da hemicelulose foi preservada na fração sólida da biomassa. Quando o grau de severidade do processo é aumentado, ou seja, temperatura e tempo de processo, as taxas altas reações levam à degradação da xilana. Resultados semelhantes foram observados e citados por alguns autores. Pan et.al. 2006 usaram diversas combinações dos parâmetros temperatura, tempo, concentração de ácido sulfúrico e relação etanol/água no tratamento organossolve para a madeira de álamo. O ponto central, correspondente a 180°C, 50% etanol, 1,25% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; alcançou um rendimento de preservação da xilana (em forma de xilose) de 72%, encontradas na fração sólida e líquida somadas da biomassa pré-tratada. Chum et.al. 1990 também verificaram que o ponto central como melhor condições para a preservação da xilana. Ambos os autores verificaram que com aumento separadamente dos valores de temperatura, tempo e concentração de ácido há uma maior solubilização da xilana para a fração líquida, porém esses parâmetros combinados aumentados provocam sua degradação. O solvente orgânico presente na mistura rompe fortes ligações entre lignina e xilana, enquanto os íons da água, o hidrônio H<sup>+</sup> substitui a ação de um catalisador

ácido, e rapidamente libera o acetato na solução. Ele é somado ao hidrônio e ambos agirão como catalisadores ácidos (*Pan, et.al., 2006*).

Tabela 4.5...: Frações de monômeros e XOS medidas nos extratos solubilizados e no resíduo sólido da biomassa pré-tratada de bagaço de cana de açúcar.

Organossolve condições de pré-tratamento grau de severidade	pH	Xilana resid.sólido após pré- tratamento (g)	Monome- -ros em fração solúvel (g)	Xilo- oligos em fração líquida (g)	Rendimento de monome- ros (%) xilose+arab	Rendi- mento xilo- oligos (%)	total hemi (fração solid e líquida) (g)	% hemi (fração sólido e líquida)
150°C/30min/30 % etanol-4.1	4.23	5.68	0.2622	0.5	9.97	19.01	6.42	77.20
150°C/30min/50 % etanol – 4.1	4.57	5.48	0.185	0.49	6.54	17.31	6.14	73.90
150°C/30min/70 % etanol – 4.1	5.16	6.28	0.0195	0.2	0.96	9.85	6.47	77.89
170°C/60min/50 % etanol – 5.1	4.31	3.11	0.25	2.26	4.81	43.46	5.59	67.25
190°C/90min/50 % etanol – 5.9	3.64	0.97	0.456	0.9	6.21	12.26	2.30	27.68

A composição do bagaço de cana-de-açúcar in natura foi analisado por Nascimento, 2010, com 29,4% de hemicelulose, dos quais 20,4% correspondia à xilose e 3,2% à arabinose.

É de se observar que, comparados com o valor de pH final medido do solúvel extraído de madeira de faia, depois de sofrer tratamento organossolve (de 3,77), os valores de pH final medidos do extrato solúvel de bagaço de cana de açúcar são maiores, com exceção do tratamento realizado a 190°C, que atingiu um pH de valor equivalente, 3,64 (temperatura maior do que a utilizada para a madeira). Isso indica a influência da composição da xilana da matéria prima, visto que a xilana da madeira dura possui um número muito maior de grupos acetil em suas ramificações, do que observado no

bagaço. Analisando-se os resultados do bagaço de cana separadamente, mais uma vez comprova-se que há uma relação entre a severidade utilizada no processo e a danificação do material e consequente aumento de íons H<sup>+</sup> em solução. O desvio observado no caso do tratamento realizado a 150°C por 30 min, no qual se obteve o menor valor de pH, pode ser explicado pela maior presença de água do tratamento, em que se utilizou apenas 30% de etanol. O efeito de clivagem realizado pela água é maior, o que leva a diminuição do pH. Condições que resultaram em fração maior de XOS na fração solúvel foram 170°C, 50% etanol e 60 minutos de reação. O extrato solubilizado sob essas condições foi utilizado para ser hidrolisado enzimaticamente.

#### 4.3.2. Caracterização enzimática

Todos preparados enzimáticos foram caracterizados quanto a sua atividade hidrolítica, concentração de proteína e também quanto a distribuição por tamanho de suas proteínas, através de eletroforese em gel. Os resultados estão mostrados na tabela 4.6 e na figura 4.14.

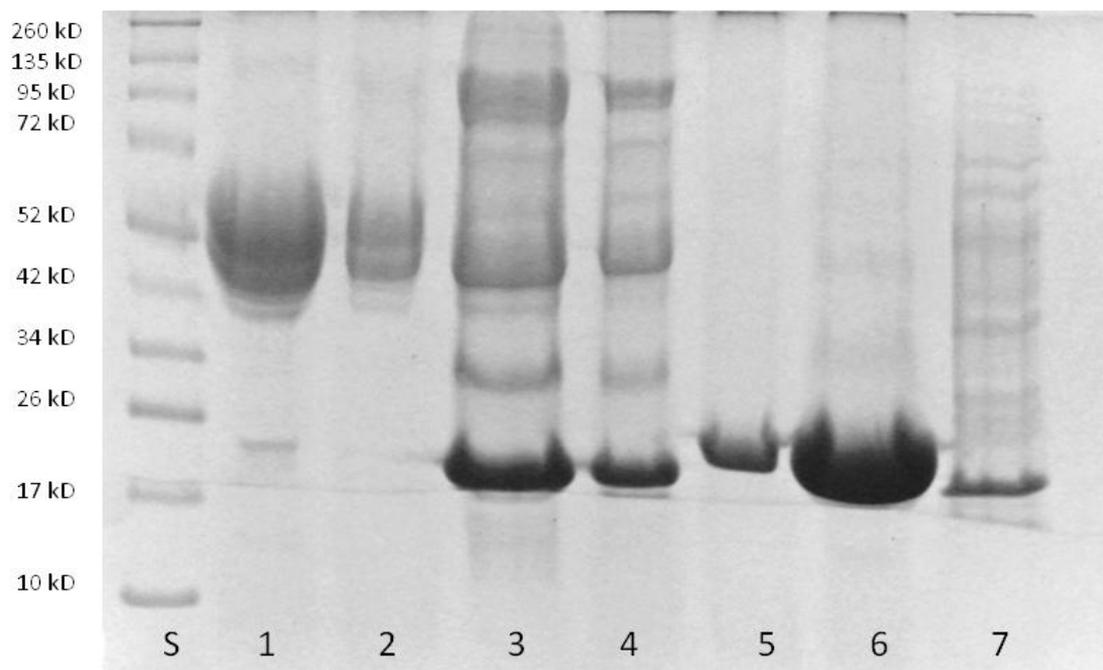
Tabela 4.6.: Atividades catalíticas dos preparados enzimáticos comerciais e dialisados.

Enzima	Atividade enzimática (UI/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (UI/mg proteína)
1 Novozymes 22036	1203	19,0	63,3
2 Novozymes 22036 dialisada	635	17,7	35,9
3 Genencor XY	1705	8,2	207,9
4 Genencor XY dialisada	1640	16,0	102,5
5 Xilanase de <i>Bacillus subtilis</i>	18	7,3	2,46
6 Novozymes 50014	34	7,0	4,85
7 Novozymes 50014 dialidada	30	0,3	100

Eletroforese em gel explica informações adicionais sobre o número e distribuição de tamanho de proteína dos preparativos enzimática. Com base na classificação proposta por muitos autores, simplificada separando as endoxilanasas em dois grandes grupos, endoxilanasas da família 10 (ou 5), de alto peso molecular (> 30 kDa) e família 11, baixo peso molecular (<30 kDa), os resultados mostrados na figura 4 abaixo sugerem que os preparativos enzimáticas NS 22036 e GXY são endoxilanasas (ou contêm endoxilanasas) que estão englobadas na família 10 (ou 5), podem pertencer tanto à classe 10 como a 5. Para que as classificações sejam mais refinadas e possa-se afirmar a qual das classes as endoxilanasas pertencem, são necessários ensaios adicionais de hidrólise em substratos específicos que contenham ramificações conhecidas, como xilana acetilada extraída de madeira, por exemplo. As enzimas NS 50014 e X-Bs são endoxilanasas da família 11 e apresentam-se de forma praticamente como uma proteína purificada. O preparativo enzimático GXY contém pelo menos quatro proteínas principais, indicando que essa enzima pode representar funções múltiplas. *Bacillus* spp. podem produzir duas xilanasas, um com baixa (16 a 22 kD) e outro com alto PM (43-50 kD) (Wong, et al., 1988). Resultado obtido por eletroforese indica que se trata do primeiro caso. Genencor XY é a preparação com maior atividade específica, enquanto a xilanasas obtida do extrato bruto de *B.subtilis* (não comercial) mostrou menos atividade específica, seguida a NS 50014.

Figura 4.14.: Eletroforese em gel SDS-PAGE de xilanasas estudadas.

1. Novozymes 22036; 2. NS 22036 dialisada; 3. Genencor XY; 4. GXY dialisada  
5. Xilanase de *B.subtilis*; 6. Novozymes 50014; 7. NS 50014 dialisada



#### 4.3.3. Seleção da xilanase

A seleção da enzima foi baseada em sua capacidade de hidrolisar xilana de bétula para a geração de XOS com liberação mínima de xilose. Resultados dos ensaios hidrólise enzimática utilizando carga de 90 UI de enzima/mL a 50 C durante 24 h são apresentados na Tabela 4.7. Com exceção do preparativo comercial da Genencor, o GXY, as enzimas apresentaram elevada capacidade de clivagem da xilana preferencialmente do interior da cadeia, ou seja, demonstram ser endoxilanases sem propriedades de  $\beta$ -xilosidase de, ou com baixa capacidade de geração de xilose.

Tabela 4.7. Rendimentos de xilose e XOS das hidrólises enzimáticas de xilana de bétula (50°C, 50mM tampão acetato pH 5,0).

		Concentração de Açúcares (mg/mL)							
		xilose	XOS	xilose	XOS	xilose	XOS	xilose	XOS
Tempo de hidrólise (h)	de	Genencor XY		Novozymes 22036		Novozymes 50014		xylanase from <i>Bacillus subtilis</i>	
1		0.105	5.132	0.04	4.086	0.051	6.36	0.05	9.5
6		0.818	8.092	0.05	9.63	0.2	6.654	0.08	9.22
24		3.995	5.391	0.35	9.63	0.25	9.01	0.1	8.9

A preparação enzimática doados por Genencor inclui, aparentemente, uma  $\beta$ -D-xilosidase em sua composição, portanto, mais de 40% do açúcar produzido consiste de xilose. Com base nestes resultados, fica claro que xilanase GXY não é adequada para a produção de XOS a partir de materiais lignocelulósicos.

#### 4.3.4. Uso da xilanase selecionada para produção de XOS

Resultados da pré-seleção de xilanases indicaram duas xilanases que são aplicáveis para a produção de XOS a partir de xilana de bagaço de cana extraída: a xilanase comercial Novozymes NS 22036 e a preparação enzimática produzida pelo microorganismo *B.subtilis*. A hidrólise de xilana de bétula usando NS 22036 é demonstrada na Figura 4.15 no início, depois de 20 minutos e depois de transcorridos 360 minutos de reação. XOS de maior grau de polimerização são hidrolisados em XOS menores tamanhos ao decorrer da reação. No entanto, a produção de xilose é praticamente nula. Concentrações dos XOS (em g/L); 22036: X5-X4 4,97; X3 3,36; X2 1,78; xilose: 0,03. *B.subtilis*: X5-X4 2,72; X3 1,95; X2 3,22; xilose: 0,02. Na figura 4.16 os produtos de hidrólise de xilana das xilanases NS 22036 e X BS são comparados após as primeiras 6 horas de incubação enzimática. Nota-se mais uma vez que essas xilanases têm como produtos principais XOS.

Figura 4.15. Cromatogramas da geração de XOS resultantes das primeiras 6 horas (em 0 min, 20 min e 360 min de reação) de hidrólise de xilana de bétula com NS 22036 (50°C pH 5,0).

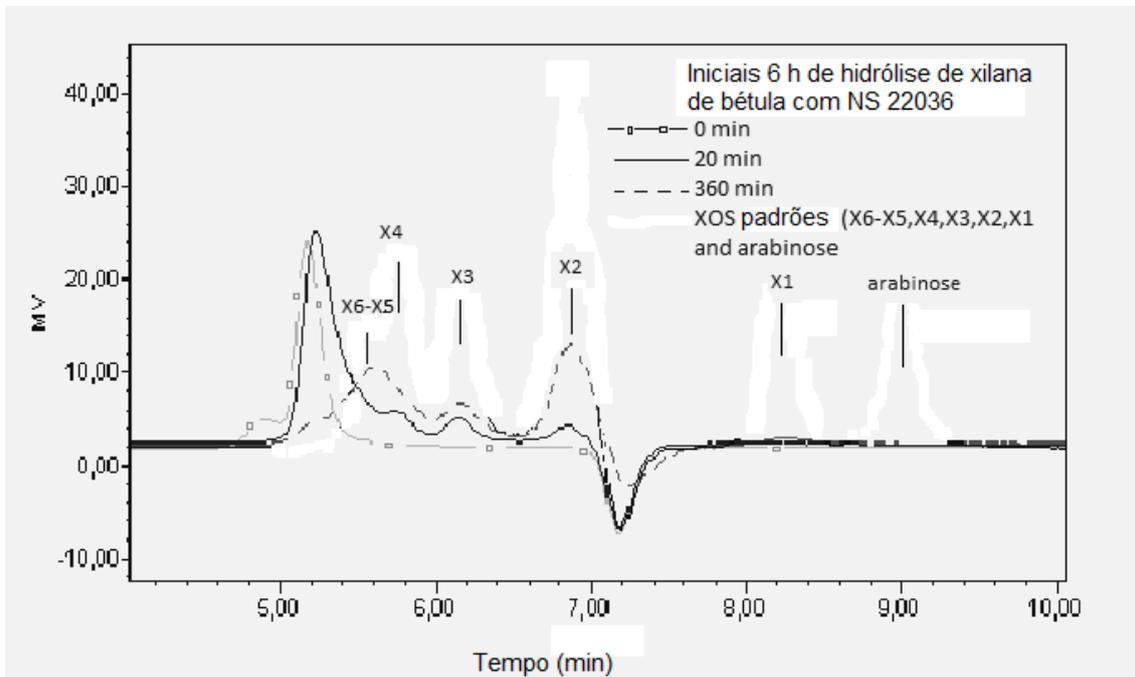
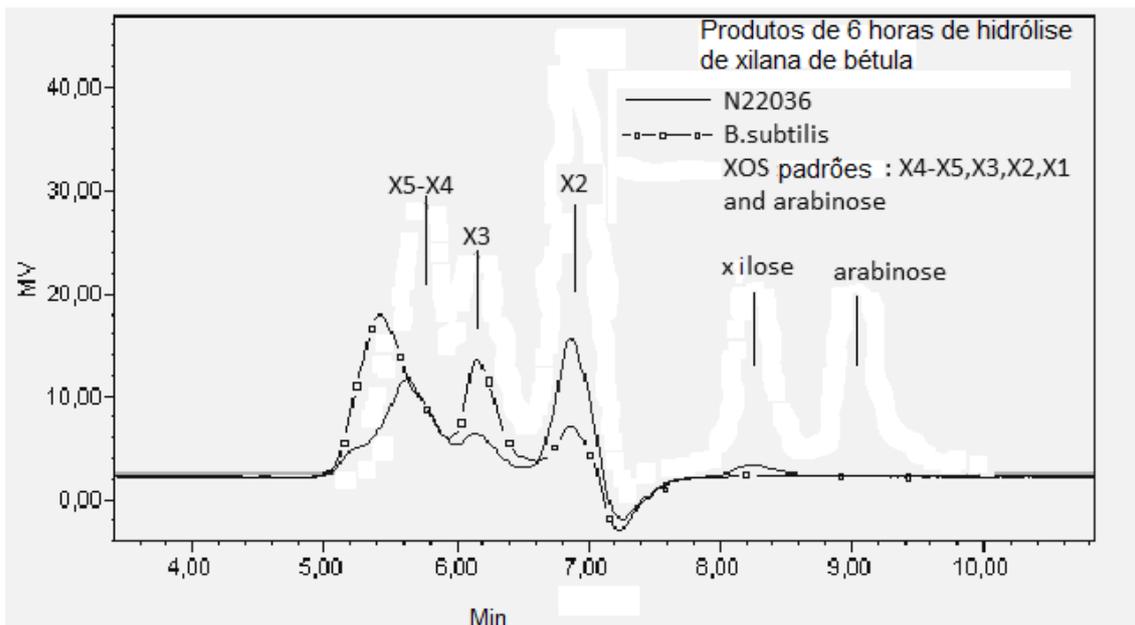


Figura 4.16. Cromatograma de produção de XOS durante primeiras 6 h de hidrólise de xilana de bétula com xilanases NS 22036 e X Bs (50°C pH 5,0).



Um estudo mais detalhado nos produtos gerados de hidrólise, analisando-se frações de XOS separadamente, pode trazer a tona outras características singulares das xilanases, demonstrando sua diversidade. Um exemplo nas diferenças catalíticas está demonstrado na tabela 4.8. Resultados da distribuição de XOS após 24 horas de reação sugerem que há uma tendenciada xilanase NS 22036 de gerar XOS principalmente em formas de xilobiose e xilotriose, enquanto que entre os produtos da xilanase cultivada de *B. subtilis*, a XBS há quase nenhuma agregação de xilotriose. De 6 a 24 horas de incubação enzimática, mais de 54% dos oligômeros de três unidades de xilose, ou seja, da xilotriose medida dentre os produtos da XBS presentes no tempo de 6 horas foi fracionada, por outro lado apenas 4,76% do X3 até então produzido com aplicação da NS 22036 foi hidrolisada.

Tabela 4.8. Porcentagem de XOS e xilose resultantes após 24 h de incubação enzimática de xilana de bétula (50°C, pH 5,5) com xilanases NS 22036 e XBS. Concentração em g/L e porcentagem de fração de xilotriose em % das xilanases citadas.

Enzima	NS 22036 xilanase		<i>Bacillus subtilis</i>	
<b>X4-X5</b>	18.1	39.6		
<b>X3</b>	28.2	11.3		
<b>X2</b>	53.25	48.05		
<b>xilose</b>	1.16	1.1		

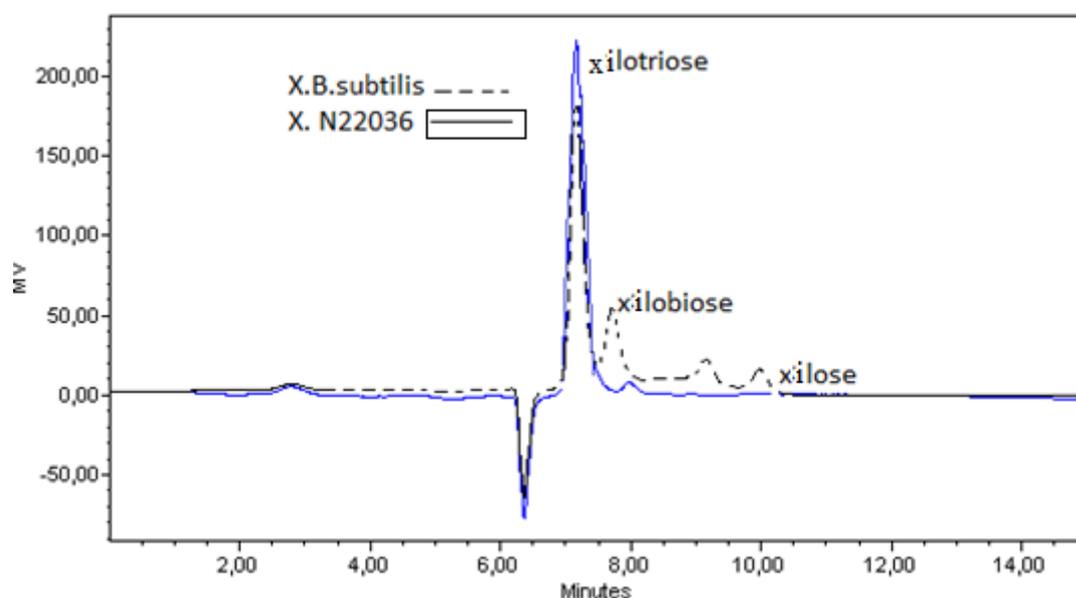
	N22036		X_ <i>B.subtilis</i>	
	após 6 h	após 24 h	após 6 h	após 24 h
<b>Xilotriose (g/L)</b>	3.36	3.2	1.95	0.88
<b>% de fracionamento entre 6 e 24 h</b>		4.76		54.87

Com base nos resultados, decidiu-se fazer uma investigação mais detalhada sobre a propriedade hidrolítica das xilanases de *B.subtilis* e NS 22036 quanto à hidrólise de xilotriose, visto que alguns autores observaram que a primeira enzima não é capaz de hidrolisar X3 (*Biely et.al., 1997; Wong et. al., 1988*). O cromatograma da Figura 4.17

apresenta os produtos de hidrólise de xilotriose incubada a 50 °C durante 60 minutos com as com xilanases X BS e NS 22036. Ocorreu a hidrólise de xilotriose em xilobiose e xilose no caso da xilanase X BS. O mesmo não foi observado para a xilanase Novozymes NS22036. Wong et. al., 1988 verificaram que não houve capacidade de clivagem de xilotriose por xilanases produzidas por duas linhagens da bactéria *Bacillus subtilis*, apesar da capacidade delas de hidrolisar arabinoxilana. Em outro estudo, Bernier et.al., 1983, observaram que houve um acúmulo de xilotriose, além xilobiose e uma pequena quantidade de xilose como produtos depois de uma incubação da 24 horas da enzima com a solução de xilana. Resultados deste trabalho demonstram outro comportamento, o que sugere que a xilanase produzida por esta linhagem de *B.subtilis* é sim capaz de romper xilotriose, gerando xilose e xilobiose. Além disso, muitas exceções também são mencionadas pelos autores. (Biely et.al., 1997; Wong et al, 1988). A xilanase de *B.subtilis* utilizada neste trabalho foi expressada em *Echerichia coli* e apresenta temperatura ótima de 55°C e faixa de pH ótimo entre os valores 6 a 6,5 (Ruller et.al., 2006).

Eletroforese em gel desta enzima não indica contaminação da preparação enzimática com celulasas, tais como as observadas e citadas por Subramaniyan e Prema, 2000.

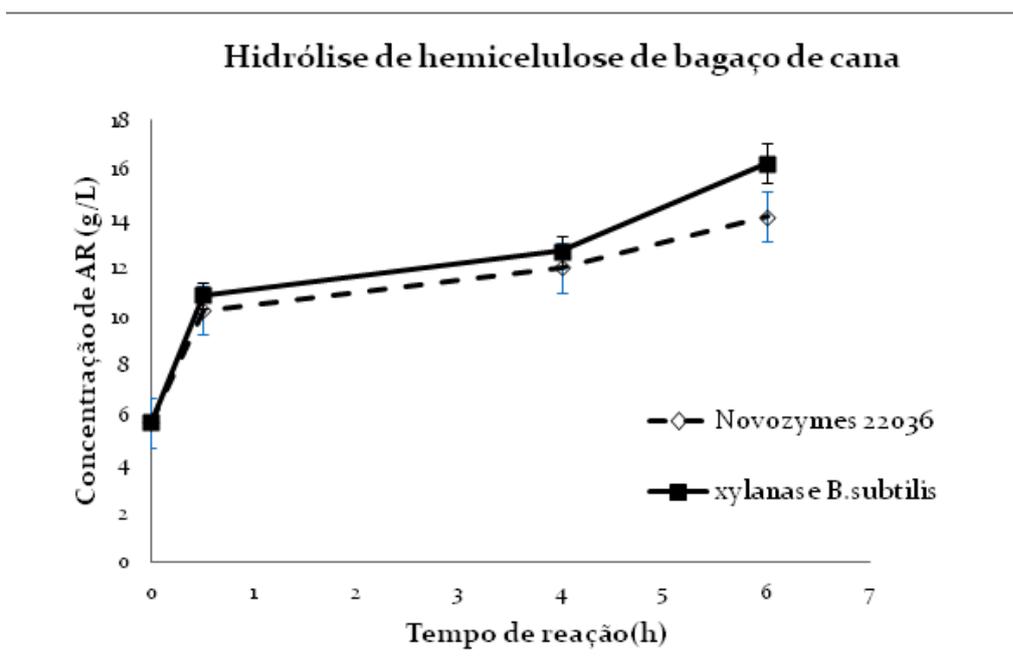
Figura 4.17. Produtos gerados nas hidrólises de xilotriose pelas enzimas X Bs e NS 22036 durante 60 min (50°C, pH 5,0)



#### 4.3.5 Aplicação da enzima selecionada para hidrólise de xilana do extrato solúvel obtido com realização de pré-tratamento organossolve de bagaço de cana de açúcar

As duas enzimas testadas na hidrólise de extratos solúveis de bagaço de cana obtidos após pré-tratamento organossolve. A reação foi monitorada durante seis horas com a quantificação de açúcares redutores, o que poderia estar diretamente relacionada à redução do grau de polimerização da xilana, e com a geração de XOS. Resultados são mostrados na Figura 4.18. Além disso, a distribuição de XOS durante hidrólise foi acompanhada por análises cromatográficas (mostrado apenas para a xilanase NS 22036 na figura 4.18). Com o tempo de reação, há uma significativa redução do grau de polimerização, dos oligômeros presentes na solução, indicando que a NS 22036 é uma xilanase específica na produção de XOS e baixa produção de xilose. Cabe destacar que, ao contrário do que ocorreu no capítulo anterior, quando se hidrolisou soluções extraídas pelo processo organossolve de pó de serra de madeira, que o substrato obtido de bagaço de cana de açúcar estava livre de lignina. Outra consideração a ser feita, é que o pH do solubilizado encontra-se na faixa correspondente ao pH ótimo da enzima, entre 4,5 e 6,0; informação esta fornecida pelo fabricante ([www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)). A temperatura de hidrólise também foi em torno da ótima, 55°C ([www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)).

Figura 4.18. Quantificação de açúcares redutores durante 6 horas de hidrólise de xilana com bagaço de cana de açúcar (50°C, ph 5.0).



Dentre as quatro endoxilanases analisadas, a xilanase produzida pela Genencor G XY mostrou-se a menos apta a gerar XOS, pois sua aplicação resultou em uma concentração elevada de monômeros. Enzimas adequadas poderiam ser as xilanases da NOVOZYMES NS 50014 e NS 22036. A primeira, no entanto, não mais está disponível comercialmente. A xilanase sintetizada por *B.subtilis* mostrou maior atividade catalítica na hidrólise de xilana de quando se deseja a xilotriose entre os produtos de hidrólise. O bagaço de cana de açúcar pode ser eficazmente pré-tratado pelo processo organossolve. Dentre as condições testadas, em que três graus de severidade foram empregados, as condições nas quais se obteve maior rendimento de extração de xilana com maior porcentagem de XOS totais solubilizados foi a 170°C por 60 min e com 50% de etanol. O extrato solubilizado nessas condições foi enzimaticamente hidrolisado com xilanases NS 22036 e xilanase de *B.subtilis*, que puderam gerar XOS sem produção elevada de xilose.

#### *4.4 Imobilização de xilanase selecionada NS 22036 e sua aplicação em bateladas repetidas na hidrólise de oligômeros obtidos por extração alcalina de xilana de bagaço de cana de açúcar*

Nesta última etapa do trabalho, a xilanase selecionada na seção 4.3 foi imobilizada utilizando-se protocolo desenvolvido na seção 4.1. Decidiu-se também testar um novo método de extração de oligômeros de xilana de bagaço de cana.. Foram assim testadas diferentes concentrações de NaOH e tempo na extração alcalina de xilana do bagaço de cana. O derivado enzimático foi utilizado na hidrólise desses oligômeros em sucessivas reações, visando estudo da estabilidade operacional da enzima.

Os resultados da sessão 4.3. mostraram que tanto a endo-xilanase NOVOZYMES NS 22036, quanto a *exilanas* de *B.subtilis* eram predominantemente endoxilanas e poderiam ser utilizadas. Decidiu-se,contudo, selecionar a enzima da NOVO para ser imobilizada em suporte gel agarose-glioxil, pois ela é uma enzima comercial e pode ser adquirida mundialmente inclusive para processos industriais.

A seção 4.2 discutiu vários processos possíveis a serem utilizados no pré-tratamento de biomassa.

Nesta seção, realiza-se a imobilização da xilanse e sua aplicação na hidrólise enzimática de hemicelulose extraída do bagaço de cana pelo tratamento com NaOH.

##### *4.4.1. Extração de xilana do bagaço de cana de açúcar com uso de NaOH*

A eficiência das diferentes condições de pré-tratamento alcalino para a extração de xilana de bagaço de cana foi determinada por três tempos de reação e três concentrações de NaOH, fixando-se a temperatura de 121° C. Resultados são apresentados na tabela 4.9. Melhores condições para a extração de XOS foram encontrados para 4%(m/ v) de NaOH e 60 min de reação, que rendeu  $52,97 \pm 2,13\%$  de extração, quase 100% como oligômeros (*Nascimento, 2010*).

Tabela 4.9. Eficiência de extração alcalina de xilana do bagaço de cana de açúcar e xiloligômeros totais obtidos, nas diferentes condições de tempo e concentração de NaOH, 121°C.

Tempo	NaOH% (w/v)	Eficiência de extração total de Xilana (%)	Fração extraída em forma de XOS (%)	Eficiência de extração de XOS (%)
60	4	55,6	99,7	55,43
60	4	52,0	99,6	51,79
60	4	51,9	99,6	51,69
90	7	40,4	99,7	40,27
90	1	25,9	98,0	25,38
30	7	50,0	99,6	49,80
30	1	27,8	97,6	27,13

O emprego de NaOH no pré-tratamento de biomassa lignocelulósica a altas temperaturas, ou seja, partir de 100°C, é realizado normalmente quando se deseja extrair lignina e a hemicelulose do resíduo lignocelulósico posteriormente hidrolisar a celulose e fermentar a celulose hidrolisada, seja ela com aplicação ou não de enzimas; para produção de etanol. O principal efeito desse tratamento é a deslignificação através da quebra de ligações éster entrecruzadas entre lignina e xilana, aumentando a porosidade da biomassa e redução da cristalinidade da celulose, permitindo que ela seja então hidrolisada por enzimas (*Tarkow e Feist, 1969*). Para esses fins, o tratamento alcalino com NaOH é o mais eficaz (*Mirahmadi, et.al., 2010*).

Silverstein et.al. 2007 realizaram a extração de xilana usando NaOH nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 % , tempos de tratamento de 30, 60 e 90 min e temperaturas de 90 e 121°C, obtendo melhor resultado de solubilização de xilana nas condições 2%NaOH, 90 min e 121°C, com 40% de extração. Mirahmadi et.al., 2010 utilizou temperaturas crescentes entre 0 e 100°C, concentrações de NaOH de 7% por 2 h. o aumento da

temperatura aumentou aumentou a extração fração de hemicelulose pôde ser extraída da porção sólida, alcançando seu máximo a 100°C.

A extração alcalina para produção de XOS é priorizada, quando se trabalha em condições brandas, com concentrações de NaOH menores do que 4% e em baixas temperaturas, normalmente abaixo de 60°C ou em temperatura ambiente. As vantagens de se empregar esse método para a extração de xilana para produção de XOS são a alta extração de hemicelulose alcançada, alta remoção da lignina e aumento da digestibilidade da celulose com baixa produção de compostos inibidores. O processo mais empregado é o uso de NaOH ou KOH em concentrações de 1 a 5 mol/L a temperaturas entre 25 e 60°C (Yoon *et.al.*, 2006, Nabarlantz, 2007). É um processo indicado para extração a da xilana com posterior hidrólise enzimática para a produção de xilo-oligosacarídeos, sendo citado por vários autores (Aachary e Prappula, 2000; Brienzo *et.al.*, 2010; Ai *et.al.*, 2005). Akpinar *et al.* 2007 utilizaram concentrações de 24% de KOH para a extração de xilana de talo de algodão a 35°C 3 h e obteve uma concentração 0,4g de xilana em 2g de substrato..

#### 4.4.2. Atividade enzimática após etapas de diálise e aminação

Na sessão 4.1 deste trabalho, cujos resultados se encontram artigos publicados (Manrich *et al*, 2010) obteve-se uma grande melhora na estabilidade térmica da xilanase NS 50014 após a aminação química. Neste sentido, a mesma estratégia foi utilizada para imobilização de xilanase NS 22036. Este procedimento requer um passo adicional de diálise para separar o excesso de reagentes de aminação (etilenodiamina e EDAC). Além disso, a imobilização da enzima elimina substâncias protetoras adicionados na formulação comercial para que a sua estabilidade de estocagem seja aumentada. Portanto, para a avaliação da eficiência de um método de imobilização, a enzima imobilizada deve ser comparada com a enzima dialisada solúvel (isenta de preservantes). No entanto, ambos, aminação e diálise podem afetar a atividade da enzima. Na tabela 4.10a são mostrados os valores de atividade das preparção enzimática de xilanase solúvel medida antes e depois dos processos de diálise e / ou aminação. Os resultados mostram que as condições experimentais usadas aqui levaram a uma elevada inativação enzima. De fato, ocorreu uma perda de atividade catalítica comparável a observada para a xilanase NS 50014. Este efeito pode ser reduzido pela mudança das condições utilizadas na aminação, como concentração de EDA e tempo de reação;

adição de inibidores competitivos da enzima, que venham a proteger seu sítio ativo durante a reação e pelo uso de outros agentes de proteção. Este passo deve ser otimizado, se realmente for verificado que a aminação melhora a imobilização / estabilização da enzima. Por outro lado, foi observado anteriormente para a xilanase NS 50014, que o uso de agente protetor não afetou a reação, devido ao efeito protetor do PEG.

Além disso, pode ser visto que a diálise aumenta a atividade enzimática específica (UI/mg de proteína) do derivado. Isso ocorre porque muitas substâncias adicionadas durante a formulação da enzima comercial, visando a sua preservação e proteção contra a contaminação de microrganismos são eliminados durante a diálise, na qual permite uma interação mais efetiva da proteína da enzima com o suporte. Em consequência, melhores resultados de imobilização podem ser esperados.

Tabela 4.10a. Valores de atividade da xilanase N22036 antes e depois das etapas de diálise e/ou aminação.

	Atividade enzimática inicial (UI/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade enzimática específica (UI/mg)	Atividade enzimática relativa
Enzima comercial	1260	19.0	66.3	1
Enzima aminada-dialisada	390	7.3	53.4	0,81
Enzima dialisada	970	8.0	121.3	1,8

#### 4.4.3. Imobilização da xilanase

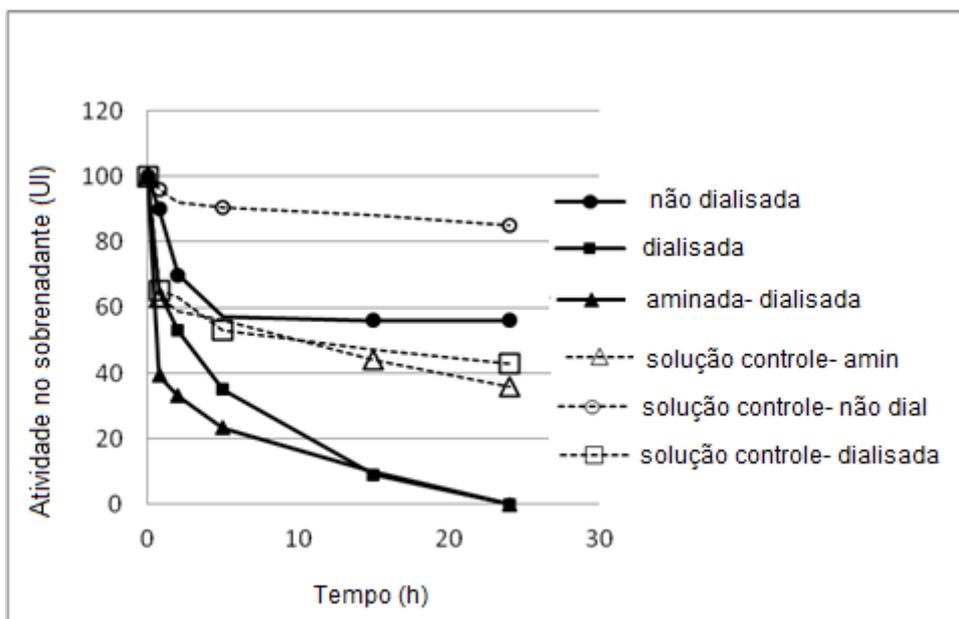
Xilanases comercial, dialisada e aminada-dialisada foram então incubadas por 24 h para serem imobilizadas em géis glioxil-agarose altamente ativadas. A Figura 4.19 mostra a cinética de imobilização de enzimas. Parâmetros de imobilização obtidos são mostrados na Tabela 4.10b. Como pode ser visto na Figura 4.19, enzima dialisada e enzima aminada /dialisada imobilizada são mais rapidamente imobilizadas do que a comercial.

Tabela 4.10b. Parâmetros de imobilização da xilanase em agarose-glioxil, em pH 10.05, 25°C, e 24 h de reação.  $A_{of}$  = carga enzimática oferecida;  $A_t$  = unidades de enzima teoricamente imobilizada;  $Y_{IU}$  = Rendimento de imobilização da atividade;  $A_{der}$  = atividade da enzima imobilizada ; AR = atividade recuperada.

Enzima	$A_{of}$ (UI/g <sub>gel</sub> )	$Y_{IU}$ (%)	$A_t$ (UI/g <sub>gel</sub> )	$A_{der}$ (UI/g)	AR (%)
Não-dialisada	340	40	136	100	73,5
Dialisada	280	100	280	246	87,8
Aminada/ dialisada	267	100	280	282	100

Os parâmetros de imobilização calculados mostrados na Tabela 4.10b também indicam que toda a enzima dialisada oferecida pôde ser imobilizada e está ativa em sua forma de derivado contendo enzima imobilizada. Por outro lado, apenas 40% da atividade da enzima comercial que foi oferecida ao suporte foi imobilizada, ocorrendo desaparecimento de 73% da enzima do sobrenadante medida sob a forma imobilizada (derivado). Portanto, uma imobilização muito mais eficaz pôde ser realizada com xilanase aminada e/ou dialisada. A separação dos agentes de proteção que competem com os grupos reativos de enzima que irão se ligar ao suporte permite a formação de um maior número de bases de Schiff entre enzima e suporte. Em consequência, etapas de aaminação e diálise conduziu não só ao maior rendimento de imobilização e atividade recuperada, mas também pode promover a obtenção de um derivado mais estável.

Figura 4.19: Cinéticas de imobilização das xilanases commercial, dialisada e aminada-dialisada.

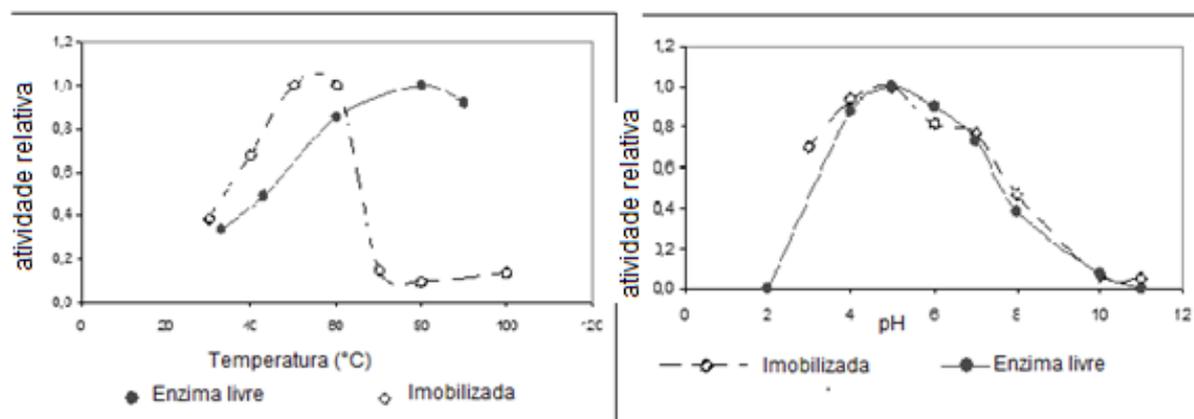


#### 4.4.4. Influência da temperatura e do pH na atividade enzimática da xilanase solúvel e xilanase imobilizada

A influência de alteração de pH da temperatura sobre a atividade catalítica da xilanase foi investigada variando-se as condições de incubação para as enzimas em sua forma comercial solúvel (sem remoção de preservantes) e sua forma comercial imobilizada, sem prévia diálise. Resultados estão mostrados nas figuras 4.20a e 4. 20b. Observe-se que, enquanto perfis de temperatura demonstraram uma grande diferença entre a xilanase solúvel e a imobilizada, Entretanto, o valor ótimo de pH não foi afetado pelo processo de imobilização.. A atividade da xilanase solúvel foi sempre determinada na presença das substâncias que agem como protetores da enzima. Isso explica os resultados obtidos para os perfis de temperatura. Temperatura de atividade máxima da enzima solúvel foi de de 80 C, maior que a verificada para a enzima imobilizada, entre 50 e 60° C. Quando a enzima é imobilizada sem etapas anteriores de aminação e diálise, poucas ligações são formadas entre a enzima e o suporte. A enzima é ligada ao suporte em apenas restritos pontos, devido a concorrência dos agentes de proteção da solução enzimática comercial com grupos reativos do suporte, mas também devido ao fato de que os grupos reativos presentes na superfície da enzima (grupos amino dos aminoácidos lisina) encontram-se em número mais baixo e insuficiente . O pH de

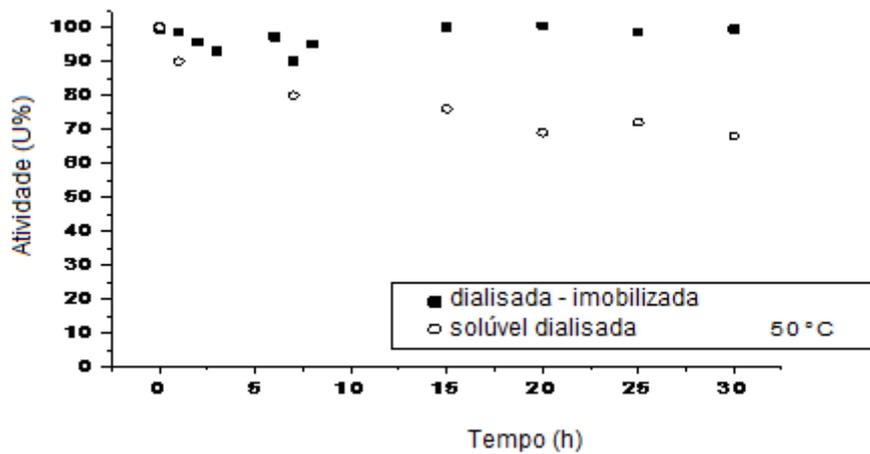
atividade máxima, 5,0, é o mesmo tanto para enzima solúvel quanto para a imobilizada, não sendo afetada nem pela presença de agentes de proteção, nem pelo processo de imobilização. Estes resultados confirmam a necessidade de aminação da enzima para que um aumento da estabilidade térmica do derivado seja alcançado.

Figura 4.20a e 4.20b. Perfis de temperatura e pH das xilanases NS 22036 comercial livre e xilanase NS 22036 comercial imobilizada.



Figuras 4.21a mostra as atividades residuais da xilanase dialisada e em seguida imobilizada (sem aminação química) e da xilanase solúvel dialisada, após a incubação em pH 5,0, a 50 °C, por 30 h. Pode-se observar que a enzima imobilizada manteve quase 100% da sua atividade durante 30 h, enquanto a forma solúvel / dialisadas perdeu 30% de sua atividade inicial nas condições de incubação. Este resultado confirma os anteriores (influência da temperatura no perfil de atividade enzimática), demonstrando que a ausência dos agentes de proteção diminui a estabilidade térmica da enzima. Além disso, já era esperado um aumento na estabilidade térmica da enzima dialisada imobilizada. A fim de comparar as meias-vidas das formas solúvel e imobilizada a temperatura de incubação foi então aumentada para 70 °C. A Figura 4.21b mostra os resultados.

Figura 4.21a. Inativação térmica da xilanase solúvel dialisada e xilanase dialisada-imobilizada a 50°C pH 5,0.



Os resultados mostrados na Figura 4.21b permitem observar claramente o aumento de estabilidade térmica que foi alcançado pela xilanase depois de ser imobilizada, quando comparada com a rápida inativação térmica que acontece com a xilanase solúvel dialisada. A 70 °C, processos de aminação e diálise subseqüenciais à imobilização de xilanase resultam em um fator de estabilização de 120 vezes, com um  $\tau_{1/2}$  de 24 h. Xilanase solúvel dialisada apresentou uma desativação rápida, com  $\tau_{1/2}$  de 11 min. Modificação química da enzima para introduz grupos amina na superfície da proteína na qual perme o aumento do número de ligações covalentes entre enzima e suporte, o que explica o resultado obtido.

Figura 4.21b. Inativação térmica da xilanase solúvel dialisada e xilanase dialisada-imobilizada a 70°C pH 5,0.

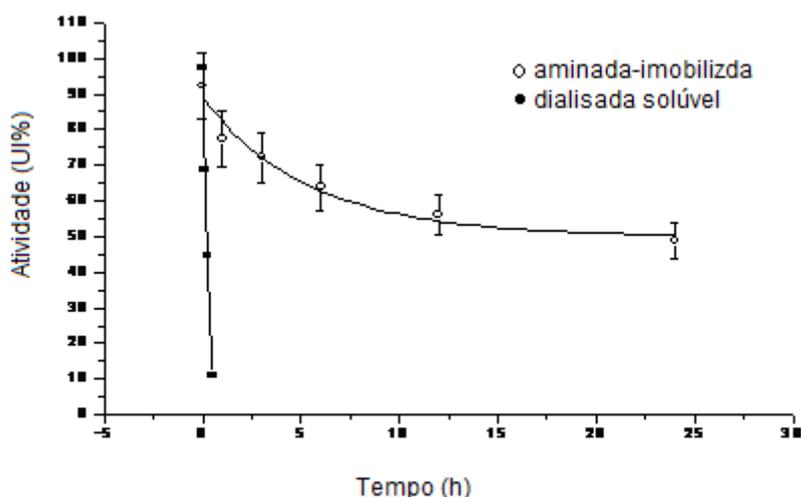


Figura 6b

Foi mostrado na sessão 4.1, que a estabilidade térmica alcançada pela xilanase NS 50014 pela mesma seqüência de operações foi capaz de aumentar sua estabilidade para um  $\tau_{1/2}$  de 30 horas a 70°C, um período superior ao alcançado pela xilanase NS 22036. Vale destacar que a forma solúvel dialisada da NS 50014 demonstra ser mais estável nesta temperatura de incubação. Seu  $\tau_{1/2}$  é de 45 min. Com isso, sua forma imobilizada é mais estável e poderia alcançar maiores tempos de operação ou poder ser reutilizada por um maior número de ciclos de reação do que a forma imobilizada da NS 22036. O fator de estabilização, porém, é menor. O derivado de xilanase NS 50014 é 40 vezes mais estável do que a sua forma dialisada solúvel, enquanto que o derivado da NS 22036 é 120 vezes mais estável do que sua forma dialisada solúvel.

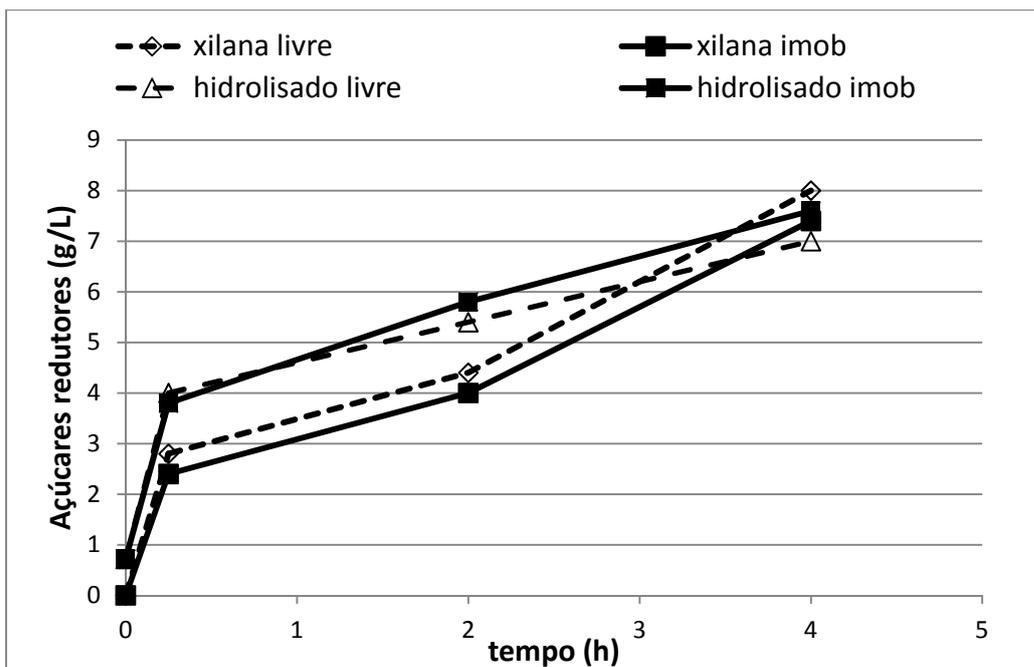
Outras estratégias de imobilização de ambas as xilanas podem ser ainda testadas para se tentar aumentar ainda mais a estabilidade térmica de ambas as enzimas, entretanto, a xilanase NS 50014 não mais é produzida pela indústria dinamarquesa NOVOZYMES, sendo comercialmente substituída pela NS 22036.

O derivado de xilanase que obteve a maior estabilidade foi utilizada para hidrolisar xilana extraída do bagaço de cana, usando o pré-tratamento com NaOH. A enzima foi mantida em contato com o substrato após o ajuste de pH para 5,0 com 72% (v / v) de ácido sulfúrico. Com isso, parte da lignina precipitou e foi separada por centrifugação.

Não ocorre, porém, uma clarificação da solução, como observada no capítulo 4.3, quando o substrato extraído depois do pré-tratamento com organossolve foi totalmente seco a temperatura ambiente e novamente suspenso em água pura. A turbidez da solução infere à presença de lignina remanescente.

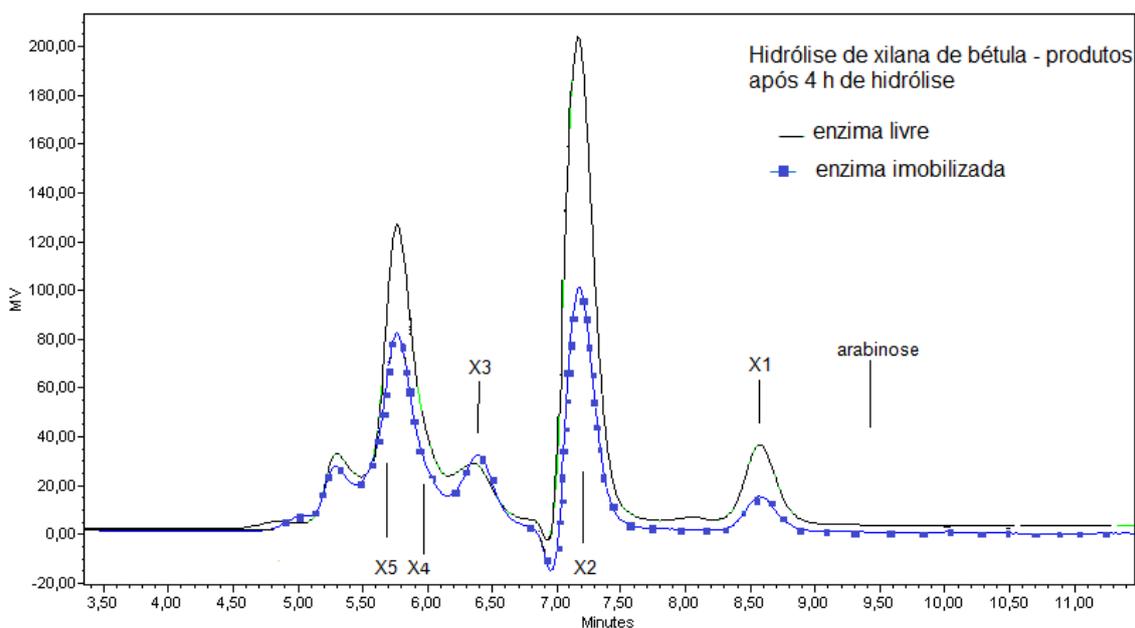
Reações ocorreram a 50 ° C com uma carga de 20 UI de enzima por grama de substrato em 5 ciclos. No último ciclo, as concentrações de açúcares redutores foram acompanhadas durante 4 h e os resultados são mostrados na Figura 4.22., A velocidade de reação para xilanase solúvel foi maior do que para a enzima imobilizada no caso da hidrólise de xilana de bétula e também no caso da hidrólise da xilana extraída de bagaço.. Efeitos de difusão poderiam explicar esse resultado. Utilizando-se então o substrato extraído de bagaço de cana, a velocidade de reação de ambas as formas da enzima são inicialmente iguais e depois de transcorrido um determinado tempo de reação, a enzima imobilizada apresenta um melhor desempenho catalítico do que a forma solúvel. Os ensaios de desativação térmica indicam que neste caso certamente não deve ter havido perdas de atividade devido ao efeito de temperatura e pH do meio de reação. A leitura de açúcares redutores, no entanto, não necessariamente representa a concentração de XOS na solução, pois engloba também açúcares de cadeia mais longas, que, em meio básico, contenham um grupo redutor (aldeído ou cetona). As leituras mais altas de AR pode simplesmente significar um maior rompimento de cadeias oligoméricas do substrato. Mesmo assim, a diferença de concentração desses açúcares gerados pela enzima livre e a imobilizada depois de transcorridas 4 horas de reação é pequena.

Figura 4.224. Concentração de açúcares redutores (g/L) medidos durante hidrólise enzimática dos diferentes substratos a 50°C pH 5,0 por 4 h.



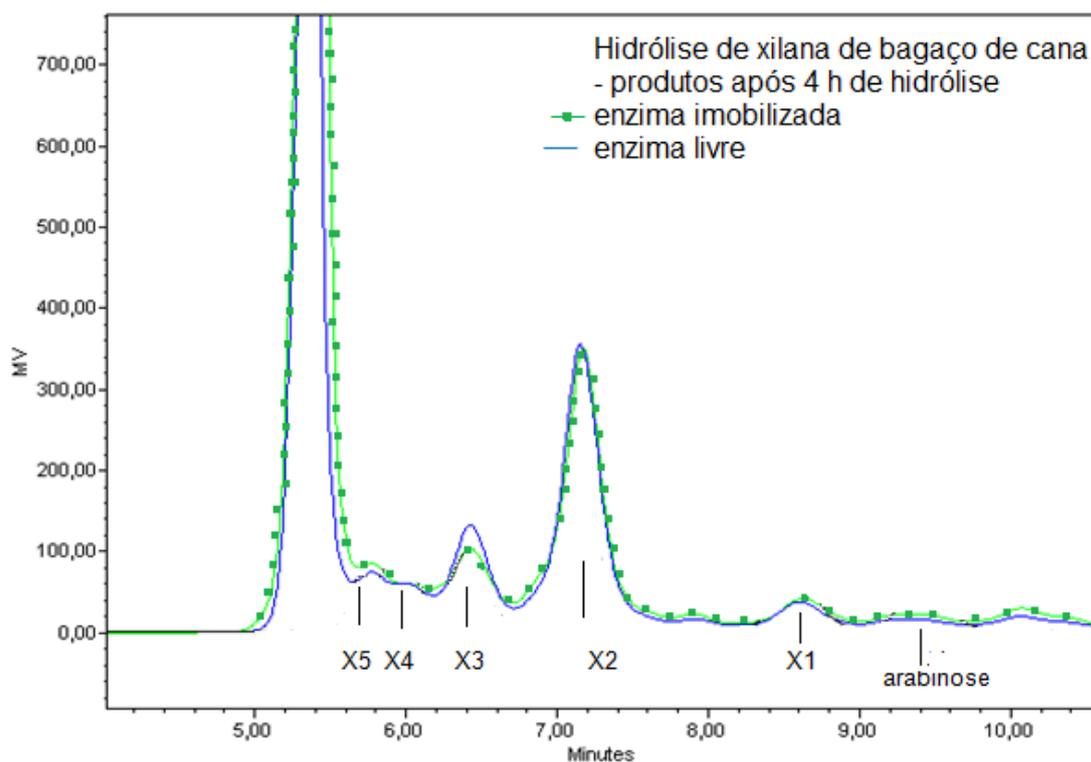
Cromatogramas das figuras 4.23 e 4.24 apresentam perfis de XOS gerados após 4h de hidrólise de xilana de bétula usando enzimas solúvel (Figura 4.23) e de xilana de bagaço de cana (Figura 4.24.6), utilizando xilanase imobilizada NS 22036.

Resultados da Figura 4.23 demonstram a formação de XOS a partir de xilana de bétula hidrolisada pela enzima solúvel e com a enzima imobilizada. Após 4 horas de reação a concentração xilana é muito baixa e a leitura de AR está condizente com a análise cromatográfica, porque a maior parte do substrato já é encontrada na forma de XOS de mais alto grau de polimerização. Concentrações de XOS; xilanase solúvel; X5-X4: 4,1; X3:1,3; X2: 3,0; xilose: 0,8; xilanase imobilizada; X5-X4: 2,6; X3:1,2; X2: 2,1; xilose: 0,4. Figura 4.23. Cromatograma com perfis de XOS gerados após 4 horas de hidrólise de xilana de bétula com xilanase NS 22036 solúvel e imobilizada.



A figura 4.24 mostra a distribuição de tamanho de oligômeros após 4 horas de reação catalisada pela xilanase imobilizada. Devido ao tratamento alcalino do bagaço de cana, a distribuição da massa molecular do substrato é diferente da encontrada na xilana comercial de bétula, pois a extração com uso de NaOH causa hidólise de cadeias de hemicelulose, sendo que a concentração de xilobiose (X2) no substrato de bagaço é de 2,5g/L, de xilose de 0,6g/L e de arabinose 0,31g/L. Ocorre a produção de XOS e apenas uma pequena produção de xilose pode ser visto por xilanases tanto solúvel (X5-X4: 3,13; X3:4,0; X2:6,1; xilose:1,1 g/L) quanto imobilizada (X5-X4: 2,46; X3:2,6; X2:4,13; xilose:1,1 g/L).

Figura 4.24. Cromatograma com perfis de XOS gerados durante 4 h de hidrólise de xilana extraída de bagaço de cana de açúcar usando xilanase NS 22036 livre e imobilizada.



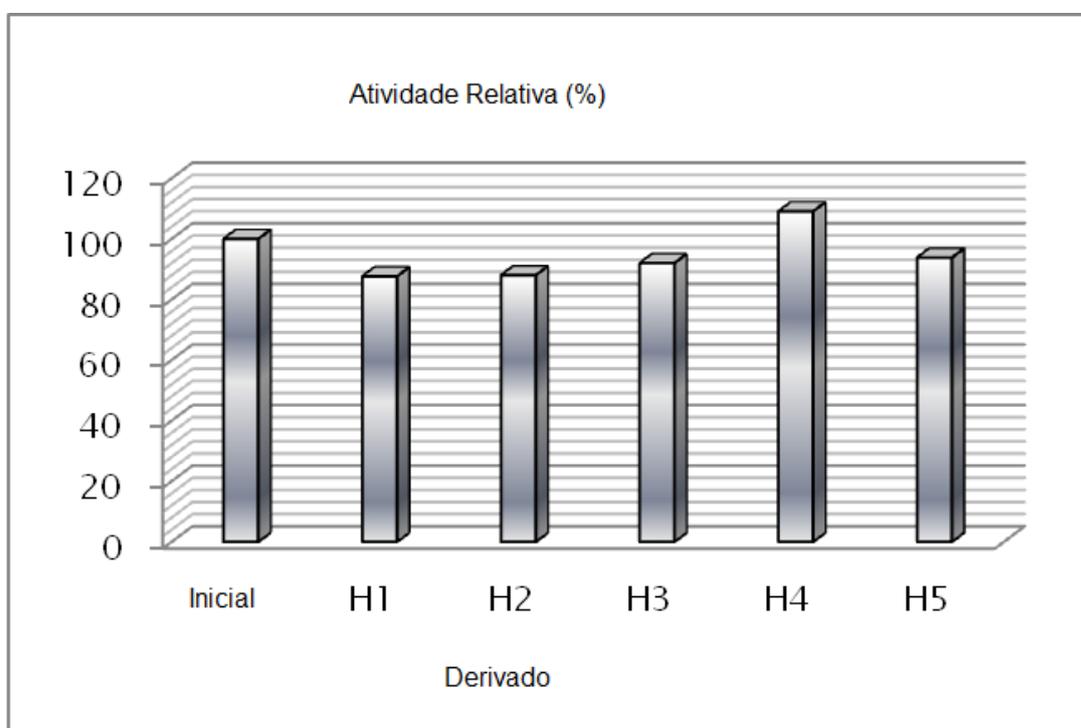
Assim como ocorrido na hidrólise da xilana, depois de transcorridas 4 horas de hidrólise do bagaço de cana, a concentração de XOS produzidos pela xilanase livre é maior. Mesmo assim, existe produção alta de XOS pela enzima imobilizada. A análise cromatográfica (e a leitura de açúcares redutores, mostrada na figura XX) demonstra que a reação ainda não foi finalizada, porque existe um pico de alta concentração representando xilana ainda não hidrolisada.

Aachary e Prappula (2009) utilizaram xilanase de *A.oryzae* MTCC 5154 por 42 h com carga enzimática de 14 U/mL de solução extraída da espiga de milho após pré-tratamento alcalino com 2% NaOH. Brienzo et.al., 2010 extraiu hemicelulose de bagaço de cana de açúcar com tratamento alcalino utilizando 6% de peróxido de sódio a 20°C por 4 horas. A solução extraída no pré-tratamento foi enzimaticamente hidrolisada a 50°C por 96 h com adição de xilanase de *Thermoascus aurantiacus* em cargas enzimáticas variando entre 40 e 80 U/g de substrato. Em ambos os casos, apesar de ter ocorrido boa solubilização da hemicelulose, o tratamento enzimático levou a geração de uma concentração alta de xilose além de XOS.

Isso significa que nem toda xilanase, disponível comercialmente ou não, pode ser aplicada na hidrólise enzimática de xilana para produção de xilo-oligosacarídeos e que de fato a seleção da enzima para o processo é fundamental. Sem esse passo, o objetivo deste projeto poderia não ter sido alcançado por completo. Figura 4.25 mostra a alta

estabilidade operacional da xilanase imobilizada, que manteve quase 100% de sua atividade após 5 ciclos de reação. Não houve variação superior a 10%, o dobro do valor correspondente ao erro calculado da determinação de atividade, de 5%. Portanto, a viabilidade de produção de XOS a partir de xilana extraída do bagaço de cana por tratamento alcalino e usando xilanase imobilizada é claramente demonstrada. Por outro lado, para se determinar a viabilidade econômica da produção de XOS usando xilanase imobilizada, mais estudos ainda são necessários, principalmente otimizações da etapa de aminação enzima e reação de hidrólise.

Figura 4.25. Recuperação enzimática do derivado de xilanase NS 22036 depois de cada ciclo de hidrólise por 4 h a 50°C pH 5,0.



## 5. Conclusões principais deste trabalho

Aplicação de diferentes pré-tratamentos de material lignocelulósico solubilizou eficientemente a fração hemicelulósica, mesmo que com distintos rendimentos, para posterior hidrólise enzimática focada na produção de xilo-oligossacarídeos. Conseguiu-se selecionar e imobilizar uma endo-xilanase comercial adequada para o tratamento e sua imobilização fez aumentar sua estabilidade térmica. O trabalho foi dividido em quatro capítulos e as conclusões principais encontram-se listadas abaixo:

- A imobilização da xilanase comercial NOVOZYMES 50014 em agarose-glioxil 10 BCL não resultou em sua estabilização térmica. A aminação, com a introdução de grupos reativos amino na superfície da enzima foi realizada e isso implicou na inativação da enzima. Na tentativa de reduzir essa perda, foi utilizado PEG como protetor da enzima. O PEG, no entanto, prejudicou a eficiência de estabilização alcançada pela enzima imobilizada, que foi menor do que quando não se usou o protetor. A xilanase imobilizada aminada sem uso de PEG resultou em um fator de estabilização de 40 vezes em relação a enzima solúvel dialisada.

- A faia apresentou uma composição mais rica em hemicelulose do que a outra madeira e foi selecionada para ser pré-tratada por processo hiderotermal com emprego de radiação micro-ondas em diferentes condições de temperatura e tempo; e processo organossolve a 180°C por 60 min 50% de etanol . Através do micro-ondas e alta temperatura, ocorreu perda de açúcar, o que indica que esse pré-tratamento é menos indicado do que o organossolve, onde se extraiu 45% de hemicelulose da matéria prima, 90% em forma de oligômeros. O extrato solubilizado foi eficientemente hidrolisado pela xilanase imobilizada NS 50014 fornecendo elevadas concentrações de XOS com baixa produção de xilose.

- A partir da análise do perfil hidrolítico de quatro xilanases diferentes foi possível observar diferenças entre elas. A xilanase Genencor GXY produziu, pela hidrólise de xilana de bétula, grandes concentrações de xilose, enquanto que as xilanases NOVOZYMES 22036 e a xilanase sintetizada pelo *B.subtilis* produziram altas concentrações de XOS e baixas concentrações de xilose. O bagaço de cana de açúcar pré-tratado por processo organossolve com aplicação de três graus de severidade diferentes conseguiu solubilizar 43% da hemicelulose da matéria prima, quase

totalmente em forma de oligômeros, em condição ótima de tratamento (170°C, 60 min, 50% de etanol, G.S. 5,1). A fração solubilizada do bagaço de cana hidrolisada com xilanase NS 22036 resultou produção de XOS.

- O pré-tratamento alcalino com 4% de NaOH (m/ m) por 60 min a 121°C foi eficaz para se extrair 53% da xilana de bagaço de cana de açúcar numa fração de aproximadamente 100% de oligômeros. A xilanase NS 22036 foi imobilizada em gel de agarose-glioxil 6 BCL depois de realizado sua aminação. Esta etapa foi novamente responsável por perdas de atividade, porém resultou em aumento de 120 vezes da estabilidade da xilanase, comparada com a enzima solúvel dialisada. A enzima imobilizada foi aplicada para hidrolisar o extrato solúvel do bagaço por cinco ciclos consecutivos de 4 horas a 50°C e pH 5,0, e foi eficiente na geração de XOS. A enzima imobilizada pôde ser recuperada e manteve sua atividade enzimática depois da sequência de operações.

*Sugestões para trabalhos futuros:-* A etapa de aminação que precede a imobilização multipontual em agarose-glioxil deve ser melhorada. Devem ser testadas diferentes condições, alterando-se concentração de reagente e de catalisador, bem como tempo de reação; acompanhando-se o efeito dessas alterações sobre o fator de estabilização da enzima imobilizada.

- Etapas seguintes à obtenção de xilo-oligossacarídeos de materiais lignocelulósicos utilizando xilanase imobilizada devem ser realizadas, que são: purificação dos XOS, obtenção destes em forma de cristais e realização de análises *in vitro* e *in vivo* de suas propriedades, para que assim o material obtido seja reconhecido como ingrediente prebiótico.

## 6. Referências Bibliográficas

Aachary, A.A.; Prapulla,S.G (2009); Value addition to corncob: Production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154 Bioresource Technology 100(991–99).

Aachary, A.A.; Prapulla,S.G (2011); Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 10(2-6).

Adelsberger, H.; Hertel, C., Glawisching, E.; Zverlov, W.V.; Schwarz, W.H.(2004); Enzyme system of *Clostridium stercorarium* for hydrolysis of arabinoxylan: reconstitution of the in vivo system from recombinant enzymes. Microbiology 150 (2257-2260).

Adriano, W. S., Mendonça, D. B., Rodrigues, D. S., Mammarella, E. J., Giordano, R. L. C. (2008). Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotrypsin. Biomacromolecules, 9(2170–2179).

Ai, Z., Jiang, Z., Li, L., Deng, W., Kusakabe, I. , Li H.(2005); Immobilization of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xylo-oligosaccharide production. Process Biochemistry 40,8 (2707-2714).

Akpınar, O.; Gunay, K.; Yılmaz, Y.; Levent, O.; Bostancı, S.(2010); Enzymatic processing and antioxidant activity of agricultural wastes autohydrolysis liquors. Bioresource 5,2(699-711).

Akpınar, O.; Kavas, A.; Bakir, U.; Yılmaz,L.(2007) Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks. J.Agric.Food Chem. 55(5544-5551).

Araque E, Parra C, Freer J, Contreras D, Rodrigues J, Mendonça R, Baezy J (2008) Evaluation of organosolve pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D.Don to ethanol. Enzyme Microb.Technol.43(214-219).

Arato,C., Pye,E.K. and Gjennestad,G. (2005); The lignol approach to biorefinery of wood bionmass to produce ethanol and chemicals. Applied Biochemistry and Biotechnology 121-124(871-882).

Bailey, MJ; Biely, P; Putanen, K; (1992); Interlaboratorial testing of methods for assay of xilanase activity. Journal of Biotechnology 23(257-270).

Banerjee, R.; Pandey, A. (2002). Bio-industrial applications of sugarcane bagasse: a technological perspective. International Sugar Journal, Glamorgan 104,1238(64-67).

Beg, Q.K.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal G.S.(2001), Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl.Microb.Biotechnol 56(326- 338).

Benzie, I. F.F.; Strain; J.J.(1999); Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in Enzymology, Oxidants and Antioxidants Part A, 299(15–27).

Bernier Jr, R.; Desrochers, M.; Jurasek, L.; Paice, M.G.(1983) Isolation and Characterization of a Xylanase from Bacillus subtilis. Appl. Environ. Microb. 46,2(511-514).

Blanco R.; Guisán J.M.(1989); Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. Enzyme Micorb. Technol. 11 (360-366).

Borrega, M.; Nieminen, K.; Sixta, H. (2011); Degradation kinetics of the main carbohydrates in birch wood during hot water extraction in a batch reactor at elevated temperatures; Bioresource Technology; 102 (10724–10732).

Bradford, M.M. (1976); A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72,1-2, (248-254).

Brienzo, M.; Carvalho, W.; Milagres, A.M.F.(2010); Xylo-oligosaccharide production from alkali-pretreated sugacane bagasse using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. Appl.Biochem.Biotechnol. 162(1195-1205).

Bryjak, J; Kolarz, B.N.(1998); Immobilization of trypsin on acrylic copolymers. *Process Biochemistry* 33, 4(409-417).

Campbell, J.M., Fahey Jr, G.C., Wolf, B.W. (1997). Selected Indigestible Oligosaccharides Affect Large Bowel Mass, Cecal and Fecal Short-Chain Fatty Acids, pH and Microflora in Rats. *J. Nutr.* 127,1(130-136).

Cano A, Palet C, (2007) Xylooligosaccharide recovery from agricultural biomass waste treatment with enzymatic polymeric membranes and characterization of products with MALDI-TOF-MS. *J. Membrane Sci.* 291(96-105).

Cherry, J.R., Fidantsef, A.L.(2003); Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(438–443).

Christakopoulos, P.; Katapois, P.; Kalogeris, E.; Kekos, D.; Macris, B.J.; Stamatis, H.; Skaltsa, H.(2003); Antimicrobial activity of acidic xylo-oligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxylanases. *Int. J. Biol. Macromol* 31(171-175). Endo- $\beta$ -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.* 57 (151-166).

Chum, H.L.; Johnson, D.K.; Black, S.K.; Overend, R.P.(1990); Pretreatment-Catalyst effects and the combined severity parameter. *Appl. Biochem. Biotech.* 24-25,1 (1-14).

Cleantech magazine (2010), Low cost enzymes could catalyse a revolution in ethanol production, *Cleantech magazine*, March/April 2010. Copyright Cleantech Investor Ltd (<http://www.cleantechinvestor.com/portal/bioenergy/5164-enzymes.html>).

Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G.(2005); Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology reviews* 29(3-23).

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento. Brasília: Conab, janeiro, 2011. 19 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>. Acesso em 05 de fevereiro de 2011.

Darlymple, BP; Cybinski, DH; Layton, I; McSeeney, CS; Kue, GP; Swadling, YJ; Lowry, JB (1997); Three *Neocallimastix patriciarum* esterases associated with the

degradation of complex polysaccharides are members of a new family of hydrolases; *Microbiology* 143(2605-2614).

Dhiman, S.S.; Scharma, J.; Battan, B.(2001); Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review. *BioResources* 3,4(1377-1402).

Dhiman, SS; Sharma, J; Buttan, B (2008); Industrial application and Future Prospects of Microbial xXylanases: a Review; *Bioresources* 3,4(1377-1402).

Dominguez, R; Soucheon, H; Spinelli, S; Dauter, Z; Wilson, KS; Chouvauk, S; Beguin,P; Alziari, AM (1995); A comon proetin fold and similar active site in two distinct families of  $\beta$ -glucanases; *Nat.Struct. Biol.*2,5(569-576).

Dumon, C.; Song, L.; Bonzonnet, S.; Fauré, R.; O'Donohue, M.J.(2011); Progress and future prospective for pentose-specific biocatalysts in biorefining. *Process Biochemistry*.

Ebringerov', H.; Hromádková, Z.; Kůst'álová, Z.; Sasinková, V.(2008); Chemical valorization of agricultural by-products: isolation and characterization of xylan-based antioxidants from almond shell biomass. *Bioresource* 3,1(60-70).

Fernández-Lafuente, R.; Rosell, C.M; Alvaro, G; Guisán, J.M. (1992); Immobilization-stabilization of penicillin G acylase from *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, (489–495).

Gavrilescua, M; Chistib Y (2005). *Biotechnology- A Sustainable Alternative for Chemical Industry*; *Biotechnology Advances* 23(471–499)

Gibson, G.R.; Probert, H.M.; Lo, J.V.; Rastall R.A.; Roberfroid, M (2004); Dietary modulation of human colonic microbiota: uptading the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews* 17(259-275).

Gibson, G.R.; Roberfroid, M(1995); Dietary modulation of human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125(1401-1412).

Godin B, Ghysel F, Agneessens R, Schmit T, Gofflot S, Lamaudiere S, Sinnaeve G, Goffart JP, Gervin PA, Stilmant D, Delcarte J (2010) Détermination de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine et des cendres dans diverses cultures lignocellulosiques

dédiées à la production de bioéthanol de deuxième génération. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14(S2):549-560

Grosser (2006) Das Holz der Pappel Beiträge zur Schwarzpappel, Bayerische Forstverwaltung 52(56-62).

Grous WR, Converse AO, Grethlein HE (1986) Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. *Enzyme Microb. Technol.* 8(274-280).

Guisán, J.M.(1988); Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes, *Enzyme Microb. Technol.* 10 (375–382).

Gullón, P.; Salazar, N.; Munoz, M.J.; Gueimonde, M.; Ruas-Madiedo, P.; Reyes-Gavilán, C.G.; Parajó, J.C. (2011); Assessment on the fermentability of Xylooligosaccharides from rice husks; *Bioresources* 6,3(3096-3114).

Hoare, D.G, Koshland, D.E.(1967); A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 242, (2447–2453).

[http://opensourceecology.org/wiki/Green\\_Chemistry](http://opensourceecology.org/wiki/Green_Chemistry)

Iiyama K., Wallis, A.F. A. (1990); Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure; *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 51, 2, (145–161).

Jeffries, TW; Yang, VW; Davies, MW (1998); Comparative study of xylanase kinetics using dinitro arsenomolybdate and ion chromatographic assays. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70-72 (257-265).

Jiang, Z.Q.; Deng, W.; Zhu, Y.P.; Li, L.T.; Sheng, Y.J. ;Hayashi, K. (2004); The recombinant xylanase B of *Thermotoga maritime* is highly xylan specific and produces exclusively xylobiose from xylans, a unique character for industrial applications. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 27 (207-213).

Kapoor M.; Kuhad, R.C.(2007); Immobilization of Xylanase from *Bacillus pumilus* Strain MK001 and its Application in Production of Xylo-oligosaccharides. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142 (125–138).

Keshwani D.R (2009) Microwave Pretreatment of Switchgrass for Bioethanol Production, Doctorate Thesis (Doctor degree in Philosophy), Graduate Faculty of North Carolina State University, USA.

Kim, S-W. Development of enzyme immobilization techniques. (apresentação pdf).Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University.

Koch, G.; Bauch, J.; Puls, J.; Welling, J. (2002): Ursachen und wirtschaftliche Bedeutung von Holzverfärbungen. Allgem. Forstz./Wald, München 57 6, S. (315-318).

Kolenová, K.; Vršanská, M.; Biely, P. (2006); Mode of action of endo- $\beta$ -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides J. Biotechnol. 121 (338-345).

Kordsachia, O.(2011); Untersuchung alternativer Holzarten für den sauren Sulfite- und den Bisulfitaufschluss Relatório final Projeto 123 Instituto de Tecnologia e Biologia de madeira, Univesidade de Hamburg, Janeiro de 2011.

Kumar P, Barrett DM (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. Ind. Eng. Chem.Res. 48(3713-3729).

Licht, T.R.; Ebersbach, T.; Frøkiær, H.(2011); Prebiotics for prevention of gut infections; Trends in Food Science and Technology.

Ligero, P.; Kolk, J.C.; Vega, A.; Pan, J.E.G.(2011); Production of xylo-oligosaccharides from *Miscanthus x giganteus* by autohydrolysis; BioResources 6,4(4412-4429).

Lopez-Gallego, F.; Montes, T.; Fuentes, M.; Alonso, N.; Grazu, V.; Betancor, L.; Guisán, J.M.; Fernandez-Lafuente R.(2005); Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. J. Biotechnol. 116 (1–10).

Manrich A., Komesu A, Adriano W.S., Tardioli P.W., Giordano R.L.C. (2010); Immobilization and Stabilization of Xylanase by Multipoint Covalent Attachment of Agarose and Chitosan Supports. Applied Biochem. Biotechnol. 161(455-467).

Manrich A.; Nascimento, V.M., Giordano, R.C.;Giordano, R.L.C.G.(2011); Immobilization of endo-xylanase for xylo-oligosaccharides production from xylan

oligomers extracted from sugarcane bagasse using alkaline pretreatment; Book of Abstracts; 10<sup>th</sup> Biotrans, Symposium on Biocatalysis, Italia, 2-6 out 2011 (351).

Marton, J.M.; Felipe, M.G.A, Almeida e Silva, J.B.A.; Pessoa Jr, A.(2006); Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production; Brazilian Journal of Chemical Engineering 23,1(9-21).

Mateo, C., Palomo, J. M., Lorente, G. F., Guisán, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. (2007); Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. Enzyme and Microbial Technology, 40(451–1463).

Medeiros, L.A. de. Xilanases de *Penicillium chrysogenum*: produção, caracterização e aplicação no pré-branqueamento de polpa celulósica de pseudocaule de bananeira frutífera. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/ USP, 2007.

Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 31, 27(426–428).

Mirahmadi, K. Kabir, M.M. Jeihanipour, A. Karimi, K. Taherzadeh M.J.(2010), Alkaline pretreatment of spruce and birch to improve bioethanol and biogas production. Bioresources Online Journal. 5,2(928-938).

Miyake T., Yoshino S., Yamada T., Hata K., Nishizawa M. (2011) Self-Regulating Enzyme-Nanotube Ensemble Films and Their Application as Flexible Electrodes for Biofuel Cells, Journal of the American Chemical Society, 133, 13, (5129-5134).

Moure, A.; Gullón, P.; Dominguez, H.; Parajó, J.C.(2006); Advances in the manufacture, purification and applications of Xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. Process Biochemistry 41(1913-1923).

Mtui, G.Y.S.(2009); Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products. Afric.Joun. of Biotechnol. 8,8(1398-1415).

Nabarlatz, D.A.(2007). Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides, Doctoral Thesis, Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, Spain, September 2007.

Nakagame, Seiji (2010). The influence of lignin on the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass substrates, Thesis, Philosophy in the Faculty of Graduate Studies (Forestry) the University of British Columbia (Vancouver) November 2010.

Nascimento, V.M. Pré-tratamento Alcalino (NaOH) do Bagaço de Cana-de-açúcar para a Produção de Etanol e Obtenção de Xilooligômeros. Dissertação. Departamento de Engenharia Química; UFSCar, SP, Brasil, 2010.

Overend, R.P.; Chornet, E.(1987); Fractionation of lignocellulosics by steam–aqueous pretreatments. Philosophical Transactions for the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences Philos, 321(523–536).

Pan,X, Gilkes N, Kadla J, Pye K, Saka S, Grega D., Ehara K, Xie D, Lam D, Saddler J (2006). Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolve fractionation process: optimization of process yields. *Biotechnol and Bioeng* 94,5(851-861).

Parasuraman P, Singh R, Bolton TS, Omori S, Francis RC (2007) Estimation of Hardwood Lignin concentrations by UV spectroscopy and Chlorine demethylation *BioResources* 2,3(459-471).

Pastell, H.; Westerman, P.; Meyer, A.S.; Thuomainen, P.; Tenkanen, M.(2009); In vitro fermentation of arabino-derived carbohydrates by *Bifidobacterium* and mixed fecal microbiota. *J.Agric.Food.Chem.* 57,18(8598-8606).

Peng, F.; Ren, J-L; Xu, F; Bian, J.; Peng, P.; Sun, R.C.(2009); Comparative Study of Hemicelluloses Obtained by Graded Ethanol Precipitation from Sugarcane Bagasse. *J. Agric. Food Chem.*,14(6305–6317).

Polizeli M.L.T.M.; Pizzatti A.C.S.; Monti, R.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A.; Amorim, J.D.S.(2005); Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 67(577-591).

Prakash et.al. Antioxidante Activity; *Analitical Progress*; Medallion Labs Dr. Jonathan DeVries, Editor [http://www.medlabs.com/Downloads/Antiox\\_acti\\_.pdf](http://www.medlabs.com/Downloads/Antiox_acti_.pdf)

Reddy, S.; Krishnan,C.(2010); Production of prebiotics and antioxidants as health food supplements from lignocelluloseic materials using multi-enzymatic hydrolysis. Int.J.Chem.Sci. 8,3(535-549).

Rivas, B., Dominguez, J.M., Dominguez, H., Parajó, J.C.; Bioconversion of posthydrolysis liquors: an alternative for xylitol production from corn cobs. Enzyme and Microbial Technology 31(431-438).

Roberfroid, M. (2007) Prebiotics: The Concept Revisited; The Journal of Nutrition 37(830-837).

Rodrigues, Dasciana Souza ; mendes, Adriano Aguiar ; adriano, Wellington Sabino ; gonçalves, l. R. B. ; giordano, r. L. C. . Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, v. 51, p. 100-109, 2008.

Ruiz, H.A.; Ruzene, D.S.; Silva, D.P.; Silva, S.S.M.; Vicente, A.A.; Teixeira, J.A.(2011); Development and Characterization of an Environmentally Friendly Process Sequence (Autohydrolysis and Organosolve) for Wheat Straw Delignification; Appl Biochem Biotechnol 164(629–641).

Ruller.R.; Rosa, J.C.; Faça, V.M.; Greene, L.J.; Ward, R.J.(2006); Efficient consecutive expression of *Bacillus Subtilis* Xylanase A in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  under control of the *Bacillus* BsXA Promotor. Biotechnol.and Appl.Biochem. 43, 1(1-15).

Rycroft, C.EE.; Jones, M.R., Gibson, G.R.; Rastall, R.A.(2011); A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. Journal of Applied Microb. 91,5(878-887).

Samanta, A.K.; Senani, S., Kolte, A.P.; Sridhar, M.; Sampath, K.T.; Jayapal, N.; Deni, A.(2011); Production in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs. Food and Bioproducts Processing.

Sanchez,O., Candona,C. (2008); Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Bioresource Technology 99(5270-5295).

Sawada, T., Nakamura, Y., Kobayashi, F., Kuwahara, M., and Watanabe, T. (1995), *Biotechnol. Bioeng.* 48(2), 719–724. Effects of fungal pretreatment and steam explosion pretreatment on enzymatic saccharification of plant biomass

Sedlmeyer, F.B.:(2011); Xylan as by-product of biorefineries: Characteristics and potential use for food applications; *Food Hydrocolloids* 25 (1891-1898).

Shapiro, A.L.; Viñuela, E.; Maizel Jr., J.V.(1976); Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28,5 (815–820).

Sheldon, R.A.(2007); Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.*, 349 (1289–1307).

Sjostrom, E. (1993) *Wood Chemistry. Fundamentals and Application. Second Edition*, Academic press, 292.

Sousa, L.C., Chundawat, S.P.S., Balan, V., Dale, B.E.(2009); Cradle-to-grave' assessment of existing lignocelluloses pretreatment technologies; *Current Opinion in Biotechnology*, 20:339–347.

Sousa, V.M.C.; Santos, E.F.; Sgarbieri, C.V.(2011); The Importance of Prebiotics in Functional Foods and Clinical Practice; *Food and Nutrition Sciences*, 2(133-144).

Subramaniyan S, Prema P, Ramakrishna SV(1997); Isolation and screening for alkaline thermostable xylanases. *J Basic Microbiol* 37,6(431–7).

Tabakoff, B.; Lee, J.M.; Leon-Jones, F; Hoffman, P.(1985); Ethanol inhibits the activity of the B form of monoamine oxidase in human platelet and brain tissue; *Psychopharmacology*, 87, 2 (152-156).

Taherzadeh,J.M. and Karimi,K.(2008); Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int.J.Mol.Sci.* 9(161-1651).

Tardioli, P.W.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M.; Giordano, R L.C.(2003); Hydrolysis of Proteins by Immobilized-Stabilized Alcalase-Glyoxyl Agarose. *Biotechnology Progress*, 19( 565–574).

Tarkow, H., Feist, W.C.(1969); A Mechanism for Improving the Digestibility of Lignocellulosic Materials with Dilute Alkali and Liquid Ammonia. *Adv. Chem. Ser.* 95 (197–218).

Tufvesson, P.; Lima-Ramos, J.; Nordblad, M.; Woodley, J.M.(2011) Guidelines and Cost Analysis for Catalyst Production in Biocatalytic. *Processes Organic Process Research & Development*, 15(266–274).

Tuohy K.M.; Rouzaud, G.C.M.; Brück, W.M.; Gibson, G.R. (2005); Modulation of the Human Gut Microflora Towards Improved Health Using Prebiotics – Assessment of Efficacy; *Current Pharmaceutical Design*, 11, (75-90).

[uncarn.org/repository/cão/landingpage.cfm?article=Ca.v063n04p18](http://uncarn.org/repository/cão/landingpage.cfm?article=Ca.v063n04p18)

Van Craeyveld V, Swennen K, Dornez E, Van de Wielle T, Morzorati M, Verstraete YD, Onagbesan O, Decuypere E, Buyse J, De Ketelaere B, Broekaert WF, Delcour JA, Courtin CM (2008) Structurally Different Wheat Derived Arabiboxyloligosaccharides Have Different Prebiotic and Fermentation Properties in Rats *J Nutr.* 138(12): 2348-2355.

Vazquez, M.J.; Garrote, G.; Alonso, J.L.; Dominguez, H.; Parajó, J.C.(2005); Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: evaluation of operational strategies. *Bioresource Technology* 96(889-896).

Veenashri, B.R.; Muralikrishna G.(2011); In vitro anti-oxidant activity of xylooligosaccharides derived from cereal and millet brans- A comparative study. *Food Chem.* 126,3(1475-1484).

Vegas, R.; Alonso, J.L.; Dominguez, H.; Parajó, J.C.(2005); Manufacture and refining of oligosaccharides from industrial solid wastes. *Ind.Eng.Chem.Res* 44(614-620).

Wang, Y.(2009); Prebiotics: Present and Future in food science and technology. *Food research International* 42(8-12).

Wardencki, W; Cury, J; Namieoienik, J (2005); Green Chemistry — Current and Future Issues; *Polish Journal of Environmental Studies*; 14, 4 (389-395)

Wong, K.K.Y.; Tan, L.U.L.; Saddler, J.N.(1988); Multiplicity of  $\beta$ -1,4-Xylanase in Microorganism: Functions and Applications. *Microbiological Reviews* 52,3(305-317).

Wühlisch, G.(2006); Erhaltung der genetischen Vielfalt der Schwarzpappel; Bericht der Bayerischen Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft 52(46-50); Lerchl Druck, Freising

[www.cleantechinvestor.com/portal/bioenergy/5164\\_enzymes.html](http://www.cleantechinvestor.com/portal/bioenergy/5164_enzymes.html)

www.MarketResearch.com: *Enzymes in Industrial Applications: Global Markets*, BCC Research; January 1, 2011 (<http://www.marketresearch.com/BCC-Research-v374/Enzymes-Industrial-Applications-Global-6060223/>)

Xuejun Pan, X.; Xie, D.; Yu, R.W.; Lam, D.; Saddler, J.N.(2007); Pretreatment of Lodgepole Pine Killed by Mountain Pine Beetle Using the Ethanol Organosolve Process: Fractionation and Process Optimization *Ind. Eng. Chem. Res.*(2609-2617).

Yoon,Y.K.Y., Woodams,E.E., Hang,Y.D.(2006); Enzymatic production of pentoses from hemicelluloses fraction of corn residues. *LWT* 39(387-391).

Zhao, X.; Cheng, K.; Liu, D.(2009); Organosolve pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis *Appl Microbiol Biotechnol* 82(815–827).

Zheng, Y.; Pan, Z.; Zhang, R.(2009); Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int.J.Agric.and Biol.Eng.* 2,3(51-68).