

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

THAÍS OLIVEIRA BALDEZ

**ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DE XILOOLIGÔMEROS POR  
XILANASES E BETA-XILOSIDASE NA FORMA LIVRE E  
IMOBILIZADA**

São Carlos  
2018

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

THAÍS OLIVEIRA BALDEZ

**ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DE XILOOLIGÔMEROS POR  
XILANASES E BETA-XILOSIDASE NA FORMA LIVRE E  
IMOBILIZADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, requisito necessário à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientação: Prof. Dr. Raquel L. C. Giordano

São Carlos  
2018

Baldez, Thais Oliveira

Estudo cinético da hidrólise de xilooligômeros por xilanases e beta-xilosidase na forma livre e imobilizada / Thais Oliveira Baldez. -- 2018. 114 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador: Raquel de Lima Camargo Giordano

Banca examinadora: Álvaro de Baptista Neto, Marcelo Perecin de Arruda Ribeiro

Bibliografia

1. Hidrólise enzimática. 2. Xilanases e beta-xilosidases. 3. Xilana. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

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

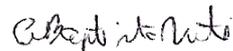
DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

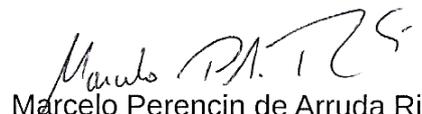
Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE THAÍS OLIVEIRA BALDEZ APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 15 DE MARÇO DE 2018.

BANCA EXAMINADORA:

  
Raquel de Lima Camargo Giordano  
**Orientadora, UFSCar**

  
Álvaro de Baptista Neto  
**UNESP**

  
Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro  
**UFSCar**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, a meus anjos e a meus guias por todas as oportunidades que me concederam e que foram essenciais para me guiar até aqui.

Agradeço à minha família, meus pais Geraldo e Sandra, pelo exemplo, paciência, incentivos, suporte e amor. Aos meus irmãos Tiago e Matheus por todo o apoio, aprendizados e todo o suporte incondicional durante toda a minha vida.

Agradeço a minha orientadora Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano, por seus ensinamentos, sua compreensão, confiança e paciência comigo.

Agradeço aos professores Dr. Roberto Giordano, Dr. Paulo Tardioli pelo suporte em diversos momentos. Ao Dr. Marcelo Ribeiro pelos conselhos e ensinamentos nas etapas de conclusão do trabalho.

Aos técnicos Amadeus, Tiago, Thaís e Aline.

Agradeço a meus colegas de projeto Felipe A.S. Corradini e Thaís S.S. Milessi, por toda a paciência e ensinamentos ao longo do meu treinamento.

Agradeço a meus amigos e também colegas de trabalho Cíntia, Murilo, Sheyla, Laiane, Letícia P., Carlota, Letícia A., Camila, Matheus, Vitor, Thiago, Eric e Paula pelos ensinamentos, companheirismo, momentos de descontração e trabalho juntos.

As minhas amigas Jaqueline e Larissa, que me acolheram, me escutaram e me auxiliaram nos momentos difíceis.

A empresa Suzano Papel e Cellulose S/A pela doação da polpa branqueada de eucalipto, e as empresas Vedartis e DuPont pela doação das enzimas utilizadas neste estudo.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química pelos recursos disponibilizados para o desenvolvimento do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida.

A todos meu muito obrigada!

## RESUMO

Este trabalho visa a contribuir para o desenvolvimento do processo de produção de etanol a partir de xilooligômeros (XO) extraídos de hemicelulose de bagaço de cana de açúcar, através da hidrólise dos xilooligômeros a xilose, isomerização desta a xilulose, catalisada por xiloseisomerase (XI) e fermentação do isômero a etanol, por *Sacharomyces cerevisiae* (Sc). Todas as reações ocorrerão dentro de um biocatalizador onde as enzimas, previamente imobilizadas covalentemente em outros suportes, estarão co-imobilizadas com a levedura em alginato de cálcio. A eficiência desse processo para produção de etanol já foi demonstrada por pesquisadores do DEQ/UFSCar, estando com depósito de pedido de patente efetuado. O foco deste trabalho está voltado para a etapa de hidrólise dos xilooligômeros a xilose, pelas ações de endo/exoxilanases,  $\beta$ -xilosidase e enzimas auxiliares (Xil). O objetivo deste trabalho foi estudar diferentes coquetéis enzimáticos visando selecionar e caracterizar o mais adequado para a hidrólise completa de xilooligômeros/xilana em xilose. Para facilitar esta busca, foi necessário também desenvolver um substrato que permitisse estudo eficiente da ação de endoxilanases. Produziu-se então uma xilana com a mesma performance da comercial, extraída da polpa de eucalipto branqueada (holocelulose). Foi realizado o estudo cinético das enzimas: Multifect A03139 (XAS-2) e Accellerase A03304 (XAS-3), dois complexos comerciais contendo xilanases, enzimas auxiliares e  $\beta$ -xilosidases; uma endo-xilanase recombinante de *Bacillus subtilis* (Verdartis) (XAS-1) e uma  $\beta$ -xilosidase produzida *in house* recombinante (XAS-4). As duas últimas também foram estudadas na forma imobilizada XASI-1 e XASPI-4. Foram avaliadas a influência da concentração enzimática, temperatura, pH e concentração do substrato na hidrólise de xilana. Além disso, foi investigada a estabilidade térmica de cada enzima nas temperaturas de 32 (processo SHIF) e 50 °C. Os modelos cinéticos foram ajustados aos perfis de velocidade inicial experimental, para se estimarem os parâmetros cinéticos das reações. Foi também avaliado o efeito de inibição causado pelas concentrações de xilose e de xilose/xilulose combinados em  $\beta$ -xilosidases. Para  $\beta$ -xilosidase (XASPI-4), foi possível ajustar um modelo de inibição competitiva com dois inibidores. Os ensaios de hidrólise enzimática de longa duração foram realizados com todas as enzimas isoladas e algumas combinadas, com o objetivo de avaliar o perfil de produção de xilooligossacarídeos, tanto a 50 °C quanto a 32 °C. A hidrólise com XAS-1 e XASP-4 juntas obteve resultados promissores, uma vez que é possível observar o aumento do perfil de conversão e a produção de xilose após 48 h de reação. Também foram realizados ensaios a 32°C com os licores obtidos a partir de pré-tratamentos hidrotérmico e alcalino do bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados obtidos permitem um maior conhecimento das características de cada enzima facilitando a preparação de um coquetel eficiente de enzimas para converter completamente xilana em xilose.

**PALAVRAS-CHAVE:** xilana, xilanases,  $\beta$ -xilosidases, estudo cinético, hidrólise enzimática.

## ABSTRACT

This work aims to contribute to the development of the ethanol production process from xylooligomers (XO) extracted from sugarcane bagasse hemicellulose through the hydrolysis of XO to xylose, xylose isomerization catalyzed by xyloseisomerase (XI) and fermentation of the isomer to ethanol by *Sacharomyces cerevisiae* (Sc). All reactions will occur within a biocatalyst where the enzymes, previously immobilized covalently in other carriers, will be co-immobilized with the yeast in calcium alginate. The efficiency of this process for the production of ethanol has already been demonstrated by DEQ/UFSCar researchers, with an patent application request. The focus of this work is on the hydrolysis stage of XO to xylose, by the actions of endo / exoxylanases,  $\beta$ -xylosidase and auxiliary enzymes (Xyl). The objective of this work was to study different enzymatic cocktails in order to select and characterize the most suitable for the complete hydrolysis of xylooligomers/xylan in xylose. To facilitate this search, it was also necessary to develop a substrate that would allow efficient study of the action of endoxylanases. A xylan with the same commercial performance was then produced and extracted from the bleached eucalyptus pulp (holocellulose). The kinetic study was carried with the enzymes: Multifect A03139 (XAS-2) and Accellerase A03304 (XAS-3), two commercial complexes containing xylanases, auxiliary enzymes and  $\beta$ -xylosidase; a recombinant endoxylanase from *Bacillus subtilis* (Verdartis) (XAS-1) and a recombinant in-house produced  $\beta$ -xylosidase (XAS-4). The latter two were also studied in the immobilized form XASI-1 and XASPI-4. The influence of enzyme concentration, temperature, pH and substrate concentration on xylan hydrolysis were evaluated. In addition, the thermal stability of each enzyme was assessed at temperatures of 32 (SHIF process) and 50 ° C. Kinetic models were fitted with initial velocity profiles data to estimate the kinetic parameters of the reactions. The inhibition effect caused by xylose and xylose / xylulose concentrations combined in  $\beta$ -xylosidases was also evaluated. For  $\beta$ -xylosidase (XASPI-4), it was possible to adjust a competitive inhibition model with two inhibitors. The long-term enzymatic hydrolysis assays were carried out with all the enzymes isolated and some combined, to evaluate the production profile of xylooligosaccharides, both at 50 °C and 32 °C. The hydrolysis with XAS-1 and XAS-4 combined obtained promising results, since it is possible to observe an increase of the conversion profile and the xylose production after 48 h of reaction. Tests were also carried out at 32°C with liquors obtained from hydrothermal and alkaline pre-treatments of sugarcane bagasse. The obtained results allow a greater comprehension of each enzymes characteristics, assisting the preparation of an efficient enzymes cocktail to completely convert xylan to xylose.

KEY WORDS: xylan, xylanases,  $\beta$ -xylosidases, kinetic study, enzymatic hydrolysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração tridimensional da estrutura de biomassas lignocelulósicas.....	19
Figura 2 - Estrutura dos monossacarídeos mais abundantes na hemicelulose. ....	20
Figura 3 – Estrutura base para xilana de (A) arabino-4-O-metilglucuranoxilana e (B) O-acetil-4-O-metilglucuranoxilana. ....	22
Figura 4 - Precursores da lignina <sup>1</sup> álcool p-cumarílico, <sup>2</sup> p-álcool coniferílico e <sup>3</sup> álcool sinapílico. ....	24
Figura 5 - Composição química do bagaço de cana-de-açúcar. ....	25
Figura 6 – Polpa branqueada de eucalipto em blocos e em folhas. ....	27
Figura 7 – Esquema de pré-tratamento para material lignocelulósico.....	27
Figura 8 – Ilustração de um sistema hemicelulósico de arabinoxilana. ....	31
Figura 9 - Representação da estrutura tridimensional típica das xilanases dos grupos GH 8 (produzida por <i>Bacillus halodurans</i> ) <sup>1</sup> , GH 10 (produzida por <i>Streptomyces lividans</i> ) <sup>2</sup> , GH 11 (produzida por <i>Trichoderma reesei</i> ) <sup>3</sup> e β-xilosidase do grupo GH 43 (produzida por <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ) <sup>4</sup> .....	33
Figura 10 – Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima (A) e o efeito da inibição incompetitiva e competitiva (B).....	38
Figura 11 - Esquema apresentando alguns dos possíveis produtos para uma biorrefinaria. ....	39
Figura 12 - Fluxograma das etapas envolvidas nos pré-tratamentos do BCA. ....	43
Figura 13 - Fluxograma simplificado dos processos de extração da xilana de polpa de eucalipto branqueada estudados no presente trabalho. ....	46
Figura 14 – Variação da suspensão ao longo do processo de precipitação.....	47
Figura 15 – Curvas termogravimétricas para as xilanas obtidas por precipitação em pHs 5,0 e 6,0.....	63
Figura 16 - Comparação entre a atividade para uma mesma enzima aplicada ao substrato de xilana de bétula e de eucalipto em diferentes condições.....	65
Figura 17 – Eletroforese das enzimas avaliadas neste trabalho.....	66
Figura 18 – Influência da concentração enzimática na velocidade inicial de reação para todas as enzimas em estudo, realizadas em xilana de eucalipto 1% em tampão citrato 50 mM pH 5,5 e 50 °C. ....	69
Figura 19 – Influência da temperatura sobre a atividade das endoxilanases XAS-1, 2 e 3 e XASI-1, realizadas em xilana de eucalipto 1 % (m/v) tampão citrato de sódio pH 5,5.....	70



Figura 20 – Ajuste dos parâmetros para obtenção da energia de ativação de cada reação enzimática.....	72
Figura 21 - Perfis de atividade das endoxilanasas XAS-1, 2, 3 e XASI-1 em função da .....	73
Figura 22 – Perfis de pH e temperatura para XAS-2 e XAS-3, em 3D e 2D.....	75
Figura 23 – Perfis de pH e temperatura para XAS-4 em 3D e 2D. ....	76
Figura 24 - Comparação entre os valores experimentais e os preditos pelos modelos. ....	78
Figura 25 – Efeito do pH na atividade da $\beta$ -xilosidase XAS-4 purificada. ....	79
Figura 26 – Estabilidade térmica de XAS-1, 2, 3 e XASI-1, incubadas em tampão citrato 50 mM pH 6,0.....	81
Figura 27 – Estabilidade térmica das $\beta$ -xilosidases XAS-2, XAS-3, XASP-4 e XASPI-4 incubada em tampão fosfato pH 6,0, 50 mM. ....	82
Figura 28 – Efeito da concentração do substrato de xilana de eucalipto na velocidade da reação para as endoxilanasas a 50°C, tampão citrato 50 mM pH 5,5. ....	84
Figura 29 – Influência da concentração do substrato (pNPX) na velocidade da reação para as $\beta$ -xilosidases estudadas.....	85
Figura 30 – Influência da concentração de xilose na atividade das enzimas XAS-2, XAS-3, XASP-4 e XASPI-4, medidas em tampão fosfato 50 mM com pNPX 5 mM, pH 6,0 a 50 °C.	88
Figura 31 - Influência da concentração de xilulose na atividade da enzima XASP-4, medida em tampão fosfato 50 mM com pNPX 5 mM, pH 6,0 a 50 °C. ....	89
Figura 32 – Influência da inibição mista na $\beta$ -xilosidase (XASPI-4) por xilose e xilulose nas seguintes condições ( $\square$ ) sem inibição, ( $\circ$ ) 8 e 1,6 g/L, ( $\Delta$ ) 16 e 3,2 g/L e ( $\nabla$ ) 32 e 6,4 g/L, respectivamente. ....	90
Figura 33 – Perfil de conversão total da hidrólise enzimática da fração solúvel da xilana de eucalipto (8,8 g/L), a 32 e 50 °C, pH 5,6 (tampão citrato de sódio 50 mM) pela ação das enzimas XAS-1, 2 e 3 (150 UI/g <sub>xilana</sub> ou 1500 UI/L). ....	93
Figura 34 – Comparação das hidrólises enzimáticas de xilana de eucalipto (6,8 g/L) para as enzimas XASI-1, XAS-1 + XASP-4 e XASI-1 + XASPI-4 na forma solúvel e imobilizada, pH 5,6 a 32°C. ....	95
Figura 35 – Perfil de concentração de X1, X2, X3, X4 e X5 para os ensaios de hidrólise enzimática em xilana de eucalipto (6,8 g/L), pH 5,6 a 32 °C, com as enzimas XASI-1 e XASI-1 + XASPI-4. ....	96
Figura 36 - Hidrólise enzimática da xilana presente no licor hidrotérmico extraído do bagaço de cana-de-açúcar pela ação de XAS-1, 2 e 3 com carga de 150 UI/g <sub>xilana</sub> ou 2250 UI/mL. ....	98

Figura 37 – Comparação entre a hidrólise enzimática entre o licor alcalino e o hidrotérmico pela ação da XAS-1, em pH 5,6 a 32°C.....	99
Figura 38 – Gráficos de paretos obtidos para cada enzima nos ensaios de DCCR com significância de 10%.....	115

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química (% peso seco) de diferentes materiais lignocelulósicos. ....	18
Tabela 2 – Classificação básica da hemicelulose. ....	21
Tabela 3 - Diferença entre hemicelulose e celulose.....	21
Tabela 4 – Estudos de extração de xilana de diferentes materiais. ....	23
Tabela 5 – Estudos de pré-tratamentos aplicados ao bagaço de cana-de-açúcar.....	29
Tabela 6 – Revisão sobre cinética enzimática de xilanases. ....	38
Tabela 7 – Revisão da cinética enzimática de $\beta$ -xilosidases. ....	39
Tabela 8 – Características das enzimas avaliadas.....	43
Tabela 9 – Relação de ensaios de hidrólise enzimática realizados.....	50
Tabela 10 – Matriz do planejamento experimental para $\beta$ -xilosidase. ....	56
Tabela 11 - Composição química média do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> . ....	59
Tabela 12 - Composições químicas médias do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. ....	59
Tabela 13 - Ensaios utilizando a abordagem 1 de extração em autoclave a 121 °C.....	61
Tabela 14 - Ensaios utilizando a abordagem 2 de extração SAARNIO et al. (1954) com agitação mecânica durante 20 h.....	61
Tabela 15 - Caracterização do material extraído em termos de concentração dos monômeros e total extraído de xilana (obtido por hidrólise ácida, ver item 3.3.1).....	62
Tabela 16 – Variação da atividade enzimática nos substratos de eucalipto pHs 5 e 6, e em bétula. ....	64
Tabela 17 – Resultados da quantificação das bandas proteicas das diferentes enzimas.....	67
Tabela 18 – Características dos complexos enzimáticos avaliados. ....	67
Tabela 19 – Dados de energia de ativação e para as endoxilanases. ....	72
Tabela 20 – Dados de ANOVA obtidos pelo <i>software</i> Protimiza, com nível de significância de 0,10.....	77
Tabela 21 – Validação das regiões ótimas obtidas através do planejamento experimental contendo os dados de atividade específica preditos versus os experimentais. ....	79
Tabela 22 – Valores dos parâmetros do modelo obtidos através do ajuste do modelo de MM para as endoxilanases. ....	84
Tabela 23 – Valores obtidos através do ajuste do modelo de Andrews e MM para as $\beta$ -xilosidases. ....	86
Tabela 24 – Parâmetros cinéticos $k_{cat}$ e $k_{cat}/K_M$ obtidos para cada enzima estudada. ....	87

Tabela 25 – Principais resultados obtidos para as enzimas XAS-1, 2, 3 em substrato de xilana de eucalipto e XAS-2, 3 e 4 nos ensaios realizados em substrato pNPX.....	91
Tabela 26 – Perfil dos XOS produzidos após 24h de hidrólise enzimática com xilana de eucalipto (8,8 g/L) a pH 5,6 e 32 °C* .....	94
Tabela 27 – Conversões em termos de xilose e XOS presentes ao fim das 48 h de hidrólise enzimática (XAS-1, XASI-1, XASP-4 e XASPI-4) em xilana de eucalipto (6,8 g/L), pH 5,6 a 32 °C.....	97
Tabela 28 – Perfil dos XOS produzidos após 12h de hidrólise enzimática em licor hidrotérmico com concentração de xilooligômeros de 22,6 g/L e carga enzimática de 150 UI/g <sub>xos</sub> para cada enzima estudada * .....	99
Tabela 29 – Dados experimentais utilizados para os DCCRs. ....	114

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2G	Segunda geração
BCA	Bagaço de cana-de-açúcar
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CTC	Centro de Tecnologia Canavieira
DEQ	Departamento de Engenharia Química
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
GH	Hidrolases glicosil
HMF	Hidroximetilfurfural
MM	Michaelis Menten
SHIF	Simultânea hidrólise, isomerização e fermentação
SIF	Simultânea isomerização e fermentação
X1	Xilose
X2	Xilobiase
X3	Xilotriose
X4	Xilotetraose
XI	Xilose isomerase
XO	Xilooligômeros
XOS	Xilooligossacarídeos
Ea	Energia de ativação
$k_2$	Constante cinética de formação do produto
Ki	Constante de inibição
KM	Constante de MM
pNP	p-nitrofenil
pNPX	p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranoside
U	Unidade de atividade enzimática
UI	Unidade internacional de atividade enzimática
$V_{max}$	Velocidade máxima de reação
$v_o$	Velocidade inicial

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
2.1	Materiais Lignocelulósicos .....	18
2.1.1	Celulose.....	19
2.1.2	Hemicelulose .....	19
2.1.3	Lignina .....	24
2.1.4	Extrativos e cinzas .....	24
2.1.5	Cana-de-açúcar .....	25
2.1.6	Polpa de Eucalipto Branqueada.....	26
2.2	Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.....	27
2.3	Hidrólise da hemicelulose .....	29
2.3.1	Hidrólise ácida.....	29
2.3.2	Hidrólise enzimática .....	30
2.4	Enzimas .....	30
2.4.1	Xilanases e $\beta$ -xilosidase.....	31
2.4.2	Imobilização enzimática .....	33
2.5	Cinética enzimática.....	34
2.5.1	Modelos cinéticos aplicados a xilanases e $\beta$ -xilosidases .....	38
2.6	Biorrefinaria da Cana-de-açúcar.....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1	Material .....	42
3.1.1	Biomassa Lignocelulósica.....	42
3.1.2	Seleção das enzimas para estudo cinético .....	42
3.2	Procedimento experimental.....	43
3.2.1	Pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar .....	43

3.2.2	Extração da xilana de polpa de eucalipto branqueada .....	45
3.3	Métodos analíticos .....	48
3.3.1	Caracterização química dos substratos estudados .....	48
3.3.2	Caracterização das xilanases e $\beta$ -xilosidase avaliadas.....	53
4	RESULTADOS.....	59
4.1	Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar .....	59
4.2	Avaliação do substrato de polpa de eucalipto branqueada para hidrólise enzimática.....	60
4.2.1	Solubilidade da xilana de eucalipto .....	62
4.3	Caracterização das enzimas.....	66
4.4	Estudo cinético das enzimas avaliadas .....	68
4.4.1	Efeito da concentração enzimática .....	68
4.4.2	Efeito da temperatura.....	70
4.4.3	Efeito do pH .....	72
4.4.4	Efeito de temperatura e pH para $\beta$ -xilosidases.....	74
4.4.5	Análise de estabilidade térmica .....	80
4.4.6	Efeito da concentração de substrato .....	83
4.4.7	Influência da concentração de inibidores para as $\beta$ -xilosidases .....	88
4.5	Hidrólise enzimática .....	92
4.5.1	Substrato de xilana de eucalipto .....	92
4.5.2	Substrato de bagaço de cana-de-açúcar .....	97
5	CONCLUSÕES .....	101
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	104
7	REFERÊNCIAS.....	105
	ANEXO I.....	112
	ANEXO II .....	114

## 1 INTRODUÇÃO

Com a crescente demanda de energia no mundo, é necessário o máximo aproveitamento dos materiais envolvidos nos diferentes processos, como é o caso de praticamente todos os resíduos de biomassa produzidos nas atividades agrícolas e industriais, e mesmo o lixo urbano, que apresenta elevados teores de materiais lignocelulósicos. Desta forma, a reutilização e reciclagem de resíduos ajudam a diminuir os problemas ambientais ligados ao acúmulo e minimiza o uso de combustível fóssil (BIOETANOL 2008).

No Brasil, grande parte da produção de etanol é proveniente da sacarose de cana-de-açúcar, assim a utilização do bagaço de cana-de-açúcar (BCA), subproduto do processo de moagem, certamente ocupa uma posição de grande destaque, e a viabilidade técnica e econômica de seu uso para a produção de biocombustíveis vem sendo largamente estudada. Estima-se que uma tonelada de cana moída contém aproximadamente 280 kg de BCA (CARDONA, et al., 2009). A indústria sucroalcooleira geralmente utiliza o bagaço na geração de energia para o próprio processo, porém a produção de etanol de segunda geração (2G), a partir da celulose presente nos materiais lignocelulósicos vem se tornando realidade (BIOETANOL, 2008).

A cana-de-açúcar é considerada uma das fontes mais ricas de carboidrato na natureza. Seu bagaço, um material lignocelulósico, é constituído principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (BADHAN et al., 2007). A fração hemicelulósica rica em açúcares (xilose, glicose, frutose, arabinose, galactose e manose), pode ser utilizada para a produção de diferentes insumos de interesse comercial (xilitol, etanol, manitol, entre outros), uma vez que esta é hidrolisada com maior facilidade devido à heterogeneidade dos componentes e seu estado amorfo (JEFFRIES, 1983). A hemicelulose presente no BCA é composta principalmente por xilanas, as quais são longas estruturas formadas basicamente por monômeros de xilose. Sua utilização para a produção de etanol permite aumentar grandemente o rendimento etanol/biomassa. Atualmente, é comum o uso e estudo da fração celulósica em diversos processos a fim de produzir etanol, porém o uso da hemicelulose pode ser uma chave para a viabilidade econômica da produção de etanol a partir de lignocelulósicos.

Como alternativa para a transformação desses materiais em etanol, a hidrólise enzimática vem se consolidando como umas das alternativas mais viáveis. No caso da xilana, especificamente, sua extração em condições ácidas mais severas já a libera na forma de monômeros, em especial xilose. Alternativamente, sua extração em condições brandas permite



a solubilização de xilana na forma de xilooligômeros, cuja conversão final a xilose irá requerer ação combinada de diferentes enzimas: as endo-1,4- $\beta$ -xilanases promovem uma quebra inicial da hemicelulose, liberando oligômeros de xilose, que servem de substrato para as  $\beta$ -xilosidases, gerando xilose.

Em processo de simultânea isomerização e fermentação (SIF), estudado inicialmente no grupo LabEnz do DEQ/UFSCar, a xilose era liberada diretamente em condições ácidas e pela ação de um biocatalizador que agregava (por envolvimento em gel de alginato de cálcio) a enzima xilose isomerase (XI) covalentemente imobilizada e *S.cerevisiae*, era primeiramente isomerizada a xilulose, pela ação da enzima XI, e a seguir fermentada a etanol pela ação da levedura tradicionalmente usadas na produção de etanol de sacarose (SILVA et al, 2013).

Contudo, estudos contínuos desse processo mostraram facilidade de contaminação do meio por bactérias que consomem xilose, uma vez que a velocidade de fermentação de xilulose pela levedura é muito baixa. Propôs-se então um novo processo, onde a alimentação seria feita de xilooligômeros, os quais somente seriam transformados em xilose pela ação de xilanases co-imobilizadas, que passariam a fazer parte do biocatalizador inicial. Esse processo se mostrou eficiente para a produção de etanol, o qual teve pedido de depósito de patente e se encontra em desenvolvimento no grupo (MILESSI, 2017).

Desta forma, este trabalho está relacionado ao desenvolvimento do processo SHIF e está focado na etapa de hidrólise enzimática dos xilooligômeros. O objetivo principal deste trabalho foi o estudo cinético da hidrólise dos xilooligômeros catalisados por xilanases e  $\beta$ -xilosidases em suas formas livres e imobilizadas, visando a futura aplicação das mesmas no processo SHIF de produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de açúcar. Foram estudados dois coquetéis enzimáticos comerciais contendo endo/exo xilanases,  $\beta$ -xilosidase e enzimas auxiliares, uma xilanase recombinante com ação endo e uma  $\beta$ -xilanase recombinante. As enzimas foram caracterizadas cineticamente na forma livre e as recombinantes, inclusive na forma imobilizada. Foram estudadas as influências da concentração de enzimas, substrato e possíveis inibidores do processo, bem como pH e temperatura dos complexos estudados. Foram também avaliadas a estabilidade térmica e o comportamento das hidrólises enzimáticas tanto no substrato de eucalipto quanto nos licores de bagaço de cana-de-açúcar.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Materiais Lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos ou biomassa lignocelulósica são termos referentes a biomassa vegetal que se encontra ao longo de toda a crosta terrestre. A parede celular destes materiais é composta basicamente por celulose (40-50%), hemicelulose (25-30%) e lignina (15-25%) (U.S. DOE., 2015). As principais fontes de lignocelulósicos são relacionados a práticas agrícolas, oriundas de manutenção de florestas e processamento de madeiras, gerando a cada ano grandes quantidades de resíduos destes materiais (CANO, PALET, 2007). Na Tabela 1 encontram-se a composição básica de diversos tipos de materiais lignocelulósicos.

**Tabela 1** - Composição química (% peso seco) de diferentes materiais lignocelulósicos.

<b>Classificação geral das biomassas</b>	<b>Biomassa lignocelulósica</b>	<b>Celulose</b>	<b>Hemicelulose</b>	<b>Lignina</b>
Madeira dura	Sicômoro Americano	37,2 – 41,8	17,6 – 19,6	25,0 – 27,3
	Gafanhoto preto	39,3 – 42,6	16,6 – 18,9	24,4 – 28,6
	Eucalipto	46,6 – 50,3	12,7 – 14,4	26,9 – 28,2
	Álamo híbrido	40,3 – 47,3	16,6 – 22,6	15,5 – 16,3
	Salgueiro	42,4 – 45,3	20,6 – 22,9	16,9 – 18,9
	Carvalho	40,4	35,9	24,1
Madeira maleável	Pinheiro	42,0 – 50,0	24,0 – 27,0	20,0
Resíduos agrícolas	Bagaço de cana-de-açúcar	31,9 – 43,4	12,2 – 25,5	23,1 – 27,6
	Palha de arroz	29,2 – 34,7	23,0 – 25,9	17,0 – 19,0
	Casca de arroz	28,7 – 35,6	12,0 – 29,3	15,4 – 20,0
	Palha de milho	30,6 – 38,1	19,1 – 25,3	16,7 – 21,3
	Sabugo de milho	33,7 – 41,2	31,9 – 36,0	6,1 – 15,9
	Talos de milho	35,0 – 39,6	16,8 – 35,0	7,0 – 18,4
	Casca de trigo	35,0 – 39,0	23,0 – 30,0	12,0 – 16,0
	Casca de cevada	36,0 – 43,0	24,0 – 33,0	6,3 – 9,8
	Casca de aveia	31,0 – 35,0	20,0 – 26,0	10,0 – 15,0
	Casca de sorgo	32,0 – 35,0	24,0 – 27,0	15,0 – 21,0
Culturas herbáceas	Festuca alta	23,4 – 26,4	18,2 – 20,4	10,9 – 14,8
	Gramínea	26,8 – 37,5	22,4 – 28,8	13,2 – 22,5
	Miscanthus	35,0 – 40,0	16,0 – 20,0	20,0 – 25,0
	Tabaco	22,0 – 30,0	15,0 – 20,0	15,0 – 25,0
Outros resíduos	Iodo de celulose	31,4	9,8	15,3
	Resíduo de agave	30,7	16,9	16,9
	Polpas químicas de papel	60,0 – 70,0	10,0 – 20,0	5,0 – 10,0
	Esterco de gado sólido	1,6 – 4,7	1,4 – 3,3	2,7 – 5,7

Fonte: MUSSATTO (2016)

Para converter a biomassa lignocelulósica em materiais de maior valor agregado (xilitol, XOS, biopolímeros, entre outros), primeiramente, é importante fazer um estudo das

características morfológicas destes materiais. A Figura 1 representa a estrutura morfológica dos materiais lignocelulósicos, na qual a celulose está representada pela fibra verde escuro, a lignina está em marrom e a hemicelulose em verde claro.

**Figura 1** - Ilustração tridimensional da estrutura de biomassas lignocelulósicas.



Fonte: U.S. DOE (2015)

### 2.1.1 Celulose

A celulose é um polímero linear constituído por longas cadeias de D-glicose, nas quais os monômeros de açúcar são agrupados por ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas, que formam as unidades de celobiose e liberam uma molécula de água. Estas cadeias são formadas por camadas unidas por forças de van der Waals com ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, sua geometria covalente e não ramificada dá origem a uma estrutura de fibras alongadas (ROSS ET AL., 1991; WYMAN, 1994).

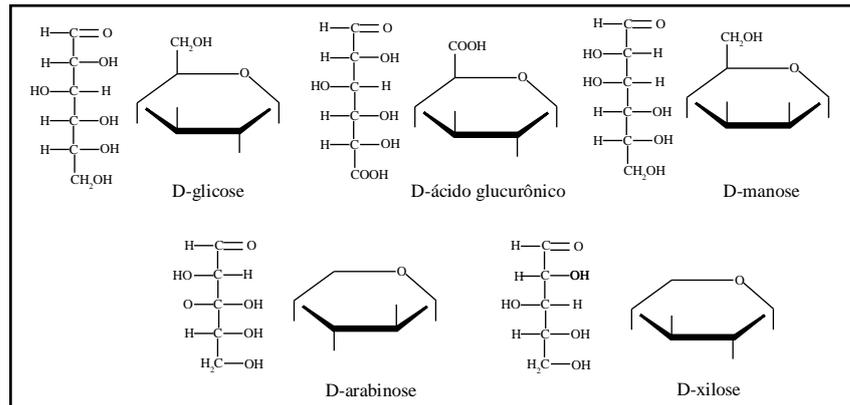
Devido a esta complexa estrutura fibrosa e à presença regular de ligações de hidrogênio, a celulose é um composto muito resistente a tração e insolúvel na maioria dos solventes (SJÖSTRÖM, 1981).

### 2.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais comuns na natureza, representando cerca de 20 a 35% do complexo lignocelulósico, o que pode variar conforme a biomassa (SAHA, 2003). Ao contrário da celulose, a hemicelulose pode ser considerada um polímero de

estrutura química heterogênea, composto por pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e ácidos urônicos (4-O-metil-glucurônico, ácido galacturônico) (SJÖSTRÖM, 1981; MAMMAN, 2008). Em madeiras duras também é possível encontrar traços de ramnose. A Figura 2 apresenta a estrutura dos monossacarídeos mais abundantes na hemicelulose.

**Figura 2 -** Estrutura dos monossacarídeos mais abundantes na hemicelulose.



Fonte: adaptado de MAMMAN (2008).

As unidades de pentoses e hexoses presentes na hemicelulose formam cadeias poliméricas complexas repletas de ramificações, as quais formam ligações cruzadas de pontes de hidrogênio, facilitando a sua interação com a celulose e conferindo maior estabilidade ao material (FASANELLA, 2008; RAMOS, 2003). As cadeias laterais presentes no agregado também permitem a interação da hemicelulose de forma polar com a celulose e de forma apolar com a lignina (WOLF, 2011).

É importante ressaltar que a composição da hemicelulose varia consideravelmente dependendo de sua natureza, por exemplo, a hemicelulose presente em madeiras duras é composta principalmente por xilanas, já madeiras mais macias contém maior quantidade de glucomanas (MAMMAN, 2008). A Tabela 2 apresenta as típicas composições da hemicelulose.

**Tabela 2** – Classificação básica da hemicelulose.

<b>Hemicelulose</b>	<b>Ocorrência</b>	<b>% na Madeira</b>	<b>Solubilidade</b>
Galactoglucomanana	Madeira macia	5 – 8	Alcalinos e água
(Galacto)Glucomanana	Madeira macia	10 – 15	Borato alcalino
Arabinogluconoxilana	Madeira macia	7 – 10	Alcaninos, DMSO* e água*
Arabinogalactana	Madeira de lariço	5 – 35	Água
Glucoronoxilana	Madeira dura	15 – 30	Alcalinos e dimetilsulfoxido*
Glucomanana	Madeira dura	2 – 5	Borato alcalino

NOTA: \*Solubilidade parcial. Fonte: adaptado de SJOSTROM, 1981.

A Tabela 3 relaciona as principais diferenças entre a hemicelulose e a celulose.

**Tabela 3** - Diferença entre hemicelulose e celulose.

<b>Celulose</b>	<b>Hemicelulose</b>
Formada por cadeias de glicose	Composta por unidades de pentoses e hexoses
Alto grau de polimerização (100 a 15000)	Baixo grau de polimerização (50 a 300)
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Apresenta regiões cristalinas e amorfas	Apresenta somente regiões amorfas
É atacado lentamente por ácido inorgânico diluído a quente	É atacado rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente
Insolúvel em soluções alcalinas (exceto em altas temperaturas e/ou conc. de reagentes)	Solúvel em soluções alcalinas diluídas

Fonte: adaptado de BIANCHI (1995).

### 2.1.2.1 Xilanas

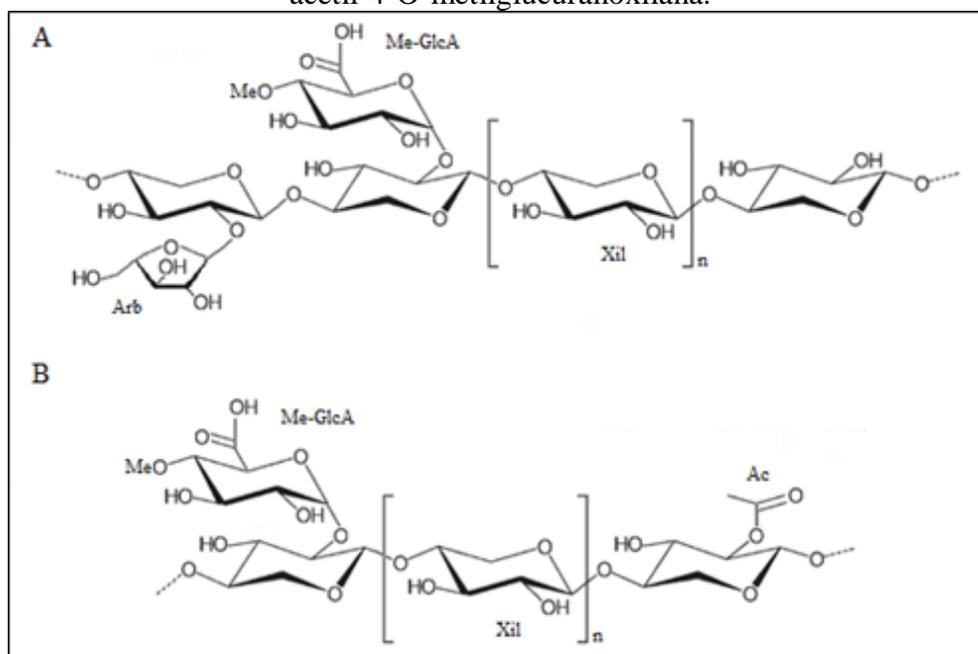
A xilana trata-se de um heteropolissacarídeo composto em sua grande maioria de ligações  $\beta$ -1,4 de resíduos de D-xilanopiranosil com diversas ramificações que podem conter moléculas de L-arabinose, grupos acetil, D-galactose, D-ácido glucurônico e resíduos de ácido ferúlico e cumárico (SOUZA, 2013). A diferença entre a estrutura da xilana depende da natureza da matéria-prima vegetal.

As xilanas podem ser utilizadas em diversos setores industriais como em fármacos sendo utilizados como aditivos, na indústria papelreira colaborando para a qualidade do papel e também na indústria de alimentos auxiliando na conservação dos alimentos através de biofilmes (LUCENA et al., 2017; QUARESMA, 2014).

Os tipos de xilanas mais comuns de se extrair podem ser encontrados em dois grupos distintos, no caso de madeiras duras como Eucalipto e Bétula, o grupo substituinte é o O-acetil-4-O-metilglucuranoxilana, já em madeiras macias como gramíneas e cana-de-açúcar o grupo

substituinte mais presente é o arabino-4-O-metilglucuranoxilana (WONG et al., 1988). A Figura 3 apresenta a configuração base das xilanas.

**Figura 3** – Estrutura base para xilana de (A) arabino-4-O-metilglucuranoxilana e (B) O-acetil-4-O-metilglucuranoxilana.



Fonte: Adaptado de EBRINGEROVA e HEINZE (2000).

Entre os métodos mais usuais de extração de xilana destaca-se a extração com soluções alcalinas (NaOH ou KOH), DMSO e utilizando o composto nitren.

GARCIA et al. (2000) extraíram xilana de espiga de milho com DMSO em uma solução de NaOH 4%, afim de comparar as diferentes soluções de xilana extraídas. SUN et al. (2012) extraíram xilana de bambu, HETTRICH et al. (2006) estudaram a extração de xilana de flocos de aveia, nos quais em todos os estudos foram utilizadas soluções de NaOH para a extração. MARQUES (2014) e QUARESMA (2014) estudaram a extração de xilana da polpa de eucalipto branqueada via soluções alcalinas, MAGATON e colaboradores (2008) partiram do eucalipto bruto, o qual foi deslignificado e então a xilana foi extraída por DMSO.

JANZON, SAAKE e PULS (2008) estudaram a extração de xilanas de polpa de eucalipto branqueada, polpa sulfite de faia, mix de polpas *softwood* e polpa branqueada de bétula por três diferentes métodos de extração, utilizando NaOH, KOH e Nitren (complexo organometálico) como solventes. No estudo em questão, o nitren se mostrou promissor utilizando uma quantidade menor de reagente para produzir a mesma quantidade de xilana,

porém deve-se remover a quantidade de níquel formado, sendo esta uma das principais desvantagens do processo.

A Tabela 4 apresenta alguns dos estudos envolvendo a extração de xilana, a partir de diferentes matérias-primas e métodos aplicados, os quais percebe-se que é possível obter elevados rendimentos de extração.

**Tabela 4** – Estudos de extração de xilana de diferentes materiais.

<b>Autores</b>	<b>Matéria-prima</b>	<b>Extração</b>	<b>Proporção (m/v)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
SUN et al. (2012)	Bamboo	NaOH 0,8 - 8%	01:25	73,53 - 92,65
MARQUES (2014)	polpa de eucalipto branqueada	NaOH 10%	01:20	65 – 85
QUARESMA (2014)	polpa de eucalipto branqueada	NaOH 10%	-	55 – 81
	polpa sulfite de faia	NaOH 10%	01:20	90,2
JANZON, SAAKE e PULS (2008)	polpa de bétula branqueada	NaOH 10%	01:20	96,92
		NaOH 10%	01:20	95,9
	polpa de eucalipto branqueada	KOH 10%	01:20	83,11
		Nitren 5%	01:10	76,35

Fonte: Autor.

#### **2.1.2.1.1 Xilooligossacarídeos**

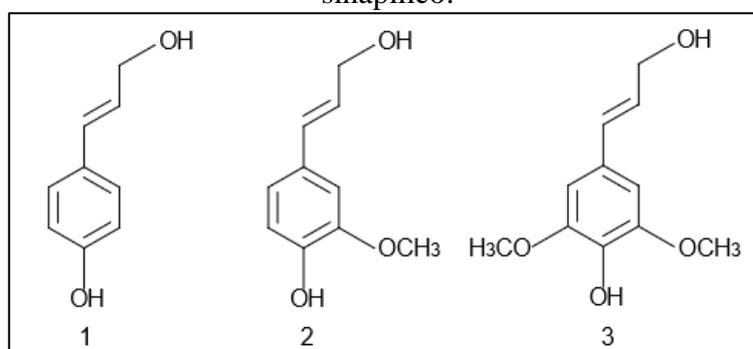
Os xilooligossacarídeos (XOS) são oligômeros de açúcar formados por unidades de xilose (2-7), que por possuírem propriedades benéficas a saúde humana vem ganhando espaço na indústria de alimentos e de fármacos em todo o mundo. Os XOS são reconhecidos por muitos estudiosos como prebióticos, nutrientes que auxiliam na redução do colesterol, melhorando a absorção de cálcio no organismo, agem como antioxidantes, além de apresentarem atividade imunológica com efeito antitumoral (AACHARY; PRAPULLA, 2011; GOLDMAN, 2009)

Os XOS podem ser produzidos a partir de xilana proveniente de qualquer matéria-prima vegetal. Após a extração desta xilana na forma oligomérica, a produção de XOS requer etapa de hidrólise controlada, fazendo com que ocorra a redução do peso molecular desses oligômeros. O método mais recomendado para este tipo de processo é a hidrólise enzimática por endoxilanasas, minimizando a produção de xilose (MENEZES; DURRANT, 2008)

### 2.1.3 Lignina

A lignina é um polímero que possui uma estrutura polifenólica tridimensional e amorfa, a qual é composta por unidades de fenilpropano derivadas da polimerização oxidativa de três precursores monoméricos: os álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 4) (DENCE; LIN, 1992). Estes precursores são obtidos a partir da glicose (gerada pela fotossíntese) através de rotas enzimáticas (FENGEL; WENEGER, 1989).

**Figura 4** - Precursores da lignina <sup>1</sup>álcool p-cumarílico, <sup>2</sup>p-álcool coniferílico e <sup>3</sup>álcool sinapílico.



Fonte: Adaptado de SJOSTROM (1983)

Mesmo sendo a última substância incorporada à parede celular, a lignina possui um papel fundamental nos materiais lignocelulósicos, agindo como material ligante, aumentando sua rigidez e atuando como barreira contra degradação enzimática e/ou microbiana da parede celular (FENGEL; WEGENER, 1989).

### 2.1.4 Extrativos e cinzas

Além dos três principais componentes já mencionados, existem outros compostos com menores proporções, como os compostos extrativos e as cinzas.

Os compostos extrativos são componentes orgânicos de baixo peso molecular, geralmente solúveis em solventes orgânicos como etanol ou acetona. Os extrativos constituem um grupo heterogêneo que pode conter ceras, ácidos graxos, resinas, clorofilas, terpenóides, substâncias fenólicas, entre outras. Estes compostos proporcionam diferentes funções na planta, tais como cor, cheiro, proteção química, reserva nutritiva e sabor (BROWNING, 1967).



As cinzas contêm compostos inorgânicos geralmente absorvidos diretamente do solo. Entre os sais minerais os sais de cálcio, potássio, magnésio, manganês, ferro e cobre são os mais frequentes neste tipo de biomassa (MC NAUGHTON et al., 1985).

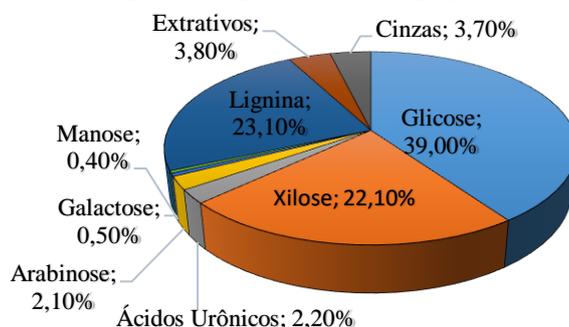
### 2.1.5 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*) é uma planta original da Nova Guiné e se espalhou pelo mundo através da migração, chegando ao Brasil em 1520. Hoje em dia o Brasil é o primeiro no ranking de produção de açúcar e também é o maior exportador de etanol do planeta graças a cana (NOVACANA). No país o cultivo da cana-de-açúcar, em termos de superfície ocupada, só perde para o cultivo da soja e do milho, sendo o estado de São Paulo responsável por cerca de 60% da produção (CONAB, 2017).

Quando a cana-de-açúcar vai para a usina, em geral, é lavada e segue para o sistema de preparo e extração, no qual um conjunto de rolos da moenda separa o caldo que contém a sacarose da fibra (bagaço) que corresponde de 8 a 14% da biomassa (BIOETANOL, 2008). Conforme dados apresentados pela CONAB (2015), em geral o processamento de uma tonelada de cana de açúcar gera 280 kg de bagaço, com umidade em torno de 50% (140 kg de bagaço seco).

O bagaço da cana-de-açúcar é um material lignocelulósico, sua composição química depende de diversos fatores como a espécie da planta e até mesmo o solo onde é cultivada. Uma composição química mais detalhada do bagaço de cana foi publicada por VAN MARIS e colaboradores (2006), apresentada na Figura 5.

**Figura 5** - Composição química do bagaço de cana-de-açúcar.



Fonte: adaptado de VAN MARIS et al. (2006).

A hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar é classificada como glucoranoarabinoxilana (PENG et. al., 2009), nesta fração BRIENZO et. al. (2010) encontra a composição de 80,9% de xilose, 3,8% de arabinose, 4,2 de glicose e 3,2 de ácido glucurônico. A partir dos dados apresentados e sabendo-se que o rendimento de produção de etanol a partir de xilose é de aproximadamente  $0,45 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{xilose}}$  (MILESSI, 2017), estima-se que a partir de 1 tonelada de bagaço de cana-de-açúcar seco é possível produzir mais de 100 L de etanol.

### **2.1.6 Polpa de Eucalipto Branqueada**

As árvores de eucalipto são responsáveis pela produção de 98% da celulose do país, este fato pode ser explicado pois o Brasil possui um clima favorável para o desenvolvimento do eucalipto, essas árvores crescem em apenas 7 anos e chegam a atingir cerca de 35 metros de comprimento (BRACELPA, 2010). Em 2016 o Brasil se tornou o maior produtor mundial de celulose de fibra curta (Eucalipto), pois esse gênero é o principal responsável por grande parte da área plantada no país, com um total de 5,56 milhões de hectares, que são responsáveis por produzir 72% da celulose do país (IBÁ, 2016). O eucalipto por ser um material lignocelulósico é composto quimicamente por frações que variam de 46-50,3% de celulose, 12,7-23% de hemicelulose, 26,9-33% de lignina, 0,1-0,2% de cinzas e 2-5% de extrativos (CARVALHO et al., 2015; MUSSATO, 2016).

Para produção de celulose e papel o processo dominante na indústria é o processo Kraft, que utiliza hidróxido de sódio (NaOH) e sulfeto de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) para o branqueamento de polpas de madeira. No processo, metade da madeira é dissolvida formando um tipo de licor negro que é separado da polpa por lavagem e em seguida enviado para o sistema de recuperação de kraft, onde os reagentes inorgânicos de polpação são recuperados enquanto os produtos orgânicos dissolvidos são usados como combustível para produzir vapor e energia (TRAN; VAKKILAINNEN, 2008).

No decorrer do processo de polpação, a solução a quente, contendo NaOH e  $\text{Na}_2\text{S}$ , pode degradar a hemicelulose e a lignina, e também pode afetar as longas cadeias de xilana que se transformam em polissacarídeos de menor massa molecular. Ao final do processo ocorre uma queda no pH, na qual parte das xilanas dissolvidas pode precipitar ou ainda ser adsorvida na superfície da polpa, acarretando em um maior rendimento da polpação (MAGATON; PILÓ-VELOSO; COLODETTE, 2008). A composição química da polpa de eucalipto branqueada ou polpa kraft variam consideravelmente na literatura. Foram encontrados valores para fração de celulose entre 73-93%, hemicelulose 5,7-13% e lignina 1,2-8% (TEIXEIRA et. al., 2015). A

Figura 6 apresenta a polpa de eucalipto branqueada em blocos e em folhas, as duas maneiras como ela pode ser armazenada nas indústrias.

**Figura 6** – Polpa branqueada de eucalipto em blocos e em folhas.



Fonte: Autor.

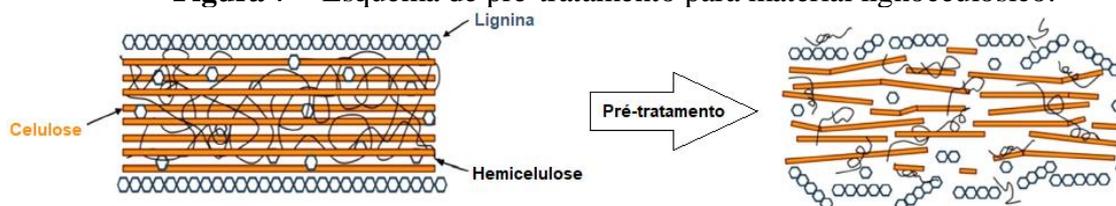
A polpa branqueada de eucalipto é um material fácil de ser encontrado pois é a principal matéria-prima utilizada na produção de papéis para impressão, para escrever ou ainda papéis higiênicos, graças a sua alta capacidade absorvente (IBÁ, 2016).

## 2.2 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

Como mencionado anteriormente, as biomassas lignocelulósicas possuem propriedades que agem como uma barreira a ações de enzimas e microrganismos, assim para ocorrer a completa hidrólise deste material é necessário romper sua complexa matriz e para isto é necessário a inserção de uma etapa de pré-tratamento para o estudo destes materiais.

O pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos consiste em remover a lignina e a hemicelulose do bagaço, ao mesmo tempo que reduz a estrutura cristalina da celulose e aumenta a porosidade do material, como pode ser observado na Figura 7. Um pré-tratamento considerado eficaz é aquele que tem a capacidade aumentar a produção de açúcares, evitar a degradação ou perda de carboidratos, minimizar a produção de subprodutos inibidores (como o furfural, hidroximetilfurfural e lignina) de processos subsequentes e diminuir os custos do processo (SUN; CHENG, 2002).

**Figura 7** – Esquema de pré-tratamento para material lignocelulósico.



Fonte: adaptado de MOOD et al. (2013).

Muitos tipos de pré-tratamento vêm sendo estudados nos últimos anos, os quais geralmente são baseados em processos físicos, químicos e biológicos.

Os processos físicos visam aumentar a área superficial facilitando o acesso aos poros do material, diminuindo a cristalinidade e o seu grau de polimerização (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Podem ser considerados pré-tratamentos físicos a moagem, lascamento, pirólise, expansão entre outros.

Os processos químicos fazem uso de algum reagente químico para que ocorra o pré-tratamento. Desta forma, deve-se sempre levar em conta o custo do reagente utilizado e também se o processo não irá produzir muitos resíduos. Os processos mais utilizados para hidrólise de materiais lignocelulósicos são a hidrólise ácida concentrada que ocorre de forma rápida e agressiva (elevada temperatura e pressão) transformando toda a hemicelulose em xilose e produzindo concentrações consideráveis de furfural e HMF; a hidrólise alcalina é realizada em condições de temperatura e pressão mais baixas quando comparada a ácida, em geral emprega-se como reagente o hidróxido de sódio e retira grande parte da lignina presente no bagaço; e por fim o processo organossolve que faz uso de solventes orgânicos como o etanol ou metanol, o qual pré-hidrolisa o material, porém tem como desvantagem o processo de remoção do solvente utilizado (SILVA, 2015; WOLF, 2011).

Também é possível utilizar processos físico-químicos como é o caso da explosão a vapor, que faz uso de vapor saturado e alta pressão, expandindo assim a matriz lignocelulósica, o que pode gerar grande quantidade de inibidores; e o pré-tratamento hidrotérmico o qual utiliza água em elevada temperatura e pressão, neste processo a produção de inibidores é menor se comparado a explosão a vapor e também há uma boa recuperação de pentoses (MANRICH, 2012)

Portanto, para escolher o pré-tratamento mais adequado para cada biomassa é necessário avaliar quais são os produtos de interesse e também avaliar os custos mecânicos e de reagentes envolvidos no processo. A Tabela 5 apresenta uma relação de alguns pré-tratamentos estudados aplicados ao bagaço de cana-de-açúcar.

**Tabela 5** – Estudos de pré-tratamentos aplicados ao bagaço de cana-de-açúcar.

<b>Autor</b>	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Inibidores</b>
(SILVA, 2015)	Hidrotérmico	Remoção hemicelulose 83,7%	195 °C 10 min	Baixas concentrações de furfural < 0,8 g/L e HMF < 0,04 g/L.
(MANRICH, 2012)	Organossolve	Remoção hemicelulose 43%	170 °C, 60 min, 50% etanol	Solvente utilizado, furfural e HMF em baixas concentrações.
	Alcalino	Rendimento de 53% de xilana	60 min 121°C NaOH 4%	Remove a lignina com baixa produção de compostos inibidores.
(WOLF, 2011)	Organossolve	Rendimento de 50,5% de XO	170 °C 60 min 50% etanol	Alta concentração do solvente utilizado, furfural e HMF em baixas concentrações.
(NASCIMENTO, 2011)	Alcalino	Rendimento de 65% de xilana	4% NaOH 60 min	Remove a lignina com baixa produção de compostos inibidores.
	Explosão à vapor	Rendimento de 70% de xilana	1:5 m/v H <sub>2</sub> O 70 °C 30 min	Baixas concentrações de ác.acético 0,46 g/L e furfural 0,43 g/L.
	Ácido	Rendimento de 94% de xilana	0,8% v/v H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 13 min 83 °C	Baixas concentrações de ác.acético 0,23 g/L e furfural 0,004 g/L.

Fonte: Autor.

## 2.3 Hidrólise da hemicelulose

A hidrólise da hemicelulose é facilitada devido à sua baixa cristalinidade e menor grau de polimerização, o que faz com que sua estabilidade térmica e química sejam inferiores quando comparada à celulose (WYMAN et al., 2005). Existem duas técnicas que são amplamente empregadas na hidrólise para liberação de açúcares, as quais são a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática.

### 2.3.1 Hidrólise ácida

A hidrólise ácida ocorre a temperatura elevada e de maneira rápida transformando praticamente toda a cadeia polimérica em monossacarídeos, essa hidrólise é conhecida por produzir inibidores a processos fermentescíveis, além de ser necessária a recuperação do ácido ao fim do processo (no caso da utilização de ácidos concentrados) e utilização de equipamentos resistentes a corrosão (SUN; CHENG, 2002).

### 2.3.2 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos vem sendo o objeto da maior parte dos estudos efetuados a nível mundial (SOARES; ROSSELL, 2004).

Este tipo de hidrólise ocorre em condições brandas e tem a possibilidade de formar produtos de diferentes valores agregados. Processos enzimáticos vem sendo considerados mais adequados sob ponto de vista ambiental e geralmente formam produtos de melhor qualidade. No caso da hidrólise da hemicelulose é possível produzir tanto xilooligossacarídeos quanto a própria xilose (MANRICH, 2012).

Existem diversos estudos relacionados à hidrólise enzimática da fração hemicelulósica que buscam compreender os mecanismos envolvidos na relação das diferentes enzimas e substratos envolvidos nos mais diversos processos.

BRIENZO e colaboradores (2010), estudaram a hidrólise enzimática de hemicelulose extraída de bagaço de cana-de-açúcar, por um extrato enzimático de *Thermoascus aurantiacus* a 50 °C, os experimentos foram avaliados através de um planejamento experimental contendo diferentes concentrações de substrato e cargas enzimáticas, no qual observou-se que com 2% de hemicelulose e 60 U/g de enzimas foi possível obter 39% de xilose, 59% de xilobiose e 2% de outros XOS como melhores resultados para o processo.

MANRICH (2012) realizou experimentos com hemicelulose de bagaço de cana e também com xilana de faia, estudou a hidrólise de 3 enzimas comerciais (Accellerase XY A03304, NS50014 e NS 22036) e uma sintetizada por *B. subtilis*. Em seus resultados verificou que em ambos os substratos as enzimas produziram grandes concentrações de XOS e menores quantidades de xilose.

MILESSI (2017) estudou o processo de hidrólise, isomerização e fermentação simultâneos (SHIF) de xilooligômeros, para isto testou 7 complexos enzimáticos distintos em substrato de faia. A enzima Multifect CX XL e a xilanase recombinante de *Bacillus subtilis* (XynA) foram selecionadas para compor os *beads* de seu biocatalisador. A Multifect apresentou melhor conversão (78,7%) e maior produção de xilose na hidrólise da xilana de faia, enquanto XynA apresentou exclusiva atividade de endoxilanase,

## 2.4 Enzimas

As enzimas que hidrolisam a hemicelulose são chamadas de hemicelulases, as quais são definidas e classificadas de acordo com o grupo que atacam, sendo agrupadas como hidrolases

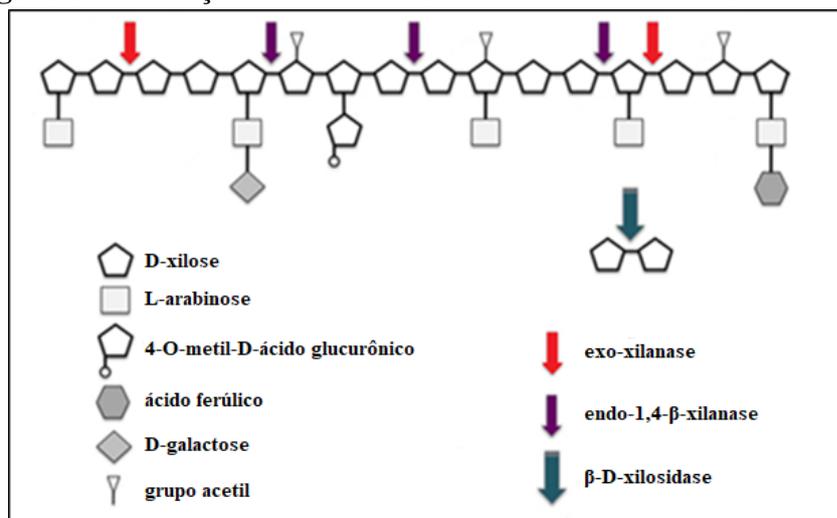
glicosil (GH) (SHARMA; KUMAR, 2013). Entre o grupo das hemicelulases destacam-se as endoxilanasas que hidrolisam as ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas da cadeia principal da xilana, as exoxilanasas e as  $\beta$ -xilosidasas complementam a ação na cadeia principal hidrolisando xilooligossacarídeos curtos em xilose. As  $\alpha$ -arabinofuranosidasas são principalmente exoenzimas que liberam arabinose da cadeia principal da xilana, formando arabinoxilana, arabioglucoxilanas e arabinanas (DUMON et al., 2012).

Outras enzimas que são necessárias na degradação da hemicelulose são as enzimas acessórias, estão a  $\alpha$ -galacturônidase, que age liberando galactose, a  $\alpha$ -glucuronidase, que remove o ácido 4-O-metil-D-glucurônico, a feruloil esterase libera o ácido ferúlico e a acetil-xilano esterase que atua removendo grupos acetatos da hemicelulose (SOUZA, 2013)

#### 2.4.1 Xilanasas e $\beta$ -xilosidase

Como já mencionado, tanto as xilanasas quanto as  $\beta$ -xilosidasas são enzimas fundamentais para a hidrólise de frações hemicelulósicas, devido sua alta especificidade, baixa perda de substrato e pouca geração de resíduos (MICHELIN et al., 2008). Estas enzimas vêm ganhando espaço principalmente nas indústrias de produtos alimentares e na produção de papel (DOBREV et al., 2007). A Figura 8 apresenta uma ilustração de como estas enzimas atacam uma cadeia de xilana.

**Figura 8** – Ilustração de um sistema hemicelulósico de arabinoxilana.



Fonte: adaptado SOUZA (2013)

As endoxilanases tem como nome oficial endo-1,4-xilanase, e formam o maior grupo de enzimas envolvidas na degradação da xilana, as quais são responsáveis por clivar as ligações glicosídicas da cadeia principal da xilana, transformando-as em xilooligômeros menores. Estas enzimas possuem características próprias que estão diretamente ligadas com sua origem, uma vez que as endoxilanases podem ser produzidas em condições variadas por diferentes microrganismos (fungos, bactérias entre outros) (BASTAWDE, 1992).

Endoxilanases são classificadas por famílias, as duas principais famílias são a 10 e a 11. A família 10 tem como principais características massa molecular maior que 30 kDa e valores baixos de ponto isoelétrico. A família 11 (GH 11), em contrapartida, contém enzimas de massa molar menor que 30 kDa, altos valores de ponto isoelétrico, possuem menor versatilidade, maior especificidade, moléculas menores e compactas que possuem menor flexibilidade conformacional e maior profundidade do sítio ativo, quando comparadas as GH 10 (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

Mesmo que ambas endoxilanases tenham preferência em atacar ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4-internas da xilana, como possuem diferentes especificidades de substratos, acabam formando diferentes produtos. O GH 10, com menos especificidade ao substrato, é capaz de atacar pontos próximos a ramificação e as extremidades não redutoras da cadeia, liberando XOS lineares mais curtos, podendo até mesmo liberar xilose. O GH 11 apresenta uma preferência em atacar regiões menos substituídas, liberando fragmentos de XOS maiores (BIELY et al., 1997).

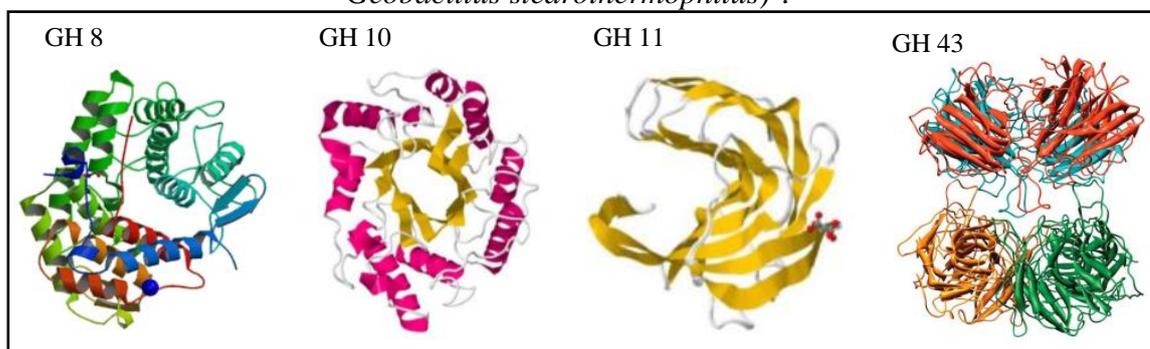
As exoxilanases são produzidas principalmente por bactérias e fungos, pertencem a família 8 (GH 8) e podem hidrolisar a xilana através de sua extremidade redutora formando XOS de cadeias curtas que geralmente podem ser degradados por  $\beta$ -xilosidases (JUTURU; WU, 2014).

As enzimas  $\beta$ -xilosidases liberam monômeros de xilose, pois atacam extremidades não redutoras de XOS. Essas enzimas podem ter conformação monomérica, dimérica ou tetramérica, possuem peso molecular que varia de 26 a 360 kDa, e são produzidas por diversas espécies de bactérias e fungos (CORRAL; VILLASEÑOR-ORTEGA, 2006). As betas são agrupadas em cinco família diferentes (GH 3, 39, 43, 52 e 54), porém as mais abundantes e melhor caracterizadas são a GH 3 e a GH 43. O GH 3 inclui membros que possuem diversas atividades enzimáticas e características, pois é possível encontrar atividade de  $\beta$ -D-glicosidase,  $\beta$ -D-xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidases. Como existe essa variedade de características dentre a família de genes, se torna mais difícil encontrar estruturas de cristal disponíveis para enzimas com atividade  $\beta$ -xilosidase dessa família (FAURE, 2002).



A família 43 possui mecanismo de inversão, na qual sua estrutura cristalina para duas  $\beta$ -xilosidases estudadas revelaram a presença de dois domínios, um domínio catalítico  $\beta$ -N-terminal de cinco cabeças e um domínio em sanduíche  $\alpha$ - $\beta$  C-terminal (BRUNZELLE et al., 2008; BRÜX et al., 2006). A Figura 9 apresenta a estrutura tridimensional das famílias 8, 10, 11 e 43.

**Figura 9** - Representação da estrutura tridimensional típica das xilanases dos grupos GH 8 (produzida por *Bacillus halodurans*)<sup>1</sup>, GH 10 (produzida por *Streptomyces lividans*)<sup>2</sup>, GH 11 (produzida por *Trichoderma reesei*)<sup>3</sup> e  $\beta$ -xilosidase do grupo GH 43 (produzida por *Geobacillus stearothermophilus*)<sup>4</sup>.



Fonte:<sup>1</sup>(JUTURU; WU, 2014), <sup>2</sup>(DEREWENDA, 1994), <sup>3</sup>(MURAKAMI, 2005) e <sup>4</sup>(BRÜX et al., 2006).

#### 2.4.2 Imobilização enzimática

As enzimas possuem estruturas altamente complexas, são solúveis em meio aquoso, frágeis e cada uma se comporta de maneira diferente quando submetida a novas condições com diferentes substratos. A imobilização de enzimas é uma das chaves para a viabilidade do uso das enzimas nos mais diversos setores industriais.

O processo de imobilização de enzimas consiste na união entre uma enzima e um suporte sólido, o que proporciona a enzima as seguintes vantagens: aumento da estabilidade, facilidade na separação entre o catalizador e o produto, possibilidade de reutilização da enzima imobilizada, o que também reflete diretamente no custo do processo (GUISÁN, 2006). Porém como desvantagens este processo pode alterar a conformação natural da enzima ocasionando a perda de atividade durante o processo de imobilização, além do custo suporte a ser utilizado (SILVA, 2013).

Os métodos de imobilização podem ser divididos em três grandes grupos: ligação em um suporte, encapsulação e entrecruzamento, os quais se diferem pela forma de interação da enzima com o suporte ou com ela mesma, os suportes mais comumente utilizados são sílica, quitosana, zeólitas e agarose (SHELDON, 2007).

A imobilização com ligação a um suporte pode ocorrer por três diferentes vias: de natureza física, na qual atuam forças de interação hidrofóbica ou de Van der Waals que preserva as características da enzima porém não resiste às condições de operação industrial; a interação iônica, é realizada por ligações de sais, podendo ser revertida pela mudança nas condições que influenciam as interações, como pH, força iônica e temperatura; e a por ligação covalente, vantajosa por garantir que o catalisador não escape do suporte uma vez que sua ligação é de natureza irreversível, porém como desvantagens não é possível recuperar o suporte nem as enzimas em sua natureza original e geralmente esta técnica leva a perdas excessivas de atividade enzimática (BRYJAK; KOLARZ, 1998).

A técnica de imobilização por ligação covalente é formada entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os aminoácidos residuais da superfície da enzima. Entre os grupos funcionais presentes nos aminoácidos se destacam o grupo amina (NH<sub>2</sub>) da lisina, grupo carboxila (CO<sub>2</sub>H) do ácido aspártico e ácido glutâmico, o grupo hidroxila (OH) da serina ou treonina e o grupo tiol (SH) da cisteína. É importante que a escolha do método seja adequado à enzima, pois caso contrário pode promover inativação da mesma pela reação com aminoácidos residuais do sítio ativo (MIELENZ, 2009).

A imobilização multipontual está ganhando destaque entre as técnicas de imobilização graças ao grande sucesso no aumento da estabilidade das enzimas, na qual diversos grupos de uma mesma molécula de enzima se ligam a grupos reativos do suporte de imobilização (ADRIANO et al., 2008; MANRICH, 2012; MILESSI et al., 2015).

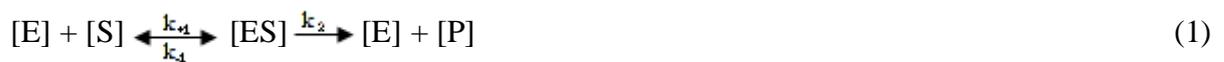
A técnica de imobilização em agarose-glioxil, é muito consolidada entre pesquisadores quando se refere a aumento de estabilidade de moléculas, uma vez que, muitos autores conseguiram os melhores resultados para suas enzimas utilizando este suporte (MANRICH, 2012; TARDIOLI, 2003). Prova disso foram os estudos realizados por MILESSI (2017) que testou três diferentes métodos de imobilização de endoxilânase, obtendo como resultado uma estabilização de 8600 vezes maior para o derivado agarose-glioxil-XynA em relação a enzima solúvel. Porém vale ressaltar que esta técnica apresenta como desvantagens a queda na atividade enzimática e também possui elevado custo do suporte.

## **2.5 Cinética enzimática**

As enzimas são consideradas catalisadores bioquímicos, graças a sua capacidade de diminuir a energia livre de ativação necessária à reação, e assim, aceleram a velocidade das

reações. Para entender o estudo cinético das enzimas é importante conhecer um pouco do mecanismo existente entre enzimas e substratos.

Henri propôs que a atuação da enzima no substrato ocorre em duas etapas, segundo a Equação 1. A primeira etapa da catálise enzimática é a formação de um complexo enzima-substrato, com o substrato se ligando por meio de fendas nos centros ativos das enzimas, ligação essa que é acompanhada por mudanças conformacionais que facilitam, assim, a formação do estado de transição do complexo enzima-substrato [ES], que em uma segunda etapa se rompe para liberar a enzima [E] e formar o produto [P] (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2006).



Baseando-se nesse mecanismo, Michaelis-Menten, usando a hipótese de equilíbrio rápido, e Briggs-Haldane, usando a hipótese de estado estacionário, conseguiram deduzir uma equação hiperbólica (Equação 2) relacionando a velocidade da reação e a concentração de substrato, conhecida como equação de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

Onde:

$V_{\max}$ : é a velocidade máxima de atuação da enzima, onde a enzima se encontra totalmente saturada;

$v$ : velocidade obtida em determinada concentração de substrato;

[S]: concentração do substrato no meio;

$K_M$ : é uma constante de equilíbrio que representa a afinidade da enzima com o substrato.

Esse comportamento hiperbólico é observado experimentalmente, portanto a equação de Michaelis-Menten é uma boa representação matemática do fenômeno. Contudo, o modelo somente se aplica dentro das condições utilizadas para dedução da Equação 2, ou seja:

- Apenas uma enzima e um substrato

- Irreversível (essa hipótese é respeitada também sempre que se tomam as velocidades iniciais da reação, pois para um curto tempo de reação a concentração de produto é muito pequena e, portanto, a velocidade da reação de volta será sempre desprezível;

- Conservação da enzima, Equação 3:

$$E_0 = [E] + [ES] \quad (3)$$

- A enzima e o substrato reagem rapidamente formando o complexo [ES], a etapa de formação do produto é mais lenta, devendo ser a etapa controladora da reação, com a velocidade sendo proporcional à concentração do complexo ES;

- O substrato deve estar em excesso no meio, quando comparado à concentração de enzima, assim a variação da concentração de S será muito maior que a variação da concentração do complexo ES;

- Atinge-se rapidamente a concentração de equilíbrio do complexo, no caso da velocidade de decomposição do complexo em E+S ser muito maior do que a de decomposição em E+P (hipótese de equilíbrio rápido), ou uma concentração menor, quando  $k_2$  for da mesma ordem de grandeza que  $k_{-1}$ , a qual permanece então aproximadamente constante em relação à variação da concentração de substrato (hipóteses de estado pseudo-estacionário) (CHAPLIN; BUCKE, 1990).

Os principais fatores que influenciam na velocidade da reação catalisada por enzimas são: a concentração de enzimas [E], temperatura, pH, concentração de substrato [S] e concentração de inibidores [I].

O efeito da concentração enzimática é uma variável de grande importância no estudo cinético, pois a hipótese de  $[S] \gg [E]$  tem que ser respeitada quando se deseja utilizar o modelo de MM para representar o efeito da concentração de substrato na velocidade da reação. Assim, a relação entre as velocidades iniciais e a variação da concentração enzimática (demais condições experimentais constantes) deve ser proporcional, respeitando a relação apresentada pela Equação 4, assim sabe-se que a concentração de substrato é muito maior que a concentração de enzimas, no estudo cinético.

$$V_{\max} = k_2 [E_0] \quad (4)$$

Onde:

$k_2$ : constante cinética de formação do produto;

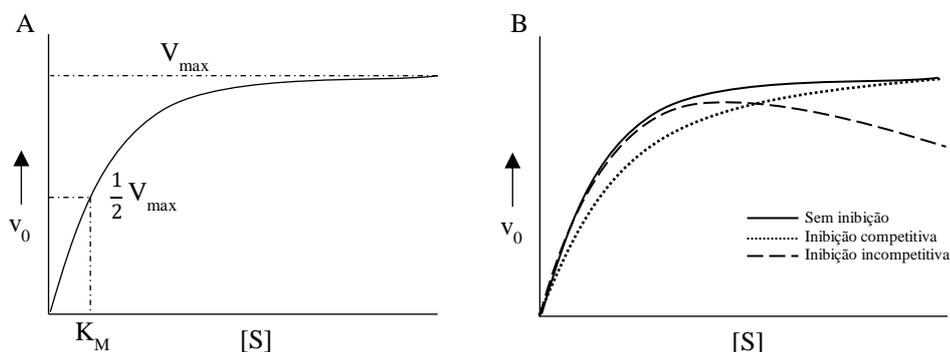
$[E_0]$ : concentração inicial de enzima.

O efeito do aumento de temperatura faz com que mais moléculas atinjam o estado de ativação necessário para reagirem, aumentando assim sua velocidade inicial. Por outro lado, este aumento na vibração das moléculas de enzima conduz à formação de novas interações na estrutura tri-dimensional da molécula, com conseqüente perda da capacidade catalítica. A curva de aumento exponencial da temperatura, segundo Arrhenius, e a curva de inativação térmica combinadas resultam num formato tipo sino, com uma temperatura ou região de temperatura máxima. O efeito do pH, na maioria dos casos, tem perfil similar ao da temperatura, pois existe um ponto de pH ótimo no qual sua atividade é máxima e acima ou abaixo deste valor a velocidade de reação diminui. Neste caso, a variação da atividade está relacionada com a concentração de  $H^+$  no meio, cuja alteração pode modificar a estrutura tridimensional das proteínas, inativando-a. Além disso, o pH pode alterar os estados iônicos de aminoácidos que participam do sítio catalítico, ou de substratos ionizáveis. Essa alteração pode impedir que o aminoácido exerça seu papel na catálise e, no caso de substratos ionizáveis, alterar a concentração da espécie iônica reativa (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000; SHULER; KARGI, 2002).

O aumento da concentração de substrato no meio gera incrementos cada vez menores na velocidade inicial da reação que se aproxima cada vez mais da velocidade máxima, uma vez que todos os sítios ativos das enzimas estiverem ocupados por substrato (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2006). A Figura 10 (A) ilustra o perfil de velocidades iniciais pela variação da concentração de substrato.

Existem diversos inibidores que podem influenciar diretamente na cinética enzimática, por isso é importante conhecer os principais mecanismos existentes. Os três tipos de inibição enzimática reversíveis são: competitiva, na qual o inibidor tem afinidade pelo sítio ativo da enzima ( $K_M$  varia); incompetitiva, onde o inibidor tem afinidade apenas pelo complexo ES ( $V_{max}$  varia); e a inibição não-competitiva o inibidor tem afinidade pela enzima livre, porém longe do sítio ativo, o que muitas vezes causa uma deformação na enzima. Os mecanismos podem ser facilmente distinguidos experimentalmente através dos efeitos aparentes sobre o gráfico de  $v_o$  versus  $[S]$ , como pode-se perceber na Figura 10 (B), que apresenta os efeitos de inibição competitiva e incompetitiva, o efeito de uma inibição não-competitiva seria a união entre os outros dois efeitos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

**Figura 10** – Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima (A) e o efeito da inibição incompetitiva e competitiva (B).



Fonte: CHAPLIN e BUCKE (1990).

### 2.5.1 Modelos cinéticos aplicados a xilanases e $\beta$ -xilosidases

Diversos estudos realizados tanto com endoxilanases quanto com  $\beta$ -xilosidases vêm utilizando como principal modelo cinético o modelo de MM.

As Tabelas 6 e 7 apresentam algumas das referências que utilizaram estes dois tipos de enzimas aplicadas a diferentes substratos em diversas condições, que obtiveram bons ajustes para o modelo de MM, uma vez que tal compilação promove uma visão global das últimas pesquisas.

**Tabela 6** – Revisão sobre cinética enzimática de xilanases.

Autores	Condições <sup>1</sup>	Microrganismo xilanases	Substrato-xilana	$K_M$ (mg mL <sup>-1</sup> )
(SALLES et al., 2000)	T 50°C pH 5,0	<i>Acrophialophora nainiana</i>	Bétula solúvel Bétula insolúvel	40,9 16,1
(BATAILLON et al., 2000)	T 60°C pH 6,0	<i>Bacillus sp.</i>	Bétula	0,7
(LUCENA-NETO; FERREIRA-FILHO, 2004)	T 50°C pH 5,0	<i>Humicola grisea</i>	Aveia solúvel Aveia insolúvel	10,9 11,2
(JUODEIKIENE et al., 2011)	T 40°C pH 4,5	<i>T. reesei</i>	Trigo Bétula	3,2 0,3
		<i>Th. Lanuginosus</i>	Trigo Bétula	2,2 0,2
			<i>Chrysosporthe cubensis</i>	Aveia
(PASSARINHO, 2014)	T 40°C pH 6,5	<i>Orpinomyces</i> <i>Orpinomyces</i> mutante	Trigo	0,002 0,001
(TERRASAN; GUISAN; CARMONA, 2016)	T 65°C pH 6,0	<i>Penicillium janczewskii</i>	Bétula Aveia	7,5 4,2

NOTA: <sup>1</sup> Condições nas quais foram realizadas as medidas de velocidade para a obtenção do parâmetro  $K_M$ . Fonte: Autor.

**Tabela 7** – Revisão da cinética enzimática de  $\beta$ -xilosidases.

Autor	Condições <sup>1</sup>	Microrganismo $\beta$ -xilosidases	Substrato	K <sub>M</sub> (mM)
(YAN et al., 2008)	T 50°C pH 6,5	<i>Paecilomyces thermophila</i> J18	pNPX	0,5
(TENG et al., 2011)	T 50°C pH 7,0	<i>Paecilomyces thermophila</i> em <i>E. coli</i>	pNPX	4,5
(WONGWISANSRI et al., 2013)	T 60°C pH 5,0	<i>Aspergillus sp.</i> em <i>Pichia pastoris</i>	pNPX	1,7
(TERRASAN; GUISAN; CARMONA, 2016)	T 75°C pH 5,0	<i>Penicillium janczewskii</i>	pNPX	1,2

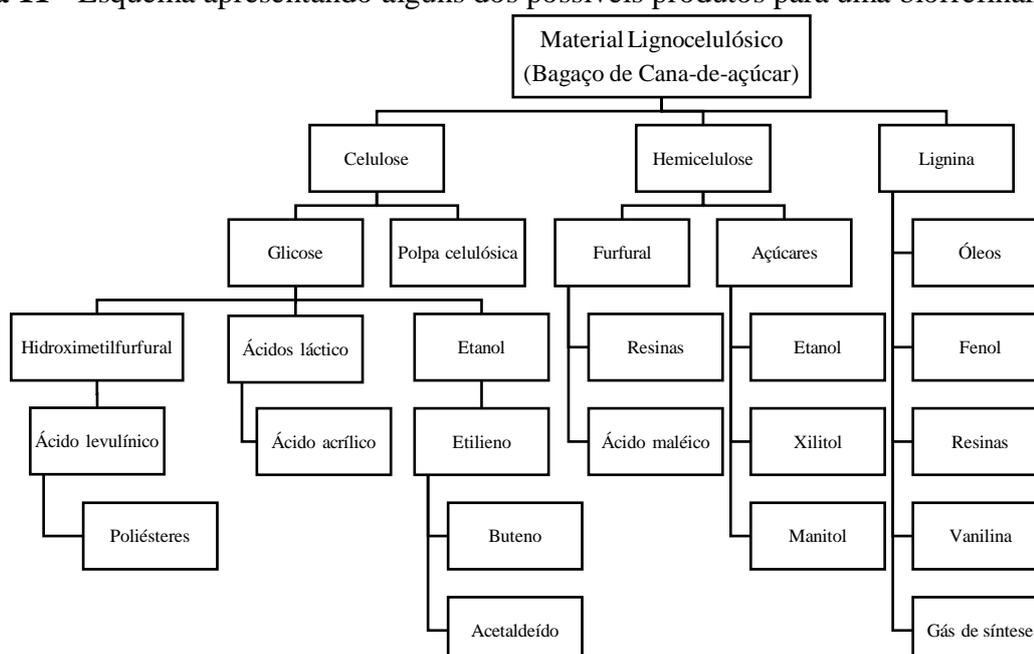
NOTA: <sup>1</sup> Condições nas quais foram realizadas as medidas de velocidade para a obtenção do parâmetro K<sub>M</sub>. Fonte: Autor.

## 2.6 Biorrefinaria da Cana-de-açúcar

O termo biorrefinaria refere-se à conversão de uma biomassa em produtos variados com mínimo desperdício e emissões de gases. As indústrias que transformam materiais de fontes renováveis como bagaço e palha de cana-de-açúcar, palha de cereais entre outros, em produtos de maior valor agregado (JONG et al., 2005).

A cana-de-açúcar é uma biomassa com grande potencial para biorrefinarias, pois além de produzir o açúcar e etanol de primeira geração (1G), esta matéria-prima pode produzir diversos outros produtos obtidos utilizando o bagaço de cana como mostra a Figura 11. A expectativa da produção brasileira de etanol total, para a safra 2017/18, é de 26,45 bilhões de litros de etanol 1G (CONAB, 2017).

**Figura 11** - Esquema apresentando alguns dos possíveis produtos para uma biorrefinaria.



Fonte: adaptado de SCHUCHARD e RIBEIRO (2001).

Quando o etanol é produzido a partir da biomassa lignocelulósica ele é chamado de etanol de segunda geração (2G), normalmente é produzido a partir da hidrólise da fração celulósica da biomassa, porém estudos recentes mostram que o etanol também pode ser produzido a partir da fração hemicelulósica, como no estudo realizado por SILVA (2013).

O processo de produção de bioetanol, a partir de materiais lignocelulósicos, envolve a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares, que em seguida, passam por um processo de fermentação produzindo assim o etanol. A etapa de hidrólise dos polissacarídeos é fonte de muitos estudos, e pode ser realizada por rota ácida e/ou enzimática para a separação dos açúcares (BIOETANOL, 2008).

Uma vez que o aproveitamento das frações hemicelulósicas das biomassas são cruciais para a viabilidade econômica do etanol 2G (FURLAN et al., 2013). AQUINO (2013) estudou a simultânea isomerização e fermentação de xilose a etanol (SIF) usando xilose isomerase (XI) e *S. cerevisiae* coimobilizadas em gel de alginato de cálcio, no qual foram estudadas as influências das concentrações de enzima/levedura no reator, do pH, da temperatura e da linhagem de levedura na produtividade e na seletividade em etanol, obtendo resultados promissores, indicando viabilidade técnica de produção de etanol a partir de xilose com o biocatalisador desenvolvido.

SILVA (2013) também testou o processo SIF, no qual a enzima glicose isomerase e a levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* foram coimobilizadas em gel de alginato de cálcio, e aplicados ao hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (61 g/L de xilose, entre outros componentes) produziu 23 g/L de etanol, com rendimento de 0,34 g/g e produtividade de 1,8 g/L.h. Este estudo também foi realizado continuamente, tendo rendimentos equivalentes ao processo descontínuo (acompanhado durante 7 dias), porém concluiu-se que na operação contínua o controle do pH e prevenção contra contaminações microbianas é de extrema importância.

MILESSI (2017) estudou um processo integrado por hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas (SHIF) de hemicelulose utilizando xilanases, xilose isomerase e levedura coimobilizadas. Primeiramente, a autora realizou estudos com diferentes xilanases a fim de selecionar as mais promissoras para produzir o biocatalisador, selecionadas as enzimas os estudos do processo SHIF foram realizados com xilana de bétula, observando a produção de etanol (0,160 g/g e 0,092 g/L.h) e o acúmulo de xilose, indicando redução da atividade da XI.

Estudos envolvendo a SHIF de hemicelulose são de importância acadêmica e industrial e podem ajudar a estabelecer um processo integrado de produção de etanol 2G no conceito de



biorrefinaria (MILESSI, 2017). Desta forma, torna-se cada vez mais importante o estudo e caracterização de enzimas que se adequem a diferentes ambientes de trabalho e tenham a capacidade de hidrolisar as diferentes biomassas utilizadas em processos de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Biomassa Lignocelulósica**

###### **3.1.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar**

O bagaço *in natura* de cana-de-açúcar utilizado no presente trabalho foi doado em julho de 2016 pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), localizado na cidade de Campinas/SP. O bagaço foi armazenado a -20°C, possuindo umidade em torno de 60%.

Para a realização dos diferentes pré-tratamentos avaliados neste trabalho, o bagaço *in natura* foi seco até obter uma umidade próxima a 10%, com o intuito de não enrijecer e/ou degradar a estrutura lignocelulósica do material. Em seguida este material foi submetido a moagem em moinho de facas e peneirado a 10 mesh.

###### **3.1.1.2 Polpa de eucalipto branqueada**

A xilana padrão utilizada neste trabalho foi obtida a partir da polpa de eucalipto branqueada (*Eucalyptus urograndis*), gentilmente doada pela empresa Suzano Papel e Celulose localizada em Suzano/SP. Este material possui composição de 75,6 % de celulose, 14,6 % de hemicelulose, 6,7 % de lignina e 1,1 % de cinzas segundo BONDANCIA (2016).

###### **3.1.2 Seleção das enzimas para estudo cinético**

Estudos realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Enzimática do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (LabEnz – DEQ/UFSCar) identificaram 3 xilanases comerciais como enzimas promissoras no processo de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar (MANRICH, 2012; MILESSI, 2017), como mencionado no Item 2.3.1. Desta forma, no presente trabalho optou-se por avaliar essas 3 xilanases comerciais e uma  $\beta$ -xilosidase produzida *in house*, como mostra a Tabela 8, com o intuito de levantar os parâmetros cinéticos de cada enzima.

**Tabela 8** – Características das enzimas avaliadas.

<b>Código</b>	<b>Enzima</b>	<b>Fornecedor</b>
XAS-1	<i>Bacillus subtilis</i> (XynA)	Vedartis (Brasil)
XASI-1	<i>B. subtilis</i> imobilizada	
XAS-2	Multifect CX XL A03139	DuPont – Genencor (EUA)
XAS-3	Accellerase XY A03304	DuPont – Genencor (EUA)
XAS-4	$\beta$ -xilosidase de <i>B. subtilis</i>	<i>In house</i> (DIEGO et al., 2015)
XASP-4	$\beta$ -xilosidase purificada	
XASPI-4	$\beta$ -xilosidase purificada e imobilizada	

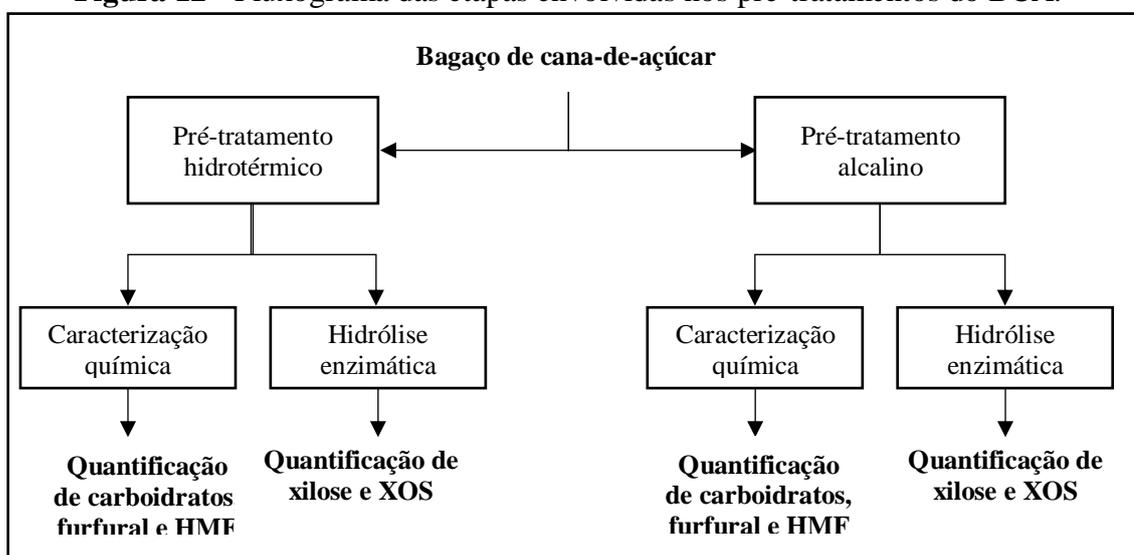
A enzima XASP-4, produzida por *rE. coli*, foi purificada em coluna cromatográfica de afinidade com metal imobilizado, a qual também foi utilizada nos estudos a fim de compará-la com seu extrato bruto. As enzimas XASI-1 e XASPI-4 foram imobilizadas em suporte de agarose-glioxil com carga de 5 mg de proteínas totais por/ g de gel, conforme procedimento descrito por MILESSI (2015).

## 3.2 Procedimento experimental

### 3.2.1 Pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar

Neste trabalho foram avaliadas 2 condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

A Figura 12 apresenta um fluxograma com todas as etapas envolvidas nos pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

**Figura 12** - Fluxograma das etapas envolvidas nos pré-tratamentos do BCA.

Fonte: Autor.

### 3.2.1.1 Pré-tratamento hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado em reator de aço inoxidável de alta pressão (PARR Instrument Company, modelo 4848) com capacidade de 2 L, munido de controle de agitação mecânica e temperatura.

Este pré-tratamento foi realizado de acordo com condições pré-estabelecidas por SILVA (2015), que dentre as condições avaliadas em sua pesquisa, foi a melhor condição na obtenção de açúcares fermentescíveis para a produção de etanol 2G aplicado ao bagaço de cana-de-açúcar. Desta forma, o bagaço (granulometria de 10 mesh e de umidade conhecida) foi misturado com água no reator, na proporção bagaço/água 1:10 (m/v), sendo submetido a uma temperatura de 195 °C por 10 min.

Ao final do processo, a fração sólida foi separada da fração líquida por meio de filtração. Para isso, a suspensão ainda quente foi filtrada em filtro de pano a fim de minimizar a precipitação da lignina solubilizada.

A fração sólida foi submetida a lavagem com água a 60 °C para maior extração da fração hemicelulósica.

A fração líquida obtida foi então caracterizada, de acordo com a metodologia descrita no item 3.3.1.

### 3.2.1.2 Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi realizado conforme as condições pré-estabelecidas por NASCIMENTO (2011). Assim, o bagaço foi pré-tratado com solução 4% (m/v) de NaOH em uma proporção de 1:10 (m/v) de massa seca por volume de solução. Este material foi homogeneizado e autoclavado a 121 °C por 1 hora.

Após o término do pré-tratamento o bagaço foi filtrado em filtro de pano. A fração sólida foi lavada com água a 60 °C para a efetiva remoção das frações de hemicelulose e lignina restantes no sólido. Esta fração líquida foi armazenada a baixas temperaturas e devidamente caracterizada (item 3.3.1).

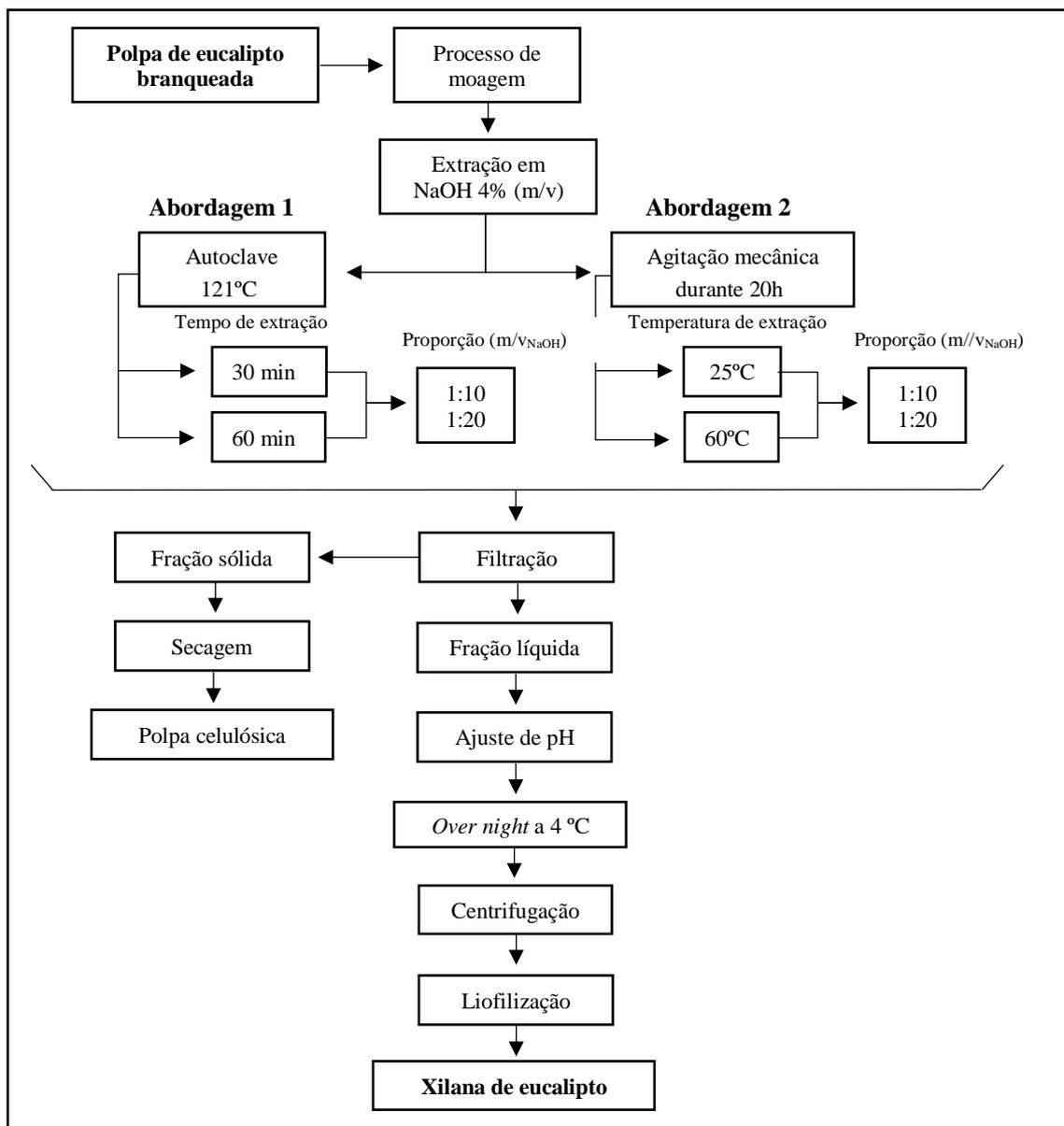
### **3.2.2 Extração da xilana de polpa de eucalipto branqueada**

Para realizar a extração da xilana de polpa de eucalipto branqueada foi necessário moer a matéria-prima em moinho de facas e em seguida verificou-se sua umidade.

Nesta etapa do trabalho, avaliou-se duas abordagens diferentes para a extração do material hemicelulósico da polpa de eucalipto: a primeira abordagem seguiu o procedimento adotado por NASCIMENTO (2011), enquanto na segunda utilizou-se o procedimento adotado por SAARNIO et al. (1954). A Figura 13 apresenta um fluxograma simplificado das abordagens aplicadas na extração da xilana de eucalipto.

A polpa de eucalipto branqueada foi dispersa em solução 4% (m/v) de hidróxido de sódio (NaOH) e em seguida foi submetida ao tratamento em autoclave na abordagem 1 e sob agitação mecânica através da abordagem 2.

**Figura 13** - Fluxograma simplificado dos processos de extração da xilana de polpa de eucalipto branqueada estudados no presente trabalho.



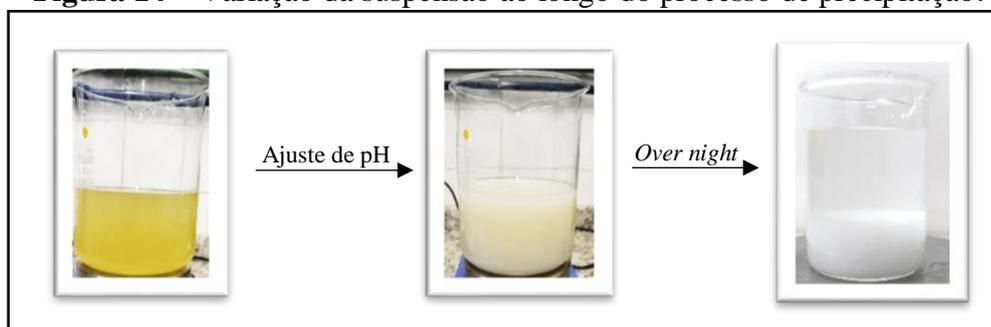
Fonte: Autor.

Após o processo de extração, filtrou-se a suspensão formada pela polpa de eucalipto e NaOH. O sólido gerado, rico em celulose, foi seco em estufa a 50 °C e armazenado. A xilana, produto desejado, foi obtido a partir da fase líquida rica em hemicelulose.

Os processos de extração de xilana avaliados neste trabalho foram realizados em meio básico (pH em torno de 13,5). Desta forma, para promover a precipitação da xilana foi necessário diminuir o pH das soluções para próximo de 6,0, adicionando-se ácido acético glacial. As suspensões obtidas nas diferentes condições avaliadas foram incubadas *over night* a 4 °C, com o intuito de favorecer uma precipitação mais efetiva, facilitando a separação das duas

fases geradas. Ao longo destas etapas foi possível observar a alteração de transparência e tonalidade dessas suspensões, como é apresentado na Figura 14.

**Figura 14** – Variação da suspensão ao longo do processo de precipitação.



Em seguida essas suspensões foram centrifugadas, obtendo-se uma massa concentrada em xilana. Esse precipitado foi seco facilitando assim seu armazenamento. Para auxiliar o processo de secagem, o precipitado foi lavado com etanol e centrifugado novamente.

Por fim, a fração sólida (de consistência pastosa) foi congelada para ser devidamente seca no liofilizador.

Após seco, o material foi macerado e peneirado em peneira de 48 mesh. Desta forma, a xilana gerada pôde ser armazenada a temperatura ambiente, permitindo sua posterior caracterização e utilização como substrato para medida de atividade das xilanases avaliadas no presente trabalho.

### **3.2.2.1 Procedimento para melhorar a solubilidade da xilana de eucalipto**

A xilana de eucalipto obtida no processo de extração selecionado mostrou-se pouco solúvel em água. Desta forma, avaliou-se uma estratégia para aumentar a solubilidade deste material, sendo a xilana 2% (m/v) mantida sob agitação magnética a 60 °C por 15 minutos e meia hora.

O material obtido após a realização desta metodologia foi avaliado como substrato para medida de atividade enzimática da xilanase XAS-2. Desta forma, foi possível comparar o desempenho dos diferentes substratos produzidas neste trabalho e avaliar o(s) procedimento(s) adequado(s) para a obtenção de um substrato mais solúvel, que possa ser equiparado ao substrato comercial de bétula.

### **3.3 Métodos analíticos**

#### **3.3.1 Caracterização química dos substratos estudados**

As amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratadas foram caracterizadas quanto a sua composição química de acordo com a metodologia descrita por ROCHA et al. (1997) e GOUVEIA et al. (2009). Algumas das caracterizações também foram utilizadas para o substrato extraído da polpa branqueada de eucalipto.

##### **3.3.1.1 Determinação do teor de umidade**

Para a preparação dos substratos utilizados nos diferentes pré-tratamentos, foi necessário determinar o teor de umidade, obtendo-se assim parâmetros em termos de biomassa seca.

Para tanto, utilizou-se uma balança determinadora de umidade, modelo ID-50, marca MARCONI com modo de secagem automática. Amostras com mais de 1 g de substrato foi seca até que não houvesse mais variação de peso. Neste momento, o equipamento informava automaticamente o final do processo e o respectivo valor em % de umidade do substrato analisado.

##### **3.3.1.2 Hidrólise**

Após os pré-tratamentos realizados neste trabalho, todos os substratos gerados foram submetidos a uma etapa de hidrólise ácida e uma hidrólise enzimática, permitindo a hidrólise dos polissacarídeos constituintes nas amostras (celulose e hemicelulose) em seus respectivos monômeros (glicose e xilose). Assim, a composição dos materiais obtidos nos diferentes pré-tratamentos e processos de hidrólise puderam ser determinadas e comparadas entre si.

###### **3.3.1.2.1 Hidrólise ácida total**

Este processo foi realizado em tubos de ensaio, onde para cada 5mL de solução foram adicionados 174 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%, conforme descrito por NASCIMENTO (2011). Os tubos foram colocados em autoclave a 121 °C por 1 h. Após o resfriamento dos mesmos, o pH das



soluções foi ajustado com carbonato de cálcio sólido e estas foram centrifugadas para separação da fase sólida da líquida.

Por fim, as frações líquidas obtidas após hidrólise ácida filtradas em membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  para posterior análise em CLAE (item 3.3.1.3).

### **3.3.1.2.2 Hidrólise enzimática**

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados utilizando-se as enzimas comerciais listadas na Tabela 8.

Eppendorfs de 5 mL, contendo 3 mL de substrato, foram incubados em câmara incubadora (marca Marconi) com agitação orbital, nas temperaturas de 32 e 50 °C. Para todos os ensaios realizados, o tempo total de acompanhamento variou de 24 a 48 h.

Nos ensaios realizados com a xilana extraída da polpa de eucalipto branqueada utilizou-se concentração de 10 g L<sup>-1</sup> de xilana em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,6, conforme descrito por MILESSI (2017).

Os ensaios com licor hidrotérmico foram realizados com 8,80 g L<sup>-1</sup> de xilana, o qual foi rota evaporado para alcançar essa concentração e ajustado seu pH com NaOH. Já o licor proveniente do pré-tratamento alcalino foi concentrado até obter 5 g L<sup>-1</sup> de xilana, com pH ajustado em 5,6 com NaOH.

Ao longo das hidrólises foram coletadas alíquotas de 200  $\mu\text{L}$ , sendo estas transferidas para eppendorfs de 2 mL, contendo 200  $\mu\text{L}$  de NaOH 1M e deixadas em banho de gelo, afim de parar a reação. Em seguida, as amostras foram completas com um volume de 600  $\mu\text{L}$  de água MiliQ e agitadas, sendo devidamente filtradas para enfim serem analisadas por CLAE.

Contudo, também foram realizados ensaios com carga enzimática variável como é possível observar na Tabela 9, que apresenta a relação de carga enzimática, temperatura e tempo de acompanhamento total da reação.

**Tabela 9** – Relação de ensaios de hidrólise enzimática realizados.

Ensaio	Enzimas/Carga	Substrato	Temp.	Tempo de reação
1	XAS-1 – 150 UI/g <sub>xilana</sub> XAS-2 – 150 UI/g <sub>xilana</sub> XAS-3 – 150 UI/g <sub>xilana</sub>	Xilana de eucalipto	32 °C	48 h
2	XAS-1 e 2 – 75/75 UI/g <sub>xilana</sub> XAS-1 e 3 – 75/ 75 UI/g <sub>xilana</sub> XASI-1 – 30 UI/g <sub>xilana</sub> XAS-1 e 4 – 30 UI/g e 120 U/g <sub>xilana</sub> XASI-1 e 4 – 30 UI/g e 120 U/g <sub>xilana</sub>	Xilana de eucalipto	32 °C	48 h
3	XAS-1 – 150 UI/g <sub>xilana</sub> XAS-2 – 150 UI/g <sub>xilana</sub> XAS-3 – 150 UI/g <sub>xilana</sub>	Xilana de eucalipto	50 °C	24 h
4	XAS-1 – 150 UI/g <sub>xilana</sub> XAS-2 – 150 UI/g <sub>xilana</sub> XAS-3 – 150 UI/g <sub>xilana</sub>	Licor hidrotérmico	32 °C	12 h
5	XAS-1 – 150 UI/g <sub>xilana</sub>	Licor alcalino	32 °C	12 h

### 3.3.1.3 Determinação da concentração de carboidratos e ácidos orgânicos

Carboidratos (xilose, glicose, arabinose, celobiose) e ácidos orgânicos (ácido acético, ácido glucurônico) presentes nos substratos hidrolisados e não hidrolisados foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando-se uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltd) em um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD, utilizando como fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 M, com vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup> e temperatura de 65 °C. Os compostos foram monitorados com um detector de índice de refração Shimadzu RID-6 A.

Cada amostra gerou um cromatograma que foi comparado com os padrões dos açúcares e ácidos orgânicos passados previamente na coluna, na qual a quantificação é realizada através das curvas de calibração de cada padrão.

Destaca-se que foi necessário remover os compostos fenólicos presentes nas amostras antes de realizar as análises por CLAE. Para isso, utilizou-se cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak C18 (Waters), assim como foram utilizados filtros de membrana de 0,2 µm.

### 3.3.1.4 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural (HMF)

Furfural (F) e hidroximetilfurfural (HMF) foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em uma coluna  $\mu$  Bondapack C-18 (5  $\mu$ m) de 125 x 4 mm (Hewlett-Packard), utilizando-se acetonitrila/água 1:8 (v/v) com 1% de ácido acético como fase móvel, a uma vazão de 0,8mL/min, à temperatura de 25°C.

Os hidrolisados obtido na etapa de hidrólise ácida foram filtrados em membrana de 0,2  $\mu$ m, para total remoção de partículas sólidas das amostras. Os compostos foram detectados em 276 nm por um detector UV-visível Shimadzu SPD-10, durante corrida de 8 min.

As concentrações de furfural e HMF foram determinadas a partir das curvas de calibração obtidas com os compostos puros.

### 3.3.1.5 Determinação de lignina solúvel

A quantidade de lignina solúvel presente nos licores extraídos do bagaço de cana-de-açúcar foi determinada pela medida de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro UV-visível, conforme NASCIMENTO (2011).

Uma alíquota de 200  $\mu$ L do hidrolisado obtido na etapa de hidrólise ácida para caracterização química dos materiais lignocelulósicos, foi transferida para eppendorf de 2 mL e adicionado-se 25  $\mu$ L de NaOH 6,5 N, a fim de elevar o pH até aproximadamente 12.

Essa solução foi agitada e seu volume foi completado com água destilada para 2 mL. Após ser homogeneizada, a concentração de lignina presente nesta solução pôde ser determinada por espectrofotômetro.

Através da Equação 5 pôde-se calcular a concentração de lignina solúvel nos hidrolisados obtidos.

$$C_{\text{lig}} = \frac{(A_{280\text{nm}} - \epsilon_{\text{HMF}} \cdot C_{\text{HMF}} - \epsilon_{\text{F}} \cdot C_{\text{F}})}{B} \quad (5)$$

Onde:

$C_{\text{Lig}}$ : Concentração de lignina solúvel no hidrolisado ( $\text{g L}^{-1}$ );

$A_{280\text{nm}}$ : Absorbância da solução de lignina em 280 nm junto com os produtos de degradação (furfural e HMF);

$\epsilon_{\text{HMF}}$ : Absortividade do hidroximetilfurfural ( $114 \text{ L g}^{-1}$ );

$\epsilon_F$ : Absortividade do furfural (146,85 L g<sup>-1</sup>);

$C_{HMF}$ : Concentração de hidroximetilfurfural no hidrolisado (g L<sup>-1</sup>);

$C_F$ : Concentração de furfural no hidrolisado (g L<sup>-1</sup>).

$B$ : Absortividade da lignina 14,5 L cm<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>.

### 3.3.1.6 Determinação da concentração de xilooligossacarídeos e de xilose

Os xilooligossacarídeos (XOS) e a xilose obtidos no processo de hidrólise enzimática (item 3.3.1.2.2) foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo Waters e2695 equipado com detectores de índice de refração e UV-visível. Utilizou-se a coluna Sugar-Pak™I (300 × 6,5 mm) e água ultrapura como fase móvel com um fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup> e temperatura de 80 °C. Antes das análises, as amostras foram devidamente filtradas primeiro em filtros Sep-Pak® C-18 (Waters), e em seguida, em membranas de 0,2 µm. As amostras foram quantificadas a partir das curvas de padrões de xilohexaose (X6), xilopentose (X5), xilotetraose (X4), xilotriose (X3), xilobiose (X2) e xilose (X1). Porém como o método utilizado não separa de maneira eficiente X5 e X6, os valores de X6 não foram utilizados. No caso do licor de bagaço de cana-de-açúcar X5 também não foi utilizado, uma vez que as amostras são repletas de impurezas e os resultados foram inconclusivos.

Para calcular a conversão de xilana em XOS é necessário primeiramente que se utilize a Equação 6 para o cálculo da massa molecular de cada molécula.

$$MM_{x_n} = MM_{(C_5H_8O_4)_n} + [(n - 1) \cdot MM_{(H_2O)}] \quad (6)$$

Assim de acordo com Milessi (2016), são aplicadas as Equações 7 e 8 para calcular a conversão total da xilana.

$$f_{x_n} = \frac{MM_{(C_5H_8O_4)_n} \cdot n}{MM_{x_n}} \quad (7)$$

$$\text{Conversão de xilana} = \frac{f_{X1} \cdot C_{X1} + f_{X2} \cdot C_{X2} + f_{X3} \cdot C_{X3} + f_{X4} \cdot C_{X4} + f_{X5} \cdot C_{X5}}{C_{xilana}^{inicial}} \quad (8)$$

Onde:

$n$ : é o número de moléculas de  $C_5H_8O_4$  presente na cadeia de xilana;

$f_{xn}$ : fator estequiométrico de X1, X2, X3 e X4;

$MM_{(C_5H_8O_4)_n}$ : massa molecular de cada molécula que constitui a cadeia xilana ( $132,11 \text{ g mol}^{-1}$ );

$MM_{(H_2O)}$ : massa molecular da água ( $18,02 \text{ g mol}^{-1}$ );

$MM_{xn}$ : massa molecular de X1 ( $150,13 \text{ g mol}^{-1}$ ), X2 ( $282,24 \text{ g mol}^{-1}$ ), X3 ( $414,40 \text{ g mol}^{-1}$ ) e X4 ( $546,47 \text{ g mol}^{-1}$ );

$C$ : concentração ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

### 3.3.1.7 Análise Termogravimétrica (TGA)

As xilanas isoladas no processo de extração com diferentes pH foram analisadas por termogravimetria.

O equipamento utilizado foi um Simultaneous DTA-TG Apparatus da Shimadzu. Para tanto, utilizou-se de 10 a 15 mg de cada uma das amostras.

A TGA foi realizada em 2 etapas distintas. Primeiramente, as amostras foram analisadas em uma gama de temperaturas compreendida entre 25 a 110 °C na etapa de secagem por 15 min com rampa de aquecimento de 30 °C  $\text{min}^{-1}$ . A segunda etapa do processo foi realizada com a variação de temperaturas entre 100 a 600 °C com velocidade de aquecimento de 10 °C  $\text{min}^{-1}$  em atmosfera de  $N_2$ , com fluxo de 50  $\text{mL min}^{-1}$ .

### 3.3.2 Caracterização das xilanases e $\beta$ -xilosidase avaliadas

#### 3.3.2.1 Eletroforese

As enzimas, destacadas na Tabela 8, foram avaliadas por eletroforese SDS-PAGE (gel poli-acrilamida 10%) seguindo as condições descritas por LAEMMLI (1970) em sistema Amersham CL Gel Box. A corrida do gel foi realizada por 20 minutos a uma tensão de 160 V em cuba de eletroforese horizontal, conectada a uma fonte de alimentação (Power PAC 1.000, BIORAD-USA) contendo tampão de corrida (Tris base 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1% m/v, pH 8,3). As massas moleculares das enzimas foram determinadas utilizando marcador molecular ECL Full-Range Rainbow (de 2 a 5  $\mu\text{L}$  por poço). Após as corridas das amostras, o gel foi corado por 30 minutos em uma solução contendo 0,25% de Coomassie Blue Brilliant G-

250 (m/v), 5% etanol e 1% de ácido acético (v/v); e descorado com uma solução de 30% etanol e 10% ácido acético (v/v) por 1 h; afim de obter uma melhor resolução do gel este foi deixado sob agitação em água destilada por mais 2 h.

### **3.3.2.2 Determinação da concentração de proteínas**

A concentração de proteína total presente nos extratos enzimáticos comerciais e *in house* (Tabela 8) foi determinado segundo a metodologia descrita por BRADFORD (1976). Albumina de soro bovina (BSA) foi usada como padrão para construção da curva de calibração. Além disso, foram analisados os percentuais de enzimas endo e betas em cada complexo através do *software* online ImageJ.

### **3.3.2.3 Medida da atividade enzimática**

#### **3.3.2.3.1 Atividade de endoxilanas**

A medida da atividade de endoxilanas foi realizada utilizando-se como substrato as xilanas de bétula e eucalipto (item 4.3) diluídas em tampão citrato de sódio 50 mM, 10 % m/v e pH 5,5. Esta suspensão foi submetida a agitação em reatores de vidro a temperatura de 50 °C por 5 minutos, a fim de ambientar a suspensão a temperatura de reação. Em seguida, adicionou-se a enzima. Alíquotas de 100 µL foram coletadas nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 min (este é um período curto de tempo pois o método utilizado mede a velocidade inicial de atuação das enzimas).

Os açúcares redutores produzidos nessa reação de hidrólise foram quantificados pelo método dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Primeiramente, foi realizada a curva de calibração do equipamento foi construída com padrões de xilose com concentrações entre 0,2 e 2 g/L. O procedimento de análise é realizado em eppendorfs de 1,5 mL nos quais são adicionados 300 µL de DNS e mais 100 µL das alíquotas coletadas os eppendorfs são agitados e deixados em água fervente durante 5 min, em sequência estes são submetidos ao banho de gelo durante 5 min e por fim são adicionados 600 µL de água a cada eppendorf sendo estes devidamente agitados, então é realizada a leitura em 540 nm no espectrofotômetro. A unidade de atividade enzimática (UI) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de xilose em 1 min nas condições de ensaio.

### 3.3.2.3.2 Atividade $\beta$ -xilosidase

A medida de atividade da  $\beta$ -xilosidase foi realizada conforme LACHKE (1988), onde é medida a quantidade de pNP (p-nitrofenil) liberado de pNPX (p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranoside) a 50 °C. A mistura reacional é constituída por pNPX 5 mM em tampão fosfato 50 mM pH 6,0. Desta mistura 0,5mL são transferidos para uma cubeta de plástico, onde é adicionada a enzima à reação, sendo esta monitorada durante 3 min, em espectrofotômetro com absorbância em 410 nm. Os pontos que se encontram lineares, partindo do zero, foram utilizados para medida da concentração de pNP liberada. Uma unidade da atividade (UI) da  $\beta$ -xilosidase é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de pNP por minuto nas condições descritas acima.

### 3.3.2.4 Efeito da concentração enzimática

O efeito da concentração enzimática foi avaliado para as endoxilanasas utilizando as condições padrões de análise de medida de atividade com xilana de eucalipto 10% (massa de xilana por volume de tampão citrato), a qual foram variadas as diluições de cada enzima adicionada ao meio, cada ensaio foi realizado em triplicata. Para a  $\beta$ -xilosidase foi utilizado o método de medida de atividade específico, onde também só foram variadas as diluições de cada enzima no meio.

### 3.3.2.5 Efeito da temperatura e pH

Para analisar o efeito da temperatura em cada uma das endoxilanasas foram realizados ensaios em triplicata da medida de atividade nas condições padrão descritas anteriormente com temperaturas que variam de 30, 40, 50, 60 e 70 °C.

Através do perfil de temperatura versus a velocidade pode-se calcular a Energia de Ativação para cada complexo enzimático, fazendo uso da Equação 9 de Arrhenius linearizada.

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} \quad (9)$$

Onde:

k = constante de velocidade específica (g/L.min);

A = constante pré-exponencial (g/L.min);

$E_a$  = energia de ativação (J/mol);

R = constante dos gases (J/mol.K);

T = temperatura (K).

Já para os ensaios de variação de pH utilizaram-se diferentes tampões como o tampão citrato de sódio para os pHs 3,0, 4,0, e 5,0, e o tampão fosfato de sódio para os pHs 6,0, 7,0 e 8,0.

Para analisar o efeito da temperatura e pH para as  $\beta$ -xilosidases em sua forma livre, livre purificada e imobilizada realizou-se um planejamento experimental utilizando o delineamento composto central rotacional (DCCR) (nível de significância de 10 %) com 3 pontos centrais, conforme apresenta a Tabela 10.

**Tabela 10** – Matriz do planejamento experimental para  $\beta$ -xilosidase.

Nº Exp.	pH	Temp. (°C)	pH	Temp. (°C)
1	-1	-1	5,0	34,4
2	1	-1	9,0	34,4
3	-1	1	5,0	55,6
4	1	1	9,0	55,6
5	-1,41	0	4,2	45,0
6	1,41	0	9,8	45,0
7	0	-1,41	7,0	30,0
8	0	1,41	7,0	60,0
9	0	0	7,0	45,0
10	0	0	7,0	45,0
11	0	0	7,0	45,0

Para avaliar o pH da  $\beta$ -xilosidase os tampões utilizados foram citrato de sódio (pH 4,0, 4,2 e 5,0), fosfato de sódio (pH 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0), acetato de sódio (pH 6,0, 7,0 e 8,0) e tampão glicina (pH 9, 9,8 e 10).

### 3.3.2.6 Análise de estabilidade térmica

A estabilidade térmica das enzimas foi realizada nas temperaturas de 50 °C e 32 °C, para os quatro diferentes complexos enzimáticos. Cada enzima foi diluída em tampão conforme os resultados obtidos nos ensaios do efeito da concentração enzimática. Elas então foram submersas em banho de termostático em tubos falcon de 15 mL, dos quais eram recolhidas



amostras ao longo do tempo, sendo estas analisadas em duplicata através da medida de atividade.

### 3.3.2.7 Efeito da concentração do substrato

A variação da concentração do substrato se deu de maneira mais criteriosa, pois como o substrato utilizado é a xilana de eucalipto para estes ensaios utilizou-se a xilana solubilizada em autoclave, a qual foi concentrada em rota evaporador e devidamente caracterizada quanto a sua concentração de XOS antes e depois da hidrolisada ácido. Desta forma, para a medida da atividade endo foram utilizadas concentrações do substrato que variaram de 1, 3, 6, 10 e 15 g L<sup>-1</sup>. Enquanto que para a medida da atividade beta as concentrações de pNPX utilizadas foram de 0,10 a 15 mM.

A partir dos dados obtidos nestes ensaios foi possível calcular as constantes de Michaelis-Menten, as quais são apresentadas na Equação 2 (item 2.5). Também utilizou-se a Equação 10, onde foi realizado o ajuste utilizando-se o modelo de Andrews de inibição incompetitiva – inibição pelo substrato.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}} \quad (10)$$

Onde:

K<sub>i</sub>: constante de inibição.

### 3.3.2.8 Efeito dos inibidores aplicados a β-xilosidases

Foram avaliados os efeitos das concentrações de xilose e xilulose aplicados as β-xilosidases estudadas. Para realizar a medida de atividade utilizou-se o procedimento descrito no item 3.3.2.3.2, no qual foi adicionado a cada ensaio a contração de inibidor necessária. No caso da xilose foram analisadas as concentrações de 8, 16 e 32 g/L em pNPX 5 mM para todas as enzimas (XAS-2, XAS-3, XASP-4 e XASPI-4), já para a xilulose utilizou-se 1,6, 3,2 e 6,4 g/L em pNPX 5 mM aplicado a enzima XASP-4. Após a comprovação da inibição foram realizados ensaios os dois inibidores juntos em diferentes concentrações de pNPX e com as seguintes concentrações de xilose e xilulose, 8 e 1,6, 16 e 3,2, 32 e 6,4 g/L, respectivamente.

Para avaliar o efeito da inibição conjunta utilizou-se a Equação 11 (FAN et al., 2010), cujo mecanismo e dedução propostos encontram-se no ANEXO I. Os parâmetros da equação foram calculados a partir dos pontos isolados de cada inibidor, onde pode-se estimar as constantes de inibição  $K_{i1}$  e  $K_{i2}$  (1 – xilose e 2 – xilulose), e utilizando as curvas de inibição conjunta e um ajuste global foi possível estimar o valor de  $\alpha$ .

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{\left(1 + \frac{[I_1]}{K_{i1}} + \frac{[I_2]}{K_{i2}} + \frac{[I_1] \cdot [I_2]}{\alpha \cdot K_{i1} \cdot K_{i2}}\right) \cdot K_M + [S]} \quad (11)$$

Onde  $\alpha$  é uma constante.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

A composição química do bagaço de cana-de-açúcar é apresentada na Tabela 11. Os resultados confirmam que a biomassa é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Os dados obtidos encontram-se de acordo com os descritos por NASCIMENTO (2011).

**Tabela 11** - Composição química média do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

Componente	<i>In natura</i> <sup>1</sup> (%)	NASCIMENTO (2011) (%)
Celulose	39,1 ± 0,6	38,8 ± 1,4
Hemicelulose	28,5 ± 0,7	29,4 ± 1,7
Extrativos	5,0 ± 0,1	5,1 ± 0,4
Lignina totais	20,7 ± 0,8	21,7 ± 0,3
Cinzas	4,6 ± 0,2	4,9 ± 1,1
<b>Total</b>	<b>97,9 %</b>	<b>99,9 %</b>

NOTA:<sup>1</sup> cada valor corresponde à média de três experimentos ± desvio padrão, dados obtidos pelo grupo de pesquisa.

Os pré-tratamentos foram aplicados ao bagaço *in natura*, que se encontrava moído e seco (14% de umidade). As composições químicas do bagaço de cana-de-açúcar com o pré-tratamento hidrotérmico e alcalino se encontra disposta na Tabela 12.

**Tabela 12** - Composições químicas médias do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

Componentes	Hidrotérmico (%)	Alcalino (%)
<b>Celulose</b>	<b>56,9 ± 0,4</b>	<b>59,2 ± 1,1</b>
Glicose	56,5 ± 0,4	58,7 ± 1,1
HMF	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,0
<b>Hemicelulose</b>	<b>12,3 ± 0,3</b>	<b>21,6 ± 0,3</b>
Xilose	11,1 ± 0,1	20,8 ± 0,4
Ácido Acético	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,1
Furfural	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,0
<b>Lignina total</b>	<b>26,1 ± 1,2</b>	<b>8,4 ± 0,7</b>
<b>Cinzas</b>	<b>4,0 ± 0,4</b>	<b>3,2 ± 0,4</b>
<b>Total</b>	<b>99,3 %</b>	<b>92,3 %</b>

NOTA: Cada valor corresponde à média de três experimentos ± desvio padrão, dados obtidos pelo grupo de pesquisa.

O rendimento de extração total foi de 65,7 e 57,4 % para o pré-tratamento hidrotérmico e o alcalino, respectivamente.

As frações líquidas chamadas de licores de extração também foram caracterizadas. O licor hidrotérmico obteve rendimento em XOS de 68,5 % (± 4,38) e rendimento em xilose de

18,80 % ( $\pm 5,32$ ), já o licor alcalino obteve 28,55 % ( $\pm 2,06$ ) em rendimento de XOS e não apresentou rendimento em xilose. Resultados semelhantes em termos de rendimento em xilose após a hidrólise total foram encontrados na literatura (BETANCUR; PEREIRA, 2010; NASCIMENTO, 2011; SILVA, 2015)

Nota-se, a partir dos dados apresentados nas Tabelas 11 e 12, que o pré-tratamento hidrotérmico extrai maior teor de hemicelulose do bagaço quando comparado ao tratamento alcalino. No entanto, o licor hidrotérmico também apresenta elevada concentração de xilose. Desta forma, este pré-tratamento permite que grande parte da fração celulósica continue concentrada no bagaço, sendo este comportamento comumente descrito na literatura (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2014; ZAKARIA; HIRATA; HASSAN, 2015). O licor alcalino não apresenta rendimento em xilose e extrai mais da metade da fração de lignina presente no bagaço, comportamento esperado uma vez que o pré-tratamento alcalino degrada a estrutura da lignina diminuindo a cristalização da celulose. Estudos com bagaço de cana-de-açúcar obtendo resultados semelhantes são descritos por NASCIMENTO (2011) e MANRICH (2012).

Os licores foram utilizados no estudo da hidrólise enzimática (item 4.5) a fim de verificar o comportamento das enzimas em diferentes substratos.

#### **4.2 Avaliação do substrato de polpa de eucalipto branqueada para hidrólise enzimática**

Tentativas iniciais de estudo cinético de endoxilanasas usando o licor obtido pelo pré-tratamento do bagaço de cana como substrato mostraram impossibilidade de acompanhamento da reação de hidrólise pelo método DNS, usando espectrofotômetro, devido à já alta concentração inicial de açúcares redutores no licor. Xilanas comerciais (bétula e faia) eram o substrato padrão utilizado na literatura, mas tornou-se indisponível e/ou muito caro.

Foi então desenvolvido um método de preparação desse substrato in-house. Com base nos estudos realizados sobre os diversos tipos de xilanas, optou-se por estudar a extração da xilana a partir da polpa de eucalipto branqueada, sendo esta uma glucuronoxilana, assim como a xilana de bétula, comumente utilizada como substrato padrão para medida de atividade enzimática antes de ser descontinuada pelo seu principal fornecedor.

Primeiramente, foram avaliadas duas diferentes abordagens de extração. Para tanto, as extrações foram comparadas quanto a medidas das velocidades iniciais para a enzima XAS-2 (Multifect) diluída 100 vezes, para cada um dos ensaios relacionados à extração do substrato.

Na Tabela 13 são apresentados os resultados obtidos ao utilizar a 1ª estratégia de extração da xilana, de acordo com a metodologia descrita por NASCIMENTO (2011).

**Tabela 13** - Ensaios utilizando a abordagem 1 de extração em autoclave a 121 °C.

Ensaios	Tempo (h)	T (°C)	Proporção (m/v)	Velocidade (g/L.min)
1	1	121	1:10	0,0596 ± 0,0017
2	1	121	1:20	0,0107 ± 0,0009
3	0,5	121	1:10	0,0575 ± 0,0005
4	0,5	121	1:20	0,0450 ± 0,0020

A partir dos resultados apresentados na Tabela 13 pode-se constatar que os ensaios 1 e 3 apresentaram melhor desempenho com relação a velocidade inicial da enzima em estudo. Também é possível observar que o ensaio 2 obteve um desempenho inferior aos outros ensaios indicando que possivelmente ocorreu degradação do material em estudo, pois foram realizados em condições mais severas, que os outros três testados a 121°C.

Na Tabela 14 são apresentados os resultados obtidos ao utilizar o procedimento de extração desenvolvido por SAARNIO et al. (1954), que utilizam temperaturas de extração menores que as da abordagem 1.

**Tabela 14** - Ensaios utilizando a abordagem 2 de extração SAARNIO et al. (1954) com agitação mecânica durante 20 h.

Ensaios	Tempo (h)	T (°C)	Proporção (m/v)	Velocidade (g L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
1	20	25	1:10	0,0221 ± 0,0002
2	20	25	1:20	0,0376 ± 0,0010
3	10	60	1:10	0,0284 ± 0,0017
4	10	60	1:20	0,0338 ± 0,0005

Com base nos resultados da Tabela 14 pode-se perceber que o ensaio 2 se mostrou mais promissor quanto a medida de velocidades iniciais de XAS-2. Como esta abordagem foi realizada em condições mais brandas pode-se perceber que os resultados apresentaram pouca variação.

Para melhor caracterizar os produtos obtidos, foram selecionados somente os ensaios que apresentaram os melhores resultados de velocidade, a fim de obter uma melhor comparação dos substratos obtidos. Os substratos produzidos foram suspensos em tampão citrato 50 mM 1% (m/v), em seguida submetidos a hidrólise ácida e então analisados por CLAE juntamente com a xilana de bétula comercial (*birchwood* – Sigma-Aldrich®), os resultados são apresentados na Tabela 15.

**Tabela 15** - Caracterização do material extraído em termos de concentração dos monômeros e total extraído de xilana (obtido por hidrólise ácida, ver item 3.3.1)

Componentes	Ensaio 1	Ensaio 2	Xilana de Bétula
	Abordagem 1	Abordagem 2	
	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
Xilose	4,65 ± 0,31	6,73 ± 0,39	6,84 ± 1,21
Arabinose	0,30 ± 0,43	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Ác. Acético	1,67 ± 0,03	0,88 ± 0,03	0,00 ± 0,00
Furfural	1,46 ± 0,27	1,39 ± 0,08	2,46 ± 0,50
HMF	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01

Conforme os resultados apresentados na Tabela 15 é possível observar que a concentração de xilose apresentada na abordagem 2 se equipara à concentração obtida pela xilana de bétula, já a abordagem 1 apresenta cerca de 32% a menos de xilose quando feita a mesma comparação. Também pode-se perceber que na abordagem 1 aparece arabinose, que não se encontra nos demais substratos, o que pode ser um indício da elevada severidade no tratamento, o qual pode ter ocasionado a quebra de algumas ramificações do material.

Outro ponto que vale ser ressaltado é que os dois substratos produzidos apresentam menor concentração de furfural e maior concentração de ácido acético quando comparados ao substrato comercial. Compostos como furfural e HMF são produtos da degradação das cadeias de pentoses (C5) e hexoses (C6), respectivamente, gerados a partir da etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, e são considerados compostos inibidores em etapas de fermentação dos mesmos (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000). O ácido acético presente nos resultados das duas abordagens pode ser considerado como resíduo do processo, pois para que ocorra a precipitação da xilana utilizou-se quantidades consideráveis de ácido acético. Uma vez que diversos estudos comprovaram que este composto é um forte inibidor do metabolismo microbiano, é importante a minimização da produção do mesmo para as próximas etapas deste estudo (KRISCH; SZAJÁNI, 1997).

Por fim, entre os ensaios e as abordagens aplicadas ao material optou-se pelo ensaio 2 da abordagem 2, uma vez que o substrato se mostrou mais semelhante ao substrato padrão de bétula, e também por ser obtido em condições de extração brandas, o que diminui o risco de degradação do material e o custo do processo.

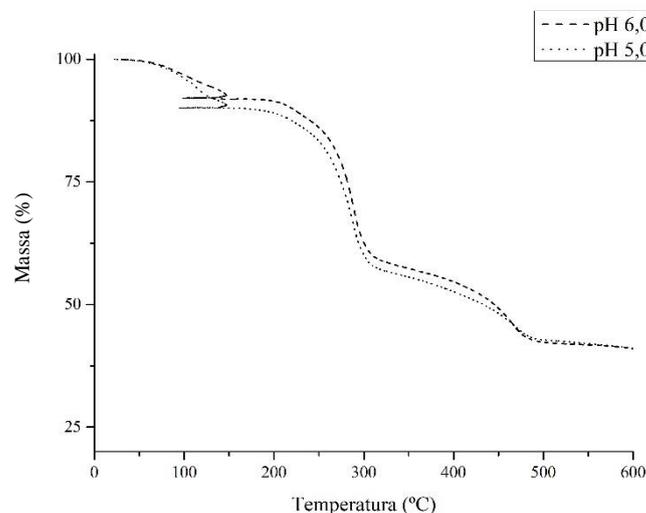
#### 4.2.1 Solubilidade da xilana de eucalipto

A solubilidade da xilana de eucalipto se mostrou um problema desde os primeiros ensaios. O problema foi identificado através da dificuldade de obter pontos lineares na medida

da atividade enzimática e também por haver baixos valor de atividade enzimática quando comparado à atividade em xilana de bétula.

Desta forma, a partir de alguns estudos realizados, observou-se que a etapa de queda do pH na extração do material era um fator de grande influência na produção de sais precipitados, que por consequência poderiam influenciar diretamente na solubilidade da xilana. A Figura 15 apresenta os resultados da análise termogravimétrica (ATG) realizadas para as xilanas precipitadas a pH 5,0 e 6,0.

**Figura 15** – Curvas termogravimétricas para as xilanas obtidas por precipitação em pHs 5,0 e 6,0.



ATG é uma técnica de análise térmica destrutiva, na qual é monitorada a variação da massa da amostra em função da temperatura e do tempo, em ambiente de atmosfera controlada (QUARESMA, 2014).

Analisando a Figura 15, é possível observar que os termogramas apresentam três fases. A primeira fase ocorre perto dos 100°C, que corresponde à evaporação de água residual e dos compostos voláteis ainda presentes na amostra. A segunda fase ocorre perto dos 250°C, que está relacionada com a degradação das cadeias de xilana. Já a terceira fase é observada perto dos 350°C que corresponde à carbonização dos produtos, já transformados em cinzas. Termograma com semelhante comportamento foi analisado por QUARESMA (2014), para amostras de xilana de eucalipto.

Através dos dados obtidos pelos termogramas, também é possível quantificar a massa da amostra ao longo da variação da temperatura. Desta forma, pôde-se determinar a

porcentagem real de xilana presente em cada amostra, sendo que o restante da massa das amostras avaliadas eram sais que se formaram no processo de precipitação.

Para as xilanas precipitadas a pH 5,0 e 6,0, constatou-se uma perda de massa de 54,35 % e 55,46 %, respectivamente. Os resultados desta análise se mostraram muito próximos, porém sabe-se que quanto menor a perda de massa, maior será o teor de sais na amostra.

Para se obter um melhor parâmetro de comparação, também foram realizadas medidas de atividade enzimática para uma mesma enzima XAS-2 (complexo Multifect). As xilanas em estudo (precipitadas a pH 5,0 e 6,0) foram comparadas em relação à atividade da xilana de bétula, com os resultados apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16** – Variação da atividade enzimática nos substratos de eucalipto pHs 5 e 6, e em bétula.

	Xilana de bétula	Xilana de eucalipto pH 5,0	Xilana de eucalipto pH 6,0
Atividade (UI mL <sup>-1</sup> )	2060,88 ± 65,99	411,04 ± 14,41	971,56 ± 28,82

Nota-se que a xilana pH 5,0 apresentou 20% da atividade e a xilana pH 6,0 apresentou 47% da atividade relativa à xilana comercial. Em consequência dos experimentos realizados optou-se por precipitar a xilana a pH 6,0, já que nesta condição observou-se menor teor de sais no meio, além de ter apresentado os melhores resultados quanto a atividade enzimática.

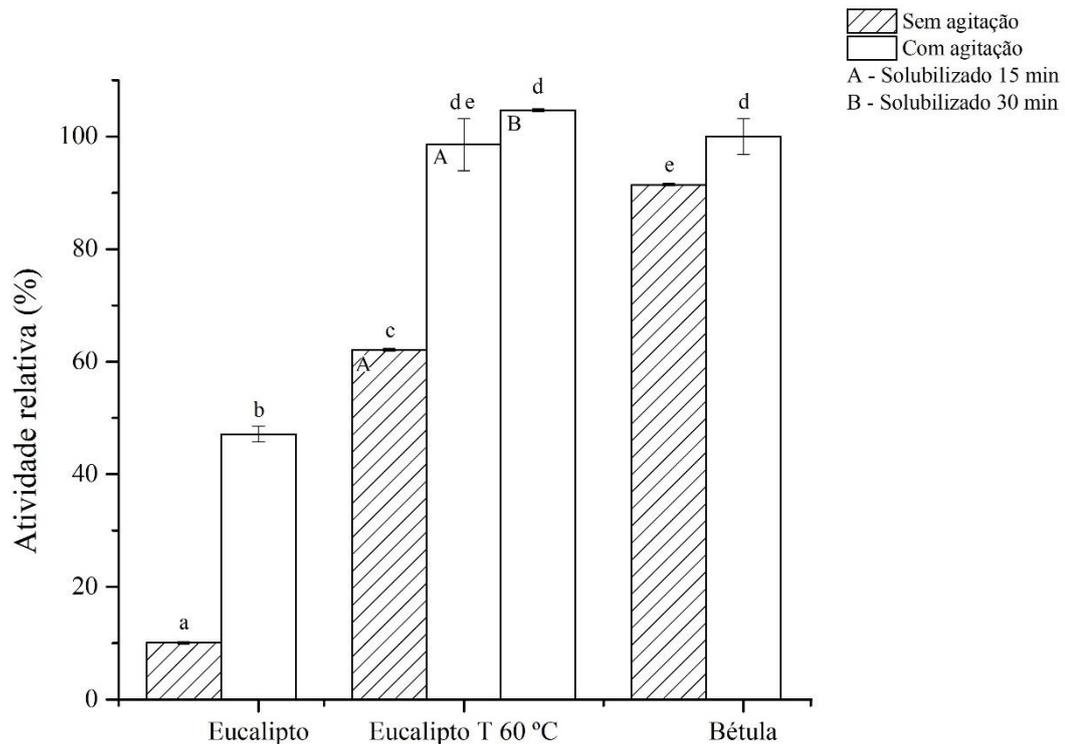
Entretanto, com o intuito de melhorar ainda mais a qualidade dos pontos ao longo da medida de atividade e também de utilizar todo o potencial do substrato para realização das medidas, avaliou-se o desempenho de um método adicional para solubilizar a xilana pH 6,0 no tampão.

Neste contexto, utilizou-se como método principal a solubilização em chapa de aquecimento magnética a 60°C, na qual a suspensão permaneceu em substratos insolúveis ou parcialmente solúveis é a dependência de agitação ao longo da reação. Portanto, foram comparadas as medidas de atividade nos substratos selecionados anteriormente, com agitação mecânica de aproximadamente 350 rpm e sem agitação.

A Figura 16 apresenta as medidas de atividade enzimática para o substrato antes e após solubilização sob aquecimento. A atividade no substrato de bétula também foi avaliada em ensaios sem agitação mecânica a fim de se comparar os resultados obtidos nas diferentes condições avaliadas.



**Figura 16** - Comparação entre a atividade para uma mesma enzima aplicada ao substrato de xilana de bétula e de eucalipto em diferentes condições.



Através da Figura 16 é possível observar que a xilana de eucalipto precipitada a pH 6,0 apresentou atividade 50 % menor quando comparada a atividade medida em xilana de bétula. Já quando a mesma xilana passou pelo processo de solubilização a atividade aumentou drasticamente. Pode-se perceber que a xilana solubilizada a 60 °C fez com que o substrato fosse mais solúvel no tampão, assim como também pode-se constatar que a variação do tempo de exposição de 15 para 30 min não apresentou diferença significativa nos resultados. A enzima parece assim estar atuando apenas em substratos solúveis, observando-se que o aquecimento a 60 °C permitiu uma maior solubilização deste, aparentemente atingindo o padrão da xilana de bétula comercial.

A partir da análise do teste de Tukey, foi possível verificar que, sob agitação, o processo de solubilização do novo substrato de eucalipto permitiu obtenção de atividades similares aos obtidos com a mesma concentração inicial de xilana comercial, atingindo-se o objetivo do estudo.

A Figura 16 também permite constatar que a agitação proporcionou a obtenção de uma maior atividade enzimática para todas os substratos avaliados. Desta forma, é possível afirmar que tanto para a xilana de bétula quanto para a xilana de eucalipto, o substrato não deve estar

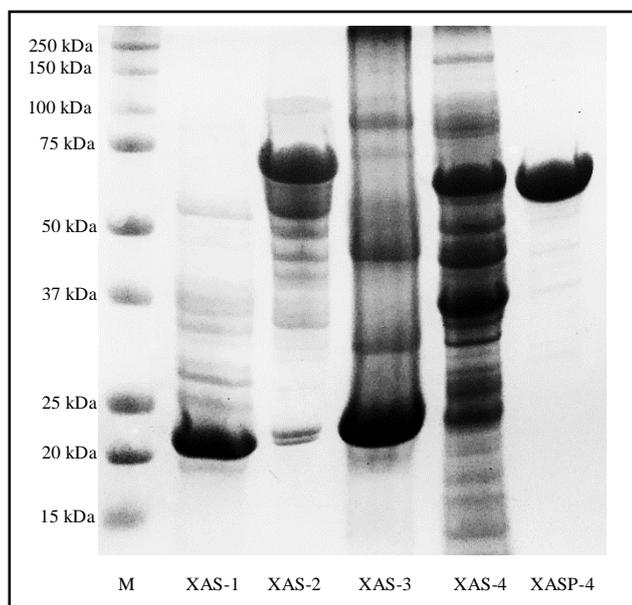
totalmente solúvel, sendo importante o efeito de agitação para eliminar efeitos difusivos na medida da atividade da enzima. Os oligômeros presentes na xilana de bétula devem ser menores pois esse substrato foi menos sensível ao efeito da agitação. É importante lembrar que se os substratos estivessem completamente solúveis, com a enzima livre (solúvel), uma vez agitado inicialmente para homogeneização do meio, esta não deveria mais ser necessária, podendo inclusive ser prejudicial em longo tempo pela incorporação de ar e consequente inativação hidrofóbica da enzima.

Com a escolha do método de extração e a seleção do pH de precipitação do material, o rendimento mássico final de produção da xilana foi de  $56,4 \pm 3,3$  (%  $\pm$  desvio). Estudos realizados por MARQUES (2014) mostraram rendimentos entre 65 e 85% de extração de xilana de polpa de eucalipto branqueada com NaOH 10 % a temperatura de 25°C.

### 4.3 Caracterização das enzimas

A caracterização das enzimas selecionadas (item 3.3.2) foram realizadas por eletroforese, quantificação de proteínas e atividade enzimática, apresentados na Figura 17.

**Figura 17** – Eletroforese das enzimas avaliadas neste trabalho.



A Figura 17 apresenta o gel de poliacrilamida SDS-PAGE sob condições desnaturantes. O gel de eletroforese mostra que as xilanases comerciais (XAS-1, XAS-2 e XAS-3), o extrato bruto obtido em cultivo de *rE. coli* e a respectiva  $\beta$ -xilosidase purificada, apresentaram perfis proteicos diferenciados.

A Tabela 17 apresenta os resultados de quantificação percentual das bandas de proteínas consideradas endo e beta de cada complexo, sendo estes obtidos a partir do *software* online ImageJ.

**Tabela 17** – Resultados da quantificação das bandas proteicas das diferentes enzimas.

Enzimas	Faixa MM (kDa)	Endoxilanase (%)	Faixa MM (kDa)	$\beta$ -xilosidase (%)
XAS-1	22	53,29 $\pm$ 0,36	55	2,36 $\pm$ 1,77
XAS-2	22	7,48 $\pm$ 1,72	70-55	53,48 $\pm$ 0,69
XAS-3	22	33,06 $\pm$ 2,19	43	24,71 $\pm$ 1,20
XAS-4	-	-	66	18,75 $\pm$ 0,67
XASP-4	-	-	66	86,20 $\pm$ 3,74

NOTA: ImageJ, disponível em: <https://imagej.net/Welcome>.

Fazendo a relação entre a Figura e Tabela 17, percebe-se que as enzimas XAS-2 e XAS-3 são constituídas por um complexo enzimático, já a XAS-1 apresenta maior grau de pureza em endoxilanase. A enzima XAS-4 mesmo antes de purificada possuía somente 18,75 % de proteínas de  $\beta$ -xilosidase, após a purificação esse porcentual aumentou para 86,20. Também é possível observar que XAS-1 e XAS-3 apresentam características mais acentuadas da família 11 ( $\geq 20$  kDa). A enzimas XAS-2 e XAS-3 possuem diferentes  $\beta$ -xilosidases em suas composições, assim como outras enzimas, pois de acordo com a literatura a faixa de beta pode variar de 26 a 360 kDa (CHEN et al., 2012; LAMA et al., 2004).

XASP-4,  $\beta$ -xilosidase purificada, não apresentou nenhuma outra banda acentuada indicando que sua purificação foi efetiva, obtendo como peso molecular 66 kDa, indicando que esta enzima pertencente à família 43. Estudos realizados por DIOGO e colaboradores (2015) utilizando  $\beta$ -xilosidase (GH43, NCBI-GI: 255767415) obtiveram resultado muito semelhante para o gel de SDS-PAGE.

A Tabela 18 apresenta a relação de proteínas, atividade-endo e atividade-beta, e também suas respectivas atividades específicas. A partir destas análises é possível notar que as enzimas selecionadas são muito diferentes entre si.

**Tabela 18** – Características dos complexos enzimáticos avaliados.

Enzima	Proteína (mg mL <sup>-1</sup> )	Atividade endo (UI mL <sup>-1</sup> )	Atividade específica endo (UI mg <sup>-1</sup> )	Atividade beta (U mL <sup>-1</sup> )	Atividade específica beta (U mg <sup>-1</sup> )
XAS-1	2,02 $\pm$ 0,04	610,90 $\pm$ 39,26	302,43 $\pm$ 19,44	0,12 $\pm$ 0,08	0,06 $\pm$ 0,04
XAS-2	34,71 $\pm$ 0,48	2157,13 $\pm$ 4,80	62,15 $\pm$ 0,14	11,90 $\pm$ 0,58	0,34 $\pm$ 0,02
XAS-3	7,53 $\pm$ 0,05	2846,73 $\pm$ 17,98	378,05 $\pm$ 2,39	21,94 $\pm$ 0,11	2,91 $\pm$ 0,01
XAS-4	8,75 $\pm$ 0,18	ND	ND	47,19 $\pm$ 1,32	5,39 $\pm$ 0,15
XASP-4	4,93 $\pm$ 0,33	ND	ND	72,81 $\pm$ 0,57	14,77 $\pm$ 0,11

Nota: ND – não detectado.

É importante salientar que a enzima XASP-4 obteve resultado quase 3 vezes maior de atividade específica quando comparada à XAS-4 bruta (mesmo após longo tempo de armazenamento), comprovando a eficiência do processo de purificação ao qual foi submetida. Também observa-se a queda na concentração de proteínas depois de purificada a enzima, comportamento comumente descrito na literatura (YAMAGUCHI; IZUMI; KITAMIKADO, 1998).

As enzimas XAS-1 e XASP-4 foram selecionadas para imobilização, uma vez que estas são enzimas mais específicas (endo e beta), sendo assim mais fácil de compreender somente o efeito da imobilização nas mesmas. Quanto a suas atividades enzimáticas, obtendo-se  $28,55 \pm 1,15$  UI/g<sub>derivado</sub> para XASI-1 e  $71,92 \pm 1,25$  U/mg para XASPI-4.

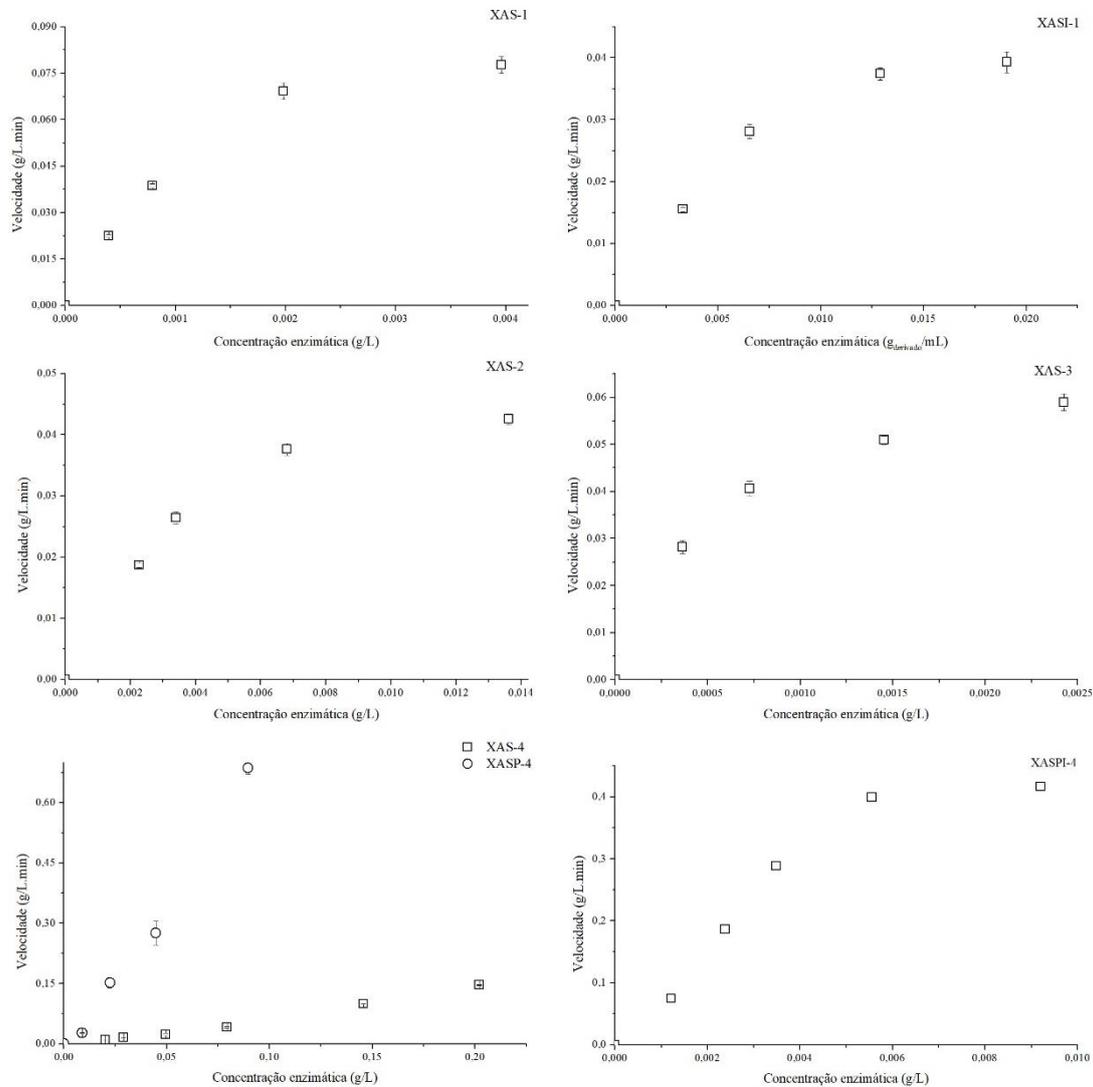
#### **4.4 Estudo cinético das enzimas avaliadas**

No estudo cinético das enzimas selecionadas foram estudadas as influências na velocidade de reação da concentração enzimática, da temperatura, do pH e da concentração de substrato no meio. Foram também avaliadas as estabilidades térmicas das enzimas.

##### **4.4.1 Efeito da concentração enzimática**

A Figura 18 apresenta os gráficos da variação da velocidade inicial de reação com relação à variação da concentração enzimática (g/L – gramas de proteínas totais no volume reacional) das enzimas XAS 1, 2 e 3 avaliadas em termos de atividade endoxilanasas e XAS-4 bruta, purificada e imobilizada somente como  $\beta$ -xilosidase. As concentrações enzimáticas foram calculadas utilizando-se a massa de proteínas totais presentes em cada enzima, com exceção da XASI-1 que está apresentada na forma de derivado gel-enzima. O efeito da concentração enzimática é o passo inicial de um estudo cinético onde se supõe que a enzima se comporte conforme modelo de Michaelis-Menten, para se determinar a faixa de concentração enzimática onde o modelo é válido. Na dedução desse modelo matemático, utiliza-se a hipótese de ser necessário que a concentração de substrato esteja em largo excesso em relação à da enzima para se poder chegar à equação final. Se isso está sendo obedecido, deverá ser observada uma relação linear entre velocidade da reação e concentração de enzima no meio, e deverá ser dentro dessa região a concentração de enzima a ser escolhida para se prosseguir no estudo cinético.

**Figura 18** – Influência da concentração enzimática na velocidade inicial de reação para todas as enzimas em estudo, realizadas em xilana de eucalipto 1% em tampão citrato 50 mM pH 5,5 e 50 °C.



A partir da Figura 18 é possível observar que as enzimas XAS-1, 2, 3, XASI-1 e XASPI-4 apresentam um perfil linear nos pontos de menor concentração enzimática, e com o aumento dessa concentração a variação de velocidade vai diminuindo, conforme esperado (LEHNINGER; NELSON; COX, 1976; BERG; TYMOCZKO; STRYER 2006). Já a enzima XAS-4 apresenta uma ampla faixa de linearidade tanto como extrato bruto quanto purificado, o que não acontece quando a mesma está imobilizada. Com base nos dados apresentados na Figura 18, foi possível estimar a relação de concentração máxima de cada enzima para cada substrato em questão, essa concentração abrange em cada gráfico os pontos que se encontram na faixa linear partindo de zero.

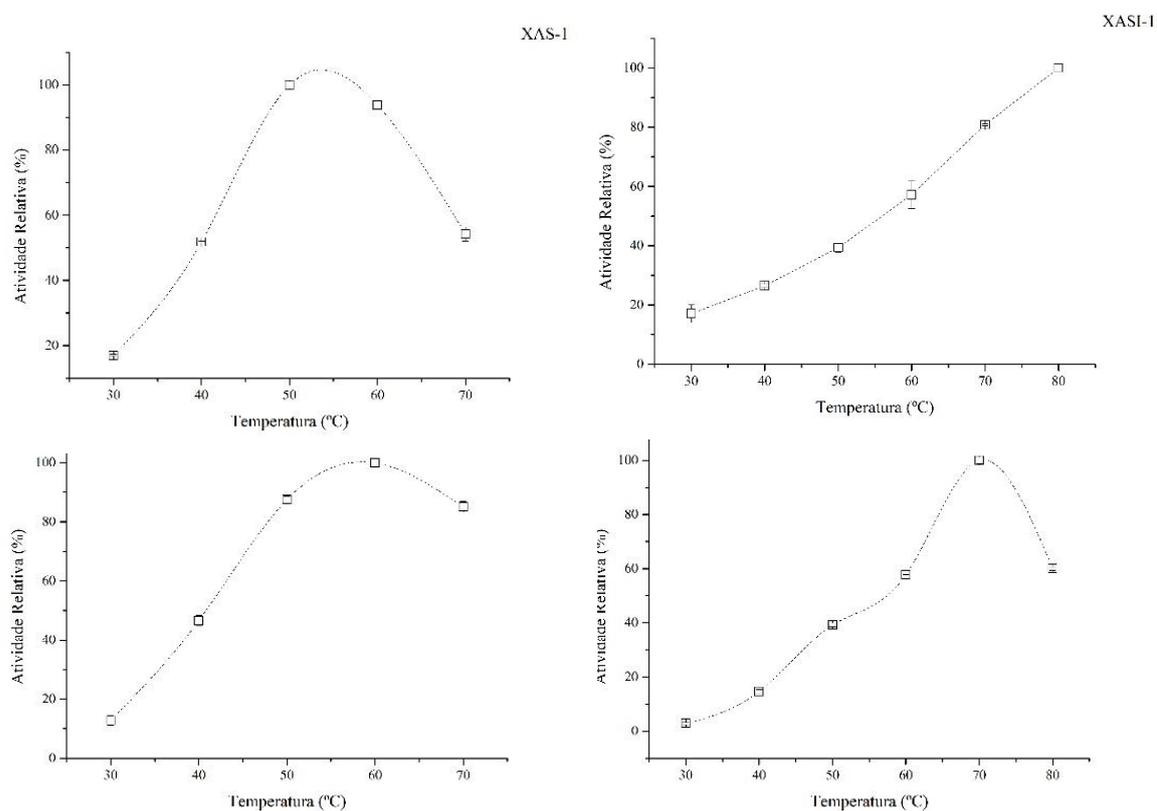
Desta forma, para os experimentos convencionais de medida de atividade endo, foram padronizados que, em 5 mL de solução tampão com 10 % de substrato eram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução enzimática de XAS-1, 2 e 3 nas seguintes concentrações 0,04, 0,17 e 0,04  $\text{g}_{\text{proteínas}}/\text{L}$ , respectivamente. Para a enzima XASI-1, nas mesmas condições padrões utilizou-se 50  $\mu\text{L}$  da suspensão (tampão + derivado) com concentração de 0,4  $\text{g}_{\text{derivado}}/\text{mL}$ .

Para a atividade beta de XAS-4 e XASP-4 foram utilizadas em 500  $\mu\text{L}$  de substrato, 50  $\mu\text{L}$  de enzima com 0,25  $\text{g}_{\text{proteínas}}/\text{L}$ , e para XASPI-4 utilizou-se em 800  $\mu\text{L}$  de substrato mais 40  $\mu\text{L}$  de derivado com concentração de 0,05  $\text{g}_{\text{proteínas totais}}/\text{mL}$ . Uma vez que as enzimas  $\beta$ -xilosidases apresentaram uma ampla faixa de linearidade, as atividades das enzimas XAS-2 e 3 foram realizadas com 500  $\mu\text{L}$  de substrato e 30  $\mu\text{L}$  de enzima com 3,47 e 0,75  $\text{g}/\text{L}$ , respectivamente.

#### 4.4.2 Efeito da temperatura

O efeito da variação de temperatura na atividade endo nas enzimas XAS-1, XASI-1, XAS-2 e XAS-3 pode ser observado a partir da Figura 19.

**Figura 19** – Influência da temperatura sobre a atividade das endoxilanasas XAS-1, 2 e 3 e XASI-1, realizadas em xilana de eucalipto 1 % (m/v) tampão citrato de sódio pH 5,5.

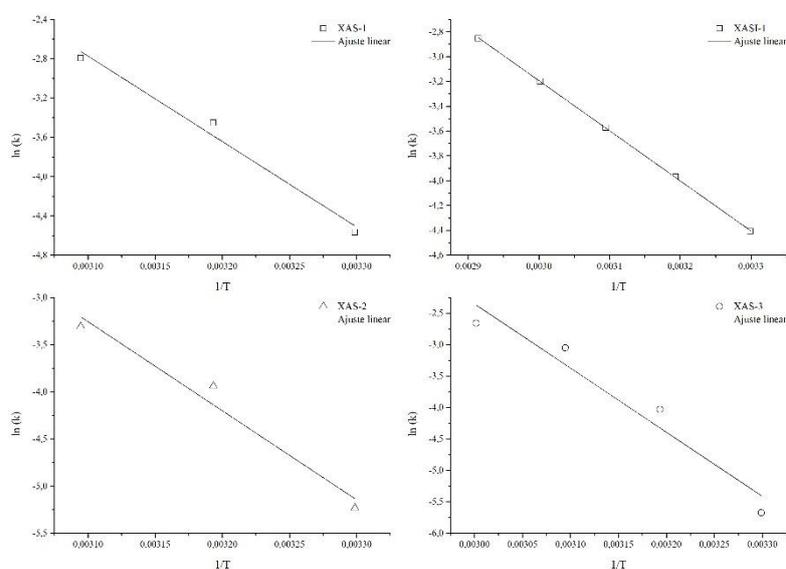


Observa-se por meio da Figura 19 que as três enzimas livres possuem perfis de temperatura semelhantes com um pico de máxima atividade nas temperaturas de 55, 60 e 70 °C para as enzimas XAS-1, 2 e 3, respectivamente. A enzima XASI-1 apresentou um perfil crescente de atividade até a temperatura de 80°C, temperaturas maiores não foram testadas pois dificilmente esta enzima será aplicada em condições tão severas. Os perfis de influência da temperatura obtidos no estudo, estão de acordo com o esperado pela literatura. Uma vez que, com o aumento da temperatura, ocorre o aumento da velocidade inicial da enzima, porém temperaturas elevadas conduzem a progressiva inativação das moléculas da enzima, e a união destes dois fatores faz com que cada enzima apresente uma temperatura ótima.

Comparando a XAS-1 livre e imobilizada é possível perceber que quando imobilizada, esta se torna menos susceptível à inativação através do efeito da temperatura. Esse efeito estabilizante da ligação multipontual da enzima ao suporte agarose ativado com grupos glioxil já foi reportado por MILESSI et al, 2015. As ligações covalentes que ocorrem para a formação do derivado agarose-glioxil-XynA diminuem drasticamente a flexibilidade da enzima, tornando a estrutura das moléculas mais estáveis (SCHELLENBERGER, ULBRICH, 1989; MILESSI et al., 2015).

Através dos dados obtidos pelo efeito da temperatura também foi possível calcular a energia de ativação para cada reação catalisada, a partir da Lei de Arrhenius fazendo uso da Equação 9 (3.3.2.5). Os dados obtidos de  $\ln(K)$  em função de  $1/T$  permitiram determinar a energia de ativação ( $E_a$ ) para cada enzima, a partir de ajustes lineares como são apresentados na Figura 20 e Tabela 19.

**Figura 20** – Ajuste dos parâmetros para obtenção da energia de ativação de cada reação enzimática



**Tabela 19** – Dados de energia de ativação e para as endoxilanases.

Enzima	$E_a$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
XAS-1	72,30	0,97
XASI-1	40,39	0,99
XAS-2	78,53	0,91
XAS-3	84,77	0,94

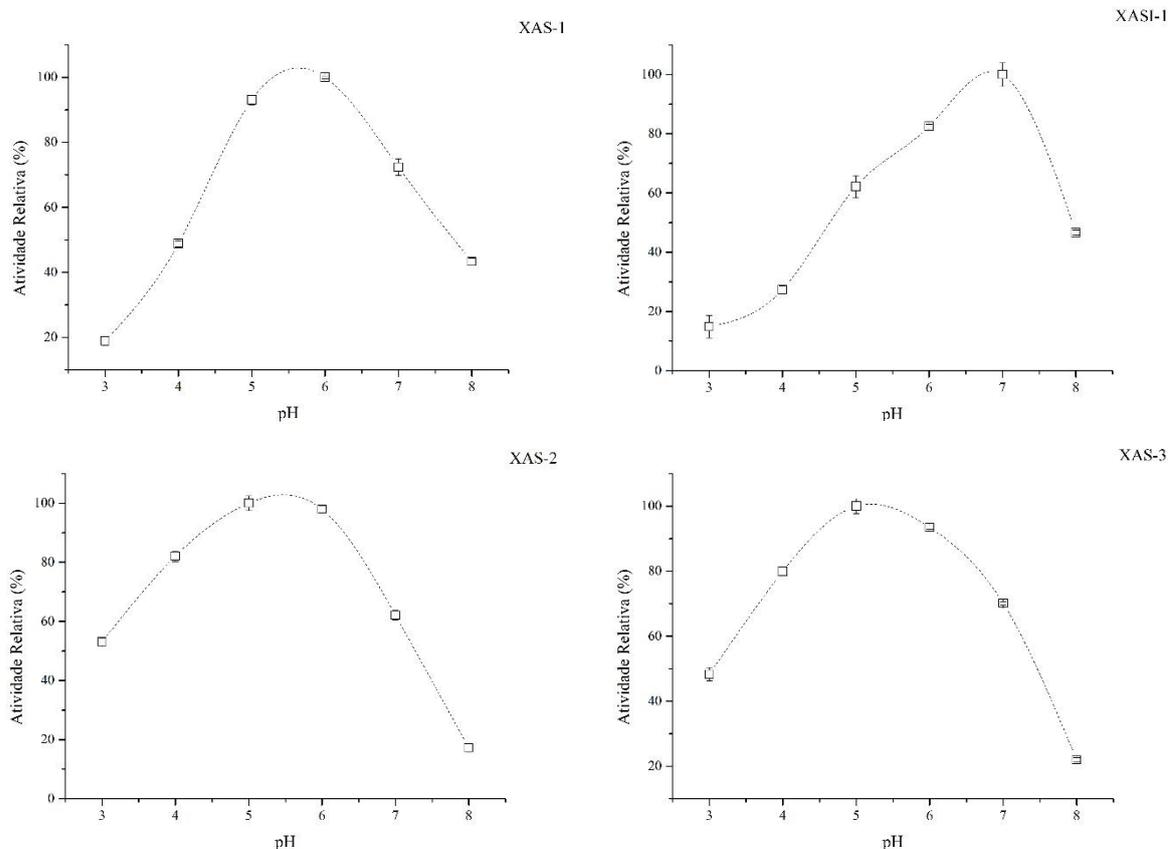
A energia de ativação de cada reação representa a altura da barreira energética do estado de transição, assim quanto maior a  $E_a$  mais lenta será a reação química (LEHNINGER; NELSON; COX, 1976). Para as enzimas estudadas, XAS-3 apresentou maior  $E_a$  seguida pelas XAS-2, XAS-1 e XASI-1. Desta forma, constata-se que XAS-3 é mais sensível à variação de temperatura, já XASI-1 é muito menos sensível a variação de temperatura quando comparado a mesma enzima na forma livre. Os resultados encontrados foram maiores que os resultados encontrados por PETRESCU et al., (2000) para xilanase de *Cryptococcus adeliar*  $E_a$  de 52,2 kJmol<sup>-1</sup> e foram menores que o resultado encontrado por STEPHENS et al., (2007) que obteve  $E_a$  de 97 kJ mol<sup>-1</sup> para xilanase de *Thermomyces lanuginosus*.

#### 4.4.3 Efeito do pH

Os perfis de atividade das xilanases com relação à variação dos pHs são apresentados na Figura 21.



**Figura 21** - Perfis de atividade das endoxilanasas XAS-1, 2, 3 e XASI-1 em função da variação do pH, realizadas em xilana de eucalipto 1 % (m/v) a 50°C.



Através da Figura 21 é possível observar que as faixas de pH ótimo para as enzimas XAS-1, 2 e 3 situam-se entre o pH 5,0 e 6,0. Já a enzima XASI-1 imobilizada obteve um pH ótimo próximo a 7, este aumento do pH está diretamente relacionado com a mudança na estrutura tridimensional da enzima ocasionada pela imobilização. Este comportamento de variação do pH ótimo de enzimas imobilizadas é comumente descrito na literatura e também está relacionado com o tipo de suporte utilizado, PAL e KHANUM (2011) observaram um aumento de 0,5 no pH ótimo de uma xilanase de *Aspergillus niger* DFR-5 imobilizada em glutaraldeído e alginato.

Ensaio de perfil de atividade das xilanasas com relação a variação de pH realizados por MILESSI (2017) mostraram-se muito semelhantes aos obtidos neste trabalho, abrangendo as mesmas faixas de pH ótimo. Observa-se também que, entre estas enzimas, a XAS-1 tem sua atividade reduzida drasticamente em pH mais ácidos, o que pode estar diretamente relacionado com a natureza da enzima. Estudos relacionados especificamente com enzimas endoxilanasas em sua forma livre apresentam perfil de pH semelhantes (GÓMEZ et al., 2016; MILESSI, 2017).

Valores de temperatura e pH ótimos próximos aos apresentados neste estudo foram encontrados para xilanase de *Paenibacillus* sp. que obteve melhor atividade em temperatura de 60 °C e pH 6, em experimentos realizados com xilana de aveia (ZHENG et al., 2014). BATAILLON e colaboradores (2000) estudaram sobre a purificação e caracterização da xilanase de *Bacillus* sp., a enzima se mostrou com maior atividade em temperatura e pH de 75 °C e 6,0, em substrato de bétula.

SAHA (2003) verificou, em xilana de milho, que a xilanase de *Fusarium verticillioides* apresenta melhor atividade em temperatura de 50°C e pH 5,5, valores semelhantes a os encontrados para XAS-1. MARAIS (2008) estudou a xilanase comercial Multifect CX72L e obteve temperatura ótima em 60 °C e pH entre 4 e 6, utilizando como substrato xilana de aveia.

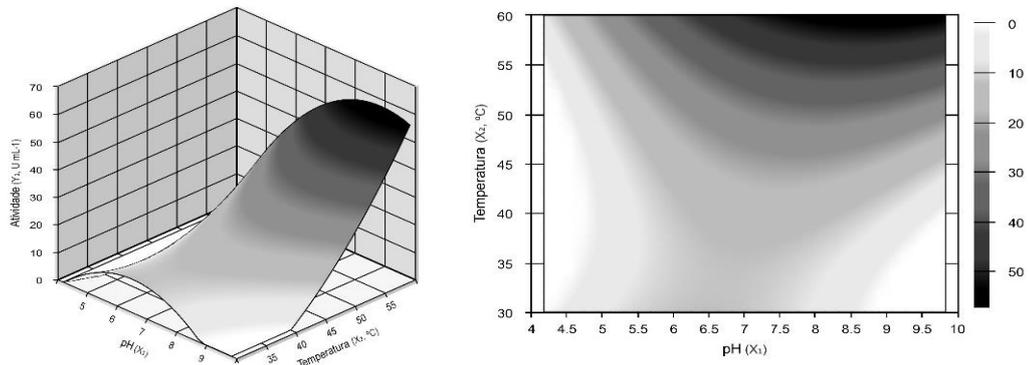
#### **4.4.4 Efeito de temperatura e pH para $\beta$ -xilosidases**

Para as enzimas que apresentaram atividade beta significativa (Tabela 18 do item 4.3), foram realizados ensaios de variação de temperatura e pH através de um planejamento experimental DCCR apresentado na Tabela 10 (Item 3.3.2.5). Também foram aplicadas as mesmas condições de estudo para a enzima XAS-4 purificada e imobilizada, a fim de comparar os perfis obtidos com a sua forma bruta.

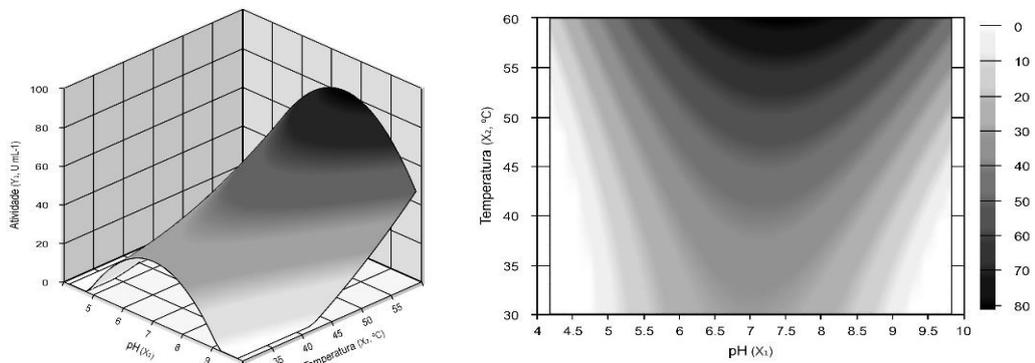
Os resultados das superfícies obtidas como resposta do estudo de pH e temperatura para as  $\beta$ -xilosidases são apresentados nas Figuras 22 e 23.

**Figura 22** – Perfis de pH e temperatura para XAS-2 e XAS-3, em 3D e 2D.

XAS-2



XAS-3

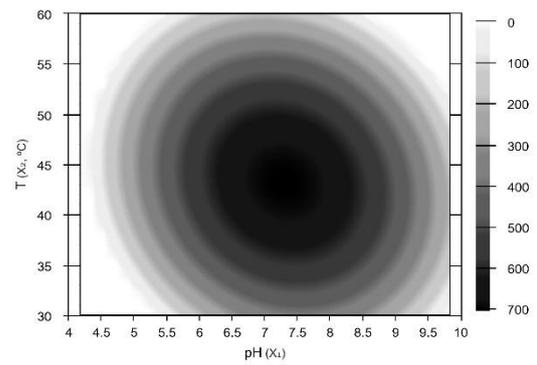
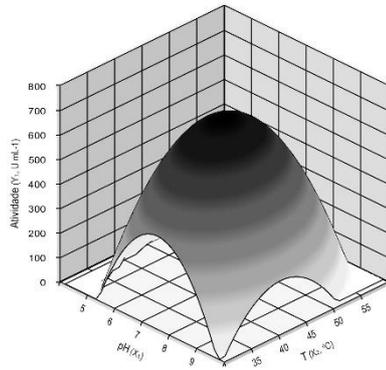


NOTA: Figuras obtidas pelo software Protimiza.

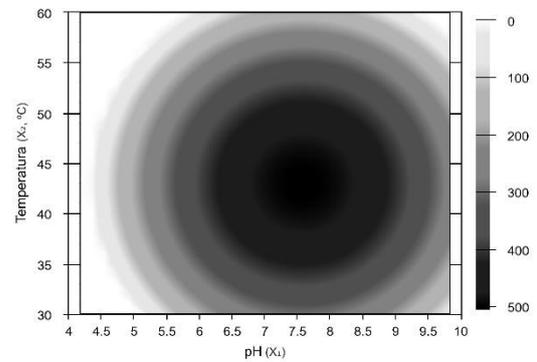
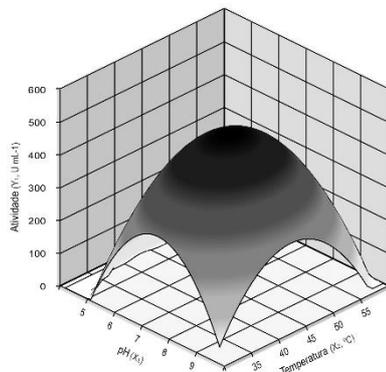
Através da Figura 22 é possível observar que a enzima XAS-2 apresenta como região ótima para atividade beta valores de pH entre 7,5 e 10 e temperaturas próximas a 60 °C. Já para a enzima XAS-3, observa-se que sua região de ótima atividade foi entre pH 6,5 e 8,5 e temperaturas entre 55 e 60 °C. Vale ressaltar que por limitação do equipamento não foi possível realizar ensaios em temperaturas maiores que 60 °C, porém este estudo já possibilita observar quais são os valores de pH e temperatura que mais se aproximam do ponto de ótimo das enzimas.

**Figura 23** – Perfis de pH e temperatura para XAS-4 em 3D e 2D.

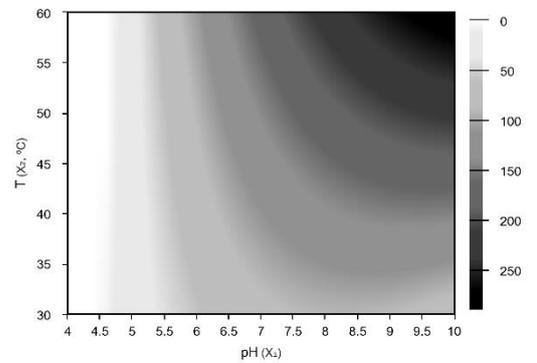
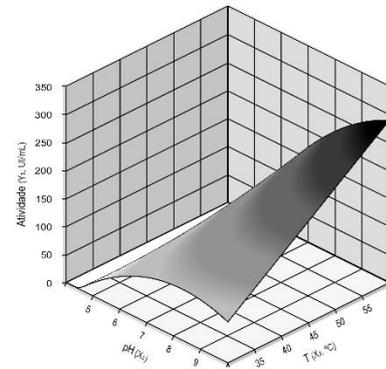
XAS-4 Bruta



XASP-4



XASPI-4



NOTA: Figuras obtidas pelo software Protimiza.

Na Figura 23, observam-se os perfis para a enzima XAS-4, nos quais é possível perceber a diferença entre esta enzima e as outras enzimas (Figura 22). Tanto em sua forma bruta quanto purificada, a XAS-4 apresenta uma região de ótima atividade bem definida, nas quais para a bruta a região se encontra entre pH 6,4 e 8,4, enquanto que a purificada obteve pH entre 6,4 e 9, e as duas apresentaram região de ótima temperatura entre 35 e 50 °C. DIOGO e colaboradores (2015) em seus estudos com a mesma  $\beta$ -xilosidase (XynB) obtiveram temperatura ótima de 35 °C e pH ótimo de 6,5 (tampões McIlvaine's 40 mM pH 3 – 10), valores que se encontram dentro da região ótima obtida através do planejamento experimental realizado neste trabalho.

Quando observada a XASPI-4 imobilizada, é possível notar que a região ótima esta muito deslocada do centro, a enzima imobilizada resistiu tanto a valores maiores de temperatura quanto de pH, o que está relacionada à alteração estrutural ocorrida na mesma com a técnica de imobilização. A XAS-4 é uma enzima multimérica e possui quatro sítios ativos (DIOGO et al., 2015). Na forma livre o desprendimento entre as sub-unidades, mantidas juntas por atrações físicas mais fracas, pode ocorrer facilmente. Na forma imobilizada, contudo, deve ter ocorrido ligação covalente entre suporte e duas ou mais sub-unidades da enzima, o que permitiu grande aumento de resistência térmica e alcalina para a enzima.

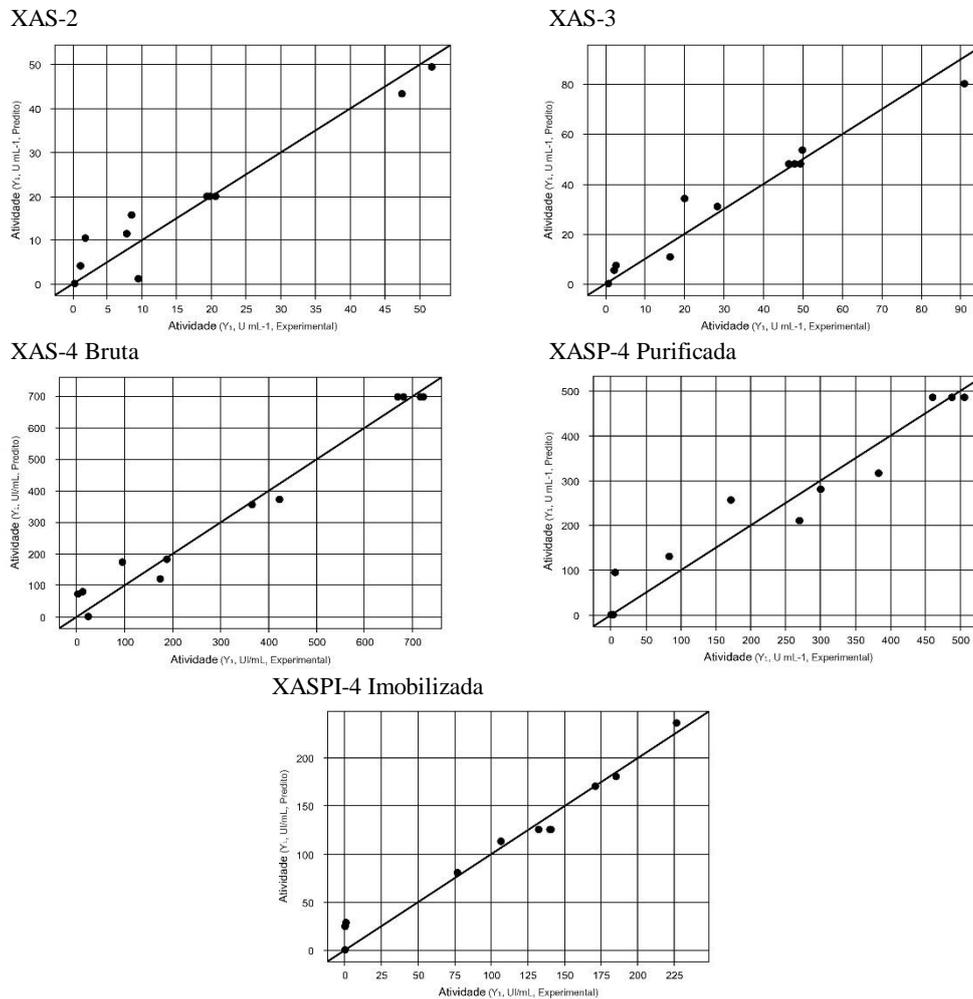
Os valores apresentados pela Tabela 20 são parâmetros muito importantes na análise dos dados obtidos pela ANOVA, pois para que o modelo seja considerado estatisticamente significativo é necessário que este apresente  $R^2$  próximo a 1,  $F_{\text{regressão/resíduos}} \geq F_{\text{tab}}$ , assim como é aconselhável que  $F_{\text{falta de ajuste/erro puro}} \leq F_{\text{tab}}$  (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

**Tabela 20** – Dados de ANOVA obtidos pelo *software* Protimiza, com nível de significância de 0,10.

Enzimas	$F_{\text{regressão/resíduos}} - F_{\text{tab1}}$	$F_{\text{falta de ajuste/erro puro}} - F_{\text{tab2}}$	$R^2$
XAS-2	9,75 > 5,05	261,29 > 19,16	0,91
XAS-3	13,32 > 5,05	95,27 > 19,16	0,93
XAS-4	44,85 > 3,97	18,27 > 6,59	0,97
XASP-4	18,45 > 4,53	14,04 < 19,25	0,92
XASPI-4	30,83 > 4,53	33,11 > 19,25	0,95

A partir dos dados presentes na Tabela 20 percebe-se que  $F_{\text{falta de ajuste/erro puro}} > F_{\text{tab}}$  para as três primeiras enzimas, significando que a falta de ajuste do modelo é significativa e não pode ser considerada para validar ou descartar o modelo obtido. Destaca-se, também, que XAS-2, 3 e XASPI-4 são os que apresentaram valores muito maiores que o de  $F_{\text{tab2}}$  este fato está diretamente relacionado ao ponto central do planejamento, pois o ideal é que a região côncava do gráfico se localize próxima ao centro do mesmo, porém as três enzimas apresentaram máxima atividade próximas a 60 °C e o equipamento não opera a temperaturas maiores. Neste caso, é necessário observar o gráfico de valores preditos versus os valores experimentais que se encontram na Figura 24.

**Figura 24** - Comparação entre os valores experimentais e os preditos pelos modelos.



NOTA: Figuras obtidas pelo software Protimiza.

Observa-se que para todas as enzimas o gráfico não apresenta grande discrepância entre os valores preditos e os experimentais, sendo assim os modelos podem ser considerados uma boa aproximação para atividade enzimática em diferentes pH e temperatura. Porém, é importante ressaltar que como o planejamento não permitiu obtenção de todos os parâmetros dentro do esperado, a região mencionada como ótima deverá ser a mais próxima da realidade experimental. Desta forma foram realizados experimentos de validação para cada enzima em estudo, os resultados são apresentados na Tabela 21.

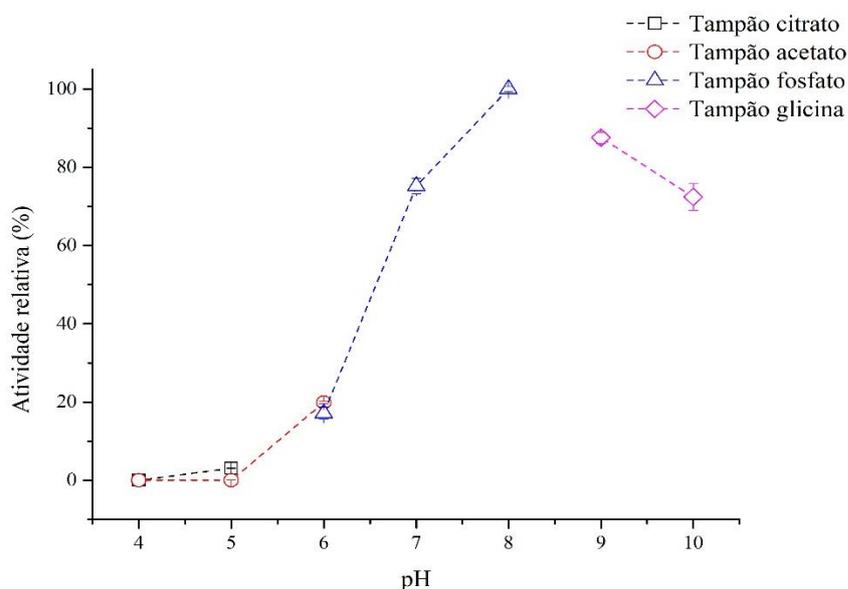
**Tabela 21** – Validação das regiões ótimas obtidas através do planejamento experimental contendo os dados de atividade específica preditos versus os experimentais.

Enzima	pH	T (°C)	Atividade predita (U mg <sup>-1</sup> )	Atividade exp. (U mg <sup>-1</sup> )	Desvio padrão (±)	Erro (%)
XAS-2	9	58	1,46	1,37	0,06	4,65
XAS-3	8	58	9,85	12,50	1,88	15,00
XAS-4	7	45	79,36	77,77	1,12	1,44
XASP-4	8	45	100,15	71,34	20,37	28,56
XASPI-4	8	55	356,70	401,84	31,92	7,94

Através dos dados apresentados pela Tabela 21, pode-se perceber que as enzimas XAS-2, 3, 4 e XASPI-4 podem ser bem representadas pelos perfis ajustados. A enzima XASP-4 obteve erro elevado, pois os dados do perfil e da validação foram realizados com diferença de 3 meses, tendo ocorrido, mesmo congelada, perda parcial de sua atividade. No ANEXO II deste trabalho encontram-se as tabelas complementares com mais detalhes dos estudos realizados no planejamento DCCR.

A fim de verificar com maior precisão o perfil de atividade com relação ao pH para a enzima XAS-4 purificada, foi realizado o experimento utilizando-se diversos tampões 50 mM, a temperatura de 50 °C, o perfil levantado encontra-se na Figura 25.

**Figura 25** – Efeito do pH na atividade da  $\beta$ -xilosidase XAS-4 purificada.



A partir da Figura 25 pode-se constatar que o pH ótimo de trabalho para a enzima XAS-4 é próximo a 8, confirmando a significância do modelo ajustado apresentado na Figura 23, pois este valor se encontra dentro da região ótima mencionada.

YAN e colaboradores (2008) caracterizaram a  $\beta$ -xilosidase de *Paecilomyces thermophila*, obtendo máxima atividade em temperatura de 55 °C e pH 6,5. Estudos realizados com beta de *Bacillus* sp. XY-131 mostraram valores de pH ótimo de 6,5 e temperatura de 45 °C (YAMAGUCHI; IZUMI; KITAMIKADO, 1998), já a beta produzida a partir de *Thermomyces lanuginosus* em *E. coli* se mostrou com maior atividade em pH 7 e temp. de 55°C (CHEN et al., 2012).

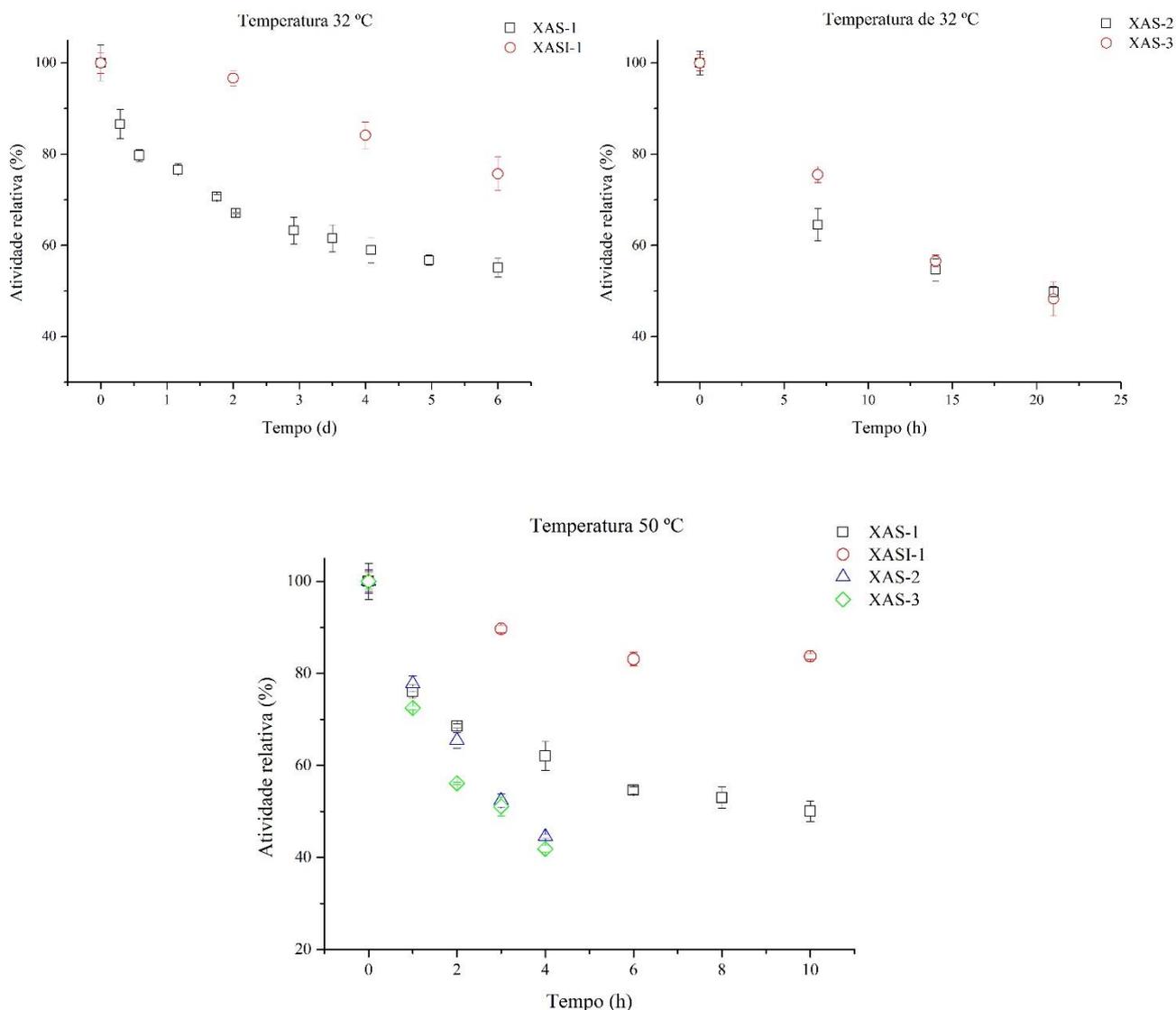
Um fato interessante de se destacar é que as enzimas XAS-2 e XAS-3 apresentam tanto endoxilanase quanto  $\beta$ -xilosidase e cada uma apresenta características diferentes, como pôde-se observar nos dados apresentados anteriormente. Na literatura é comum se encontrar enzimas endo e beta produzidas por um mesmo microorganismo e meio, que apresentem características diferentes, caso das enzimas produzidas por *Bascillus thermantarcticus*, as quais apresentaram o mesmo valor de pH para atividade máxima, porém temperaturas diferentes para endo e beta (LAMA et al., 2004); assim com as enzimas produzidas por *Fusarium verticillioides*, com pH ótimo de 5,5 e 4,5 e temperatura ótima de 50 e 60 °C para a xilanase e  $\beta$ -xilosidase, respectivamente (SAHA, 2003).

#### **4.3.5 Análise de estabilidade térmica**

Os dados referentes à estabilidade térmica das endoxilanasas são apresentados na Figura 26.



**Figura 26** – Estabilidade térmica de XAS-1, 2, 3 e XASI-1, incubadas em tampão citrato 50 mM pH 6,0.



Pode-se observar através da Figura 26, que a XAS-1 é mais resistente a temperatura quando comparada com as demais enzimas, pois ela mesmo livre (32 °C) demorou dias para alcançar o tempo de meia vida, e com a imobilização foi possível melhorar ainda mais sua estabilidade como pode ser observado nos ensaios a 32 °C e a 50 °C. MILESSI (2017) em seus estudos, conseguiu aumentar o tempo de meia vida da endoxilanase de *Bacillus subtilis* imobilizada em agarose-glioxil em mais de 8 mil vezes, nas condições de 56 °C e pH 5,6.

As enzimas XAS-2 e 3 se mostraram muito semelhantes em termos de estabilidade, nas duas temperaturas estudadas. Comparando os gráficos de 32 °C e 50 °C percebe-se que todas as enzimas perdem mais rapidamente a atividade a 50 °C, este comportamento é de se esperar,

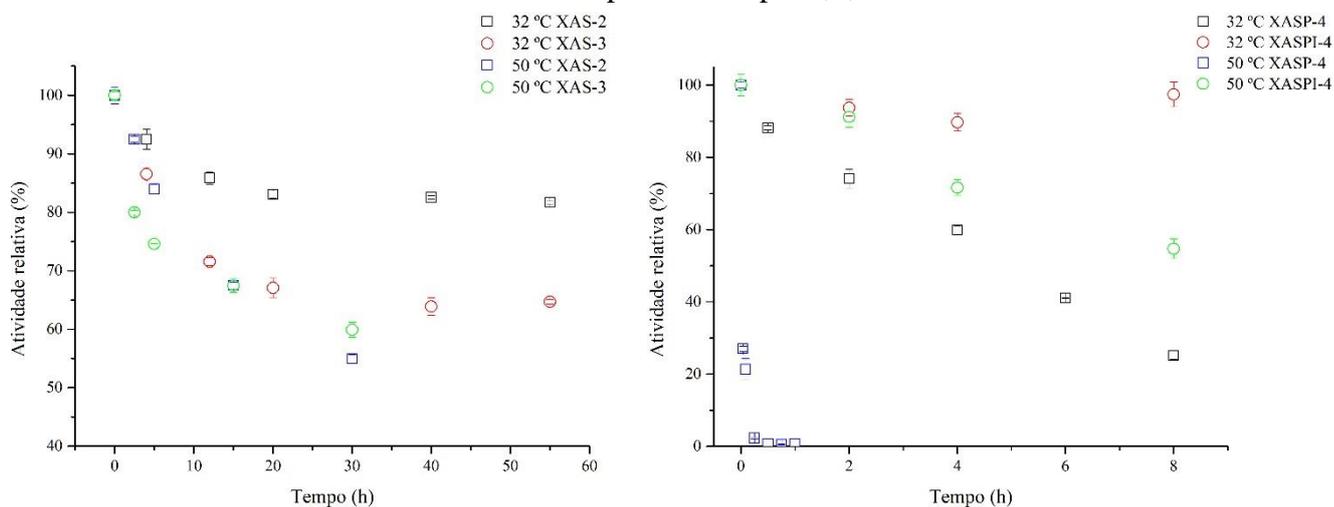
uma vez que com o aumento da temperatura ocorre maior vibração da estrutura molecular da enzima, favorecendo seu desenovelamento.

A enzima XAS-1 se destacou pela sua estabilidade, uma vez que o tempo de meia vida a 32 °C foi superior a 6 dias, enquanto que o tempo de meia vida dos complexos XAS-2 e 3 foram de aproximadamente 20 h.

Com relação à temperatura de 50 °C, XAS-1 apresentou  $t_{1/2}$  próximo a 9 h enquanto as outras enzimas apresentaram tempo de meia vida de cerca de 3 h.

A Figura 27 apresenta o perfil de atividade em relação ao tempo de incubação para as  $\beta$ -xilosidases XAS-2, XAS-3, XASP-4 e XASPI-4.

**Figura 27** – Estabilidade térmica das  $\beta$ -xilosidases XAS-2, XAS-3, XASP-4 e XASPI-4 incubada em tampão fosfato pH 6,0, 50 mM.



O primeiro gráfico apresenta os dados de estabilidade para as enzimas XAS-2 e XAS-3, as quais se mostraram estáveis a 32 °C, após 20 h de incubação, retendo ainda 80 % e 65 % da atividade inicial, respectivamente. A 50 °C, observa-se, como esperado, aumento da inativação, chegando as duas próximas a 55 % da atividade após 30 h de incubação.

O segundo gráfico apresenta os resultados de estabilidade realizados para a enzima XASP-4 livre e imobilizada, onde pode-se observar que a enzima livre é muito sensível ao aumento da temperatura: a 32 °C a enzima, apresentou tempo de meia vida de aproximadamente 5 h e seu perfil segue em queda até chegar próximo a zero em apenas 10 h, já a 50 °C a enzima desnatura quase que instantaneamente (< 2,5 min). A enzima XASPI-4 imobilizada se mostrou muito mais resistente ao efeito da temperatura, pois em 32 °C nas mesmas 8 h sua atividade quase não variou, e a 50 °C em 8 h ainda não havia chegado em meia vida.

Na literatura encontram-se diversos estudos relacionados a estabilidade térmica de xilanases e  $\beta$ -xilosidases (LAMA et al., 2004; SUN; CHENG, 2002; ZHANG et al., 2011). CUNHA (1999) estudou a estabilidade a 30 e 50 °C da xilanase de *Aspergillus foetidus* e obteve  $t_{1/2}$  de 8 dias e de 7 h, respectivamente. A enzima Multifect estudada por MARAIS (2008) obteve  $t_{1/2}$  próximo a 5 h a temperatura de 55 °C para a medida de endoxilanase e  $t_{1/2}$  próximo a 6 h para a  $\beta$ -xilosidase.

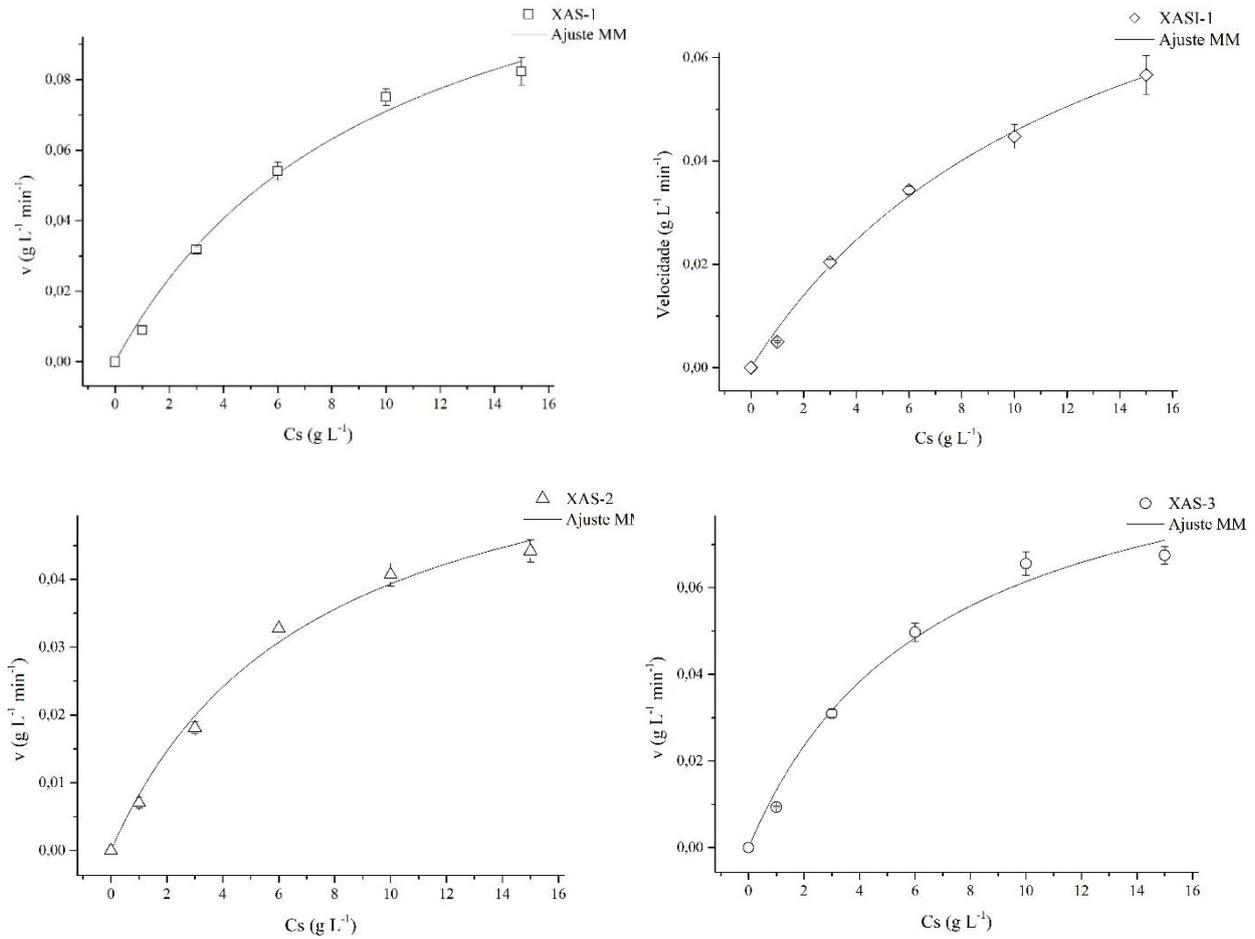
#### **4.4.6 Efeito da concentração de substrato**

Foram variadas as concentrações de substrato para todas as enzimas selecionadas. Uma vez que os complexos enzimáticos XAS-2 e XAS-3 contêm atividade endo e beta foram realizados dois estudos, com os substratos específicos para cada tipo de medida.

##### **4.4.6.1 Influência da variação de $C_s$ na velocidade de hidrólise catalisada por endoxilanases**

O estudo do efeito da concentração de substrato permite que se conheçam a velocidade máxima da reação para cada enzima, parâmetros de afinidade entre enzima e substrato e ainda detectar possível inibição por substrato que possa existir ao longo das reações. Sendo assim, os ensaios presentes na Figura 28 mostram o efeito da variação da concentração de xilana de eucalipto para cada complexo enzimático em estudo, as medidas de velocidades iniciais foram realizadas a temperatura de 50 °C e pH 5,5. Foram ajustados aos pontos experimentais o modelo de Michaelis-Menten, sendo os resultados de  $V_{max}$ ,  $K_M$  e coeficientes de ajuste reportados pela Tabela 22.

**Figura 28** – Efeito da concentração do substrato de xilana de eucalipto na velocidade da reação para as endoxilanases a 50°C, tampão citrato 50 mM pH 5,5.



**Tabela 22** – Valores dos parâmetros do modelo obtidos através do ajuste do modelo de MM para as endoxilanases.

Enzima	Ce (g L <sup>-1</sup> )	V <sub>max</sub> (mg mL <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (mg mL <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
XAS-1	0,0008	0,15 ± 0,012	11,13 ± 1,52	0,99
XASI-1	0,0065*	0,11 ± 0,010	13,12 ± 2,24	0,99
XAS-2	0,0034	0,07 ± 0,006	7,25 ± 1,45	0,99
XAS-3	0,00007	0,10 ± 0,011	6,75 ± 1,64	0,99

NOTA: \*Ce (g derivado mL<sup>-1</sup>)

Pode-se observar a partir dos resultados apresentados pela Figura 28 e Tabela 22, que o modelo de MM se ajustou bem para todas as enzimas obtendo  $R^2 > 0,99$  em todos os casos. Com relação ao  $K_M$  que representa a afinidade entre enzima e substrato, onde quanto menor o valor de  $K_M$  maior a afinidade XAS-3 e XAS-2 obtiveram maior afinidade quando comparados a XAS-1 e XASI-1.

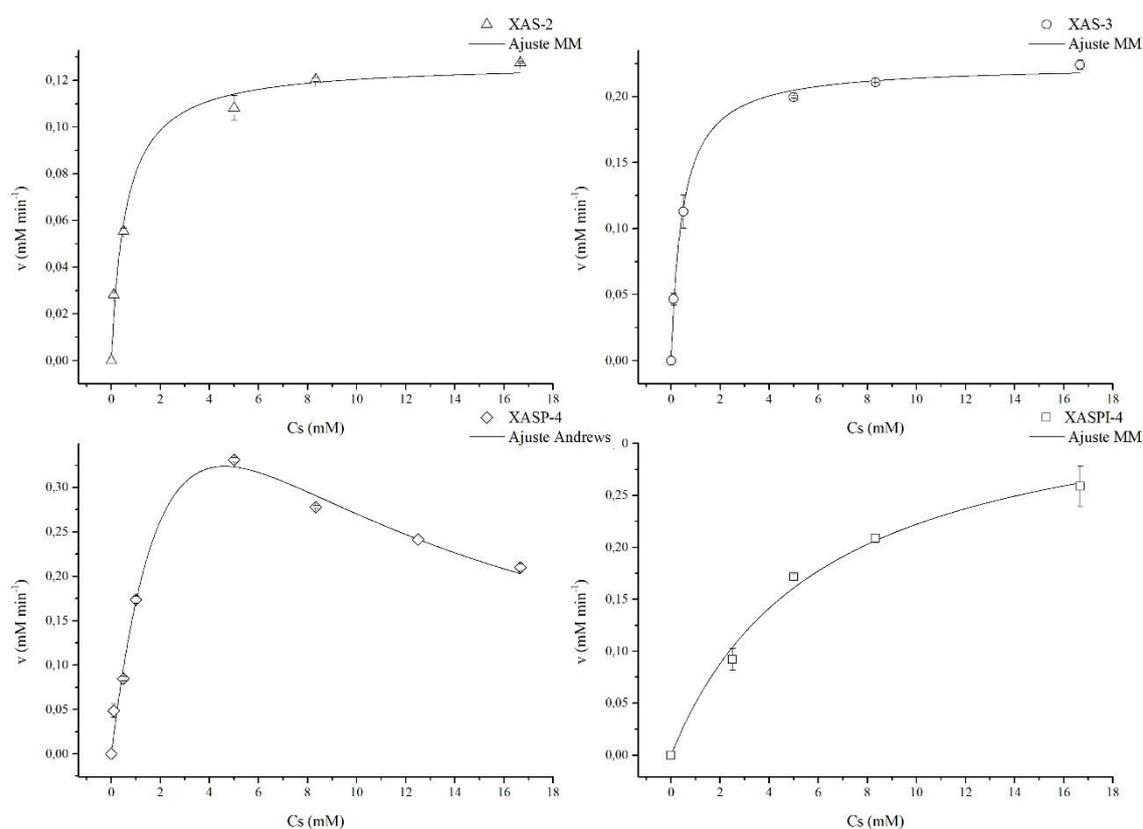
Resultados semelhantes de  $K_M$  foram reportados na literatura, em ensaios realizados nas condições de temperatura de 50 °C e pH 5,0 para xilanases de *Acrophialophora nainiana* em

xilana de bétula (SALLES et al., 2000), *Humicola grisea* em xilana de aveia (LUCENA-NETO; FERREIRA-FILHO, 2004) e *Chrysosporthe cubensis* em xilana de aveia (GOMES, 2014) os respectivos valores de  $K_M$  foram de 40,9-16,1, 10,9-11,2 e 2,6-1,2  $\text{mg mL}^{-1}$ .

#### 4.4.6.2 Influência da concentração de Cs na velocidade de hidrólise catalisada por $\beta$ -xilosidases

O efeito da variação da concentração de pNPX para as enzimas XAS-2, XAS-3, XASP-4 e XASPI-4 estão presentes na Figura 29, as medidas de velocidades iniciais foram realizadas a temperatura de 50 °C e pH 6,0. O efeito foi analisado conforme os modelos de Michaelis-Menten e de Andrews, sendo os resultados de  $V_{\text{max}}$ ,  $K_M$  e  $K_i$  apresentados pela Tabela 23.

**Figura 29** – Influência da concentração do substrato (pNPX) na velocidade da reação para as  $\beta$ -xilosidases estudadas.



**Tabela 23** – Valores obtidos através do ajuste do modelo de Andrews e MM para as  $\beta$ -xilosidases.

Enzima	Ce (g L <sup>-1</sup> )	V <sub>max</sub> (mM min <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (mM)	K <sub>i</sub> (mM)	R <sup>2</sup>
XAS-2	0,3155	0,13 ± 0,003	0,58 ± 0,08	-	0,99
XAS-3	0,0684	0,22 ± 0,004	0,47 ± 0,05	-	0,99
XASP-4	0,0224	0,88 ± 0,180	3,93 ± 1,10	5,41 ± 1,67	0,98
XASPI-4	0,0024	0,36 ± 0,023	6,04 ± 0,99	-	0,98

É possível observar a partir da Figura 29 que XASP-4 apresenta perfil diferenciado de XAS-2, XAS-3 e XASPI-4. Esse perfil (XASP-4) é comum em casos de inibição pelo substrato (inibição incompetitiva), que ocorre quando mais de uma molécula de substrato se liga a um local ativo, destinado a apenas uma molécula, resultando em um complexo inativo diminuindo assim a taxa de reação (CHAPLIN; BUCKE, 1990). O efeito desta inibição interfere muito no valor da velocidade máxima, como pode ser observado na Tabela 20. Vale salientar que este efeito da inibição pelo substrato não é observado nas condições do experimento para a enzima imobilizada. Há indicação neste caso de presença de efeitos difusivos no ensaio com enzima imobilizada. Esse efeito dependerá da relação entre velocidade de reação (medida por volume de catalisador) e da velocidade de difusão do substrato no gel. Uma vez que a velocidade de reação pode estar muito mais alta que a de difusão, a concentração real de substrato para a enzima imobilizada deve estar abaixo daquela para onde ocorre inibição da velocidade intrínseca. Já para as afinidades enzima-substrato XAS-2 e XAS-3, observaram-se valores próximos, com maior afinidade ao pNPX.

Diversos estudos são reportados pela literatura quanto aos valores de K<sub>M</sub> para diferentes  $\beta$ -xilosidases em pNPX. TENG e colaboradores (2011) estudaram betaxilosidase de *Paecilomyces thermophila* em *E. coli* nas condições de 50 °C e pH 7,0 e obtiveram K<sub>M</sub> de 4,5 mM. Estudos recentes desenvolvidos com  $\beta$ -xilosidase de *Penicillium janczewskii* nas condições de 75 °C e pH 5,0 apresentaram K<sub>M</sub> de 1,2 mM (TERRASAN; GUIBAN; CARMONA, 2016). Para beta de *Paecilomyces thermophila* em 50 °C e pH 6,5 K<sub>M</sub> foi de 0,5 mM, resultado que mais se aproxima aos encontrados para XAS-2 e 3.

A partir dos dados obtidos pelos ensaios de variação da concentração de substrato (Tabelas 22 e 23) e fazendo uso dos dados apresentados na Tabela 17, que contém o percentual de proteínas endo e beta de cada complexo, foi possível calcular os valores das constantes catalíticas e das constantes de eficiência catalítica de cada complexo estudado, sendo os dados apresentados na Tabela 24.

**Tabela 24** – Parâmetros cinéticos  $k_{cat}$  e  $k_{cat}/K_M$  obtidos para cada enzima estudada.

Enzimas	$k_{cat}$ endo ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ endo ( $mL\ mg^{-1}s^{-1}$ )	$k_{cat}$ beta ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ beta ( $mL\ mg^{-1}s^{-1}$ )
XAS-1	5,92	0,53	-	-
XASI-1	0,11	0,01	-	-
XAS-2	4,58	0,63	0,00179	0,02
XAS-3	6,83	1,01	0,03015	0,46
XAS-4	-	-	0,10562	0,19
XASPI-4	-	-	0,40345	0,48

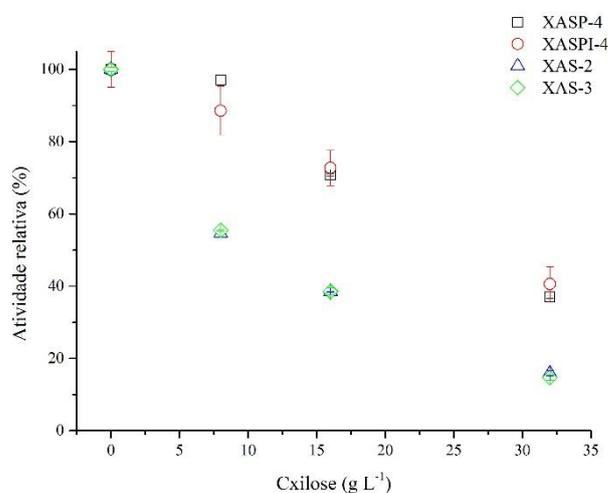
As constantes catalíticas  $k_{cat}$  e  $k_{cat}/K_M$  para as endoxilanases se mostraram muito próximas tendo como melhor resultado em constante de eficiência XAS-3>XAS-2>XAS-1>XASI-1. A enzima XASI-1 apresentou resultados muito inferiores aos da sua forma livre, o que deve estar relacionado a modificação na sua estrutura molecular da enzima, confirmada pela baixa atividade recuperada de 43 %, obtida por MILESSI (2017). Para as frações de  $\beta$ -xilosidases, as constantes de eficiência catalítica das enzimas XASPI-4 e XAS-3 tiveram resultados superiores aos das outras enzimas. Neste caso, a enzimas livre obteve resultado inferior ao da enzima imobilizada mostrando que é possível que imobilização tenha melhorado a afinidade com o substrato em questão. Esses resultados, também podem estar ligados a efeitos difusivos nas medidas com enzima imobilizada, como mencionado anteriormente.

Estudos realizados por DRISS et al. (2013) que caracterizaram xilanases GH11 do fungo *Penicillium* obtiveram  $k_{cat}$  e  $k_{cat}/K_M$  de 594 à 3024 ( $s^{-1}$ ) e 42 à 215 ( $mL\ mg^{-1}s^{-1}$ ) para diferentes substratos (aveia, LVAX e faia), tendo como principal diferença os valores de  $K_M$  muito menores, o que fez com que tanto o  $k_{cat}$  quanto o  $k_{cat}/K_M$  fossem muito maiores que os encontrados neste estudo. Já estudos realizados por JÄNIS et al. (2007) determinaram os parâmetros cinéticos de uma endoxilanase (*Trichoderma reesei*) com substrato de xilohexose, xilopentose, xilotetraose e xilotriose e obtiveram os seguintes coeficientes de eficiência catalítica 0,93, 0,37, 0,027 e 0,00015  $\mu M^{-1}\ s^{-1}$ . TAGUCHI et al. (1995) estudou os parâmetros cinéticos de *Bacillus pumilus* em substrato de pNPX e encontrou  $K_M$  e  $k_{cat}$  de 0,38 mM e 2,29  $s^{-1}$ , respectivamente. Estudos relacionados a  $\beta$ -xilosidases foram realizados por BRUNZELLE et al. (2008) com enzimas de *Selenomonas ruminantium* e obtiveram  $k_{cat}$  de 9,36  $s^{-1}$  e  $k_{cat}/K_M$  6,71  $mM^{-1}s^{-1}$ . Estes valores encontrados na literatura comprovam que as enzimas estudadas são tão eficientes quanto as mencionadas, uma vez que foram valores próximos ou até mesmo menores que os deste estudo.

#### 4.4.7 Influência da concentração de inibidores para as $\beta$ -xilosidases

As  $\beta$ -xilosidases são enzimas muito importantes no processo de degradação da xilana, pois são elas que transformam os xilooligossacarídeos em xilose. Além de ser produto da degradação enzimática, a xilose se encontra em altas concentrações em licores provenientes de alguns pré-tratamentos. Desta forma, se torna importante avaliar a influência da concentração da xilose na atividade das  $\beta$ -xilosidases em estudo, como pode ser observado na Figura 30.

**Figura 30** – Influência da concentração de xilose na atividade das enzimas XAS-2, XAS-3, XASP-4 e XASPI-4, medidas em tampão fosfato 50 mM com pNPX 5 mM, pH 6,0 a 50 °C.



Através da Figura 30 pode-se observar que realmente ocorre inibição por xilose, a enzima XASP-4 livre e imobilizada possuem efeito semelhante, assim como as enzimas XAS-2 e XAS-3 que também sofrem com a ação do inibidor, porém de forma mais acentuada. Estudos envolvendo a inibição por xilose também foram realizados por KIRIKYALI et al. (2014) em  $\beta$ -xilosidase *rAspergillus oryzae*, YAN et al. (2008) estudaram a tolerância a xilose da  $\beta$ -xilosidase de *Paecilomyces thermophila*.

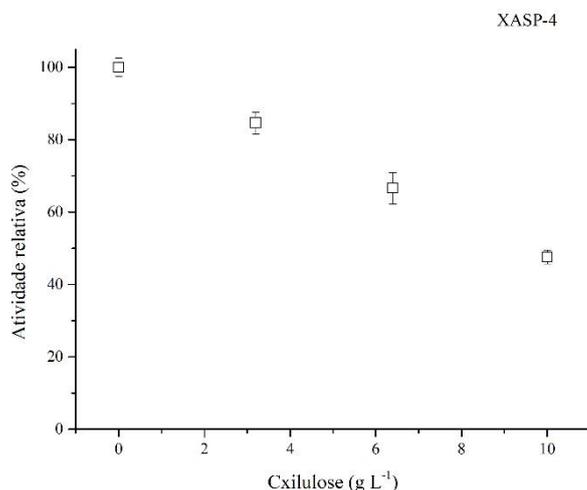
Estudos realizados por MILESSI (2017), mostraram que em um processo SIF partindo de xilana de bétula com 60 g/L de xilose e 3g/L de xilulose, em apenas duas horas havia 38 g/L de xilose e 10,08 g/L de xilulose, após este tempo a concentração de xilulose diminui por estar sendo consumida pela *Saccharomyces cerevisiae*, desta forma torna-se importante saber como essa concentração de xilulose afeta a reação de hidrólise das enzimas.

Desta forma, foram realizados ensaios de inibição das concentrações de xilulose em meio ao substrato padrão, uma vez que esta molécula é um isômero de xilose produzida pela



enzima glicose-isomerase. A Figura 31, apresenta o efeito causado a partir das diferentes concentrações de xilulose, em termos de atividade relativa.

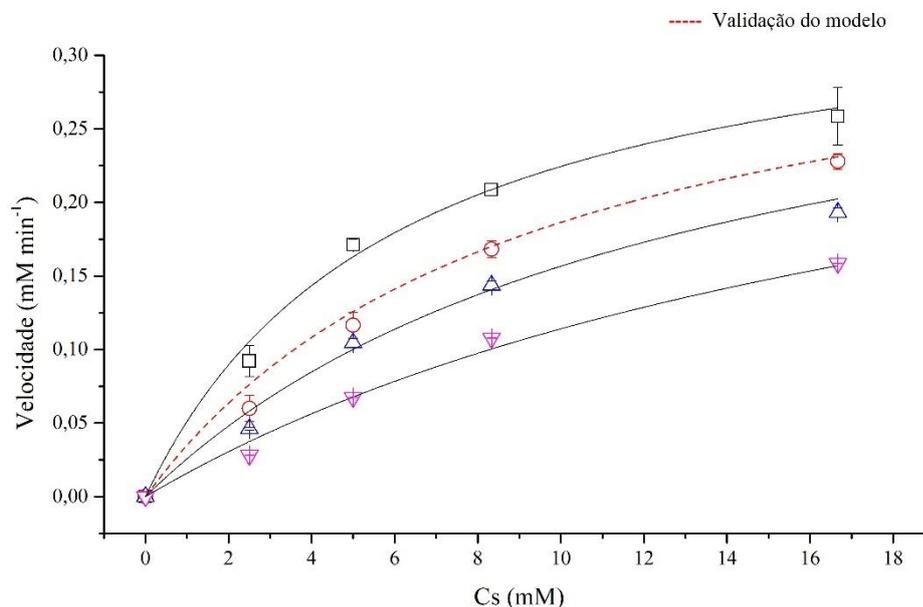
**Figura 31** - Influência da concentração de xilulose na atividade da enzima XASP-4, medida em tampão fostato 50 mM com pNPX 5 mM, pH 6,0 a 50 °C.



A partir da Figura 31 é percebe-se que com o aumento da concentração de xilulose no meio reacional a atividade da enzima diminui consideravelmente, com 10 g/L de xilulose a atividade chegou próximo a 50 %. Quando se comparam as Figuras 30 e 31 pode-se constatar que a inibição causada pela xilulose é mais significativa, uma vez que com 10 g/L de xilose a atividade enzimática ficou em torno de 80 %. Na literatura ainda não foram encontrados estudos relacionados a inibição por xilulose em  $\beta$ -xilosidases.

Sabendo-se que a relação de equilíbrio xilose/xilulose normal é da ordem de 5:1 (SILVA, 2013), foram realizados ensaios de inibição contendo os dois inibidores xilose e xilulose na proporção de 5:1, respectivamente, afim de avaliar o efeito conjunto destes dois compostos na enzima  $\beta$ -xilosidase produzida *in house* já imobilizada (XASPI-4). A partir da Figura 32 é possível observar os perfis de inibição dos dados experimentais, assim como a curva do modelo ajustado.

**Figura 32** – Influência da inibição mista na  $\beta$ -xilosidase (XASPI-4) por xilose e xilulose nas seguintes condições ( $\square$ ) sem inibição, ( $\circ$ ) 8 e 1,6 g/L, ( $\Delta$ ) 16 e 3,2 g/L e ( $\nabla$ ) 32 e 6,4 g/L, respectivamente.



O levantamento dos parâmetros cinéticos foi realizado a partir do ajuste inicial do modelo de MM sem inibição, partindo destes foi possível estimar  $K_{i_{xilose}}$  de  $163,52 \pm 31,37$  mM e  $K_{i_{xilulose}}$  de  $58,68 \pm 9,46$  mM isoladamente, uma vez inseridos esses dados na Equação 11 foi possível obter o valor de  $\alpha$  de  $1,76 \pm 0,56$ , com um ajuste de  $R^2$  0,99. A validação do modelo é apresentada na Figura 32 representada através da linha tracejada que passa próxima aos dados de inibição de 8 e 1,6 g/L de xilose e xilulose, respectivamente. Estudos relacionados a inibição por xilose em  $\beta$ -xilosidases são geralmente reportados com efeito de inibição competitiva, tendo valores de  $K_i$  que variam de 2 a 10 mM (HERRMANN et al., 1997; FAN et al., 2010; KIRIKYALI et al., 2014). FAN et al. (2010) também realizaram estudos de inibição competitiva mista para  $\beta$ -xilosidases de *Selenomonas ruminantium*, no qual a mutante W145G quando catalisada em 4NPA, apresentou inibição por xilose e etanolamina, obtendo como parâmetros com  $K_M$ ,  $K_{i_{xilose}}$ ,  $K_{i_{etanolamina}}$  e  $\alpha$  de 0,432, 14,1, 1,17 mM e 0,0978.

ZANOELO et al. (2004) em suas pesquisas doparam o meio de reação com 200 mM de xilose e não verificaram efeito de inibição na sua  $\beta$ -xilosidase de *Scytalidium thermophilum*, já YAN e colaborador (2008) encontraram  $K_i$  de 139 mM para beta produzida pelo fungo termofílico de *Paecilomyces thermophila J18*. Resultado próximo ao encontrado neste estudo, indicando que esta enzima por mais que seja inibida ainda é menos afetada pelo efeito da concentração de xilose que a grande maioria das  $\beta$ -xilosidases.

A Tabela 25 apresenta um resumo das principais propriedades obtidas para cada enzima estuda neste trabalho.

**Tabela 25** – Principais resultados obtidos para as enzimas XAS-1, 2, 3 em substrato de xilana de eucalipto e XAS-2, 3 e 4 nos ensaios realizados em substrato pNPX.

	<b>Propriedade</b>	<b>XAS-1</b>	<b>XASI-1</b>	<b>XAS-2</b>	<b>XAS-3</b>	<b>XAS-4</b>	<b>XASP-4</b>	<b>XASPI-4</b>
	Proteína (mg mL <sup>-1</sup> )	2,02 ± 0,04	-	34,71 ± 0,48	7,53 ± 0,05	8,75 ± 0,18	4,93 ± 0,33	-
endoxilanasas	Ce utilizada (α vel.) (g L <sup>-1</sup> )	0,0008	0,0065 <sup>1</sup>	0,0034	0,00007	-	-	-
	Atividade (UI mL <sup>-1</sup> )	610,90 ± 39,26	11,42 ± 0,46	2157,13 ± 4,80	2846,73 ± 17,98	-	-	-
	Atividade esp. (UI mg <sup>-1</sup> )	302,43 ± 19,44	28,55 ± 1,15 <sup>2</sup>	62,15 ± 0,14	378,05 ± 2,39	-	-	-
	T máx. ativ. (°C)	55	≈ 80	60	70	-	-	-
	pH máx. ativ.	5,0 - 6,0	6,5 - 7,5	5,0 - 6,0	5,0 - 6,0	-	-	-
	Ea (kJ mol <sup>-1</sup> )	72,3	-	78,53	84,77	-	-	-
	K <sub>M</sub> (mg mL <sup>-1</sup> )	11,13 ± 1,52	13,12 ± 2,24	7,25 ± 1,45	6,75 ± 1,64	-	-	-
	V <sub>max</sub> (mg mL <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	0,15 ± 0,012	0,11 ± 0,01	0,07 ± 0,006	0,10 ± 0,011	-	-	-
	t <sub>1/2</sub> (32 °C)	> 6 dias	>> 6 dias	20 h	20 h	-	-	-
	t <sub>1/2</sub> (50 °C)	9 h	>> 10 h	3 h	3 h	-	-	-
	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	5,92	0,11	4,58	6,83	-	-	-
	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> (mL mg <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	0,53	0,01	0,63	1,01	-	-	-
	β-xilosidasas	Ce utilizada (α vel.) (g L <sup>-1</sup> )	-	-	0,3155	0,0684	0,019	0,0224
Atividade (U mL <sup>-1</sup> )		0,12 ± 0,08	-	11,90 ± 0,58	21,94 ± 0,11	47,19 ± 1,32	72,81 ± 0,57	359,58 ± 6,24
Atividade esp. (U mg <sup>-1</sup> )		0,06 ± 0,04	-	0,34 ± 0,02	2,91 ± 0,01	5,39 ± 0,15	14,77 ± 0,11	71,92 ± 1,25
T máx. ativ. (°C)		-	-	≥ 60	≥ 55	35 - 50	35 - 50	> 50
pH máx. ativ.		-	-	7,5 - 10	6,5 - 8,5	6,4 - 8,4	6,4 - 9,0	> 8
K <sub>M</sub> (mM)		-	-	0,58 ± 0,08	0,47 ± 0,05	-	3,93 ± 1,10	6,04 ± 0,99
V <sub>max</sub> (mM min <sup>-1</sup> )		-	-	0,22 ± 0,004	0,13 ± 0,003	-	0,88 ± 0,180	0,36 ± 0,023
K <sub>i</sub> (mM)		-	-	-	-	-	5,41 ± 1,67	163,52 ± 31,37 <sup>3</sup>
t <sub>1/2</sub> (32 °C)		-	-	>> 60 h	>> 60 h	-	5 h	>> 8 h
t <sub>1/2</sub> (50 °C)		-	-	> 30 h	> 30 h	-	< 2,5 min	≈ 8 h
k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )		-	-	0,0018	0,0302	-	0,1056	0,4035
k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> (mL mg <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )		-	-	0,02	0,46	-	0,19	0,48

NOTA: <sup>1</sup>gderivado mL<sup>-1</sup>; <sup>2</sup> UI gderivado<sup>-1</sup>; <sup>3</sup> Ki<sub>xilose</sub>; <sup>4</sup> Ki<sub>xilulose</sub>; <sup>5</sup> Ki<sub>xilose/xilulose</sub>; <sup>6</sup> Unidade: M.

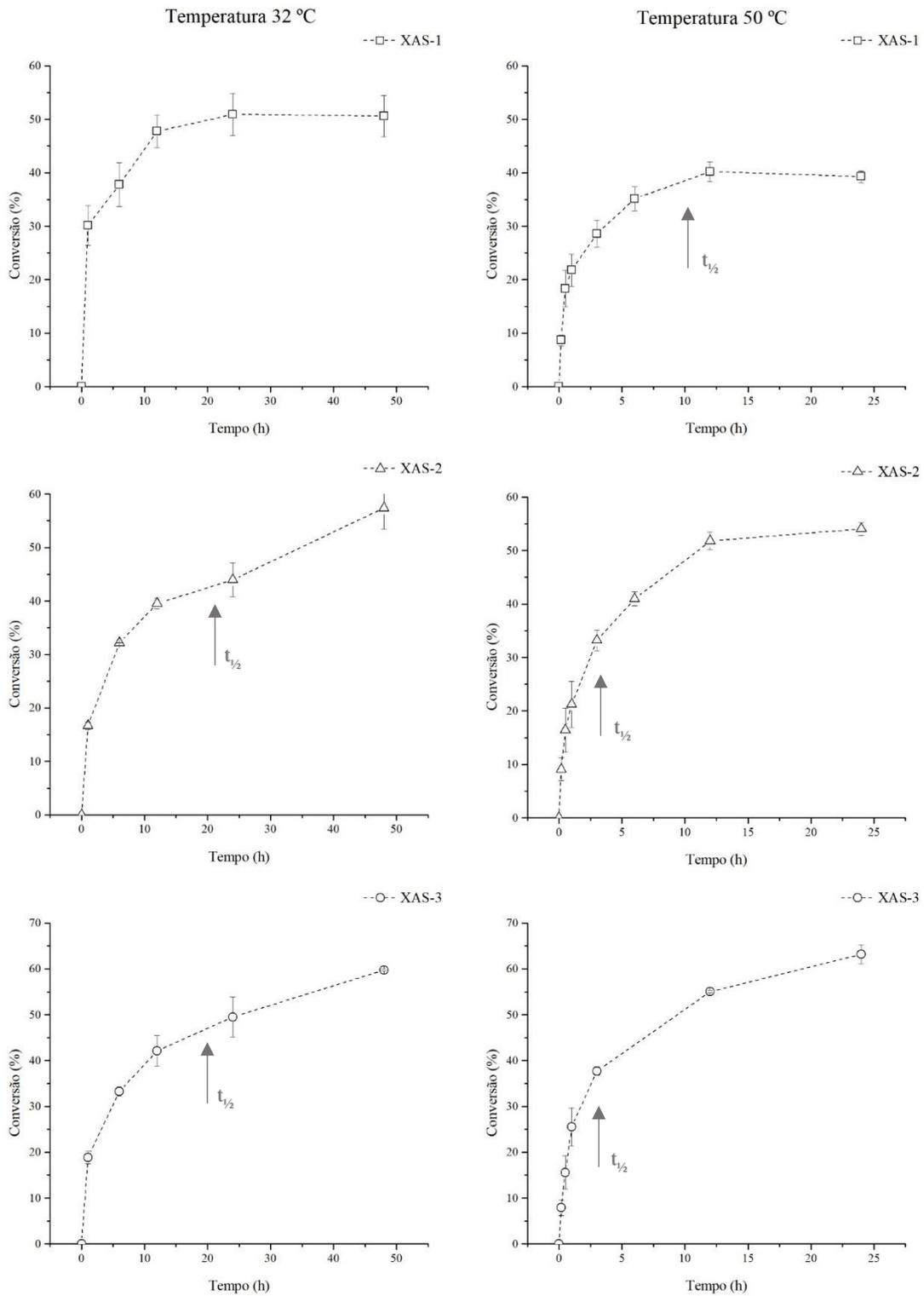
## 4.5 Hidrólise enzimática

Foram realizadas hidrólises enzimáticas na fração solúvel de xilana de eucalipto, no licor hidrotérmico e no licor alcalino conforme descrito na Tabela 9 (Item 3.3.1.2.2) para acompanhar a conversão de xilana e XOS durante o tempo de reação. Os ensaios foram realizados de maneira geral com carga enzimática de  $150 \text{ UI g}_{\text{xilana}}^{-1}$ , a fim de facilitar a comparação de dados levantados por MILESSI (2017). As hidrólises foram estudadas nas condições de pH 5,6 e a  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ , pois a princípio este será o pH do processo SHIF que esta em desenvolvimento (AQUINO, 2013; MILESSI, 2017). Também foram realizadas hidrólises enzimáticas a  $50^\circ\text{C}$ , afim de facilitar comparações com a hidrólise em xilana de bétula.

### 4.5.1 Substrato de xilana de eucalipto

A Figura 33 apresenta os perfis de hidrólise enzimática a  $32$  e  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  em substrato de xilana de eucalipto ( $8,80 \text{ g L}^{-1}$ ), solubilizada em tampão citrato de sódio  $50 \text{ mM}$  pH 5,6, com carga enzimática de  $150 \text{ UI g}_{\text{xilana}}^{-1}$ . Em sequência encontra-se a Tabela 26, a qual contém o perfil de XOS referente a cada uma das hidrólises.

**Figura 33** – Perfil de conversão total da hidrólise enzimática da fração solúvel da xilana de eucalipto (8,8 g/L), a 32 e 50 °C, pH 5,6 (tampão citrato de sódio 50 mM) pela ação das enzimas XAS-1, 2 e 3 (150 UI/g<sub>xilana</sub> ou 1500 UI/L).



NOTA:  $t_{1/2}$  tempo de meia vida de cada xilanase. Análises realizadas em HPLC com quantificação de X5, X4, X3, X2 e X1.

A partir da Figura 33 é possível observar que em geral a 32 °C as enzimas tiveram um desempenho melhor do que a 50 °C. A enzima XAS-1 não se mostrou muito eficiente quando comparada as outras enzimas em ambas temperaturas, a 50 °C próximo a 10 h de reação não se observa mais variação significativa na conversão de xilana, fato que deve estar relacionado a ao tempo de meia vida da própria enzima, já que a 32 °C esta obteve melhor conversão. A 50 °C XAS-2 obteve perfil semelhante a XAS-1, porém a 32 °C em 48h a enzima ainda apresentou perfil crescente de conversão, assim como XAS-3 que em ambas as temperaturas apresentou perfil crescente de conversão de xilana. Este fenômeno crescente esta relacionado a ação da betaxilosidase uma vez que estas atacam cadeias menores e são mais resistentes a temperatura como pode-se observar na Figura 27.

**Tabela 26** – Perfil dos XOS produzidos após 24h de hidrólise enzimática com xilana de eucalipto (8,8 g/L) a pH 5,6 e 32 °C\*.

T (°C)	Enzima	X1 <sup>1</sup> (g L <sup>-1</sup> )	X2 <sup>2</sup> (g L <sup>-1</sup> )	X3 <sup>3</sup> (g L <sup>-1</sup> )	X4 <sup>4</sup> (g L <sup>-1</sup> )	X5 <sup>5</sup> (g L <sup>-1</sup> )	Conversão (%)
32	XAS-1	0,11 ± 0,01	0,97 ± 0,17	0,96 ± 0,07	2,88 ± 0,16	0,72 ± 0,04	50,92 ± 3,95
	XAS-2	0,94 ± 0,07	1,22 ± 0,11	0,44 ± 0,02	2,06 ± 0,12	0,55 ± 0,04	43,96 ± 3,16
	XAS-3	1,37 ± 0,15	1,28 ± 0,21	0,19 ± 0,01	2,22 ± 0,14	0,59 ± 0,02	49,54 ± 4,42
50	XAS-1	0,17 ± 0,10	1,10 ± 0,17	1,68 ± 0,26	1,07 ± 0,38	0,80 ± 0,01	39,28 ± 1,07
	XAS-2	2,79 ± 0,05	1,61 ± 0,00	0,59 ± 0,07	0,43 ± 0,04	0,70 ± 0,07	54,03 ± 1,18
	XAS-3	3,33 ± 0,22	1,90 ± 0,41	0,48 ± 0,03	0,34 ± 0,04	0,78 ± 0,06	63,17 ± 2,08

NOTA: \* dados obtidos através de duplicatas; <sup>1</sup>xilose, <sup>2</sup>xilobiose, <sup>3</sup>xilotriose, <sup>4</sup>xilotetraose e <sup>5</sup>xilopentose.

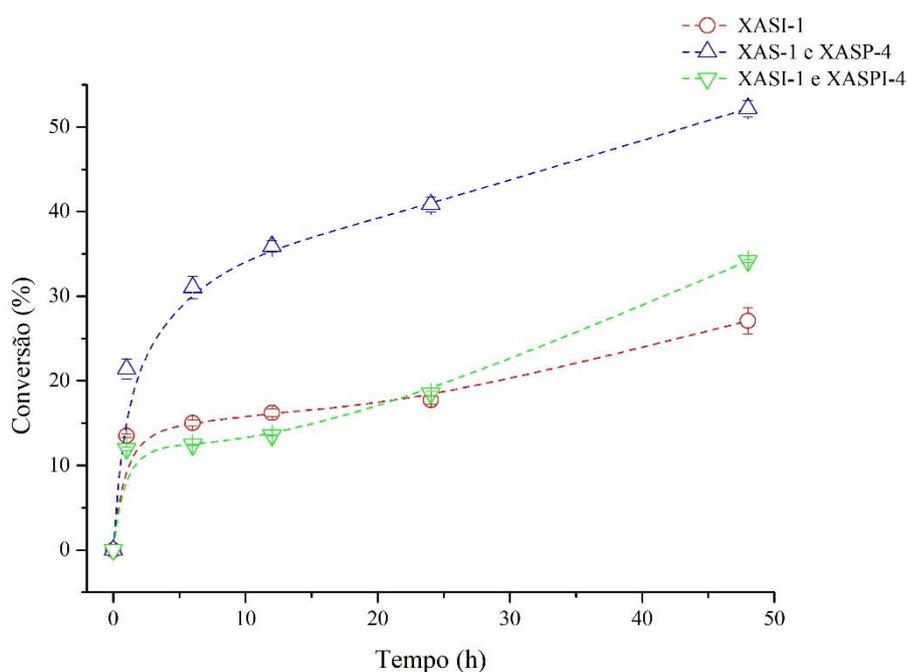
Os perfis de XOS obtidos ao final de 24 h da hidrólise a 32°C, mostram que XAS-1, XAS-2 e XAS-3 tiveram conversões totais equivalentes levando-se em consideração o desvio, já a 50 °C melhores desempenhos foram observados para XAS-2 e 3. Através da Tabela 26, observa-se a elevada produção de xilose para XAS-2 e 3 como era de se esperar uma vez que estas contêm frações significativas de β-xilosidases. Comparando os perfis de XOS levantados por este trabalho com os perfis apresentados por MILESSI (2017) (*B. subtilis*, Multifect e Accellerase) a 50 °C, pode-se perceber que XAS-1 e XAS-3 apresentaram perfis de conversão total muito semelhantes de 44,8 e 58,8 %, respectivamente. Porém a enzima Multifect nas análises realizadas por MILESSI (2017) apresentou conversão de 78,7 %, esta discrepância nos valores pode ser relacionada a afinidade da enzima com o substrato em questão, pois em seus experimentos foi utilizada a xilana de faia.

Por ser considerada uma hidrólise mais branda, a 32 °C os experimentos foram acompanhados até 48 h, desta forma a conversão final de XAS1, 2 e 3 foram de 50,60 ± 3,86, 57,40 ± 3,95 e 59,77 ± 0,19, respectivamente. Estes resultados mostram que essa temperatura

favorece a hidrólise da xilana de eucalipto para todas as enzimas estudadas, sendo as condições aplicadas ao processo SHIF, uma vez que o tempo de meia vida das enzimas é superior em temperaturas menores.

Ensaio de hidrólise enzimática utilizando as enzimas XAS-1 combinada à XASP-4, livre e imobilizadas, foram realizados. Para estes, utilizou-se carga enzimática de 30 UI/g<sub>xilana</sub> de XAS-1 e utilizou-se 120 U/ g<sub>xilana</sub> de XAS-4 em substrato de xilana de eucalipto (6,8 g/L), a fim de verificar a influência da concentração de beta na reação. Os perfis de hidrólise são apresentados na Figura 34.

**Figura 34** – Comparação das hidrólises enzimáticas de xilana de eucalipto (6,8 g/L) para as enzimas XASI-1, XAS-1 + XASP-4 e XASI-1 + XASPI-4 na forma solúvel e imobilizada, pH 5,6 a 32°C.



NOTA: Análises realizadas em HPLC com quantificação de X5, X4, X3, X2 e X1.

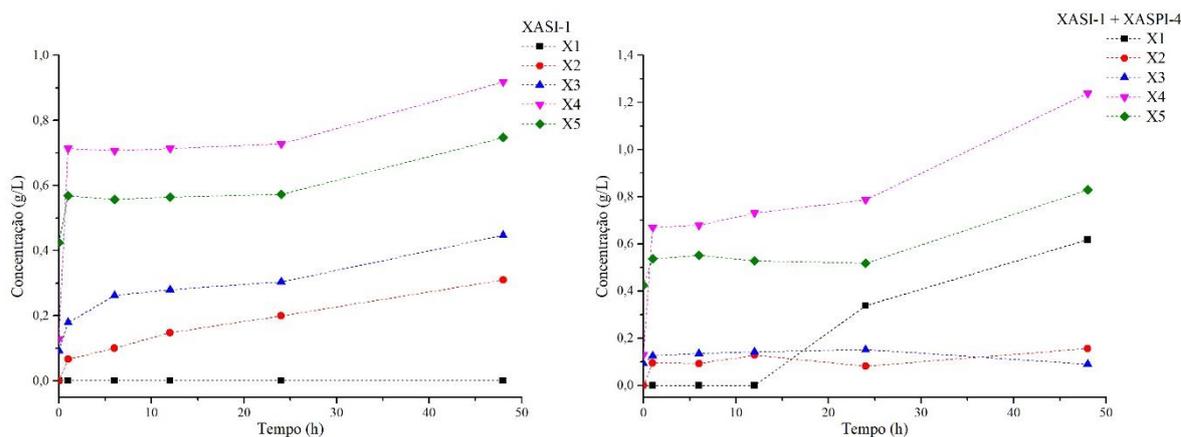
Observa-se através da Figura 34, que XAS-1 + XASP-4 livres obtiveram perfil crescente e de alta conversão apesar da baixa carga de XAS-1 (30 UI/g<sub>xilana</sub>), a ação da  $\beta$ -xilosidase foi verificada ao longo de toda a reação de hidrólise, o que significa que mesmo que o tempo de meia vida a 32 °C da XASP-4 seja aproximadamente 5 h, a enzima não desnatura por completo até as 48 h de reação. MARAIS (2008) comparou a hidrólise enzimática em xilana de bétula e eucalipto com diferentes cargas enzimática a 55 °C em pH 5,0, com a enzima Multifect CX72L e obteve conversões máximas de 100 % com 4000 UI mL<sup>-1</sup> e 80 % com carga de 3000 UI mL<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>, respectivamente. Então no que diz respeito a conversão final, neste trabalho também pode-se perceber que com menor carga enzimática obteve-se menor conversão total mesmo quando adicionada carga enzimática extra de  $\beta$ -xilosidase.

Também é possível observar a discrepância entre a conversão nos ensaios com as enzimas livres e imobilizadas, este fato está relacionado com a solubilidade do substrato uma vez que foi utilizado o substrato convencional (isto é, com frações solúvel e insolúvel) para todos os ensaios. As enzimas imobilizadas possuem uma maior resistência a transferência de massa dificultando o processo de hidrólise da fração do substrato insolúvel. MILESSI (2015), comprovou em seus experimentos que, com XynA (XAS-1) livre e imobilizada utilizando somente a fração solúvel da xilana de bétula, é possível obter as mesmas conversões. Porém, as cadeias de xilana de eucalipto com peso molecular próximo a 34,9 kDa (MAGATON et al., 2008) são maiores que as cadeias de xilana de bétula, o que pode dificultar ainda mais a hidrólise destes oligômeros no caso das enzimas mobilizadas.

Além disso, também observa-se que com a adição da  $\beta$ -xilosidase a reação tanto para o combinado de enzimas na forma livre quanto na imobilizada o perfil de conversão total foi crescente próximo a 20 h de reação. A Figura 35 compara os perfis de X1, X2, X3, X4 e X5 dos ensaios 1 e 3 das enzimas imobilizadas.

**Figura 35** – Perfil de concentração de X1, X2, X3, X4 e X5 para os ensaios de hidrólise enzimática em xilana de eucalipto (6,8 g/L), pH 5,6 a 32 °C, com as enzimas XASI-1 e XASI-1 + XASPI-4.



Através da Figura 35 é possível perceber não há produção de xilose ao longo da reação e que o perfil de cada XOS é crescente durante as 48 h de reação quando se utiliza somente a enzima XASI-1. Quando esta enzima trabalha juntamente com a XASPI-4, nota-se que X2 e X3 permanecem aproximadamente constantes, X4 tem uma maior concentração ao final de 48 h



e também observa-se a produção de X1 a partir das 12 h de reação. Os dados apresentados pela Tabela 27, indicam a porcentagem de produtos (xilose e XOS) ao final das 48 h de hidrólise.

**Tabela 27** – Conversões em termos de xilose e XOS presentes ao fim das 48 h de hidrólise enzimática (XAS-1, XASI-1, XASP-4 e XASPI-4) em xilana de eucalipto (6,8 g/L), pH 5,6 a 32 °C.

Ensaio	Enzima	Xilose (%)	XOS (%)	Conversão total (%)
1	XASI-1	0,00 ± 0,00	27,08 ± 1,55	27,08 ± 1,55
2	XAS-1 + XASP-4	22,25 ± 0,62	29,94 ± 0,58	52,19 ± 0,96
3	XASI-1 + XASPI-4	7,20 ± 0,03	26,96 ± 0,28	34,17 ± 0,18

NOTA: ensaios realizados em duplicata. Análises realizadas em HPLC com quantificação de X5, X4, X3, X2 e X1.

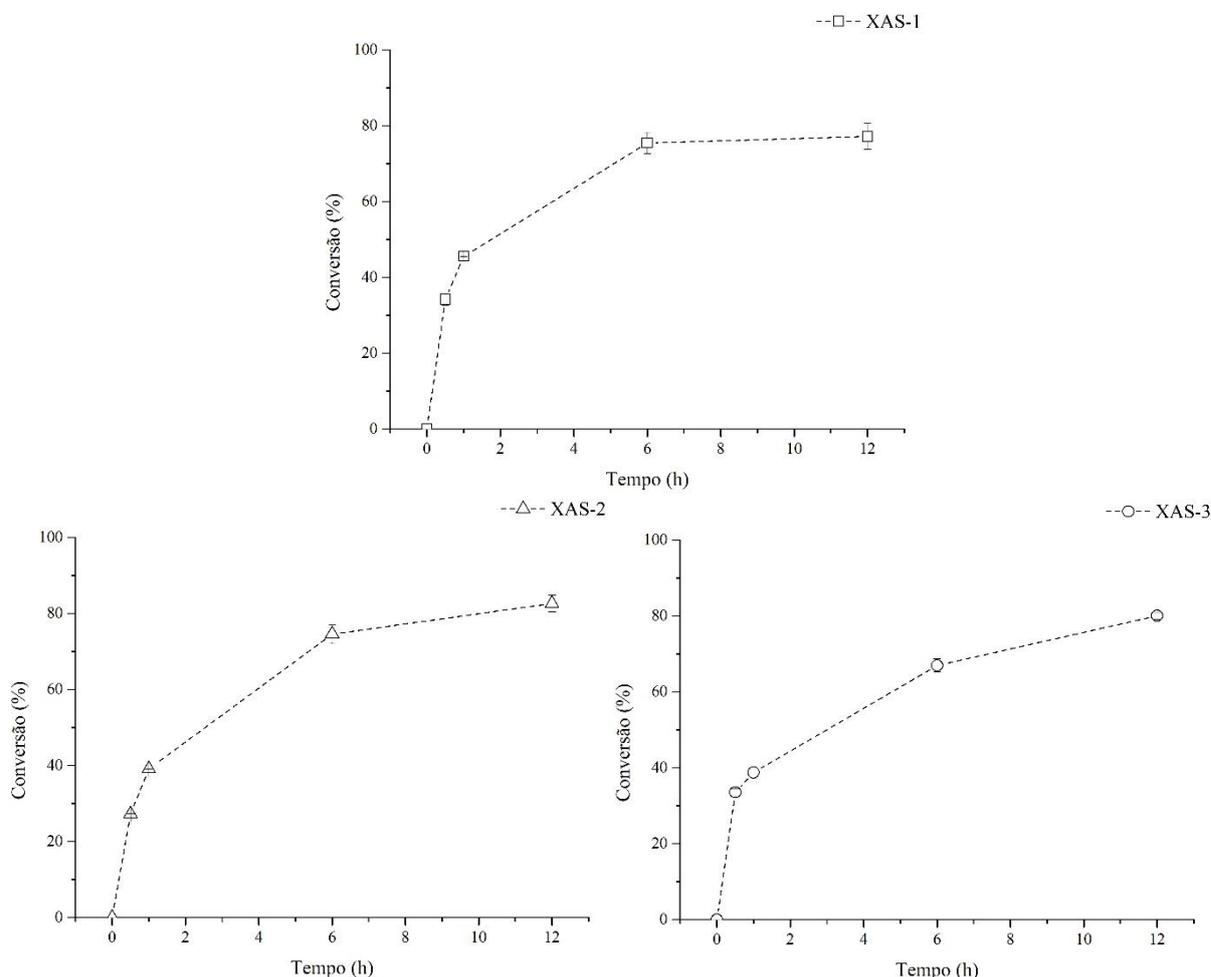
Com base nos dados apresentados pela Tabela 27, pode-se perceber que a adição da enzima XASP-4 na reação produziu xilose, o que não é observado quando a enzima XAS-1 é utilizada sozinha. O combinado de enzimas livres do ensaio 2 obteve melhores resultados para a produção de xilose e conversão total, uma vez que as enzimas livres possuem maior facilidade em hidrolisar o substrato convencional. Por mais que o combinado das enzimas imobilizadas tenha produzido menos xilose comparado ao combinado das livre, aquele ainda apresentou melhora significativa no processo de hidrólise. Além disto, as enzimas imobilizadas podem ser facilmente separadas do meio e reutilizadas diversas vezes sem perda de atividade, o que diminui muito o custo do processo (GUIZAN, 2006). Estes ensaios sustentam a hipótese de que, para ocorrer a hidrólise completa do substrato em questão, é necessária a adição de beta-xilosidases a reação.

Ensaio realizado com  $\beta$ -xilosidase de *Geobacillus stearothermophilus* T-6, pertencente à família GH43 (assim como a XAS-4), mostrou que além de atacar xilobiose a mesma também tem a capacidade de clivar unidades de xilose de extremidades não redutoras de xilooligômeros (SHALLOM et al. 2005).

#### 4.5.2 Substrato de bagaço de cana-de-açúcar

Para a hidrólise enzimática do licor hidrotérmico foi realizada concentração do licor extraído em 6,8 vezes e seu pH foi ajustado para 5,6 com NaOH 1M. As hidrólises foram realizadas a 32 °C, com carga enzimática de 150 UI g<sub>xilana</sub><sup>-1</sup>, em 15 g L<sup>-1</sup> de xilana na forma de licor do bagaço de cana-de-açúcar, o qual apresentava concentração inicial de xilose e XOS de 35 e 7,6 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os perfis e as concentrações de XOS ao longo do tempo são apresentados na Figura 36 e Tabela 28, respectivamente.

**Figura 36** - Hidrólise enzimática da xilana presente no licor hidrotérmico extraído do bagaço de cana-de-açúcar pela ação de XAS-1, 2 e 3 com carga de 150 UI/g<sub>xilana</sub> ou 2250 UI/mL.



NOTA: análises realizadas em HPLC com quantificação de X4, X3, X2 e X1.

As hidrólises enzimáticas apresentadas na Figura 35 foram acompanhadas durante 12 h, nas quais as enzimas selecionadas se mostraram eficientes na hidrólise da xilana do licor em termos de XOS como pode-se perceber pelos dados apresentados na Tabela 28. Assim como na hidrólise da xilana de eucalipto, a hidrólise do licor pela XAS-1 apresentou maior concentração de X4 e não produziu xilose. Já a XAS-2, em relação a produção de xilose, se mostrou mais eficiente que XAS-3, comportamento diferente do apresentado pela hidrólise em xilana de eucalipto. Este comportamento pode estar relacionado a afinidade em diferentes substratos e também pode ser um indício da presença de  $\beta$ -xilosidases pertencentes a grupos diferentes em cada complexo (XAS-2 e XAS-3), uma vez que as duas são igualmente inibidas por altas concentrações de xilose como pode ser observado na Figura 30.

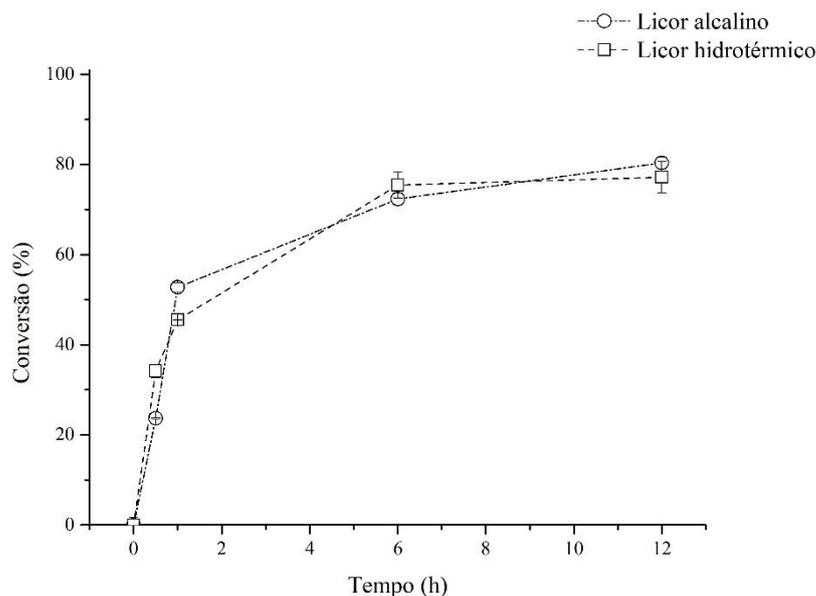
**Tabela 28** – Perfil dos XOS produzidos após 12h de hidrólise enzimática em licor hidrotérmico com concentração de xilooligômeros de 22,6 g/L e carga enzimática de 150 UI/g<sub>xos</sub> para cada enzima estudada\*.

Enzima	X1 <sup>1</sup> (g L <sup>-1</sup> )	X2 <sup>2</sup> (g L <sup>-1</sup> )	X3 <sup>3</sup> (g L <sup>-1</sup> )	X4 <sup>4</sup> (g L <sup>-1</sup> )	Conversão total (%)
XAS-1	0,00 ± 0,00	6,42 ± 0,40	2,71 ± 0,04	10,10 ± 0,18	77,18 ± 3,43
XAS-2	2,01 ± 0,68	6,84 ± 0,13	3,91 ± 0,05	7,37 ± 0,17	82,62 ± 2,18
XAS-3	0,86 ± 0,19	6,76 ± 0,39	2,81 ± 0,01	9,21 ± 0,12	80,05 ± 0,97

NOTA: \*dados obtidos através de duplicatas; <sup>1</sup>xilose, <sup>2</sup>xilobiose, <sup>3</sup>xilotriose e <sup>4</sup>xilotetraose.

Também foi realizado um estudo de hidrólise enzimática utilizando a XAS-1 em licor proveniente de pré-tratamento alcalino. Uma vez que, através do estudo de caracterização dos pré-tratamentos sabe-se que a fração líquida (rica em hemicelulose) alcalina contém aproximadamente 4 vezes mais lignina removida do bagaço que o licor hidrotérmico. Comparou-se o impacto da lignina nas hidrólises dos diferentes pré-tratamentos, em pH 5,6 a 32 °C, com carga enzimática de 150 UI g<sub>xilana</sub><sup>-1</sup> da XAS-1, os perfis são apresentados na Figura 37.

**Figura 37** – Comparação entre a hidrólise enzimática entre o licor alcalino e o hidrotérmico pela ação da XAS-1, em pH 5,6 a 32°C.



NOTA: análises realizadas em HPLC com quantificação de X4, X3, X2 e X1.

Nota-se que a conversão total da hidrólise enzimática ao fim de 12 h para o licor alcalino foi de aproximadamente 80 % ( $\pm 1,30$ ), conversão muito próxima à apresentada pelo licor hidrotérmico de 77 % ( $\pm 3,43$ ). Estes perfis sugerem que os dois licores apresentam características semelhantes em relação a inibição da endoxilanase. A literatura relata que as xilanases estudadas até o momento apresentam inibição moderada à lignina, quando comparada a inibição em glucanases (BERLIN et al., 2006; KELLOCK et al., 2017). E também, a presença

de 35 g L<sup>-1</sup> de xilose no meio pode ter afetado a atividade da xilanase, como foi observado em estudos recentes (AJIJOLAKEWU et al., 2016).

Haja visto que, para a hidrólise enzimática no caso da enzima XAS-1, não houve diferença nos resultados de conversão final. Vale ressaltar ainda, a importância de se estudar a SHIF com os diferentes pré-tratamentos, pois as enzimas e leveduras atuantes nas etapas do processo (hidrólise, isomerização e fermentação) podem se comportar de maneira diferente em cada licor.

## 5 CONCLUSÕES

Quanto ao estudo de produção do substrato de xilana de polpa de eucalipto branqueada:

- A extração da xilana de polpa de eucalipto foi realizada a 25 °C, 1:20 (m/v) de NaOH 4% durante 20 h, de precipitação com ácido acético a pH 6 e solubilização a 60°C durante 15 minutos. Permitiu obtenção de atividade endoxilanase similar à apresentada na hidrólise de xilana comercial de bétula, com rendimento de 56,4%. Essa foi então a condição de extração selecionada para dar continuidade aos estudos.

Quanto à caracterização das 4 enzimas livres e 2 imobilizadas estudadas neste trabalho:

- Através das análises de eletroforese e medida de atividade endo e beta, pôde-se constatar que a enzima XAS-1 (*rB.subtillis*) é formada principalmente por endoxilanase, as enzimas XAS-2 (Multifect CX XL) e XAS-3 (Accellerase XY) são complexos enzimáticos formados tanto por endoxilanasas quanto por  $\beta$ -xilosidases, enquanto que a XAS-4 (*rB.subtillis* produzida *in house*) é restritamente  $\beta$ -xilosidase.
- O efeito da concentração enzimática nas velocidades de hidrólise de xilana foram realizadas para XAS-1, 2 e 3. As concentrações selecionadas para estudo cinético com cada enzima (dentro da faixa linear) foram: de 0,8, 3,4 e 0,07 mg/L, respectivamente. O perfil de velocidade em função da concentração de enzima para XAS-4, medido com substrato pNPX, mostrou-se linear em toda a faixa estudada, sendo selecionada a concentração de 0,0224 g/L. Para as enzimas imobilizadas XASI-1 e XASPI-4 foram selecionadas as concentrações de 0,0065 g<sub>derivado</sub>/mL e 0,0024 g/L, respectivamente.
- Através dos perfis de pH e temperatura, foi possível observar que para as endoxilanasas XAS-1, 2, 3 e XASI-1, a temperatura de máxima atividade foi de 55, 60, 70 e  $\approx$  80 °C, respectivamente; enquanto que a região de pH de máxima atividade foi entre 5,0 e 6,0 para as enzimas livres e entre 6,5 e 7,0 para a XASI-1. As  $\beta$ -xilosidases XAS-2, 3, 4 e 4 purificada apresentaram região de máxima atividade temperatura  $\geq$  60 °C,  $\geq$  55 °C e entre 35 – 50 °C para as duas XAS-4; as regiões de pH de máxima atividade foram respectivamente, 7,5 – 10, 6,5 – 8,5, 6,4 – 8,4 e 6,4 – 9,0. A XASPI-4 obteve região ótima em pH > 8 e temperatura > 50 °C.

- Estabilidade térmica:
  - Endos XAS-1, 2 e 3 obtiveram  $t_{1/2}$  de mais de 6 dias, 20h e 20h para 32 °C, e próximos a 9h, 3h e 3h para 50 °C, respectivamente;
  - $\beta$ -xilosidase XAS-4 purificada apresentou  $t_{1/2}$  de aproximadamente 5h para 32 °C e menor que 2,5 min para 50 °C; Betas dos complexos XAS-2 e XAS-3 mostraram-se muito estáveis a 32 °C e com tempo de meia vida  $\geq 30$  h para cada, a 50 °.
  - As enzimas imobilizadas se mostraram muito estáveis tanto XASI-1 quanto a XASPI-4, sendo que a beta em 50 °C obteve  $t_{1/2}$  próximo a 8 h.
- No estudo do efeito da concentração de substrato nas velocidades de hidrólise de xilana foi possível realizar bons ajustes de MM para as endoxilanasas XAS-1, 2, 3 e XASI-1, com valores de  $K_M$  de 11,13,7,25, 6,75 e 13,12 mg mL<sup>-1</sup>, e  $V_{max}$  de 0,15, 0,07, 0,10, 0,11 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente;
- No estudo do efeito da concentração de substrato nas velocidades de hidrólise com pNPX foi possível realizar bons ajustes do modelo de MM para as  $\beta$ -xilosidasas XAS-2, 3 e XASPI-4 obtendo como valores de  $K_M$  0,58, 0,47, 3,93 e 6,04 mM, e  $V_{max}$  de 0,22, 0,13, 0,88 e 0,36 mM min<sup>-1</sup>, respectivamente;
  - Para  $\beta$ -xilosidase XAS-4 (livre, purificada) foi ajustado o modelo de Andrews, obtendo-se estimativas para  $K_M$  de 3,93 mM,  $V_{max}$  de 0,88 mM min<sup>-1</sup> e de  $K_i$  igual a 5,41 mM.
- Também foram calculados os valores de  $k_{cat}$  e  $k_{cat}/K_M$  para todas as enzimas, sendo que para as endo XAS-3 se obteve maior constante de eficiência catalítica e para as betas XASPI-4 e XAS-3 obtiveram os melhores resultados.
- Através dos ensaios de inibição foi possível observar que as  $\beta$ -xilosidasas realmente são inibidas por xilose, sendo os complexos XAS-2 e XAS-3 mais afetados que XASP-4 tanto livre quanto imobilizada. Também se verificou que XASP-4 é inibida por concentrações de xilulose, quando testados os dois inibidores juntos foi possível ajustar um modelo de inibição que obteve  $K_{i_{xilose}}$  e  $K_{i_{xilulose}}$  de 163,65 e 58,68 mM, e também obteve  $K_{i_{xilose/xilulose}}$  de 16,85 M.

Quanto as hidrólises enzimáticas:

- Com substrato de xilana de eucalipto comparando-se a conversão máxima de xilana nas temperaturas de 32 e 50 °C, foi possível observar que as enzimas XAS-1, 2 e 3 tiveram melhor desempenho de conversão a 32 °C, e a xilanase XAS-3 se destacou na produção de xilose para

ambas as temperaturas. Os combinados das enzimas XAS-1 e XAS-4 tanto na forma livre quanto imobilizadas se mostraram mais eficientes, quando comparadas aos ensaios de XAS-1, obtendo maior conversão total e maiores porcentagens de xilose.

- Com relação a hidrólise enzimática do licor hidrotérmico as enzimas estudadas apresentaram bons resultados de conversão obtendo elevadas concentrações de xilotetraose, enquanto que XAS-2 obteve melhor resultado com conversão de 83 %.
- Também foi realizada a comparação entre os licores hidrotérmico e alcalino quando ao perfil de hidrólise, nos quais observou-se que para XAS-1 o licor alcalino apresentou máxima conversão em 12h de aproximadamente 80 % e o licor hidrotérmico 77 %, indicando que não há diferença no uso dos licores para esta enzima.

Os estudos de caracterização de cada enzima foram essenciais para a compreensão dos mecanismos de atuação destas, em diferentes meios. Constatou-se, que a enzima comercial XAS-2 possui maior afinidade as cadeias de xilana de cana-de-açúcar, quando comparada a enzima XAS-3. Porém, em xilana de eucalipto, XAS-3 apresentou melhor desempenho na produção de XOS e xilose, confirmando a melhor afinidade das enzimas presentes no complexo a este substrato. Como maior avanço, destaca-se a adição da enzima beta-xilosidase aos sistemas reacionais com XAS-1, onde pode-se verificar um aumento da concentração de xilose no meio, resultado que colabora nos estudos do processo de hidrólise dos xilooligômeros presente no bagaço de cana-de-açúcar.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para as enzimas imobilizadas:

- Imobilizar xilanase e  $\beta$ -xilosidase ao mesmo suporte de uma só vez;
- Fazer combinados enzimáticos com as enzimas XAS-2 e XAS-3 enriquecidas com XASP-4.
- Imobilizar em diferentes suportes assim como coimobilizar a enzima XAS-4.
- Realizar experimentos com uma menor quantidade de enzima imobilizada (XAS-4) no suporte, de modo a se diminuir a velocidade de reação por volume de suporte e, conseqüentemente, minimizar o atraso difusional.
- Realizar um planejamento experimental, onde seriam combinadas as enzimas estudadas com diferentes cargas enzimáticas, a fim de transformar toda a xilana presente no licor em xilose.

SHIF:

- Realizar simulações do processo SHIF, a partir dos dados obtidos através da caracterização das enzimas e da levedura aplicadas ao processo.
- Aplicação dos diferentes coquetéis enzimáticos utilizando as enzimas XAS-1, XAS-2, XAS-3 e XAS-4 ao processo SHIF em xilana de eucalipto.
- Aplicação dos mesmos combinados enzimáticos nos licores ricos em xilana de bagaço de cana-de-açúcar provenientes de diferentes pré-tratamentos, a fim de selecionar o melhor licor para produção de etanol.



## 7 REFERÊNCIAS

- AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Xylooligosaccharides ( XOS ) as an Emerging Prebiotic : Microbial Synthesis , Utilization , Structural Characterization , Bioactive Properties , and Applications. **Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety** v. 10, p. 2–16, 2011.
- ADRIANO, W. S.; MENDONÇA, D. B.; RODRIGUES, D. S. et al. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2170–2179, 2008.
- AJIJOLAKEWU, K. A. et al. Assessment of the Effect of Easily-metabolised Carbon Supplements on Xylanase Production by Newly Isolated *Trichoderma asperel*. **BioResources**, v. 11(4), n. October, p. 9611–9627, 2016.
- AQUINO, P.M. **Produção de etanol de xilose com glicose isomerase e *Saccharomyces cerevisiae* coimobilizadas em gel de alginato**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), São Carlos, 2013.
- BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K.; Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresour. Technol.** 2007, 98, 504.
- BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 8: 353-368, 1992.
- BATAILLON, M. et al. Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. strain SPS-0. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 2–4, p. 187–192, 2000.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. International Edition. W.H. Freeman and Company. New York. v. 6. 2006.
- BERLIN, A. et al. Inhibition of cellulase, xylanase and  $\beta$ -glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 2, p. 198–209, 2006.
- BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA, N. J. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 1–9, 2010.
- BIANCHI, M. L. **Polpação de palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolve**. Universidade Estadual de Campinas, 1995.
- BIELY, P. et al. Endo- $\beta$ -1,4-xylanase families: Differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n. 1–3, p. 151–166, 1997.
- BIOETANOL de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável**. Organização BNDES e CGEE. Rio de Janeiro. p. 316. 2008. Acesso em: 05/2017. Disponível em: [www.bioetanoldecana.org](http://www.bioetanoldecana.org)
- BONDANCIA, T. J. **Biorrefinaria florestal: uma proposta para integração dos processos de obtenção de nanocelulose e etanol 2G a partir da polpa de celulose de eucalipto**. Universidade Federal de São Carlos, 2016.
- BRACELPA - **Associação dos fabricantes de celulose e papel**. Disponível em: <http://www.bracelpa.com.br>. Acesso em: 11/2016.
- BRADFORD, M.M. 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, 1976.
- BRIENZO, M.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. M. F. Xylooligosaccharides Production from Alkali-Pretreated Sugarcane Bagasse Using Xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 1195–1205, 2010.

- BROWNING, B. L. *Methods of wood chemistry*. New York: **Wiley**. 1967.
- BRUNZELLE, J. S. et al. Structure of the two-subsite  $\beta$ -D-xylosidase from *Selenomonas ruminantium* in complex with 1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 474, n. 1, p. 157–166, 2008.
- BRÜX, C. et al. The Structure of an Inverting GH43  $\beta$ -Xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its Substrate Reveals the Role of the Three Catalytic Residues. **Journal of Molecular Biology**, v. 359, n. 1, p. 97–109, 2006.
- BRYJAK, J; KOLARZ, B. N. Immobilization of trypsin on acrylic copolymers. *Process Biochemistry* v. 33, n. 4, 409-417, 1998.
- CANO A, PALET C. Xylooligosaccharide recovery from agricultural biomass waste treatment with enzymatic polymeric membranes and characterization of products with MALDI-TOF-MS. **J. Membrane Sci.** 291, pp. 96-105, 2007.
- CARDONA, C. A., QUINTERO, J. A. e PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**. 101, pp. 4754-4766, 2009.
- CARVALHO, D. M.; VILAPLANA, F.; ABAD, A. M.; COLODETTE, J. L.; LINDSTROM, M.; SEVASTYANOVA, O. Comparative study on the structure of acetylated xylans from eucalyptus and sugarcane bagasse and straw. 2015
- CHAPLIN, M. & BUCKE, C. **Enzyme Technology**. Cambridge University Press, U.K., 1990.
- CHEN, Z. et al. Secretory expression of a  $\beta$ -xylosidase gene from *Thermomyces lanuginosus* in *Escherichia coli* and characterization of its recombinant enzyme. **Letters in Applied Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 330–337, 2012.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3–23, 2005.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 2 - Safra 2014/15, n. 9 - Nono levantamento, Brasília, p 1-109, 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 06/ 2017.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 1 - Safra 2017/18, Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 09/ 2017.
- CORRAL, O. L.; VILLASEÑOR-ORTEGA, F. Xylanases. **Advances in Agricultural and Food Biotechnology**. 37/661, 305 - 322, 2006.
- CUNHA, HELLEN C. M. **Caracterização do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor: identificação de inibidores potenciais de processos fermentativos e enzimáticos**. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 1999.
- DENCE, C.W.; LIN, S.Y. *Methods in lignin chemistry*. Berlin: **Springer-Verlag**, 578p., 1992.
- DEREWENDA, U. et al. Crystal structure, at 2.6-Å resolution, of the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the F family of beta-1,4-D-glycanases. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 33, p. 20811–4, 19 ago. 1994.
- DIOGO, J. A. et al. Development of a chimeric hemicellulase to enhance the xylose production and thermotolerance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 69, p. 31–37, 2015.
- DOBREV, G. T. et al. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 2671–2678, 2007.
- DRISS, D. et al. Functional characterization of *Penicillium occitanis* Pol6 and *Penicillium funiculosum* GH11 xylanases. **Protein Expression and Purification**, v. 90, n. 2, p. 195–201, 2013.

DUMON, C. et al. Progress and future prospects for pentose-specific biocatalysts in biorefining. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 346–357, mar. 2012.

EBRINGEROVA, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties , 1 Naturally occurring xylans structures , isolation procedures and properties. **Macromol. Rapid Commun** ,v. 556, n. 9, p. 542–556, 2000.

FAN, Z. et al. Engineering lower inhibitor affinities in  $\beta$ -D-xylosidase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 4, p. 1099–1113, 2010.

FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente.** Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FAURE, D. The family-3 glycoside hydrolases: From housekeeping functions to host-microbe interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1485–1490, 2002.

FENGEL, D., WEGENER, G. Wood chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: **Walter de Gruyter & CO**, 613p., 1989.

FURLAN, F. F.; FILHO, R. T.; PINTO, F. H. P. B.; COSTA, C. B. B.; CRUZ, A. J. G.; GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C. Bioelectricity versus bioethanol from sugarcane bagasse: is it worth being flexible? **Bitechnology for Biofuels**. 6: 142, p. 1–12, 2013.

GARCIA, R. B.; GANTER, J. L. M. S.; CARVALHO, R. R. D -xylans from corn cobs. **European Polymer Journal**, v. 36, p. 783–787, 2000.

GOLDMAN, N. Methods for optimizing enzymatic hydrolysis fo xylan to improve xylo- oligosaccharide yield. MMG 445. **Basic Biotechnology**, v. 5, p. 31-36, 2009.

GOMES, K. D. E. S. **Purificação e caracterização de xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis* e utilização na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.** Universidade Federal de Viçosa, 2014.

GÓMEZ, S. et al. Structural and functional characterization of a highly stable endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Fusarium oxysporum* and its development as an efficient immobilized biocatalyst. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 191, 2016.

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

GUISÁN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells** . 2nd edition, New Jersey: Humana Press, 465p, 2006.

HERRMANN, M. C. et al. The  $\beta$ -D-xylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional  $\beta$ -D-xylan xylohydrolase. **Biochem. J.**, v. 381, p. 375–381, 1997.

HETTRICH, K. et al. Derivatization and characterization of xylan from oat spelts. **Macromolecular Symposia**, v. 232, p. 37–48, 2006.

IBÁ - **Indústria Brasileira de Árvores**. 2016. Disponível em: [http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2016\\_.pdf](http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2016_.pdf). Acesso em: 07/2017.

JÄNIS, J. et al. Determination of steady-state kinetic parameters for a xylanase-catalyzed hydrolysis of neutral underivatized xylooligosaccharides by mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 365, n. 2, p. 165–173, 2007.

JANZON, R.; SAAKE, B.; PULS, J. Upgrading of paper-grade pulps to dissolving pulps by nitren extraction: Properties of nitren extracted xylans in comparison to NaOH and KOH extracted xylans. **Cellulose**, v. 15, n. 1, p. 161–175, 2008.

JEFFRIES, T. W. Utilization of xylose by bactéria, yeasts, and fungi. **Advances in Biochemical Engineering** . Berlin: Springer. P. 1-32, 1983.

JONG, E., REE, R., TUIL, R.F., ELBERSEN, W. Biorefineries for the Chemical Industry – A Dutch point of view. In: **Proceedings of the 2005 annual meeting of the association for the Advancement of Industrial Crops**: International Conference on Industrial Crops and Rural Development, 17-21 September, Murcia, Spain, 2005.

JUODEIKIENE, G. et al. The use of  $\beta$ -xylanase for increasing the efficiency of biocatalytic conversion of crop residues to bioethanol. **Catalysis Today**, v. 167, n. 1, 2011.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial exo-xylanases: a mini review. **Applied biochemistry and biotechnology**. v. 174, 81 - 92, 2014.

KELLOCK, M. et al. Lignin-derived inhibition of monocomponent cellulases and a xylanase in the hydrolysis of lignocellulosics. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 183–191, 2017.

KIRIKYALI, N.; WOOD, J.; CONNERTON, I. F. Characterisation of a recombinant  $\beta$ -xylosidase (xylA) from *Aspergillus oryzae* expressed in *Pichia pastoris*. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2014.

KRISCH, J.; SZAJÁNI, B. Ethanol and acetic acid tolerance in free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter acetii*. **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 525-528, 1997

LACHKE, A.H. 1, 4-b-D-xylan xylohydrolase of *Sclerotium rolfsii*. **Methods Enzymol.** 160, 679–684, 1988.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p.680 – 685, 1970.

LAMA, L. et al. Purification and characterization of thermostable xylanase and  $\beta$ -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 4, p. 283–289, 2004.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 839 p., 2000.

LUCENA-NETO, S. A.; FERREIRA-FILHO, E. X. Purification and partial characterization of a new  $\beta$ -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 86–90, 2004.

LUCENA, C. A. A. et al. Desenvolvimento de biofilmes à base de xilana e xilana/gelatina para produção de embalagens biodegradáveis. **Polímeros**, v. 27, n. spe, p. 35–41, 2017.

MAGATON, A. DA S.; PILO-VELOSO, D.; COLODETTE, J. L. Characterization of O-acetil-(4-O-methylglucurono)xylans from *Eucalyptus urograndis*. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1085–1088, 2008.

MAMMAN, A.S. Furfural: Hemicellulose/xylose derived biochemical. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**, v. 2, 438–454, 2008.

MANRICH, A. **Produção de xilo-oligossacarídeos a partir de lignocelulósicos pré-tratados com xilanases imobilizadas e estabilizadas**. Universidade Federal de São Carlos, 2012.

MARAIS, S. **Enzymatic hydrolysis with commercial enzymes of a xylan extracted from hardwood pulp**. University of Pretoria, 2008.

MARQUES, A. I. DA F. Isolation of xylans from bleached *Eucalyptus* kraft pulp by precipitation with antisolvents. **Técnico Lisboa**, p. 11, dez. 2014.

MC NAUGHTON. S.J., TARRANTS, J.L., MCNAUGHTON, M.M., DAVIS, R.H. Silica as a defense against herbivory and growth promotor in African grasses. **Ecology** 66 (2), 528-535, 1985.

MENEZES, C. R. DE; DURRANT, L. R. Xilooligossacarídeos : produção , aplicações e efeitos na saúde humana. p. 587–592, 2008.

MICHELIN, M.; POLIZELI, M. L. T. M.; RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; VICENTE, A. A.; JORGE, J. A.; TEREZI, H. F.; TEIXEIRA, J. A. A new strategy for xylanase production using wheat straw autohydrolysis liquor as substrate. **CHEMPOR**. Braga, Portugal, p.9, 2008.

MIELENZ, J. R. Biofuels and Biotechnology. In: MIELENZ, J. M., RAPLEY, R. **Molecular Biology and Biotechnology**. 5 Ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, p. 548-584, 2009.

MILESSI, T. S. S. et al. Hemicellulosic ethanol production by immobilized cells of *Scheffersomyces stipitis*: Effect of cell concentration and stirring. **Bioengineered Bugs**, v. 6, n. 1, p. 26–32, 2015.

MILESSI, T. S. D. S. **Produção de etanol 2G a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente modificada imobilizadas**. Universidade Federal de São Carlos, 2017.

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

MOOD, S. H. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, n. November 2013, p. 77–93, 2013.

MURAKAMI, M. T., RULLER, R., WARD, R. J., & ARNI, R. K. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the mesophilic xylanase A from *Bacillus subtilis* 1A1. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 61(Pt 2), 219–20, 2005

MUSSATTO, S. I. Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery. **Elsevier**, 2016.

NASCIMENTO, V. M. **Pré-Tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xioligômeros**. Universidade Federal de São Carlos, 2011.

NOVACANA. Disponível em: <https://www.novacana.com/cana-de-acucar>. Acesso em: 04/2017.

PAL, A.; KHANUM, F. Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: Characterization of immobilized enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1315–1322, 2011.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000.

PASSARINHO, A. T. P. **Produção e caracterização de xilanases derivadas do gene XynA de *Orpinomyces PC-2* e avaliação da eficiência para hidrólise de farinha e clarificação de sucos**. Universidade Federal de Ouro Preto, 2014.

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

PETRESCU, I. et al. Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae*. **Extremophiles**, v. 4, n. 3, p. 137-144, 2000.

QUARESMA, A. C. A. **Isolamento e modificação de xilanas da pasta branca**. Universidade de Aveiro, 2014.

RAMOS, L.P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**. v. 26, n. 6, p. 863–871, 2003.

ROCHA, G.J.M.; SILVA, F.T.; CURVELO, A.A.S.; ARAÚJO, G.T. A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: **5th Braz. symp. chem. lignins and other woody compon**, Curitiba, PR, 31 agosto - 5 setembro. Proceedings. p.3-8, 1997.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas: Editora Casa do Pão, p. 325, 2005.

- RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. et al. Fast Determination of the Composition of Pretreated Sugarcane Bagasse Using Near-Infrared Spectroscopy. **Bioenergy Research**, v. 7, n. 4, p. 1441–1453, 2014.
- ROSS P, MAYER R, BENZIMAN M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiol Reviews** 55:35–58, 1991.
- SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.
- SALLES, B. C. et al. Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, n. 2, p. 309–314, jun. 2000.
- SAARNIO, J.; WATHÉN, K.; GUSTAFSSON, C. Structure of an acidic xylan from birchwood holocellulose. **Acta chemica scandinavica**. v. 8, 825–829, 1954.
- SHELLENBERGER, A., ULBRICH, R. Protein stabilization by blocking the native unfolding nucleus. **Biomedica Biochimica Acta**, v. 48, n. 1, p. 63–67, 1989.
- SCHUCHARD, U.; RIBEIRO, M. L. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 247–251, 2001.
- SHALLOM, D. et al. Biochemical characterization and identification of the catalytic residues of a family 43  $\beta$ -D-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6. **Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 387–397, 2005.
- SHARMA, M.; KUMAR, A. Xylanases: an overview. **British Biotechnology Journal**, 3 (1) :1-28, 2013.
- SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.
- SHULER, M.L., KARGI, F. **Bioprocess Engineering Basic Concepts**, Englewood Cliffs, Ed. Prentice Hall, 479 p. 1992.
- SILVA, C. **Produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana usando glicose isomerase coimobilizada com *Saccharomyces cerevisiae***. Universidade Federal de São Carlos, 2013.
- SILVA, G. M. DA. **Avaliação de diferentes configurações de hidrólise enzimática e fermentação utilizando bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol 2G**. Universidade Federal de São Carlos, 2015.
- SJÖSTRÖM E. Wood Chemistry, Fundamental and Applications. **Academic Press**, New York, 1981.
- SOARES, P. A., ROSSELL, C. E. V. Conversão da Celulose pela tecnologia Organosolv. **Vol. 3 Nova Séries**, v. 3, p. 29, 2004.
- SOUZA, W. R. DE. Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. **InTech**, p. 207–248, 2013.
- STEPHENS, D. E. et al. Directed evolution of the thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of biotechnology**, v. 127, n. 3, p. 348-354, 2007.
- SUN, S. N. et al. Structural Characterization of Hemicelluloses From Bamboo Culms (*Neosinocalamus Affinis*). **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 46, p. 3–4, 2012.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.
- TAHERZADEH, M.J., KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**. 9, 1621–1651, 2008.
- TAGUCHI, H. et al. A Simple Assay for Xylanase Using o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylobioside. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, n. 6, p. 983–985, 1995.

TARDIOLI, P. W. **Hidrólise controlada de proteínas do soro de queijo usando carboxipeptidase e alcalase imobilizadas multipontualmente em agarose**. Universidade Federal de São Carlos, 2003.

TEIXEIRA, R. S. S.; SILVA, A. S.; JANG, J.; KIME, H.; Ishikawa, K.; ENDO, T.; LEE, S.; BON, E. Combining biomass wet disk milling and endoglucanase/  $\beta$ -glucosidase hydrolysis for the production of cellulose nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, 75 - 81, 2015.

TENG, C. et al. High-level expression of extracellular secretion of a  $\beta$ -xylosidase gene from *Paecilomyces thermophila* in *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1822–1830, 2011.

TERRASAN, C. R. F.; GUISAN, J. M.; CARMONA, E. C. Xylanase and  $\beta$ -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: Purification, characterization and hydrolysis of substrates. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 54–62, 2016.

TRAN, H.; VAKKILAINEN, E. K. Thekraft chemical recovery process. 2008. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/8300/1692dfc20ff33e9bfa2c00c773a127c2bc4d.pdf>. Acesso em: 08/2017

U.S. DOE. Lignocellulosic Biomass for Advanced Biofuels and Bioproducts: **Workshop Report**, DOE/SC-0170. Department of Energy Office of Science, 2015.

VAN MARIS, A. J. A. et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: Current status. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 90, n. 4, p. 391–418, 2006.

WOLF, L. D. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. Universidade Federal de São Carlos, 2011.

WONG, K.K.Y., TAN L.U.L., SADDLER J.N., Multiplicity of  $\beta$ -1,4 xylanase in microorganisms: Functions and applications, **Microbiol Rev**. 52. 305–317. 1988.

WONGWISANSRI, S. et al. High-level production of thermotolerant  $\beta$ -xylosidase of *Aspergillus* sp. BCC125 in *Pichia pastoris*: Characterization and its application in ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 410–413, 2013.

WYMAN, C. E. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 50, p. 3-16, 1994.

WYMAN, C., DECKER, S., HIMMEL, M., BRADY, J., SKOPEC, C., VIKARI, L. **Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose**. Thayer School of Engineering, Dartmouth College, Hanover, New Hampshire, 2005.

YAMAGUCHI, K.; IZUMI, Y.; KITAMIKADO, M. Purification and Characterization of  $\beta$ -Xylosidase from *Bacillus* sp. XY-131. **Fisheries science**, v. 64, n. 5, p. 787–792, 1998.

YAN, Q. J. et al. A xylose-tolerant  $\beta$ -xylosidase from *Paecilomyces thermophila*: Characterization and its co-action with the endogenous xylanase. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5402–5410, 2008.

ZAKARIA, M. R.; HIRATA, S.; HASSAN, M. A. Hydrothermal pretreatment enhanced enzymatic hydrolysis and glucose production from oil palm biomass. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 142–148, 2015.

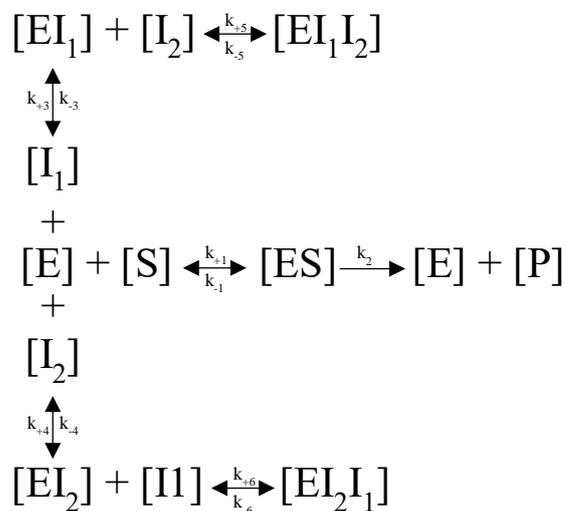
ZHANG, J. et al. Thermostable recombinant xylanases from *Nonomuraea flexuosa* and *Thermoascus aurantiacus* show distinct properties in the hydrolysis of xylans and pretreated wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 12, 2011.

ZHENG, H. C. et al. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Paenibacillus* sp. NF1 and its application in xylooligosaccharides production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 489–496, 2014.

ZANOELO, F. F. et al. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant  $\beta$ -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 170–176, 2004.

## ANEXO I

Mecanismo de reação proposto para inibição competitiva, com tipos de inibidores.



A velocidade de reação é dada por:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (\text{I})$$

Conservação da enzima:

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EI_1] + [EI_2] + [EI_1I_2] + [EI_2I_1] \quad (\text{II})$$

Aplicando a hipótese de estado pseudo estacionário:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{+1}} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (\text{III})$$

$$K_{i_1} = \frac{k_{-3}}{k_{+3}} = \frac{[E][I_1]}{[EI_1]} \quad (\text{IV})$$

$$K_{i_2} = \frac{k_{-4}}{k_{+4}} = \frac{[E][I_2]}{[EI_2]} \quad (\text{V})$$

$$K_{i_{12}} = \frac{k_{-5}}{k_{+5}} = \frac{[EI_1][I_2]}{[EI_1I_2]} \quad (\text{VI})$$

$$K_{i_{21}} = \frac{k_{-6}}{k_{+6}} = \frac{[EI_2][I_1]}{[EI_2I_1]} \quad (\text{VII})$$



Substituindo III em IV, V e VI, substituindo tudo em II, tem-se:

$$[E_0] = [ES] + K_M \frac{[ES]}{[S]} + K_M \frac{[ES][I_1]}{[S] K_{i_1}} + K_M \frac{[ES][I_2]}{[S] K_{i_2}} + K_M \frac{[ES][I_1][I_2]}{[S] K_{i_1} K_{i_2}} + K_M \frac{[ES][I_1][I_2]}{[S] K_{i_2} K_{i_1}} \quad (\text{VIII})$$

Isolando [ES] e substituindo em I, tem-se:

$$v = \frac{k_2[E_0][S]}{\left(1 + \frac{[I_1]}{K_{i_1}} + \frac{[I_2]}{K_{i_2}} + \frac{[I_1][I_2]}{K_{i_1}K_{i_2}} + \frac{[I_1][I_2]}{K_{i_2}K_{i_1}}\right) K_M + [S]} \quad (\text{IX})$$

Rearranjando alguns termos tem-se:

$$v = \frac{k_2[E_0][S]}{\left(1 + \frac{[I_1]}{K_{i_1}} + \frac{[I_2]}{K_{i_2}} + \frac{[I_1][I_2]}{\alpha \cdot K_{i_1} \cdot K_{i_2}}\right) K_M + [S]} \quad (\text{X})$$

Sendo que  $\alpha$  é dado por:

$$\frac{1}{\alpha} = \frac{K_{i_2}K_{i_1} + K_{i_1}K_{i_2}}{K_{i_1}K_{i_2}} \quad (\text{XI})$$

Assim a modelo proposto a inibição competitiva por dois inibidores distintos:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{\left(1 + \frac{[I_1]}{K_{i_1}} + \frac{[I_2]}{K_{i_2}} + \frac{[I_1][I_2]}{\alpha \cdot K_{i_1} \cdot K_{i_2}}\right) K_M + [S]}$$

Onde:

$$V_{\max} = k_2[E_0]$$

## ANEXO II

A Tabela 29 apresenta os dados obtidos experimentais utilizados para os ajustes dos modelos do planejamento experimental.

**Tabela 29** – Dados experimentais utilizados para os DCCRs.

pH	T	pH	T	XAS-2	XAS-3	XAS-4			XASPI-4
						Atividade (UI mL <sup>-1</sup> )			
-1	-1	5	34,4	1,14	2,66	1,96	5,09	0	
1	-1	9	34,4	9,44	16,49	423,51	383,28	106,42	
-1	1	5	55,6	8,55	20,00	11,54	3,45	0,92	
1	1	9	55,6	47,49	49,89	173,75	269,10	226,76	
-1,41	0	4,17	45	0,21	0,71	24,9	0,07	0,34	
1,41	0	9,82	45	1,78	2,09	94,29	171,51	185,09	
0	-1,41	7	30	7,79	28,32	364,77	300,43	76,59	
0	1,41	7	60	51,78	90,97	187,42	82,68	170,95	
0	0	7	45	20,58	46,57	681,77	506,17	140,73	
0	0	7	45	19,38	49,3	715,59	460,74	140,2	
0	0	7	45	19,79	48,05	722,84	487,78	132,44	
0	0	7	45	-	-	669,69	-	-	

A Figura 38 apresenta a representação do gráfico de paretos obtido para cada ensaio de DCCR, com os termos com significância de 10 %.

**Figura 38** – Gráficos de paretos obtidos para cada enzima nos ensaios de DCCR com significância de 10%.

