



Campus Universitário Darcy Ribeiro
Departamento de Biologia Celular

Gilvan Caetano Duarte

***HOLOCELULASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus oryzae*:
PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE
BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA***

BRASÍLIA / DF
FEVEREIRO / 2013

Gilvan Caetano Duarte

*HOLOCELULASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus oryzae*:
PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE
BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular do *Campus* Universitário Darcy Ribeiro (UnB), como pré-requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Molecular. Linha de Pesquisa: **Enzimologia e Bioquímica de Proteínas.**

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart

BRASÍLIA / DF
FEVEREIRO / 2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 1006417.

Duarte, Gilvan Caetano.
D812h Holocelulases produzidas por *Aspergillus oryzae* :
purificação, caracterização e degradação de biomassa
lignocelulósica / Gilvan Caetano Duarte. -- 2013.
xviii, 221 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Instituto
de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, 2013.
Inclui bibliografia.
Orientação: Edivaldo Ximenes Ferreira Filho ; Coorientação:
Carlos André Ornelas Ricart.

1. Resíduos industriais. 2. Hemicelulose. 3. Enzimas
- Aplicações industriais - Indústria têxtil. 4. Química
têxtil. I. Ferreira Filho, Edivaldo Ximenes. II. Ricart,
Carlos André Ornelas. III. Título.

CDU 577.15



Campus Universitário Darcy Ribeiro
Departamento de Biologia Celular

TERMO DE APROVAÇÃO

Tese de Doutorado intitulada: **Holocelulases produzidas por *Aspergillus oryzae*: purificação, caracterização e degradação de biomassa lignocelulósica**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, pelo doutorando Gilvan Caetano Duarte, desenvolvida no Laboratório de Enzimologia, sob orientação do Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, como pré-requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Molecular.

RESULTADO: _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho
Orientador

Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa
Membro interno

Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira
Membro externo

Profa. Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo
Membro externo

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco
Membro externo

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart
Membro suplente

Brasília/DF, 28 de Fevereiro de 2013

Dedicatória

A minha querida mãe Sebastiana pela amizade, dedicação e os cuidados inigualáveis destinados a mim..., numa luta diária para que eu alcançasse o que sou hoje..., devo toda minha vida a senhora!!!...

Ao meu pai Elvânio e meu irmão Denis pela confiança, companheirismo e gratidão de sempre...

A minha querida esposa Fernanda e ao meu querido filho Felipe por tornar os meus dias os melhores momentos de minha vida..., amo muito vocês!!!...

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela “vida” e pela oportunidade de crescimento espiritual concedida a mim e a todos os companheiros de jornada que pude conviver até hoje...

Aos meus pais Sebastiana e Elvânio, ao meu irmão Denis, a minha esposa Fernanda e meu filho Felipe por tudo que pude passar ao lado de vocês e pela paciência em suportar este momento de tão grande importância para mim...

Ao meu orientador Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho pela amizade, confiança e mais do que tudo pela paciência..., muito obrigado pela magnífica orientação!!!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart, sempre amigo e disponível em todos os momentos..., obrigado mais uma vez por confiar em minha capacidade!!!

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

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

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

À Profa. Dra. Lourdes Isabel Velho do Amaral “in memoriam”, pelos poucos mais proveitosos momentos de aprendizagem...

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Félix pela amizade e pelos inúmeros conhecimentos disponibilizados ausentes de qualquer tipo de cobrança...

À Profa. Dra. Eliane Ferreira Noronha pelas conversas e pelas diversas resoluções de dúvidas que surgiram em momentos desta jornada.

Ao Prof. Dr. Ricardo Kruger pelos momentos de descontração e também de responsabilidade dentro do Laboratório.

Ao Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira pela amizade sincera, pelos puxões de orelha..., rs!..., pelas inúmeras dicas e por ser o primeiro incentivador neste projeto.

Aos professores Dr. Marcelo Valle de Sousa, Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo e Dr. Octávio Luiz Franco por aceitarem participar como membros avaliadores desta conquista.

Aos professores e demais técnicos administrativos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular/UnB.

À Marísia e à Margarete pela amizade sincera, pelo respeito e mais do que tudo pelas infinitas ajudas nos momentos que mais precisei..., obrigado!!!

Aos técnicos do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Nuno e Antônio pela disponibilidade e colaboração de sempre.

Aos colegas de trabalho, em especial aos membros do Laboratório de Enzimologia/UnB, Paula Jaramillo, Leonora, Caio, Antonielle, Elizabete, Juliana Infante, Bárbara, Helder, Jaqueline, Liana, Natália Milanezi, Natália Gurgel, Eliane Siqueira, Luís Vale, Tiago, Clemente, Fernanda Pereira, João Paulo, João Pedro, Pedro Henrique, Marcela, Pedro Hamann, Karen, Pricila, Brenda, Tales, Lucas, Alinne, Regina, Samuel, Julianna Peixoto, pela convivência amigável, colaboração e momentos de descontração.

Aos colegas de trabalho, em especial aos membros do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas/UnB, Diana, Pedro Matins, Humberto, Adelson, Ana Carolina, Jax, Rayner, Micaela, Anne,...

Ao colega do Laboratório de Biologia Molecular/UnB, Marciano...

Aos membros do Colegiado de Ciências Biológicas e à Universidade Federal Tocantins (UFT) pela oportunidade de conclusão deste Curso.

Aos órgãos que fomentaram esta pesquisa, Capes, CNPq (Redes Sisbiota e Centro Oeste), FAPDF (Pronex) e UFT.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)

Sumário

	Lista de Figuras	xi
	Lista de Tabelas	xiv
	Abreviaturas	xvi
	Resumo	xvii
	Abstract	xviii
	Considerações Iniciais	19
	Objetivo Geral	21
	Objetivos Específicos	21
	Capítulo I – Referencial Teórico	22
1.1.	Referencial Teórico	23
1.1.1.	Introdução Geral.....	23
1.1.2.	Composição da biomassa lignocelulósica.....	29
1.1.3.	Resíduos agroindustriais.....	33
1.1.4.	Holocelulases e a degradação da biomassa lignocelulósica.....	37
1.1.5.	Fungo filamentososo <i>Aspergillus oryzae</i>	45
1.2.	Referências Bibliográficas	48
	Capítulo II – Material e Métodos	56
2.2.	Material e Métodos	57
2.2.1.	Produtos químicos.....	57
2.2.2.	Resíduos da indústria têxtil.....	57
2.2.3.	Pré-tratamento dos resíduos da indústria têxtil.....	59
2.2.4.	Análise química composicional dos resíduos da indústria têxtil não-tratados.....	59
2.2.5.	Origem e preparo das polpas de celulose.....	60
2.2.6.	Análise química composicional dos resíduos da indústria têxtil pré-tratados e das polpas de celulose.....	61

2.2.7.	Origem do bagaço de cana-de-açúcar.....	61
2.2.8.	Análise química composicional dos bagaços BCNT e BCHA ou BCEV pré-tratados.....	61
2.2.9.	Isolamento, identificação e manutenção de <i>A. oryzae</i>	62
2.2.10.	Cultivo de <i>A. oryzae</i> para o estabelecimento de condições básicas.....	63
2.2.11.	Cultivo de <i>A. oryzae</i> para produção de enzimas.....	64
2.2.12.	Atividades enzimáticas padrões.....	64
2.2.13.	Dosagem de proteína total.....	65
2.2.14.	Dosagem de açúcar redutor total ou glicose.....	65
2.2.15.	Purificação de isoenzimas de xilanases e de uma CM-celulase produzidas por <i>A. oryzae</i>	66
2.2.16.	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE).....	68
2.2.17.	Coloração de proteínas por nitrato de prata.....	69
2.2.18.	Zimografia.....	69
2.2.19.	Digestão trípica das bandas separadas por SDS.....	69
2.2.20.	Espectrometria de massa (MS) do tipo MALDI.....	70
2.2.21.	Espectrometria de massas <i>in tandem</i> (MS/MS) do tipo MALDI.....	71
2.2.22.	Efeito da temperatura.....	71
2.2.23.	Efeito do pH.....	72
2.2.24.	Determinação de parâmetros cinéticos.....	72
2.2.25.	Efeito de íons metálicos e reagentes ativadores/inibidores.....	73
2.2.26.	Termoestabilidade.....	74
2.2.27.	Especificidade de substrato.....	74
2.2.28.	Hidrólise enzimática.....	75
2.3.	Referências Bibliográficas	78
	Capítulo III - Aplicação de resíduos da indústria têxtil no	80

	cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> e produção de holocelulases....	
3.1.	Resumo.....	81
3.2.	Introdução.....	82
3.3.	Resultados e Discussão.....	84
3.3.1.	Produção de holocelulases por <i>A. oryzae</i> cultivado em PAS ou PASPT.....	84
3.3.2.	Condições basais de cultivo de <i>A. oryzae</i> em resíduos pré-tratados e produção de xilanase.....	91
3.4.	Conclusões.....	94
3.5.	Referências Bibliográficas.....	95
	Capítulo IV - Uso de resíduo da indústria têxtil como fonte de carbono para a produção de uma xilanase de baixa massa molecular de <i>Aspergillus oryzae</i>.....	97
4.1.	Resumo.....	98
4.2.	Introdução.....	99
4.3.	Resultados e Discussão.....	101
4.3.1.	Caracterização enzimática do Extrato Bruto (EB) de <i>A. oryzae</i> cultivado em PASPT.....	101
4.3.2.	Purificação de Xyl-O1.....	102
4.3.3.	Caracterização enzimática de Xyl-O1.....	109
4.4.	Conclusões.....	122
4.5.	Referências Bibliográficas.....	123
	Capítulo V - Purificação e caracterização parciais de isoenzimas de xilanases e endoglicanase produzidas por <i>Aspergillus oryzae</i>.....	127
5.1.	Resumo.....	128
5.2.	Introdução.....	129
5.3.	Resultados e Discussão.....	132
5.3.1.	Caracterização enzimática e dosagens de proteína total, açúcar redutor total e de glicose do EB de <i>A. oryzae</i>	132

5.3.2.	Purificação parcial de holocelulases produzidas por <i>A. oryzae</i> .	133
5.3.3.	Resultados preliminares para a caracterização das enzimas Xyl-O2, Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas.....	146
5.4.	Conclusões.....	152
5.5.	Referências Bibliográficas.....	153
	Capítulo VI - Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar e de polpas de celulose por holocelulases produzidas por <i>Aspergillus oryzae</i> cultivado em resíduo da indústria têxtil.....	156
6.1.	Resumo.....	157
6.2.	Introdução.....	158
6.3.	Resultados e Discussão.....	161
6.3.1.	Caracterização dos substratos lignocelulósicos quanto à composição química.....	161
6.3.2.	Hidrólise de substratos lignocelulósicos por holocelulases produzidas por <i>A. oryzae</i>	164
6.4.	Conclusões.....	176
6.5.	Referências Bibliográficas.....	177
	Considerações Finais e Perspectivas.....	179
	Apêndices.....	181
	Anexos.....	214

Lista de Figuras

Figura 1.1.	Diagrama mostrando os principais componentes da parede celular vegetal e seus prováveis arranjos estruturais.....	30
Figura 1.2.	Mecanismo geral de hidrólise de ligação glicosídica com retenção anomérica catalisada por β -glicosidase.....	38
Figura 1.3.	Mecanismo geral de hidrólise de ligação glicosídica com inversão anomérica catalisada por β -glicosidase.....	38
Figura 1.4.	Estrutura simplificada e sítios de ataque enzimático sobre a celulose.....	40
Figura 1.5.	Estrutura simplificada e sítios de ataque enzimático sobre a hemicelulose.....	41
Figura 1.6.	Estrutura simplificada e sítios de ataque enzimático sobre a pectina.....	43
Figura 2.1.	Amostras de resíduos obtidos junto à indústria têxtil produzidos durante o beneficiamento ou rebeneficiamento do algodão.....	58
Figura 2.2.	Amostras de polpas de celulose.....	60
Figura 2.3.	Amostras de bagaço de cana-de-açúcar.....	62
Figura 2.4.	Perfil de uma cultura de <i>A. oryzae</i> em meio sólido; conídio e esporos de <i>A. oryzae</i> dispostos em lâmina microscópica, observada em microscopia de luz.....	63
Figura 3.1.	Curvas de indução de <i>A. oryzae</i> cultivado em PAS ou PASPT como fonte de carbono.....	86
Figura 4.1.	Estratégia utilizada na purificação da enzima Xyl-O1.....	103
Figura 4.2.	Perfis cromatográficos da purificação da enzima Xyl-O1 a partir da fração ultrafiltrado do EB de <i>A. oryzae</i> cultivado em PASPT como fonte de carbono.....	105
Figura 4.3.	SDS-PAGE (12%) co-polimerizado com solução de xilana de aveia 0,1% para detecção de Xyl-O1 purificada da fração ultrafiltrado do EB de <i>A. oryzae</i> cultivado em PASPT, corado com nitrato de prata ou revelado por solução de vermelho congo 0,1%.....	108
Figura 4.4.	Efeito da temperatura e pH sobre a atividade xilanolítica das amostras do EB de <i>A. oryzae</i> e Xyl-O1 purificada.....	110

Figura 4.5.	Efeito do tempo de incubação na termoestabilidade de Xyl-O1 purificada em pH 7,0.....	114
Figura 4.6.	Efeito de L-cisteína 20 mmol.L ⁻¹ na termoestabilidade de Xyl-O1 purificada em pH 7,0 e 50°C ou 55°C.....	114
Figura 4.7.	Fracionamento em CLAE-DAP dos produtos formados pela hidrólise de frações solúveis e insolúveis de xilana de bétula, nos intervalos de tempo de 6, 12, 18 e 24 h.....	118
Figura 5.1.	Estratégia de purificação de isoenzima com atividade de xilanase (Xyl-O2) e purificações parciais de outras isoenzimas com atividade de xilanase (Xyl-O3/Xyl-O4) e de uma enzima com atividade de CM-celulase (Cel-O1) da fração concentrado pós-ultrafiltração em membrana PM-10 do EB de <i>A. oryzae</i> cultivado em PASPT como fonte de carbono.....	133
Figura 5.2.	Cromatografia de filtração em gel em resina do tipo <i>Sephadex G-50</i> , equilibrada em tampão PBS 50 mmol.L ⁻¹ , pH 7,0 contendo NaCl 25 mmol.L ⁻¹ e azida sódica 0,02%, sob fluxo de 20 mL.h ⁻¹ , que foi utilizada na sequência de purificação de isoenzimas com atividade de xilanase e uma enzima com atividade de CM-celulase da fração concentrado do EB de <i>A. oryzae</i> cultivado em PASPT como fonte de carbono.....	135
Figura 5.3.	Cromatografia de troca iônica em resina do tipo <i>DEAE-Sephrose</i> , equilibrada em tampão PBS 25 mmol.L ⁻¹ , pH 7,0 contendo azida sódica 0,02%, sob fluxo de 30 mL.h ⁻¹ , foi utilizada na sequência de purificação da enzima Xyl-O2.....	136
Figura 5.4.	Cromatografia de troca iônica em resina <i>Q-Sephrose</i> , equilibrada em tampão tris-HCl 25 mmol.L ⁻¹ , pH 8,2 contendo azida sódica 0,02%, sob fluxo de 30 mL.h ⁻¹ , utilizada na sequência de purificação parcial de duas outras isoenzimas com atividade de xilanase (Xyl-O3/Xyl-O4) e uma enzima com atividade de CM-celulase (Cel-O1).....	136
Figura 5.5.	SDS-PAGE (12%) co-polimerizado com solução de xilana de aveia 0,1% para detecção de Xyl-O2 purificada da fração concentrado do EB de <i>A. oryzae</i> cultivado em PASPT, corado com nitrato de prata ou revelado por solução de vermelho congo 0,1%.....	139
Figura 5.6.	SDS-PAGE (12%) co-polimerizado com solução de xilana de aveia 0,1% para detecção de Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas da fração concentrado do EB de <i>A. oryzae</i> cultivado em PASPT, corado com nitrato de prata ou revelado por solução de vermelho congo 0,1%.....	141

Figura 5.7.	Análise por espectrometria em PMF-MALDI-TOF de xilanase Xyl-O3 parcialmente purificada de <i>A. oryzae</i> cultivado em PASPT como fonte de carbono. Sequência dos peptídeos gerados pela tripsinização da enzima encontrados pela análise de MS contra uma endo-1,4-beta-xilanase de <i>A. oryzae</i> RIB40; as letras representando os peptídeos encontrados estão grafadas em negrito.....	142
Figura 5.8.	Sequenciamento por MALDI-TOF/TOF MS/MS do peptídeo DSVFSQVLGEDFVR com massa observada de 1598.0613 Da obtido a partir do espectro em MALDI-TOF/TOF MS da xilanase Xyl-O3 parcialmente purificada de <i>A. oryzae</i> cultivado em PASPT como fonte de carbono.....	143
Figura 5.9.	SDS-PAGE (12%) co-polimerizado com solução de CM-celulose 0,1% para detecção da enzima Cel-O1 parcialmente purificada da fração concentrado do EB de <i>A. oryzae</i> cultivado em PASPT, corado com nitrato de prata ou revelado por solução de vermelho congo 0,1%.....	145
Figura 5.10.	Efeito da temperatura sobre a atividade xilanolítica das amostras enzimáticas Xyl-O2 purificada e Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas.....	147
Figura 5.11.	Efeito do pH sobre a atividade xilanolítica das amostras enzimáticas, Xyl-O2 purificada e Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas, diluídas em tampão PBS 25 mmol.L ⁻¹ , pH 7,0 ou Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas, diluídas em tampão tris-HCl 25 mmol.L ⁻¹ , pH 8,2.....	148
Figura 5.12.	Efeito do tempo de incubação na termoestabilidade de Xyl-O2 purificada e Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificada, em tampão PBS pH 7,0 ou em tampão tris-HCl pH 8,2.....	150
Figura 5.13.	Efeito do tempo de incubação na termoestabilidade de Xyl-O2 purificada e Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificada, em tampão PBS pH 7,0 ou em tampão tris-HCl pH 8,2.....	151
Figura 6.1.	Açúcar redutor total liberado durante a hidrólise de polpa de celulose escura, polpa de celulose pré-branqueada por O ₂ e polpa de celulose branca promovida por amostras do ultrafiltrado PM-10 do EB de <i>A. oryzae</i> e por Xyl-O1 purificada.....	169
Figura 6.2.	Remoção de grupos cromóforos durante a hidrólise das polpas de celulose PCE, PCPB e PCB, catalisada por amostra de ultrafiltrado PM-10 do EB de <i>A. oryzae</i> ou Xyl-O1 purificada.....	172

Lista de Tabelas

Quadro 1.1.	Resíduos agroindustriais utilizados na produção de enzimas que degradam a biomassa lignocelulósica, principalmente xilanases.....	35
Tabela 3.1.	Análise química composicional dos resíduos do re-beneficiamento de algodão não-tratados.....	87
Tabela 3.2.	Análise química composicional específica dos resíduos do re-beneficiamento de algodão pré-tratados.....	88
Tabela 3.3.	Dosagem de açúcar redutor total e de glicose em comparação à atividade específica de xilanase, durante 30 dias de cultivo de <i>A. oryzae</i> em PAS ou PASPT.....	90
Tabela 3.4.	Dosagem de atividade específica de xilanase durante o cultivo de <i>A. oryzae</i> em PASPT em meio líquido suplementado com extrato de levedura ou em presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,16% como fonte de nitrogênio.....	92
Tabela 3.5.	Comparação entre os resíduos da indústria têxtil pré-tratados (PASPT, PALPT e PFPT) no utilizados no cultivo de <i>A. oryzae</i> em presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,16%, quanto à produção de xilanase.....	93
Tabela 4.1.	Atividades enzimáticas do EB de <i>A. oryzae</i> crescido em PASPT por 6 dias a 28°C.....	101
Tabela 4.2.	Sumário das etapas de purificação de Xyl-O1 produzida por <i>A. oryzae</i> cultivado em PASPT como fonte de carbono.....	107
Tabela 4.3.	Parâmetros cinéticos determinados para Xyl-O1 purificada.....	111
Tabela 4.4.	Efeito de reagentes específicos ou aminoácidos sobre a atividade xilanolítica de Xyl-O1 purificada.....	113
Tabela 4.5.	Especificidade de substrato de Xyl-O1 purificada.....	115
Tabela 4.6.	Hidrólise de frações solúvel ou insolúvel de xilana de bétula catalisada por Xyl-O1 purificada.....	117
Tabela 4.7.	Identificação e análise quantitativa por CLAE-DAP dos xilooligossacarídeos liberados durante as reações de hidrólise catalisada por Xyl-O1 purificada.....	120
Tabela 5.1.	Caracterização do EB de <i>A. oryzae</i> quanto às atividades enzimáticas de holocelulases, concentração de proteína total, de açúcar redutor total e de glicose.....	132

Tabela 5.2.	Sumário das etapas de purificação de Xyl-O2 e purificação parcial de Xyl-O3 e Cel-O1 produzidas por <i>A. oryzae</i> quando cultivado em PASPT como fonte de carbono.....	138
Tabela 5.3.	Massas monoisotópicas $[M + H]^+$ observadas e esperadas de íons selecionados do digesto trípico de Xyl-O3 parcialmente purificada de <i>A. oryzae</i>	143
Quadro 5.4.	Sequenciamento e massas monoisotópicas $[M + H]^+$ dos íons fragmentados obtidos do peptídeo precursor DSVFSQVLGEDFVR.....	144
Tabela 6.1.	Análise química composicional do BCNT obtido junto à Usina Vale do Rosário.....	161
Tabela 6.2.	Análise química composicional do BCNT em comparação ao bagaço BCHA.....	162
Tabela 6.3.	Análise química composicional do BCNT em comparação ao bagaço BCEV.....	163
Tabela 6.4.	Análise química composicional das polpas de celulose, escura (PCE), deslignificada por O ₂ (PCPB) e branca (PCB).....	164
Tabela 6.5.	Quantificação e identificação dos produtos de hidrólise liberados dos substratos BCNT, BCHA e BCEV catalisada por enzimas do EB de <i>A. oryzae</i>	165
Tabela 6.6.	Quantificação e identificação dos produtos de hidrólise liberados do substrato PCB pela atividade de amostras do ultrafiltrado do EB <i>A. oryzae</i> e Xyl-O1 purificada.....	174

Abreviaturas

AR: Açúcar redutor	PBS: <i>Phosphate buffer sodium</i>
BCEV: Bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor	PCB: Polpa de celulose branca
BCHA: Bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado por ácido sulfúrico	PCE: Polpa de celulose escura
BCNT: Bagaço de cana-de-açúcar “in natura” ou não-tratado	PCPB: Polpa de celulose pré-branqueado ou deslignificada por O ₂
Cel-O1: CM-celulase parcialmente purificada da fração concentrado PM-10 do EB de <i>A. oryzae</i>	PF: Pó de filtro
CLAE-DAP: Cromatografia de troca iônica em sistema de alta eficiência, acoplado à detecção amperométrica pulsada	PFPT: Pó de filtro pré-tratado
CMC: Carboximetil-celulose	PMF: <i>Peptide Mass Fingerprint</i>
DNS: Ácido-3',5'-Dinitro-Salicílico	PT: Pré-tratado
EB: Extrato bruto	TCA: Ácido tricloroacético
MALDI-TOF: <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight</i>	TFA: Ácido trifluoroacético
MS: <i>Mass Spectrometry</i>	Xyl-O1: Xilanase purificada da fração ultrafiltrado PM-10 do EB de <i>A. oryzae</i>
NT: Não-tratado	Xyl-O2: Xilanase purificada da fração concentrado PM-10 do EB de <i>A. oryzae</i>
PAL: Piolho de algodão limpo	Xyl-O3/Xyl-O4: Xilanasas parcialmente purificadas da fração concentrado PM-10 do EB de <i>A. oryzae</i>
PALPT: Piolho de algodão limpo pré-tratado	
PAS: Piolho de algodão sujo	
PASPT: Piolho de algodão sujo pré-tratado	

Resumo

Piolho de algodão sujo, piolho de algodão limpo e pó de filtro são resíduos da indústria têxtil e representam fontes de matérias-primas renováveis com elevados percentuais de holocelulose. A degradação destes resíduos requer a atividade de holocelulases produzidas por *Aspergillus oryzae*, reconhecido pelos elevados títulos de hemicelulases, especialmente xilanases, quando cultivado em biomassa lignocelulósica residual como fonte de carbono. Este trabalho objetivou utilizar os resíduos da indústria têxtil no cultivo submerso de *A. oryzae* e produção de holocelulases, além de purificar, caracterizar e submeter estas enzimas à hidrólise de substratos lignocelulósicos. A suplementação dos meios de cultivo com os resíduos pré-tratados, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,16%, e o estabelecimento do período de 6 dias de cultivo aumentaram a produção de xilanases por *A. oryzae*. Por consequência, uma xilanase (Xyl-O1) de 21,5 kDa foi purificada da fração ultrafiltrado do extrato bruto (EB) de *A. oryzae* e apresentou atividade catalítica máxima a 50°C e pH 6,0, termoestabilidade a 50°C por 6 h quando em presença de L-cisteína 20 mmol.L⁻¹, especificidade em hidrolisar ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ internas de substratos solúveis, com eficiência máxima de 33% para hidrólise de xilana de bétula e liberação de xilobiose como produto predominante. A partir da fração concentrado do EB de *A. oryzae*, outras isoenzimas com atividade de xilanase foram purificadas e identificadas como Xyl-O2 (21,5 kDa) e Xyl-O3/Xyl-O4 (35,3 e 33,1 kDa, respectivamente). Em adição, uma endoglicanase (Cel-O1) foi parcialmente purificada e apresentou massa molecular entre 40 e 45 kDa. A caracterização da amostra contendo as isoenzimas Xyl-O3/Xyl-O4 revelou maior atividade catalítica a 60°C e no intervalo de pH 5,0 a 7,0 quando diluídas em tampão tris-HCl. A amostra ainda permaneceu 100% termoestável a 40°C por 24 h. As holocelulases produzidas por *A. oryzae* apresentaram maior atividade de hidrólise sobre o bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor, com 0,398 mg.mL⁻¹ de açúcar redutor (AR) liberado. As amostras enzimáticas de ultrafiltrado do EB de *A. oryzae* e de Xyl-O1 purificada promoveram a hidrólise das polpas de celulose (PC), com 0,168 mg.mL⁻¹ de AR liberado pela amostra Xyl-O1 purificada sobre a PC branca. A liberação de cromóforo a 237 nm e do produto xilobiose resultaram da atividade das amostras enzimáticas sobre as PC. *A. oryzae* cultivado em resíduos da indústria têxtil produziu elevados títulos de hemicelulases, principalmente xilanases. A caracterização enzimática destas isoenzimas, purificadas ou parcialmente purificadas, revelaram propriedades catalíticas que as tornam alvos potenciais de aplicação nas biorefinarias. Palavras-chave: Resíduos agroindustriais, hemicelulases, atividade enzimática, hidrólise enzimática.

Abstract

Dirty cotton, clean cotton and filter powder are textile residues and represent sources of renewable raw materials with high percentages of holocellulose. The degradation of these residues requires the holocellulase activities produced by *Aspergillus oryzae* recognized by high titers of hemicellulases, xylanases especially when grown on lignocellulosic biomass waste as a carbon source. This study aimed to use the textile industry residue in submerged cultivation of *A. oryzae* and production of holocellulases. In addition, purify and characterize these enzymes undergo hydrolysis of lignocellulosic substrates. Supplementation of culture medium with the pretreated residues, 0.16% (NH₄)₂SO₄ and setting the period of 6 days cultivation increased the production of xylanases by *A. oryzae*. Consequently, a xylanase (Xyl-O1) of 21.5 kDa was purified from ultrafiltrate fraction of *A. oryzae* crude extract (CE) and showed maximal catalytic activity at 50°C and pH 6.0. It was thermostable at 50°C for 6 h in the presence of 20 mmol.L⁻¹ L-cysteine. Xyl-O1 showed specificity in hydrolyze the internal glycosidic bonds β(1-4) in soluble substrates, with maximum efficiency of 33% for the hydrolysis of birchwood xylan and release of xylobiose as the predominant product. From the concentrated fraction of *A. oryzae* CE, other isoenzymes with xylanase activity were purified and identified as Xyl-O2 (21.5 kDa) and Xyl-O3/Xyl-O4 (35.3 and 33.1 kDa respectively). In addition, an endoglucanase (Cel-O1) was partially purified and presented molecular weight between 40 and 45 kDa. The characterization of the sample containing Xyl-O3/Xyl-O4 isoenzymes showed a higher catalytic activity at 60°C and in the pH range from 5.0 to 7.0 when diluted in Tris-HCl buffer. The sample still remained 100% thermostable at 40°C for 24 h. The holocellulases produced by *A. oryzae* showed greater activity on the hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse, with 0.398 mg.mL⁻¹ of reducing sugar (RA) released. Enzymatic samples of ultrafiltrate from *A. oryzae* CE and purified Xyl-O1 promoted hydrolysis of paper pulps (PP), with 0.168 mg.mL⁻¹ of RA released by purified Xyl-O1 on white PP. The release of chromophore at 237 nm and xylobiose product resulted from the enzymatic activity of the samples on the PP. *A. oryzae* grown in the textile industry waste produced high titers of hemicellulases, mainly xylanases. The enzymatic characterization of these enzymes purified or partially purified revealed catalytic properties which make them potential targets for application of the biorefineries. Key-words: Agro-industrial residues, hemicellulases, enzymatic activity, enzymatic hydrolysis.

Considerações Iniciais

A disposição das informações contidas nesta Tese foi estruturada na forma de capítulos, para os quais uma breve descrição segue abaixo:

Capítulo I – Referencial teórico. Neste capítulo foram inseridas inúmeras informações da literatura científica sobre a atual conjuntura em relação às necessidades energéticas mundiais, com ênfase para a questão das biorrefinarias, com o bioetanol como o produto considerado chave para um desenvolvimento sustentável, congregando aspectos econômicos e ambientais.

Capítulo II – Material e metodologias aplicadas nos capítulos experimentais. Neste capítulo foram descritas em detalhes, todas as metodologias que foram desenvolvidas durante a execução de cada etapa experimental. Grande parte da metodologia descrita foi desenvolvida nos Laboratórios de Enzimologia (UnB) e de Bioquímica e Química de Proteínas (UnB). Os ensaios de análise química composicional foram realizados em laboratórios parceiros.

Capítulo III – Aplicação de resíduos da indústria têxtil no cultivo de *Aspergillus oryzae* e produção de holocelulases. Neste capítulo, buscou-se o estabelecimento de condições básicas de cultivo de *A. oryzae* em piolho de algodão sujo como fonte de carbono lignocelulósica, com base nos perfis de produção de holocelulases, no melhor período de tempo de cultivo para a produção de uma determinada holocelulase ou mistura de holocelulases e fontes de nitrogênio disponíveis.

Capítulo IV - Uso de resíduo da indústria têxtil como fonte de carbono para a produção de uma xilanase de baixa massa molecular de *Aspergillus oryzae*. Neste capítulo, foi obtida a purificação de uma xilanase (Xyl-O1) da fração ultrafiltrado PM-10 a partir do extrato bruto de *A. oryzae* cultivado por 6 dias em piolho de algodão sujo como fonte de carbono e sulfato de amônio 0,16% como fonte de nitrogênio prioritária. Xyl-O1 purificada foi submetida a inúmeros ensaios de caracterização enzimática, dosagem da atividade de xilanase sob efeito de variações de temperatura e pH, determinação de parâmetros cinéticos e termoestabilidade, especificidade de substrato e hidrólise enzimática de substratos comerciais.

Capítulo V - Purificação e caracterização parciais de isoenzimas de xilanases e endoglucanase produzidas por *Aspergillus oryzae*. Neste capítulo foi dada continuidade ao processo de purificação de holocelulases, conforme iniciado no Capítulo IV, entretanto, a

amostra inicial foi representada pela fração concentrado PM-10 do extrato bruto de *A. oryzae*, objetivando a purificação e caracterização parciais de isoenzimas com atividade de xilanase, somado à possível purificação parcial de uma enzima com atividade de CM-celulase. Este trabalho encontra-se em andamento e os dados preliminares indicam a purificação de uma isoenzima com atividade de xilanase, a purificação parcial de duas outras isoenzimas, sendo uma delas com expressiva atividade catalítica em eletroforese de zimograma, e ainda a purificação parcial de uma enzima com atividade de CM-celulase.

Capítulo VI - Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar e de polpas de celulose por holocelulases produzidas por *Aspergillus oryzae* cultivado em resíduo da indústria têxtil. Neste capítulo, as holocelulases produzidas por *A. oryzae* presentes na amostra extrato bruto foram submetidas a ensaio de hidrólise enzimática sobre o bagaço de cana-de-açúcar não-tratado ou pré-tratados por hidrólise ácida ou por explosão a vapor, como substratos. As amostras ultrafiltrado PM-10 e Xyl-O1 purificada foram submetidas também a ensaios de hidrólise enzimática tendo como substratos polpas de celulose obtidas em diferentes etapas do processo *Kraft* de fabricação de papel. A atividade das amostras enzimáticas foi avaliada quanto à liberação de açúcar redutor, de pentoses, de grupamentos cromofóricos e também quanto à quantificação/identificação dos produtos de hidrólise em sistema de cromatografia de alta eficiência.

Considerações Finais e Perspectivas. Nesta parte do trabalho é apresentada uma síntese geral explorando os resultados mais relevantes que foram alcançados, discutindo as perspectivas futuras de novos desafios que serão propostos para a finalização dos capítulos ainda não publicados.

Apêndices. Aqui estão apresentados textos produzidos pelo autor, que foram mencionados no texto principal, porém representam apenas informações complementares.

Anexos. Neste item está apresentada a descrição de metodologias e dados experimentais referentes à análise composicional dos substratos lignocelulósicos que foram realizados por laboratórios parceiros e gentilmente disponibilizados pelos respectivos responsáveis para constarem no texto principal.

Objetivo Geral

Utilizar a biomassa lignocelulósica (holocelulose) dos resíduos da indústria têxtil como fonte de carbono para o cultivo submerso de *Aspergillus oryzae* e subsequente produção de holocelulases que promovam a sacarificação do substrato e liberação de hexoses e pentoses que possam ser utilizadas nas mais variadas biorrefinarias.

Objetivos Específicos

Comparar o cultivo de *A. oryzae* nos resíduos da indústria têxtil não-tratados ou pré-tratados pela dosagem de atividades enzimáticas padrões para holocelulases, bem como estabelecer condições básicas para a eficiente produção destas enzimas;

Utilizar o resíduo piolho de algodão sujo pré-tratado como fonte de carbono para o cultivo de *A. oryzae* e subsequente produção e purificação de uma xilanase de baixa massa molecular. Comparar algumas propriedades bioquímicas, como pH e temperatura ótimos, estabilidade térmica e perfis de hidrólise enzimática com as propriedades de outras xilanases descritas na literatura;

Purificar e caracterizar outras holocelulases com atividade de xilanase e de CM-celulase da fração concentrado PM-10 do EB de *A. oryzae* cultivado em piolho de algodão sujo pré-tratado como fonte de carbono.

Avaliar, por meio de hidrólise enzimática, a eficiência das holocelulases produzidas por *A. oryzae* sobre substratos como o bagaço de cana-de-açúcar não-tratado ou pré-tratados e polpas de celulose obtidas em diferentes estágios do processo *Kraft* de fabricação de papel.

Capítulo I

Referencial Teórico

1.1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1. Introdução geral

A demanda por energias “limpas” é considerada um desafio mundial para o desenvolvimento sustentável da humanidade.

Nas sociedades contemporâneas, o progresso tecnológico está atrelado ao consumo, principalmente, energético. Grande parte das fontes de energia disponíveis ao homem vem de combustíveis fósseis (carvão, gás natural e petróleo), que são utilizados na manutenção da força motriz nos setores residencial e produtivo industrial (Goldemberg, 2002). A energia, neste sentido, não constitui apenas um ingrediente para o desenvolvimento humano, mas sim é considerada fundamental.

Muito embora as estimativas mundiais variem, as reservas de combustíveis fósseis economicamente exploráveis incluem quase um trilhão de toneladas de carvão, mais do que um trilhão de barris de petróleo e mais do que um trilhão de metros cúbicos de gás natural (Annual, 2009b; Annual, 2009a). Somado aos combustíveis fósseis, fontes minerais como reservas de urânio representavam mais de três milhões de toneladas (Chow et al., 2003). No ano 2000 foi registrado o consumo de aproximadamente cinco bilhões de toneladas de carvão natural, correspondendo a 0,5% das reservas. O consumo de gás natural e petróleo corresponderam a 1,6 e 3% das reservas, respectivamente; a geração de eletricidade por meio de fontes nucleares equivaleu a 2% das reservas de urânio (Chow et al., 2003).

No entanto, mesmo estas informações fornecendo uma situação relativamente cômoda quanto à disponibilidade energética mundial, as tecnologias empregadas no progresso das populações são responsáveis por um problema grave que tem despertado a atenção de climatologistas, que é a liberação de quantidades nunca vistas de gases tóxicos na atmosfera, sendo o dióxido de carbono (CO₂) o principal representante.

Segundo Hoffert et al. (2002), no século XX, a população mundial quadruplicou gerando um aumento no consumo de energia primária em torno de 16 vezes. Conseqüentemente, os níveis de CO₂ atmosférico aumentaram de 275 a 370 partes por milhão (ppm). Sem os devidos controles, este número pode atingir 550 ppm ainda neste século. Modelos climáticos indicam que níveis de CO₂ atmosférico superiores a 550 ppm, poderiam resultar em aquecimento global, comparável em magnitude, mas com efeito oposto ao

resfriamento global acontecido na última idade glacial (Hoffert et al. citado por Hoffert et al., 2002). Metas de estabilização destes níveis abaixo de 450 ppm, futuramente seriam necessárias para evitar, por exemplo, a perda de coloração de corais, a circulação termohalina desigual nos oceanos e o aumento do nível dos mares como resultado do derretimento das camadas de gelo dos pólos da Terra (Hoffert et al., 2002; O'Neill e Oppenheimer, 2002).

Neste sentido, é de fundamental importância que ações governamentais destinadas a promover a igualdade social sejam feitas de maneira sustentável, congregando não só aspectos econômicos, mas também ambientais.

Dentre as alternativas aplicadas à redução das emissões de gases do efeito estufa destaca-se a substituição dos combustíveis de origem fóssil pelos combustíveis obtidos de fontes renováveis. Os biocombustíveis, produzidos a partir de material orgânico vegetal, semelhante às culturas agrícolas (ex.: milho, trigo, cana-de-açúcar, açúcar de beterraba, mandioca, entre outros), resíduos das culturas agrícolas (ex.: palha e casca de arroz, sabugo e espigas de milho, farelo de trigo) ou biomassa residual (ex.: resíduos residências, produzidos em atividades agrícolas, resíduos de papel, derivados de madeira utilizada nas construções entre outros), surgem com alternativa viável (Neves et al., 2007).

Os biocombustíveis líquidos podem ser utilizados como combustíveis alternativos para o setor de transportes, como desempenhado por outras fontes como gás natural liquefeito, gás natural comprimido, gás liquefeito de petróleo e o gás hidrogênio. Os biocombustíveis podem significativamente reduzir as emissões de gases na atmosfera, originadas no setor de transportes, se forem adotados amplamente (Balat e Balat, 2009). De acordo com Goldemberg citado por Balat e Balat (2009), os veículos automotores contribuem com mais de 70% das emissões de monóxido de carbono (CO) e 19% de CO₂.

Dentre os biocombustíveis, o bioetanol é considerado uma alternativa promissora e vem sendo produzido em grande escala no Brasil, nos Estados Unidos da América (EUA) e em alguns países europeus e asiáticos; neste sentido, espera-se que o bioetanol assumira o *status* de biocombustível renovável dominante no setor de transportes nos próximos 20 anos (Hahn-Hägerdal et al., 2006).

As matérias-primas renováveis utilizadas para a produção do bioetanol podem ser divididas em três grupos principais: 1) contendo sacarose (cana-de-açúcar, açúcar de

beterraba, sorgo doce e frutas), 2) material amiláceo (milho, trigo, arroz, batata, mandioca, batata doce e cevada) e 3) biomassa lignocelulósica (madeira, palha, casca e gramíneas). No presente momento, a produção de bioetanol como um combustível veicular é quase inteiramente dependente do amido e açúcares existentes nas culturas agrícolas (Balat e Balat, 2009). O bioetanol e demais biocombustíveis originados a partir destas matérias-primas renováveis são designados de *primeira geração* (Goldschmidt, 2008).

No entanto, o aumento da demanda de biocombustíveis de primeira geração resulta em um aumento dos custos de manutenção dos solos agricultáveis e do uso de fertilizantes, que podem ser relacionados com o aquecimento global e também com a contaminação das águas subterrâneas. As culturas agrícolas são principalmente desenvolvidas como monoculturas que necessitam de mais pesticidas, que são agentes redutores da biodiversidade ambiente. Somado a isto, grandes áreas de florestas tropicais estão sendo devastadas, especialmente no Brasil, por meio de queimadas que liberam CO₂ e levam a erosão dos solos (Goldschmidt, 2008). Uma alternativa para superar estes problemas poderia ser a produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica, que atualmente é designado biocombustível de *segunda geração*. O bioetanol de segunda geração apresenta um melhor balanço econômico-ecológico, pois não compete com a produção de alimentos, somado ao fato de a celulose e demais componentes poliméricos da biomassa lignocelulósica representar uma fonte natural renovável, disponível em grandes quantidades e a baixos custos (Goldschmidt, 2008).

Nos últimos anos, grupos de pesquisa espalhados por todo o mundo estão priorizando os estudos na utilização da biomassa lignocelulósica como matéria-prima para a produção de bioetanol. Em países onde o manejo de culturas agrícolas não é favorável, o material lignocelulósico representaria uma opção atrativa para a produção de biocombustíveis. De maneira geral, a produção comercial do bioetanol se resume a quatro etapas principais: pré-tratamento da biomassa, hidrólise da celulose, fermentação de hexoses, separação e tratamento de efluentes, somado a etapa de desintoxicação e fermentação de pentoses liberadas durante o pré-tratamento; esta atividade é comumente realizada em um passo separado de fermentação (Cardona e Sánchez, 2007). Entretanto, é consenso atual de que um dos grandes desafios na eficiente conversão da biomassa em bioetanol seja representado pela etapa de pré-tratamento.

Devido à complexidade estrutural da lignocelulose, normalmente sua degradação é facilitada pela inclusão de etapas de pré-tratamento que facilitam a remoção de lignina,

possibilitando a hidrólise total ou parcial da porção hemicelulose, bem como reduz a porção de celulose cristalina aderida à celulose amorfa que é disponível para hidrólises subseqüentes (Mosier et al., 2005; Cardona e Sánchez, 2007). Dependendo da constituição específica da biomassa, métodos de pré-tratamentos físicos, químicos, físico-químicos ou biológicos são empregados (Sánchez e Cardona, 2008). Outros autores classificam as metodologias atuais de pré-tratamento da biomassa em apenas métodos físicos e químicos. Mas de maneira geral, os métodos físicos são representados pela fragmentação (redução do tamanho das partículas da biomassa), explosão a vapor (elevada pressão de vapor é aplicada por poucos minutos à biomassa sem a adição de químicos) e hidrotermólise (a biomassa é submetida à água líquida pressurizada em elevadas temperaturas) (Mosier et al., 2005). Em relação aos métodos químicos, são comumente empregados diferentes agentes como ozônio, ácidos e álcalis diluídos, peróxidos e solventes orgânicos. Dentre os agentes químicos, o pré-tratamento realizado por ácido diluído se destaca pela eficiência de recuperação de monossacarídeos originados da fração hemicelulose (Lynd et al. citado por Sánchez e Cardona, 2008). Posteriormente ao pré-tratamento, a celulose é submetida à hidrólise enzimática liberando glicose que é transformada em bioetanol por microrganismos fermentadores, principalmente leveduras. Eventualmente, os açúcares liberados da fração hemicelulose podem ser convertidos também em glicose. No entanto, as tecnologias envolvidas nesta conversão são mais complexas e resultam em elevados custos de produção comparados ao bioetanol da cana-de-açúcar, beterraba e milho.

Neste sentido, a inclusão de etapa de pré-tratamento da biomassa tem por função melhorar a liberação de monossacarídeos ou a habilidade de formá-los durante hidrólises enzimáticas sucessivas e ao mesmo tempo evitar a formação de inibidores para os processos de hidrólise e fermentação subseqüentes. De fato, somado aos custos efetivos adicionais incluídos no produto final, durante o pré-tratamento da biomassa são produzidos inibidores, incluindo compostos de baixa massa molecular como ácidos orgânicos, derivados de furanos, compostos fenólicos e inorgânicos (Dashtban et al., 2009) que são efetivos em inibir as enzimas envolvidas na sacarificação do substrato, ou mesmo são eficazes em inibir o desenvolvimento colonial de microrganismos fermentadores. Curiosamente, *Sacharomyces cerevisiae* configura-se como um microrganismos menos sensíveis aos efeitos dos inibidores. Öhgren et al. (2006) verificaram o sucesso da co-fermentação de glicose e xilose, obtidas como produto da hidrólise do sabugo de milho pré-tratado por explosão a vapor, sem uma desintoxicação prévia, por *S. cerevisiae* recombinante TMB 3400.

O efeito de inibidores sobre a atividade de holocelulases foi demonstrado por Panagiotou e Olsson (2007), em que derivados da lignina (furanos, fenóis e ácidos orgânicos de baixas massas moleculares) que são encontrados no hidrolisado de palha de trigo, atuaram como inibidores da atividade de uma mistura de enzimas comerciais, bem como sobre amostras de EB de *Penicillium brasilianum* IBT 20888 durante a digestão enzimática de papel de filtro e xilana. O tema também foi abordado em revisão publicada por Duarte et al. (2012) (Apêndice A), onde os autores buscaram reunir as informações mais recentes para os futuros estudos, principalmente relacionados à inibição promovida por estes agentes sobre hemicelulases.

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

A biomassa lignocelulósica é particularmente importante para a aplicação no setor de energia, devido à disponibilidade em grande escala, baixo custo e produção ambientalmente correta (Lynd et al. citado por Lynd et al., 2005). Vantagens estratégicas, econômicas e ambientais são importantes para os países interessados em reduzir a dependência internacional pelos produtos de origem fóssil, somado a redução das emissões dos gases-estufa (Adsul et al., 2005; Neves et al., 2007). O obstáculo primário a utilização da biomassa lignocelulósica é a ausência de tecnologias de baixo custo, eficientes em romper a recalcitrância destes materiais (Lynd et al. citado por Lynd et al., 2005).

De acordo com o Departamento de Energia dos Estados Unidos, diversos produtos de elevado valor agregados, como o bioetanol, bioplásticos, surfactantes, biodiesel, óleos e ácidos graxos, detergentes, adesivos, biogás, lubrificantes, tintas e pigmentos, podem ser obtidos pela bioconversão da biomassa lignocelulósica (Turner et al., 2007). Dentre estes, o bioetanol se destaca como uma alternativa aos custos econômicos e ambientais provocados pelos combustíveis fósseis. Dados do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL)

confirmam os EUA como o maior produtor e consumidor de bioetanol, seguido pelo Brasil. Juntos EUA e Brasil são responsáveis por aproximadamente 80% da produção mundial; na última década a produção do bioetanol mundial quase triplicou alcançando 86 bilhões de litros em 2009 (Energy, 2010). Em termos de custo de produção, o bioetanol amiláceo produzido nos EUA representava US\$ 0,53 a US\$ 0,59/L (Energy, 2010). No Brasil, o custo de produção para do bioetanol da cana-de-açúcar (sacarose) representava cerca de US\$ 0,22/L, sendo que aproximadamente 60% deste total correspondiam a custos de obtenção e pré-processamento (sacarificação) do material bruto (Daishou citado por Neves et al., 2007).

Diante das perspectivas de que em um futuro próximo, o bioetanol seja um substituto eficiente tanto econômico quanto ambiental para os combustíveis fósseis, duas alternativas são particularmente importantes quanto à utilização da biomassa lignocelulósica: 1) como substrato para a sacarificação e liberação de hexoses e pentoses que possam ser fermentados, posteriormente, e 2) como fonte de carbono para o cultivo de microrganismos produtores de enzimas, principalmente aquelas voltadas para catálise em reações de sacarificação, conforme mencionada no primeiro item.

Entretanto a funcionalidade da biomassa lignocelulósica como fonte de carboidratos fermentescíveis requer o estabelecimento de metodologias eficazes para a obtenção de biocatalisadores para a conversão desta biomassa, pois grande parte dos custos referentes à sacarificação dos componentes poliméricos lignocelulósicos tem origem nos custos de produção destes catalisadores. Ou seja, o desenvolvimento de metodologias específicas de purificação e caracterização de enzimas secretadas por fungos contribuirá significativamente para a redução dos custos industriais para a obtenção destes catalisadores.

É crescente a aplicação de catalisadores enzimáticos nos mais variados campos da biotecnologia. Segundo o *Business Communications Company Inc.* (BCC), o mercado global para enzimas industriais aumentou de US\$ 2,3 bilhões em 2007 para estimados US\$ 3,3 bilhões em 2010. As estimativas futuras afirmam que este valor deve alcançar US\$ 4,4 bilhões em 2015; uma taxa de crescimento anual acumulada de 6% para um período de 5 anos (BCC Research, 2011). O mercado para enzimas industriais está concentrado em três setores fundamentais: 1) enzimas para aplicação técnica, avaliadas por cerca de US\$ 1 bilhão em 2010, com estimativas de alcançar cerca de US\$ 1,5 bilhão em 2015, um crescimento anual acumulado de 6,6%. As maiores vendas de enzimas de aplicação técnica ocorrem no mercado de couro, seguido pelo setor de produção de bioetanol; 2) enzimas envolvidas na manipulação

de alimentos e bebidas, com valorização para 2010 de US\$ 975 milhões e estimativas que devem alcançar US\$ 1,3 bilhão em 2015, com crescimento anual acumulado de 5,1%. Neste segmento, as maiores vendas de enzimas serão para os mercados de leite e derivados, cujo valor alcançado em 2009 foi de US\$ 401,8 milhões; 3) enzimas para nutrição animal, com valorização estimada para 2012 de US\$ 375 milhões (BCC Research, 2011). Aproximadamente 52% do mercado mundial são representadas por enzimas técnicas, para a produção de detergentes, biopolpação e papel (BCC Research citado por Turner et al., 2007). Neste setor, destacam-se enzimas hidrolíticas, principalmente proteases e amilases, que perfazem um total de 20 a 25% de todo o mercado, respectivamente. É destacada também a aplicação de hidrolases em bioprocessos, uma vez que estas não requerem cofatores ou substratos complexos durante a catálise, bem como podem apresentar versatilidade nos estágios iniciais de degradação de biomassas em setores florestais e agrícolas (Turner et al., 2007).

1.1.2. Composição da biomassa lignocelulósica

O complexo lignocelulósico é o biopolímero mais abundante da Terra. Considera-se que a biomassa lignocelulósica compreende aproximadamente 50% da biomassa da natureza e sua produção anual foi estimada de 10 a 50 bilhões de toneladas (Sánchez e Cardona, 2008).

A lignocelulose é um material orgânico renovável que constitui o elemento estrutural da parede celular de todas as células vegetais. Outro conceito que tem ganhado importância se refere ao conteúdo de carboidratos (celulose, hemicelulose e pectina) da parede celular vegetal, definido como holocelulose (Freer et al. citado por Andraeus et al., 2008). O termo descreve o conteúdo de carboidrato total presentes no material lignocelulósico, posterior a remoção da lignina (Percival Zhang et al., 2006). A ocorrência, abundância, distribuição e estrutura da holocelulose são dependentes da espécie, tecido e condições de crescimento da planta (Andraeus et al., 2008).

Segundo McCann e Carpita (2008), a eficiência de bioconversão da biomassa lignocelulósica depende de características macroscópicas e moleculares das matérias-primas. As características macroscópicas incluem organização espacial dos diferentes tipos celulares que constituem o tecido vegetal, a força e a extensão da adesão célula-célula e a distribuição espacial da lignina. Em nível molecular, a composição e a arquitetura das paredes celulares dos diferentes tipos de células influenciam na migração local de glicosil hidrolases (GHs) por

meio dos poros da parede celular até as microfibrilas de celulose, xilana e outros glicanos. As propriedades da arquitetura específica incluem a natureza e a extensão das ligações cruzadas entre os diferentes polissacarídeos, as interações entre a lignina e carboidratos, a natureza e a extensão dos *links* promovidos pelas proteínas estruturais, a cristalinidade da celulose e o tamanho das microfibrilas (McCann e Carpita, 2008).

Neste sentido, a parede celular constitui uma rede fibrilar que proporciona à célula vegetal sua forma estável e resistência (Cosgrove, 2001). É constituída por celulose, hemicelulose e lignina em maiores proporções (Figura 1.1). No entanto, quantidades reduzidas de outros componentes como cinzas, proteínas e pectina podem ser encontrados em diferentes percentuais dependendo da origem vegetal (Sánchez e Cardona, 2008; Dashtban et al., 2009).

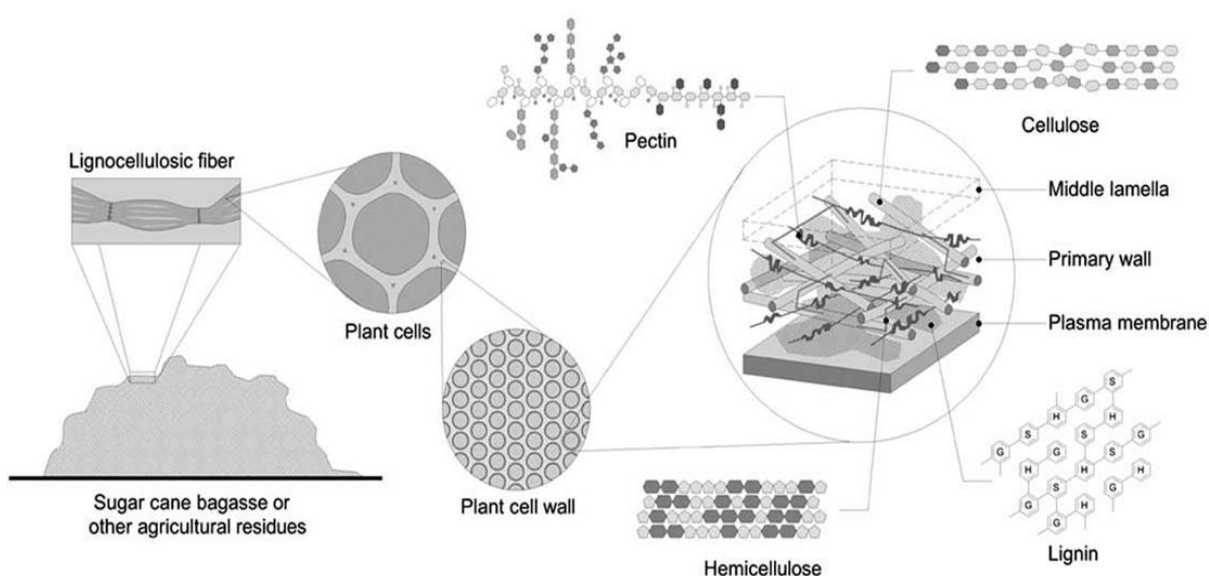


Figura 1.1. Diagrama mostrando os principais componentes da parede celular vegetal e seus prováveis arranjos estruturais. As microfibrilas de celulose interagem firmemente com microfibrilas de hemicelulose (como por exemplo, xiloglicanos); as pectinas formam uma matriz gelificante que permite a interação com proteínas estruturais; a lignina que constitui uma rede tridimensional intrincada de unidades p-hidroxifenilpropanos, cuja função principal é promover a resistência à hidrólise quando firmemente aderida às holoceluloses; adaptado de Siqueira e Filho (2010).

A celulose é o componente mais abundante nas células vegetais (Turner et al., 2007). As fibras celulósicas são responsáveis pela força e resistência da madeira, compreendendo cerca de 40 a 50% do peso seco total (Cullen e Kersten, 1992). Estimativas indicam a produção de 1,5 trilhões de toneladas de celulose anualmente, representando uma fonte inesgotável de

matéria-prima para produtos, biocompatíveis e ambientalmente corretos (Kumar et al., 2008). É definida como um polímero orgânico puro, linear e altamente ordenado (frequentemente cristalino), formado por dímeros de celobiose (D-glicopiranosil- β -1,4-glicopiranoose), ou seja, unicamente por moléculas de glicoses anidras, dispostas em longas cadeias (Martínez et al., 2005). As unidades de D-glicoses internas, bem como os dímeros sucessivos de celobiose das longas cadeias de celulose estão unidos por ligações O-glicosídicas β (1-4) (Turner et al, 2007; Balat e Balat, 2009; Dashtban et al., 2009). A justaposição de cadeias adjacentes de celulose é mantida por interações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals que mantêm o alinhamento paralelo da estrutura cristalina da microfibrila. Como resultado deste alinhamento, a celulose é insolúvel em diversos solventes e apresenta baixa acessibilidade a ácidos e a hidrólise enzimática (Balat e Balat, 2009).

O segundo maior constituinte químico da biomassa lignocelulósica é a hemicelulose, representando de 20 a 30% do peso seco da madeira Cullen e Kersten (1992), também referida como poliose. São heteropolissacarídeos poliméricos formados pela mistura de vários monossacarídeos como D-glicose, D-manose, D-galactose, D-xilose, D-arabinose, ácido 4-O-metil-glicurônico e resíduos de ácido D-galacturônico. A D-xilose é a pentose predominante, derivada da fração hemicelulose encontrada em madeiras de angiospermas. Porém, os resíduos de D-arabinose podem representar quantidades significativas das pentoses encontradas em vários resíduos agrícolas e outras culturas herbáceas “gramíneas”, como por exemplo, na espécie *Panicum virgatum*, cultivada nos EUA e considerada uma alternativa viável como matéria-prima vegetal para o setor energético (Balat e Balat, 2009). Em termos percentuais, os resíduos de D-arabinose representam cerca de 2 a 4% das pentoses na madeira, enquanto nas culturas herbáceas o percentual está entre 10 a 20% do total de pentoses, podendo alcançar de 30 a 40% do material fibroso obtido no processamento do milho (Mohagheghi et al. citado por Balat e Balat, 2009).

A lignina é o complexo fenólico aromático mais abundante na natureza (Boer et al., 2006), e constitui um complexo tridimensional, não estéreo regular, composto de unidades fenilpropanóides dimetoxilada [siringil (S)], monometoxilada [p-guaiacil (G)] e não-metoxilada [p-hidroxifenil (H)], derivadas dos alcoóis aromáticos p-hidroxicinamil correspondentes, sinapil, coniferil e p-coumaril (Martínez et al., 2005; Dashtban et al., 2009), que são unidas por diversos tipos de ligações carbono-carbono e ligações éter (Cullen e Kersten, 1992). É o terceiro principal componente da biomassa lignocelulósica; sintetizada

pelas plantas superiores e representa de 20 a 30% do peso seco da madeira. A maior proporção de lignina está nas paredes secundárias da célula vegetal, mas as maiores concentrações estão na lamela média onde o heteropolímero atua como substância cimentante mantendo as células justapostas o que confere rigidez e força para o tecido vegetal (Cullen e Kersten, 1992). A lignina está ligada covalentemente a polímeros de xilana na madeira de angiospermas e com galactoglicomananas encontrada na madeira de gimnospermas (Balat e Balat, 2009). Desta forma, a lignina atua como uma barreira para alguns solventes e enzimas, impedindo a penetração principalmente de enzimas lignocelulolíticas ao interior da biomassa (Dashtban et al., 2009). A composição da lignina em relação à razão H:G:S varia entre os diferentes grupos de plantas vasculares. Na madeira de gimnospermas lenhosas é encontrado o maior conteúdo de lignina, formada principalmente por unidades G. Em contraste, a lignina da madeira de angiospermas lenhosas é prioritariamente constituída por unidades S e G; enquanto a lignina de angiospermas não-lenhosas contém unidades H. A composição da lignina entre os diferentes tecidos vegetais e camadas de parede celular também variam, como por exemplo, a lignina da lamela média tipicamente apresenta menor razão S/G do que a lignina de parede celular secundária (Martínez et al., 2005).

As substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alta massa molecular que formam o maior componente da lamela média, uma fina camada de material adesivo extracelular, entre as paredes primárias de células vegetais superiores (Uenojo e Pastore, 2007). A pectina em algumas células ou tecidos vegetais é considerada o terceiro grupo de polissacarídeos estruturais da parede celular, abundante na polpa de beterraba e de frutos cítricos e maçãs onde pode representar metade do conteúdo polimérico (Brummell citado por Turner et al., 2007). Quimicamente, a pectina é formada por um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, compostos por resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações O-glicosídicas $\alpha(1-4)$, parcialmente esterificadas por grupos metil éster e parcial ou completamente neutralizadas por uma ou mais bases (íons sódio, potássio ou amônia) (Uenojo e Pastore, 2007). Em termos estruturais, são identificadas também regiões contendo ambos resíduos de L-ramnose e ácido D-galacturônico; e ainda regiões de açúcares neutros como L-ramnose, D-arabinose, D-galactose e D-xilose. Os resíduos de L-ramnose carregam cadeias laterais contendo D-arabinose e D-galactose. São também presentes cadeias laterais simples de xilogalacturonanas (Kashyap et al., 2001; Turner et al., 2007; Uenojo e Pastore, 2007).

Outros componentes não-estruturais da madeira incluem compostos extraíveis com solventes orgânicos (também chamados extrativos) que podem ser compostos polares (ex.: fenóis e taninos), apolares (ex.: ácidos graxos e esteróis), solúveis em água (ex.: açúcares e amido), bem como proteínas e cinzas. Estes componentes juntos geralmente representam menos de 5% da massa seca da madeira, podendo alcançar 20% em madeiras de gimnospermas (ex.: algumas Cupressaceae) (Fengel e Wegener citado por Martínez et al., 2005).

1.1.3. Resíduos agroindustriais

A biomassa lignocelulósica disponível na natureza para a degradação microbiológica é representada por culturas agrícolas, material de origem florestal, lixo orgânico urbano e resíduos agroindustriais.

Com referência aos resíduos agroindustriais, de acordo com estimativas da *Food and Agriculture Organization* (FAO citado por Kumar et al., 2008), as fontes de resíduos agroindustriais produzidas e disponíveis às biorrefinarias para a conversão em produtos de valor agregado, são abundantes. As estimativas mundiais afirmavam que sejam produzidas anualmente em torno de $2,9 \times 10^3$ milhões de toneladas em culturas de cereais, $1,6 \times 10^2$ milhões de toneladas em cultivo de subsistência, $1,4 \times 10^3$ milhões de toneladas em cultivo de sementes oleaginosas e $5,4 \times 10^2$ milhões de toneladas nas grandes lavouras. Dentre os diversos tipos de materiais lignocelulósicos são disponíveis a palha de trigo, a palha do arroz, material vegetal das palmeiras, sabugo de milho, caules e casca da planta do milho, etc., cada material com sua respectiva quantidade de celulose (Kumar et al., 2008). No Quadro 1.1 estão listadas diversas enzimas que catalisam a degradação da biomassa lignocelulósica, especialmente xilanases, produzidas por microrganismos crescidos em fontes de carbono residuais.

Durante o cultivo, beneficiamento e o rebeneficiamento do algodão são produzidos grandes quantidades de resíduos contendo material lignocelulósico.

O destino industrial do algodão inicia-se quando este é colhido na lavoura e, conduzido à indústria de fiação é beneficiado em fios, que serão utilizados na tecelagem. As frações dos fardos de algodão, impróprios para transformação em fios, representadas por pó de algodão (filtro), fibras quebradiças e grande quantidade de resíduos do algodoeiro (talos,

hastes, folhas e caroço), são comercializados a indústrias de re-beneficiamento. No re-beneficiamento são produzidas fibras mais limpas que serão novamente re-comercializadas com indústrias de fiação e outros ramos têxteis interessados em fibras de algodão de segunda qualidade. Neste sentido, durante o beneficiamento e o re-beneficiamento do algodão são produzidos os resíduos têxteis identificados como “piolho de algodão sujo”, o “piolho de algodão limpo” e “pó de filtro” (Hang, 2008; Siqueira et al., 2010a).

Estes resíduos totalizam cerca de 4.300 toneladas/ano de biomassa lignocelulósica. De acordo com Hang (2008), o piolho de algodão sujo, quando re-beneficiado, resulta em um material mais limpo (fibras de segunda qualidade) que são novamente comercializadas com as grandes indústrias têxteis a custos que variam de R\$ 0,80 a R\$ 2,00 por tonelada, para um montante produzido de 2.500 toneladas/ano; a casca do algodão é comercializada com pecuaristas que utilizam o material na complementação da ração animal; o pó de filtro, por sua vez, é comercializado com olarias, como combustível para queima de tijolos e telhas de barro. Juntos estes dois últimos resíduos perfazem um total de 1.800 toneladas/ano, com valores de comercialização de R\$ 0,15 e R\$ 0,03 por tonelada, respectivamente.

Quadro 1.1. Resíduos agroindustriais utilizados na produção de enzimas que degradam a biomassa lignocelulósica, principalmente xilanases.

Resíduos	Microrganismo	Enzimas	Referências bibliográficas
Fibra bruta de algodão	<i>Thermomonospora curvata</i>	Xilanase	Stutzenberger e Bodine (1992)
Polpa de beterraba	<i>Penicillium capsulatum</i>	Xilanases (XynA and XynB)	Filho et al. (1993)
Plásticos biodegradáveis	<i>A. oryzae</i>	Cutinase	Maeda et al. (2005)
Caule da planta de algodão	<i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Celulase e lacase	Kerem et al. (1992)
Resíduo da laranja	<i>P. ostreatus</i>	Lacase; manganês peroxidase; xilanase; endo-1,4-glicanase	Alexandrino et al. (2007);
Bagaço de mandioca	<i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 34612	Glicoamilase	Silva (2006)
Piolho de algodão sujo e talos da bananeira	<i>A. oryzae</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Emericella nidulans</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Fusarium verticillioides</i> , <i>Fusarium proliferatum</i> e <i>Paecilomyces lilacinum</i>	Xilanase; mananase; pectinase; endoglicanase; FPase; avicelase	Siqueira et al. (2010)a
Subprodutos do café; resíduo dos cafezais	<i>Penicillium</i> sp. CFR 303; <i>Hemicula grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	Xilanase	Murthy e Naidu (2010); Medeiros et al. (2008)
Polpa de eucalipto obtida no processo <i>Kraft</i>	<i>Streptomyces</i> sp. QG-11-3	Xilanase	Beg et al. (2000)
Resíduo líquido da autohidrólise da palha de trigo	<i>Aspergillus terricola</i> Marchal	Xilanase e β -xilosidase	Michelin et al. (2008)
Engaço de bananeira	<i>Clostridium thermocellum</i> ; <i>H. grisea</i> var.	Xilanase, pectinase,	Lucena-Neto e Filho (2004); Vieira

	<i>thermoidea</i> ; <i>Trichoderma harzianum</i> strains T4 e T6, <i>Acrophialophora nainiana</i>	mananase e celulase	et al. (2007); Medeiros et al. (2007); Medeiros et al. (2000)
Farelo de trigo e farelo de arroz	<i>Aspergillus niger</i> CFR 1105, <i>A. oryzae</i> CFR 232 e <i>Rhizopus arrhizus</i> NCIM 997	Amilase, pululanase, xilanase, 1,3/1,4- β -D-Glicanase	Kavitha et al. (2005)
Fibras do bambu (<i>Guadua angustifolis</i>)	<i>Schizophyllum commune</i>	Xilanase, mananase, poligalacturonase, CM-celulase e FPase	Valencia et al. (2011)
Pó da semente de tamarindo	<i>Termitomyces clypeatus</i>	Xilanase e celulase	Chatterjee et al. (2010)
Casca da mandioca	<i>Penicillium janthinellum</i> CRC 87M-115	Xilanase e protease	Oliveira et al. (2006)
Resíduo líquido contendo enxofre	<i>A. oryzae</i> NRRL 3485 e <i>Aspergillus phoenicis</i> ATCC 13157	Xilanase	Chipeta et al. (2005); Chipeta et al. (2008)
Lascas de madeira (<i>Pinus taeda</i>) pré-tratadas; biomassa pré-tratada de <i>Pinus densiflora</i>	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> ; <i>Laetiporus sulphureus</i>	Xilanase	Milagres et al. (2005); Lee et al. (2009)
Bagaço de cevada ou casca de amendoim	<i>Aspergillus casielus</i>	Xilanase	Kronbauer et al. (2007)
Água residual de destilarias	<i>Burkholderia</i> sp	Xilanase	Mohana et al. (2008)

1.1.4. Holocelulases e a degradação da biomassa lignocelulósica

A degradação completa da holocelulose que compõem as fibras celulósicas nativas (algodão, linho, cânhamo, juta e resíduos lignocelulósicos, como os produzidos na indústria têxtil) requer a utilização de GHs, como as celulasas, hemicelulasas e pectinases que são eficientemente secretadas por fungos filamentosos como sistemas multienzimáticos capazes de atuarem de maneira sinérgica (Turner et al., 2007).

As GHs representam um importante grupo de enzimas que catalisam a hidrólise da ligação glicosídica entre resíduos de monossacarídeos, levando a formação de um hemiacetal ou hemicetal de açúcar e a porção aglicona livre correspondente. As GHs são comumente referidas como glicosidasas e podem catalisar a hidrólise de ligações dos tipos O-, N- e S-entre glicosídeos [CAZypedia (<http://www.cazypedia.org/>)].

As GHs têm sido agrupadas em mais de 100 famílias conforme atualizado por Carbohydrate Active enZyme database (CAZY) [CAZY (<http://www.cazy.org/>)]. Cada família de GHs contém proteínas que são relacionadas pela sequência de aminoácidos e pelo dobramento estrutural nativo. Esta interrelação se estende para a maquinaria catalítica e mecanismos moleculares que são conservados para a grande maioria das GHs, como também em relação ao reconhecimento da geometria em torno da ligação glicosídica (independente de convenções de nomenclatura). Usualmente, o mecanismo catalítico de retenção ou inversão da configuração em torno do carbono anomérico resultante é também conservado dentro das famílias de GHs, conforme proposto inicialmente por Koshland em 1953 para explicar o mecanismo catalítico da lisozima (Gloster et al., 2008; [CAZypedia (<http://www.cazypedia.org/>)]).

Celulasas, hemicelulasas e pectinases representam GHs envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica e são classificadas por atuarem sobre seus respectivos substratos por meio da hidrólise das ligações glicosídicas por catálise ácido/base com retenção (Figura 1.2) ou inversão da configuração anomérica (Figura 1.3) para o ponto de clivagem (Rye e Withers, 2000; Vasella et al., 2002). A retenção ocorre por meio de reação de substituição dupla e a inversão via reação de substituição simples. Ambos os mecanismos envolvem a estabilização do íon *oxacarbonium* por interações eletrostáticas e um par de ácidos carboxílicos presentes no sítio ativo (Rye e Withers, 2000). Algumas xilanases e celulasas apresentam mecanismo catalítico que envolve duas substituições simples consecutivas em que a configuração

anomérica é retida, enquanto outras catalisam reação de substituição simples com inversão da configuração (Coughlan citado por Siqueira et al., 2010b).

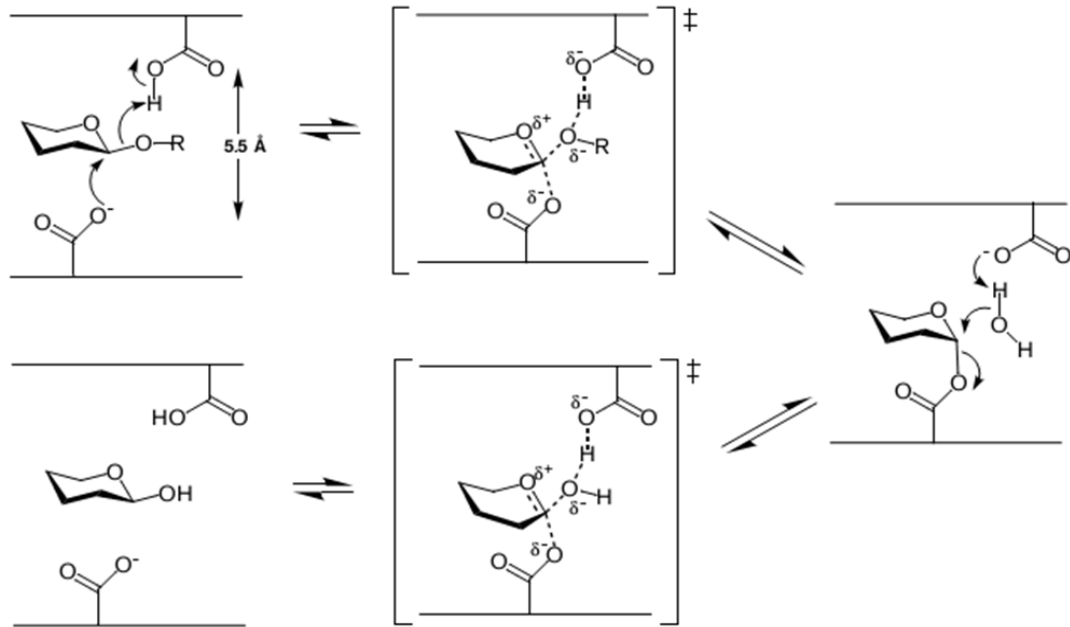


Figura 1.2. Mecanismo geral de hidrólise de ligação glicosídica com retenção anomérica catalisada por β -glicosidase; adaptado de Rye e Withers (2000).

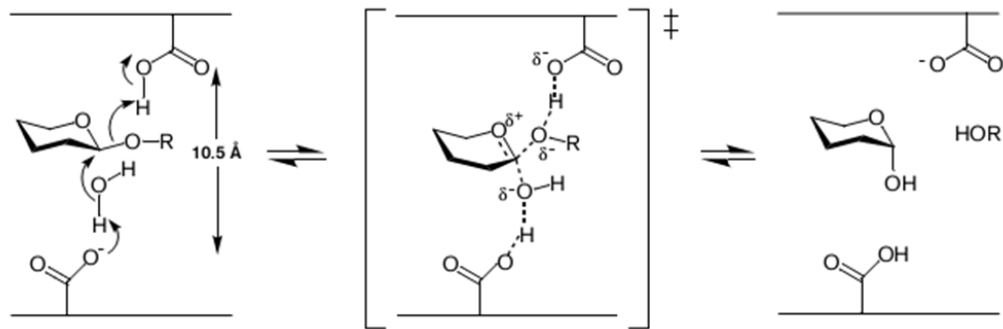


Figura 1.3. Mecanismo geral de hidrólise de ligação glicosídica com inversão anomérica catalisada por β -glicosidase; adaptado de Rye e Withers (2000).

Uma exceção é identificada para a família GH97, que contém enzimas com ambos os mecanismos catalíticos; um glutamato atua como uma base geral em reações de inversão, enquanto que um aspartato provável atua como um nucleófilo catalítico em reações de retenção. (Gloster et al., 2008; [CAZypedia (<http://www.cazypedia.org/>)]). Outra curiosidade em termos de mecanismo catalítico acontece com as GHs das famílias GH4 e GH109 que operam por meio de hidrólise NAD-dependente sendo identificadas etapas de redução-adição-

eliminação-oxidação via estados de transição aniônica (Yip et al., 2007; [CAZypedia (<http://www.cazypedia.org/>)]).

Outra classificação utilizada para distinguir entre holocelulases diversas envolve a posição de clivagem do substrato. Dentre as GHs envolvidas, as holocelulases tipo-exo atuam sobre ligações glicosídicas terminais e liberam unidades de monossacarídeos, enquanto as holocelulases tipo-endo hidrolisam ligações glicosídicas internas ao acaso ou em posições específicas nos polímeros de holocelulose. Em adição, enzimas acessórias clivam vários pontos de ramificações na estrutura polimérica e são essenciais para a hidrólise completa da biomassa lignocelulósica (Sanchez, 2009).

As celulases representam um complexo enzimático constituído por um conjunto de hidrolases, secretadas por microrganismos, plantas e alguns animais. Estas enzimas são glicoproteínas com massa molecular entre 50 e 90 kDa, capazes de romper as ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ entre resíduos de D-glicose de microfibrilas de celulose, resultando na liberação de celoligossacarídeos, celobiose e glicose (Dillon, 2004).

As celulases produzidas por bactérias, fungos e animais são encontradas na forma individualizada, mas podem constituir complexo enzimático multipolimérico denominado celulossoma, conforme observado em *Clostridium thermocellum*. Entre os complexos celulolíticos de bactérias e fungos, o mais conhecido é o de *Trichoderma reesei* (Dillon, 2004). As enzimas que hidrolisam a celulose são divididas em três grupos: endo- β -1,4-glicanases (EC 3.2.1.4), que hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso na fibra de celulose; exo- β -1,4-glicanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), que agem nas extremidades reductoras e não-reductoras de polímeros gerados pela ação das endoglicanases liberando celobiose; β -1,4-glicosidasas (EC 3.2.1.21), que hidrolisam oligossacarídeos e celobiose a glicose (Figura 1.4) (Dillon, 2004; de Vries e Visser, 2001; Andreaus et al., 2008; Kumar et al., 2008).

As principais aplicações das celulases destinam-se à área têxtil e de detergentes. Na área têxtil, as celulases são utilizadas para desenvolver o aspecto de usado e desbotado (bioestonagem) em tecidos de algodão tingidos com índigo e, também, para a retirada das regiões de desorganização de microfibrilas de celulose (*pilling*) e amaciamento dos tecidos (Dillon, 2004). Como componentes de detergentes, as celulases são utilizadas para remover extremidades de microfibrilas que são retiradas do tecido juntamente com a sujeira e, ainda,

proporcionam maior brilho aos tecidos. As celulases vêm sendo utilizadas como aditivos na preparação do malte de cerveja, em processos de extração de sucos, óleos vegetais, pigmentos, alcalóides e amido (Dillon, 2004). Na área de alimentação animal, são comercializadas como componentes de indutores de silagem e em ração para aves e suínos com a finalidade de aumentar a digestibilidade de alimentos ricos em fibras de celulose. Na área energética, estas enzimas vêm sendo empregadas em plantas-piloto para a obtenção de hidrolisados de celulose, os quais são utilizados para a fermentação visando produtos de interesse, como o bioetanol (Dillon, 2004).

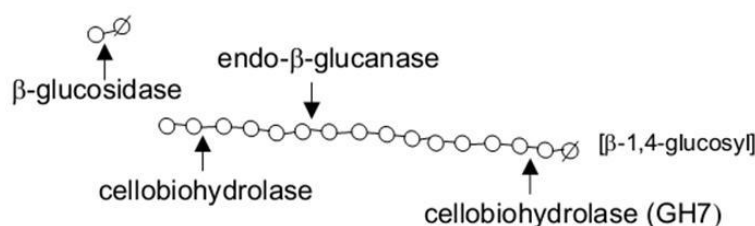


Figura 1.4. Estrutura simplificada e sítios de ataque enzimático sobre a celulose. Resíduos de D-glicose são representados por [O]; extremidade redutora da cadeia [Ø]. Adaptado de Turner et al. (2007).

A hidrólise completa da porção hemicelulose requer a participação de enzimas responsáveis pelas clivagens das cadeias principais e laterais. As enzimas envolvidas na degradação da hemicelulose incluem hidrolases tipo-exo e tipo-endo que clivam a cadeia principal de hemicelulose. A primeira hidrolisa ligações glicosídicas terminais e libera unidades de monossacarídeos das extremidades não-redutoras. A segunda, dependendo do tipo de enzima, cliva ligações localizadas no interior da molécula, de modo aleatório ou específico (Filho, 2004b). Dentre as várias enzimas, pode-se destacar: β -D-xilanase (EC 3.2.1.8), β -D-mananase (EC 3.2.1.78), β -D-xilosidase (EC 3.2.1.37), β -D-manosidase (EC 3.2.1.35), α -L-arabinanase (EC 3.2.1.99), β -D-galactanase (EC 3.2.1), todas envolvidas na clivagem da cadeia principal. Na quebra das cadeias laterais atuam as enzimas: acetil xilana esterase (EC 3.1.1.6), α -D-galactosidase (EC 3.2.1.22), α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) e α -D-glicuronidase (EC 3.2.1.131) (Figura 1.5) (Filho, 2004b; Sanchez, 2009).

Na natureza, vários organismos são capazes de produzir hemicelulases, dentre estes bactérias (aeróbicas e anaeróbicas), fungos (mesofílicos, termofílicos e extremofílicos), algas, protozoários, gastrópodes e artrópodes (Kulkarni et al., 1999; Supramaniyan e Prema, 2002; Filho, 2004b). A maioria dos fungos fitopatogênicos produz enzimas, incluindo xilanases, que

degradam polissacarídeos da parede celular vegetal. As xilanases foram também descritas para gêneros de bactérias que não estão envolvidos em fitopatogenicidade, como *Bacillus* (Filho, 2004b). Dentre os microrganismos produtores de xilanases destacam-se os fungos filamentosos *Acrophialophora nainiana*, isolado na região central do Brasil (Salles et al., 2000), e *Penicillium citrinum*, destacado por secretar uma isoforma de xilanase tolerante a meio alcalino, pertencente à família GH11, com viáveis possibilidades de aplicações biotecnológicas (Dutta et al., 2007).

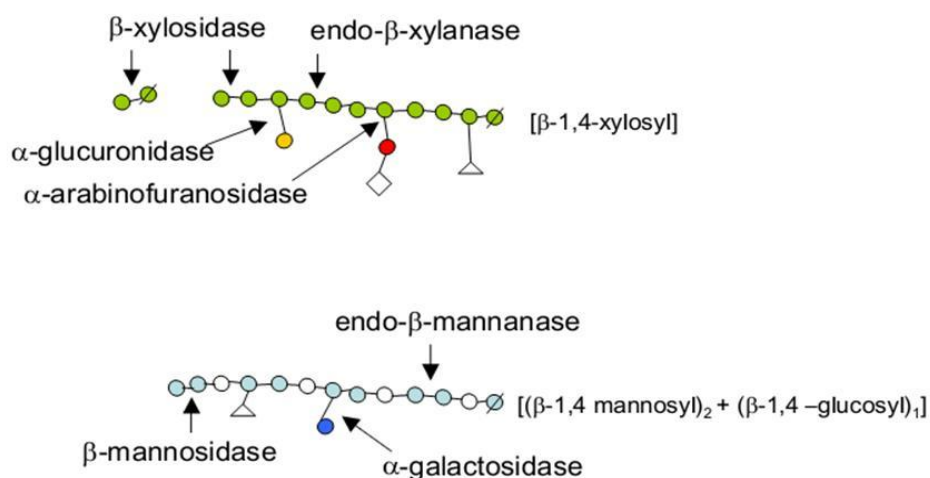


Figura 1.5. Estrutura simplificada e sítios de ataque enzimático sobre a hemicelulose. Carboidratos são representados por círculos: resíduos de D-glicose [○], D-xilose [●], ácido D-glicurônico [●], D-arabinose [●], D-manose [○] e galactose [●]; grupos acetato [△]; grupos fenólicos [◇]; extremidade reductora da cadeia por [● ou ○]. Adaptado de Turner et al. (2007).

Segundo Collins et al. (2005) enzimas com atividade de xilanase são classificadas dentro das famílias de GHs 5, 7, 8, 10, 11 and 43 por conterem verdadeiramente os domínios catalíticos relacionados à atividade endo-beta-1,4-xilanase. Os membros destas famílias de GHs diferem em suas propriedades físico-químicas, estrutura, modo de ação e especificidade de substrato. Entretanto, existem similaridades, como por exemplo, nas famílias 5 e 10 que dividem uma estrutura tridimensional similar Collins et al. (2005). Além disto, as famílias 5, 7, 10 e 11 contêm enzimas que catalisam a hidrólise com retenção da configuração anomérica, com dois resíduos de glutamatos (Glu) envolvidos no mecanismo catalítico. Este mecanismo de hidrólise é semelhante para celulasas (Filho, 2004b). Com ênfase aos resíduos catalíticos envolvidos na hidrólise, para as xilanases da família GH10, o nucleófilo catalítico foi primeiramente identificado na endoxilanase de *Cellulomonas fimi* (CfXyn10A) como Glu233 na sequência ITELD. As enzimas pertencentes à família GH10 possuem um resíduo de

asparagina precedendo o resíduo ácido/base geral na sequência NEP [CAZyedia (<http://www.cazypedia.org/>)]. Para as xilanases da família GH11, o nucleófilo foi primeiro identificado na endoxilanase de *Bacillus circulans* como Glu78 na sequência ITELD [CAZyedia (<http://www.cazypedia.org/>)]. Inversamente, enzimas das famílias 8 e 43 tipicamente operam com inversão do centro anomérico e os aminoácidos Glu e aspartato configuram como resíduos catalíticos [CAZY (<http://www.cazy.org/>)].

O complexo xilanolítico é formado por enzimas específicas e ao mesmo tempo altamente versáteis quanto à degradação do substrato. Neste sentido, estas enzimas têm ganhado grande destaque nas últimas décadas, particularmente, devido ao potencial de aplicação em vários segmentos industriais, como no setor de alimentos, indústria de polpa de celulose e papel (Filho, 2004b), tratamento da ração animal para aumentar a digestibilidade, processamento alimentar para aumentar a clarificação e a conversão de substratos lignocelulósicos em materiais-primas e biocombustíveis (Subramaniyan e Prema, 2002). A principal aplicação industrial das xilanases está no branqueamento da polpa de celulose. Quando livre de atividade de celulases, as xilanases podem ser aplicadas em etapas de biobranqueamento (remoção da lignina) da polpa *Kraft* de celulose, na modificação da consistência da polpa e também na reciclagem do papel. Nos dias atuais, cerca de 30% das patentes concedidas nos EUA estão relacionadas ao uso destas enzimas e redução de produtos químicos tóxicos e poluentes neste processo, como cloreto e hipoclorito (Corral e Villaseñor-Ortega, 2006). As xilanases, juntamente com enzimas celulolíticas, têm sido aplicadas para na conversão de material lignocelulósico, especialmente resíduos agroindustriais e florestais em produtos de elevado valor agregados como biocombustíveis (Subramaniyan e Prema, 2002) e outros químicos. As xilanases também têm sido requeridas em processos de hidrólises de xilanas isoladas que resultem na produção de oligossacarídeos que são utilizados como aditivos em alimentos funcionais ou adoçantes alternativos (Corral e Villaseñor-Ortega, 2006).

As enzimas que degradam a pectina, as pectinases, desempenham importante papel no crescimento da planta, amadurecimento do fruto e na modificação da biomassa. As pectinases são produzidas por várias espécies de plantas e microrganismos, destacando-se as espécies dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma* (Filho, 2004a). Inúmeras enzimas estão envolvidas na degradação da pectina; estas podem atuar por reações de hidrólise ou por β -eliminação catalisada por

liases: endo-poligalacturonase (EC 3.2.1.15), exo-poligalacturonase (EC 3.2.1.67) e exopoligalacturonidase (EC 3.2.1.82), que clivam a cadeia de ácido poligalacturônico por hidrólise e representam as mais abundantes de todas as pectinases; α -L-ramnosidases (EC 3.2.1.40), hidrolisam ramnogalacturonanas; α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) hidrolisam as cadeias laterais contendo resíduos de L-arabinose e endo-arabinanases (EC 3.2.1.99), que clivam as cadeias laterais contendo arabinanas (Figura 1.6) (Takao et al., 2002; Turner et al., 2007). Dentre as enzimas que clivam o polímero de ácido galacturônico por β -eliminação destacam-se: polimetilgalacturonato liase (EC 4.2.2.10), poligalacturonato liase (EC 4.2.2.2) e exo-poligalacturonato liase (EC 4.2.2.9). Destaca-se também, a pectinesterase (EC 3.1.1.11), que desesterifica ligações ésteres de grupos metil de cadeias laterais da pectina, liberando pectinas ácidas e metanol (Jayani et al., 2005; Turner et al., 2007).

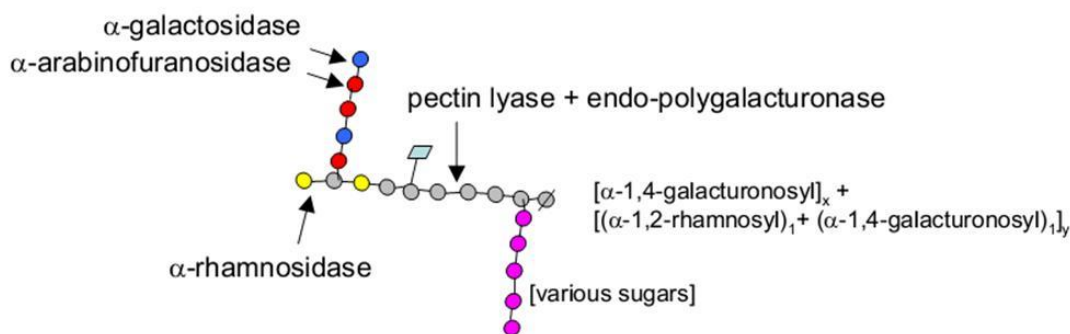


Figura 1.6. Estrutura simplificada e sítios de ataque enzimático sobre a pectina. Carboidratos são representados por círculos: resíduos de ácido D-galacturônico [●], ácido D-glicurônico [●], D-arabinose [●], galactose [●] e resíduos de açúcar indefinidos [●]; grupos metil [▭]; extremidade redutora da cadeia [⊘]. Adaptado de Turner et al. (2007).

Não diferente das demais enzimas que degradam polímeros da holocelulose da parede celular vegetal, as pectinases representam um grupo de enzimas utilizadas na indústria de alimentos (processamento de frutas e legumes), com um enfoque na extração, clarificação e despectinização de sucos de frutas (Filho, 2004a; Jayani et al., 2005). Neste grupo de enzimas se destacam as pectinases ácidas comumente isoladas de extratos brutos de fungos, principalmente *A. niger* e algumas espécies do gênero *Trichoderma*. A função industrial destas enzimas é aumentar o rendimento da extração e clarificação de sucos durante as etapas de prensagem, decantação e remoção de partículas em suspensão (Filho, 2004a). As pectinases ácidas, especialmente as que apresentam atividade de poligalacturonase, são utilizadas na maceração de frutas e legumes, sendo também denominadas de macerases

(Filho, 2004a). As pectinases alcalinas são comumente originadas de fontes bacterianas, principalmente, *Bacillus* sp e no setor industrial utilizadas na desemgomagem e maceração de fibras têxteis e no pré-tratamento de efluentes com substâncias pécticas das indústrias de sucos de frutas (Kashyap et al., 2001). Durante a fabricação de papel, pectinases podem despolimerizar substâncias pécticas e, subsequentemente, diminuir a demanda catiônica das soluções pécticas e do filtrado resultantes do branqueamento com peróxido (Uenojo et al., 2007). Outras aplicações das pectinases alcalinas incluem a utilização na extração de óleo vegetal, na fermentação do café com a finalidade de remover a camada de mucilagem que se forma sobre os grãos e como componente de coquetéis enzimáticos responsáveis pela redução na viscosidade das rações animais aumentando a disponibilidade nutricional do alimento (Filho, 2004a; Jayani et al., 2005).

Inúmeros relatos têm abordado o interesse de pesquisadores em relação ao imenso potencial dos microrganismos secretores de enzimas naturais para a biodegradação da biomassa lignocelulósica. Nikolov et al. (2000) desenvolveram uma metodologia eficaz de produção de glicose após hidrólise enzimática de resíduos de fibras de celulose deslignificadas produzidas na industrialização do papel. Medeiros et al. (2000) verificaram uma maneira eficiente de aproveitar o resíduo da planta da banana (*Musa cavendishii*) designado engaço da bananeira por meio de bioconversão promovida por hemicelulases de fungos aeróbios *Trichoderma harzianum* var. T₄ e T₆, *Acrophialophora nainiana* e *Humicola grisea* var. *thermoidea*.

Os resíduos de biomassa lignocelulósica produzidos na cultura do algodão (*Gossypium hirsutum* L.), e principalmente a própria fibra de algodão tem sido submetida à ação de biocatalisadores, em processos têxteis de bioestonagem e biopolimento e em processos de bioconversão. Csiszár et al. (1998) verificaram a atividade enzimática de celulase comercial no pré-tratamento de tecidos de algodão em condições alcalinas. Também Mane et al. (2007) observaram a bioconversão de resíduos agroindustriais em proteínas comestíveis pelo fungo *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer, com ênfase nos produtos gerados a partir do cultivo do algodão.

O expressivo crescimento do mercado global para biocatalisadores têm influenciado diversos estudos envolvendo a purificação, caracterização e determinação de mecanismos de ação de enzimas secretadas por fungos, envolvidas com a degradação da biomassa lignocelulótica. Saha (2004) demonstrou a purificação e a caracterização de endoglicanase de

Mucor circinelloides. Cardoso e Filho (2003) e Salles et al. (2005) relataram a purificação e a caracterização de β -D-xilanase (Xyn III), em ensaios isolados, secretada pelos fungos *Acrophialophora nainiana* e *Humicola grisea* var. *thermoidea*, respectivamente. Boer et al. (2006) relataram ainda, a purificação e a caracterização de duas manganês peroxidases secretadas pelo basidiomiceto de decomposição branca *Lentinula edoles*. Dentre os estudos envolvendo a degradação da pectina, destaca-se a purificação e a caracterização do mecanismo catalítico de poligalacturonases secretadas pelo fungo *Sclerotium rolfsii* (Schnitzhofer et al., 2007).

1.1.5. Fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*

Os fungos representam eucariotos simples que, atualmente, são classificados pelos taxonomistas modernos no Reino Fungi, baseado no tipo de absorção dos nutrientes do meio. São responsáveis por secretar inúmeras enzimas de grande eficiência na degradação de nutrientes disponíveis no ambiente, que serão absorvidos por suas células (Bennett, 1998). Apresentam-se amplamente diversos quanto à morfologia, fisiologia e ecologia, sendo que alguns fungos são conhecidos por seus impactos negativos no bem estar dos humanos como agentes causadores de doenças em plantas (ex.: ferrugem em cereais), biodegradação (apodrecimento e mofo) ou como agentes patogênicos em animais (ex.: produção de toxinas e micoses) (Bennett, 1998).

Os fungos podem apresentar-se como mofos microscópicos, leveduras, cogumelos e trufas macroscópicas. Algumas espécies de macrofungos são consideradas iguarias e são manuseadas e cultivadas para alimentação humana. Entretanto, espécies microscópicas, que incluem os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Saccharomyces*, são mais bem conhecidas pelos seus impactos positivos quando utilizados em processos industriais (Bennett, 1998). Dentre os fungos filamentosos, os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* representam os mais bem conhecidos produtores de enzimas que degradam a holocelulose (Andreaus et al., 2008), bem como se destacam por serem intensivamente utilizados na indústria, devido suas propriedades metabólicas, como produtores de alimentos fermentados, enzimas industriais e de degradação ou na síntese de metabólitos secundários (Kobayashi et al., 2007). Em termos de hidrólise de celulose a glicose, *Trichoderma reesei* e *T. viride* configuram como as espécies de maior importância na produção de celulasas (Heikinheimo, 2002; Taherzadeh e Karimi, 2007).

O gênero *Aspergillus* é constituído por um grupo de fungos filamentosos com um grande número de espécies (de Vries e Visser, 2001). Os *Aspergillus* foram primeiramente reconhecidos como organismo em 1729 por Micheli. São amplamente dispersos por todos os ambientes e consistem em mais de 180 espécies oficialmente reconhecidas e formam um importante grupo de fungos filamentosos, os Ascomicetes (Ward et al., 2005). Neste grupo também são encontrados agentes patogênicos humanos, como o causador da aspergilose em humanos, *A. fumigatus*; produtor de aflatoxina, *A. flavus* e *A. parasiticus* (de Vries e Visser, 2001). Muitos membros são microrganismos úteis na natureza na degradação de polissacarídeos da parede celular vegetal (de Vries Visser, 2001), bem como são importantes em processos industriais na produção de enzimas homologas e heterólogas (te Biesebeke, 2005). Dentre os membros deste grupo, *A. oryzae* e *A. niger* receberam a certificação *Generally Recognized as Safe* (GRAS status) da *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA (Ward et al., 2005), e *A. oryzae*, pelo longo período de utilização na indústria alimentícia recebeu também o status da *World Health Organization* (Kobayashi et al., 2007).

O fungo filamentoso *A. oryzae* tem sido utilizado por mais de 1000 anos para a produção de alimentos fermentados tradicionais da Indústria Japonesa, como *sake* (vinho de arroz), *miso* (pasta de soja) e *shoyu* (molho de soja) (Oda et al., 2006; Kobayashi et al., 2007). Nesta fermentação, *A. oryzae* secreta significante quantidades de amilases e/ou proteases para a hidrólise de amido em açúcares, e proteínas a peptídeos/aminoácidos que são posteriormente fermentados por leveduras e bactérias lácticas (Kobayashi et al., 2007). Somado a isto, *A. oryzae* possui a habilidade de produzir grandes quantidades de diferentes enzimas no ambiente, e esta propriedade tem sido utilizada para a produção comercial de enzimas recombinantes e de suas próprias enzimas. Devido à elevada produção de enzimas e alto grau de segurança, *A. oryzae*, bem como *A. niger* e *A. sojae* tem despertado grande interesse como hospedeiros para produção de proteínas homólogas e heterólogas (te Biesebeke, 2005; Oda et al., 2006).

O foco principal da pesquisa básica sobre *A. oryzae* tem sido a análise de enzimas hidrolíticas que são importantes nos processos de fermentação. Nesta etapa são incluídas purificações, caracterizações e análise da sequência de aminoácidos de diversas enzimas de interesse (Machida et al., 2008). A amilase (diastase) de *A. oryzae* foi a primeira enzima de origem microbiana utilizada em processos industriais, tradicionalmente isolada de cevada em germinação e utilizada na etapa de fermentação do malte e fabricação da cerveja. Jokichi

Takamine, em 1894, foi provavelmente o primeiro a perceber as possibilidades técnicas das enzimas de fungos e a introduzi-las na indústria (Bennett, 1998). Takamine cultivou *A. oryzae* em finas camadas de arroz cozido a vapor e farelo de trigo e sugeriu novas utilidades para a diastase parcialmente purificada como substituinte para enzimas de fermentação do malte e como aditivo digestivo para o tratamento da dispepsia (Bennett, 1998; te Biesebeke, 2005).

Nas últimas décadas, o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante tem capacitado o melhoramento de espécies de fungos filamentosos para a produção de proteínas heterólogas; os maiores hospedeiros são *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae* e *T. reesie* (Bennett, 1998; Damásio et al., 2011). Em paralelo a este desenvolvimento, pesquisas sobre a secreção de proteínas por *A. oryzae* têm sido focada na regulação pós-transcricional e pós-traducional das proteínas produzidas (Oda et al., 2006; te Biesebeke et al., 2006).

O mecanismo de secreção de *A. oryzae* também tem sido investigado para se aumentar a produtividade da fermentação e a quantidade de enzimas produzidas. Os caminhos secretórios incluem várias etapas de classificação entre retículo endoplasmático, golgi, membrana plasmática, endossomo e vacúolo. Estudos envolvendo a extremidade das hifas, onde a secreção de proteínas é mais proeminente, são também relevantes para o aumento da secreção de enzimas no cultivo em estado sólido (Machida et al., 2008).

E finalmente na última década, o sequenciamento dos genomas de *A. niger* e *A. oryzae* foi completado (Machida et al., 2005). A disponibilidade da sequência do genoma tem auxiliado na identificação de genes e regiões funcionalmente importantes, bem como tem sido aplicadas técnicas de análise do genoma total para a exploração destas informações (Maeda et al., 2004), principalmente na formação de produtos e secreção de proteínas. Deste modo, a sequência do genoma de *A. oryzae* e a análise detalhada das informações contidas produzirão resultados capazes de explicar o motivo pelo qual este fungo apresenta propriedades tão atrativas às fermentações industriais.

1.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adsul, M. G.; Ghule, J. E.; Shaikh, H.; Singh, R.; Bastawde, K. B.; Gokhale, D. V.; Varma, A. J., Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* **2005**, *62*, 6-10.
- Alexandrino, A. M.; Faria, H. G.; Souza, C. G. M.; Peralta, R. M., Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2007**, *27*, 364-368.
- Andreaus, J.; Filho, E. X. F.; Bon, E. P. S., Biotechnology of Holocellulose-Degrading Enzymes. In *Biocatalysis and Bioenergy*, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, 2008; pp 195-229.
- Annual, I. E., World Estimated Recoverable Coal. In EIA, U. S. D. o. E., Ed. Washington, DC, 2009b.
- Annual, I. E., World Proved Reserves of Oil and Natural Gas, Most Recent Estimates. In Washington, DC, 2009a.
- Balat, M.; Balat, H., Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy* **2009**, *86*, 2273-2282.
- BCC Research, Enzymes in Industrial Applications: Global Markets. In Wellesley, MA, USA, 2011.
- Beg, Q. K.; Bhushan, B.; Kapoor, M.; Hoondal, G. S. Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. *Enzyme and Microbial Technology*. **2000**, *27*, 459-466.
- Bennett, J. W., Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology* **1998**, *66*, 101-107.
- Boer, C. G.; Obici, L.; Souza, C. G. M.; Peralta, R. M., Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*. *Process Biochemistry* **2006**, *41*, 1203-1207.
- Cantarel, B. L.; Coutinho, P. M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrissat, B., The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* **2009**, *37*, D233-D238.
- Cardona, C. A.; Sánchez, Ó. J., Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology* **2007**, *98*, 2415-2457.
- Cardoso, O. A. V.; Filho, E. X. F., Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *FEMS Microbiology Letters* **2003**, *223*, 309-314.
- Chatterjee, R.; Majumder, K.; Sengupta, S., Tamarind kernel powder co-induces xylanase and cellulase production during submerged fermentation of *Termitomyces clypeatus*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **2010**, *15*, 854-861.

- Chipeta, Z.; du Preez, J.; Christopher, L., Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2008**, *35*, 587-594.
- Chipeta, Z.; du Preez, J.; Szakacs, G.; Christopher, L., Xylanase production by fungal strains on spent sulphite liquor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2005**, *69*, 71-78.
- Chow, J.; Kopp, R. J.; Portney, P. R., Energy Resources and Global Development. *Science* **2003**, *302*, 1528-1531.
- Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G., Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* **2005**, *29*, 3-23.
- Corral, O. L.; Villaseñor-Ortega, F., Xylanases. In *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, Guevara-González, R. G.; Torres-Pacheco, I., Eds. Research Signpost: Kerala, 2006; pp 305-322.
- Cosgrove, D. J., Wall Structure and Wall Loosening. A Look Backwards and Forwards. *Plant Physiology* **2001**, *125*, 131-134.
- Csiszár, E.; Szakács, G.; Rusznák, I., Combining Traditional Cotton Scouring with Cellulase Enzymatic Treatment. *Textile Research Journal* **1998**, *68*, 163-167.
- Cullen, D.; Kersten, P., Fungal enzymes for lignocellulose degradation. In *Applied molecular genetics of filamentous fungi*, 1 ed.; Kinghorn, J. R.; Turner, G., Eds. New York, 1992; pp 100-131.
- Damáσιο, A. R. L.; Silva, T. M.; Almeida, F. B. R.; Squina, F. M.; Ribeiro, D. A.; Leme, A. F. P.; Segato, F.; Prade, R. A.; Jorge, J. A.; Terenzi, H. F.; Polizeli, M. L. T. M., Heterologous expression of an *Aspergillus niveus* xylanase GH11 in *Aspergillus nidulans* and its characterization and application. *Process Biochemistry* **2011**, *In Press*, *Corrected Proof*.
- Dashtban, M.; Schraft, H.; Qin, W., Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences* **2009**, *5*, 578-595.
- de Vries, R. P.; Visser, J., *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2001**, *65*, 497-522.
- Dillon, A. J. P., Celulases. In *Enzimas como agentes biotecnológicos*, 1ª ed. ed.; Said, S.; Pietro, R. C. L. R., Eds. Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004; pp 243-269.
- Duarte, G. C.; Moreira, L. R. S.; Jaramillo, P. M. D.; Filho, E. X. F., Biomass-derived inhibitors of holocellulases. *BioEnergy Research* **2012**, 1-10.
- Dutta, T.; Sengupta, R.; Sahoo, R.; Sinha Ray, S.; Bhattacharjee, A.; Ghosh, S., A novel cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citrinum*: production, purification and characterization. *Letters in Applied Microbiology* **2007**, *44*, 206-211.
- Energy, U. S. D., Current State of the U.S. Ethanol Industry. In Programs, O. o. B., Ed. Washington, 2010.

Filho, E. X. F., Pectinases. In *Enzimas como agentes biotecnológicos*, 1ª ed. ed.; Said, S.; Pietro, R. C. L. R., Eds. Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004a.

Filho, E. X. F., Xilanases. In *Enzimas como agentes biotecnológicos*, 1ª ed. ed.; Said, S.; Pietro, R. C. L. R., Eds. Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004; pp 137-148b.

Filho, E. X. F.; Puls, J.; Coughlan, M. P., Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **1993**, *11*, 171-180.

Gloster, T. M.; Turkenburg, J. P.; Potts, J. R.; Henrissat, B.; Davies, G. J., Divergence of Catalytic Mechanism within a Glycosidase Family Provides Insight into Evolution of Carbohydrate Metabolism by Human Gut Flora. *Chemistry & Biology* **2008**, *15*, 1058-1067.

Goldemberg, J., The Brazilian Energy Initiative. In Secretary of State for the Environment. São Paulo, 2002; p 9.

Goldschmidt, F., From Cellulose to Ethanol: Engineering Microorganisms to Produce Biofuel. In Institute of Biogeochemistry and Pollutant Dynamics, D. E. S., Ed. Zürich, 2008; p 17.

Hahn-Hägerdal, B.; Galbe, M.; Gorwa-Grauslund, M. F.; Lidén, G.; Zacchi, G., Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology* **2006**, *24*, 549-556.

Hang, C., Informações sobre o resíduo agrícola piolho de algodão, produzido por re-beneficiamento de sobras da industrialização do algodão, obtidas junto à empresa Hantex Resíduos Têxteis Ltda. In gilvanduarte@yahoo.com.br, Ed. Gaspar, 2008.

Heikinheimo, L. *Trichoderma reesie* cellulases in processing of cotton. Tampere University of Technology, Tietotie, 2002.

Hoffert, M. I.; Caldeira, K.; Benford, G.; Criswell, D. R.; Green, C.; Herzog, H.; Jain, A. K.; Kheshgi, H. S.; Lackner, K. S.; Lewis, J. S.; Lightfoot, H. D.; Manheimer, W.; Mankins, J. C.; Mauel, M. E.; Perkins, L. J.; Schlesinger, M. E.; Volk, T.; Wigley, T. M. L., Advanced Technology Paths to Global Climate Stability: Energy for a Greenhouse Planet. *Science* **2002**, *298*, 981-987.

Jayani, R. S.; Saxena, S.; Gupta, R., Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry* **2005**, *40*, 2931-2944.

Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S.; Tewari, R., Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology* **2001**, *77*, 215-227.

Kavitha, S.; Shyamala, H.; Muralikrishna, G.; Varadaraj, M. C.; Rati Rao, E., Starch and cell wall degrading enzymes from fungal organisms grown on cereal and millet brans. *European Food Research and Technology* **2005**, *220*, 560-564.

Kerem, Z.; Friesem, D.; Hadar, Y., Lignocellulose Degradation during Solid-State Fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **1992**, *58*, 1121-1127.

Kobayashi, T.; Abe, K.; Asai, K.; Gomi, K.; Juvvadi, P. R.; Kato, M.; Kitamoto, K.; Takeuchi, M.; Machida, M., Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2007**, *71*, 646-670.

Kronbauer, E. A. W.; Peralta, R. M.; Osaku, C. A.; Kadowaki, M. K., Xylanase production by *Aspergillus casielus* induced with different carbon sources. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos* **2007**, *25*, 207-216.

Kulkarni, N.; Shendye, A.; Rao, M., Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* **1999**, *23*, 411-456.

Kumar, R.; Singh, S.; Singh, O., Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2008**, *35*, 377-391.

Lee, J.-W.; Park, J.-Y.; Kwon, M.; Choi, I.-G., Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2009**, *107*, 33-37.

Lucena-Neto, S. A.; Filho, E. X. F., Purification and characterization of a new Xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *Brazilian Journal of Microbiology* **2004**, *35*, 86-90.

Lynd, L. R.; Zyl, W. H. v.; McBride, J. E.; Laser, M., Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology* **2005**, *16*, 577-583.

Machida, M.; Asai, K.; Sano, M.; Tanaka, T.; Kumagai, T.; Terai, G.; Kusumoto, K.-I.; Arima, T.; Akita, O.; Kashiwagi, Y.; Abe, K.; Gomi, K.; Horiuchi, H.; Kitamoto, K.; Kobayashi, T.; Takeuchi, M.; Denning, D. W.; Galagan, J. E.; Nierman, W. C.; Yu, J.; Archer, D. B.; Bennett, J. W.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T. E.; Fedorova, N. D.; Gotoh, O.; Horikawa, H.; Hosoyama, A.; Ichinomiya, M.; Igarashi, R.; Iwashita, K.; Juvvadi, P. R.; Kato, M.; Kato, Y.; Kin, T.; Kokubun, A.; Maeda, H.; Maeyama, N.; Maruyama, J.-i.; Nagasaki, H.; Nakajima, T.; Oda, K.; Okada, K.; Paulsen, I.; Sakamoto, K.; Sawano, T.; Takahashi, M.; Takase, K.; Terabayashi, Y.; Wortman, J. R.; Yamada, O.; Yamagata, Y.; Anazawa, H.; Hata, Y.; Koide, Y.; Komori, T.; Koyama, Y.; Minetoki, T.; Suharnan, S.; Tanaka, A.; Isono, K.; Kuhara, S.; Ogasawara, N.; Kikuchi, H., Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* **2005**, *438*, 1157-1161.

Machida, M.; Yamada, O.; Gomi, K., Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the History of Koji Mold and Exploration of Its Future. *DNA Research* **2008**, *15*, 173-183.

Maeda, H.; Sano, M.; Maruyama, Y.; Tanno, T.; Akao, T.; Totsuka, Y.; Endo, M.; Sakurada, R.; Yamagata, Y.; Machida, M.; Akita, O.; Hasegawa, F.; Abe, K.; Gomi, K.; Nakajima, T.; Iguchi, Y., Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2004**, *65*, 74-83.

Maeda, H.; Yamagata, Y.; Abe, K.; Hasegawa, F.; Machida, M.; Ishioka, R.; Gomi, K.; Nakajima, T., Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2005**, *67*, 778-788.

Mane, V.; Patil, S.; Syed, A.; Baig, M., Bioconversion of low quality lignocellulosic agricultural waste into edible protein by *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) singer. *Journal of Zhejiang University - Science B* **2007**, *8*, 745-751.

Martínez, Á. T.; Speranza, M.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Ferreira, P.; Camarero, S.; Guillén, F.; Martínez, M. J.; Gutiérrez, A.; Río, J. C. d., Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* **2005**, *8*, 195-204.

McCann, M. C.; Carpita, N. C., Designing the deconstruction of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* **2008**, *11*, 314-320.

Medeiros, R. G.; Coelho, L. A.; Filho, E. X. F., Agricultural Residues as Source for Production of Hemicellulases from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology* **2008**, *2*, 30-33.

Medeiros, R. G.; Silva, L. P.; Azevedo, R. B.; Silva-Jr, F. G.; Filho, E. X. F., The use of atomic force microscopy as a tool to study the effect of a xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in kraft pulp bleaching. *Enzyme and Microbial Technology* **2007**, *40*, 723-731.

Medeiros, R. G.; Soffner, M. L. A. P.; Thomé, J. A.; Cacaís, A. O. G.; Estelles, R. S.; Salles, B. C.; Ferreira, H. M.; Neto, S. A. L.; Silva, F. G.; Ferreira-Filho, E. X., The production of hemicellulases by aerobic fungi on medium containing residues of banana plant as substrate. *Biotechnology Progress* **2000**, *16*, 522-524.

Michelin, M.; Polizeli, M. L. T. M.; Ruzene, D. S.; Silva, D. P.; Vicente, A. A.; Jorge, J. A.; Terenzi, H. F.; Teixeira, J. A. In *A new strategy for xylanase production using wheat straw autohydrolysis liquor as substrate*, Chempor 2008: proceedings of the International Chemical and Biological Engineering Conference, 10, Braga, 2008, Braga, September 4-6, 2008; FERREIRA, E. C.; MOTA, M., Eds. Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho: Braga, 2008; pp 2043-2048.

Milagres, A. M. F.; Magalhães, P. O.; Ferraz, A., Purification and properties of a xylanase from *Ceriporiopsis subvermispora* cultivated on *Pinus taeda*. *FEMS Microbiology Letters* **2005**, *253*, 267-272.

Mohana, S.; Shah, A.; Divecha, J.; Madamwar, D., Xylanase production by *Burkholderia* sp. DMAX strain under solid state fermentation using distillery spent wash. *Bioresource Technology* **2008**, *99*, 7553-7564.

Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y. Y.; Holtzapfle, M.; Ladisch, M., Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* **2005**, *96*, 673-686.

Murthy, P.; Naidu, M. Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. *Food Bioprocess Technology* **2010**, *5*, 657-664.

Neves, M. A. d.; Kimura, T.; Shimizu, N.; Nakajima, M., State of the Art and Future Trends of Bioethanol Production. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology* **2007**, *1*, 14.

Nikolov, T.; Bakalova, N.; Petrova, S.; Benadova, R.; Spasov, S.; Kolev, D., An effective method for bioconversion of delignified waste-cellulose fibers from the paper industry with a cellulase complex. *Bioresource Technology* **2000**, *71*, 1-4.

Oda, K.; Kakizono, D.; Yamada, O.; Iefuji, H.; Akita, O.; Iwashita, K., Proteomic Analysis of Extracellular Proteins from *Aspergillus oryzae* Grown under Submerged and Solid-State Culture Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **2006**, *72*, 3448-3457.

Öhgren, K.; Bengtsson, O.; Gorwa-Grauslund, M. F.; Galbe, M.; Hahn-Hägerdal, B.; Zacchi, G., Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology* **2006**, *126*, 488-498.

Oliveira, L. A.; Porto, A. L. F.; Tambourgi, E. B., Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresource Technology* **2006**, *97*, 862-867.

O'Neill, B. C.; Oppenheimer, M., Dangerous Climate Impacts and the Kyoto Protocol. *Science* **2002**, *296*, 1971-1972.

Panagiotou, G.; Olsson, L., Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. *Biotechnology and Bioengineering* **2007**, *96*, 250-258.

Percival Zhang, Y. H.; Himmel, M. E.; Mielenz, J. R., Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* **2006**, *24*, 452-481.

Rye, C. S.; Withers, S. G., Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, *4*, 573-580.

Saha, B. C., Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. *Process Biochemistry* **2004**, *39*, 1871-1876.

Salles, B. C.; Cunha, R. B.; Fontes, W.; Sousa, M. V.; Filho, E. X. F., Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *Journal of Biotechnology* **2000**, *81*, 199-204.

Salles, B. C.; Medeiros, R. G.; Bão, S. N.; Silva Jr, F. G.; Filho, E. X. F., Effect of cellulase-free xylanases from *Acrophialophora nainiana* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on eucalyptus kraft pulp. *Process Biochemistry* **2005**, *40*, 343-349.

Sánchez, C., Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* **2009**, *27*, 185-194.

Sánchez, Ó. J.; Cardona, C. A., Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology* **2008**, *99*, 5270-5295.

Schnitzhofer, W.; Weber, H. J.; Vrsanská, M.; Biely, P.; Cavaco-Paulo, A.; Guebitz, G. M., Purification and mechanistic characterisation of two polygalacturonases from *Sclerotium rolfsii*. *Enzyme and Microbial Technology* **2007**, *40*, 1739-1747.

Silva, G., Aproveitamento biotecnológico de resíduos agroindustriais na produção de glucoamilase In FURB, U. R. B.-. Ed. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Blumenau, 2006.

Siqueira, F. G.; Filho, E. X. F., Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **2010**, *7*, 54-60.

Siqueira, F. G.; Siqueira, E. G.; Jaramillo, P. M. D.; Silveira, M. H. L.; Andreus, J.; Couto, F. A.; Batista, L. R.; Filho, E. X. F., The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2010**, *64*, 20-26a.

Siqueira, F. G.; Siqueira, A. G.; Siqueira, E. G.; Carvalho, M.; Peretti, B.; Jaramillo, P. M. D.; Teixeira, R.; Dias, E.; Félix, C. R.; Filho, E. X. F., Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues. *Biodegradation* **2010**, *21*, 815-824b.

Stutzenberger, F. J.; Bodine, A. B., Xylanase production by *Thermomonospora curvata*. *Journal of Applied Microbiology* **1992**, *72*, 504-511.

Subramaniyan, S.; Prema, P., Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application. *Critical Reviews in Biotechnology* **2002**, *22*, 33-64.

Taherzadeh, M. J.; Karimi, K., Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources* **2007**, *2*, 707-738.

Takao, M.; Akiyama, K.; Sakai, T., Purification and Characterization of Thermostable Endo-1,5- α -L-Arabinase from a Strain of *Bacillus thermodenitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology* **2002**, *68*, 1639-1646.

te Biesebeke, R. Molecular analysis and improvement of protein production by *Aspergillus oryzae* grown on solid substrates. Wageningen University, Wageningen, 2005.

Turner, P.; Mamo, G.; Karlsson, E., Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories* **2007**, *6*, 1-23.

Uenojo, M.; Pastore, G. M., Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova* **2007**, *30*, 388-394.

Valencia, J. A.; Jiménez, A. V.; Siqueira, F. G.; Medina, K. D.; Franco, G. R.; Filho, E. X. F.; Siegfried, B.; Grossi-de-Sa, M. Holocellulase activity from *Schizophyllum commune* grown on bamboo: A comparison with different substrates. *Current Microbiology* **2011**, *63*, 581-587.

Vasella, A.; Davies, G. J.; Böhm, M., Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, *6*, 619-629.

Vieira, W. B.; Moreira, L. R. S.; Monteiro-Neto, A.; Filho, E. X. F., Production and characterization of an enzyme complex from a new strain of *Clostridium thermocellum* with emphasis on its xylanase activity. *Brazilian Journal of Microbiology* **2007**, *38*, 237-242.

Ward, O. P.; Qin, W. M.; Dhanjoon, J.; Ye, J.; Singh, A., Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. In *Advances in Applied Microbiology*, Allen I. Laskin, J. W. B. G. M. G.; Sima, S., Eds. Academic Press: 2005; Vol. Volume 58, pp 1-75.

Withers, S.; Williams, S., Glycoside hydrolases. In *CAZypedia*, Williams, S., Ed., available at URL <http://www.cazypedia.org/>, accessed 18 March 2013.

Yip, V. L. Y.; Thompson, J.; Withers, S. G., Mechanism of GlvA from *Bacillus subtilis*: A Detailed Kinetic Analysis of a 6-Phospho- α -glucosidase from Glycoside Hydrolase Family 4 \dagger . *Biochemistry* **2007**, *46*, 9840-9852.

Capítulo II

Material e Métodos

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos descritos abaixo foram realizados em triplicata. O desvio padrão dos experimentos para determinação de atividade enzimática foi menor do que 20% em comparação com valores médios.

2.2.1. Produtos químicos

Xilanas de aveia, de bétula e de faia, carboximetil-celulose “CM-celulose” (*carboxymethylcellulose sodium salt*), pectina (*pectin from citrus fruits*), manana (*galactomannan polysaccharide of locust bean gum from seeds of Ceratonia siliqua*), β -mercaptoetanol, N-bromosuccinimida (NBS), iodoacetamida, dietil-pirocarbonato (DEPC), 5,5-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)-carbodiimida (EDC), 2,2-ditiodipiridina, 1,4-diotreititol (DTT), L-cisteína and L-triptofano adquiridos junto a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Dodecil sulfato de sódio (*Sodium dodecyl sulfate*, SDS) adquirido junto a Gibco BRL Life Technologies (Japão). N,N,N',N'-tetrametilenediamino (TEMED) e vermelho congo adquiridos junto a ICN Biomedicals, Inc (Aurora, OH, USA). Celulose microcristalina “avicel” (*Microcrystalline cellulose*) foi adquirida junto a Fluka (Munich, Germany). Papel de filtro (*Filter paper*, FP), Whatman nº 1, resinas cromatográficas *Sephacryl S-100*, *Sephadex G-50*, *DEAE* e *Q-Sepharose Fast Flow*, marcador de massa molecular *Low Molecular Weight* (LMW) foram adquiridos junto a GE Healthcare Life Sciences (São Paulo, SP, Brazil). Todos outros químicos utilizados foram de grau analítico.

2.2.2. Resíduos da indústria têxtil

Os resíduos agroindustriais produzidos durante o re-beneficiamento do algodão, piolho de algodão sujo (PAS), piolho de algodão limpo (PAL) e pó de filtro (PF) (Figura 2.1), foram gentilmente fornecidos pela Hantex - Resíduos Têxteis Ltda., localizada no município de Gaspar, próximo ao pólo têxtil industrial de Blumenau/SC, Brasil.

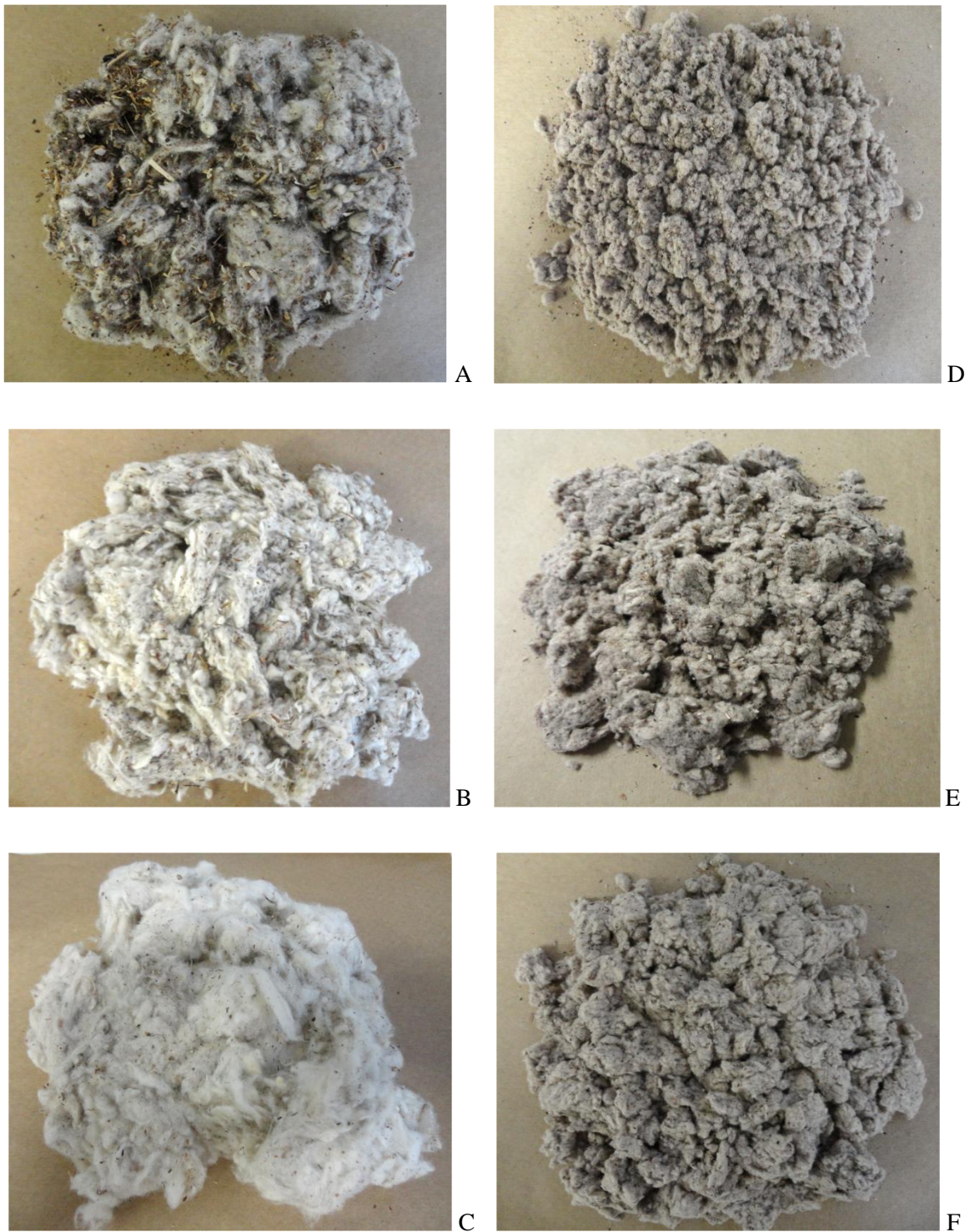


Figura 2.1. Amostras de resíduos obtidos junto à indústria têxtil produzidos durante o beneficiamento ou rebeneficiamento do algodão. PAS (A), PAL (B) e PF (C) representam os resíduos não-tratados; PASPT (D), PALPT (E) e PFPT (F) representam os resíduos pré-tratados, conforme descrito no item 2.2.3 deste Capítulo.

2.2.3. Pré-tratamento dos resíduos da indústria têxtil

Os resíduos PAS, PAL e PF não-tratados foram submetidos a uma etapa de pré-tratamento estabelecida pelo Laboratório de Enzimologia (UnB). Inicialmente, os resíduos foram autoclavados a 121°C por duas horas, seguido por lavagem exaustiva em água corrente, secagem a 65°C por 72 h e por fim, foram fragmentados por trituração em moinho de bancada. Posteriormente ao pré-tratamento, os resíduos, piolho de algodão sujo pré-tratado (PASPT), piolho de algodão limpo pré-tratado (PALPT) e pó de filtro pré-tratado (PFPT) (Figura 2.1) foram armazenados em sacos plásticos a temperatura ambiente e utilizados como biomassas lignocelulósicas nos cultivos submersos de *A. oryzae*.

2.2.4. Análise química composicional dos resíduos da indústria têxtil não-tratados

Os resíduos da indústria têxtil não-tratados foram analisados quanto à composição química pelo Laboratório de Produtos Vegetais do Departamento de Ciência dos Alimentos e no Laboratório de Análise Foliar do Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, Brasil.

Os três resíduos foram submetidos à secagem a 60°C por 48 h, triturados, embalados em sacos plásticos de polietileno e armazenados a temperatura de 20 a 25°C. As análises de umidade e matéria seca foram feitas com os substratos sem tratamento prévio. O teor de proteína bruta ou proteína total foi determinado pelo método micro Kjeldahl, conforme estabelecido pela AOAC (1995). O valor de extrato etéreo (gordura total) foi determinado com éter etílico utilizando instrumento de Soxhlet (AOAC, 1995). O teor de cinzas foi determinado pelo método gravimétrico baseado na determinação da perda de peso do material submetido a aquecimento a 550°C (AOAC, 1995). O teor de fibra bruta foi determinado segundo metodologia proposta pela AOAC (1995). Os teores de lignina, celulose e hemicelulose foram determinadas segundo método proposto por Van Soest (1965-1967) citado por Silva e Queiroz (2009). A porcentagem de carboidrato foi obtida pela diferença:

$$(\% \text{ carboidrato}) = 100 - (\text{fibra bruta} + \text{gordura} + \text{cinzas} + \text{proteína total})$$

2.2.5. Origem e preparo das polpas de celulose

As polpas de celulose (Figura 2.2) obtidas a partir da mistura percentual de *Eucalyptus grandis* (40%), *E. saligna* (30%) e *E. urophylla* (30%), foram produzidas pela empresa Conpacel, localizada no município de Limeira/SP, Brasil, e gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Francides Gomes da Silva Júnior do Laboratório de Química, Celulose e Energia, Departamento de Ciências Florestais, ESALQ - Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, Brasil. Inicialmente, a polpa de celulose foi submetida ao processo industrial *Kraft*, logo após finalizadas as etapas de cozimento e lavagem, resultou no material designado polpa escura (PCE). Em seguida, o material submetido ao estágio de deslignificação com O₂ originou a polpa pré-branqueada ou deslignificada por O₂ (PCPB). Por fim, a polpa PCPB submetida ao processo final de branqueamento por reagentes clorados ou por adição de hipoclorito de sódio, resultou no material designado polpa branca (PCB).

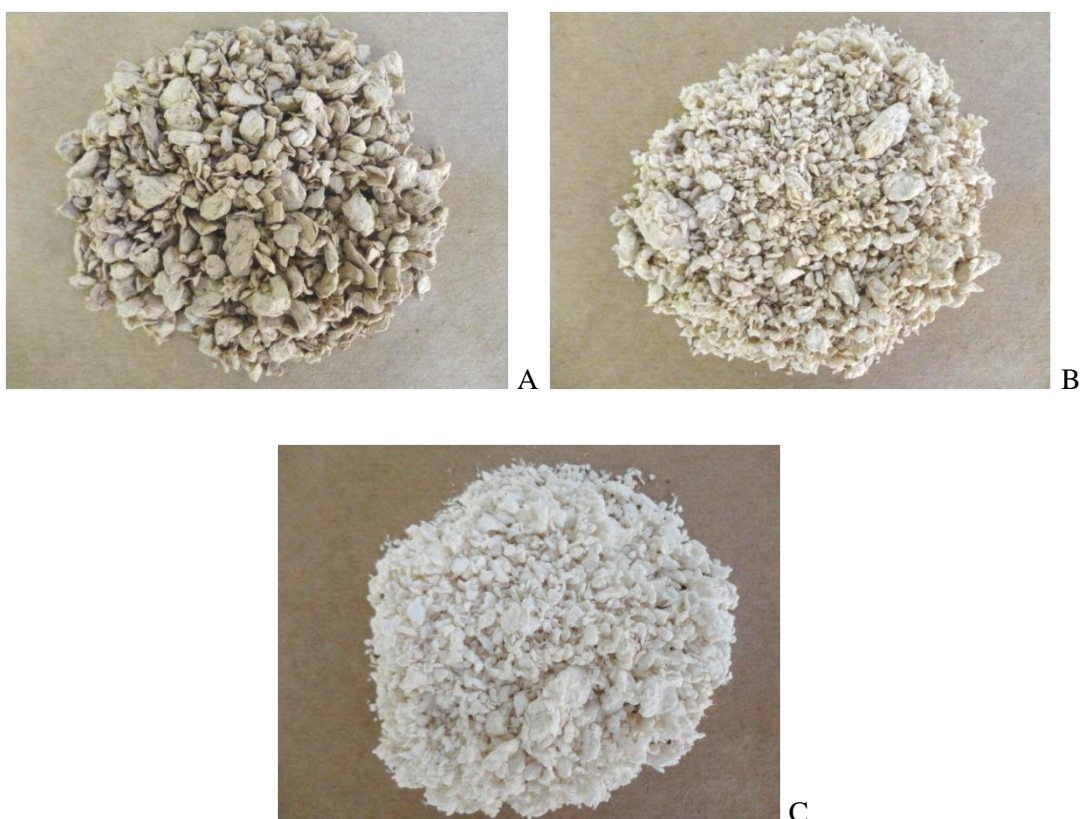


Figura 2.2. Amostras de polpas de celulose. PCE (A); PCPB (B); PCB (C).

2.2.6. Análise química composicional dos resíduos da indústria têxtil pré-tratados e das polpas de celulose

Os resíduos da indústria têxtil pré-tratados e as polpas de celulose (PCE, PCPB e PCB) foram analisados quanto à composição química conforme a metodologia descrita por Li et al. (2004) e Lin et al. (2010), conforme metodologia disponível no Anexo A. As análises foram realizadas pelo Laboratório de Química Tecnológica do Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde/GO sob supervisão do Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro.

2.2.7. Origem do bagaço de cana-de-açúcar

O resíduo bagaço de cana-de-açúcar não-tratado (BCNT) (Figura 2.3) foi produzido pela Usina da Pedra, localizada na zona rural do município de Serrana/SP, Brasil. O material foi obtido da Safra 2011 de cana-de-açúcar colhida mecanicamente sem queima prévia do canavial. O teor de umidade de equilíbrio em torno de 8,0 a 10% base úmida; a secagem do material foi realizada à temperatura de 25°C.

Outros dois resíduos (Figura 2.3), bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado por ácido sulfúrico (BCHA) ou bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor (BCEV) foram originados a partir do pré-tratamento de amostra de BCNT (Anexo B), com umidade em torno de 50%, produzido pela Usina Vale do Rosário, localizada na zona rural do município de Morro Agudo/SP, Brasil.

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

2.2.8. Análise química composicional dos bagaços BCNT e BCHA ou BCEV pré-tratados

A análise composicional do bagaço BCNT e BCHA ou BCEV pré-tratados (Anexo B) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Rocha et al. (1997) e Gouveia et al. (2009). As análises foram realizadas pelo CTBE do CNPEM, Campinas/SP, Brasil.



Figura 2.3. Amostras de bagaço de cana-de-açúcar. BCNT (A); BCHA (B); BCEV (C).

2.2.9. Isolamento, identificação e manutenção de *A. oryzae*

A. oryzae foi isolado da compostagem natural de resíduos da indústria têxtil e, posteriormente, identificado pelo Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, Brasil sob supervisão do Prof. Dr. Luís Roberto Batista.

A identificação da espécie foi confirmada por análise molecular (Anexo C) realizada pela pesquisadora Gláucia Emy Okida Midorikawa do Laboratório de Microbiologia: Interação Planta Praga do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília/DF, Brasil sob supervisão do Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller.

A manutenção do isolado foi realizada em meio sólido Batata-Dextrose-Ágar (BDA) contendo (m/v) (caldo de batata 2,0%, dextrose 1,0% e agar 2,0%), por meio de repiques realizados mensalmente (Figura 2.4). O isolado encontra-se depositado na Micoteca do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília/DF, Brasil.

Alternativamente, o isolado foi conservado em água salina 0,9% (m/v) ou óleo mineral ou glicerol 18% (v/v), em frascos de penicilina fechados com tampas emborrachadas e lacradas com anéis de alumínio; mantidos a temperatura ambiente. O isolado também foi mantido em glicerol 18% (v/v), em criotubos devidamente esterilizados para conservação em ultrafreezer a -80°C .

2.2.10. Cultivo de *A. oryzae* para o estabelecimento de condições básicas

O cultivo submerso de *A. oryzae* foi realizado em frascos do tipo *Erlenmeyer* de 500 mL, contendo 150 mL de meio líquido suplementado (m/v) [KH_2PO_4 0,7%, K_2HPO_4 0,2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1%, extrato de levedura 0,06%; pH 7,0 ajustado com solução de KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$], e 1,0% (m/v) de resíduos da indústria têxtil não-tratados ou pré-tratados como fontes de carbono lignocelulósicas (Medeiros et al., 2007). Alternativamente, o cultivo de *A. oryzae* foi realizado em meio líquido suplementado, contendo sulfato de amônio 0,16% (m/v) como fonte prioritária de nitrogênio, em substituição à massa correspondente ao extrato de levedura. Todos os meios foram autoclavados a 121°C por 25 min.

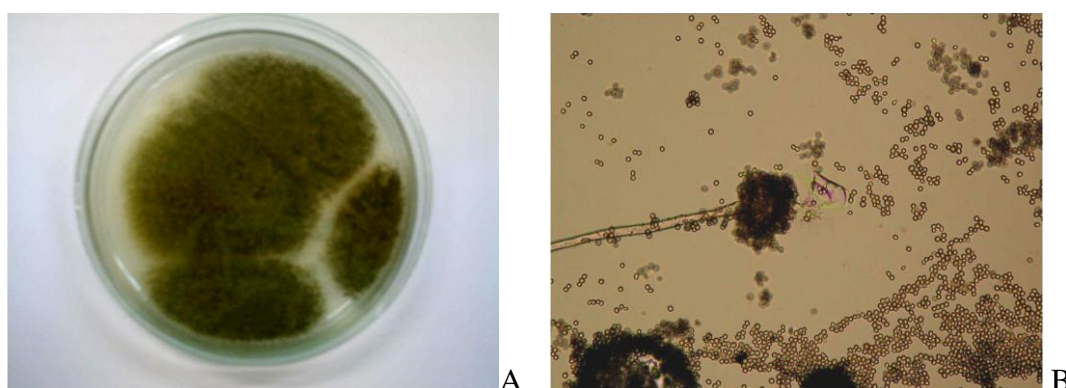


Figura 2.4. Perfil de uma cultura de *A. oryzae* em meio sólido (A); conídio e esporos de *A. oryzae* dispostos em lâmina microscópica (B), observada em microscopia de luz.

O inóculo foi obtido por meio da raspagem dos esporos em uma placa de petri com repique de aproximadamente 20 dias, os quais foram dispersos em 50 mL de solução autoclavada de NaCl 0,9% (m/v). A esta suspensão foi adicionada três mililitros do surfactante, *Tween* 80 1,0% (v/v). A contagem de esporos da suspensão foi realizada em câmara de *Newbauer* e microscópico ótico, contabilizando 10^8 esporos/mL (Siqueira et al., 2010). O inóculo foi adicionado aos meios líquidos adotando-se a relação de um mililitro de solução de esporos para cada 100 mL de meio de cultura. Os cultivos submersos foram incubados por 30 dias a

28°C e agitação constante de 120 rpm. A cada três dias de cultivo foram retiradas amostras de 1,5 mL a contar do tempo zero de adição do inoculo, as quais foram centrifugadas a 10.500 g por 10 min a 20°C (Hettich Zentrifugen Mikro 200R, Alemanha). O sobrenadante (pós-centrifugação) foi armazenado a -20°C e utilizado como fonte de enzimas em ensaios subsequentes.

2.2.11. Cultivo de *A. oryzae* para produção de enzimas

Os cultivos submersos de *A. oryzae* foram realizados em frascos *Erlenmeyers* de 2,0 L, contendo 500 mL de meio líquido suplementado, adicionado de PASPT 1,0% (m/v) como fonte de carbono. Baseado nas condições ideais estabelecidas no Capítulo III desta Tese, o meio líquido suplementado foi preparado com sulfato de amônio 0,16% como fonte prioritária de nitrogênio, em substituição ao extrato de levedura. O período de cultivo de 6 dias foi estabelecido como o momento de ideal para a produção de holocelulases. Ao final do cultivo, o meio líquido contendo a massa micelial foi centrifugado conforme mencionado acima e filtrado a vácuo em funil de *Büchner* com papel de filtro comum. Ao filtrado, denominado Extrato Bruto (EB), foi adicionada azida sódica 0,02% (m/v), antes de ser armazenado em câmara fria a 4°C e posteriormente utilizado como fonte de enzimas em ensaios subsequentes. Os valores das atividades de xilanase, pectinase, CM-celulase, mananase, FPase e avicelase apresentados em UI.mL⁻¹, foram determinados e utilizados como referência de similaridade entre as respectivas triplicatas de um mesmo cultivo.

2.2.12. Atividades enzimáticas padrões

Os ensaios enzimáticos para xilanase, pectinase, CM-celulase e mananase foram realizados pela reação de 1 volume de solução de enzimas (25 µL) contidas nos sobrenadantes pós-cultivos ou em frações de cromatografias, com 2 volumes de soluções de substratos (50 µL) a 1,0% (m/v) [xilana de aveia, pectina e carboximetil-celulose (CMC)] e a 0,5% (m/v) (manana), incubadas a 50°C por 30 min, conforme descrito por Filho et al. (1993). O ensaio para celulase total (FPase) foi realizado pela reação de uma tira de papel de filtro (Whatman nº. 1) de dimensões 1,0 x 3,0 cm, como substrato, com 75 µL de solução de enzimas, incubado a 50°C por 60 min, adaptado de Ghose (1987). O ensaio para avicelase foi realizado pela reação de 1 volume de solução de enzimas (100 µL), com 1 volume de suspensão homogeneizada de celulose microcristalina 1,0% (m/v) (100 µL), equilibrada em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 5,0, como substrato, incubado a 50°C por 120 min sob

agitação constante de 60 rpm. Após cada período de incubação, as reações foram interrompidas pela adição de 150 μL de solução do ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) (m/v) [ácido 3,5-dinitro-salicílico 1,0%, NaOH 16% e tartarato de sódio e potássio ($4\cdot\text{H}_2\text{O}$) 30%; diluídos em água destilada], e novamente incubadas em água fervente por 10 min. Em seguida, adicionou-se 0,75 mL de água destilada, seguido de breve agitação em *vortex*. A quantidade de açúcar redutor liberado em cada ensaio foi dosada pela leitura da absorbância a 540 nm (Miller, 1959), realizada em leitor de microplaca (SpectraMax M2^e, Molecular Devices Co., EUA). Curvas de calibração para D-xilose, ácido D-galacturônico, D-glicose e D-manose foram preparadas em concentrações que variaram de 0,2 a 1,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Uma unidade de atividade enzimática ($\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi definida como a quantidade de açúcares redutores liberados na unidade de tempo por mililitro ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcar redutor. $\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.2.13. Dosagem de proteína total

A concentração de proteína total dos sobrenadantes pós-cultivos ou de frações de cromatografias foi quantificada pelo método de Bradford (1976), utilizando o *Kit Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, EUA) composto pela solução *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* e solução aquosa de soroalbumina bovina (BSA) ($0,1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) como proteína de referência, de acordo com instruções do fabricante.

2.2.14. Dosagem de açúcar redutor total ou glicose

A concentração de açúcar redutor total ou específico foi obtida pela dosagem de açúcar redutor total pelo método de DNS ou pelo método de glicose oxidase utilizando o *Kit Glicemia Enzimático AA* (Wiener Laboratorios, Argentina). Para dosagem de açúcar redutor total utilizou-se 75 μL de solução de enzimas, juntamente a adição de 150 μL de solução de DNS. A reação foi incubada em água fervente por 10 min. Em seguida, adicionou-se 0,75 mL de água destilada, seguido de breve agitação em *vortex* e leitura da absorbância a 540 nm. Os valores das absorbâncias foram inseridos em gráfico contra a curva de calibração de DNS para glicose, e a concentração de açúcar redutor total foi expressa em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A concentração de glicose foi quantificada pelo *Kit Glicemia Enzimático* contendo a solução reagente [glicose oxidase (GOD), peroxidase (POD) e 4 aminofenazona (4-AF) em tampão fosfato de sódio pH 7,0 com hidroxibenzoato], conforme descrição do fabricante. A quantidade de glicose foi determinada pela reação de 10 μL de solução de enzimas com 1,0 mL de solução reagente, seguida por agitação em *vortex*. A reação foi incubada a temperatura

ambiente (25–28°C) por 25 min em repouso. Finalmente, a quantidade de glicose foi obtida pela leitura da absorbância a 505 nm. Uma solução de glicose padrão fornecida no *Kit* foi preparada de maneira semelhante às amostras e utilizada com referência; a concentração de açúcar redutor específico foi expressa também em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.2.15. Purificação de isoenzimas de xilanases e de uma CM-celulase produzidas por *A. oryzae*

Um volume de 110 mL de EB de *A. oryzae* foi submetido a ultrafiltração em membrana (suporte em polietersulfona) com as seguintes especificações: limite nominal de massa molecular (NMWL) de 10 kDa, 76 cm de diâmetro (Amicon Millipore Co., Bedford, MA, EUA), utilizando sistema de filtração (Amicon Millipore Co.).

O volume de 100 mL correspondendo ao ultrafiltrado, por apresentar cerca de 50% da atividade xilanolítica do EB, foi submetido a uma etapa de liofilização (liofilizador Liobrás, Brasil), por 48 h. O material liofilizado foi ressuspendido em tampão fosfato de sódio (PBS) $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, contendo NaCl $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e azida sódica 0,02% (m/v). A suspensão foi então centrifugada a 10.500 g , por 10 min a 4°C . A alíquota de 4,5 mL do sobrenadante foi primeiramente fracionada por cromatografia de filtração em gel em resina do tipo *Sephacryl S-100* (45 x 2,6 cm), previamente equilibrada em tampão PBS $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,0, contendo NaCl $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e azida sódica 0,02%. Nesta etapa, a enzima foi eluída sob fluxo constante de $20 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, e frações contendo o volume de 3,0 mL foram coletadas e analisadas quanto à absorbância a 280 nm. As frações com atividade xilanolítica foram isoladas e o volume reunido de 6,5 mL foi re-aplicado à cromatografia de filtração em gel em resina do tipo *Sephadex G-50*, em coluna (65 x 2,6 cm), previamente equilibrada no mesmo tampão descrito anteriormente. As frações foram eluídas sob fluxo de $20 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ e alíquotas de 3,0 mL contendo a atividade de xilanase foram coletadas e reunidas. Finalmente, um volume de 20 mL, obtido no fracionamento anterior, foi dialisado a 4°C por *overnight* contra tampão PBS $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,0, contendo azida sódica 0,02%. O volume dialisado foi submetido à cromatografia de troca iônica em resina do tipo *Q-Sepharose Fast Flow*, em coluna (4,0 x 2,6 cm), equilibrada em tampão PBS $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,0, contendo azida sódica 0,02%. As proteínas não aderidas à resina foram fracionadas em tampão de equilíbrio e logo após a resina foi eluída em tampão de equilíbrio contendo gradiente linear de NaCl ($0,0\text{--}1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). As frações foram eluídas sob fluxo de $30 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ e alíquotas de 3,0 mL contendo a atividade

xilanolítica foram coletadas, reunidas e o volume resultante identificado como Xyl-O1 purificada.

Um volume de 10 mL da fração concentrado, contendo 128,19 e 195,74% das atividades de xilanase e CM-celulase do EB de *A. oryzae*, respectivamente, foi centrifugada a 10.500 g por 10 min a 4°C. Um volume de 9,5 mL foi submetido à cromatografia de filtração em gel em resina do tipo *Sephadex G-50*, em coluna (65 x 2,6 cm), equilibrada em tampão PBS 50 mmol.L⁻¹, pH 7,0 contendo NaCl 25 mmol.L⁻¹ e azida sódica 0,02%. A amostra foi eluída sob fluxo de 20 mL.h⁻¹ e alíquotas de 5,0 mL foram coletadas e analisadas quanto à absorbância a 280 nm. As frações com atividade de xilanase e CM-celulase foram reunidas e identificadas como P1-SDG50. Frações contendo uma segunda atividade de xilanase foram também reunidas e identificadas como P2-SDG50. Anteriormente a aplicação das duas amostras à cromatografia de troca iônica, estas foram submetidas à diálise em membrana (suporte em celulose) com as seguintes especificações: NMWL de 6,5 kDa e 2,5 cm de largura (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), contra os tampões PBS 25 mmol.L⁻¹, pH 7,0 ou tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 8,2 ambos contendo azida sódica 0,02%. Inicialmente, a amostra P2-SDG50 dialisada contra tampão PBS foi submetida à cromatografia em troca iônica em resina do tipo *DEAE-Sepharose*, em coluna (6,0 x 2,6 cm), equilibrada em tampão PBS 25 mmol.L⁻¹, pH 7,0 contendo azida sódica 0,02%. As frações contendo a atividade de xilanase foram eluídas em tampão de equilíbrio e logo após a resina foi eluída em tampão de equilíbrio contendo gradiente linear de NaCl (0,0–1,0 mol.L⁻¹). As frações foram eluídas sob fluxo de 30 mL.h⁻¹ e alíquotas de 3,0 mL contendo a atividade xilanolítica foram reunidas e o volume resultante identificado como Xyl-O2 purificada. Em seguida, a amostra identificada como P1-SDG50 dialisada contra tampão tris-HCl foi submetida à cromatografia de troca iônica em resina do tipo *Q-Sepharose*, em coluna (6,0 x 2,6 cm), equilibrada em tampão tris-HCl 25 mmol.L⁻¹, pH 8,2 contendo azida sódica 0,02%. As frações contendo a atividade de xilanase e, posteriormente, CM-celulase foram eluídas em tampão de equilíbrio contendo gradiente linear de NaCl (0,0–1,0 mol.L⁻¹). As frações foram eluídas sob fluxo de 30 mL.h⁻¹ e alíquotas de 3,0 mL contendo a atividade de xilanase ou CM-celulase foram coletadas, reunidas e os volumes resultantes identificados como Xyl-O3/Xyl-O4 ou Cel-O1 parcialmente purificadas, respectivamente.

A eficiência das estratégias de purificação foi expressa por meio de dois parâmetros: rendimento (representado pela dosagem da atividade retida em cada etapa de purificação

como uma porcentagem da atividade do extrato bruto; a atividade do extrato bruto correspondeu a 100%); nível de purificação (parâmetro que indica o aumento em pureza, e é obtido dividindo a atividade específica, calculada após cada etapa de purificação, pela atividade específica do extrato inicial).

Todas as etapas cromatográficas foram realizadas à temperatura média de 25°C.

2.2.16. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

O perfil de bandas e as massas moleculares aparentes das amostras enzimáticas, anterior e posterior as etapas cromatográficas, foram analisados por SDS-PAGE, conforme descrito por Laemmli (1970). Eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida a 12% (v/v) foi realizada utilizando sistema Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) para mini-gel (83 x 73 x 0,75 mm) contendo SDS 0,1% (v/v) (Apêndice B). O gel concentrador foi preparado a 5,0% (v/v) contendo SDS 0,1% (Apêndice B). As amostras de proteínas (massa de proteína total utilizada foi de 1,0 a 20 µg) foram previamente submetidas à precipitação por solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (v/v) em acetona contendo DTT 20 mmol.L⁻¹ e incubadas por 1 h a 4°C, conforme descrito por GE-Healthcare (2004). Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 18.600 g por 15 min a 4°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas por duas ou três vezes em acetona PA refrigerada contendo DTT 20 mmol.L⁻¹ (1,0 mL/tubo), e centrifugadas conforme mencionado anteriormente. As amostras permaneceram à temperatura ambiente por 5 min, para secagem. Após este período, as amostras foram ressolubilizadas em 20 µL de água milli-Q, e a este volume foi adicionado de 10 µL de tampão de amostra [tris-HCl 125 mmol.L⁻¹, pH 6,8; SDS 2,0% (v/v); azul de bromo fenol 0,05% (m/v); glicerol 20% (v/v) e β-mercaptoetanol 5,0% (v/v)]. A mistura foi aquecida por 3 min a 100°C. A eletroforese foi realizada em tampão [tris-HCl 25 mmol.L⁻¹, glicina 192 mmol.L⁻¹ e SDS 0,1% (v/v), pH 8,3 após diluição], à temperatura ambiente, submetida a 25 mA constante por 50 min (Apêndice B). O marcador de massas moleculares *Low Molecular Weight* (LMW) contendo as proteínas fosforilase B (97 kDa), soroalbumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa) (GE Healthcare) foi utilizado como referência de migração para determinação das massas moleculares aparentes.

2.2.17. Coloração de proteínas por nitrato de prata

Após a separação das amostras em SDS-PAGE em condição padrão, as bandas protéicas foram reveladas utilizando o método descrito por Blum et al. (1987). O gel foi incubado sob agitação em solução fixadora (v/v) [metanol 40% e ácido acético 7%] por 1 h. Este volume foi reservado para a etapa final de coloração. Em seguida, o gel foi lavado por três vezes em solução etanol 50% (v/v) durante 20 min cada, sob agitação. Após as lavagens, o gel foi incubado por 1 min em solução tiosulfato de sódio 0,02% (m/v), lavado três vezes em água destilada durante 10 seg cada e incubado em solução de coloração [nitrato de prata 0,2% (m/v), formaldeído 0,03% (v/v) para 50 mL de água destilada] por 15 min sob agitação. Novamente, o gel foi lavado três vezes em água destilada durante 10 seg cada e submetido à solução reveladora [carbonato de sódio 6,0% (m/v), tiosulfato de sódio 0,004% (v/v), formaldeído 0,02% (v/v) para 50 mL de água destilada]. A reação foi interrompida com solução fixadora, após o surgimento das bandas. O gel foi armazenado em solução de ácido acético 1,0% (v/v), para ser foto-documentado, posteriormente em escâner de bancada.

2.2.18. Zimografia

As amostras enzimáticas, anterior e posterior às etapas cromatográficas, foram submetidas à técnica de zimografia em SDS-PAGE a 12% (v/v), co-polimerizado com solução de xilana de aveia 0,1% (v/v) (Sunna et al., 1997) ou de CM-celulose 0,1% (v/v) (Bischoff et al., 2006). As amostras de proteínas foram preparadas conforme descrito no item 2.2.17. Após a eletroforese, o gel foi incubado em solução de triton X-100 2,5% (v/v) por 1 h a temperatura de 28°C sob agitação. Em seguida, o gel foi incubado em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 6,0 por 5 min a temperatura de 85 a 90°C. A reação foi interrompida pela incubação do gel por *overnight* a 4°C. Posteriormente, o gel foi lavado com água destilada e submetido à solução de vermelho congo 0,1% (m/v) por 30 min a 28°C sob agitação. Por fim, o gel foi descorado em solução de NaCl 1,0 mol.L⁻¹ até o aparecimento das bandas translúcidas. As bandas translúcidas foram mais bem visualizadas pela adição de microvolumes de solução de ácido acético 1,0% (v/v), para ser em seguida, foto-documentadas em escâner de bancada.

2.2.19. Digestão trípica das bandas separadas por SDS-PAGE

A análise por espectrometria de massas foi realizada com o auxílio dos pesquisadores Diana Paola Gómez-Mendoza e Pedro Alves Martins do Laboratório de Bioquímica e

Química de Proteínas do Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília/DF, Brasil sob supervisão do Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart.

As bandas separadas em SDS-PAGE 12% e coradas por nitrato de prata foram submetidas ao processo de digestão enzimática. Inicialmente, as bandas selecionadas foram manualmente excisadas do gel e descoradas utilizando solução de ferricianeto de potássio 15 mmol.L^{-1} e tiosulfato de sódio 50 mmol.L^{-1} e, por fim, estas foram lavadas em água milli-Q até que o gel ficasse novamente transparentes (Gharahdaghi et al., 1999). As bandas foram reduzidas por 1 h a 56°C em tampão NH_4HCO_3 10 mmol.L^{-1} contendo DTT 10 mmol.L^{-1} e em seguida alquiladas por 1 h a temperatura ambiente em tampão NH_4HCO_3 10 mmol.L^{-1} contendo iodoacetamida 55 mmol.L^{-1} . Após esta etapa, as frações foram submetidas a três lavagens em tampão NH_4HCO_3 10 mmol.L^{-1} e em solução de acetonitrila 100% (v/v). Posteriormente, as bandas foram reidratadas em tampão de digestão [NH_4HCO_3 10 mmol.L^{-1} ; CaCl_2 $5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$; acetonitrila 10% (v/v)] gelado adicionado de tripsina $0,12 \text{ }\mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$ (Promega, Madison, WI, EUA) e incubadas a 40°C por 16 h. Por fim, os peptídeos foram extraídos com $20 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão NH_4HCO_3 10 mmol.L^{-1} em sonificador durante 20 min. A extração foi repetida por três vezes e os volumes resultantes foram reunidos para ser submetido em ensaio subsequente (Shevchenko et al., 1996).

2.2.20. Espectrometria de massa (MS) do tipo MALDI-TOF

Na análise por espectrometria de massa (MS), os peptídeos resultantes da digestão trípica de cada banda protéica foram acidificados com $1 \text{ }\mu\text{L}$ de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v). Em seguida, os peptídeos trípticos foram dessalinizados e concentrados em cromatografia de fase reversa em resina do tipo *Poros R2* adaptada a uma ponteira *Gel Loader*. Os peptídeos foram eluídos em solução de mistura de matrizes contendo ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) $2,5 \text{ }\mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$ (diluído em acetonitrila 30% e TFA 0,1%) e ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) $2,5 \text{ }\mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$ (diluído em acetonitrila 50% e TFA 0,1%); e aplicados sobre placa AnchorChip™ (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Depois de completada a secagem das amostras na placa, esta foi inserida no espectrômetro de massa Autoflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics). Anteriormente à geração dos espectros das amostras, fez-se uma calibração externa do aparelho utilizando uma mistura de peptídeos de massas conhecidas (*Peptide calibration standard*, Bruker Daltonics) plaqueada com a mesma mistura de matrizes (DHB e HCCA). Para cada amostra foram gerados espectros de massas em modo refletor positivo com o auxílio do programa FlexControl v. 2.4 (Bruker Daltonics). Em

seguida, os espectros foram editados e analisados no programa FlexAnalysis v. 2.4 (Bruker Daltonics), preservando o espectro original em outro computador de forma que, caso seja necessário, o espectro possa ser recuperado. Para cada espectro foram geradas listas de picos contendo as massas monoisotópicas de cada um dos peptídeos trípticos observados. Estas listas foram utilizadas na busca de massas semelhantes contra o banco de dados de seqüência de proteínas de fungos *online* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, EUA) utilizando o programa BioTools v. 3.0 (Bruker Daltonics) acoplado ao programa Mascot <<http://www.matrixscience.com/>> (Perkins et al., 1999). Como parâmetros de busca foram utilizados carbamidometilação da cisteína (alquilação com iodocetamida) como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. Estabeleceu-se como zero ou, no máximo, um os sítios de clivagem perdidos pela tripsina. Não foram impostas restrições de massas. As identificações consideradas significativas foram as que apresentaram *score* acima do limiar calculado pelo Mascot considerando o valor de $p < 0,05$.

2.2.21. Espectrometria de massas *in tandem* (MS/MS) do tipo MALDI-TOF/TOF

A fim de confirmar a identificação por MS, picos parentais (relativos ao espectro de MS) foram selecionados e fragmentados (MS/MS). O procedimento foi realizado no espectrômetro de massas Autoflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics) a partir da mesma amostra plaqueada para o MS. Para a fragmentação aumentou-se o ganho do detector e a potência do laser. Assim como no MS, os espectros obtidos foram processados no programa FlexAnalysis v. 2.4 (Bruker Daltonics) e utilizados na busca contra o banco de dados de seqüências de proteínas de fungos do NCBI auxiliado pelo programa BioTools v. 3.0 (Bruker Daltonics) acoplado ao programa Mascot <<http://www.matrixscience.com/>> (Perkins et al., 1999). Parâmetros de busca semelhantes na etapa de MS foram utilizados, acrescentando tolerância de erro de massa de 0,5 Da para fragmentos de peptídeos.

2.2.22. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática das amostras, anterior ou posterior as etapas cromatográficas, foi determinado por meio de ensaios enzimáticos padrões, conforme descrito no item 2.2.12, no intervalo de temperatura de incubação de 30 a 80°C, com acréscimos de 5 em 5°C. As demais etapas para a visualização da atividade enzimática residual foram realizadas conforme descrito no item 2.2.12. A atividade enzimática residual foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% de atividade enzimática

correspondeu à atividade no melhor valor de temperatura dentro do intervalo analisado. O perfil gráfico foi construído com os valores de atividade enzimática relativa *versus* o valor da temperatura.

2.2.23. Efeito do pH

O efeito do pH sobre a atividade enzimática das amostras, anterior ou posterior as etapas cromatográficas, foi determinado a 50°C por 30 minutos no intervalo de pH entre 3,0 a 9,0. Os ensaios foram realizados em três faixas tamponantes diferentes e concentração final de 50 mmol.L⁻¹, variando de 0,5 unidade no intervalo de pHs testados: acetato de sódio (3,0 a 6,0); fosfato de sódio (6,0 a 7,0) e tris-HCl (7,0 a 9,0). A força iônica dos tampões foi devidamente ajustada com NaCl quando necessário (Segel, 1993). O protocolo utilizado foi ajustado da seguinte maneira: 12,5 µL de amostras enzimáticas, 37,5 µL dos tampões descritos acima e 25 µL de solução de substratos a 1,0% (m/v). As demais etapas para a visualização da atividade enzimática residual foram realizadas conforme descrito no item 2.2.12. A atividade enzimática residual foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% de atividade enzimática correspondeu à atividade no melhor valor de pH dentro do intervalo analisado. O perfil gráfico foi construído com os valores de atividade enzimática relativa *versus* o valor de pH.

2.2.24. Determinação de parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) das amostras enzimáticas purificadas foram determinados para frações solúveis e insolúveis de xilanas de aveia ou bétula. O preparo das frações foi iniciado pela pesagem de 1 g de cada xilana. As massas separadamente foram adicionadas de 20 mL de solução de NaOH 1,0 mol.L⁻¹, seguida de agitação por 30 min a temperatura ambiente; na sequência adicionou-se 20 mL de solução de HCl 1,0 mol L⁻¹, seguida de agitação por 30 min; a este volume fez-se a adição de tampão acetato de sódio 100 mmol.L⁻¹, pH 5,0 para completar o volume final de 100 mL. As suspensões foram agitadas por mais 30 min a temperatura ambiente, e posteriormente, centrifugadas a 8.500 g por 15 min a 4°C resultando para cada suspensão nas duas frações, uma solúvel e outra insolúvel, conforme descrito por Filho et al. (1993). Estas frações foram dialisadas exaustivamente contra água destilada em membrana de diálise (suporte em celulose) com as seguintes especificações: NMWL de 12 kDa e 3,3 cm de largura (Sigma Chemical Co.); a 4°C, e por fim, foram liofilizadas e armazenadas a -20°C. O ensaio enzimático padrão foi realizado

conforme descrito no item 2.2.12, variando a concentração de substrato (frações solúvel e insolúvel de xilanas liofilizadas re-solubilizadas em água destilada, de 6,0 a 26,7 mg.mL⁻¹). A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima de reação (V_{max}) foram determinadas pelo método de regressão não linear *Enzfitter* (Leatherbarrow, 1999), construindo gráficos com os valores de atividade enzimática em UI.mL⁻¹ versus a concentração de substrato em mg.mL⁻¹. A velocidade de reação foi expressa em µmoles de xilose liberada na unidade de tempo por mililitro (UI.mL⁻¹).

2.2.25. Efeito de íons metálicos e reagentes ativadores/inibidores

O efeito de íons metálicos dos sais AgNO₃, KCl, NaCl, CoCl₂, CaCl₂, CuSO₄, FeSO₄, HgCl₂, MgSO₄.7H₂O, MgCl₂, MnCl₂, ZnSO₄, AlCl₃ e FeCl₃ sobre a atividade de amostras enzimáticas foi determinado, pré-incubando as amostras enzimáticas com as soluções aquosas dos respectivos íons para a concentração final de 1,0 ou 10 mmol.L⁻¹. O efeito do íon Mn⁺² também foi avaliado na concentração final de 20 mmol.L⁻¹.

O efeito dos reagentes ativadores/inibidores sobre a atividade de amostras enzimáticas foi determinado, pré-incubando as amostras enzimáticas com soluções aquosas ou etanólicas (caso o reagente não seja solúvel em água) dos respectivos reagentes para as seguintes concentrações finais: 1,0 mmol.L⁻¹ para N-bromosuccinimida (NBS); 2,0 mmol.L⁻¹ para 5,5-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) e 2,2-ditiodipiridina; 5,0 mmol.L⁻¹ para L-triptofano, iodoacetamida, dietil pirocarbonato (DEPC), 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)-carbodiimida (EDC) e β-mercaptoetanol; 20 mmol.L⁻¹ para 1,4-ditiotreitol (DTT), L-cisteína e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS).

O período de pré-incubação foi de 20 min à temperatura de 28°C. A atividade enzimática residual foi quantificada na temperatura e pH de melhor atividade de xilanase conforme o seguinte protocolo: 12,5 µL de amostras enzimáticas, 37,5 µL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 6,0 (força iônica devidamente ajustada com NaCl), e 25 µL de solução de substratos a 1,0% (m/v). As demais etapas para a quantificação da atividade enzimática residual foram realizadas conforme descrito no item 2.2.12. Os ensaios controle foram realizados pré-incubando as amostras enzimáticas com água destilada ou solução de álcool etílico 4,0% (v/v) na ausência dos íons metálicos ou reagentes ativadores/inibidores, nas mesmas condições descritas anteriormente. A atividade enzimática residual foi expressa como

atividade relativa, sendo que o valor de 100% de atividade enzimática correspondeu à atividade na ausência dos íons metálicos ou reagentes ativadores/inibidores, respectivamente.

2.2.26. Termoestabilidade

O ensaio para a determinação da termoestabilidade das amostras enzimáticas foi realizado nas temperaturas e pH de melhor atividade de xilanase. Um volume de 1,0 mL das amostras enzimáticas, anterior ou posterior às etapas cromatográficas foi incubado a 50 e 55°C em intervalos de hora em hora estendendo até 24 h. Alíquotas foram retiradas nos intervalos estabelecidos para a quantificação da atividade enzimática residual de acordo com o seguinte protocolo: 12,5 µL de amostras enzimáticas, 37,5 µL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 6,0 (força iônica devidamente ajustada com NaCl), e 25 µL de solução de substratos 1,0% (m/v). As demais etapas para a obtenção da atividade enzimática residual foram realizadas conforme descrito no item 2.2.12. A atividade enzimática residual foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% de atividade correspondeu à atividade realizada a partir de amostras retiradas no tempo zero de incubação. O perfil gráfico foi construído com os valores de atividade enzimática relativa *versus* o tempo de incubação.

2.2.27. Especificidade de substrato

O ensaio para a determinação da especificidade de substrato da enzima Xyl-O1 purificada foi realizado monitorando a quantidade de açúcar redutor liberado quando a amostra enzimática foi incubada com uma variedade de soluções de xilanas de aveia, de bétula e de faia, 4-O-metil-glicurono-D-xilano, CM-celulose, pectina e manana na concentração final de 6.67 mg·mL⁻¹. Os ensaios enzimáticos padrões foram realizados nas mesmas condições estabelecidas no item 2.2.12. Outros substratos, como papel de filtro e avicel, foram ensaiados como descrito no item 2.2.12.

Os ensaios envolvendo *p*-nitrofenilglicosídeos, para as atividades β-xilosidase, α-arabinofuranosidase, β-glicosidase e β-manosidase foram realizados quantificando o *p*-nitrofenol (PNP) liberado, conforme descrito por (Ximenes et al., 1996). Os ensaios foram realizados a 50°C em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 6,0 com [*p*-nitrofenil-β-D-xilosídeo (PNPX), *p*-nitrofenil-α-L-arabinofuranosídeo (PNPA), *p*-nitrofenil-β-D-glicosídeo (PNPG) e *p*-nitrofenil-β-D-manosídeo (PNPM), adquiridos junto à Sigma Chemical Co.] como substratos. A concentração final dos substratos na mistura de reação foi de 10 mmol.L⁻¹.

A amostra enzimática (50–100 μL) foi misturada com cada substrato em um volume final de 1,0 mL. A reação foi finalizada pela adição de 1,0 mL de solução de Na_2CO_3 1,0 mol.L^{-1} . O produto PNP liberado foi quantificado pela leitura da absorbância em 410 nm após 10 min de incubação. Uma unidade de atividade foi definida com a quantidade de enzima que catalisou a liberação de 1,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de PNP por minuto por mililitro a 50°C.

O ensaio para detecção de atividade de β -1,3-glicanase foi realizado pela mistura de 25 μL de amostra de Xyl-O1 purificada com 25 μL de solução de laminarina 1,0% (m/v) solubilizada em tampão acetato de sódio 50 mmol.L^{-1} , pH 6,0, como substrato. A mistura foi incubada a 45°C por 30 min, e a quantidade de açúcares redutores liberados foi determinada utilizando o método do DNS, conforme descrito por Noronha e Ulhoa (2000).

2.2.28. Hidrólise enzimática

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados com o auxílio dos pesquisadores Leonora Rios de Souza Moreira, Caio de Oliveira Gorgulho Silva, Pedro Henrique Siqueira e Marcela de Carvalho Campos do Laboratório de Enzimologia do Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília/DF, Brasil, sob supervisão do Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho. Entretanto, apenas os produtos de hidrólise enzimática foram monitorados no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica, Universidade de Brasília, Brasília/DF, Brasil, sob supervisão inicial da Profa. Dra. Lourdes Isabel Velho do Amaral.

O potencial de hidrólise de amostras enzimáticas foi determinado pela mistura de reação contendo 1 volume de amostra enzimática e 2 volumes de solução de substratos (10 mg.mL^{-1}): [xilana de bétula, frações solúvel ou insolúvel, preparadas conforme descrito no item 2.2.25]; bagaço de cana-de-açúcar (BCNT ou BCHA ou BCEV); polpas de celulose (PCE ou PCPB ou PCB); todos os substratos foram solubilizados em água destilada, para volumes finais de reação de 0,3 ou 3,0 mL. Para os ensaios envolvendo xilana de bétula frações solúvel e insolúvel foram incubadas por 6, 12, 18 e 24 h a 28°C e agitação de 120 rpm. Nos ensaios envolvendo bagaço de cana-de-açúcar, as amostras foram incubadas por 24, 48, 72 e 96 h, a 50°C e agitação de 150 rpm. E finalmente, ensaios envolvendo as polpas de celulose, as amostras foram incubadas no intervalo de 0 a 6 h e 8 h, a 28°C e agitação de 120 rpm.

Nos tempos estabelecidos, alíquotas foram removidas para as seguintes análises:

- 1) Alíquota de 75 μL , analisada quanto ao teor de açúcar redutor total pelo método do DNS, conforme descrito no item 2.2.12.
- 2) Alíquota de 10 μL , analisada quanto ao teor de glicose pelo método de glicose oxidase, conforme descrito no item 2.2.14.
- 3) Alíquota de 100 μL , analisada quanto à presença de pentoses livres pelo método de orcinol-férrico (Teste de Bial), conforme descrito por Chaplin (1994). Neste ensaio, uma alíquota de 100 μL das reações de hidrólise foi adicionada de 100 μL do reagente A [TCA 10% (m/v)] e a mistura foi submetida a banho fervente por 15 min. Em seguida, a mistura foi rapidamente resfriada à temperatura ambiente e na sequência foi adicionada de 600 μL do reagente B (m/v) (sulfato de amônio férrico 1,15% e orcinol 0,2%, diluído em solução de HCl 9,6 mol.L⁻¹); o volume final foi novamente colocado em banho fervente por 20 min e então resfriado à temperatura ambiente. A solução final do ensaio foi diluída 10x em água destilada e submetida às leituras nas absorvâncias de 660 e 520 nm. Uma curva de calibração para D-xilose foi preparada em concentrações variando de 0,2 a 1,2 mg.mL⁻¹.
- 4) Alíquota de 20 μL , analisada em diferentes comprimentos de onda (237, 254, 280 e 465 nm), conforme estabelecido por Medeiros et al. (2007). Neste ensaio, uma alíquota de 20 μL foi diluída 10x em água destilada e submetida à análise nos diferentes comprimentos de onda.
- 5) Inicialmente, as alíquotas removidas foram imediatamente colocadas em banho fervente por 10 min e armazenadas a -20°C. As amostras foram preparadas da seguinte maneira: alíquotas de 75 μL , removidas nos ensaios com xilana de bétula (frações solúvel e insolúvel) foram liofilizadas e posteriormente, re-solubilizadas em 500 μL de água milli-Q; alíquotas de 500 μL , removidas nos ensaios com bagaço de cana-de-açúcar e polpas de celulose foram utilizadas diretamente. Neste ensaio, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de troca aniônica e alta eficiência, acoplada a detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD), quanto à quantificação e identificação de xilooligossacarídeos liberados, conforme descrito por Ryan et al. (2003). Os produtos de hidrólise foram analisados em sistema *Dionex ICS 3000 DC Ion Chromatography* equipado com pré-coluna *CarboPac Guard* e coluna *CarboPac PA-100* (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA), operando sob fluxo de 0,250 mL

min⁻¹ e 28°C. Volumes de 10 µL foram injetados utilizando AS40 *auto sampler* (Dionex). Os produtos foram eluídos em solução de NaOH 100 mmol.L⁻¹ (Dionex) complementado pelo gradiente de acetato de sódio 0,0–500 mmol.L⁻¹ (Dionex), por 70 minutos. A coluna foi equilibrada por 15 min com solução de NaOH 100 mmol.L⁻¹ entre amostras sucessivas. Os xilooligossacarídeos foram identificados em detector eletroquímico ED40 (Dionex) e os dados analisados pelo programa Chromeleon 6.80 SR8 (Dionex). Uma mistura de xilooligossacarídeos (15 µg.mL⁻¹) com 2 a 6 unidades de D-xiloses polimerizadas (xilobiose, X2; xilotriose, X3; xilotetraose, X4; xilopentaose, X5; xilohexaose, X6; adquiridos junto à Megazyme Corporation., Wicklow, Ireland) e D-xilose (X1) foi utilizada como padrão para as análises quantitativas dos produtos liberados.

2.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC, Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. In 16 ed. ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, 1995.

Bischoff, K.; Rooney, A.; Li, X.-L.; Liu, S.; Hughes, S., Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters* **2006**, *28*, 1761-1765.

Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J., Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **1987**, *8*, 93-99.

Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 248-254.

Chaplin, M. F., Monosaccharides. In *Carbohydrate Analysis: a practical approach*, 2 ed.; Chaplin, M. F.; Kennedy, J. F., Eds. Oxford University Press: Oxford, 1994; pp 1-36.

Filho, E. X. F.; Puls, J.; Coughlan, M. P., Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **1993**, *11*, 171-180.

GE-Healthcare, Sample preparation. In *2-D Electrophoresis*, GE Healthcare: Munich, 2004; pp 19-42.

Gharahdaghi, F.; Weinberg, C. R.; Meagher, D. A.; Imai, B. S.; Mische, S. M., Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 601-605.

Ghose, T. K., Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* **1987**, *59*, 257-268.

Gouveia, E. R.; Nascimento, R. T.; Souto-Maior, A. M.; Rocha, G. J. M., Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova* **2009**, *32*, 1500-1503.

Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680-685.

Leatherbarrow, R. J., *Enzfitter Manual, a non-linear curve fitting program for Windows*. Biosoft: London, 1999.

Li, S.; Xu, S.; Liu, S.; Yang, C.; Lu, Q., Fast pyrolysis of biomass in free-fall reactor for hydrogen-rich gas. *Fuel Processing Technology* **2004**, *85*, 1201-1211.

Lin, L.; Yan, R.; Liu, Y.; Jiang, W., In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass wastes based on three major components: Cellulose, hemicellulose and lignin. *Bioresource Technology* **2010**, *101*, 8217-8223.

Medeiros, R. G.; Silva-Jr., F. G.; Bao, S. N.; Hanada, R.; Filho, E. X. F., Application of xylanases from Amazon Forest fungal species in bleaching of eucalyptus kraft pulps. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2007**, *50*, 231-238.

Miller, G. L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* **1959**, *31*, 426-428.

Noronha, E. F.; Ulhoa, C. J., Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters* **2000**, *183*, 119-123.

Perkins, D. N.; Pappin, D. J. C.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S., Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551-3567.

Rocha, G. J. M.; Silva, F. T.; Araújo, G. T.; Curvelo, A. A. S., A fast and accurate method for determining the cellulose and polyoses through HPLC. In *V Brazilian Symposium Proceedings on the Chemistry of Lignin and Other Wood Components*, Curitiba, 1997; *5*, pp 113-115.

Ryan, S. E.; Nolan, K.; Thompson, R.; Gubitz, G. M.; Savage, A. V.; Tuohy, M. G., Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. *Enzyme and Microbial Technology* **2003**, *33*, 775-785.

Segel, I. H., Effects of pH and temperature. In *Enzyme Kinetics - Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*, Wiley Classics Library ed.; John Wiley & Sons, INC.: New York, 1993; pp 885-942.

Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M., Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 850-858.

Silva, D. J.; Queiroz, A. C., *Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3^a ed.; Viosa, 2009; p 235.

Siqueira, F. G.; Siqueira, E. G.; Jaramillo, P. M. D.; Silveira, M. H. L.; Andreaus, J.; Couto, F. A.; Batista, L. R.; Filho, E. X. F., The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2010**, *64*, 20-26.

Sunna, A.; Puls, J.; Antranikian, G., Characterization of the xylanolytic enzyme system of the extreme thermophilic anaerobic bacteria *Thermotoga maritima*, *T. neapolitana*, and *T. thermarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **1997**, *118*, 453-461.

Ximenes, F. A.; Silveira, F. Q. P.; Filho, E. X. F., Production of β -Xylosidase Activity by *Trichoderma harzianum* Strains. *Current Microbiology* **1996**, *33*, 71-77.

Capítulo III

*Aplicação de resíduos da indústria têxtil no cultivo de *Aspergillus oryzae* e produção de holocelulases*

3.1. RESUMO

Os resíduos da indústria têxtil piolho de algodão sujo (PAS), piolho de algodão limpo (PAL) e pó de filtro (PF) são produzidos em grandes quantidades, porém são empregados apenas em atividades com baixo valor agregado. Portanto, a utilização destes resíduos como fonte de carbono no cultivo de *Aspergillus oryzae* constitui uma alternativa viável e de baixo custo para a produção de enzimas holocelulolíticas que degradem a celulose, a hemicelulose e a pectina. Este trabalho objetivou comparar o cultivo de *A. oryzae* em PAS, PAL e PF não-tratados (NT) ou pré-tratados (PT) por meio da dosagem de atividades enzimáticas padrões para holocelulases, bem como estabelecer condições básicas para a eficiente produção destas enzimas. *A. oryzae*, isolado da compostagem natural de resíduos têxteis, foi submetido a cultivos submersos em meio suplementado, contendo 1,0% de cada resíduo como fonte de carbono. Alternativamente, o meio de cultivo foi suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,16% como fonte de nitrogênio. Os cultivos isolados foram incubados a 28°C e 120 rpm de agitação constante, por 30 dias. A cada 3 dias, alíquotas de 1,5 mL foram retiradas, centrifugadas a 10.500 g por 10 minutos a 4°C e armazenadas a -20°C. Os ensaios enzimáticos para xilanase, pectinase, mananase, CM-celulase, FPase e avicelase foram realizados à 50°C com tempos de incubação de 30 a 120 min dependendo da atividade. O teor de açúcar redutor produzido foi quantificado a 540 nm pelo método de DNS. De maneira geral, os cultivos suplementados com resíduos NT ou PT promoveram a produção de hemicelulases, principalmente xilanase, com atividade específica superior a 10 UI.mg⁻¹, nos primeiros 3 dias de cultivo em PASPT. Entretanto, ao 6º dia de cultivo, as atividades de pectinase e mananase foram também relevantes. O estabelecimento do tempo de cultivo de 6 dias e a suplementação dos cultivos de *A. oryzae*, com resíduos da indústria têxtil PT e com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,16%, representaram condições básicas importantes para a produção de xilanase. Palavras-chave: Piolho de algodão sujo; atividade enzimática; degradação.

3.2. INTRODUÇÃO

Resíduos agrícolas e florestais, lixo orgânico municipal, resíduos originados no processamento industrial e safras agrícolas representam uma fonte alternativa de baixo custo de material holocelulósico que pode ser utilizado para obtenção de precursores químicos, biocombustíveis, alimentos e rações (Howard et al., 2003; Andraus et al., 2008). Os resíduos, piolho de algodão sujo (PAS), piolho de algodão limpo (PAL) e pó de filtro (PF), são produzidos durante o re-beneficiamento do algodão na indústria têxtil. Inicialmente, o PAS é produzido durante o processamento do algodão, logo após ser colhido no campo e transportado à indústria de fiação, onde é beneficiado em fios para as indústrias de tecelagem. As porções dos fardos de algodão impróprios para transformação em fios, representadas por pó de algodão, fibras quebradiças e grande quantidade de resíduos do algodoeiro (talos, hastes, folhas e caroço), são comercializadas com indústrias de re-beneficiamento. No re-beneficiamento são produzidas fibras mais limpas que serão re-comercializadas com as indústrias de fiação e outros ramos têxteis interessados em fibras de algodão de segunda qualidade, somado ao pó de filtro (Siqueira et al., 2010).

Os resíduos da indústria têxtil, semelhante a outras biomassas lignocelulósicas, são produzidos em grandes quantidades e normalmente depositados de maneira irregular em locais não-apropriados ou utilizados apenas em atividades com reduzido valor agregado. Segundo Sánchez (2009), o acúmulo de material lignocelulósico em grandes quantidades em locais não-apropriados resulta não apenas na deterioração ambiental, mas também na perda de material potencialmente valioso que pode ser utilizado na manufatura do papel, produção de biocombustíveis de segunda geração, compostagem, em ração animal e alimentação humana, entre outras.

De maneira geral, a biomassa lignocelulósica presente nestes resíduos contém 75% ou mais de celulose e hemicelulose que não podem ser facilmente convertidas a açúcares monoméricos simples devido a sua recalcitrância natural (Adsul et al., 2004). Neste sentido, uma alternativa para a utilização eficiente destes resíduos seria aplicá-los em processos biotecnológicos, como o estabelecimento de microrganismos, principalmente fungos filamentosos, em cultivos sólidos ou submersos e a subsequente produção de enzimas extracelulares capazes de atuar sinergicamente sobre os polissacarídeos que compõem a holocelulose encontrada no material lignocelulósico. Entretanto, é consenso atual que a inclusão de etapas de pré-tratamento do material lignocelulósico, antes de sua utilização como

fonte de carbono para microrganismos, resulta em maior digestibilidade da biomassa. Segundo McMillan (1994), o pré-tratamento do material lignocelulósico inclui fragmentação mecânica, hidratação em álcali, hidrólise ácida, explosão das fibras a vapor e exposição a fluidos supercríticos, todos atuando por mecanismos diversos sobre os componentes da biomassa lignocelulósica, tornando-a mais susceptível a hidrólise enzimática e conversão microbiana.

Dentre os fungos filamentosos com elevados títulos de produção de enzimas extracelulares, *Aspergillus oryzae* se destaca pelo seu potencial para a produção de holocelulases, principalmente quando cultivado em biomassa lignocelulósica, como em resíduos da indústria têxtil (Siqueira et al., 2010). Além disso, o uso milenar de *A. oryzae* na tradicional culinária japonesa, com especial atenção na produção de alimentos fermentados, como *sake* (vinho de arroz), *shoyu* (molho de soja) e *miso* (pasta de grãos de soja) (Kobayashi et al., 2007), somado à inclusão da espécie na lista de organismos *Generally Recognized as Safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA (Maeda et al., 2005), capacita ainda mais a utilização deste fungo na decomposição de materiais lignocelulósicos.

A exploração biotecnológica de resíduos como o PAS, PAL e PF, requer a atividade de enzimas que degradam principalmente a celulose, hemicelulose e pectina (Csiszár et al., 1998; Csiszár et al., 2001). Portanto, o sucesso de *A. oryzae* na degradação destas biomassas depende da produção de elevados títulos de holocelulases extracelulares como celulase, xilanase e pectinase, conforme determinado por Siqueira et al. (2010). Entretanto, a eficiência de *A. oryzae* na produção de holocelulases, principalmente xilanase, depende também do estabelecimento de condições básicas de cultivo, como melhor fonte de carbono a partir das diferentes biomassas disponíveis (Ghanem et al., 2000; Seyis e Aksoz, 2005; Chipeta et al., 2008), inclusão ou não de etapas de pré-tratamento das biomassas, fonte de nitrogênio disponível (Ghanem et al., 2000; Seyis e Aksoz, 2005), tempo de cultivo, temperatura (Yuan et al., 2005) e pH (Chipeta et al., 2008) de cultivo e velocidade de aeração adequada (Chipeta et al., 2008), que torne a atividade promissora e reprodutível.

Diante disto, este trabalho objetivou comparar o cultivo de *A. oryzae* nos resíduos PAS, PAL e PF não-tratados ou pré-tratados [piolho de algodão sujo pré-tratado (PASPT), piolho de algodão limpo pré-tratado (PALPT) e pó de filtro pré-tratado (PFPT)] pela dosagem de atividades enzimáticas padrões para holocelulases, bem como estabelecer condições básicas para a eficiente produção destas enzimas.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resíduos agrícolas, florestais, lixos orgânicos urbanos e safras agrícolas, principalmente cereais, têm despertado o interesse de pesquisadores espalhados por diversos centros biotecnológicos, sobre as potencialidades destes resíduos como fonte de biomassa lignocelulósica. Somado a isto, pressões energéticas e ambientais impulsionam a busca de alternativas de baixo custo para a produção de químicos e demais produtos derivados de processos biotecnológicos, que oferecerão vantagens econômicas, estratégicas e ambientais às populações pressionadas por uma convivência sustentável. Neste sentido, o aproveitamento de resíduos agroindustriais, como os produzidos no re-beneficiamento do algodão, para a indução de holocelulases por fungos filamentosos, torna-se uma alternativa viável na redução dos custos de produção de enzimas capazes de hidrolisar materiais lignocelulósicos.

3.3.1. Produção de holocelulases por *A. oryzae* cultivado em PAS ou PASPT

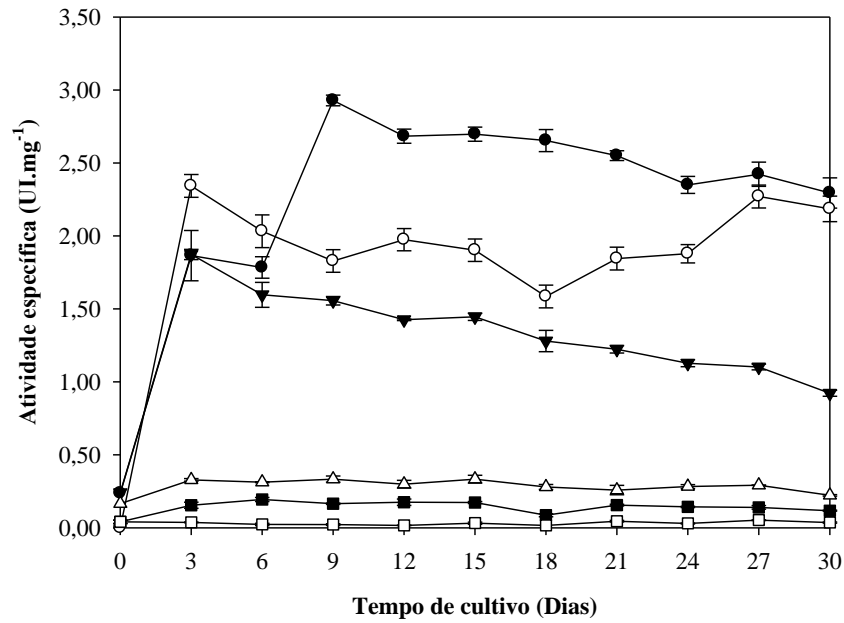
A capacidade de *A. oryzae* de produzir holocelulases quando crescido em PAS ou PASPT como fontes de carbono foi avaliada por meio da dosagem de atividade enzimática específica (UI.mg⁻¹) para xilanase, pectinase, mananase, CM-celulase, FPase e avicelase, conforme apresentado na Figura 3.1. Nesta figura é possível verificar que enzimas pertencentes ao grupo das hemicelulases foram produzidas prioritariamente, com destaque para xilanase. Atividades de pectinase e mananase foram detectadas nos três primeiros dias de cultivo em PAS, e os valores de atividade específica corresponderam a 2,4 e 1,9 UI.mg⁻¹, respectivamente (Figura 3.1). Apesar da atividade de xilanase ter sido detectada nos três primeiros dias de cultivo, este grupo de enzimas apresentou maior atividade específica no 9º dia, correspondendo a 2,9 UI.mg⁻¹ (Figura 3.1). Os resultados apresentados estão de acordo com Siqueira et al. (2010), que utilizaram os resíduos bagaço de cana de açúcar, engaço de bananeira e piolho de algodão sujo como indutores de holocelulases para fungos diversos, incluindo *A. oryzae* que se destacou na produção de xilanase quando cultivado em PAS não tratado.

A. oryzae quando cultivado em PASPT também produziu holocelulases do grupo das hemicelulases, principalmente xilanase (Figura 3.1). Entretanto, a atividade específica foi consideravelmente aumentada em cerca de seis vezes nos três primeiros dias de cultivo, quando comparada com o valor apresentado em PAS, e correspondeu a 11,1 UI.mg⁻¹. Em PASPT, a atividade específica de xilanase correspondeu a 13,6 UI.mg⁻¹ ao 9º dia de cultivo

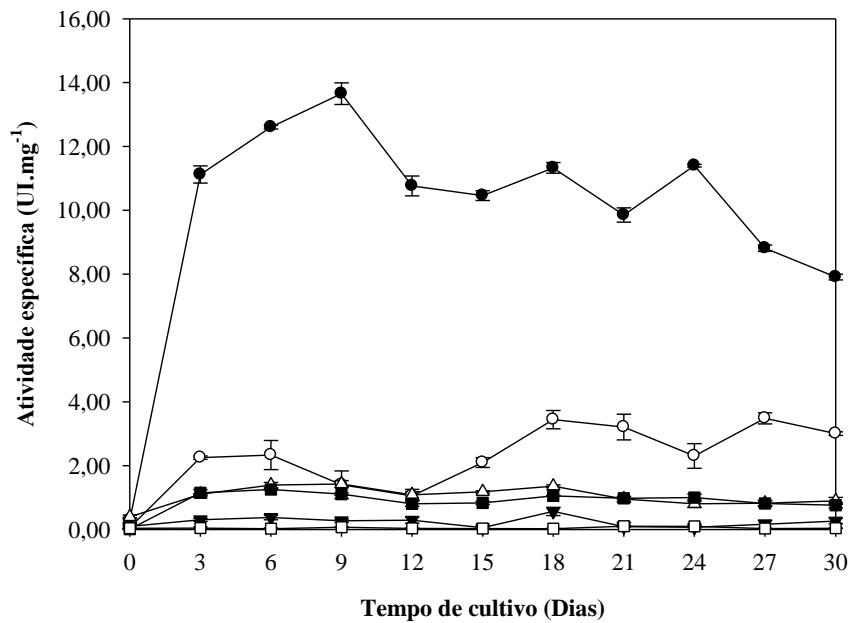
(Figura 3.1). Estes resultados também são corroborados por Adsul et al. (2004), que verificaram elevados títulos de atividade de xilanase para *Trichoderma viride* e *Penicillium janthinellum* quando cultivados em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como fonte de carbono.

No entanto, a mesma eficiência para produção de celulase não foi alcançada por *A. oryzae* quando cultivado em PAS ou PASPT. Durante o período de 30 dias de cultivo, apenas valores residuais de atividade específica para CM-celulase, FPase e avicelase foram observados (Figura 3.1). Siqueira et al. (2010) também verificaram valores residuais de atividade enzimática para o grupo das celulases. Os autores enfatizaram a produção de enzimas celulolíticas pelos fungos isolados da compostagem natural de resíduos têxteis, quando cultivados em resíduo de engaço de bananeira, do que com o próprio PAS como fonte de carbono. Em adição a isto, Adsul et al. (2004) relataram a baixa produção de enzimas FPase e CM-celulase por *Trichoderma viride* e *Penicillium janthinellum* quando cultivados em bagaço de cana-de-açúcar. Os autores sugeriram que a menor produção de celulase poderia estar relacionada à menor acessibilidade dos microrganismos à matriz holocelulósica do substrato não submetido a etapas de pré-tratamento.

A análise química composicional dos resíduos do re-beneficiamento do algodão não-tratados ou pré-tratados foi realizada como o objetivo de verificar possíveis alterações, principalmente, nos percentuais de holoceluloses apresentados para cada resíduo. O conhecimento sobre estes percentuais poderia auxiliar na interpretação dos perfis de produção de holocelulases apresentados na Figura 3.1. Conforme visualizado na Tabela 3.1, o percentual de fibras totais encontrado para os resíduos PAS, PAL e PF, correspondeu a 56,7, 69,1 e 86,8%, respectivamente. Estes percentuais foram confirmados pela simples observação visual de porções dos três resíduos, que caracteriza PAS como a fonte de carbono com maior presença de fragmentos vegetais da planta do algodão, enquanto PF apresenta um perfil com fibras de algodão fragmentadas. PAL apresenta perfil intermediário entre os dois resíduos citados anteriores (Tabela 3.1).



A



B

Figura 3.1. Curvas de indução de *A. oryzae* cultivado em PAS (A) ou PASPT (B) como fonte de carbono. Após inocular esporos de *A. oryzae* aos meios de cultivo, alíquotas de 1,5 mL foram retiradas em intervalos a cada 3 dias (tempo zero até 30 dias) e submetidas a ensaios enzimáticos para xilanase [—●—], pectinase [—○—], mananase [—▼—], CM-celulase [—△—], FPase [—■—] e avicelase [—□—], expressos em UI.mg⁻¹.

Os percentuais representando a porção holocelulose (parte da parede celular vegetal constituída por carboidratos totais, com exceção para os teores de lignina), dos resíduos não-tratados corresponderam a 76, 77,1 e 88,5% para PAS, PAL e PF, respectivamente (Tabela 3.1).

Quanto ao teor de estruturas poliméricas individualizadas (celulose, hemicelulose e lignina), o resíduo PAS apresentou percentuais de 65,7, 9,8 e 6,3%, respectivamente. Para PAL, os valores obtidos foram de 73, 4,1 e 4,8%, enquanto para PF os percentuais foram de 40,8; 47,7 e 4,5%, respectivamente (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Análise química composicional dos resíduos do re-beneficiamento de algodão não-tratados.

Parâmetros Analisados (%)	Resíduos Têxteis		
	PAS	PAL	PF
Fibras	56,7	69,1	86,8
Proteína bruta	6,9	6,2	5,0
Gorduras	1,8	1,1	1,5
Carboidratos solúveis	30,0	20,8	5,6
Celulose	65,7	73,0	40,8
Hemicelulose	9,8	4,1	47,7
Lignina	6,3	4,8	4,5
Extrativos	ND	ND	ND

Piolho de algodão sujo (PAS); Piolho de algodão limpo (PAL); Pó de filtro (PF); Parâmetro não-determinado (ND).

Dentre os três resíduos, PAS apresentou valor de 6,9% quanto ao teor de proteína total. Este valor é intermediário ao apresentado por outros dois resíduos, bagaço de cana-de-açúcar com 3,1% e engaço de bananeira (variedade prata) com 8,6%, os quais também são utilizados como indutores de holocelulases por colaboradores do Laboratório de Enzimologia (UnB). A partir do valor de 6,9%, é possível estimar o teor de nitrogênio [N] total deste material, que correspondeu a 1,10%. Este valor é menor do que o percentual de 1,37% apresentado pelo resíduo engaço de bananeira, considerado uma fonte de biomassa rica em nitrogênio (Siqueira et al., 2010). O cálculo deste percentual foi obtido pela divisão do teor de proteína total pelo fator N 6,25 utilizado na literatura bromatológica para conversão de proteína bruta em teor de nitrogênio total (Yeoh e Wee, 1994; Sluiter et al., 2010) O

nitrogênio representa um elemento químico essencial ao crescimento de todo ser vivo, principalmente microrganismos, uma vez que necessitam de uma relação carbono:nitrogênio adequada para seu estabelecimento e sucesso na degradação de material orgânico (Siqueira et al., 2010).

A estimativa do teor de carbono [C] para o resíduo PAS, quantificada pelo somatório dos teores de gorduras, carboidratos solúveis, celulose e hemicelulose, e dividindo este resultado pelo teor de nitrogênio total de PAS, revelou uma relação C:N de 97:1. Ainda de acordo com Siqueira et al. (2010), relações C:N para outros resíduos lignocelulósicos, como bagaço de cana-de-açúcar e engaço de bananeira corresponderam a 237:1 e 79:1, respectivamente.

Tabela 3.2. Análise química composicional específica dos resíduos do re-beneficiamento de algodão pré-tratados.

Parâmetros Analisados (%)	Resíduos Têxteis		
	PASPT	PALPT	PFPT
Celulose	62,2 ± 0,8	60,8 ± 0,1	68,1 ± 0,1
Hemicelulose	15,6 ± 0,8	22,9 ± 0,3	15,9 ± 1,2
Lignina	18,1 ± 0,9	11,6 ± 0,2	11,6 ± 0,8
Extrativos	4,1 ± 0,9	4,72 ± 0,01	4,4 ± 0,3

Piolho de algodão sujo pré-tratado (PASPT); Piolho de algodão limpo pré-tratado (PALPT); Pó de filtro pré-tratado (PFPT). Os dados foram gentilmente determinados pelo Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro do Laboratório de Laboratório de Química Tecnológica do Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Por sua vez, a análise química composicional dos resíduos PAS, PAL e PF pré-tratados, foi realizada conforme descrito no Capítulo 2 desta Tese. Os dados apresentados na Tabela 3.2 não revelaram alterações expressivas no teor de holocelulose em cada resíduo, após o pré-tratamento, indicando que mesmo depois de autoclavados a 121°C por 2 h, submetidos lavagem exaustiva, à secagem por 72 h e trituração subsequente, a fração holocelulose permaneceu inalterada. Os percentuais obtidos corresponderam a 77,8; 83,7 e 84%, para PASPT, PALPT e PFPT, respectivamente (Tabela 3.2). Em termos de componentes poliméricos individualizados, os percentuais obtidos para celulose mostraram maior homogeneidade e corresponderam a 62,2; 60,8 e 68,1%, para PASPT, PALPT e PFPT, respectivamente (Tabela 3.2). Para a fração hemicelulose, os percentuais corresponderam a 15,6; 22,9 e 15,9%. De maneira geral, estes percentuais em comparação aos apresentados na

Tabela 3.1, indicaram indícios de mobilização polimérica, como para os resíduos PALPT ou PFPT, cujos conteúdos de celulose ou hemicelulose foram reduzidos em 12,2 e 31,8%, respectivamente. No entanto, foram observados também indícios de maior exposição polimérica, nas frações de celulose no resíduo PFPT ou hemicelulose no resíduo PALPT, cujos percentuais foram aumentados em 27,3 e 18,8%, respectivamente. Os percentuais referentes à lignina também foram aumentados para os três resíduos em comparação aos dados apresentados na Tabela 3.1, indicando, novamente, a possibilidade de maior exposição polimérica (Tabela 3.2). O teor de extrativos encontrado para os três resíduos pré-tratados correspondeu a aproximadamente 4%.

Paralelo à determinação do perfil de holocelulases produzidas por *A. oryzae* quando cultivado em PAS ou PASPT, foram quantificados também o teor de açúcar redutor total pelo método de DNS e teor de glicose pela reação de glicose oxidase. A quantificação dos dois parâmetros indicaria uma tendência temporal para a produção de determinada enzima ou mistura de enzimas no período estabelecido para os cultivos. Conforme mencionado anteriormente, durante os cultivos de *A. oryzae* em PAS ou PASPT foram produzidas enzimas que degradam hemicelulases, principalmente xilanase. Neste sentido, na Tabela 3.3 estão apresentados os valores referentes à atividade específica de xilanase produzida em PAS ou PASPT, juntamente à dosagem de açúcar redutor liberado em cada cultivo.

A dosagem de açúcar redutor, em comparação com a atividade específica de xilanase no período de 30 dias dos cultivos, não revelou a tendência temporal esperada indicando um intervalo de tempo de maior eficiência de *A. oryzae* em produzir xilanase (Tabela 3.3). Entretanto, curiosamente, durante os 30 dias de cultivo não foi verificada alteração expressiva destes parâmetros em ambas as fontes de carbono, os quais permaneceram praticamente inalterados mesmo depois de confirmada a presença de xilanase ativa a partir do tempo zero (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Dosagem de açúcar redutor total e de glicose em comparação à atividade específica de xilanase, durante 30 dias de cultivo de *A. oryzae* em PAS ou PASPT.

Período de cultivo	PAS			PASPT		
	Xilanase (UI.mg ⁻¹)	AR-Total (mg.mL ⁻¹) ^a	Glicose (mg.mL ⁻¹) ^b	Xilanase (UI.mg ⁻¹)	AR-Total (mg.mL ⁻¹) ^a	Glicose (mg.mL ⁻¹) ^b
0	0,236 ± 0,000	0,260 ± 0,019	0,025 ± 0,004	0,290 ± 0,076	0,112 ± 0,011	0,025 ± 0,012
3	1,865 ± 0,172	0,311 ± 0,009	0,044 ± 0,004	11,122 ± 0,269	0,085 ± 0,007	0,028 ± 0,012
6	1,784 ± 0,074	0,261 ± 0,013	0,035 ± 0,002	12,607 ± 0,059	0,088 ± 0,004	0,022 ± 0,009
9	2,928 ± 0,036	0,264 ± 0,015	0,037 ± 0,004	13,653 ± 0,338	0,067 ± 0,005	0,009 ± 0,008
12	2,684 ± 0,048	0,220 ± 0,001	0,038 ± 0,005	10,764 ± 0,312	0,066 ± 0,004	0,024 ± 0,010
15	2,698 ± 0,048	0,249 ± 0,014	0,038 ± 0,005	10,462 ± 0,154	0,087 ± 0,010	0,020 ± 0,006
18	2,654 ± 0,076	0,224 ± 0,010	0,041 ± 0,007	11,327 ± 0,166	0,075 ± 0,004	0,022 ± 0,004
21	2,550 ± 0,034	0,239 ± 0,014	0,036 ± 0,002	9,854 ± 0,226	0,066 ± 0,006	0,025 ± 0,001
24	2,350 ± 0,059	0,242 ± 0,003	0,038 ± 0,002	11,398 ± 0,041	0,072 ± 0,009	0,028 ± 0,006
27	2,423 ± 0,083	0,235 ± 0,004	0,043 ± 0,000	8,815 ± 0,099	0,071 ± 0,003	0,010 ± 0,009
30	2,294 ± 0,104	0,232 ± 0,002	0,040 ± 0,004	7,911 ± 0,090	0,072 ± 0,004	0,025 ± 0,001

Açúcar redutor (AR); *a* – açúcar redutor total pelo método de DNS; *b* – dosagem de glicose pela reação de glicose oxidase.

Quando comparado os cultivos em PAS ou PASPT, quanto aos valores de açúcar redutor total e de glicose, foi observada uma redução de aproximadamente $\frac{2}{3}$ para açúcar redutor total e $\frac{1}{2}$ para o teor de glicose, respectivamente (Tabela 3.3). Esta redução possivelmente é resultado da remoção parcial de compostos solúveis (até o presente momento, não identificados) durante as etapas de autoclavagem e lavagem em água corrente, executada no pré-tratamento de PAS. Conforme observado na Figura 3.1 e Tabela 3.3, a atividade específica de xilanase foi aumentada quando *A. oryzae* foi cultivado em PASPT. Este resultado parece indicar que, o aumento da atividade específica de xilanase seja devido à remoção de componentes solúveis existentes em PAS que atuam como repressores no estabelecimento de *A. oryzae* e consequente produção de xilanase. Paralelo a isto, o aumento da atividade específica de xilanase pode estar relacionado à remoção de compostos solúveis originados da degradação da biomassa lignocelulósica, que foram “de novo” re-polimerizados. Este efeito possivelmente foi visualizado na Tabela 3.2, que mostrou um aumento no percentual de lignina no resíduo PASPT após o pré-tratamento. Segundo Hu e Ragauskas (2012), alguns grupos de pesquisa têm hipotetizado a re-polimerização de produtos de degradação de polissacarídeos (como por exemplo, 5-hidroximetil-furfural (HMF) e furfurais) com a lignina parcialmente degradada em pré-tratamento de biomassa por explosão

a vapor, formando um material semelhante à lignina referido como pseudo-lignina. Inversamente, a redução da atividade mananase específica em PASPT (Figura 3.1), em comparação à produzida em PAS, pode também estar vinculada à remoção de componentes solúveis, possivelmente capazes de induzirem *A. oryzae* com maior eficiência na produção desta enzima.

A dosagem da atividade específica de xilanase apresentada na Tabela 3.3, mostrou o aumento da eficiência de *A. oryzae* na produção de xilanase viabilizada pelo pré-tratamento do resíduo PAS. De fato, o obstáculo primário que impede o acesso e mobilização da fração lignocelulósica que constitui a biomassa vegetal é a ausência de tecnologias eficientes e de baixo custo capazes de romper a recalcitrância destes materiais (Lynd et al., 2005). Como mencionado por Howard et al. (2003), dos três principais componentes da biomassa lignocelulósica (celulose, hemicelulose e lignina), a lignina é o mais recalcitrante, devido a sua estrutura cristalina altamente organizada resultando em maior resistência à degradação. Entretanto, é crescente na literatura científica o surgimento de tentativas bem sucedidas que relatam a utilização da biomassa lignocelulósica na obtenção de produtos com valor agregado, como enzimas, químicos e biocombustíveis, principalmente após a aplicação de etapas de pré-tratamento. Segundo Mosier et al. (2005), o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é requerido para tornar a celulose mais acessível às enzimas que convertem carboidratos poliméricos em açúcares fermentáveis. Portanto, nossos resultados indicam a eficiência das etapas de pré-tratamento estabelecidas neste estudo, sobretudo quanto à produção de xilanase.

3.3.2. Condições basais de cultivo de *A. oryzae* em resíduos pré-tratados e produção de xilanase

A eficiência de produção de xilanase por *A. oryzae* cultivado em PASPT, utilizando meios líquidos suplementados ou não por extrato de levedura como fonte de nitrogênio, foi avaliada pela dosagem de atividade específica (Tabela 3.4).

Os resultados apresentados na Tabela 3.4 mostraram que o cultivo de *A. oryzae* em PASPT em presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,16% como única fonte de nitrogênio foi mais eficiente com relação à produção de xilanase, com um aumento médio durante os 30 dias de cultivo de cerca de duas vezes (Tabela 3.4). Ghanem et al. (2000), também verificaram um aumento na produção de xilanase por *Aspergillus terreus* de 1,7 vezes em relação ao controle, quando cultivado em presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Conforme observado, os valores mais expressivos de

atividade específica de xilanase foram registrados no 9º dia de cultivo, para as duas suplementações com nitrogênio, e corresponderam a 13,653 e 22,543 UI.mg⁻¹, respectivamente (Tabela 3.4). Estes resultados estão de acordo com Seyis e Aksoz (2005), que também registraram uma produção máxima de xilanase por *Trichoderma harzianum* 1073 D3, em presença de (NH₄)₂SO₄, 0,14%. Os autores mencionaram ainda que, os maiores títulos de xilanase foram obtidos em presença de (NH₄)₂SO₄, cuja concentração variou de 0,12 a 0,15%.

Tabela 3.4. Dosagem de atividade específica de xilanase durante o cultivo de *A. oryzae* em PASPT em meio líquido suplementado com extrato de levedura ou em presença de (NH₄)₂SO₄ 0,16% como fonte de nitrogênio.

Período de cultivo	Xilanase (UI.mg ⁻¹)	
	PASPT + extrato de levedura ^a	PASPT + (NH ₄) ₂ SO ₄ ^b
0	0,290 ± 0,076	0,646 ± 0,066
3	11,122 ± 0,269	14,669 ± 0,222
6	12,607 ± 0,059	21,452 ± 0,827
9	13,653 ± 0,338	22,543 ± 0,655
12	10,764 ± 0,312	18,440 ± 0,344
15	10,462 ± 0,154	20,029 ± 0,465
18	11,327 ± 0,166	19,799 ± 0,646
21	9,854 ± 0,226	19,914 ± 0,688
24	11,398 ± 0,041	21,806 ± 0,814
27	8,815 ± 0,099	19,490 ± 0,582
30	7,911 ± 0,090	19,976 ± 0,839

a – Cultivo suplementado com extrato de levedura 0,06% + (NH₄)₂SO₄ 0,1%; *b* – Cultivo suplementado apenas com (NH₄)₂SO₄ 0,16%.

A produção de xilanases durante o cultivo de *A. oryzae* também foi quantificada entre os três resíduos da indústria têxtil pré-tratados (PASPT, PALPT e PFPT) (Tabela 3.5).

De maneira geral, os cultivos de *A. oryzae* nos três resíduos revelaram expressivos valores de atividade específica de xilanase, indicando que *A. oryzae* promoveu maior degradação de biomassas lignocelulósicas pré-tratadas (Tabela 3.5). Os valores máximos de atividade específica de xilanase foram quantificados no 9º dia em PASPT, correspondendo a 22,543 UI.mg⁻¹, e no 6º dia de cultivo para PALPT e PFPT, correspondendo a 31,171 e 33,649 UI.mg⁻¹, respectivamente (Tabela 3.5). De acordo com estes resultados, o resíduo da indústria têxtil que apresentou melhor eficiência como fonte de carbono na produção de

xilanase em menor tempo de cultivo foi PFPT. Curiosamente, este resíduo anterior ao pré-tratamento apresentou um percentual de 47,7% referente à fração de hemicelulose, bem superior aos outros dois resíduos analisados, cujos percentuais foram de 9,8% para PAS e de 4,1% para PAL (Tabela 3.1). No entanto, a análise química composicional do resíduo PFPT revelou uma redução de 31,8% para a fração de hemicelulose (Tabela 3.2).

Tabela 3.5. Comparação entre os resíduos da indústria têxtil pré-tratados (PASPT, PALPT e PFPT) no utilizados no cultivo de *A. oryzae* em presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,16%, quanto à produção de xilanase.

Período de cultivo	Atividade de xilanase (UI mg ⁻¹)		
	PASPT ^a	PALPT ^b	PFPT ^c
0	0,646 ± 0,066	1,570 ± 0,142	1,108 ± 0,163
3	14,669 ± 0,222	16,039 ± 1,016	11,165 ± 1,286
6	21,452 ± 0,827	31,171 ± 0,119	33,649 ± 1,978
9	22,543 ± 0,655	27,520 ± 0,499	26,343 ± 0,445
12	18,440 ± 0,344	23,857 ± 0,607	23,269 ± 0,266
15	20,029 ± 0,465	25,431 ± 1,667	27,847 ± 0,611
18	19,799 ± 0,646	25,085 ± 0,401	20,989 ± 0,099
21	19,914 ± 0,688	27,612 ± 0,787	23,955 ± 0,708
24	21,806 ± 0,814	24,999 ± 0,253	19,833 ± 2,025
27	19,490 ± 0,582	28,762 ± 0,688	19,567 ± 0,207
30	19,976 ± 0,839	24,125 ± 0,322	23,233 ± 2,736

Piolho de algodão sujo pré-tratado (PASPT); Piolho de algodão limpo pré-tratado (PALPT); Pó de filtro pré-tratado (PFPT).

Entretanto, o percentual de hemicelulose não discrimina o teor de xilana disponível, o qual poderia ser utilizado para explicar o valor máximo de atividade específica de xilanase apresentado por PFPT, uma vez que este polímero foi um potente indutor para a xilanase produzida por *T. harzianum* 1073 D3 conforme demonstrado por (Seyis e Aksoz, 2005). Ainda em relação aos menores valores de atividade específica de xilanase obtidos durante o cultivo de *A. oryzae* em PASPT, em comparação aos outros resíduos pré-tratados, é possível que o maior percentual de lignina (18,1%) e o menor percentual de hemicelulose (15,6%) sejam os parâmetros que influenciaram na menor eficiência do resíduo PASPT. Por fim, o resíduo PALPT foi o que apresentou maior número de dias de cultivo com elevados títulos para a atividade específica de xilanase.

3.4. CONCLUSÕES

- 1) De maneira geral, os cultivos com resíduos NT ou PT promoveram a produção de hemicelulases, principalmente xilanase, com valor de atividade específica superior a 10 UI.mg^{-1} , nos primeiros 3 dias de cultivo em PASPT.
- 2) As atividades de pectinase e mananase foram também relevantes ao 6º dia de cultivo de *A. oryzae*.
- 3) A suplementação dos cultivos de *A. oryzae* com resíduos da indústria têxtil PT e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ representaram condições básicas importantes para a produção de xilanase.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adsul, M. G.; Ghule, J. E.; Singh, R.; Shaikh, H.; Bastawde, K. B.; Gokhale, D. V.; Varma, A. J., Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydrate Polymers* **2004**, *57*, 67-72.

Andreaus, J.; Filho, E. X. F.; Bon, E. P. S., Biotechnology of Holocellulose-Degrading Enzymes. In *Biocatalysis and Bioenergy*, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, 2008; pp 195-229.

Chipeta, Z.; du Preez, J.; Christopher, L., Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2008**, *35*, 587-594.

Csiszár, E.; Szakács, G.; Rusznák, I., Combining Traditional Cotton Scouring with Cellulase Enzymatic Treatment. *Textile Research Journal* **1998**, *68*, 163-167.

Csiszár, E.; Urbánszki, K.; Szakács, G., Biotreatment of desized cotton fabric by commercial cellulase and xylanase enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2001**, *11*, 1065-1072.

Ghanem, N. B.; Yusef, H. H.; Mahrouse, H. K., Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Bioresource Technology* **2000**, *73*, 113-121.

Howard, R. L.; Abotsi, E.; Jansen, R. E. L.; Howard, S., Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* **2003**, *2*, 602-619.

Hu, F.; Ragauskas, A., Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. *BioEnergy Research* **2012**, *5*, 1043-1066.

Kobayashi, T.; Abe, K.; Asai, K.; Gomi, K.; Juvvadi, P. R.; Kato, M.; Kitamoto, K.; Takeuchi, M.; Machida, M., Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2007**, *71*, 646-670.

Lynd, L. R.; Zyl, W. H. v.; McBride, J. E.; Laser, M., Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology* **2005**, *16*, 577-583.

Maeda, H.; Yamagata, Y.; Abe, K.; Hasegawa, F.; Machida, M.; Ishioka, R.; Gomi, K.; Nakajima, T., Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2005**, *67*, 778-788.

McMillan, J. D., Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, American Chemical Society: 1994; Vol. 566, pp 292-324.

Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y. Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M., Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* **2005**, *96*, 673-686.

Sánchez, C., Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* **2009**, *27*, 185-194.

Seyis, I.; Aksoz, N., Investigation of factors affecting xylanase activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2005**, *55*, 115-119.

Siqueira, F. G.; Siqueira, E. G.; Jaramillo, P. M. D.; Silveira, M. H. L.; Andraus, J.; Couto, F. A.; Batista, L. R.; Filho, E. X. F., The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2010**, *64*, 20-26.

Sluiter, J. B.; Ruiz, R. O.; Scarlata, C. J.; Sluiter, A. D.; Templeton, D. W., Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 9043-9053.

Yeoh, H.-H.; Wee, Y.-C., Leaf protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for 90 plant species. *Food Chemistry* **1994**, *49*, 245-250.

Yuan, Q.-p.; Wang, J.-d.; Zhang, H.; Qian, Z.-m., Effect of temperature shift on production of xylanase by *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* **2005**, *40*, 3255-3257.

Capítulo IV

*Uso de resíduo da indústria têxtil como fonte de carbono para a produção de uma xilanase de baixa massa molecular de *Aspergillus oryzae**

Adaptado de:

*Gilvan Caetano Duarte, Leonora Rios de Souza Moreira; Diana Paola Gómez-Mendoza; Félix Gonçalves Siqueira; Luís Roberto Batista; Lourdes Isabel Velho do Amaral; Carlos André Ornelas Ricart; Edivaldo Ximenes Ferreira Filho. Use of residual biomass from the textile industry as carbon source for production of a low-molecular-weight xylanase from *Aspergillus oryzae*. Applied Sciences 2012, 2, 754-772.*

4.1. RESUMO

O resíduo da indústria têxtil piolho de algodão sujo pré-tratado (PASPT) foi utilizado como fonte de carbono para o cultivo submerso de *Aspergillus oryzae* e a produção de xilanases. O extrato bruto (EB) filtrado foi fracionado por ultrafiltração seguida por três etapas cromatográficas, que resultaram no isolamento de uma xilanase (Xyl-O1) com massa molecular aparente de 21,5 kDa., determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) co-polimerizado com solução de xilana de aveia 0,1%. Xyl-O1 purificada apresentou maior eficiência catalítica a 50°C e pH 6,0. Os valores de K_m ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) utilizando fração solúvel de xilana de aveia ou de bétula corresponderam a 10,05 e 3,34, respectivamente. Xyl-O1 purificada foi mais estável em presença de ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB), 1,4-ditiotreitol (DTT), L-cisteína ou β -mercaptoetanol, que aumentaram a catálise em 40, 14, 40 ou 37%, respectivamente. A termoestabilidade da enzima também foi aumentada em pH 7,0, quando em presença de L-cisteína 20 mM, com a retenção de 100% da atividade inicial após 6 h de incubação a 50°C. A enzima catalisou o rompimento de ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ internas de substratos solúveis contendo resíduos de D-xilose, com eficiência máxima de 33% para a hidrólise de xilana de bétula, após 12 h de incubação a 28°C e agitação constante de 120 rpm. A identificação dos produtos de hidrólise por cromatografia de troca iônica em sistema de alta eficiência, acoplado à detecção amperométrica pulsada (CLAE-DAP) indicou a predominância dos produtos X2 a X6 durante as primeiras 12 h de incubação, somado ao acúmulo de xilooligômeros após a eluição do xilooligossacarídeo padrão X6. *A. oryzae* cultivado em PASPT produziu Xyl-O1 que foi purificada e sua caracterização enzimática revelou uma xilanase com mecanismo catalítico tipo-endo e versatilidade em hidrolisar substratos solúveis e insolúveis. Palavras-chave: Resíduos agroindustriais; hemicelulose; purificação de enzimas; xylanase; hidrólise.

4.2. INTRODUÇÃO

O aproveitamento da biomassa lignocelulósica que compõe os resíduos agroindustriais, tem assumido papel relevante dentro da comunidade científica mundial, uma vez que o uso eficiente destes materiais pode resultar em vantagens econômicas, estratégicas e ambientais.

A exploração biotecnológica de resíduos, como o piolho de algodão sujo (PAS), requer a ação de enzimas que degradem principalmente a celulose, hemicelulose e pectina (Csiszár et al., 1998; Csiszár et al., 2001). As enzimas que catalisam estas reações são comumente obtidas de microrganismos que produzem sistemas multienzimáticos capazes de atuarem de maneira sinérgica (Turner et al., 2007). A expressiva abundância e o baixo custo dos resíduos agroindustriais, utilizados na produção de xilanases, substancialmente contribuiriam para a redução do custo de produção e consequente aplicação destas enzimas em processos biotecnológicos (Murthy e Naidu, 2010).

β -xilanase (1,4- β -D-xilano xilanhidrolase, EC 3.2.1.8) refere-se a um importante grupo de endo-glicosil hidrolases que catalisam a quebra de ligações glicosídicas β (1-4) internas à xilana, um heteropolissacarídeo linear formado principalmente por unidades β -D-xilopiranosídicas (Polizeli et al., 2005), liberando fragmentos curtos de xilooligômeros (Salles et al., 2000). Os xilooligômeros, por sua vez, são sequencialmente hidrolisados em unidades de D-xilose por enzimas acessórias (de Vries e Visser, 2001), essenciais para a degradação completa da xilana, que é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, presente em vegetais superiores, angiospermas e gimnospermas (Cardoso e Filho, 2003). As xilanases de microrganismos são eficientes em inúmeras aplicações biotecnológicas e industriais, incluindo clarificação de sucos de frutas e vinhos, na produção de alimentos processados em combinação com celulasas, no melhoramento das propriedades nutricionais da silagem agrícola, de alimentos em grãos e rações para aves, na desengomagem de fibras vegetais e no biobranqueamento de papel (Murthy e Naidu, 2010).

Inúmeros estudos têm descrito a utilização de fungos filamentosos, principalmente do gênero *Aspergillus*, como eficientes produtores de enzimas que degradam a biomassa lignocelulósica. Dentre estes, *Aspergillus oryzae* se destaca por sua utilização milenar pela culinária oriental, na produção de alimentos fermentados e bebidas, como o *sake* (vinho de arroz), *shoyu* (molho de soja) e o *miso* (pasta de soja), e ainda como um excelente produtor de

enzimas industriais, como a α -amilase (Kimura et al., 1998; Gomi, 1999). Com ênfase à produção de enzimas industriais, Siqueira et al. (2010) relataram a expressiva produção de enzimas holocelulolíticas, principalmente xilanases, por *A. oryzae* cultivado em diferentes resíduos agroindustriais. Somado aos elevados títulos de produção de xilanases, semelhante a outros *Aspergillus*, relatos sobre a produção de xilanases múltiplas mostram a versatilidade de *A. oryzae* na degradação de distintos polímeros de xilana. Conforme relatado por Oda et al. (2006), a análise proteômica comparativa das proteínas extracelulares produzidas por *A. oryzae* RIB40, cultivado em meio submerso suplementado com farelo de trigo, evidenciou a presença de isoformas para uma xilanase designada XynG2 e pelo menos outras duas isoenzimas designadas XynF3 e XynG1.

Em função da importância biotecnológica das xilanases na degradação da fração hemicelulose da parede celular vegetal, este estudo teve como objetivo utilizar o resíduo piolho de algodão sujo pré-tratado (PASPT) como fonte de carbono para o cultivo de *A. oryzae* e subsequente produção e purificação de uma xilanase de baixa massa molecular. Algumas propriedades bioquímicas, como pH e temperatura ótimos, estabilidade térmica e perfis de hidrólise enzimática são comparados com propriedades de outras xilanases descritas na literatura. Este trabalho representa o primeiro relato sobre purificação e caracterização de uma xilanase produzida por *A. oryzae* crescido em resíduo da indústria têxtil.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Caracterização enzimática do Extrato Bruto (EB) de *A. oryzae* cultivado em PASPT

Na Tabela 4.1 é mostrado o perfil enzimático do EB de *A. oryzae* cultivado em PASPT por seis dias à temperatura de 28°C, conforme estabelecido no Capítulo 2 desta Tese. Nestas condições, os maiores valores de atividade enzimática foram determinados para xilanase e pectinase, e corresponderam a 0,488 e 0,258 UI.mL⁻¹, respectivamente. As atividades de mananase, CM-celulase e FPase corresponderam a 0,100 UI.mL⁻¹. E finalmente, o ensaio para avicelase revelou atividade enzimática residual, com valor próximo a zero (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Atividades enzimáticas do EB de *A. oryzae* crescido em PASPT por 6 dias a 28°C.

Atividades enzimáticas	UI.mL ⁻¹
Xilanase	0,488 ± 0,011
Pectinase	0,258 ± 0,048
Mananase	0,098 ± 0,006
CM-celulase	0,095 ± 0,004
FPase	0,081 ± 0,015
Avicelase	0,009 ± 0,001

Os resultados apresentados na Tabela 4.1 estão de acordo com o trabalho de Siqueira et al. (2010), que utilizaram os resíduos bagaço de cana-de-açúcar, engaço de bananeira e piolho de algodão sujo no cultivo de diversos fungos, incluindo *A. oryzae*, que se destacou na produção de holocelulases, principalmente xilanase. Outros autores também têm utilizado a biomassa lignocelulósica, contida em resíduos agroindustriais, para a produção de holocelulases a baixos custos. Dentre estes se destaca a produção de celulase e xilanase por *Penicillium janthinellum* e *Trichoderma viride* (Adsul et al., 2004), produção de xilanase por *Aspergillus terreus* e *A. niger* (Gawande e Kamat, 1999), *T. harzianum* (Isil e Nilufer, 2005), *A. oryzae* e *A. phoenicis* (Chipeta et al. 2005; Chipeta et al., 2008), *A. casielus* (Kronbauer et al., 2007). O uso da biomassa lignocelulósica para a produção de enzimas pode reduzir significativamente os custos de obtenção destes catalisadores, quando comparados aos custos de produção utilizando fontes de carbono industrializadas. Segundo Siqueira et al. (2010), os resíduos agroindustriais representam fontes de carbono de baixo custo para o crescimento de

microrganismos, incluindo fungos filamentosos, e conseqüentemente para a produção expressiva de hemicelulases.

O fato de *A. oryzae* ter se destacado na produção de xilanase pode estar relacionado à composição química do resíduo PASPT utilizado como fonte de carbono. Neste sentido, foi proposta a realização de análise química composicional do resíduo PASPT (resultados não apresentados) e comparar os resultados com as análises realizadas para o resíduo não-tratado. Em termos percentuais, não foram observadas alterações expressivas quanto à composição da fração holocelulose dos resíduos não e pré-tratado. Os percentuais encontrados foram de 75,5% para o resíduo não-tratado e 77,8% para o submetido ao pré-tratamento. Entretanto, em relação aos componentes individuais, houve um aumento no percentual de hemicelulose de 9,8% para 15,6% no resíduo pré-tratado. De maneira semelhante ao discutido no Capítulo 2 desta Tese, o maior percentual de hemicelulose pode indicar, por sua vez, um maior percentual de xilana, reconhecida por desempenhar um efeito indutor para xilanase (Seyis e Aksoz, 2005).

É importante ressaltar que, fragmentos vegetais da planta do algodoeiro, visíveis no resíduo não-tratado, foram bem mais homogeneizados com a fração fibrosa do resíduo, posteriormente à etapa de trituração ao final do pré-tratamento. Uma fonte de carbono mais homogênea pode resultar em uma maior disponibilidade de componentes da hemicelulose existente nestes fragmentos vegetais para o desenvolvimento de *A. oryzae*. Outro fator a se considerar, é que durante o pré-tratamento do resíduo não-tratado, podem ter sido removidos compostos que atuariam como possíveis inibidores do desenvolvimento de *A. oryzae* ou mesmo sobre as enzimas recém-produzidas.

4.3.2. Purificação de Xyl-O1

A enzima Xyl-O1 foi purificada após ultrafiltração em membrana PM-10, seguida por cromatografias de filtração em gel em resinas dos tipos *Sephacryl S-100* e *Sephadex G-50*, e por cromatografia de troca iônica em resina do tipo *Q-Sepharose*. A estratégia de purificação desenvolvida está apresentada na Figura 4.1.

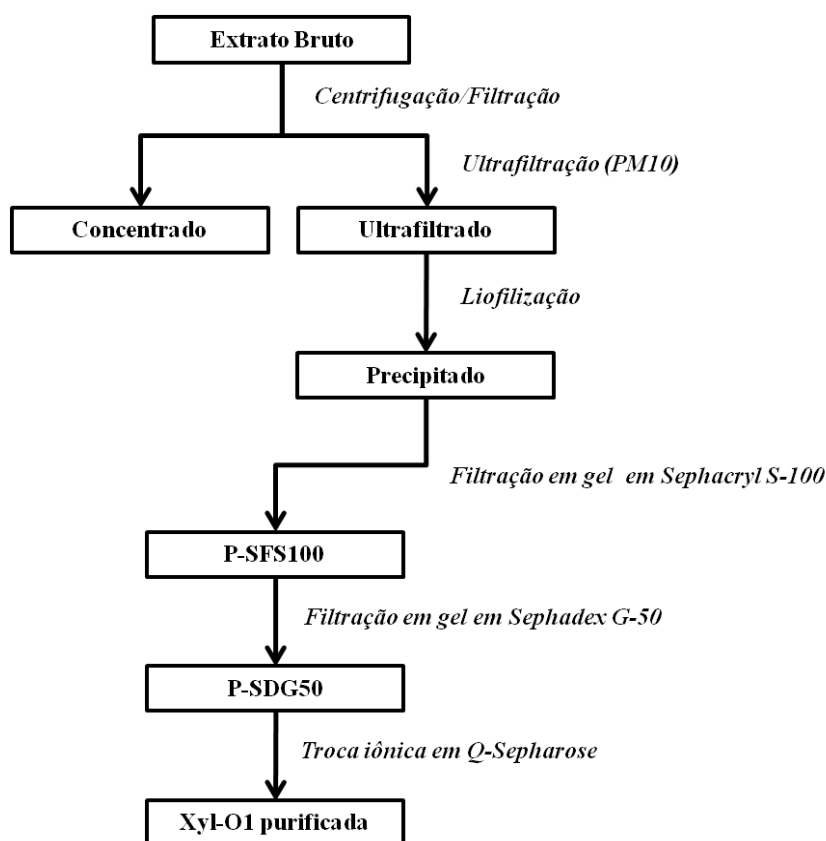


Figura 4.1. Estratégia utilizada na purificação da enzima Xyl-O1. P – representa as frações contendo atividade de xilanase, que foram reunidas pós-cromatografias.

Inicialmente, o EB de *A. oryzae* foi submetido à ultrafiltração em membrana PM-10, sendo obtidas duas frações: concentrado e ultrafiltrado. A fração concentrado foi adicionada de azida sódica 0,02% (m/v) e armazenada à 4°C para experimentos subsequentes. A fração ultrafiltrado, cujo valor de atividade de xilanase foi quantificada em 0,294 UI.mL⁻¹, foi utilizada nas sequências seguintes de fracionamento. Devido à baixa concentração de proteínas solúveis nesta fração, um volume de 100 mL de ultrafiltrado foi concentrado 10 vezes por liofilização. A partir de então, a amostra ressolubilizada em tampão PBS foi submetida à cromatografia de filtração em gel em resina do tipo *Sephacryl S-100*, cujo perfil cromatográfico indicou a eluição de dois picos principais com atividade de xilanase (Figura 4.2 A). Como a atividade de xilanase do pico 2 correspondeu a 3,5 vezes a do pico 1, somado aos maiores valores de absorbâncias em 280 nm, optou-se pela seleção do pico 2 para o fracionamento seguinte. As frações referentes ao pico 2, após serem reunidas, foram aplicadas à resina do tipo *Sephadex G-50* e a atividade de xilanase foi eluída em um pico único com reduzidos valores de absorbância em 280 nm (Figura 4.2 B). Ainda neste fracionamento, um

pico adicional com elevada absorvância em 280 nm foi eluído e apresentou uma substância colorida na cor marrom, ainda não identificada.

No fracionamento em resina do tipo *Q-Sepharose* (Figura 4.2 C), Xyl-O1 foi eluída em tampão de equilíbrio pH 7,0, anterior ao gradiente de NaCl. Diante deste resultado, o perfil de eluição de Xyl-O1 sugere a purificação de uma proteína básica de *A. oryzae*. Segundo Wong et al. (1988), existe uma relação entre valores de massa molecular e de pH isoelétrico (*pI*) quando xilanases de diferentes espécies são comparadas. Neste caso, xilanase de baixa massa molecular tende a ser básica, enquanto xilanase de alta massa molecular estão associadas a *pIs* mais ácidos. Uma exceção a esta regra acontece para xilanase de *Schizophyllum commune* (21 kDa.; *pI* 4,5) conforme mencionado por Kolenová et al. (2006); entretanto, esta relação ainda é conservada em fungos semelhantes a leveduras que produzem xilanases múltiplas, como em *Cryptococcus* sp (Nakanishi et al., 1984; Wong et al., 1988).

Como observado na Tabela 4.2, a atividade xilanólítica remanescente na porção ultrafiltrado após liofilização foi consideravelmente recuperada durante as etapas de fracionamentos em cromatografias de filtração em gel e de troca iônica. Ainda na Tabela 4.2, estão expressos os valores referentes à purificação e rendimento de Xyl-O1, os quais corresponderam a 27,1vezes e 16,7%, respectivamente. Estes percentuais estão de acordo com os encontrados em outros trabalhos envolvendo a purificação de xilanases, comumente caracterizados por uma baixa recuperação protéica (Poutanen, 1988; Cerri e Silva et al., 1999; Ximenes et al., 1999; Fang et al., 2008). Na estratégia de purificação deste trabalho, a ultrafiltração reteve parte da atividade de β -xilanase presente na porção concentrado. Conseqüentemente, a ausência de outras isoformas ou isoenzimas de xilanases na porção ultrafiltrado, capazes de atuarem sinergisticamente na hidrólise do substrato, pode ter subestimado os valores de purificação e rendimento durante as etapas finais de fracionamento, conforme mencionado por Filho et al. (1993).

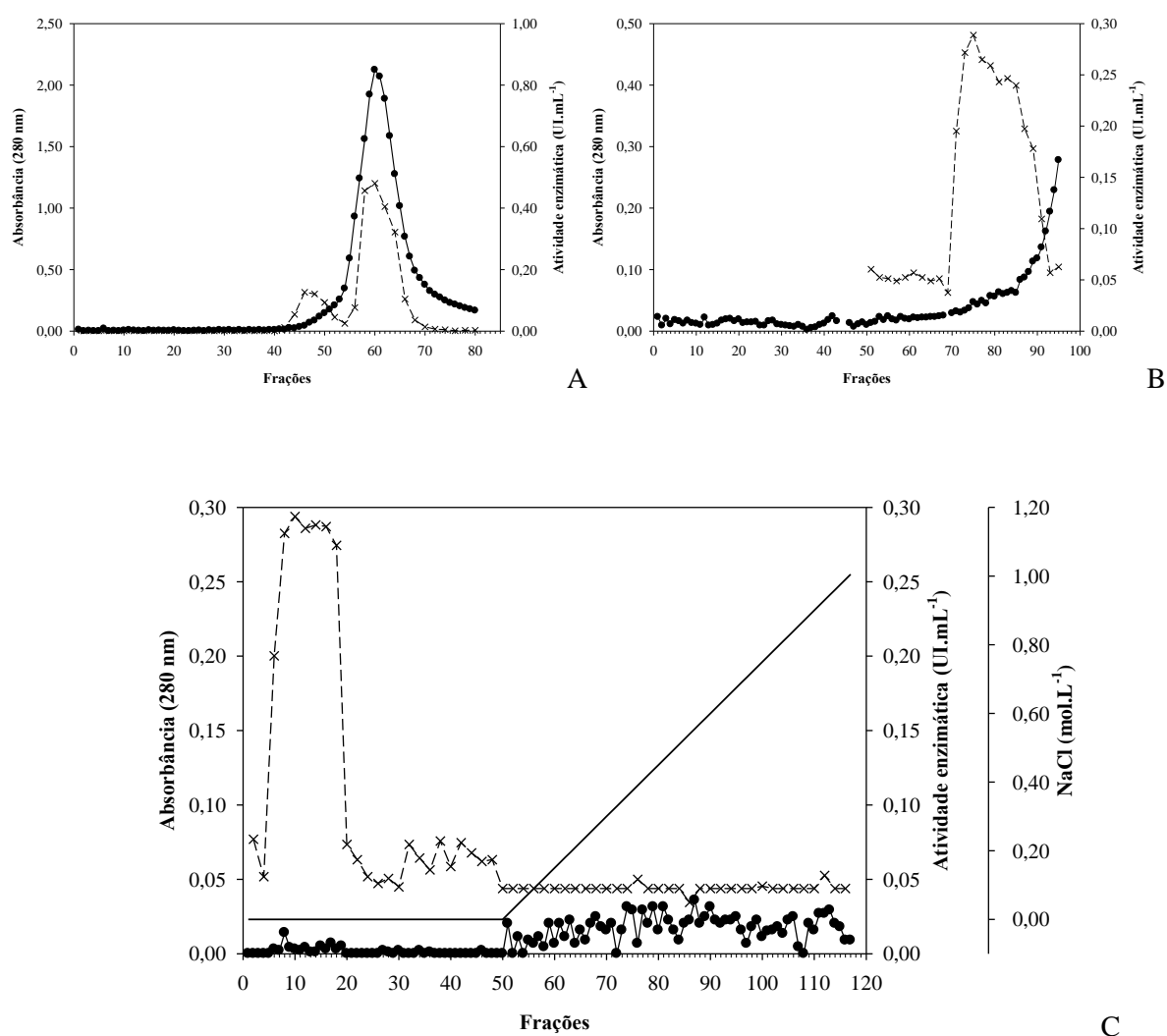


Figura 4.2. Perfis cromatográficos da purificação da enzima Xyl-O1 a partir da fração ultrafiltrado do EB de *A. oryzae* cultivado em PASPT como fonte de carbono. Cromatografia de filtração em gel em resina do tipo *Sephacryl S-100* (45 x 2,6 cm), equilibrada em tampão PBS 50 mmol.L⁻¹, pH 7,0 contendo NaCl 150 mmol.L⁻¹ e azida sódica 0,02% sob fluxo de 20 mL.h⁻¹; as frações 58-64 foram reunidas e o volume resultante foi identificado como P-SFS100 (A). Cromatografia de filtração em gel em resina do tipo *Sephadex G-50* (65 x 2,6 cm), equilibrada em tampão PBS 50 mmol.L⁻¹, pH 7,0 contendo NaCl 25 mmol.L⁻¹ e azida sódica 0,02%, sob fluxo de 20 mL.h⁻¹; as frações 71-84 foram reunidas e o volume resultante foi identificado como P-SDG50 (B). Cromatografia de troca iônica em resina do tipo *Q-Sepharose* (4,0 x 2,6 cm), equilibrada em tampão PBS 25 mmol.L⁻¹, pH 7,0 contendo azida sódica 0,02%, sob fluxo de 30 mL.h⁻¹; nesta etapa cromatográfica, a enzima Xyl-O1 foi eluída em tampão de equilíbrio nas frações 7-18 (C). Absorbância 280 nm [—●—]; atividade de xilanase [-x-]; gradiente de NaCl [———]. Detalhes experimentais estão disponíveis no texto.

A estratégia de fracionamento apresentada neste trabalho, começando pela concentração de proteínas por liofilização, resultou em maiores valores de purificação e rendimento comparados a metodologia iniciada por precipitação com sulfato de amônio (resultados não apresentados). No entanto, com esta estratégia, a atividade de xilanase total de 29,400 UI da fração ultrafiltrado foi reduzida para 1,647 UI após a etapa de liofilização. Uma hipótese inicial para explicar esta redução, diz respeito à desnaturação das enzimas com atividade de xilanase pela própria liofilização. A concentração de amostras protéicas por liofilização retiraria as moléculas de água de solvatação que envolvem estas amostras, resultando em uma perda total ou parcial das propriedades nativas destas enzimas. É relevante mencionar também que o processo se estendeu por 48 horas. Outro ponto a ser considerado, sugere a presença de inibidores potenciais de xilanases, produzidos como resultado da degradação de PASPT durante o cultivo de *A. oryzae*, que foram também concentrados nesta etapa. Segundo Panagiotou e Olsson (2007), derivados da lignina (furanos, fenóis e ácidos orgânicos de baixa massa molecular) que são encontrados no hidrolisado de palha de trigo, atuaram como inibidores da atividade de uma mistura de enzimas comerciais, bem como sobre amostras de EB de *Penicillium brasilianum* IBT 20888 durante a digestão enzimática de papel de filtro e xilana.

Ainda sobre os resultados apresentados na Tabela 4.2, a estratégia de purificação estabelecida para Xyl-O1 resultou em uma preparação aparentemente homogênea contendo atividade de xilanase a partir do EB de *A. oryzae*. Em termos de atividade específica foi observado um aumento expressivo de 9,15 UI.mg⁻¹ no EB para 248 UI.mg⁻¹ ao final das etapas cromatográficas, ou seja, um aumento de 27 vezes, confirmando a eficiência desta estratégia de purificação de Xyl-O1.

Tabela 4.2. Sumário das etapas de purificação de Xyl-O1 produzida por *A. oryzae* cultivado em PASPT como fonte de carbono.

Etapas de purificação	Volume total (mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (UI)	Atividade específica (UI.mg⁻¹) *	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
EB – <i>A. oryzae</i>	110,00	5,830	53,350	9,151	1,000	100,00
Ultrafiltrado	100,00	1,500	29,400	19,600	2,142	55,11
Liofilizado	4,50	0,828	1,647	1,989	0,217	3,08
<i>Sephacryl S-100</i> (frações 58–64)	21,00	0,441	7,833	17,762	1,941	14,68
<i>Sephadex G-50</i> (frações 71–84)	40,00	0,080	9,880	123,500	13,496	18,52
<i>Q-Sepharose FF</i> (frações 7–18)	36,00	0,036	8,928	248,000	27,101	16,74

* Atividade específica (UI.mg⁻¹) foi quantificada com a fração solúvel de xilana de aveia como substrato.

A pureza aparente de Xyl-O1 foi visualizada em SDS-PAGE após coloração com nitrato de prata ou por zimografia em gel desnaturante copolimerizado com solução de xilana de aveia 0,1% (v/v) (Figura 4.3). O gel corado por nitrato de prata revelou uma banda com massa molecular aparente de 21,5 kDa (Figura 4.3 A). A atividade de xilanase das amostras do EB de *A. oryzae* e Xyl-O1 purificada foi confirmada pelas bandas translúcidas em gel opaco, corado com solução de vermelho congo 0,1% (m/v), com idêntico perfil de migração relativa (Figura 4.3 B). Cabe ressaltar ainda, que a amostra do EB de *A. oryzae* apresentou pelo menos mais três bandas translúcidas (Figura 4.3 B), confirmando a multiplicidade de isoenzimas com atividade de xilanase produzidas por *A. oryzae*, cujas massas moleculares aparentes variam de 21,5 a 35 kDa, respectivamente.

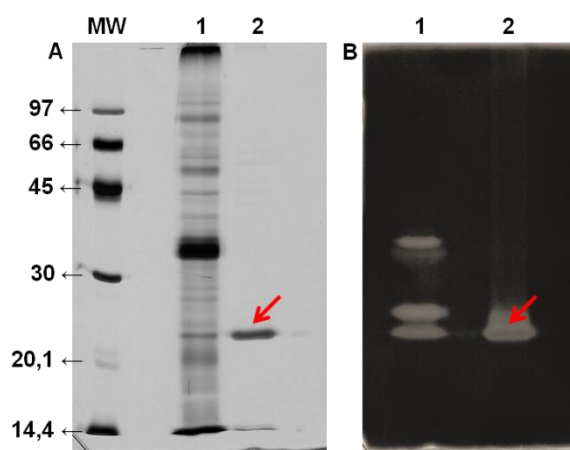


Figura 4.3. SDS-PAGE (12%) co-polimerizado com solução de xilana de aveia 0,1% para detecção de Xyl-O1 purificada da fração ultrafiltrado do EB de *A. oryzae* cultivado em PASPT, corado com nitrato de prata (A) ou revelado por solução de vermelho congo 0,1% (B). MW – marcadores de massa molecular contendo as proteínas: fosforilase B (97 kDa), soroalbumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa); Linha 1: EB de *A. oryzae* (10 μ g); Linha 2: Xyl-O1 purificada (5,0 μ g). As setas em vermelho sinalizam a banda de 21,5 kDa referente à isoenzima Xyl-O1 purificada.

Xilanases de baixa massa molecular apresentam interessantes propriedades que as tornam úteis em etapas de branqueamento de papel, uma vez que enzimas com menores massas moleculares podem penetrar com maior facilidade a estrutura das fibras constituintes das paredes celulares vegetais e alterar de maneira eficiente as propriedades da polpa. Neste sentido, a massa molecular de Xyl-O1 foi também estimada por cromatografia de filtração em gel em resina do tipo *Sephadex G-50*, calibrada com marcadores de massa molecular componentes do *kit* de calibração MW-GF-70 [albumina (66 kDa), anidrase carbônica (30

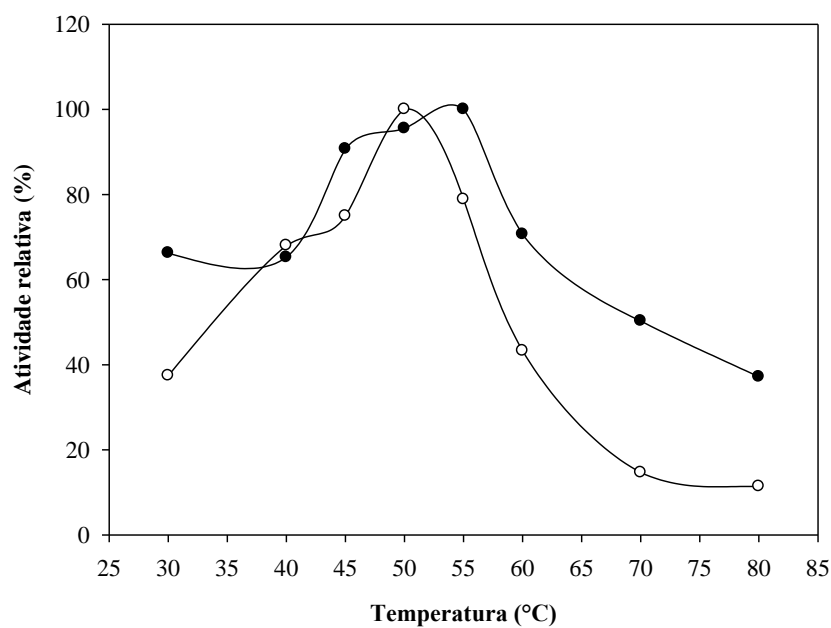
kDa), citocromo c (12,4 kDa) e aprotinina (6,5 kDa) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA)]. Entretanto, o valor estimado foi menor que 10 kDa (resultados não mostrados), sugerindo uma possível interação de Xyl-O1 com a resina do tipo *Sephadex G-50*. O mesmo fenômeno foi descrito para β -xilosidase purificada de *Trichoderma harzianum* (Ximenes et al., 1996) e para uma xilanase de baixa massa molecular purificada de *A. fumigatus* Fresenius (Cerri e Silva et al., 1999). Segundo Poutanen (1988), a razão para esta menor massa molecular aparente obtida por cromatografia em filtração em gel pode ser resultado do retardo da migração da enzima na resina, promovida possivelmente por interações entre as duas estruturas moleculares.

4.3.3. Caracterização enzimática de Xyl-O1

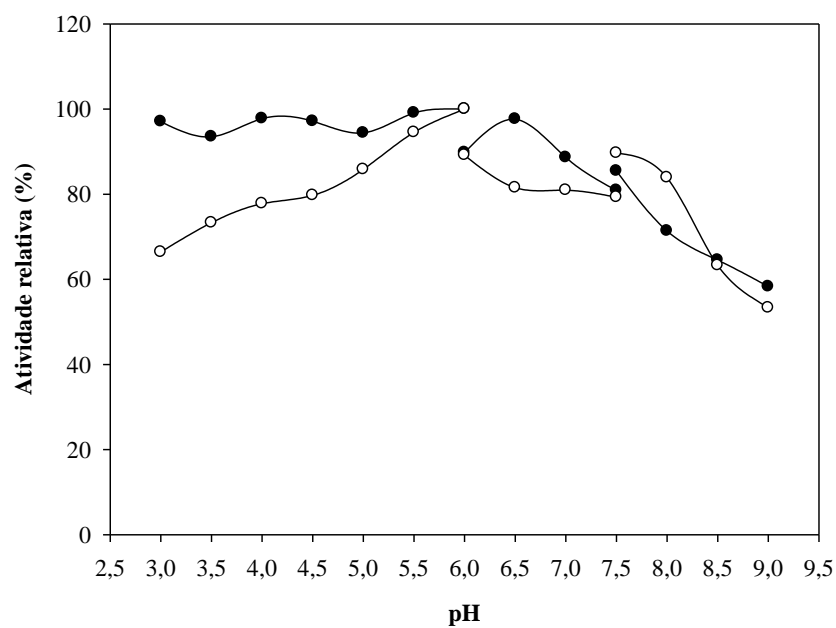
As amostras, EB de *A. oryzae* e Xyl-O1 purificada, apresentaram maiores atividades nos intervalos de temperatura e pH de 45 a 60°C e 5,5 e 6,0, respectivamente, conforme apresentado na Figura 4.4. Na faixa de temperatura de 45 a 60°C, as duas amostras foram mais estáveis com atividade de xilanase superior a 70%. As atividades máximas foram a 55°C para o EB de *A. oryzae* e a 50°C para Xyl-O1 purificada (Figura 4.4). Em relação à estabilidade em função do efeito do pH, as duas amostras apresentaram maiores atividades em pH 6,0 com tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, sendo que no intervalo de 5,5 a 6,0 está atividade foi superior a 90% (Figura 4.4).

Ainda na Figura 4.4 é possível verificar que a amostra do EB de *A. oryzae* apresentou estabilidade superior a 90% para uma ampla faixa de pH, estendendo de 3,0 a 6,0 no tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, sendo que este efeito estabilizante do tampão foi evidente para as duas amostras. Inversamente, as duas amostras quando em presença do tampão tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ manifestaram menor estabilidade para a atividade xilanólítica, em comparação aos tampões acetato de sódio e fosfato de sódio de concentração semelhante.

Outros estudos envolvendo a purificação e caracterização de β -xilanases de fungos filamentosos também estabeleceram a temperatura de 50°C como a condição ideal para a atividade enzimática (Kang et al., 1996; Ximenes et al., 1999; Teixeira et al., 2010). Os resultados deste trabalho também estão de acordo com os encontrados por Kimura et al. (2000), que estabeleceram o pH 6,0, como condição ideal para a xilanase XynG2 isolada de uma biblioteca genômica de *A. oryzae* KBN616. Entretanto, a maior atividade da enzima trabalhada por estes autores foi a 58°C.



A



B

Figura 4.4. Efeito da temperatura (A) e pH (B) sobre a atividade xilanólítica das amostras do EB de *A. oryzae* [—●—] e Xyl-O1 purificada [—○—]. Detalhes experimentais estão disponíveis no texto.

Os valores obtidos para os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} de Xyl-O1 foram estabelecidos em frações solúveis e insolúveis de xilanas de aveia ou de bétula, como substratos, e estão apresentados na Tabela 4.3. Os valores de K_m aparentes indicam que Xyl-

O1 purificada apresenta maior afinidade para xilana de bétula, composta por 90% de resíduos de xilose. Já para xilana de aveia, uma composição mais heterogênea em relação a resíduos de monossacarídeos é evidente, sendo que 75% dos resíduos correspondem a xilose, 10% de arabinose e 15% de glicose. A afinidade de Xyl-O1 por substratos contendo maior proporção de resíduos de xilose representa uma relevante propriedade a ser explorada no futuro, direcionando esta enzima em métodos alternativos de biobranqueamento de polpas de celulose.

Tabela 4.3. Parâmetros cinéticos determinados para Xyl-O1 purificada.

Parâmetros cinéticos	Xilana de aveia		Xilana de bétula	
	Solúvel	Insolúvel	Solúvel	Insolúvel
K_m (mg.mL ⁻¹)	10,050	62,600	3,345	10,375
V_{max} (UI.mL ⁻¹)	3,340	2,078	0,524	0,901

O efeito modulador positivo ou negativo de compostos químicos constitui uma ferramenta de grande utilidade na caracterização de possíveis interações que ocorrem no sítio ativo e o mecanismo de ação de enzimas xilanolíticas. Neste sentido, o efeito de íons cloreto, íons sulfato e EDTA, bem como a ação de agentes modificadores de aminoácidos específicos e aminoácidos, foram avaliados sobre a atividade de Xyl-O1 purificada.

A atividade de Xyl-O1 em presença de Hg⁺² na concentração de 1,0 e 10 mmol.L⁻¹ foi reduzida a 86 e 8%, respectivamente. O mesmo efeito inibitório foi observado para o íon Ag⁺¹ na concentração de 10 mmol.L⁻¹. O efeito inibitório destes íons é conhecido e bem fundamentado pela literatura (Ryan et al., 2003; Sandrim et al., 2005; Murthy e Naidu, 2010; Soren et al., 2010). Segundo Sandrim et al. (2005), a presença de íons Hg⁺² drasticamente inibe a atividade xilanase, sugerindo a existência de grupos tiois no sítio catalítico da enzima. De maneira geral, Xyl-O1 purificada permaneceu estável em presença de grande parte dos íons testados. No entanto, o íon Mn⁺², comumente referido com um potente ativador de xilanases, mostrou um efeito inibitório na concentração de 10 mmol.L⁻¹ e promoveu uma redução de 10% na atividade da enzima em comparação ao controle. Semelhante efeito inibitório foi observado quando a enzima foi pré-incubada por 40 minutos a 28 °C com a mesma concentração do íon. Contrariamente aos nossos resultados, Carmona et al. (2005) e Teixeira et al. (2010) demonstraram efeito ativador do íon Mn⁺² 10 mmol.L⁻¹ sobre xilanases de *A. versicolor* e *A. awamori* 2B.361 U2/1, respectivamente.

A atividade de Xyl-O1 em presença de reagentes modificadores de aminoácidos e aminoácidos permaneceu relativamente estável ou foi ativada por alguns destes reagentes (Tabela 4.4). Em presença de SDS 20 mmol.L⁻¹, a enzima reteve 74% da atividade xilanólica controle. A mistura de reação contendo L-triptofano 5,0 mmol.L⁻¹ não promoveu o aumento da atividade da enzima, contrário ao verificado em outros estudos. Entretanto, compostos contendo grupos tióis como L-cisteína, DTT e β-mercaptoetanol aumentaram a atividade de Xyl-O1 em 40, 14 e 37%, respectivamente (Tabela 4.4). Conforme discutido por Carmona et al. (2005) e Teixeira et al. (2010), a atividade xilanólica aumentada em presença de reagentes contendo grupos tióis livres, confirmam a existência de resíduos de cisteínas importantes à atividade catalítica de xilanases. A enzima manteve-se estável em presença dos reagentes NBS e EDC nas concentrações de 1,0 e 5,0 mmol.L⁻¹ (Tabela 4.4). Contudo, a atividade de Xyl-O1 foi completamente inibida por NBS na concentração de 10 mmol.L⁻¹ (resultados não apresentados). Nossos resultados são corroborados por Teixeira et al. (2010) que também relataram a inibição da atividade da xilanase de *A. awamori* em presença de NBS na mesma concentração. O reagente NBS constitui um potente inibidor de xilanases (Keskar et al., 1989; Marui et al., 1993), por promoverem a oxidação de resíduos de triptofano envolvidos na catálise enzimática, participando da ligação e/ou hidrólise do substrato. Finalmente, Xyl-O1 foi levemente inibida pelo reagente alquilante iodoacetamida, indicando a necessidade de grupos tióis envolvidos na catálise, bem como pelos reagentes DEPC e DTP, cujas reduções foram de 15 e 12%, respectivamente (Tabela 4.4).

A enzima Xyl-O1 purificada foi submetida a ensaios de termoestabilidade, nos quais foi dosada a atividade de xilanase residual em relação ao tempo de incubação nas temperaturas de 50 ou 55°C em pH 7,0 (Figura 4.5). A 50°C, a enzima permaneceu ativa por 5 h com atividade enzimática superior a 60%. A partir das 6 h de incubação, a atividade de xilanase residual foi reduzida a aproximadamente 26% e completamente inativada em 24 h. A 55°C, a enzima Xyl-O1 foi menos estável aos efeitos da temperatura e do tempo de incubação e atividade de xilanase residual foi reduzida consideravelmente a menos de 30% no primeiro intervalo de incubação (Figura 4.5).

A termoestabilidade da enzima Xyl-O1 na temperatura de 50°C foi sensivelmente aumentada em presença de L-cisteína 20 mmol.L⁻¹ e a atividade xilanase residual permaneceu próximo a 100% por um período de incubação de 6 h (Figura 4.6). A 55°C, a atividade de Xyl-O1 foi aumentada em presença de L-cisteína e permaneceu estável por 1 h de incubação com atividade catalítica superior a 75% (Figura 4.6).

Tabela 4.4. Efeito de reagentes específicos ou aminoácidos sobre a atividade xilanolítica de Xyl-O1 purificada.

Reagentes / aminoácidos	Atividade (UI.mL⁻¹)	Atividade relativa (%)	Concentração (mmol.L⁻¹)
H ₂ O controle	0,262 ± 0,021	100,00	---
Etanol 4,0% controle	0,285 ± 0,026	100,00	---
NBS	0,285 ± 0,079	108,42	1
DTNB *	0,399 ± 0,025	140,02	2
DTT	0,300 ± 0,037	114,35	20
L-Cisteína	0,367 ± 0,076	140,04	20
H ₂ O controle	0,290 ± 0,029	100,00	---
Etanol 4,0% controle	0,322 ± 0,006	100,00	---
DTP *	0,285 ± 0,025	88,43	2
L-Triptofano	0,285 ± 0,012	98,13	5
Iodoacetamida	0,255 ± 0,046	87,71	5
DEPC	0,248 ± 0,037	85,32	5
EDC	0,291 ± 0,046	100,08	5
β-Mercaptoetanol	0,397 ± 0,026	136,68	5
H ₂ O controle	0,306 ± 0,031	100,00	---
SDS	0,225 ± 0,025	73,56	20

* O efeito de alguns moduladores, não diluídos em água, sobre Xyl-O1 purificada foi determinado pela dosagem de atividade de xilanase e comparação como o respectivo controle; controle e ensaio foram preparados em presença de solução de etanol 4,0% (v/v). Atividade enzimática: 0,320 ± 0,014 UI.mL⁻¹.

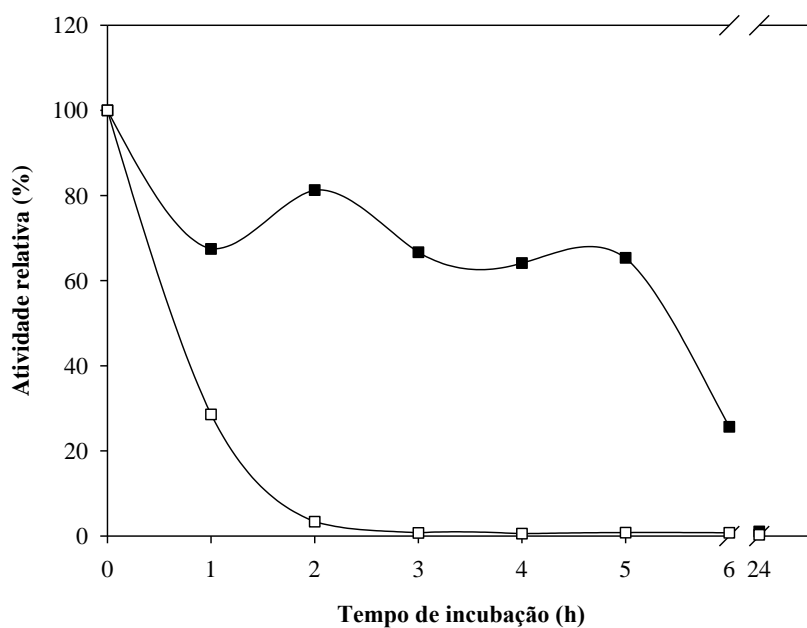
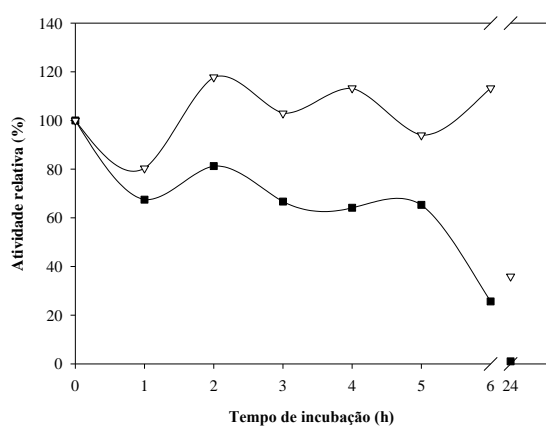
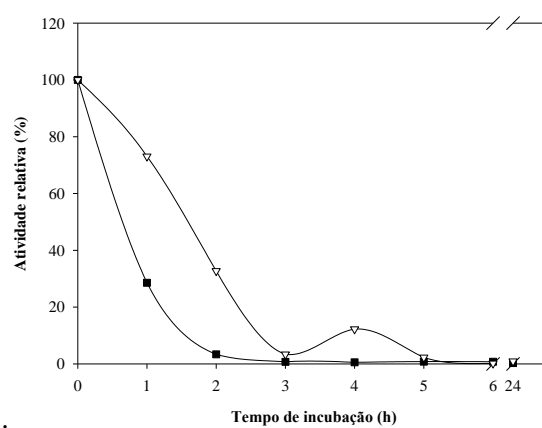


Figura 4.5. Efeito do tempo de incubação na termoestabilidade de Xyl-O1 purificada em pH 7,0. A estabilidade da enzima foi quantificada pela manutenção da solução de enzima a 50°C (■) ou 55°C (□) por 24 h.



A...



B

Figura 4.6. Efeito de L-cisteína 20 mmol.L⁻¹ na termoestabilidade de Xyl-O1 purificada em pH 7,0 e 50°C (A) ou 55°C (B) [▽]. Ensaio controle na ausência de L-cisteína [■].

A especificidade da enzima Xyl-O1 foi determinada em ensaios de hidrólise de ligações glicosídicas específicas $\alpha(1-4)$, $\beta(1-4)$ ou $\beta(1-3)$, utilizando diversos substratos. A enzima mostrou eficiência na hidrólise de substratos contendo resíduos de xilose, especialmente para as frações solúveis de xilanas de aveia, de bétula e de faia (Tabela 4.5). Estes resultados indicam a enzima Xyl-O1 como alternativa potencial para aplicações em biobranqueamento de polpa de celulose, uma vez que a aplicação de xilanases em indústrias de polpa e papel requer enzimas com atividade específica para xilana como substrato (Christov et al., 1999; Cardoso e Filho, 2003; Polizeli et al., 2005; Sandrim et al., 2005). Entretanto, a atividade da enzima foi consideravelmente reduzida para a fração insolúvel dos mesmos substratos, principalmente para xilana de aveia, cuja atividade relativa foi menor que 1% (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Especificidade de substrato de Xyl-O1 purificada.

Substrato	Ligação da cadeia principal	Atividade (U.L.mL ⁻¹)	Atividade relativa (%) ^a
Xilana de aveia (S) ^b	$\beta(1-4)$	0,659 \pm 0,005	100,00
Xilana de aveia (I) ^c	$\beta(1-4)$	0,003 \pm 0,004	0,39
Xilana de bétula (S)	$\beta(1-4)$	0,560 \pm 0,011	85,03
Xilana de bétula (I)	$\beta(1-4)$	0,228 \pm 0,025	34,60
Xilana de faia (S)	$\beta(1-4)$	0,556 \pm 0,030	84,38
Xilana de faia (I)	$\beta(1-4)$	0,024 \pm 0,030	3,58
4-O-metil-glicurono-D-xilano (I)	$\beta(1-4)$	0,328 \pm 0,028	49,87
Papel de filtro	$\beta(1-4)$	0,010 \pm 0,007	1,46
CM-celulose	$\beta(1-4)$	0,045 \pm 0,004	6,82
Avicel	$\beta(1-4)$	0,000 \pm 0,002	0,00
Laminarina	$\beta(1-3)$	0,039 \pm 0,018	5,93
Pectina	$\alpha(1-4)$	0,024 \pm 0,019	3,62
Manana	$\beta(1-4)$	0,002 \pm 0,003	0,37
PNPX	PNP- $\beta(1-4)$	0,000 \pm 0,000	0,00
PNPA	PNP- $\alpha(1-4)$	0,000 \pm 0,000	0,00
PNPG	PNP- $\beta(1-4)$	0,000 \pm 0,000	0,00
PNPM	PNP- $\beta(1-4)$	0,000 \pm 0,000	0,00

^a Atividade relativa para xilana de aveia; ^b (S): Fração solúvel; ^c (I): Fração insolúvel; *p*-nitrofenil- β -D-xilosídeo (PNPX), *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (PNPA), *p*-nitrofenil- β -D-glicosídeo (PNPG) e *p*-nitrofenil- β -D-manosídeo (PNPM).

A enzima também apresentou eficiência de hidrólise de 49,87% quando ensaiada com o substrato 4-O-metil-glicurono-D-xilano, encontrado em angiospermas. Somado a isto, as atividades relativas sobre a fração solúvel de xilanas de bétula ou de faia foram de 85 e 84,4%, respectivamente (Tabela 4.5). Atividades residuais da enzima menores do que 10% foram quantificadas para os substratos papel de filtro, CM-celulose, laminarina, pectina e manana, possivelmente indicando que tais substratos possam estar contaminados com pentosanas residuais susceptíveis à hidrólise. Conforme mencionado por Filho et al. (1993), outra possibilidade seria considerar que, a amostra Xyl-O1, mesmo apresentando banda única em SDS-PAGE e zimografia, esteja contaminada por traços destas atividades. A atividade de Xyl-O1 purificada foi reduzida a zero contra os substratos avicel e p-nitrofenilglicosídeos (Tabela 4.5).

A especificidade de Xyl-O1 também foi determinada pela análise dos produtos de hidrólise de frações solúveis ou insolúveis de xilana de bétula utilizando o método de DNS e CLAE-DAP em sistema Dionex. Os resultados apresentados na Tabela 4.6 mostram que a enzima foi mais ativa em fração solúvel do substrato, com hidrólise máxima de aproximadamente 33% obtida após 12 h de incubação. Confirmando os resultados obtidos nos ensaios de especificidade, Xyl-O1 purificada foi menos ativa sobre a fração insolúvel do substrato e o percentual de hidrólise alcançou apenas 17,5%. Estes resultados estão de acordo com Ryan et al. (2003), que também verificaram maiores percentuais de hidrólise para a fração solúvel de diferentes xilanas, catalisada por xilanase extracelular (XynC) purificada de *Penicillium capsulatum*. A afinidade de Xyl-O1 pela fração solúvel do substrato pode indicar uma preferência catalítica para sítios ramificados de O-acetil-(4-O-metil-D-glicurono) na estrutura de xilana de bétula. Segundo Coughlan e colaboradores, certos substituintes na estrutura da xilana atuam como sítios de ligação para a atividade catalítica de algumas xilanases (Cardoso e Filho, 2003). Os resíduos que compõem estes sítios na estrutura ramificada foram parcialmente removidos durante as etapas de extrações alcalinas e ácidas que foram realizadas no preparo das frações solúveis ou insolúveis do substrato. Entretanto, como apresentado na Tabela 4.6, foi observado que nos períodos de hidrólise de 18 e 24 horas não houve aumento da quantidade de açúcar redutor que foi liberado. De fato, este resultado indica que a hidrólise catalisada por Xyl-O1 foi mais eficiente nas primeiras 12 h e este período representa um platô para esta atividade que se mantém constante pelas próximas 12 h de incubação.

Tabela 4.6. Hidrólise de frações solúvel ou insolúvel de xilana de bétula catalisada por Xyl-O1 purificada.

Tempo de Hidrólise (h)	Solúvel		Insolúvel	
	AR xilose (mg) *	Hidrólise (%)	AR xilose (mg) *	Hidrólise (%)
0	0,000 ± 0,000	0,00	0,031 ± 0,006	1,55
6	0,434 ± 0,011	21,72	0,209 ± 0,036	10,47
12	0,667 ± 0,029	33,35	0,351 ± 0,057	17,54
18	0,554 ± 0,025	27,69	0,345 ± 0,039	17,23
24	0,554 ± 0,025	27,70	0,350 ± 0,037	17,50

Açúcar redutor (AR); * A quantidade de açúcar redutor liberado foi estimada pelo método de DNS.

A identificação e análise quantitativa dos xilooligossacarídeos solúveis liberados, parecem indicar que Xyl-O1 catalisa a clivagem de ligações glicosídicas internas (tipo-endo) em fração solúvel ou insolúvel de xilana de bétula (Tabela 4.7). Este mecanismo de ação é semelhante ao descrito para outras enzimas, incluindo endo- β -1,4-xilanases produzidas por *Penicillium capsulatum* (Filho et al., 1993; Ryan et al., 2003), *Cephalosporium* sp. RYM-202 (Kang et al., 1996), *A. fumigatus* Fresenius (Cerri e Silva et al., 1999) and *Acrophialophora nainiana* (Ximenes et al., 1999). Como mostrado na Tabela 4.7, os produtos de hidrólise X2 a X6 predominaram durante as primeiras 12 h de incubação. Durante as 12 h de incubação subsequentes, xilooligômeros X4 a X6 predominaram, ou nenhum produto foi identificado, como mostrado após 24 h para a fração insolúvel do substrato (Figura 4.7; Tabela 4.7). O fato de não se quantificar ou identificar produtos de hidrólise por CLAE-DAP indica o acúmulo de xilooligômeros maiores após a eluição do padrão X6 durante os períodos de incubação de 18 e 24 h (Figura 4.7). Estes resultados sugerem que Xyl-O1 purificada esteja envolvida em reações de transglicosilação em certos momentos. Neste caso, os perfis cromatográficos mostraram picos irregulares apresentando sinais eletroquímicos mais intensos e tempos de retenção superiores aos estabelecidos pelos xilooligômeros padrões (Figura 4.7). Como apenas xilooligossacarídeos contendo seis ou menos unidades de D-xilose puderam ser detectados, é possível inferir que os produtos com maior grau de polimerização não puderam ser identificados pela ausência de xilooligômeros padrões com tempos de retenção maiores. Mesmo os produtos de hidrólise obtidos por CLAE-DAP sendo representados por valores percentuais reduzidos, a técnica de detecção com base em seus tempos de retenção resulta em maior especificidade.

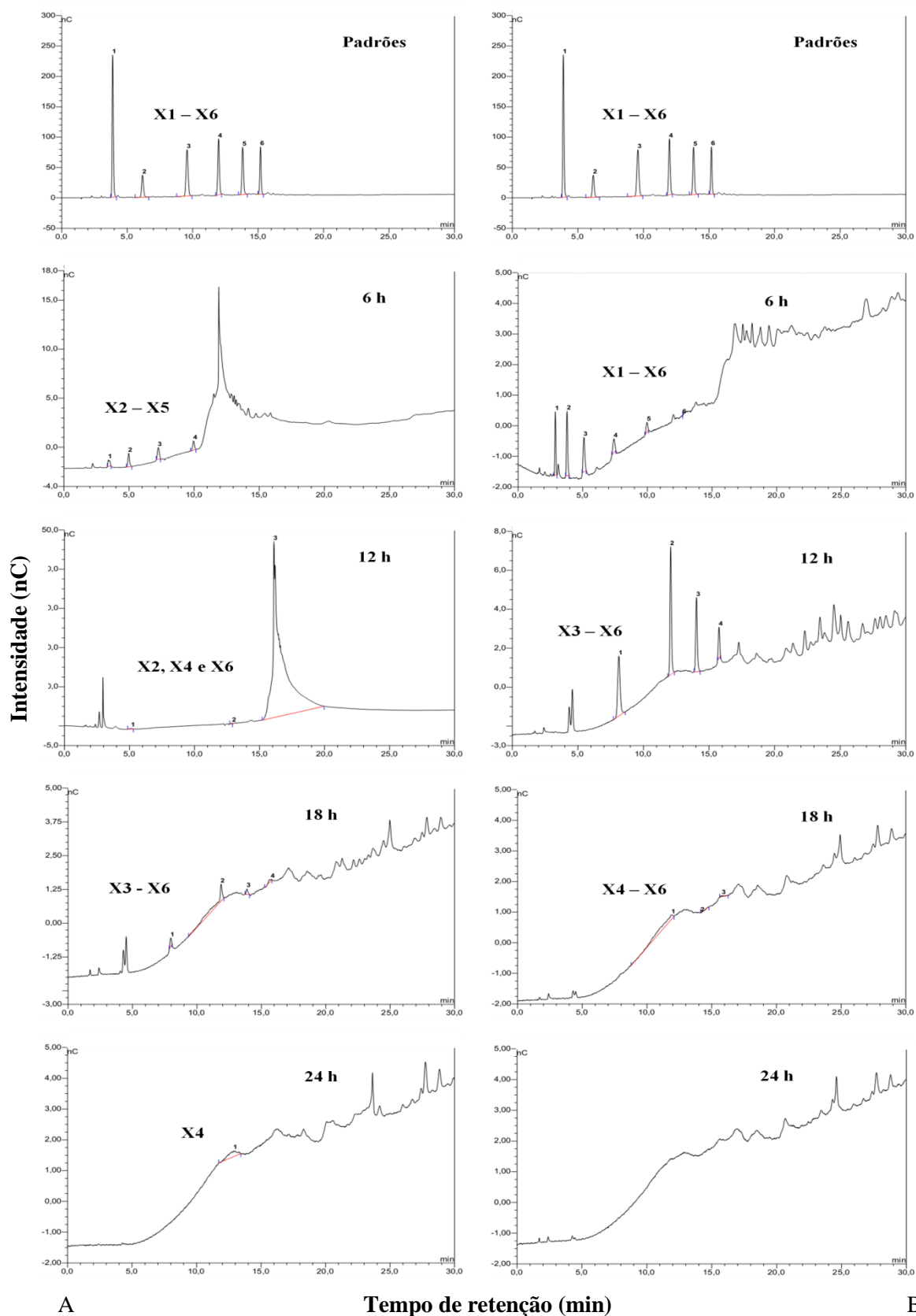


Figura 4.7. Fracionamento em CLAE-DAP dos produtos formados pela hidrólise de frações solúveis (A) e insolúveis (B) de xilana de bétula, nos intervalos de tempo de 6, 12, 18 e 24 h. Xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentaose (X5) e xilohexaose (X6).

Inversamente, a detecção de açúcar redutor pelo método do DNS é menos específica, pois mesmo utilizando D-xilose como açúcar de referência, não seria possível a distinção entre as extremidades redutoras de monômeros de D-xilose e xilooligômeros de maiores massas moleculares.

A possibilidade de Xyl-O1 purificada catalisar reação de transglicosilação pode explicar o valor constante de hidrólise obtida pelo método do DNS após 12 h de incubação (Tabela 4.6). Conforme relatado por Biely e VrŠanskÁ (1983), reações de transferência de grupos glicosil são bem conhecidas entre glicosidases e glicanases. Segundo estes autores, algumas enzimas (invertase, β -galactosidase e β -glicosidase de *A. niger*) atuam sobre oligossacarídeos catalisando a formação de diversos isômeros posicionais, com retenção da configuração da ligação glicosídica original, porém sem especificidade. Glicosidases, por exemplo, aparentemente não possuem sítios de interação específicos para uma molécula glicídica aceptora. Para glicanases com mecanismo de clivagem de ligações glicosídicas internas (lisozima, α -amilases e celulases), a especificidade é evidente e a configuração original da ligação glicosídica é mantida nos aceptores de sacarídeos a partir dos oligossacarídeos doadores que foram clivados previamente. Somado a isto, outras xilanases também foram eficientes em catalisar reações de transglicosilação, como a produzida por *Anoxybacillus flavithermus* BC (Kambourova et al., 2007). Outros trabalhos mencionaram a utilização de endo-1,4- β -xylanases e β -xylosidases na síntese de oligossacarídeos específicos (Eneyskaya et al., 2003; Jiang et al., 2004), como também na obtenção de polímero híbrido de celulose-xilana (Fujita et al., 1998). Os resultados apresentados até aqui sugerem que Xyl-O1 purificada catalisou reações de transglicosilação após um período de hidrólise efetiva, neste caso, após 12 h de incubação a 28°C. Entretanto, ensaios específicos são necessários para confirmar esta hipótese.

De fato, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que Xyl-O1 purificada, semelhante a outras hemicelulases, eventualmente catalisa a transferência de grupamentos, mais especificamente de xilooligossacarídeos produzidos na reação de hidrólise, resultando em xilooligômeros de maiores massas moleculares. Entretanto, a dupla catálise destas enzimas *in vivo* representa uma função importante para o desenvolvimento da célula vegetal de forma a remodelar ou mesmo fortalecer a parede celular como um todo. Taiz e Zeiger (2002) afirmaram que endo-transglicosilases de xiloglicanos catalisam reações de transglicosilação integrando xiloglicanos recém-sintetizados à parede celular vegetal. Um aspecto interessante na modificação de xiloglicanos é apresentado por endo-xiloglicanases

Tm-NXG1 e Tm-NXG2 de *Tropaeolum majus* pertencentes à família de GH16, que atuam na remodelagem de polissacarídeos por reação de transglicosilação (Baumann et al., 2007). Segundo estes autores, a atividade de xiloglicano-hidrolase destas enzimas teria evoluído como uma nova função adicionada a GH16 ancestral envolvida, inicialmente, em processos biológicos específicos como na germinação de sementes, amadurecimento de frutos e expansão da parede celular. Evidência adicional sobre a atividade de hidrólise/transglicosilação catalisada por hemicelulases, foi verificada por Prakash et al. (2012), cujas observações mostraram que, o polissacarídeo galactoglicomanana-glicuronoxilana II (GGM-GX) presente em frutos amadurecidos do tomateiro não foram hidrolisados por uma endo- β -mananase. Entretanto, esta enzima *in vitro* catalisa a hidrólise dos substratos GGM-GX I e II (atividade endo- β -mananase) ou a transglicosilação destes substratos em presença de oligossacarídeos originados da degradação da manana (atividade manana-transglicosilase). Diante destes indícios, os autores sugeriram que a transglicosilação é a principal reação catalisada pela endo- β -mananase; a remodelagem e não o enfraquecimento da parede celular possibilitaria na retenção de propriedades como a flexibilidade e plasticidade do fruto amadurecido.

Tabela 4.7. Identificação e análise quantitativa por CLAE-DAP dos xilooligossacarídeos liberados durante as reações de hidrólise catalisada por Xyl-O1 purificada.

Xilooligossacarídeos liberados *	% Hidrólise (Fração solúvel)				% Hidrólise (Fração insolúvel)			
	Tempo de incubação (h)				Tempo de incubação (h)			
	6	12	18	24	6	12	18	24
X1	0,005	0,000	0,000	0,000	0,015	0,000	0,000	0,000
X2	0,178	0,280	0,000	0,000	0,245	0,000	0,000	0,000
X3	0,078	0,000	0,008	0,000	0,083	0,047	0,000	0,000
X4	0,022	0,000	0,045	0,016	0,102	0,063	0,027	0,000
X5	0,031	0,000	0,005	0,005	0,066	0,055	0,005	0,000
X6	0,033	0,000	0,005	0,000	0,052	0,022	0,010	0,000

* Xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentaose (X5) e xilohexaose (X6).

Na Tabela 4.7 está apresentado o perfil de hidrólise no período de 6 a 24 h de incubação, confirmando a predominância de X2 como produto predominante da atividade de Xyl-O1 sobre as frações solúveis ou insolúveis do substrato. Para ambas as frações, Xyl-O1 mostrou um perfil de hidrólise menos específico, permitindo a quantificação dos produtos X1 a X6 no

período de 6 h de incubação. Entretanto, durante este período, X2 foi o principal produto de hidrólise liberado pela ação da enzima (Tabela 4.7).

Os percentuais reduzidos para o produto X1, especialmente no período de 6 h, parecem confirmar que Xyl-O1 tem preferência por clivar ligações glicosídicas internas no polímero de xilana de bétula. É possível observar ainda que, em ambas as frações de substrato, o produto de hidrólise predominante liberado por Xyl-O1 purificada foi X2, correspondendo a 0,458% no período entre 6 e 12 h para a fração solúvel e de 0,245% para a fração insolúvel após 12 h de incubação (Tabela 4.7). Somado a isto, os percentuais de hidrólise total obtidos pela liberação dos produtos X4, X5 e X6 da fração insolúvel foram de 0,192, 0,126 e 0,084%, respectivamente, no intervalo de 6 a 18 h. Este resultado mostra que Xyl-O1 purificada apresenta flexibilidade catalítica, pois atuou eficientemente em frações solúveis e insolúveis do substrato.

4.4. CONCLUSÕES

1. A utilização do resíduo PASPT como fonte de carbono em cultivo submerso de *A. oryzae* constitui uma alternativa viável e de baixo custo para a produção de enzimas que degradam a holocelulose, principalmente xilanases.
2. Uma xilanase de baixa massa molecular foi purificada e caracterizada utilizando etapa de ultrafiltração e cromatografias de filtração em gel e troca iônica.
3. A atividade de Xyl-O1 foi mais estável a 50°C e pH 6,0.
4. A enzima pertence ao grupo de xilanases com mecanismo de clivagem do substrato do tipo-endo.
5. A preferência em hidrolisar polímeros de xilana direciona Xyl-O1 como um catalisador potencial para ser aplicado futuramente em etapas de biobranqueamento de papel.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adsul, M. G.; Ghule, J. E.; Singh, R.; Shaikh, H.; Bastawde, K. B.; Gokhale, D. V.; Varma, A. J., Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydrate Polymers* **2004**, *57*, 67-72.
- Baumann, M. J.; Eklöf, J. M.; Michel, G.; Kallas, Å. M.; Teeri, T. T.; Czjzek, M.; Brumer, H., Structural Evidence for the Evolution of Xyloglucanase Activity from Xyloglucan Endo-Transglycosylases: Biological Implications for Cell Wall Metabolism. *The Plant Cell Online* **2007**, *19*, 1947-1963.
- Biely, P.; VrŠanskÁ, M., Synthesis and Hydrolysis of 1,3- β -Xylosidic Linkages by Endo-1,4- β -xylanase of *Cryptococcus albidus*. *European Journal of Biochemistry* **1983**, *129*, 645-651.
- Cardoso, O. A. V.; Filho, E. X. F., Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *FEMS Microbiology Letters* **2003**, *223*, 309-314.
- Carmona, E. C.; Fialho, M. B.; Buchgnani, É. B.; Coelho, G. D.; Brocheto-Braga, M. R.; Jorge, J. A., Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. *Process Biochemistry* **2005**, *40*, 359-364.
- Cerri e Silva, C. H.; Puls, J.; Sousa, M. V.; Filho, E. X. F., Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Revista de Microbiologia* **1999**, *30*, 114-119.
- Chipeta, Z.; du Preez, J.; Christopher, L., Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2008**, *35*, 587-594.
- Chipeta, Z.; du Preez, J.; Szakacs, G.; Christopher, L., Xylanase production by fungal strains on spent sulphite liquor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2005**, *69*, 71-78.
- Christov, L. P.; Szakacs, G.; Balakrishnan, H., Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching. *Process Biochemistry* **1999**, *34*, 511-517.
- Csiszár, E.; Szakács, G.; Rusznák, I., Combining Traditional Cotton Scouring with Cellulase Enzymatic Treatment. *Textile Research Journal* **1998**, *68*, 163-167.
- Csiszár, E.; Urbánszki, K.; Szakács, G., Biotreatment of desized cotton fabric by commercial cellulase and xylanase enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2001**, *11*, 1065-1072.
- de Vries, R. P.; Visser, J., *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2001**, *65*, 497-522.
- Eneyskaya, E. V.; Brumer III, H.; Backinowsky, L. V.; Ivanen, D. R.; Kulminskaya, A. A.; Shabalin, K. A.; Neustroev, K. N., Enzymatic synthesis of β -xylanase substrates: transglycosylation reactions of the β -xylosidase from *Aspergillus* sp. *Carbohydrate Research* **2003**, *338*, 313-325.

Fang, H.-Y.; Chang, S.-M.; Lan, C.-H.; Fang, T. J., Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. *Process Biochemistry* **2008**, *43*, 49-55.

Filho, E. X. F.; Puls, J.; Coughlan, M. P., Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **1993**, *11*, 171-180.

Fujita, M.; Shoda, S.-I., Xylanase-Catalyzed Synthesis of a Novel Polysaccharide Having a Glucose-Xylose Repeating Unit, a Cellulose-Xylan Hybrid Polymer. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 6411-6412.

Gawande, P. V.; Kamat, M. Y., Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. *Journal of Applied Microbiology* **1999**, *87*, 511-519.

Gomi, K., *Aspergillus: Aspergillus oryzae*. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, Richard, K. R., Ed. Elsevier: Oxford, 1999; pp 66-72.

Isil, S.; Nilufer, A., Investigation of factors affecting xylanase activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2005**, *48*, 187-193.

Jiang, Z.; Zhu, Y.; Li, L.; Yu, X.; Kusakabe, I.; Kitaoka, M.; Hayashi, K., Transglycosylation reaction of xylanase B from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima* with the ability of synthesis of tertiary alkyl β -D-xylobiosides and xylosides. *Journal of Biotechnology* **2004**, *114*, 125-134.

Kambourova, M.; Mandeva, R.; Fiume, I.; Maurelli, L.; Rossi, M.; Morana, A., Hydrolysis of xylan at high temperature by co-action of the xylanase from *Anoxybacillus flavithermus* BC and the β -xylosidase/ α -arabinosidase from *Sulfolobus solfataricus* O α . *Journal of Applied Microbiology* **2007**, *102*, 1586-1593.

Kang, M.; Maeng, P.; Rhee, Y., Purification and Characterization of Two Xylanases from Alkalophilic *Cephalosporium* sp. Strain RYM-202. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 3480-3482.

Keskar, S. S.; Srinivasan, M. C.; Deshpande, V. V., Chemical modification of a xylanase from a thermotolerant *Streptomyces*. Evidence for essential tryptophan and cysteine residues at the active site. *Biochemical Journal* **1989**, *261*, 49-40.

Kimura, T.; Kitamoto, N.; Kito, Y.; Karita, S.; Sakka, K.; Ohmiya, K., Molecular cloning of xylanase gene xynG1 from *Aspergillus oryzae* KBN 616, a shoyu koji mold, and analysis of its expression. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **1998**, *85*, 10-16.

Kimura, T.; Suzuki, H.; Furuhashi, H.; Aburatani, T.; Morimoto, K.; Karita, S.; Sakka, K.; Ohmiya, K., Molecular Cloning, Overexpression, and Purification of a Major Xylanase from *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2000**, *64*, 2734-2738.

Kolenová, K.; Vršanská, M.; Biely, P., Mode of action of endo- β -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. *Journal of Biotechnology* **2006**, *121*, 338-345.

Kronbauer, E. A. W.; Peralta, R. M.; Osaku, C. A.; Kadowaki, M. K., Xylanase production by *Aspergillus casielus* induced with different carbon sources. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos* **2007**, *25*, 207-216.

Marui, M.; Nakanishi, K.; Yasui, T., Chemical modification of xylanases from *Streptomyces* sp. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1993**, *57*, 662-663.

Murthy, P.; Naidu, M., Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. *Food and Bioprocess Technology* **2010**, *5*, 657-664.

Nakanishi, K.; Arai, H.; Yasui, T., Purification and Some Properties of Xylanase from *Cryptococcus flavus*. *Journal of Fermentation Technology* **1984**, *62*, 361-369.

Oda, K.; Kakizono, D.; Yamada, O.; Iefuji, H.; Akita, O.; Iwashita, K., Proteomic Analysis of Extracellular Proteins from *Aspergillus oryzae* Grown under Submerged and Solid-State Culture Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **2006**, *72*, 3448-3457.

Panagiotou, G.; Olsson, L., Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. *Biotechnology and Bioengineering* **2007**, *96*, 250-258.

Polizeli, M. L. T. M.; Rizzatti, A. C. S.; Monti, R.; Terenzi, H. F.; Jorge, J. A.; Amorim, D. S., Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2005**, *67*, 577-591.

Poutanen, K., An α -L-arabinofuranosidase of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology* **1988**, *7*, 271-281.

Prakash, R.; Johnston, S. L.; Boldingh, H. L.; Redgwell, R. J.; Atkinson, R. G.; Melton, L. D.; Brummell, D. A.; Schröder, R., Mannans in tomato fruit are not depolymerized during ripening despite the presence of endo- β -mannanase. *Journal of Plant Physiology* **2012**, *169*, 1125-1133.

Ryan, S. E.; Nolan, K.; Thompson, R.; Gubitz, G. M.; Savage, A. V.; Tuohy, M. G., Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. *Enzyme and Microbial Technology* **2003**, *33*, 775-785.

Salles, B. C.; Cunha, R. B.; Fontes, W.; Sousa, M. V.; Filho, E. X. F., Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *Journal of Biotechnology* **2000**, *81*, 199-204.

Sandrim, V. C.; Rizzatti, A. C. S.; Terenzi, H. F.; Jorge, J. A.; Milagres, A. M. F.; Polizeli, M. L. T. M., Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. *Process Biochemistry* **2005**, *40*, 1823-1828.

Seyis, I.; Aksoz, N., Investigation of factors affecting xylanase activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2005**, *55*, 115-119.

Siqueira, F. G.; Siqueira, E. G.; Jaramillo, P. M. D.; Silveira, M. H. L.; Andreus, J.; Couto, F. A.; Batista, L. R.; Filho, E. X. F., The potential of agro-industrial residues for production of

holocellulase from filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2010**, *64*, 20-26.

Soren, D.; Jana, M.; Sengupta, S.; Ghosh, A., Purification and Characterization of a Low Molecular Weight Endo-xylanase from Mushroom *Termitomyces clypeatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2010**, *162*, 373-389.

Taiz, L.; Zeiger, E., Cell Walls: Structure, Biogenesis, and Expansion. In *Plant Physiology*, 3 edition ed.; Sinauer Associates: Sunderland, 2002; pp 313-338.

Teixeira, R. S. S.; Siqueira, F. G.; Souza, M. V.; Filho, E. X. F.; Bon, E. P. S., Purification and characterization studies of a thermostable β -xylanase from *Aspergillus awamori*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2010**, *37*, 1041-1051.

Turner, P.; Mamo, G.; Karlsson, E., Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories* **2007**, *6*, 1-23.

Wong, K. K.; Tan, L. U.; Saddler, J. N., Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews* **1988**, *52*, 305-317.

Ximenes, F. A.; Sousa, M. V.; Puls, J.; Silva-Jr, F. G.; Filho, E. X. F., Purification and Characterization of a Low-Molecular-Weight Xylanase Produced by *Acrophialophora nainiana*. *Current Microbiology* **1999**, *38*, 18-21.

Ximenes, F. A.; Silveira, F. Q. P.; Filho, E. X. F., Production of β -Xylosidase Activity by *Trichoderma harzianum* Strains. *Current Microbiology* **1996**, *33*, 71-77.

Capítulo V

Purificação e caracterização parciais de isoenzimas de xilanases e endoglicanase produzidas por Aspergillus oryzae

5.1. RESUMO

Este trabalho refere-se à continuação das atividades de purificação e caracterização de holocelulases produzidas por *A. oryzae* quando cultivado em piolho de algodão sujo como fonte de carbono lignocelulósica. A fração concentrada obtida após ultrafiltração do extrato bruto de *A. oryzae* em membrana PM-10, foi submetida às cromatografias de gel filtração e de troca iônica, resultando na purificação de uma isoenzima de xilanase (Xyl-O2), a purificação parcial das isoenzimas também de xilanase (Xyl-O3/Xyl-O4) e de uma enzima com atividade de endoglicanase (Cel-O1). As amostras submetidas à eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) co-polimerizada com solução de xilana de aveia 0,1% ou CM-celulose 0,1% revelaram bandas com massas moleculares aparentes de 21,5 kDa para Xyl-O2; de 35,3 e 33,1 kDa para Xyl-O3/Xyl-O4; de 40,4 ou 42,9 kDa para Cel-O1. As amostras Xyl-O2 ou Xyl-O3/Xyl-O4 apresentaram maior eficiência catalítica a 50 e 60°C, respectivamente. A amostra Xyl-O3/Xyl-O4 apresentou melhor atividade catalítica em pH 5,0, quando solubilizada em tampão PBS e no intervalo de pH 5,0 a 7,0 quando solubilizada em tampão tris-HCl. A enzima Xyl-O2 foi completamente termolábil para o intervalo de 40 a 60°C após 24 h de incubação; a amostra Xyl-O3/Xyl-O4 permaneceu 100% estável a 40°C por 24 h e ainda manteve-se estável a 50°C por 6 h, sendo que a atividade residual correspondendo a 40% ainda foi detectada após 24 h. Palavras-chave: Caracterização enzimática; espectrometria de massa; hemicelulase; CM-celulase

5.2. INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas no processamento industrial agrega custo adicional ao produto de interesse, uma vez que tais processos requerem grandes quantidades destes catalisadores, normalmente obtidos a custos elevados. Boa parte dos custos adicionais é relacionada aos processos de extração, purificação e comercialização destas enzimas. Segundo Bon et al. (2008), a dificuldade de expansão da produção de enzimas no Brasil, a sua comercialização e de produtos contendo enzimas estão relacionados ao estado incipiente da *cultura de biocatálise*, com predominância da catálise química tradicional.

Neste sentido, é fundamental o surgimento de alternativas viáveis para produção de enzimas a baixos custos, tornando a aplicação destes catalisadores mais atrativa comercialmente. Uma alternativa, por exemplo, para a produção de holocelulases que degradam os polissacarídeos da parede celular vegetal, seria a escolha de um microrganismo que seja eficiente em produzir e liberar elevados títulos de enzimas no meio extracelular. O gênero *Aspergillus* tem despertado a atenção principalmente na indústria, como produtor de alimentos fermentados, de enzimas industriais e de degradação ou na síntese de metabólitos secundários (Bennett, 1998; Gomi, 1999). O gênero *Aspergillus* é formado por fungos filamentosos com um grande número de espécies (de Vries e Visser, 2001). Muitos membros são microrganismos úteis à natureza na degradação de polissacarídeos da parede celular vegetal (de Vries e Visser, 2001), bem como são importantes em processos industriais na produção de enzimas homólogas e heterólogas (te Biesebeke, 2005). Dentre os muitos membros do grupo, *Aspergillus oryzae* tem se destacado como um excelente produtor de holocelulases, principalmente para enzimas que degradam a fração hemicelulose da biomassa lignocelulósica, contida no resíduo da indústria têxtil piolho de algodão sujo, conforme apresentado no Capítulo 4 desta Tese.

As holocelulases produzidas por *A. oryzae* são classificadas, em sua maioria, dentro do grupo das glicosil hidrolases (GHs; EC 3.2.1.-), em geral representado por enzimas amplamente dispersas em microrganismos do ambiente, que são especializadas em catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e um grupamento não-carboidrato [CAZY (<http://www.cazy.org/>)]. Conforme descrito no Capítulo 4 desta Tese, *A. oryzae* cultivado em piolho de algodão sujo produziu prioritariamente isoenzimas com atividade de xilanase. O complexo xilanolítico é formado basicamente por endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8) que clivam as ligações glicosídicas na

estrutura da xilana (Polizeli et al., 2005), a maior fração polissacarídica que compõem a hemicelulose, somado às β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37), classificadas de acordo com a afinidade relativa destas enzimas por xilobiose ou xilooligossacarídeos (Polizeli et al., 2005). Dependendo da diversidade estrutural dos carboidratos formadores da xilana, outras enzimas acessórias também são produzidas e participam do processo de degradação. A produção de isoenzimas com atividade de xilanase em um mesmo cultivo é comum e pode ser resultado da expressão de diferentes alelos em um mesmo gene (Subramaniyan e Prema, 2002) ou de genes separados (Sá-Pereira et al., 2003), processamento diferencial do RNA mensageiro e modificações pós-traducionais (glicosilação, agregação e digestão proteolítica) (Polizeli et al., 2005). Até a presente data, diversas isoenzimas de β -xilanases têm sido produzidas por *A. oryzae* nas mais diversas fontes de carbono comerciais (Bailey e Viikari, 1993) e ainda purificadas e caracterizadas como proteínas heterólogas em vetores de expressão (Kimura et al., 1998; Kitamoto et al., 1999; Kimura et al., 2000; Kimura et al., 2002).

O complexo celulolítico que catalisa a degradação da biomassa lignocelulósica é formado por glicoproteínas com massa molecular entre 50 e 90 kDa, capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas da celulose, liberando celoligossacarídeos, celobiose e glicose (Cullen e Kersten, 1992; Dillon, 2004). As celulases produzidas por *Trichoderma reesei* estão entre as mais conhecidas e são divididas em três grupos: endo- β -1,4-glicanases (EC 3.2.1.4), que hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso na fibra de celulose; exo- β -1,4-glicanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), que agem nas extremidades redutoras e não-redutoras de polímeros gerados pela ação das endoglicanases, liberando celobiose; β -1,4-glicosidases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam oligossacarídeos e celobiose a glicose (Andreaus et al., 2008; Kumar et al., 2008). Semelhante às β -xilanases, endoglicanases de *A. oryzae* foram purificadas e caracterizadas quando cultivado em farelo de trigo (Yamane et al., 2002) ou após serem expressas por vetores (Kitamoto et al., 1996). Por todo o texto deste trabalho foi estabelecido o termo CM-celulase para descrever a atividade de endoglicanases, comumente, obtida por meio da degradação de CM-celulose como substrato.

As técnicas de purificação usualmente utilizadas no isolamento de enzimas com atividade de xilanase ou de CM-celulase variam de acordo com a perspectiva de aplicação destas enzimas, mas, sobretudo requer eficiência como forma de redução dos custos com catalisadores. Dentre estas técnicas, o fracionamento em colunas cromatográficas explorando propriedades como carga elétrica, massa molecular ou afinidade estão entre as mais frequentes (Sá-Pereira et al., 2003). Recentemente, a análise espectral por *Matrix Assisted*

Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS) (Mishra e Thakur, 2011) tem se tornado uma ferramenta poderosa na caracterização e identificação destas proteínas de degradação da biomassa lignocelulósica.

Neste sentido, seguindo o caminho traçado no Capítulo 4 desta Tese quando foi purificada e caracterizada uma xilanase da fração ultrafiltrado PM-10 do EB de *A. oryzae*, pretende-se como este trabalho purificar e caracterizar parcialmente outras holocelulases com atividade de xilanase e de CM-celulase da fração concentrado PM-10 do EB de *A. oryzae* cultivado em piolho de algodão sujo pré-tratado (PASPT) como fonte de carbono.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.3.1. Caracterização enzimática e dosagens de proteína total, açúcar redutor total e de glicose do EB de *A. oryzae*

Na Tabela 5.1 é apresentado o perfil enzimático e as concentrações de proteína total, açúcar redutor total e de glicose produzidos por *A. oryzae* quando cultivado em PASPT, por seis dias à temperatura de 28°C, conforme estabelecido no Capítulo 3 desta Tese.

Tabela 5.1. Caracterização do EB de *A. oryzae* quanto às atividades enzimáticas de holocelulases, concentração de proteína total, de açúcar redutor total e de glicose.

Parâmetros analisados	UI.mL ⁻¹	mg.mL ⁻¹
<i>Atividades enzimáticas</i>		
Xilanase	0,486 ± 0,009	---
Pectinase	0,177 ± 0,016	---
Mananase	0,091 ± 0,005	---
CM-celulase	0,094 ± 0,005	---
FPase	0,085 ± 0,007	---
Avicelase	0,006 ± 0,000	---
<i>Concentração de proteína total e açúcares redutores</i>		
Proteína total	---	0,044 ± 0,004
AR-total	---	0,099 ± 0,012
Glicose	---	0,007 ± 0,011

Açúcar redutor total dosado pelo método de DNS (AR-total); Glicose dosada pelo método de glicose oxidase.

Inicialmente, a dosagem das atividades enzimáticas revelou que xilanase e pectinase foram as mais ativas e corresponderam a 0,486 e 0,177 UI.mL⁻¹, respectivamente. As atividades de mananase, CM-celulase e celulase total (FPase) também foram produzidas, no entanto, os valores quantificados foram próximos a 0,100 UI.mL⁻¹. O ensaio para avicelase revelou apenas valor residual de atividade enzimática de 0,006 UI.mL⁻¹. Conforme já mencionado em capítulos anteriores desta Tese, a utilização de PASPT como fonte de carbono no cultivo submerso de *A. oryzae* induziu, prioritariamente, enzimas do grupo das hemicelulases, com ênfase para a maior produção de xilanase.

A concentração de proteína total e açúcares redutores, também apresentados na Tabela 5.1, estão coerentes com as dosagens obtidas em outros cultivos submersos de *A. oryzae* em

PASPT. O reduzido valor de glicose parece confirmar a baixa produção de enzimas celulolíticas por *A. oryzae*, uma vez que, a concentração quantificada foi praticamente nula. Entretanto, este parâmetro indica uma preferência inicial do fungo pelo conteúdo de hemicelulose contido no substrato, observada durante os seis dias de cultivo.

5.3.2. Purificação parcial de holocelulases produzidas por *A. oryzae*

Inicialmente, um volume de EB de *A. oryzae* com atividade de xilanase e de CM-celulase correspondendo a 0,486 e 0,094 UI.mL⁻¹, respectivamente, foi submetido a ultrafiltração em membrana PM-10, seguida por cromatografias de filtração em gel em resina do tipo *Sephadex G-50* e de troca iônica em resinas dos tipos *DEAE* ou *Q-Sepharose*. A estratégia para estes fracionamentos está apresentada na Figura 5.1.

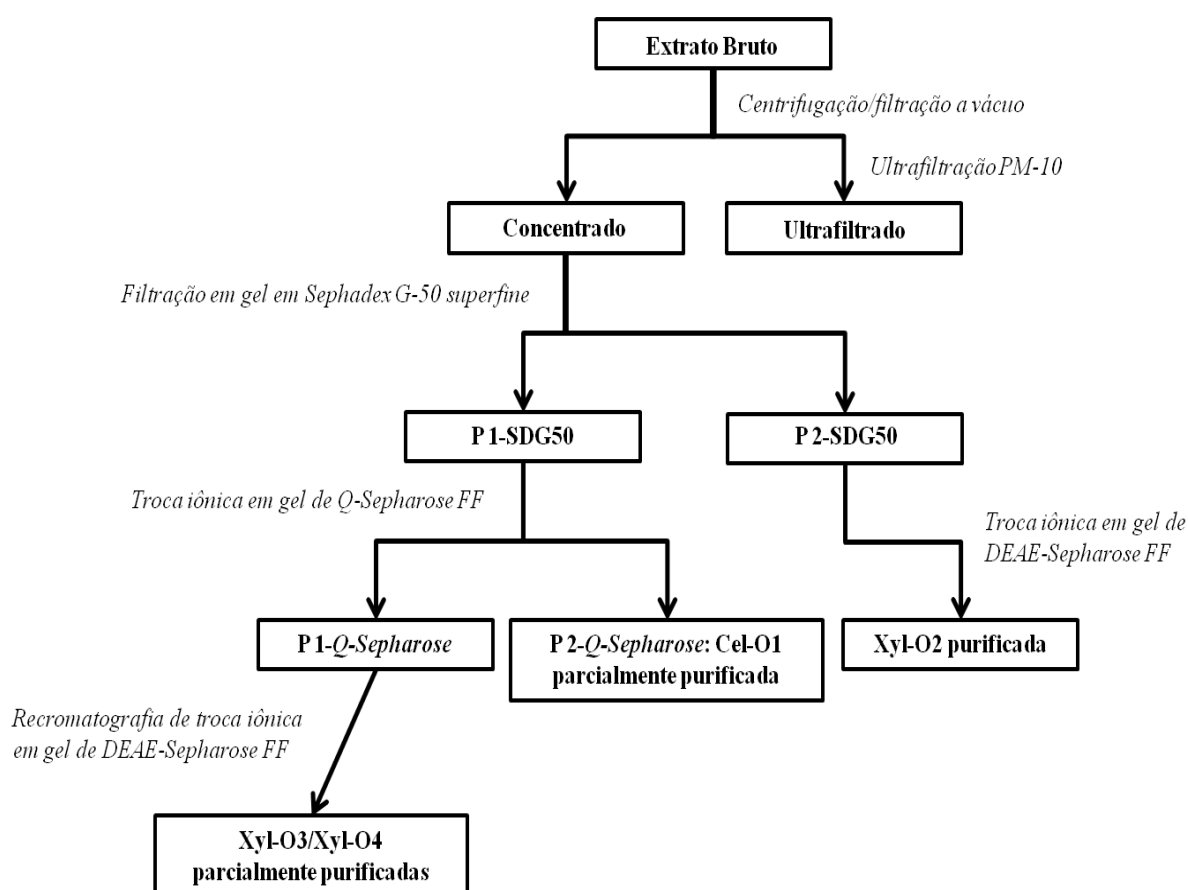


Figura 5.1. Estratégia de purificação de isoenzima com atividade de xilanase (Xyl-O2) e purificações parciais de outras isoenzimas com atividade de xilanase (Xyl-O3/Xyl-O4) e de uma enzima com atividade de CM-celulase (Cel-O1) da fração concentrado pós-ultrafiltração em membrana PM-10 do EB de *A. oryzae* cultivado em PASPT como fonte de carbono. P – representa as frações contendo atividade enzimática de interesse, que foram reunidas pós-etapa cromatográfica.

Inversamente ao proposto no Capítulo 4 desta Tese, quando foi utilizada a fração ultrafiltrado, após a etapa de ultrafiltração do EB de *A. oryzae* em membrana PM-10, a fração concentrado apresentando atividades de xilanase e de CM-celulase de 0,623 e 0,184 UI.mL⁻¹, respectivamente, foi submetida à cromatografia em resina do tipo *Sephadex G-50* (Figura 5.2). Neste perfil cromatográfico foi observado a eluição de dois picos principais de atividade enzimática, sendo que o primeiro, representado pelas frações de número 44 a 51 e contendo as atividades de xilanase e de CM-celulase, foi identificado como P 1-SDG50. O segundo pico contendo apenas a atividade de xilanase foi representado pelas frações de número 62 a 68 que foram reunidas e o volume resultante identificado como P 2-SDG50. Ainda neste fracionamento, um pico de elevada absorção em 280 nm foi eluído em frações anteriores aos dois picos com atividades enzimáticas e foi caracterizado pela presença de uma substância colorida na cor marrom ainda não identificada (Figura 5.2). A partir de então, foram realizadas cromatografias de troca iônica em resinas dos tipos *DEAE* ou *Q-Sepharose*, conforme estabelecido em procedimentos de purificação de holocelulases mencionado por outros autores. Inicialmente, a amostra P 2-SDG50 foi submetida à cromatografia em resina do tipo *DEAE-Sepharose* e a atividade de xilanase foi eluída em um único pico em tampão de equilíbrio (Figura 5.3). As frações de número 10 a 19 foram reunidas e o volume resultante foi identificado como Xyl-O2 purificada.

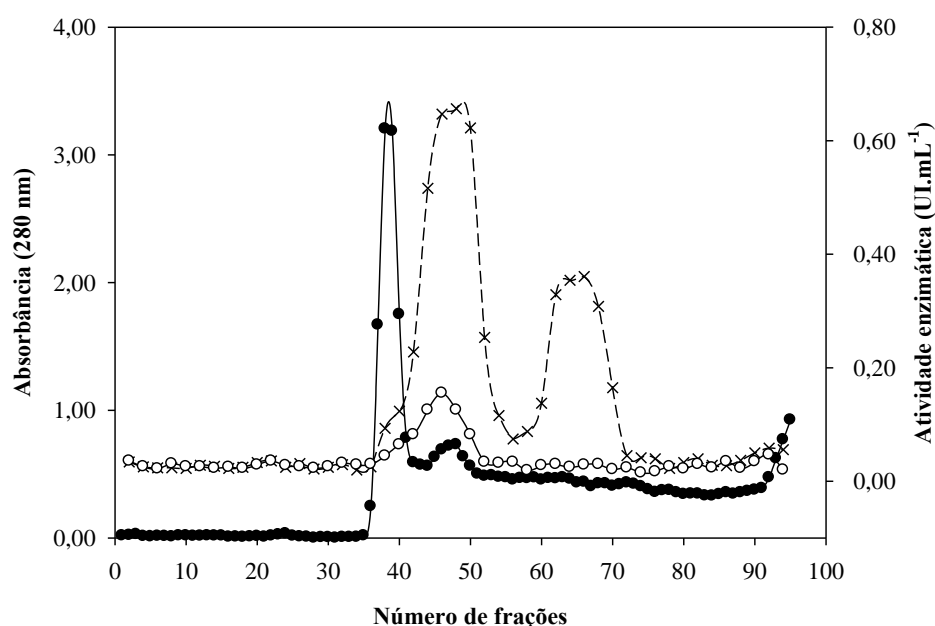


Figura 5.2. Cromatografia de filtração em gel em resina do tipo *Sephadex G-50* (65 x 2,6 cm), equilibrada em tampão PBS 50 mmol.L⁻¹, pH 7,0 contendo NaCl 25 mmol.L⁻¹ e azida sódica 0,02%, sob fluxo de 20 mL.h⁻¹, que foi utilizada na sequência de purificação de isoenzimas com atividade de xilanase e uma enzima com atividade de CM-celulase da fração concentrado do EB de *A. oryzae* cultivado em PASPT como fonte de carbono. As frações 44-51 ou 62-68 foram reunidas e o volume resultante foi identificado como P 1-SDG50 e P 2-SDG50, respectivamente. Absorbância 280 nm [—●—]; atividade de xilanase [—×—]; atividade de CM-celulase [—○—].

Na sequência, a amostra P 1-SDG50 (Figura 5.2) foi dialisada e submetida à cromatografia de troca iônica em resina do tipo *Q-Sepharose*. Neste fracionamento, um primeiro pico contendo atividade de xilanase foi eluído em tampão de equilíbrio sob gradiente de NaCl 0,4 mol.L⁻¹ (Figura 5.4). As frações de número 74 a 77 foram reunidas e o volume resultante foi identificado como Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas. Um segundo pico, representado pelas frações de número 80 a 82 foi eluído sob gradiente de NaCl 0,5 mol.L⁻¹. As frações foram reunidas e o volume resultante foi identificado como Cel-O1 parcialmente purificada (Figura 5.4).

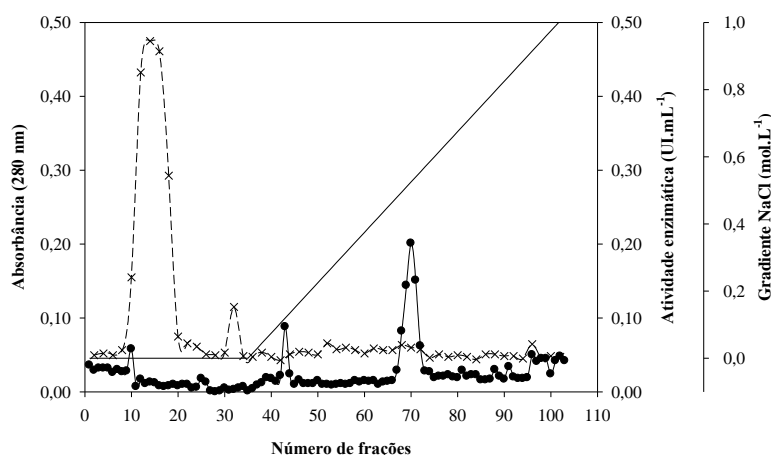


Figura 5.3. Cromatografia de troca iônica em resina do tipo *DEAE-Sepharose* (6,0 x 2,6 cm), equilibrada em tampão PBS 25 mmol.L⁻¹, pH 7,0 contendo azida sódica 0,02%, sob fluxo de 30 mL.h⁻¹, foi utilizada na sequência de purificação da enzima Xyl-O2. A amostra P 2-SDG50 foi submetida, inicialmente, à diálise contra tampão PBS 25 mM, pH 7,0. Nesta etapa cromatográfica, a enzima Xyl-O2 foi eluída em tampão de equilíbrio nas frações 10-19. Absorbância 280 nm [—●—]; atividade de xilanase [—×—]; gradiente de NaCl [—]. Detalhes experimentais estão disponíveis no Capítulo 2 desta Tese.

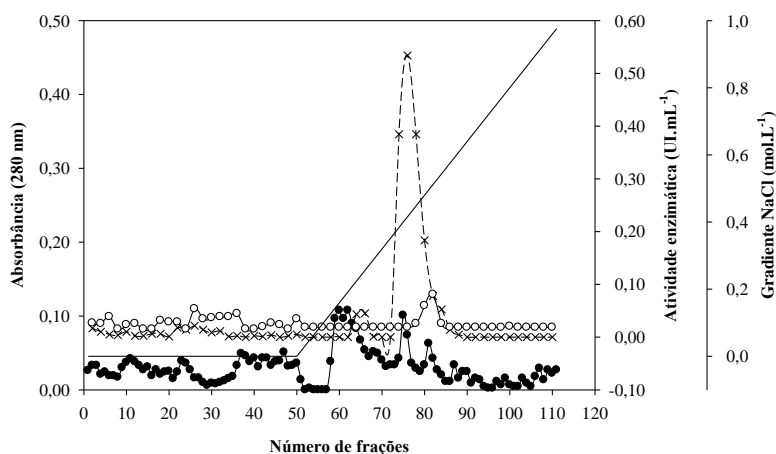


Figura 5.4. Cromatografia de troca iônica em resina *Q-Sepharose* (6,0 x 2,6 cm), equilibrada em tampão tris-HCl 25 mmol.L⁻¹, pH 8,2 contendo azida sódica 0,02%, sob fluxo de 30 mL.h⁻¹, utilizada na sequência de purificação parcial de duas outras isoenzimas com atividade de xilanase (Xyl-O3/Xyl-O4) e uma enzima com atividade de CM-celulase (Cel-O1). A amostra P1-SDG50 foi submetida, inicialmente, à diálise contra tampão tris-HCl 25 mM, pH 8,2. Nesta etapa cromatográfica, as enzimas Xyl-O3/Xyl-O4 (frações 74-77) e Cel-O1 (frações 80-82) foram eluídas em tampão de equilíbrio sob gradiente de NaCl 0,4 ou 0,5 mol.L⁻¹, respectivamente. Absorbância 280 nm [—●—]; atividade de xilanase [—×—]; atividade de CM-celulase [—○—]; gradiente de NaCl [—]. Detalhes experimentais estão disponíveis no Capítulo 2 desta Tese.

O sumário das estratégias de purificação das isoenzimas com atividade de xilanase e da enzima com atividade de CM-celulase está apresentado na Tabela 5.2. Nesta tabela é mostrado que a cromatografia de troca iônica em resina do tipo *DEAE-Sepharose* foi eficiente no fracionamento da isoenzima Xyl-O2, com purificação de 39,473 vezes e rendimento de 24,467%. Os valores de purificação e rendimento para o volume resultante contendo as isoenzimas com atividade de xilanase Xyl-O3/Xyl-O4 corresponderam a 9,778 e 12,929%, respectivamente (Tabela 5.2). Cabe ressaltar que, estes valores foram obtidos ao final da cromatografia de troca iônica em resina do tipo *Q-Sepharose*. As frações contendo as isoenzimas Xyl-O3/Xyl-O4 foram reunidas e identificadas como P 1 Q-SR, e em seguida o volume resultante foi novamente dialisado contra tampão PBS 25 mmol.L⁻¹, pH 7,0 e recromatografado em resina do tipo *DEAE-Sepharose* equilibrada no mesmo tampão, acoplada ao sistema cromatográfico *AKTApurified* UPC 10 (GE-Healthcare) (resultados não apresentados). No entanto, esta segunda cromatografia de troca iônica ainda não foi eficiente no fracionamento das duas isoenzimas, sugerindo que ambas apresentam valores de pH isoelétrico muito próximos. Os valores obtidos para as frações reunidas contendo a enzima Cel-O1 parcialmente purificada foram de 0,686 e 2,357%, respectivamente, ao final da cromatografia em resina do tipo *Sephadex G-50*. O volume resultante contendo a enzima Cel-O1 encontra-se armazenado a -20°C e os parâmetros de purificação e rendimento ainda não foram determinados (Tabela 5.2). Ainda com ênfase aos resultados mostrados na Tabela 5.2, é relevante mencionar que a inclusão de etapa de fracionamento em resina de troca iônica, seja dos tipos *DEAE* ou *Q-Sepharose* também foi um fator que contribuiu para a eficiente purificação de isoenzimas com atividade de xilanase. Outras isoenzimas de xilanasas têm sido comumente purificadas em cromatografias de troca iônica, principalmente em estudos utilizando fungos do gênero *Aspergillus*; três isoenzimas foram purificadas de *A. kawachii* (Ito et al., 1992), xilanase II de *A. fumigatus* Fresenius (Cerri e Silva et al., 1999), XynF1 de *A. oryzae* KBN616 (Kitamoto et al., 1999) e uma isoenzima de *A. carneus* (Fang et al., 2008). Por fim, durante os fracionamentos em *DEAE* ou *Q-Sepharose*, a atividade específica em UI.mg⁻¹ das frações reunidas contendo Xyl-O2 ou Xyl-O3/Xyl-O4 foi aumentada em cerca de 40 e 10 vezes, respectivamente (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Sumário das etapas de purificação de Xyl-O2 e purificação parcial de Xyl-O3 e Cel-O1 produzidas por *A. oryzae* quando cultivado em PASPT como fonte de carbono.

Etapas de purificação	Volume total (mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (UI)	Atividade específica (UI.mg⁻¹) *	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
<i>Concentrado Xyl-O2</i>						
EB filtrado	110,00	4,840	53,460	11,045	1,000	100,000
Concentrado PM-10	9,50	4,978	5,919	1,189	0,108	11,071
<i>Sephadex G-50</i> (frações 62–68)	15,00	0,135	7,140	52,889	4,788	13,356
<i>DEAE-Sepharose</i> (frações 10–19)	30,00	0,030	13,080	436,000	39,473	24,467
<i>Concentrado Xyl-O3/Xyl-O4</i>						
EB filtrado	110,00	4,840	53,460	11,045	1,000	100,000
Concentrado PM-10	9,50	4,978	5,919	1,189	0,108	11,071
<i>Sephadex G-50</i> (frações 44–51)	20,00	0,860	11,280	13,116	1,187	21,100
<i>Q-Sepharose</i> (frações 74–77)	12,80	0,064	6,912	108,000	9,778	12,929
<i>Recromatografia em DEAE-Sepharose</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Concentrado Cel-O1</i>						
EB filtrado	110,00	4,840	10,340	2,136	1,000	100,000
Concentrado PM-10	9,50	4,978	1,748	0,351	0,164	16,905
<i>Sephadex G-50</i> (frações 44–51)	20,00	0,860	1,260	1,465	0,686	2,357
<i>Q-Sepharose</i> (frações 80–82)	9,00	ND	ND	ND	ND	ND

* Atividade específica (UI.mg⁻¹) foi quantificada com a fração solúvel de xilana *oat-spelt* como substrato; ND – Quantificações não determinadas.

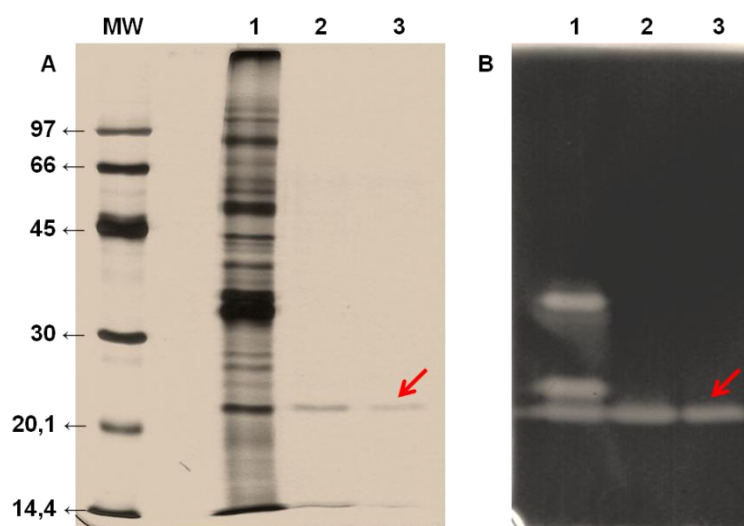


Figura 5.5. SDS-PAGE (12%) co-polimerizado com solução de xilana de aveia 0,1% para detecção de Xyl-O2 purificada da fração concentrado do EB de *A. oryzae* cultivado em PASPT, corado com nitrato de prata (A) ou revelado por solução de vermelho congo 0,1% (B). MW – marcadores de massa molecular contendo as seguintes proteínas: fosforilase B (97 kDa), soroalbumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa); Linha 1: EB de *A. oryzae* (10 μ g); Linha 2: Xyl-O1 purificada (5,0 μ g); Linha 3: Xyl-O2 purificada (1,0 μ g). As setas em vermelho sinalizam a banda de 21,5 kDa referente à isoenzima Xyl-O2 purificada.

A eficiência dos fracionamentos das enzimas purificadas ou parcialmente purificadas foi avaliada por meio de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e zimografia em gel co-polimerizado com solução de xilana de aveia ou CM-celulose a 0,1%. Na Figura 5.5 é possível visualizar que a migração relativa de Xyl-O2 tanto em SDS-PAGE padrão como em zimograma co-polimerizado com solução de xilana de aveia resultou em uma única banda com massa molecular aparente de 21,5 kDa. Este valor de massa molecular aparente é similar ao estimado para a enzima Xyl-O1 purificada na fração ultrafiltrado (Capítulo 4 desta Tese). A semelhança de migração relativa para as duas enzimas também é apresentada na Figura 5.5. De fato, esta semelhança em termos de massa molecular pode indicar a presença da mesma enzima nas duas frações obtidas após ultrafiltração em membrana PM-10. Conforme mencionado por von Gal Milanase et al. (2012), xilanases de baixa massa molecular teriam a capacidade de alterar sua conformação estrutural a fim de melhorar sua adsorção ao substrato lignocelulósico. Neste sentido, é possível que durante a ultrafiltração do EB de *A. oryzae*, algumas xilanases com massa molecular de 21,5 kDa, submetidas à pressão, consigam ultrapassar os poros da membrana de ultrafiltração e sejam encontradas na fração

ultrafiltrado. De fato, esta propriedade destas enzimas foi visualizada em um experimento preliminar em que foi proposta a realização de ultrafiltração de um volume do EB de *A. oryzae* e ao volume de concentrado resultante, adicionou-se um volume de solução autoclavada contendo os mesmos componentes do meio líquido suplementado, sem a fonte de carbono, para que esta solução resultante fosse submetida à nova etapa de ultrafiltração na mesma membrana PM-10. Esta complementação de volume foi repetida uma vez, obtendo-se três amostras de ultrafiltrados PM-10 e três novas amostras de concentrado. A dosagem de atividade de xilanase para as amostras de ultrafiltrados confirmou a presença da atividade nas três amostras, indicando um trânsito continuado da enzima pela membrana (resultados não apresentados).

Na Figura 5.6 é apresentado o perfil eletroforético das frações reunidas representando as isoenzimas com atividade de xilanase Xyl-O3/Xyl-O4. Nesta figura é visualizada a migração relativa de duas bandas mais evidentes, correspondendo a 35,3 e 33,1 kDa, respectivamente. A atividade de xilanase em zimograma também foi eficientemente detectada, conforme indicado pelas bandas translúcidas em gel opaco corado em solução de vermelho congo 0,1%. Os valores de massas moleculares aparentes das isoenzimas Xyl-O3/Xyl-O4 estão de acordo com as massas moleculares apresentadas por duas outras enzimas com atividade de xilanase, designadas por XynF1 e XynF3, que foram superexpressas por *A. oryzae* KBN616 (Kitamoto et al., 1999; Kimura et al., 2002).

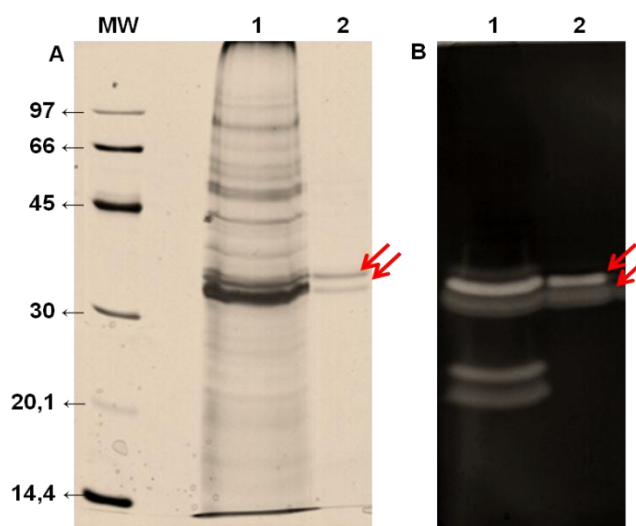
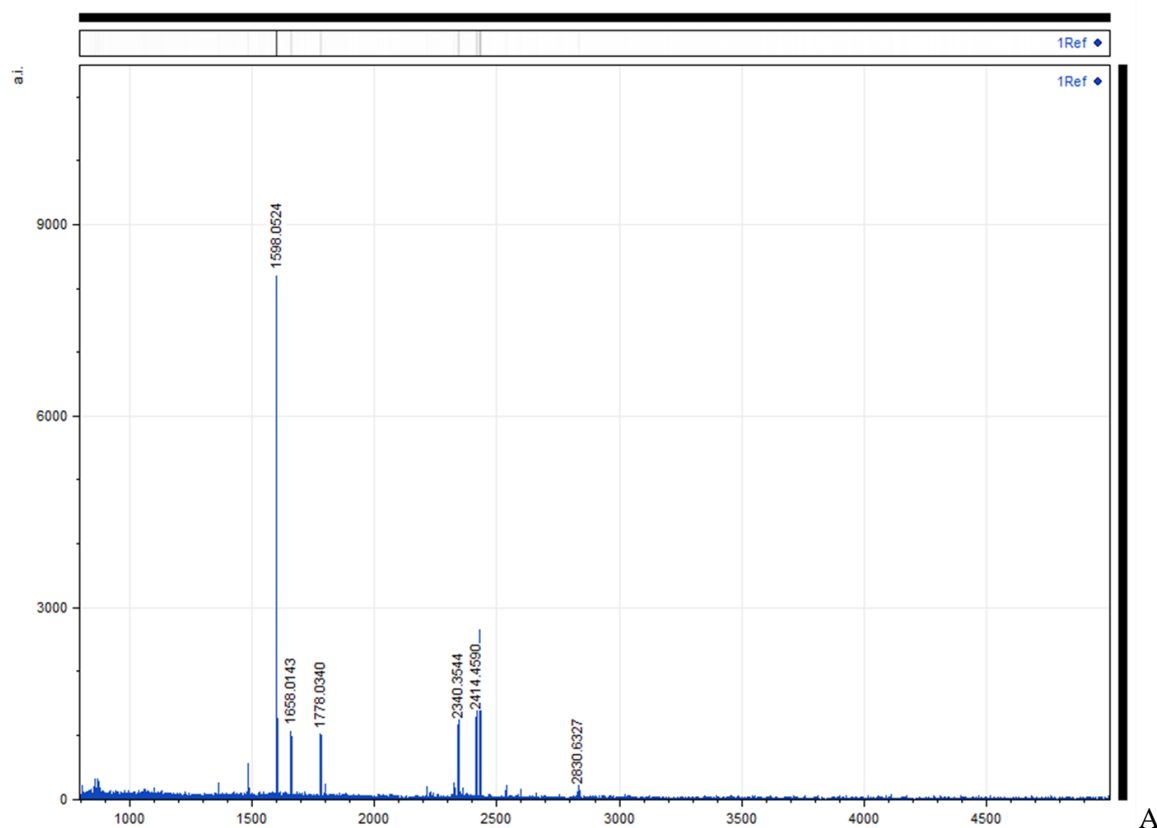


Figura 5.6. SDS-PAGE (12%) co-polimerizado com solução de xilana de aveia 0,1% para detecção de Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas da fração concentrado do EB de *A. oryzae* cultivado em PASPT, corado com nitrato de prata (A) ou revelado por solução de vermelho congo 0,1% (B). MW – marcadores de massa molecular contendo as seguintes proteínas: fosforilase B (97 kDa), soroalbumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa); Linha 1: EB – *A. oryzae* (10 μ g); Linha 2: Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas (5,0 μ g). As setas em vermelho sinalizam as bandas de 35,3 e 33,1 kDa referentes às isoenzimas Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas.

Como tentativa de obter a identificação mais precisa destas isoenzimas, as bandas coradas em nitrato de prata foram cortadas manualmente do gel e submetidas à análise por espectrometria de massas pela técnica *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) em MALDI-TOF MS (Figura 5.7). Apenas seqüências de peptídeos obtidos da banda de 35,3 kDa foram gerados de maneira eficiente e a análise das respectivas massas destes peptídeos contra a base de dados *online National Center Biotechnology Information* (NCBI) (*Mascot search*) confirmou a homologia com uma endo-1,4- β -xilânase F1 de *A. oryzae* RIB40 (número de acesso: gi 74582795), cuja cobertura de seqüência da proteína alcançou 34%. Neste ensaio, seis peptídeos foram identificados, conforme apresentado na Tabela 5.3. A massa nominal da proteína homóloga foi calculada em 35.552 Da, que está de acordo com a massa molecular aparente estimada para Xyl-O3 em SDS-PAGE (Figura 5.6).



1	MVHLKALASG	TLFASLASSA	VISRQAAASI	NDAFVAHGKK	YFGTCS DQAL
51	LQNSQNEAIV	RADFGQLTPE	NSMKWDALEP	SQGSFSFAGA	DFLADYAKTN
101	NKLVRGHTLV	WHSQLPSWVQ	GITDKDTLTE	VIKNHITTIM	QRYKG QIYAW
151	DVVNEIFDED	GTLRDSVFSQ	VLGEDFVRIA	FETAREADPN	AKLYINDY NL
201	DSADYAKTKG	MVSYVKKWLD	AGVPIDGIGS	QSHYSANGFP	VSGAKGALTA
251	LASTGVSEVA	VTELDIEGAS	SESYLEVVNA	CLDVSSCVGI	TVWGVSDKDS
301	WRSSTSPLLF	DSNYQAKDAY	NAIIDAL		

B

Figura 5.7. Análise por espectrometria em PMF-MALDI-TOF de xilanase Xyl-O3 parcialmente purificada de *A. oryzae* cultivado em PASPT como fonte de carbono (A). Sequência dos peptídeos gerados pela tripsinização da enzima encontrados pela análise de MS contra uma endo-1,4-beta-xilanase de *A. oryzae* RIB40; as letras representando os peptídeos encontrados estão grafadas em negrito (B).

O sequenciamento do peptídeo DSVFSQVLGEDFVR com massa observada de 1598.0613 Da, por MALDI-TOF/TOF MS/MS, confirmou a homologia com a sequência 165–178 identificada na endo-1,4- β -xilanase F1 de *A. oryzae* RIB40 (Figura 5.8 e Quadro 5.4). No Quadro 5.4 estão apresentados 26 íons fragmentados dos 68 obtidos durante o sequenciamento de peptídeo precursor de Xyl-O3 parcialmente purificada.

Tabela 5.3. Massas monoisotópicas $[M + H]^+$ observadas e esperadas de íons selecionados do digesto trípico de Xyl-O3 parcialmente purificada de *A. oryzae*.

Sequência	Massa observada	Massa esperada	Massa calculada	Peptídeo
41–61	2414.4503	2413.4430	2413.1332	K.YFGTCSQALLQNSQNEAIVR.A
145–164	2340.3487	2339.3414	2339.1070	K.GQIYAWDVVNEIFDEDEDGTLR.D
165–178	1598.0613	1597.0540	1596.7784	R.DSVFSQVLGEDFVR.I
193–207	1778.0465	1777.0393	1776.8206	K.LYINDYNLDSADYAK.T
218–245	2830.6322	2829.6249	2829.3722	K.WLDAGVPIDGIGSQSHYSANGFPVSGAK.G
303–317	1658.0141	1657.0068	1656.7995	R.SSTSPLLFDSDNYQAK.D

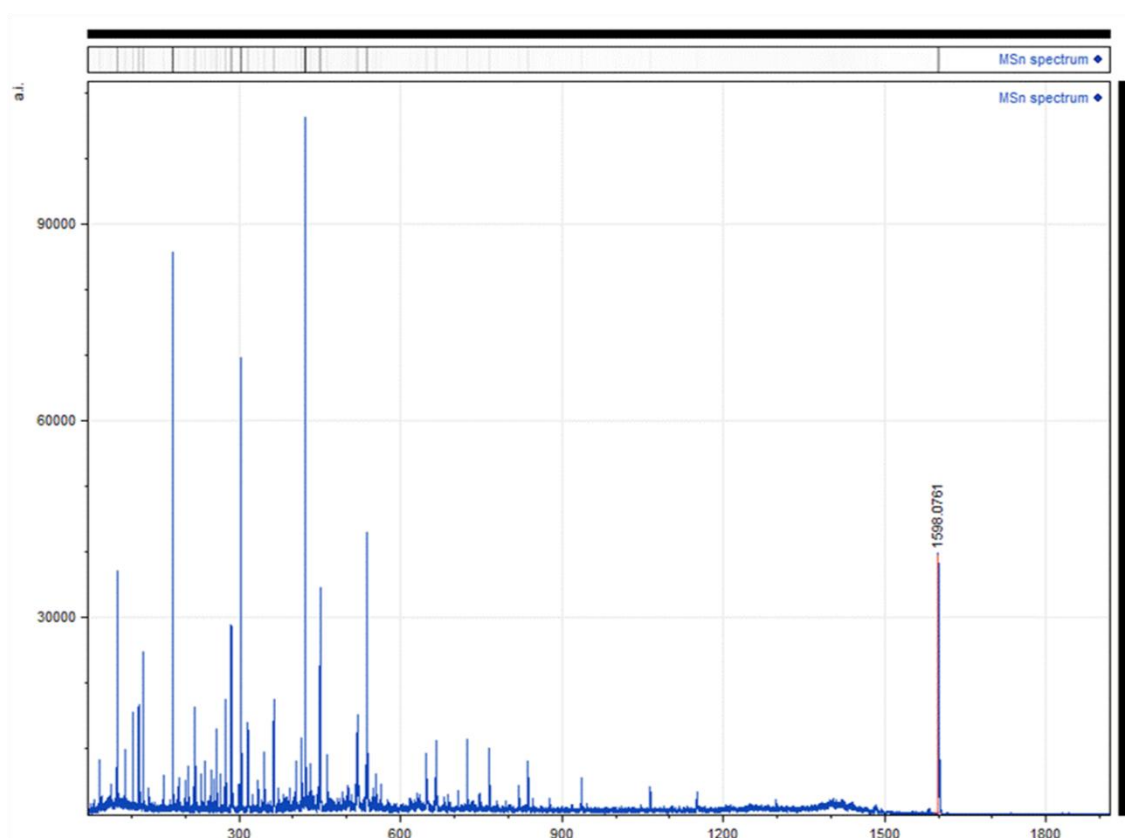


Figura 5.8. Sequenciamento por MALDI-TOF/TOF MS/MS do peptídeo DSVFSQVLGEDFVR com massa observada de 1598.0613 Da obtido a partir do espectro em MALDI-TOF/TOF MS da xilanase Xyl-O3 parcialmente purificada de *A. oryzae* cultivado em PASPT como fonte de carbono.

Quadro 5.4. Sequenciamento e massas monoisotópicas $[M + H]^+$ dos íons fragmentados obtidos do peptídeo precursor DSVFSQVLGEDFVR.

#	a	a*	b	b*	Seq.	y	y*	#
1	88.0393		116.0342		D			14
2	175.0713		203.0662		S	1482.7587	1465.7322	13
3	274.1397		302.1347		V	1395.7267	1378.7001	12
4	421.2082		449.2031		F	1296.6583	1279.6317	11
5	508.2402		536.2351		S	1149.5899	1132.5633	10
6	636.2988	619.2722	664.2937	647.2671	Q	1062.5578	1045.5313	9
7	735.3672	718.3406	763.3621	746.3355	V	934.4993	917.4727	8
8	848.4512	831.4247	876.4462	859.4196	L	835.4308	818.4043	7
9	905.4727	888.4462	933.4676	916.4411	G	722.3468	705.3202	6
10	1034.5153	1017.4888	1062.5102	1045.4837	E	665.3253	648.2988	5
11	1149.5422	1132.5157	1177.5372	1160.5106	D	536.2827	519.2562	4
12	1296.6107	1279.5841	1324.6056	1307.5790	F	421.2558	404.2292	3
13	1395.6791	1378.6525	1423.6740	1406.6474	V	274.1874	257.1608	2
14					R	175.1190	158.0924	1

Dados disponíveis no endereço eletrônico:

http://www.matrixscience.com/cgi/peptide_view.pl?file=.%2Fdata%2F20121120%2FFtEtmxHte.dat&query=1&hit=1&index=gi|74582795&db_idx=1&px=1§ion=5&ave_thresh=45&ignoreionsco_rebelow=0&report=40&sigthresh=0.05&msresflags=1025&msresflags2=2&percolate=-1&percolate_rt=0&minpeplen=7&sessionID=guest_guestsession

Outros estudos envolvendo a identificação de proteínas produzidas por *A. oryzae*, por meio da análise de sequências N-terminais (te Biesebeke et al., 2006) ou por espectrometria em PMF-MALDI-TOF (Oda et al., 2006) não mencionaram a presença da proteína homóloga a Xyl-O3, endo-1,4- β -xilanase F1 pertencente a *A. oryzae* RIB40. Oda et al. (2006) afirmaram que a baixa identificação de proteínas de fungos filamentosos está relacionada à presença de N- e/ou O- glicosilações que tornam estas proteínas resistentes à proteólise. Entretanto, a identificação de Xyl-O3 neste trabalho foi realizada sem que houvesse a necessidade de incluir etapa adicional de desglicosilação no preparo da amostra.

Ainda em termos de caracterização eletroforética, na Figura 5.9 é visualizado o perfil de migração aparente relativo à CM-celulase Cel-O1 parcialmente purificada da fração concentrado PM-10 do EB de *A. oryzae*. Na Figura 5.9A, nas raias 2 e 3 estão marcadas pelas setas em vermelho, as bandas coradas por prata com massas moleculares aparentes de 42,9 e 40,4 kDa, respectivamente. A confirmação da atividade de CM-celulase está mostrada na

Figura 5.9B, referente à SDS-PAGE co-polimerizado com solução de CM-celulose 0,1%., cuja banda translúcida também está sinalizada por uma seta em vermelho.

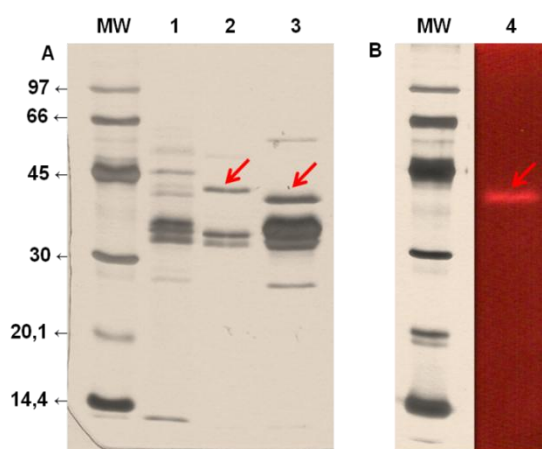


Figura 5.9. SDS-PAGE (12%) co-polimerizado com solução de CM-celulose 0,1% para detecção da enzima Cel-O1 parcialmente purificada da fração concentrado do EB de *A. oryzae* cultivado em PASPT, corado com nitrato de prata (A) ou revelado por solução de vermelho congo 0,1% (B). MW – marcadores de massa molecular contendo as seguintes proteínas: fosforilase B (97 kDa), soroalbumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa); Linha 1: P1–SDG50, referente a frações reunidas após cromatografia de filtração em gel em resina do tipo *Sephadex G-50*; Linhas 2 e 3: frações de número 80 e 82 obtidas após cromatografia de troca iônica em resina do tipo *Q-Sepharose*; Linha 4: Cel-O1 parcialmente purificada. As bandas sinalizadas pelas setas em vermelho representam Cel-O1 parcialmente purificada.

No entanto, a massa molecular aparente que identifica de maneira exata entre as bandas de 42,9 e 40,4 kDa, qual a banda corada por prata representa de fato Cel-O1 parcialmente purificada, somado à definição da presença ou não de isoformas e/ou isoenzimas na amostra, poderão ser confirmadas por eletroforese bidimensional e por espectrometria em PMF-MALDI-TOF, a serem realizadas posteriormente. Entretanto, o valor de massa molecular aparente referente à banda de 42,9 kDa, foi coerente ao valor encontrado por Youssef (2011) de 45 kDa, para CM-celulase produzida por *A. oryzae* AG1 cultivado em soro residual do processamento de queijos.

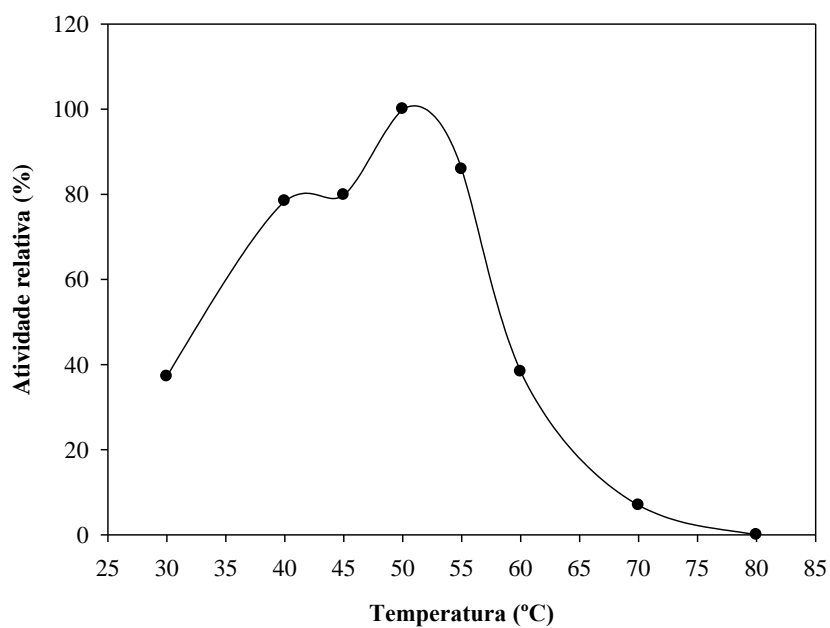
Inversamente aos resultados apresentados neste trabalho, Yamane et al. (2002) verificaram a presença de pelo menos três celulasas com massas moleculares de 62, 120 e 34 kDa, respectivamente, que foram produzidas por *A. oryzae* RIB128 quando cultivado em farelo de trigo em estado sólido. Além disto, os autores verificaram também, que a produção

de celulases por *A. oryzae* foi mais eficiente para cultivos em estado sólido do que para cultivos submersos. Ou seja, a presença de uma única banda referente à Cel-O1 parcialmente purificada (Figura 5.9B) pode indicar que, o cultivo submerso de *A. oryzae* em PASPT não ofereceu as condições mais adequadas para uma expressiva produção de enzimas do grupo das celulases.

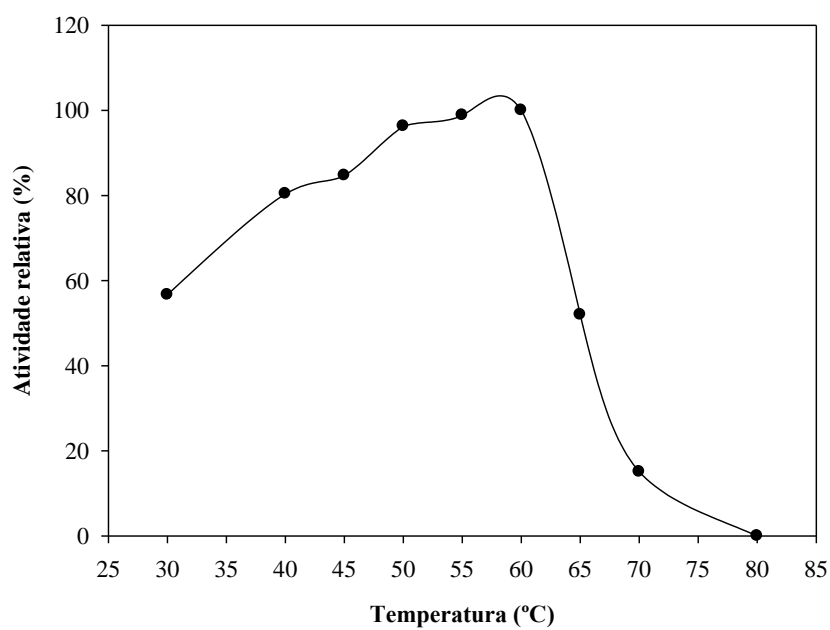
5.3.3. Resultados preliminares para a caracterização das enzimas Xyl-O2, Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas

Os resultados apresentados a seguir referem-se a parâmetros catalíticos como efeito da temperatura e do pH sobre a atividade de xilanase destas enzimas, somado à ensaios de termoestabilidade. Na Figura 5.10 é apresentado o efeito da temperatura sobre a atividade de xilanase das amostras enzimáticas Xyl-O2 purificada e Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas, respectivamente. Conforme observado na Figura 5.10A, a amostra Xyl-O2 purificada apresentou duas regiões de melhor atividade catalítica, sendo a primeira entre 40 e 45°C e a segunda a 50°C representando o valor de temperatura onde a atividade de xilanase foi mais expressiva. Na faixa de 40 a 45°C a atividade da amostra Xyl-O2 permaneceu em torno de 80%. Em relação ao parâmetro efeito da temperatura, Xyl-O2 purificada apresentou um perfil de atividade relativa em função da temperatura semelhante ao apresentado pela enzima Xyl-O1 purificada referida no Capítulo 4 desta Tese. Ambas as enzimas foram mais ativas a 50°C e mantiveram-se termoestáveis na faixa de 40 a 55°C com atividade enzimática próxima a 80%.

Na Figura 5.10B foi observada uma faixa de temperatura de 50 a 60°C representando a melhor atividade catalítica para a amostra Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificada, sendo que o valor máximo alcançado para a atividade desta amostra foi de 60°C. A atividade desta amostra foi consideravelmente reduzida à 65°C, contudo ainda permaneceu com uma eficiência de 60%. Os resultados apresentados para ambas as amostras enzimáticas estão de acordo com os dados disponíveis para xilanases, principalmente as produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, cujas enzimas mostraram melhor eficiência catalítica para temperaturas no intervalo de 42 a 60°C (Kulkarni et al., 1999; Beg et al., 2001; de Vries e Visser, 2001; Polizeli et al., 2005).



A



B

Figura 5.10. Efeito da temperatura sobre a atividade xilanolítica das amostras enzimáticas Xyl-O2 purificada (A) e Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas (B). Detalhes experimentais estão disponíveis no texto.

Estes resultados também estão de acordo aos encontrados para β -xilanases produzidas por *A. oryzae* KBN 616 em ensaios de superexpressão de genes específicos para xilanases (Kitamoto et al., 1999; Kimura et al., 2000; Kimura et al., 2002).

Os efeitos de três pH diferentes foram analisados para as amostras Xyl-O2 purificada e Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas e estão apresentados na Figura 5.11.

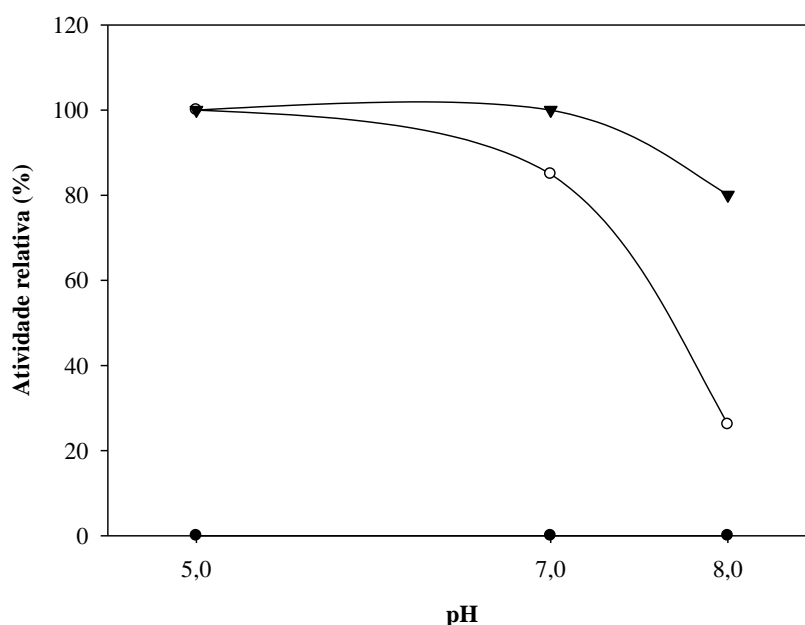


Figura 5.11. Efeito do pH sobre a atividade xilanolítica das amostras enzimáticas, Xyl-O2 purificada [—●—] e Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas, diluídas em tampão PBS 25 mmol.L⁻¹, pH 7,0 [—○—] ou Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas, diluídas em tampão tris-HCl 25 mmol.L⁻¹, pH 8,2 [—▼—]. Detalhes experimentais estão disponíveis no texto.

Neste ensaio, três valores de pHs foram selecionados para esta análise e a justificativa para a escolha foi porque tais valores são comumente utilizados em cromatografias e também porque diversas xilanases purificadas, normalmente, estavam diluídas em tampões com os respectivos valores de pHs. Ou seja, a interferência de determinado tampão ou mesmo o valor de pH na atividade de xilanase das amostras enzimáticas seriam conhecidos e controlados com maneira a manter a eficiência da catálise durante o manuseio de cada amostra, principalmente nas etapas de fracionamentos seguintes. Assim, na Figura 5.11 foi visualizado que a amostra Xyl-O2 purificada foi completamente inativa em presença dos três tampões (acetato de sódio, PBS ou tris-HCl), todos na concentração final de 50 mmol.L⁻¹. Este resultado em um primeiro momento pode ser explicado por tratar-se de uma amostra com

baixa atividade de xilanase e que durante o ajuste para a inserção do volume dos referidos tampões na mistura final do ensaio, a atividade da amostra tenha sido diluída a valores praticamente nulos. Cabe mencionar que no ensaio padrão para dosagem de atividade xilanolítica, são utilizados 25 μL de solução de enzimas para 50 μL de solução de substrato. Conforme descrito no Capítulo 2 desta Tese, os volumes foram ajustados para apenas 12,5 μL de solução de enzimas e apenas 25 μL de solução de substrato, somado aos 37,5 μL referente ao tampão adicionado. Diante disto, é possível que a atividade xilanolítica da amostra tenha sido realmente diluída.

Na Figura 5.11 também é apresentado o efeito do pH sobre a amostra Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas, quando solubilizada em tampão PBS, mostrando que a atividade xilanolítica da amostra permaneceu estável em tampão acetato de sódio pH 5,0. Inversamente, nos tampões PBS e tris-HCl a atividade foi reduzida para aproximadamente 80 e 25%, respectivamente. Entretanto, a amostra solubilizada em tampão tris-HCl mostrou eficiência de catálise superior a 80% em presença dos três tampões analisados, sendo que a amostra permaneceu 100% estável quando ensaiada na presença dos tampões acetato de sódio e PBS. Diante deste resultado, é possível inferir que a amostra Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas mantém-se mais estável quando solubilizada em tampão tris-HCl.

A eficiência catalítica da amostra Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas, verificada em pH 5,0 está mais uma vez de acordo com outros trabalhos de caracterização enzimática para β -xilanases disponíveis na literatura. β -xilanases de diferentes organismos são comumente estáveis em um amplo intervalo de pH (3,0–10,0) e mostram pH ótimo variando de 4,0–7,0 (Kulkarni et al., 1999). Para xilanases de fungos do gênero *Aspergillus* o intervalo de pH de maior eficiência foi de 2,0–8,0 (de Vries e Visser, 2001; Taneja et al., 2002; Polizeli et al., 2005). Xilanases superexpressas por *A. oryzae* KBN616 também apresentaram pH ótimo igual a 5,0 (Kitamoto et al., 1999; Kimura et al., 2002) ou pH 6,0 (Kimura et al., 2000).

Ensaio de termoestabilidade revelaram que a amostra Xyl-O2 purificada foi completamente termolábil e sua atividade catalítica foi reduzida a apenas 9% a 50°C, após a primeira 1 h de pré-incubação (Figura 5.12). Este resultado, semelhante ao observado no parâmetro efeito do pH, diferencia Xyl-O2 de Xyl-O1, uma vez que, a última permaneceu termoestável por 5 h a 50°C com atividade enzimática superior a 60%, conforme descrito no Capítulo 4 desta Tese. A amostra Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificada, solubilizada em tampão PBS, permaneceu estável a 50°C durante 6 h de pré-incubação, mantendo a atividade

de xilanase em torno de 60% (Figura 5.12). Após 24 h, a atividade residual foi reduzida a zero. Confirmando a maior estabilidade da amostra Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificada, solubilizada em tampão tris-HCl, foi observado uma manutenção da atividade de xilanase superior a 80% quando submetida à pré-incubação de 6 h a 50°C. Após 24 h, a atividade residual se manteve próxima de 40% (Figura 5.12).

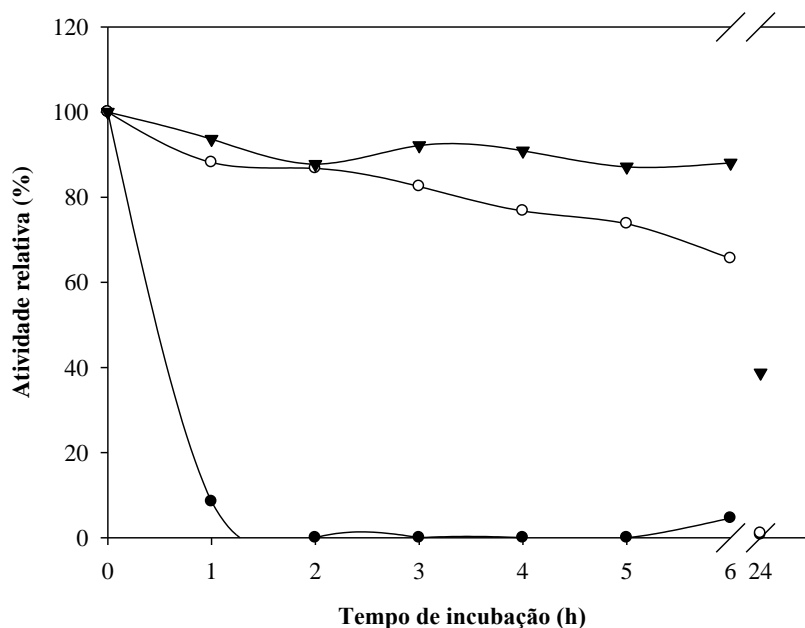
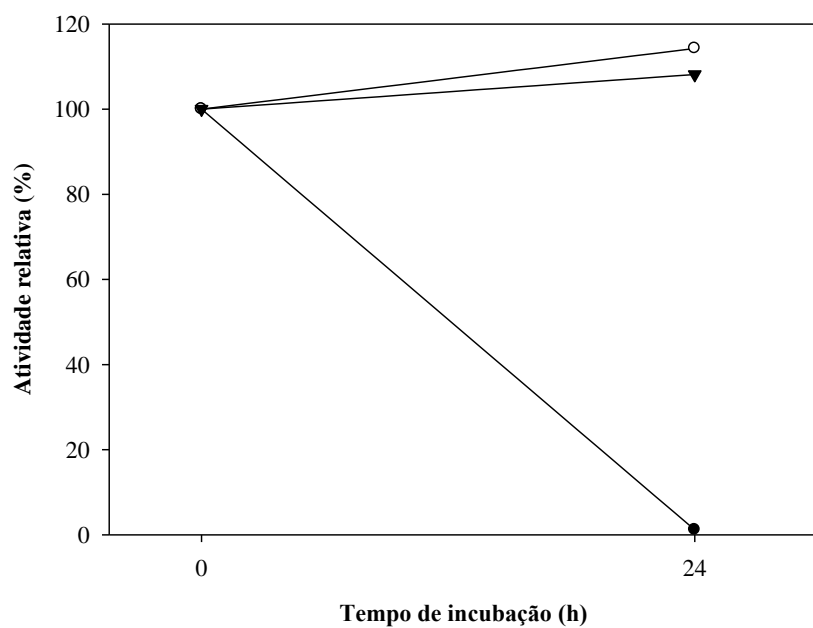
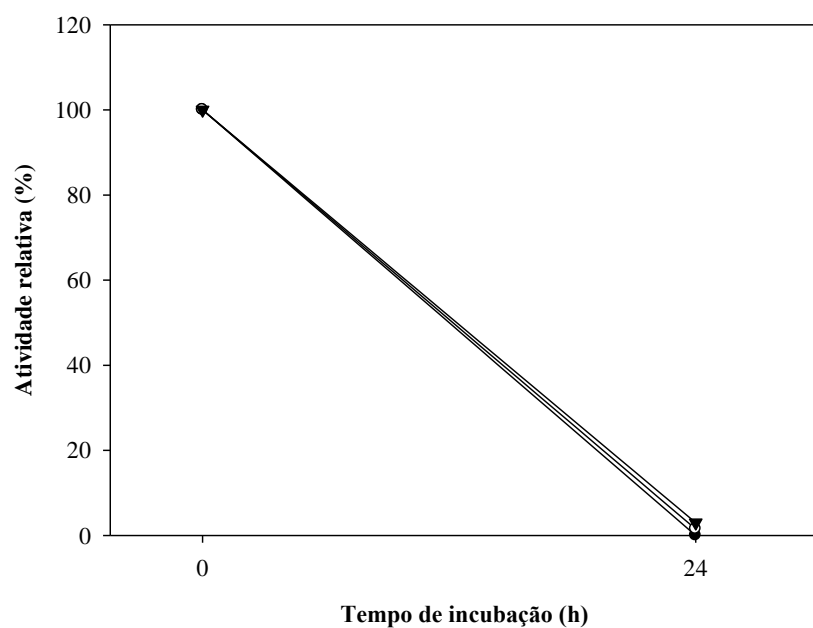


Figura 5.12. Efeito do tempo de incubação na termoestabilidade de Xyl-O2 purificada [—●—] e Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificada, em tampão PBS pH 7,0 [—○—] ou em tampão tris-HCl pH 8,2 [—▼—]. A estabilidade foi quantificada pela manutenção de volumes das amostras enzimáticas a 50°C por 24 h.

A termoestabilidade das amostras enzimáticas também foi avaliada nas temperaturas de 40 ou 60°C por 24 h, conforme apresentado na Figura 5.13. Nestas condições, a amostra Xyl-O2 purificada foi termolábil a 40°C, mantendo apenas cerca de 1% da atividade xilanolítica inicial no período de 24 h (Figura 5.13A). Inversamente, a amostra Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificada, solubilizada em tampão PBS ou tris-HCl, manteve-se termoestável com atividade xilanolítica residual superior a 100% após 24 h de pré-incubação a 40°C (Figura 5.13A). E finalmente, as amostras enzimáticas quando pré-incubadas a 60°C por 24 h foram completamente termolábeis (Figura 5.13B).



A



B

Figura 5.13. Efeito do tempo de incubação na termoestabilidade de Xyl-O2 purificada [—●—] e Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificada, em tampão PBS pH 7,0 [—○—] ou em tampão tris-HCl pH 8,2 [—▼—]. A estabilidade foi quantificada pela manutenção de volumes das amostras enzimáticas a 40°C (A) ou 60°C (B), por 24 horas.

5.4. CONCLUSÕES

Os resultados preliminares alcançados neste trabalho confirmam que *A. oryzae* produziu de maneira eficiente pelo menos quatro isoenzimas com atividade xilanolítica e uma enzima com atividade de CM-celulase, quando cultivado em piolho de algodão sujo como fonte de carbono por 6 dias a 28°C.

- 1) A isoenzima Xyl-O2 foi eficientemente purificada e possuiu massa molecular aparente semelhante à isoenzima Xyl-O1 descrita no Capítulo 4 desta Tese; entretanto, resultados de caracterização enzimática parcial não foram suficientes para confirmar a similaridade ou as discrepâncias entre as duas;
- 2) A identificação da isoenzima Xyl-O3 parcialmente purificada foi confirmada por uma xilanase homóloga referida como endo-1-4- β -xilanase pertencente a *A. oryzae* RIB40 com massa molecular próxima a 35 kDa.
- 3) A amostra Xyl-O3/Xyl-O4 permaneceu estável à 40°C por 24 h; a atividade também é mais estável quando a amostra é solubilizada em tampão tris-HCl em comparação ao tampão PBS.

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreas, J.; Filho, E. X. F.; Bon, E. P. S., Biotechnology of Holocellulose-Degrading Enzymes. In *Biocatalysis and Bioenergy*, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, 2008; pp 195-229.
- Bailey, M. J.; Viikari, L., Production of xylanases by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylan-based media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **1993**, *9*, 80-84.
- Beg, Q. K.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G. S., Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2001**, *56*, 326-338.
- Bennett, J. W., Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology* **1998**, *66*, 101-107.
- Bon, E. P. S.; Costa, R. B.; Silva, M. V. A.; Ferreira-Leitão, V. S.; Freitas, S. P.; Ferrara, M. A., Mercado e perspectivas de uso de enzimas industriais e especiais no Brasil. In *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*, Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A.; Corvo, M. L., Eds. Interciência: Rio de Janeiro, 2008; pp 463-488.
- Cantarel, B. L.; Coutinho, P. M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrissat, B., The Carbohydrate-Active Enzymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* **2009**, *37*, D233-238.
- Cerri e Silva, C. H.; Puls, J.; Sousa, M. V.; Filho, E. X. F., Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Revista de Microbiologia* **1999**, *30*, 114-119.
- Cullen, D.; Kersten, P., Fungal enzymes for lignocellulose degradation. In *Applied molecular genetics of filamentous fungi*, 1 ed.; Kinghorn, J. R.; Turner, G., Eds. New York, 1992; pp 100-131.
- de Vries, R. P.; Visser, J., *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2001**, *65*, 497-522.
- Dillon, A. J. P., Celulases. In *Enzimas como agentes biotecnológicos*, 1ª ed. ed.; Said, S.; Pietro, R. C. L. R., Eds. Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004; pp 243-269.
- Fang, H.-Y.; Chang, S.-M.; Lan, C.-H.; Fang, T. J., Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. *Process Biochemistry* **2008**, *43*, 49-55.
- Gomi, K., *Aspergillus: Aspergillus oryzae*. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, Richard, K. R., Ed. Elsevier: Oxford, 1999; pp 66-72.
- Ito, K.; Ogasawara, H.; Sugimoto, T.; Ishikawa, T., Purification and Properties of Acid Stable Xylanases from *Aspergillus kawachii*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1992**, *56*, 547-550.

Kimura, T.; Kitamoto, N.; Kito, Y.; Karita, S.; Sakka, K.; Ohmiya, K., Molecular cloning of xylanase gene xynG1 from *Aspergillus oryzae* KBN 616, a shoyu koji mold, and analysis of its expression. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **1998**, *85*, 10-16.

Kimura, T.; Suzuki, H.; Furuhashi, H.; Aburatani, T.; Morimoto, K.; Karita, S.; Sakka, K.; Ohmiya, K., Molecular Cloning, Overexpression, and Purification of a Major Xylanase from *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2000**, *64*, 2734-2738.

Kimura, T.; Suzuki, H.; Furuhashi, H.; Aburatani, T.; Morimoto, K.; Sakka, K.; Ohmiya, K., Molecular Cloning, Characterization, and Expression Analysis of the xynF3 Gene from *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2002**, *66*, 285-292.

Kitamoto, N.; Go, M.; Shibayama, T.; Kimura, T.; Kito, Y.; Ohmiya, K.; Tsukagoshi, N., Molecular cloning, purification and characterization of two endo-1,4- β -glucanases from *Aspergillus oryzae* KBN616. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1996**, *46*, 538-544.

Kitamoto, N.; Yoshino, S.; Ohmiya, K.; Tsukagoshi, N., Purification and Characterization of the Overexpressed *Aspergillus oryzae* Xylanase, XynF1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1999**, *63*, 1791-1794.

Kulkarni, N.; Shendye, A.; Rao, M., Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* **1999**, *23*, 411-456.

Kumar, R.; Singh, S.; Singh, O., Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2008**, *35*, 377-391.

Mishra, M.; Thakur, I. S., Purification, characterization and mass spectroscopic analysis of thermo-alkalotolerant β -1,4 endoxylanase from *Bacillus* sp. and its potential for dye decolorization. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2011**, *65*, 301-308.

Oda, K.; Kakizono, D.; Yamada, O.; Iefuji, H.; Akita, O.; Iwashita, K., Proteomic Analysis of Extracellular Proteins from *Aspergillus oryzae* Grown under Submerged and Solid-State Culture Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **2006**, *72*, 3448-3457.

Polizeli, M. L. T. M.; Rizzatti, A. C. S.; Monti, R.; Terenzi, H. F.; Jorge, J. A.; Amorim, D. S., Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2005**, *67*, 577-591.

Sá-Pereira, P.; Paveia, H.; Costa-Ferreira, M.; Aires-Barros, M., A new look at xylanases. *Molecular Biotechnology* **2003**, *24*, 257-281.

Subramaniyan, S.; Prema, P., Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application. *Critical Reviews in Biotechnology* **2002**, *22*, 33-64.

Taneja, K.; Gupta, S.; Chander Kuhad, R., Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99. *Bioresource Technology* **2002**, *85*, 39-42.

te Biesebeke, R., Molecular analysis and improvement of protein production of *Aspergillus oryzae* grown on solid substrates. Wageningen University, Wageningen, 2005.

te Biesebeke, R.; Boussier, A.; van Biezen, N.; van den Hondel, C. A. M. J. J.; Punt, P. J., Identification of secreted proteins of *Aspergillus oryzae* associated with growth on solid cereal substrates. *Journal of Biotechnology* **2006**, *121*, 482-485.

von Gal Milanezi, N.; Mendoza, D.; Siqueira, F.; Silva, L.; Ricart, C.; Filho, E., Isolation and characterization of a xylan-degrading enzyme from *Aspergillus niger* van Tieghem LPM 93 with potential for industrial applications. *BioEnergy Research* **2012**, *5*, 363-371.

Yamane, Y.-I.; Fujita, J.; Izuwa, S.; Fukuchi, K.; Shimizu, R.-I.; Hiyoshi, A.; Fukuda, H.; Mikami, S.; Kizaki, Y.; Wakabayashi, S., Properties of cellulose-degrading enzymes from *Aspergillus oryzae* and their contribution to material utilization and alcohol yield in sake mash fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2002**, *93*, 479-484.

Youssef, G. A., Physiological studies of cellulase complex enzymes of *Aspergillus oryzae* and characterization of carboxymethyl cellulase. *African Journal of Microbiology Research* **2011**, *5*, 1311-1321.

Capítulo VI

*Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar e de polpas de celulose por holocelulases produzidas por *Aspergillus oryzae* cultivado em resíduo da indústria têxtil*

6.1. RESUMO

A hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos constitui uma alternativa econômica e ambientalmente correta de melhorar o aproveitamento de açúcares fermentescíveis nas biorefinarias. A utilização de holocelulases para a produção de bioetanol e em etapas de biobranqueamento de papel são exemplos concretos da importância do domínio da degradação da biomassa lignocelulósica. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo utilizar amostras enzimáticas com atividade xilanolítica, produzidas por *Aspergillus oryzae*, na degradação de dois substratos lignocelulósicos: bagaço de cana-de-açúcar não-tratado (BCNT) ou pré-tratado e polpas de celulose (PC) obtidas durante o processo *Kraft* de branqueamento do papel. A análise química composicional das amostras de BCNT revelou que os percentuais referentes à holocelulose variaram de 70% para a amostra BCNT, 64,9% para o bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado por ácido (BCHA) e de 62,6% para o bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor (BCEV). Para as polpas de celulose os percentuais foram de 85,2% para polpa escura (PCE), 78,2% para polpa deslignificada por O₂ (PCPB) e de 77,2% para polpa branca (PCB). As holocelulases presentes na amostra do EB de *A. oryzae* foram mais eficientes em hidrolisar o BCEV liberando 0,398 mg.mL⁻¹ de açúcar redutor após 96 h de incubação a 50°C e agitação de 150 rpm. Na degradação das polpas de celulose, a amostra Xyl-O1 purificada foi mais eficiente sobre PCB com a liberação de 0,168 mg.mL⁻¹ de açúcar redutor após incubação a 28°C e agitação de 120 rpm. A maior liberação de cromóforos a 237 nm sugere uma remoção de cor das polpas de celulose catalisada pelas amostras enzimáticas e indica que houve uma mobilização de lignina. Xilobiose foi o produto de hidrólise de maior predominância liberado para os dois grupos de substratos testados. Palavras-chave: Biomassa lignocelulósica; pré-tratamento; pentose; xilooligômeros

6.2. INTRODUÇÃO

A hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos, catalisada por holocelulases, tem ganhado grande importância nos cenários econômico e ambiental. Segundo Himmel et al. (1999), o foco principal da biotecnologia no segundo milênio será otimizar a eficiente conversão enzimática da biomassa lignocelulósica renovável em açúcares fermentescíveis, os quais poderão ser convertidos em produtos com valor agregado.

O elevado custo de produção destas enzimas dificulta a eficiente aplicação destes catalisadores em diversos ramos industriais, como na produção de biocombustíveis (bioetanol), de alimentos e bebidas, de ração animal, no processamento de fibras têxteis, nas indústrias de polpa e papel, de cosméticos e mais recentemente na catálise ambiental (Bon et al., 2008). Neste sentido, a degradação da biomassa lignocelulósica encontrada nos resíduos agroindustriais para a produção de enzimas por fungos filamentosos, constitui uma alternativa viável e de baixo custo que torna a aplicação destes catalisadores mais atrativa comercialmente.

Conforme apresentado nos capítulos anteriores desta Tese, as holocelulases produzidas por *Aspergillus oryzae*, quando cultivado em resíduo da indústria têxtil piolho de algodão sujo, são representadas por diversas isoenzimas do grupo das β -xilanases, pectinases, β -mananases e CM-celulases, as quais podem ser aplicadas em inúmeros processos biotecnológicos.

Um setor industrial com grandes potencialidades de aplicações destas enzimas está na produção de biocombustíveis. De todos os biocombustíveis, o bioetanol é considerado uma alternativa promissora e esperado que assuma o *status* de biocombustível renovável dominante no setor de transportes nos próximos 20 anos (Hahn-Hägerdal et al., 2006). Estimativas indicam que o mercado mundial do bioetanol deve alcançar 100×10^9 litros em 2015. Os maiores produtores mundiais são os EUA, Brasil e China. Em 2009, os EUA produziram $39,5 \times 10^9$ litros de bioetanol utilizando o milho como matéria prima, enquanto o Brasil, segundo maior produtor, cerca de 30×10^9 litros foram produzidos utilizando a cana-de-açúcar. A China também tem despendido grandes investimentos na produção de bioetanol, e atualmente configura com um dos maiores produtores (Ivanova et al., citada por Bhatia et al., 2012).

O bioetanol se destaca como biocombustível devido a algumas propriedades como o teor de 35% de oxigênio, que resulta na completa combustão do combustível, diminuindo as emissões de gases tóxicos. Além disso, a produção de bioetanol utiliza energia de fontes renováveis; portanto quantidades reduzidas de dióxido de carbono (CO₂) são adicionadas ao ambiente, por conseqüência, reduzindo as emissões de gases do efeito estufa. O bioetanol ainda pode ser queimado com grande eficiência produzindo pequenas quantidades de precursores de ozônio (reduzindo a poluição do ar urbano) e é particularmente benéfico em relação à deposição de CO₂ na atmosfera (Bhatia et al., 2012). Entretanto, conforme mencionado acima, a produção atual de bioetanol em grande escala é alcançada pela fermentação de açúcares solúveis extraídos de produtos agrícolas como a cana-de-açúcar, milho, açúcar de beterraba e mandioca (Goldemberg, 2008). Embora possa ser visto como benéfico a utilização de material vegetal renovável para a produção de biocombustíveis, o uso de culturas agrícolas e outras biomassas, pode resultar no aumento das preocupações sobre problemas ambientais, incluindo estoques de alimentos e a destruição dos solos cultiváveis (Balat e Balat, 2009). Uma alternativa para a resolução deste problema seria utilizar enzimas holocelulolíticas na sacarificação total ou parcial da biomassa lignocelulósica presente nos resíduos agroindustriais, principalmente do bagaço de cana-de-açúcar, contribuindo consideravelmente na produção de um bioetanol de segunda geração. Entretanto, um obstáculo primário a utilização da biomassa lignocelulósica é a ausência de tecnologias de baixo custo, eficientes em romper a recalcitrância destes materiais (Lynd et al., 2005). A proposta atual para superar a recalcitrância natural de substratos complexos, semelhantes ao bagaço de cana-de-açúcar, é a inclusão de etapas de pré-tratamento como a hidrólise em ácidos diluídos ou a explosão a vapor (Sun e Cheng, 2002), juntamente à exploração do sinergismo entre as diversas atividades catalíticas componentes das holocelulases (Moreira et al., 2012). A possibilidade de aplicação destas enzimas pode representar, direta ou indiretamente, vantagens estratégicas, econômicas e ambientais aos países interessados em reduzir a dependência internacional pelos produtos de origem fóssil, somado a redução das emissões de gases-estufa (Adsul et al., 2005; Neves et al., 2007).

Outro setor industrial onde a utilização de holocelulases, principalmente xilanases, tem despertado grande interesse é o de branqueamento de papel, nas indústrias de polpa e papel. Durante a manufatura do papel, como etapa inicial ocorre a polpação que consiste no cozimento de cavacos de madeira em solução de sulfeto de sódio/hidróxido de sódio a 170°C por duas horas resultando na degradação e solubilização da lignina (Subramaniyan e Prema,

2002). Neste processo, parte da lignina solubilizada, comumente se liga a polímeros residuais de hemicelulose que precipitam novamente sobre as fibras de celulose, resultando em uma polpa de cloração escura. Este material, por sua vez, deverá ser submetido a etapas adicionais de clareamento, a base de reagentes clorados (gases cloro e dióxido de cloro), caso seja requerido uma polpa com alta qualidade e brilho. A aplicação de xilanases livres de atividade celulolítica (Kulkarni e Rao, 1996), resultaria em uma polpa resistente com menor necessidade de etapas de clareamento, reduzindo a liberação de efluentes tóxicos no ambiente. Conforme mencionado por Duran et al. (2008), atribui-se o papel das xilanases ao rompimento de ligações $\beta(1-4)$ glicosídicas do heteropolissacarídeo de xilana, tornando a estrutura da polpa de celulose mais flexível para uma melhor extração da lignina, conseqüentemente, reduzindo o consumo de cloro e seus derivados nos diferentes estágios de branqueamento.

Diante das inúmeras possibilidades de aplicações das holocelulases produzidas por *A. oryzae*, este trabalho teve como objetivo verificar a eficiência de hidrólise destas enzimas sobre substratos como o bagaço de cana-de-açúcar não-tratado ou pré-tratados e polpas de celulose obtidas em diferentes estágios do processo *Kraft* de fabricação de papel.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Caracterização dos substratos lignocelulósicos quanto à composição química

A análise química composicional de substratos lignocelulósicos pode fornecer informações de suma importância quanto ao perfil de produtos de hidrólise enzimática liberados durante a atividade de holocelulases. Estas informações podem direcionar futuras aplicações destas enzimas na degradação total ou parcial dos polissacarídeos componentes da biomassa lignocelulósica, melhorando a eficiência econômica, tecnológica e ambiental para a obtenção de produtos como o bioetanol ou nas indústrias de polpa e papel. Neste sentido, as Tabelas 6.1, 6.2 e 6.3 expõem os resultados obtidos para a análise química composicional do bagaço de cana-de-açúcar (BCNT e BCHA ou BCEV pré-tratados).

Tabela 6.1. Análise química composicional do BCNT obtido junto à Usina Vale do Rosário.

Componentes do substrato	(%) em massa
Celulose	43,8 ± 1,1
Hemicelulose	25,8 ± 0,8
Lignina Total	22,1 ± 0,8
Cinzas	1,4 ± 0,2
Extrativos (Ciclo-hexano/etanol 2:1)	6,1 ± 0,3
Total	99,2 ± 0,8

Fonte: Dados gentilmente fornecidos pelos pesquisadores Edgardo Olivares Gómez e George Jackson, membros do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE).

Os resultados expostos na Tabela 6.1 mostram que o teor de holoceluloses encontrado no BCNT corresponde a 69,6% dos componentes totais. O percentual de lignina total foi de 22,1%. O teor de extrativos foi representado por 6,1%. Os valores percentuais referentes aos principais componentes poliméricos do BCNT estão de acordo com outros autores que também enfatizaram o maior percentual para holoceluloses (Howard et al., 2003; Saha, 2003; Reddy e Yang, 2005; Sánchez, 2009). O percentual em torno de 70% para a fração de holocelulose indica o expressivo potencial de BCNT como fornecedor de polissacarídeos disponíveis para serem sacarificados e, posteriormente, fermentados para a obtenção de bioetanol. No entanto, o percentual de 22,1% referente à lignina caracteriza o BCNT como um material lignocelulósico de difícil degradação, uma vez que, as propriedades recalcitrantes das biomassas estão em sua maioria relacionadas ao teor de lignina. Segundo Howard et al.

(2003), dos três componentes principais que compõem a biomassa lignocelulósica, a lignina é o mais recalcitrante para ser degradado.

Neste sentido, são inúmeras as tentativas de rompimento da recalcitrância destes materiais, comumente baseadas na inclusão de metodologias de pré-tratamento da biomassa. No caso do bagaço de cana-de-açúcar, duas técnicas são particularmente importantes: a hidrólise por ácido sulfúrico diluído e a explosão a vapor. Nas Tabelas 6.2 e 6.3 estão expostos os resultados da análise química após pré-tratamento do BCNT por hidrólise por ácido sulfúrico diluído e explosão a vapor, respectivamente.

Tabela 6.2. Análise química composicional do BCNT em comparação ao bagaço BCHA.

Componentes do substrato	(% em massa)	
	BCNT	BCHA
Celulose	43,4 ± 0,8	58,4 ± 1,4
Hemicelulose	27,3 ± 0,6	6,5 ± 0,3
Lignina Total	22,3 ± 0,2	32,0 ± 0,2
Cinzas	3,1 ± 0,1	2,9 ± 0,3
Extrativos (Ciclo-hexano/etanol 2:1)	4,5 ± 0,3	ND
Total	100,6 ± 0,5	99,3 ± 0,6

Fonte: Dados gentilmente fornecidos pelos pesquisadores Edgardo Olivares Gómez e George Jackson, membros do CTBE.

Conforme observado, ambas as metodologias utilizadas no pré-tratamento de BCNT resultaram em um aumento percentual para celulose, sendo que em BCNT o valor correspondia a 43,4% e depois de submetido à hidrólise por ácido sulfúrico passou a 58,4% (Tabela 6.2). Para BCEV os percentuais antes e depois do pré-tratamento foram de 43,8 e 53,7%, respectivamente (Tabela 6.3). Inversamente, ambas as metodologias reduziram o teor de hemicelulose, sendo que para o BCHA o percentual foi reduzido de 27,3 para 6,5%; enquanto para o BCEV a redução foi de 25,8 para 8,9%. Estes resultados indicam que as duas metodologias foram eficientes na remoção de lignina, como consequência de uma maior mobilização da fração hemicelulose, traduzida como maior disponibilidade de monossacarídeos. Segundo Balat (2011), tanto a hidrólise por ácido sulfúrico quanto a explosão a vapor são caracterizadas por melhorarem a exposição da celulose à digestão enzimática (mesmo aumentando em contrapartida a cristalinidade inicial), bem como

umentam a degradação da fração hemicelulose e ainda são eficazes na promoção de deslignificação da lignocelulose.

Tabela 6.3. Análise química composicional do BCNT em comparação ao bagaço BC23EV.

Componentes do substrato	(% em massa)	
	BCNT	BCEV
Celulose	43,8 ± 1,1	53,7 ± 0,6
Hemicelulose	25,8 ± 0,8	8,9 ± 0,1
Lignina Total	22,1 ± 0,8	32,3 ± 0,3
Cinzas	1,4 ± 0,2	5,5 ± 0,2
Extrativos (Ciclo hexano/etanol 2:1)	6,1 ± 0,3	ND
Total	99,2 ± 0,8	100,3 ± 0,4

Fonte: Dados gentilmente fornecidos pelos pesquisadores Edgardo Olivares Gómez e George Jackson, membros do CTBE.

Os resultados da análise química composicional para as polpas de celulose (PCE, PCPB e PCB) estão expostos na Tabela 6.4. É possível observar que, o teor de celulose se destacou como constituinte prioritário nas três polpas, correspondendo a 85,2; 78,2 e 77,2%, respectivamente. O maior percentual de celulose apresentado pela polpa PCE parece sugerir que, durante o cozimento dos cavacos de madeira em condições alcalinas e temperaturas superiores a 170°C, ocorra uma maior exposição polimérica das fibras de celulose, em um processo semelhante ao visualizado para o bagaço BCNT submetido ao pré-tratamento de explosão a vapor.

Inversamente, nas três polpas, o teor de hemicelulose foi o parâmetro que apresentou menores percentuais, dentre os outros analisados (Tabela 6.4). Segundo Bajpai e Bajpai (1997), no processo *Kraft* objetiva-se a degradação e solubilização da lignina que se encontra possivelmente aderida de maneira covalente à fração hemicelulose. Ou seja, os menores percentuais para a hemicelulose indicam a degradação desta fração de heteropolissacarídeos e maior disponibilidade de açúcares monoméricos (pentoses).

Tabela 6.4. Análise química composicional das polpas de celulose, escura (PCE), deslignificada por O₂ (PCPB) e branca (PCB)

Componentes do substrato	(% em massa)		
	PCE	PCPB	PCB
Celulose	85,2 ± 0,3	78,2 ± 1,9	77,2 ± 1,2
Hemicelulose	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,4	6,7 ± 0,2
Lignina	10,3 ± 0,5	13,7 ± 1,5	12,9 ± 1,5
Extraíveis	3,74 ± 0,02	7,9 ± 0,01	3,3 ± 0,1
Total	99,94 ± 1,02	100,5 ± 3,81	100,1 ± 1,02

Fonte: Os dados foram gentilmente determinados pelo Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro do Laboratório de Laboratório de Química Tecnológica do Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Os percentuais encontrados para a lignina foram de 10,3; 13,7 e 12,9% para as três polpas, respectivamente (Tabela 6.4). Ainda segundo Bajpai e Bajpai (1997), aproximadamente 90% da lignina é removida durante a etapa de cozimento da madeira no processo *Kraft*, e cerca de 10% restantes permanecem na polpa e este percentual é responsável pela cor marrom característica da polpa *Kraft* e papéis finalizados.

6.3.2. Hidrólise de substratos lignocelulósicos por holocelulases produzidas por *A. oryzae*

Posteriormente à caracterização química composicional dos substratos lignocelulósicos, estes foram submetidos a ensaios de hidrólise como substratos para a atividade de enzimas produzidas por *A. oryzae*, sendo que amostras do EB de *A. oryzae* foram testadas quanto à eficiência de hidrólise sobre os bagaços de cana de açúcar e amostras da fração ultrafiltrado PM-10 e de Xyl-O1 purificada foram testadas na hidrólise de polpas de celulose. A eficiência de hidrólise das holocelulases de *A. oryzae* foi verificada pela liberação de açúcar redutor total (método de DNS), liberação de grupos cromóforos específicos nos comprimentos de onda 237, 254, 280 e 465 nm, ensaio específico para detecção de pentoses e ainda pela identificação e quantificação de xilooligossacarídeos liberados por cromatografia de troca iônica de alta eficiência acoplada detecção amperométrica pulsada (CLAE-DAP).

Tabela 6.5. Quantificação e identificação dos produtos de hidrólise liberados dos substratos BCNT, BCHA e BCEV catalisada por enzimas do EB de *A. oryzae*.

Tempo de incubação (h)	AR--Total (mg.mL ⁻¹)	Xilooligossacarídeos liberados (mg.mL ⁻¹) *					
		X1	X2	X3	X4	X5	X6
<i>BCNT</i>							
24	0,062 ± 0,003	0,000 ± 0,000	0,002 ± 0,002	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
48	0,072 ± 0,005	0,000 ± 0,000	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
72	0,085 ± 0,004	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
96	0,078 ± 0,007	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>BCHA</i>							
24	0,057 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,011 ± 0,006	0,001 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,001
48	0,061 ± 0,003	0,000 ± 0,000	0,005 ± 0,005	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
72	0,067 ± 0,004	0,000 ± 0,000	0,005 ± 0,005	0,000 ± 0,000	0,003 ± 0,002	0,003 ± 0,002	0,003 ± 0,002
96	0,076 ± 0,005	0,000 ± 0,000	0,004 ± 0,003	0,000 ± 0,000	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001
<i>BCEV</i>							
24	0,101 ± 0,022	0,001 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,003 ± 0,003	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
48	0,100 ± 0,006	0,000 ± 0,000	0,061 ± 0,006	0,001 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
72	0,096 ± 0,004	0,000 ± 0,000	0,044 ± 0,017	0,001 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
96	0,101 ± 0,022	0,000 ± 0,000	0,027 ± 0,013	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000

Açúcar Redutor Total quantificado pelo método de DNS e leitura 540 nm (AR-Total); Bagaço de cana-de-açúcar não-tratado (BCNT); Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por hidrólise ácida (BCHA); Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BCEV); Extrato Bruto de *A. oryzae* (EB *A. oryzae*). * Xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentaose (X5) e xilohexaose (X6). Os valores representam a média de ensaios realizados em triplicata.

Os ensaios de hidrólise dos bagaços BCNT, BCHA e BCEV foram realizados com as holocelulases do EB de *A. oryzae*. A Tabela 6.5 expõe uma comparação entre a quantidade de açúcar redutor total (AR-Total) liberado com a quantificação e identificação dos xilooligossacarídeos liberados nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 h. Nesta tabela foi observado que, no período de 24 h de incubação, a liberação de AR-total correspondeu a 0,062, 0,057 e 0,101 mg.mL⁻¹ para os substratos BCNT, BCHA e BCEV, respectivamente (Tabela 6.5). Estes valores de AR-Total foram ligeiramente aumentados para 0,078 e 0,076 mg.mL⁻¹ para os substratos BCNT e BCHA, respectivamente, indicando que as enzimas do EB de *A. oryzae* permaneceram ativas no meio de reação durante as 96 h de incubação a 50°C. Inversamente, para o substrato BCEV, os valores de concentração de AR-Total liberado permaneceram praticamente inalterados entre o período de 24 e 96 h de incubação (Tabela 6.5).

Em relação à concentração inicial de AR-Total liberado, as enzimas do EB de *A. oryzae* apresentaram maior eficiência de hidrólise para o substrato BCEV. Este resultado, em um primeiro momento, parece inconsistente, quando se compara o percentual de hemicelulose disponível por este substrato e o apresentado pelo substrato BCNT obtido na análise química composicional (Tabelas 6.3 e 6.1). Contudo, a atuação das enzimas do EB de *A. oryzae*, representadas principalmente por hemicelulases, pode ter sido de alguma maneira comprometida pela disposição estrutural não-tratada deste substrato. A maior liberação de AR-Total pelo substrato BCEV em comparação à concentração obtida para o substrato BCHA, pode estar relacionada à maior mobilização da fração hemicelulose promovida pela hidrólise por ácido sulfúrico. Esta maior mobilização da fração hemicelulose é visualizada na Tabela 6.2 e correspondeu ao menor percentual de hemicelulose disponível para o substrato BCHA após o pré-tratamento.

Ainda na Tabela 6.5, foram apresentados os resultados referentes à quantificação e identificação dos xilooligossacarídeos liberados pelas enzimas com atividade de xilanase do EB de *A. oryzae*. Neste sentido, no período de incubação de 24 a 96 h, o xilooligossacarídeo detectado com maior frequência para os três substratos foi xilobiose (X2), sendo que esta maior frequência foi quantificada para substrato BCEV e correspondeu ao total de 0,136 mg.mL⁻¹. Para o substrato BCHA o valor total correspondente a X2 foi de 0,025 mg.mL⁻¹ (Tabela 6.5).

De maneira geral, os resultados apresentados na Tabela 6.5 para a quantificação de AR-Total ou a quantificação e identificação de xilooligossacarídeos por CLAE-DAP,

mostraram que o substrato bagaço de cana-de-açúcar mesmo submetido às etapas de pré-tratamento por hidrólise ácida ou por explosão a vapor, ainda manteve propriedades recalcitrantes que dificultaram a atividade das enzimas produzidas por *A. oryzae* cultivado em PASPT. De fato, estes resultados sugerem que as atividades das hemicelulases do EB de *A. oryzae*, foram comprometidas por produtos da decomposição da hemicelulose, como furfural, 5-hidroximetil furfural (HMF) e derivados da lignina, que são co-produzidos durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica por explosão a vapor (Hu e Ragauskas, 2012), e estes quando presentes no meio de reação podem atuar com inibidores da atividade de hemicelulases. Outro ponto a ser levado em consideração é a possibilidade de que durante o pré-tratamento estes co-produtos participem de reações de condensação e repolimerização que resultam em um aumento da cristalinidade, principalmente da lignina (conforme observado na Tabela 6.3), diminuindo o acesso das enzimas ao substrato remanescente. Segundo Negro et al. (2003), durante pré-tratamento da biomassa por explosão a vapor dois tipos de reações ocorrem: inicialmente uma rápida reação de despolimerização da lignina nativa e hemicelulose por meio de hidrólise ácida, e em continuação ao aquecimento, reações de condensação e repolimerização tornam-se evidentes, resultando no aumento de resíduos ácidos insolúveis (*Klason lignin*).

As enzimas produzidas por *A. oryzae* também foram testadas quanto à capacidade de hidrolisar polpas de celulose (PCE, PCPB e PCB) obtidas em diferentes etapas do processo *Kraft* de fabricação do papel. Neste ensaio foram utilizadas amostras de enzimas da fração ultrafiltrado PM-10 do EB de *A. oryzae* e da enzima Xyl-O1 purificada, conforme descrito no Capítulo 4 desta Tese. Para este ensaio, juntamente à quantificação de AR-Total e quantificação/identificação de xilooligossacarídeos também propostas para o substrato bagaço de cana de açúcar, foram realizados outros três ensaios, que foram a dosagem de glicose (método de glicose oxidase), a absorvância de grupos cromóforos específicos, bem como a dosagem de pentoses livres pela reação de orcinol-férrico (Teste de Bial).

Na Figura 6.1 estão apresentadas as variações na concentração de AR-Total liberado durante a hidrólise das polpas de celulose (PCE, PCPB e PCB), catalisada por amostras da fração ultrafiltrado PM-10 e Xyl-O1 purificada, respectivamente. Neste ensaio foi observado que a polpa PCB foi a que apresentou maior suscetibilidade à atividade das enzimas contidas nas duas amostras. Quando utilizada a amostra de ultrafiltrado PM-10, o valor de AR-Total liberado na primeira hora de incubação correspondeu a cerca de $0,130 \text{ mg.mL}^{-1}$. Para amostra Xyl-O1, este valor foi de cerca de $0,168 \text{ mg.mL}^{-1}$, e esta concentração se manteve

praticamente constante até o final das 3 h de incubação (Figura 6.1). Inversamente, os resultados encontrados para as polpas PCE e PCPB revelaram maior dificuldade de acesso ao substrato pelas enzimas de ambas as amostras. Este resultado foi mais bem evidenciado para a polpa PCPB submetida à hidrólise pela amostra ultrafiltrado PM-10, cujo valor de AR-Total liberado permaneceu inalterado deste o tempo zero até o final das 3 h de incubação (Figura 6.1). No entanto, a amostra Xyl-O1 mostrou uma eficiência aparente na liberação de AR-Total da polpa PCPB no período de 3 h de incubação, cujo valor obtido foi de cerca de 0,132 mg.mL⁻¹.

Considerando os maiores valores de concentração de AR-Total liberado com a polpa PCB como substrato, foi observado que um carregamento de proteínas de aproximadamente 15 vezes maior da amostra ultrafiltrado PM-10 do EB de *A. oryzae* em relação à amostra Xyl-O1 purificada não promoveu um aumento da hidrólise, conforme verificado ao final das 3 h de incubação. Os valores de AR-Total liberado pela hidrólise das duas amostras, durante as 3 horas de incubação, foi de 0,445 e 0,562 mg.mL⁻¹, respectivamente. Esta maior eficiência de hidrólise promovida pela amostra Xyl-O1 pode ser atribuída ao fato de tratar-se de uma amostra purificada, cuja atividade específica correspondeu a 248 UI.mg⁻¹, conforme descrito na Tabela 4.2, página 99 do Capítulo 4 desta Tese. O valor de atividade específica apresentado para a amostra ultrafiltrado PM-10 do EB de *A. oryzae* foi de apenas 19,6 UI.mg⁻¹.

Em verdade, o maior carregamento de proteínas totais para a amostra ultrafiltrado PM-10 do EB de *A. oryzae* pode indicar que a dosagem de proteínas pelo método de Bradford resultou em uma superestimação da concentração real de proteínas solúveis na amostra. Esta inferência se baseou nos dados obtidos por Banik et al. (2009), que demonstraram a interferência de açúcares solúveis na dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford. Conforme mencionado no Capítulo 4 desta Tese, durante a purificação de Xyl-O1 foi visualizado a presença de uma substância colorida, a partir da fração ultrafiltrado PM-10, cujo conteúdo pode ser, em parte, representado por açúcares solúveis. A presença destes açúcares na fração ultrafiltrado PM-10 do EB de *A. oryzae* possivelmente promoveu uma maior valoração na dosagem de proteína total da amostra, conseqüentemente resultando em um maior carregamento aparente de proteínas nos ensaios de hidrólise.

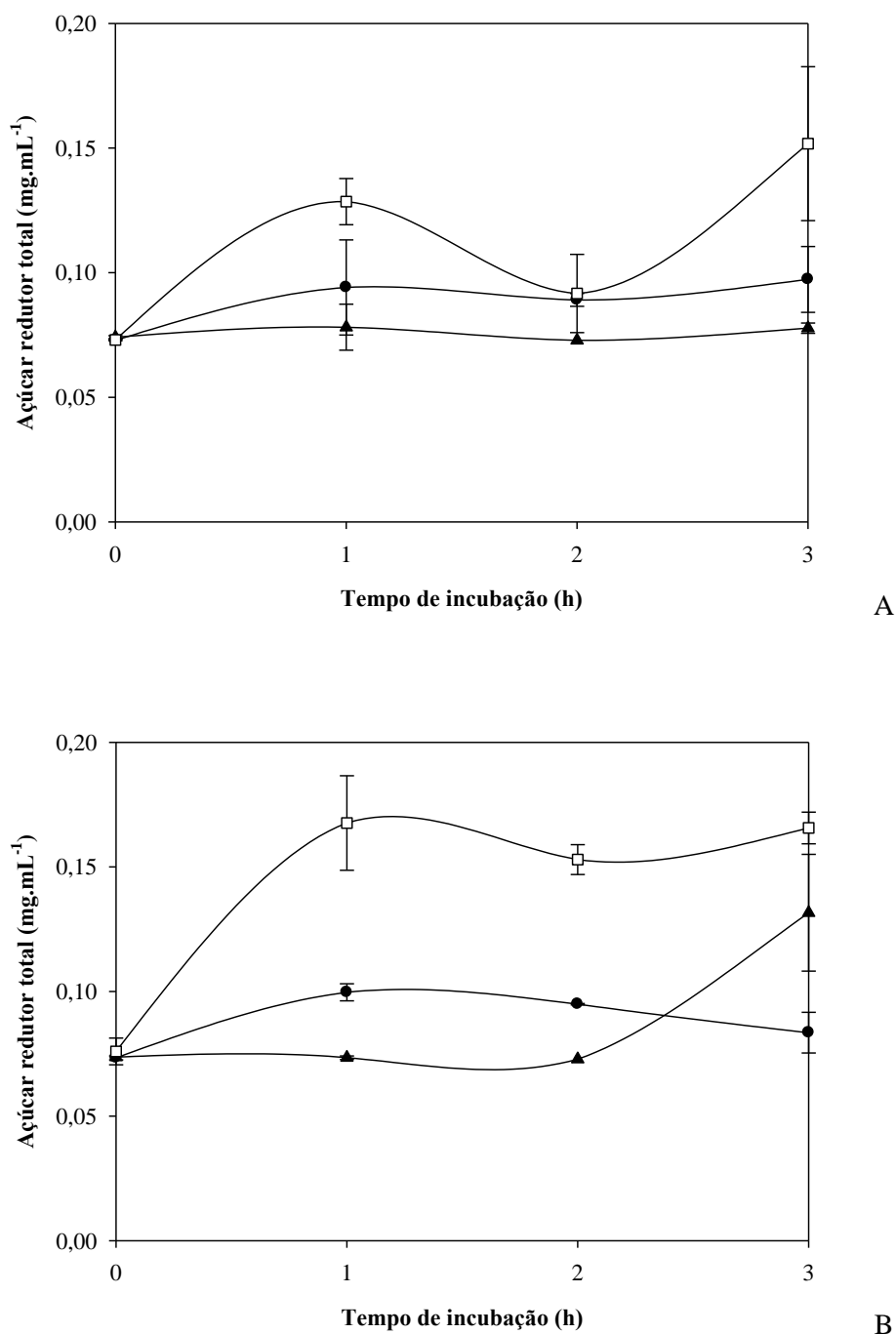


Figura 6.1. Açúcar redutor total liberado durante a hidrólise de polpa de celulose escura [—●—], polpa de celulose pré-branqueada por O₂ [—▲—] e polpa de celulose branca [—□—] promovida por amostras do ultrafiltrado PM-10 do EB de *A. oryzae* (A) e por Xyl-O1 purificada (B). A concentração de proteínas totais estimada pelo método de Bradford correspondeu a 0,015 e 0,001 mg.mL⁻¹, para ultrafiltrado PM-10 do EB de *A. oryzae* e Xyl-O1 purificada, respectivamente.

Com base nos valores brutos de AR-Total liberado da polpa PCE submetida à hidrólise por ambas as amostras, visualizou também que com apenas um processo de ultrafiltração, a atividade de hidrólise da amostra ultrafiltrado PM-10 do EB de *A. oryzae* foi semelhante à obtida com a amostra Xyl-O1 purificada. Ou seja, a utilização da amostra de ultrafiltrado PM-10 proporcionaria uma redução nos custos de obtenção de enzimas aplicadas como uma alternativa para a manufatura/clareamento do papel.

A eficiência de hidrólise sobre as polpas de celulose foi analisada quanto à presença de grupos cromóforos detectados nos comprimentos de onda (237, 254, 280 e 465 nm), os quais poderiam estar relacionados a produtos de degradação originados da estrutura polimérica das polpas de celulose, quando submetidas à hidrólise pelas amostras enzimáticas. Conforme mencionado por Medeiros et al. (2007), a liberação de grupos cromóforos representa um parâmetro eficaz para monitorar a atividade de xilanases sobre a polpa de celulose, ainda mais efetivo do que a liberação de AR-Total quantificada pelo método de DNS. Segundo os autores, o AR-Total continua a ser liberado como resultado da atividade das enzimas sobre os xilooligômeros liberados pela hidrólise inicial da xilana que efetivamente cobre a superfície das fibras de celulose. Neste sentido, na Figura 6.2 são mostradas as respectivas tendências temporais para liberação de determinado cromóforo a partir das polpas de celulose submetidas à hidrólise enzimática por amostras de ultrafiltrado PM-10 do EB de *A. oryzae* ou Xyl-O1 purificada.

A hidrólise da polpa PCE pela amostra ultrafiltrado PM-10 do EB de *A. oryzae* resultou na detecção de cromóforos para os quatro comprimentos de ondas estabelecidos, nos tempos de incubação de 3 e 6 h (Figura 6.2A). Para a polpa PCPB, a detecção dos quatro cromóforos aconteceu nos tempos de 1 e 3 h, respectivamente (Figura 6.2B). Entretanto para a polpa PCB um cromóforo foi detectado a 237 nm no período de 1 h e os outros três foram detectados a partir de 2 h de incubação (Figura 6.2C). Conforme mencionado para a amostra ultrafiltrado PM-10, a liberação de cromóforos da polpa PCE catalisada pela amostra Xyl-O1 purificada, ocorreu nos intervalos de 2 e 6 horas, com ênfase para o comprimento de onda de 237 nm. Para a polpa PCPB, a liberação de cromóforos aconteceu no intervalo de 1 h e após 3 h de incubação, também com destaque para o comprimento de 237 nm. Já para a polpa PCB, a detecção de cromóforos ocorreu no período de 1 h, com destaque para o comprimento de 254 nm com maior detecção. De acordo com estes resultados, com exceção da polpa PCB submetida à hidrólise por Xyl-O1, a maior liberação de cromóforos das polpas de celulose foi detectada a 237 nm.

Os cromóforos liberados e detectados a 237 nm, correlacionam com a remoção de cor da polpa de celulose comumente monitorada pela detecção de cromóforos a 465 nm. A remoção da cor, por consequência, indica uma redução no teor de lignina (Patel et al., 1993; Gupta et al., 2000). Ainda segundo Elegir et al., citada por Medeiros et al. (2007), a liberação de material a 237 nm correlaciona com remoção de cor e resulta no aumento do brilho da polpa de celulose após o branqueamento.

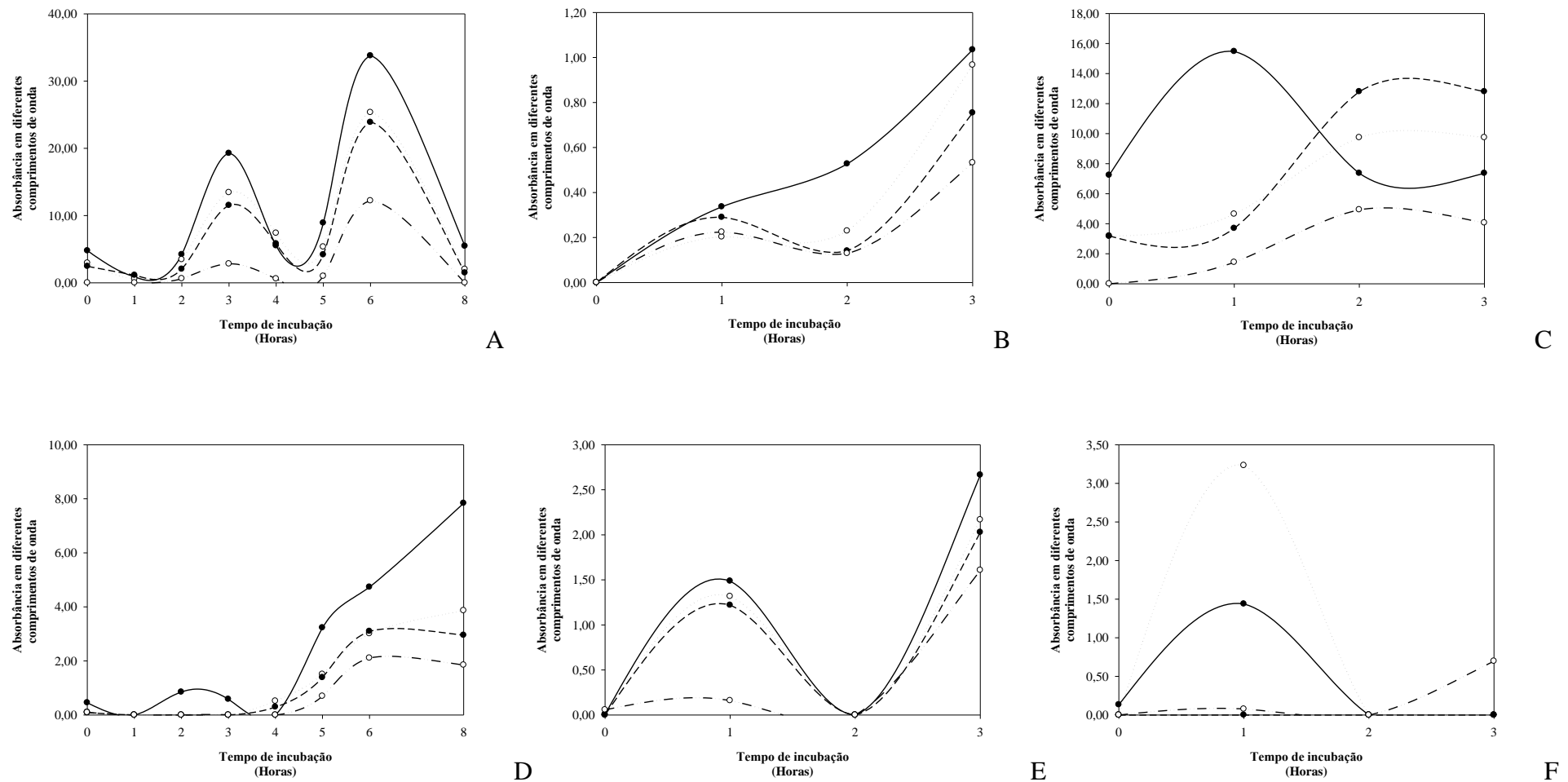


Figura 6.2. Remoção de grupos cromóforos durante a hidrólise das polpas de celulose PCE (A e D), PCPB (B e E) e PCB (C e F), catalisada por amostra de ultrafiltrado PM-10 do EB de *A. oryzae* (A, B e C) ou Xyl-O1 purificada (D, E e F). Comprimentos de onda analisados: 237 nm (—●—), 254 nm (···○··), 280 nm (—●—) e 465 nm (·-·○-·).

Para a polpa PCPB, a hidrólise catalisada pelas duas amostras mostrou uma correlação entre a liberação de AR-Total e a remoção de grupo cromóforo a 237 nm, no período de 3 h de incubação, indicando a remoção de cor vinculada à mobilização da lignina. Segundo Gupta et al. (2000), o pré-tratamento da polpa *Kraft* com a xilanase purificada de *Staphylococcus* sp. SG-13 resultou na liberação de xilose com aumento subsequente da detecção de AR-Total e liberação de cromóforos a 237 e 465 nm, indicando uma dissociação do complexo lignina-carboidratos das fibras de celulose.

Como ensaio para verificar a eficiência de hidrólise das amostras enzimáticas sobre as polpas de celulose, fez-se uma comparação entre a concentração de pentose produzida e a quantificação/identificação de xilooligossacarídeos liberados na hidrólise da polpa PCB (Tabela 6.6). Neste ensaio, os resultados obtidos com a polpa PCB foram escolhidos devido à maior suscetibilidade do substrato à atividade das amostras enzimáticas, como discutido para a Figura 6.1. No Teste de Bial, a dosagem de pentose é realizada a 660 nm, entretanto, a presença de hexose no ensaio pode ser quantificada pela leitura a 520 nm. Ou seja, é possível verificar se durante a liberação de pentose, ocorre paralelamente a detecção progressiva de hexose. Como observado na Tabela 6.6, foi possível a detecção de pentose e também de hexose durante a hidrólise catalisada por ambas as amostras enzimáticas. Neste ensaio, a liberação de pentose na reação catalisada pela amostra ultrafiltrado PM-10 ocorreu de maneira proporcional aos intervalos de tempo, sendo que o valor máximo foi obtido após 3 h (Tabela 6.6). Para a catálise promovida pela amostra Xyl-O1, a maior liberação de pentose ocorreu após 2 h de incubação (Tabela 6.6).

A utilização deste ensaio como meio de detecção da atividade de xilanase das amostras enzimáticas parece um tanto incoerente, porque esta atividade foi caracterizada como sendo tipo-endo, conforme demonstrado no Capítulo 4 desta Tese. Entretanto, o Teste de Bial, comprovadamente eficaz na detecção de pentose livre, foi utilizado neste contexto para a quantificação de xilooligômeros liberados das polpas de celulose, pós-catálise enzimática, os quais por sua vez, são formados de unidades de D-xilose. A possibilidade de explorar o método para detecção de pentose não livre foi proposta por Pramod e Venkatesh (2006), que utilizaram a metodologia para detecção de pentoses ligadas a glicoproteínas.

Tabela 6.6. Quantificação e identificação dos produtos de hidrólise liberados do substrato PCB pela atividade de amostras do ultrafiltrado do EB *A. oryzae* e Xyl-O1 purificada.

Tempo de incubação (h)	Pentose 660 nm (mg.mL ⁻¹)	Pentose 520 nm (mg.mL ⁻¹)	Xilooligossacarídeos liberados (mg.mL ⁻¹) *					
			X1	X2	X3	X4	X5	X6
<i>Ultrafiltrado PM-10</i>								
0	1,957 ± 2,008	16,025 ± 6,975	0,004 ± 0,006	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,001
1	3,597 ± 3,477	10,183 ± 1,301	0,006 ± 0,007	0,009 ± 0,010	0,001 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
2	9,972 ± 9,769	15,160 ± 6,242	0,004 ± 0,003	0,004 ± 0,008	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,001	0,000 ± 0,000
3	15,622 ± 3,707	18,128 ± 4,580	0,001 ± 0,002	0,009 ± 0,015	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,001
<i>Xyl-O1 purificada</i>								
0	0,765 ± 0,000	15,388 ± 6,581	0,002 ± 0,002	0,005 ± 0,006	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
1	1,156 ± 0,677	9,012 ± 0,000	0,004 ± 0,003	0,015 ± 0,014	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
2	8,301 ± 6,343	9,012 ± 0,000	0,002 ± 0,001	0,009 ± 0,002	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
3	5,181 ± 4,801	11,703 ± 3,079	0,001 ± 0,001	0,009 ± 0,007	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000

Pentose quantificada pelo método de orcinol-férrico (Teste de Bial) e leituras a 660 e 520 nm; Polpa de celulose branca (PCB). * Xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentaose (X5) e xilohexaose (X6). Os valores representam a média de ensaios realizados em triplicata.

Contudo, a quantificação de hexose pela leitura em 520 nm permaneceu praticamente constante durante os tempos de incubação entre 0 e 3 h, para ambas as amostras enzimáticas (Tabela 6.6). Ou seja, a quantidade de hexose existente no tempo de 3 h muito provavelmente estava presente no tempo zero e não surgiu como resultado da atividade das amostras enzimáticas. Neste sentido, o aumento crescente na concentração de pentose pela leitura em 660 nm, pode indicar a participação das amostras enzimáticas, hidrolisando a fração hemicelulose do substrato.

A quantificação/identificação de xilooligossacarídeos liberados pela hidrólise da polpa PCB confirmou a presença de X2 para o intervalo de tempo analisado. A concentração total de X2 liberado correspondeu a 0,022 e 0,038 mg.mL⁻¹, para ultrafiltrado PM-10 e Xyl-O1 purificada, respectivamente (Tabela 6.6). Estes resultados estão de acordo com os dados referentes à caracterização da enzima Xyl-O1, cuja especificidade de hidrólise sobre xilana de bétula também revelou o produto X2 como xilooligossacarídeo prioritário, conforme descrito no Capítulo 4 desta Tese. Ainda segundo os resultados da Tabela 6.6, concentrações reduzidas de X1 também foram detectadas, podendo ter sido liberadas durante as etapas de cozimento em presença de álcali ou após a deslignificação por O₂, anteriormente a obtenção da polpa PCB, durante o processo *Kraft*.

6.4. CONCLUSÕES

- 1) O pré-tratamento do bagaço BCNT por hidrólise ácida ou explosão a vapor indicou uma maior mobilização de hemicelulose, com aumento da exposição polimérica da fração celulose;
- 2) No processo *Kraft*, também foi visualizado uma maior mobilização da fração hemicelulose, e a polpa PCB, com um percentual de 6,7%, foi o substrato lignocelulósico com maior disponibilidade para a hidrólise por xilanases;
- 3) O bagaço BCEV foi o substrato mais susceptível à hidrólise catalisada pelas holocelulases produzidas por *A. oryzae* conforme determinado pela liberação de açúcar redutor ou quantificação e identificação por CLAE-DAP.
- 4) A polpa PCB foi o substrato mais susceptível à hidrólise catalisada por ambas as amostras enzimáticas, sendo que a liberação de cromóforos a 237 nm, a detecção de pentose e a liberação de açúcar redutor estão relacionados diretamente a alterações na estrutura da polpa.
- 5) Na dosagem dos xilooligômeros liberados por CLAE-DAP durante a hidrólise catalisada por ambas as amostras enzimáticas, xilobiose foi o xilooligômero produzido com maior frequência para a hidrólise do bagaço BCEV ou para hidrólise da polpa PCB.

6.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adsul, M. G.; Ghule, J. E.; Shaikh, H.; Singh, R.; Bastawde, K. B.; Gokhale, D. V.; Varma, A. J., Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* **2005**, *62*, 6-10.
- Bajpai, P.; Bajpai, P. K., Realities and Trends in Enzymatic Prebleaching of Kraft Pulp. In *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, Schepe, T., Ed. Springer-Verlag: Berlin, 1997; Vol. 56, pp 1-31.
- Balat, M., Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management* **2011**, *52*, 858-875.
- Balat, M.; Balat, H., Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy* **2009**, *86*, 2273-2282.
- Banik, S. P.; Pal, S.; Ghorai, S.; Chowdhury, S.; Khowala, S., Interference of sugars in the Coomassie Blue G dye binding assay of proteins. *Analytical Biochemistry* **2009**, *386*, 113-115.
- Bhatia, L.; Johri, S.; Ahmad, R., An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. *AMB Express* **2012**, *2*, 1-19.
- Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A.; Corvo, m. L., *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Interciência: Rio de Janeiro, 2008; p 506.
- Duran, N.; Marques, S.; Salles, B. C.; Medeiros, R. G.; Filho, E. X. F., Enzimas na indústria de polpa e papel. In *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*, Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A.; Corvo, M. L., Eds. Interciência: Rio de Janeiro, 2008; pp 205-239.
- Goldemberg, J.; Coelho, S. T.; Guardabassi, P., The sustainability of ethanol production from sugarcane. *Energy Policy* **2008**, *36*, 2086-2097.
- Gupta, S.; Bhushan, B.; Hoondal, G. S., Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. *Journal of Applied Microbiology* **2000**, *88*, 325-334.
- Hahn-Hägerdal, B.; Galbe, M.; Gorwa-Grauslund, M. F.; Lidén, G.; Zacchi, G., Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology* **2006**, *24*, 549-556.
- Himmel, M. E.; Ruth, M. F.; Wyman, C. E., Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Current Opinion in Biotechnology* **1999**, *10*, 358-364.
- Howard, R. L.; Abotsi, E.; Jansen, v. R. E. L.; Howard, S., Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* **2003**, *2*, 602-619.
- Hu, F.; Ragauskas, A., Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. *BioEnergy Research* **2012**, *5*, 1043-1066.
- Kulkarni, N.; Rao, M., Application of Xylanase from Alkaliphilic Thermophilic Bacillus sp. NCIM 59 in biobleaching of bagasse pulp. *Journal of Biotechnology* **1996**, *51*, 167-173.

- Lynd, L. R.; Zyl, W. H. v.; McBride, J. E.; Laser, M., Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology* **2005**, *16*, 577-583.
- Medeiros, R. G.; Silva-Jr., F. G.; Bao, S. N.; Hanada, R.; Filho, E. X. F., Application of xylanases from Amazon Forest fungal species in bleaching of eucalyptus kraft pulps. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2007**, *50*, 231-238.
- Moreira, L. R. S.; Ferreira, G. V.; Santos, S. S. T.; Ribeiro, A. P. S.; Siqueira, F. G.; Filho, E. X. F., The hydrolysis of agro-industrial residues by holocellulose-degrading enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology* **2012**, *43*, 498-505.
- Negro, M. J.; Manzanares, P.; Oliva, J. M.; Ballesteros, I.; Ballesteros, M., Changes in various physical/chemical parameters of Pinus pinaster wood after steam explosion pretreatment. *Biomass and Bioenergy* **2003**, *25*, 301-308.
- Neves, M. A.; Kimura, T.; Shimizu, N.; Nakajima, M., State of the Art and Future Trends of Bioethanol Production. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology* **2007**, *1*, 14.
- Patel, R. N.; Grabski, A. C.; Jeffries, T. W., Chromophore release from kraft pulp by purified streptomyces roseiscleroticus xylanases. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1993**, *39*, 405-412.
- Pramod, S.; Venkatesh, Y., Utility of pentose colorimetric assay for the purification of potato lectin, an arabinose-rich glycoprotein. *Glycoconjugate Journal* **2006**, *23*, 481-488.
- Reddy, N.; Yang, Y., Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *Trends in Biotechnology* **2005**, *23*, 22-27.
- Saha, B., Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2003**, *30*, 279-291.
- Sánchez, C., Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* **2009**, *27*, 185-194.
- Subramanian, S.; Prema, P., Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application. *Critical Reviews in Biotechnology* **2002**, *22*, 33-64.
- Sun, Y.; Cheng, J., Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* **2002**, *83*, 1-11.

Considerações Finais e Perspectivas

A utilização da biomassa lignocelulósica encontrada nos resíduos agroindustriais, como os resíduos produzidos no beneficiamento ou rebeneficiamento do algodão, constitui uma alternativa promissora e viável para o estabelecimento de fungos com potencial para produção de enzimas que degradam a parede celular vegetal. *A. oryzae* se destacou pelos elevados títulos de holocelulases, principalmente para xilanases múltiplas, quando cultivado em resíduos da indústria têxtil como fonte de carbono.

Durante o beneficiamento ou rebeneficiamento do algodão pelas indústrias têxteis são produzidos três tipos de resíduos: PAS, PAL e PF. Estes resíduos submetidos à pré-tratamento foram eficazes no cultivo de *A. oryzae* e consequente produção de holocelulases, com ênfase para o resíduo PFPT. Dentre as holocelulases produzidas por *A. oryzae* cultivado em PASPT como fonte de carbono, a atividade de xilanase foi a mais ativa e correspondeu a pelo menos quatro isoenzimas, que foram visualizadas em ensaios de zimografia em gel co-polimerizado com solução de xilana 0,1%. Uma das isoenzimas com atividade de xilanase, Xyl-O1, foi purificada da fração ultrafiltrado PM-10 do EB de *A. oryzae* e apresentou massa molecular aparente de 21,5 kDa. A caracterização enzimática de Xyl-O1 revelou um mecanismo tipo-endo de degradação da fração solúvel da xilana de bétula, cujo produto de hidrólise liberado X2 foi o mais predominante.

Ainda na fração concentrado PM-10 do EB de *A. oryzae*, pelo menos outras três isoenzimas foram mais ativas em zimografia, sendo uma com massa molecular aparente de 21,5 kDa e as outras duas apresentaram cerca de 35 kDa. Uma das isoenzimas designada como Xyl-O3 foi submetida a ensaios de espectrometria de massas por PMF-MALDI-TOF MS e MALDI-TOF/TOF MS/MS que confirmaram a homologia de sequência com uma endo-1,4- β -xilanase F1 pertencente a *A. oryzae* RIB40 com massa molecular próxima a 35 kDa.

Entretanto, a completa exploração do potencial de *A. oryzae* na produção de holocelulases, principalmente xilanase e CM-celulase, poderá se alcançada pela finalização de etapas experimentais já em andamento ou a proposição de novas metodologias de caracterização bioquímica.

Para a enzima Xyl-O1 descrita no Capítulo 4 desta Tese, sua completa identificação por experimentos de PMF-MALDI-TOF MS requererá que a digestão trípica seja executada

após a enzima ter sido submetida à etapa de N ou O desglicosilação, uma vez que as inúmeras tentativas de obtenção de espectros de MS realizadas sem esta etapa não foram eficientes. Cabe ressaltar aqui, que o ensaio para N-desglicosilação de Xyl-O1 purificada com a enzima PNGase-F (resultados não apresentados) não resultou em diferença de migração em SDS-PAGE, indicando a ausência de N-glicosilações.

Até o momento, apenas resultados da caracterização de isoenzimas com atividade de xilanase foram descritos. Entretanto, a caracterização enzimática completa destas enzimas (Xyl-O2 purificada, Xyl-O3/Xyl-O4 parcialmente purificadas), bem como da enzima Cel-O1 será realizada posteriormente com a finalização das etapas cromatográficas de purificação. Como por exemplo, para a confirmação dos resultados obtidos para Xyl-O2 purificada, será necessário uma atividade de xilanase mais concentrada.

Por fim, ao final das etapas de purificação e caracterização bioquímica e enzimática das isoenzimas de xilanase e da CM-celulase Cel-O1 pretende-se submetê-las como alternativa de baixo custo e ambientalmente correta no biobranqueamento de papel e na indústria têxtil em etapa de finalização de tecidos (bioestonagem, biopolimento, etc.), respectivamente.

Apêndices

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO:

Duarte, G. C.; Moreira, L. R. S.; Jaramillo, P. M. D.; Filho, E. X. F., Biomass-derived inhibitors of holocellulases. *BioEnergy Research* **2012**, 1-10.

Biomass-Derived Inhibitors of Holocellulases

Gilvan C. Duarte · Leonora Rios S. Moreira ·
Paula Marcela D. Jaramillo · Edivaldo Ximenes F. Filho

Published online: 23 February 2012
© Springer Science+Business Media, LLC. 2012

Abstract Enzymes constitute a major monetary cost in the bioconversion of holocellulose to ethanol. Identifying enzyme inhibitors and moderating their effects is one approach that may help to overcome this issue. Most inhibitors that reduce the hydrolysis activity of holocellulases are released as the holocellulosic biomass is broken down in the pre-treatment and hydrolysis steps. Recent reports in the literature have shown that the major inhibitors or deactivators of cellulases are phenols and xylooligosaccharides. The bioconversion of hemicelluloses by hemicellulases also has important practical applications in various agro-industrial processes in addition to the conversion of hemicellulosic biomass to fuels and chemicals. Hemicellulases, such as β -xylosidases, may also help alleviate the inhibitory effect of xylooligosaccharides to cellulases. However, compared to cellulases, less is known about the inhibition or deactivation of hemicellulases and pectinases, especially for inhibitors that are generated during pre-treatment and the hydrolysis of lignocellulosic substrates. Considering the importance of such enzymes for the complete degradation of lignocellulosic substrates, this review provides a broad view of the effect of inhibitors of holocellulases (cellulases, hemicellulases, and pectinases).

Keywords Cellulase · Hemicellulase · Phenolic compounds · Xylooligosaccharide · Biomass

Introduction

Vast amounts of lignocellulosic materials are available for exploitation as sources of food, fuel, and chemical feedstock. The complexity of lignocellulose structures is reflected in the battery of enzyme systems required for their breakdown. Knowledge of these enzyme's modes of action is crucial to overcoming the recalcitrance of lignocellulose structures to digestion and metabolism. After the removal of lignin from lignocelluloses, the total carbohydrate content obtained is the holocellulose, and it is composed of hemicelluloses, cellulose, and pectin [2].

The structure of holocellulose is dependent upon the species, tissue, and growth conditions of the plant. The hydrolysis of the holocellulosic components of the plant cell-wall structure involves the concerted action of endohydrolases and exohydrolases, which release a wide range of products, including short and long oligosaccharides and monosaccharide units. The term holocellulases refers to those enzymes that are specific to the breakdown of the holocellulosic structure and includes cellulases, hemicellulases, and pectinases. As holocelluloses comprise a variety of structures, the complete hydrolysis requires the synergistic actions of main-chain and side-chain cleaving enzymes [2].

The role of each enzyme in the breakdown of the holocellulosic structure is defined by their mechanisms of action, i.e., the hydrolysis of the terminal glycosidic linkage bonds or internal specific linkage-bond positions. Due to the heterogeneity of holocellulose, the presence of holocellulases with different specificities that release different hydrolysis products is essential. Moreover, considerable information on the enzymatic mechanisms of action can be obtained by characterizing the products of hydrolysis and their kinetic parameters with and without inhibitors. The role of

G. C. Duarte · L. R. S. Moreira · P. M. D. Jaramillo ·
E. X. F. Filho (✉)
Laboratory of Enzymology, Department of Cellular Biology,
University of Brasilia,
Brasília, Distrito Federal CEP 70910-900, Brazil
e-mail: eximenes@unb.br

inhibitors of holocellulases (cellulases, hemicellulases, and pectinases), especially those derived from the biomass, such as phenols and sugars, will be discussed in this review. We hope to stimulate continued efforts to understand the molecular mechanisms of enzymatic holocellulose breakdown.

An Overview of Holocellulose Hydrolysis

The hydrolysis of holocellulose is complex because of the heterogeneous nature of the substrate. Endo- and exoglucanases, β -glucosidases, β -xylanases, β -xylosidases, β -mannanases, and polygalacturonases are important enzymes that catalyze the release of short- and long-chain oligosaccharides. In addition, enzymes such as acetyl and ferulic acid esterases and arabinofuranosidases remove side chain groups from holocellulose, especially when the fragments of cleaved holocellulose have a high proportion of branched substituents [16, 45, 51]. The hydrolysis of holocellulose is carried out on the surface of the solid substrate (primary hydrolysis) and in the liquid phase (secondary hydrolysis). The primary hydrolysis is the rate-limiting step for the whole holocellulose hydrolysis process.

Specifically for cellulases, the primary hydrolysis is carried out by endo- and exoglucanases, while the secondary hydrolysis involves the hydrolysis of cellobiose to glucose by β -glucosidases [67, 72]. The synergistic action of holocellulases changes the holocellulose topography over time. The holocellulose structure affords the synergistic actions of a variety of main- and side-chain cleaving enzymes [16]. Homeosynergy is defined as cooperativity between two main-chain cleaving enzymes (for example, β -xylanase and β -xylosidase) or two side-chain cleaving enzymes (for example, α -arabinofuranosidase and acetylxyylan esterase). Heterosynergy is the synergistic interaction between side-chain and a main-chain cleaving enzymes (for example, α -galactosidase and β -mannanase). The lack of β -mannosidase activity in the enzyme preparation significantly influenced glucose release from pretreated Douglas fir [21]. Qing and Wyman [50] reported that the supplementation of cellulase preparations with hemicellulases (β -xylanase and β -xylosidase) improved the enzymatic hydrolysis of cellulose and hemicellulose in solids after ammonia fiber expansion and dilute acid pretreatment of corn stover. Thus, the enzymatic removal of xylan from lignocellulosic residue seems to be an efficient method of enhancing cellulase effectiveness.

The substituents in the holocellulose, such as the side branches, act as spatial obstacles that prevent the formation of enzyme–substrate complexes during catalysis, thus limiting the action of the enzymes [2]. For instance, some holocellulases are not able to cleave oligomers containing branch points, indicating that the holocellulosic linkages

are protected by the substituents. By contrast, other holocellulases cleave the backbone linkages only at or near branch points. Certain holocellulases have their highest activities against long-chain oligosaccharides or polysaccharides, while other types of holocellulases hydrolyze branch points in addition to cleaving main chain linkages [16]. Another group of holocellulases (for instance, β -glucosidases and β -xylosidases) are believed to relieve end product inhibition of other holocellulase enzymes. Substrate cross-specificity or relaxed specificity is a characteristic of many holocellulases, such as cellulases and hemicellulases [54]. Substrate specificity can range from absolute, such as for only one polysaccharide, to an equal affinity for multiple polysaccharides. In addition, holocellulases can be active against a variety of oligosaccharides sizes and affect the formation of oligosaccharides by transferase activity. Different oligomers can be formed by holocellulosic components, such as xylan and cellulose, interacting with different binding subsites of a particular enzyme, which are formed due to structural differences between these substrates. The catalytic cores of various holocellulases behave as independent entities, showing catalytic activity and defined specificities toward soluble model substrates. To organize the different enzymes, they are ordered into families by substrate specificities and modes of action (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>).

Inhibition of Holocellulases by Biomass-Derived Compounds

The primary cell wall structure is composed of approximately 10% protein and 90% holocellulose [40]. Lignin, a three-dimensional network of *p*-hydroxyphenylpropane units, has a key role in restricting the breakdown of holocellulose structure by hydrolases [54]. The matrix of holocellulose presents a great structural diversity in the plant cell walls with the cellulose/hemicellulose network embedded in a jelly-like matrix of pectin [38]. Each molecule may contain different sugar residues with the same or different bonds, which are branched to varying degrees and conformations. Within this context of macromolecule interactions, phenylpropanoid compounds, such as lignins, suberins, and phenolic acids, are important structural components of the plant cell wall [10].

In the plant cell wall environment, lignin is physically entangled with or chemically linked to holocellulose components [54, 58]. In this context, several factors are responsible for biomass resistance to enzymatic hydrolysis, including lignocelluloses particle size, cellulose crystallization, an accessible surface area, protection by lignin, cellulose sheathing by hemicelluloses, mass transfer limitation affecting the transport to and from insoluble substrates, and

the presence of phenolic compounds, fat, and proteins [37, 46].

The pretreatment of lignocellulosic biomass is crucial before the enzymatic hydrolysis of the holocellulose structure of the plant cell wall. Chemical, physical, and morphological lignocellulose features are changed during pretreatment and generally make the biomass more accessible to enzymatic saccharification [30, 33, 34, 42]. Various pretreatment options are available to fractionate, solubilize, hydrolyze, and separate cellulose, hemicellulose, and lignin components [52]. Figure 1 shows the lignocellulosic biomass treatment for enzyme saccharification and the generation of enzyme inhibitors. Lignocellulosic pretreatments, such as liquid hot water, steam explosion, and dilute acid, lead to the formation of soluble inhibitors that hamper the enzymatic hydrolysis of holocellulose [28, 29, 33, 70, 71]. These inhibitory compounds will vary according to the

pretreatment and can include soluble sugars, furan derivatives, organic acids, and phenolic compounds. The amounts of these soluble inhibitors and their distribution depend on the type and severity of pretreatment, the concentration of lignocellulosic solids during pretreatment hydrolysis, and the type of biomass [33]. In the following sections, we will discuss the inhibitory effects of the biomass derived compounds on holocellulases, with a special emphasis on phenolic compounds and sugars.

Phenolic Compounds

As was already noted by Mandels and Reese [39], compounds with the ability to inhibit enzyme activity occur in a wide variety of plants. These authors also considered these inhibitors to be universal, varying only in amounts and

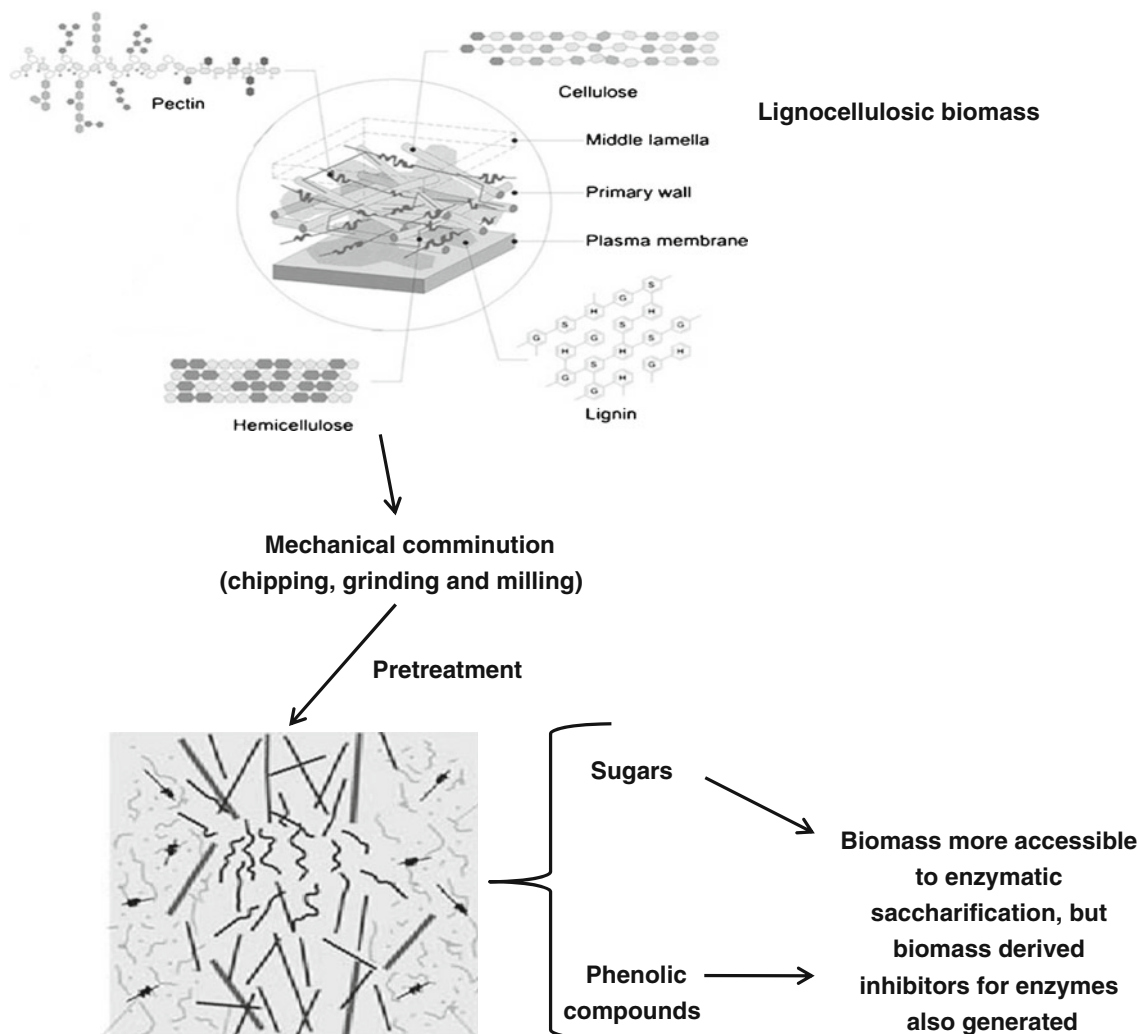


Fig. 1 Lignocellulosic biomass treatment for enzyme saccharification and the generation of enzyme inhibitors based on information adapted by Kim et al. [33], McMillan [42], Mosier et al. [46], Siqueira et al. [54], and Ximenes et al. [68, 69]

degree, and they found that the naturally occurring enzyme inhibitors belonged chiefly to the phenolic, tannin, or leucoanthocyanin chemical families.

Phenols in higher plants range from simple low molecular weight phenolic glycosides to polymeric compounds [68, 69]. The molecular formula of major enzyme inhibitors are $C_{10}H_{10}O_4$ (ferulic acid), $C_{11}H_{12}O_5$ (sinapic acid), $C_9H_{10}O_5$ (syringic acid), $C_{76}H_{52}O_{46}$ (tannic acid), and $C_8H_8O_4$ (vanillic acid). As a first line of defense, these phenylpropanoid compounds act as a barrier to many different microorganisms to which plants are exposed. During enzyme hydrolysis of pretreated lignocellulosic materials, modifications of lignin structures occur, leading to the generation of exposed phenolic moieties and the formation of simple oligomeric phenolics [22, 23, 55, 58]. As a consequence of this formation, lignin-derivable phenolic compounds have an inhibitory effect on the enzymatic conversion of the holocellulosic biomass to useful chemicals. Thus, a crucial point for the enzymatic hydrolysis of holocellulose is to reduce the inhibition and deactivation effects on enzymes to enhance hydrolysis and reduce enzyme loading. Table 1 shows examples of phenolic compound's effects on cellulase and hemicellulase activities.

The physicochemical processes of lignocellulosic biomass pretreatment modify the lignin structure and promote phenol solubilization. Many simple phenolic compounds have been identified in the solution phase of the pretreated biomass, and they often inhibit fermentative fungi or bacteria that convert glucose, xylose, or other carbohydrates into ethanol. In addition to simple monomeric phenolics, oligomeric phenolics, such as tannin, may inhibit or deactivate lignocellulose-hydrolyzing enzymes [69]. The effective concentration range for tannic acid's inhibition was studied on Avicel, filter paper, cellobiose, and *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside hydrolysis

with a cellulase mix. Tannic acid became inhibitory at concentrations higher than 0.05 mM [58, 69].

The experiments developed by Jing et al. [29] showed that the action of the lignocellulose degradation products from corn stover on industrial cellulase (Spezyme CP) during cellulose hydrolysis strongly inhibited enzyme activity, and the order of the inhibitory strength by the lignocellulose degradation products on cellulase was lignin derivatives > furan derivatives > organic acids > ethanol. The inhibition ability of phenolic compounds on cellulases was also tested in the presence of birdsfoot trefoil polyphenols (condensed tannins) and sunflower polyphenols (chlorogenic, ferulic, caffeic, and sinapic acids) [4, 41, 53]. The degree of inhibition of endoglucanases from *Neocallimastix frontalis* RE1, *Neocallimastix patriciarum* 27, *Piromyces communis* 22, and *Orpinomyces joyonii* 19-2 was nearly complete at 300 μ g condensed tannins/mL. With respect to sunflower polyphenols, the inhibitory effects were not cumulative because in the presence of phenolic compounds (chlorogenic, ferulic, caffeic, and sinapic acids), the avicelase retained 75–85% of its activity. The deactivation effects of polymeric and monomeric phenols were also determined on the cellulase activities from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* [69] fungal species. Within the groups of phenolic compounds tested, tannic acid showed the most damaging effect, causing deactivation and reversible loss on all of the enzymes activities tested. On the other hand, β -glucosidase from *A. niger* was the enzyme that was most resistant to inhibition and deactivation.

The combination of solka-floc, which is a lignin-free cellulose, with phenolic compounds released during liquid maple-pretreatment decreased the rate and extent of cellulose hydrolysis due to both deactivation of the cellulase activity and protein precipitation [33]. In another article, it

Table 1 Inhibitory effect of phenolic compounds on holocellulases

Compound	Inhibitory effect	Reference
Vanillic acid, syringic acid, acetosyringone, syringaldehyde	No significant effect on cellulase and β -glucosidase activities, strong inhibition on xylanase activity	[47]
Ferulic acid	Deactivation effect on β -glucosidases Pectinase activity of <i>F. oxysporum</i> was repressed by ferulic acid at a low concentration (200 mg/L)	[69] [66]
Substituted phenols (chlorophenols, saligenin, orthiphenyl phenol, and chlorophenyl)	Moderately active against certain fungal cellulases	[39]
Tannic acid, gallic, hydroxy-cinnamic, 4-hydroxybenzoic acids, and vanillin	Caused 20–80% deactivation of cellulases and/or β -glucosidases after 24 h of pre-incubation while enzymes pre-incubated in buffer alone retained all of their activity Tannic acid caused significant inhibition of the hydrolysis by cellulase preparation from Novozymes, leading to ~70–80% decrease in the final hydrolysis extent and initial hydrolysate	[69] [58, 68]
Sinapic acid	Strong inhibition of commercial cellulase (celluclast 1.5 L)	[53]
Condensed tannins	Inhibitory to endoglucanase and avicelase activities	[4, 41]
Lignin derivatives	Strong inhibition of commercial cellulase (Spezyme CP)	[29]

was observed that oligomeric phenolics were more inhibitory on cellulase than simple phenolics and could inactivate cellulases by reversibly forming complexes with them, while simple and oligomeric phenolics could inhibit cellulase by adsorbing onto cellulose [58]. According to this article, polyethylene glycol is believed to prevent tannin adsorption onto cellulose or disrupt active cellulase–tannin complexes by “coating” the surface of insoluble lignocelluloses. Furthermore, polyethylene glycol may be involved in the formation of micelles that separate enzymes from their inhibitors. Gustavson [27] found that the formation of a precipitate between β -glucosidase and tannic acid was dependent on pH, ionic strength, and the concentrations of both proteins and tannins. By adding different amounts of tannic acid to the cellulose enzyme in a phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0), it was found that 1 mg of β -glucosidase in 1 mL was completely precipitated by 0.75 mg of tannic acid, i.e., no enzyme activity was measurable in the supernatant. An independent assay on the amount of tannic acid in the supernatant showed that 0.460 mg of the acid was bound to the enzyme and that this amount remained constant when up to 5 mg of tannic acid was used [24].

The inhibition of xylanases and pectinases by phenolic compounds has also been reported in the literature. Significant inhibition of xylanase activity by vanillic acid, syringic acid, acetosyringone, and syringaldehyde has been observed [47]. El Modafar and El Boustani [19] tested the effects of cell wall-bound phenols, such as *p*-hydroxybenzoic, *p*-coumaric, ferulic, and sinapic acids, on the cell wall-degrading enzyme (CWDE) production by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis*. In the presence of $2.5 \mu\text{mol cm}^{-3}$ of sinapic acid, the production of the different pectinolytic enzymes (pectin methylesterase, polygalacturonase, and polygalacturonase transeliminase) was completely inhibited, and the production of cellulase was strongly reduced (by approximately 90%). The production of cellulases was completely inhibited in the presence of $3 \mu\text{mol cm}^{-3}$ of sinapic acid. In the presence of $3 \mu\text{mol cm}^{-3}$ of ferulic acid, the production of pectinases was completely inhibited, and the production of the cellulases was reduced to 74%. However, *p*-coumaric acid and *p*-hydroxybenzoic acid did not induce a total inhibition of the CWDE at the concentrations tested. The effect of an artificially applied allelic chemical, ferulic acid, on *in vitro* *F. oxysporum* revealed that pectinase activity was repressed by ferulic acid at a low concentration (200 mg/L), while it was stimulated at high concentrations (400–1,600 mg/L), as shown by an activity increase of 12.3%. The activity of pectinase was stimulated at high concentrations of ferulic acid (400–1,600 mg/L) in liquid culture, while it was depressed at a low concentration (200 mg/L). The activity was 0.091 ± 0.007 U/mL/min at the highest concentration of 1,600 mg/L [66]. Boukari et al. [11] reported the noncompetitive multi-site inhibition mechanism of phenolic compounds, including cinnamic acid, *p*-coumaric

acid, caffeic acid, ferulic acid, and 3,4,5-trimethoxy-cinnamic acid, on the enzyme activity of a purified GH11 endoxylanase (Tx-Xyl) from *Thermobacillus xylanilyticus*. According to the authors, the inhibitory effects of phenolic compounds on Tx-Xyl activity do not involve a direct interaction with the enzyme active site. These interactions are likely to involve residues located at the surface of Tx-Xyl.

Ximenes et al. [69] suggested alternative strategies to improve enzyme activity and especially to alleviate the effects of phenolic compounds on such enzymes. They suggested carrying out enzyme hydrolysis over shorter periods of time to decrease the time-dependent deactivation or removing phenolics prior to enzyme hydrolysis by separation methods. Separation methods could include washing the solids or using microbial, enzymatic, or chemical methods for converting the phenolics to inactive forms.

In addition to the inhibitory effect of phenolic compounds, nonspecific adsorption of holocellulases onto insoluble lignin decreases enzyme reactivity [2]. The use of additives, such as Tween, polyethylene glycol (PEG), and bovine serum albumin (BSA), has shown promise in enhancing lignocellulose hydrolysis [9, 35]. These additives adsorb to lignin surfaces, preventing non-productive binding of holocellulases onto lignin. The competitive adsorption of Tween 80 onto the hydrophobic lignin surface decreased the adsorption of cellulase onto CEL-SELP, a commercial cellulase onto steam-exploded (SELP) lodgepole pine cellulolytic enzyme lignin (CEL), by 60% [60]. Eriksson et al. [20] found that the non-ionic surfactant (Tween 20) was the most effective at improving the conversion of steam-pretreated spruce, as it was able to lower the enzyme load by 50% and, at the same time, retain cellulose conversion. They concluded that the addition of surfactant to prevent enzymes from binding to the residual lignin increased the possibility of recycling enzymes after complete cellulose hydrolysis. The surfactants Tween-80, dodecylbenzene sulfonic acid, and polyethylene glycol 4000 were also effective in increasing lignin removal during the pretreatment of corn stover and reduced the non-productive binding of enzymes on the biomass surface. In addition, surfactant pretreatment improved lignin solubility [48].

The addition of NaCl in the concentration range of 0–0.4 M showed that ionic strength also has a considerable effect on cellulase adsorption to CEL-SELP lignin by altering enzyme adsorption. According to Can and Guner [13], the salt ions could either compete against the protein for binding sites or change the configuration of the protein, thereby resulting in a decrease in hydrophobic interactions between the protein and the solid surface. In contrast, the hydrophobic adsorption of enzymes to lignin induces the denaturation of enzymes on the lignin surface. It has also been demonstrated that temperature has significant effects on enzyme adsorption onto different lignocellulosic substrates [60]. Borjesson et al. [9] showed that

the addition of PEG during the enzyme conversion of lignocellulose at 50°C hinders the deactivation of enzymes by excluding them from lignin surfaces. The effect of PEG addition on the enzyme conversion of lignocellulose increased with higher temperatures due to the increased adsorption of PEG on lignin, thereby resulting in a higher surface density of PEG on the lignin surface. A higher level of cellulase adsorption onto isolated lignin occurred at 45°C rather than at 4°C or 25°C.

Proteins such as BSA were also reported to prevent the non-productive adsorption of cellulase onto lignin. The results obtained by Yang and Wyman [70] suggest that the addition of BSA to dilute acid pretreated corn stover prior to enzyme addition reduces the adsorption of cellulase, particularly β -glucosidase, onto lignin. These authors reported that BSA may act as a competitive lignin blocker and may irreversibly attach to the lignin structure and reduce unproductive cellulase binding onto lignin.

Inhibition of Holocellulases by Sugars

Studies on the inhibitory effect of sugars on holocellulases (especially xylan, xylooligomers, and xylose) are instrumental to obtaining a better understanding of the loss of cellulase accessibility and enzyme effectiveness during the conversion of cellulose [33, 49, 50, 62]. However, the mechanism of inhibition of cellulase and other holocellulose-degrading enzymes is still unclear and is matter of intense research.

One mechanism of inhibition is through the release of sugars and oligomer from hemicellulose during the enzymatic hydrolysis of holocellulose. Table 2 shows the effect of sugars on cellulase and hemicellulase activities.

In experiments reported by Qing et al. [49], the effect of xylan, xylose, and xylooligomers derived from xylan upon the enzymatic hydrolysis of pure cellulose (Avicel) was tested at low enzyme loadings. It was found that xylooligomers were more inhibitory to cellulase (Spezyme CP) than was xylan or xylose in terms of a decreased initial hydrolysis rate compared to xylan or xylose added at similar concentrations. Xylooligomer addition also led to a lower final glucose yield. Higher concentrations of each of these xylose compounds resulted in reduced initial hydrolysis rates. In addition, mixed DP xylooligomers showed little, if any, effect on β -glucosidase activity. In another study [50], the inhibitory effect of xylan and xylooligomers on cellulase (Spezyme CP) was reduced after enzyme supplementation with xylanase and β -xylosidase activity. In this case, the addition of these enzymes increased glucan conversion by 27% and 8% on corn stover pretreated with ammonia fiber expansion and dilute acid, respectively. This finding might suggest that the enzymatic removal of xylan and xylooligomers before adding cellulase may enhance cellulase effectiveness.

Ximenes et al. [68] found that oat spelt xylan hydrolysates (xylooligosaccharides and xylose) were responsible for the major inhibition of the activity of commercial cellulase (Spezyme CP) and β -glucosidase (Novozyme 188).

Table 2 Inhibitory effect of sugars and hydrolysates on holocellulases

Compound	Inhibitory effect	Reference
Glucose	Notably strong inhibition of for cellulase activities from an enzyme preparation of <i>T. reesei</i> QM 9414	[56]
	Inhibitory for Novo 188 at high concentrations	[18]
	Inhibitory to cellobiase from <i>T. viride</i>	[25, 36]
Cellobiose	Moderate inhibition of cellulase activities	[26]
Xylose	Inhibitory to a mix of cellulase (Spezyme CP) and β -glucosidase (Novozyme 188)	[68]
	Inhibitory to a mix of cellulase (Spezyme CP) and β -glucosidase (Novozyme 188) hydrolyzing a lignocellulosic substrate and to β -glucosidase alone (Novozyme 188)	[18]
	Significantly inhibitory to cellulase activity	[67]
Arabinose	Arabinose was more inhibitory than xylose or D-glucuronic acid to the hydrolysis of cellobiose by both <i>T. reesei</i> and <i>A. niger</i> β -glucosidases	[68]
Mannose	Significant inhibitory effect on cellulase activity	[67]
Galactose	Significant inhibitory effect on cellulase activity	[67]
Hydrolysis products of oat spelt xylan	Moderate inhibition of a mix of cellulase (Spezyme CP) and β -glucosidase (Novo 188) hydrolyzing a lignocellulosic substrate	[68]
Hydrolysis products of starch	Slight inhibition of a mix of cellulase (Spezyme CP) and β -glucosidase (Novo 188) hydrolyzing a lignocellulosic substrate	[68]
Xylan, xylooligomers, and xylose	Xylose, xylooligomers, and xylan strongly inhibited cellulase. Xylooligomers were more inhibitory to cellulase than were either xylan or xylose with an equivalent amount of xylose at the concentration studied	[49]

Pectin and starch also inhibit glucan hydrolysis. β -Glucosidase from *T. reesei* was more sensitive to inhibition by starch, pectin, and their hydrolysis products than β -glucosidase from *A. niger*. To demonstrate that the sugar produced from the hydrolysate inhibits hydrolysis of lignocellulosic substrates, Xiao et al. [67] removed all of the produced sugar from the hydrolysate through ultrafiltration. Significant increases in the hydrolysis rate were observed after the sugar removal at both 24 and 48 h of incubation. Takagi [56] demonstrated that glucose strongly inhibited the cellulase activity from an enzyme preparation of *T. reesei* QM 9414, in which concentrations of 2.5% glucose inhibited 50% of the reaction. Ladisch et al. [36] and Gong et al. [25] showed that *Trichoderma* β -glucosidase activity was inhibited by 50% in the presence of 0.2–0.4 g/L glucose (i.e., $K_i=1.0$ – 2 mM), which is a ratio of enzyme activity to initial substrate of approximately 40 CBU/g cellobiose.

Cellobiose that is produced during cellulolysis is inhibitory to both exo- and endocellulases, thereby retarding saccharification [18]. Cellobiose is considered to be a powerful inhibitor of cellulases and inhibits this enzyme 14 times more than glucose. This type of inhibition has been classified in many different ways. Misunderstandings regarding this inhibition

result from the difficulty of conducting conclusive experiments that show the type of inhibition involved in a heterogeneous reaction environment (cellulose is an insoluble substrate) and the assumption that the cellulolytic system consists of a single enzyme [8]. Additionally, the conversion of cellobiose to ethanol can reduce the inhibition of cellulases by a factor of 16 [7]. Cellobiose inhibition of Cel 7A from *T. reesei*, which acts on low molecular weight chromogenic substrates, such as par-nitrophenyl cellobioside, has been well studied and reveals a strong competitive inhibition with an inhibition constant of approximately 20 μ M [26]. Such a strong product inhibition is a drawback from a biological activity point of view, as it limits the level of soluble sugars that can be produced. However, it has been shown that the hydrolysis of natural, cellulosic substrates are more resistant to inhibition, and product inhibition is not responsible for the gradual decrease in the hydrolysis rate at the early stage of the process [26, 61].

Other Important Inhibitors of Holocellulases

Some other important inhibitors of holocellulases are listed in Table 3 and include inhibitors not derived from the

Table 3 Inhibitory effect of other compounds biomass or not derived on holocellulases

Compound	Inhibitory effect	Reference
Acetic acid	Inhibitory for cellulase activities from <i>T. reesei</i> QM 9414	[56]
Butyric acid	Inhibitory for cellulase activities from <i>T. reesei</i> QM 9414	[56]
Citric acid	None	[56]
Formic acid	Strong inhibition for cellulase and xylanase activities.	[47]
Furoic acid	Inhibitory for xylanase activity.	[47]
Succinic acid	Inhibitory for cellulase activities (<i>T. reesei</i> QM 9414).	[56]
Guaicol	None	[47]
Ethanol	Strong inhibition for cellulase activities from <i>T. reesei</i> QM 9414	[56]
	Weak inhibition on exoglucanase activity from <i>T. reesei</i> Cel 7A	[7]
Butanol	Strong inhibition for cellulase activities (<i>T. reesei</i> QM 9414)	[56]
Butanediol	Strong inhibition for cellulase activities (<i>T. reesei</i> QM 9414)	[56]
Acetone	Strong inhibition for cellulase activities (<i>T. reesei</i> QM 9414)	[56]
Sodium gluconate	Strong inhibition for cellulase activities (<i>T. reesei</i> QM 9414)	[56]
Itaconic acid	Inhibitory for cellulase activities (<i>T. reesei</i> QM 9414)	[53]
α -Ketoglutaric acid	None	[56]
Lactic acid	Inhibitory for cellulase activities from <i>T. reesei</i> QM 9414	[56]
Propionic acid	Strong inhibition for cellulase activities from <i>T. reesei</i> QM 9414	[56]
Hg ²⁺	Xylanases from <i>Streptomyces</i> T7 were completely inhibited	[31]
	Xylanases from <i>T. koningii</i> were completely inhibited	[32]
	Xylanases from <i>A. awamori</i> were completely inhibited	[57]
Co ²⁺ , Fe ³⁺ , and Ca ²⁺	Inhibitory for mannanase and xylanase activities from <i>C. thermocellum</i>	[63]
Cu ²⁺ , Ca ²⁺ , Fe ²⁺ , Al ³⁺ , Mn ²⁺ , and Zn ²⁺	Inhibited pectinase from <i>A. nainiana</i>	[14]
Mn ²⁺ , Co ²⁺	Inhibited polygalacturonase from <i>T. harzianum</i>	[43]
Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Mg ²⁺ , Fe ³⁺ , and Zn ²⁺	Inhibited pectinase from <i>M. circinelloides</i> ITCC 6025	[56]

biomass. Among these inhibitors, formic acid, acetone, 2,3-butanediol, and propionic acid have been shown to be strong inhibitors of holocellulase [47, 56]. The holocellulase activity is deeply affected by ions; however, the effects of these ions are most important on the environment characterization surrounding the enzyme [42, 43]. Metal ions can be involved in enzyme catalysis in a variety of ways: accepting or donating electrons, acting as electrophiles themselves, masking nucleophiles to prevent unwanted side reactions, bringing together enzyme and substrate by coordinate bonds, holding the reacting groups in the required 3D orientation, and simply stabilizing a catalytically active conformation of the enzyme [44]. Among the numerous studies in the literature involving metal ions, the properties mentioned above are highlighted particularly by salts of chloride, nitrate, and sulfate.

In addition, cellulases are inhibited by mercury, silver, copper, chromium, lead, and zinc salts at concentrations of approximately 10^{-3} M. Cellulases are also inhibited by large organic molecules, such as acid or basic dyes, quaternary ammonium salts, or other detergents. The cellulase enzymatic reaction being reviewed involves ionic binding, and it is strongly affected by the pH of the reaction mixture. Acid dyes and anionic detergents inhibit at low pH levels, while basic dyes and cationic detergents become inhibitory at high pHs. Halogens and compounds that release reactive halogens, such as hypochlorite, dichloramine-B, *N*-chlorosuccinimide, *N*-bromosuccinimide, chloromelamine, and tetraglycine potassium periodide, may be active at a concentration of 10^{-4} M [39].

Keskar et al. [31] reported the isolation of a high-xylanase-producing thermotolerant *Streptomyces* T7 and observed that the xylanase enzyme was completely inhibited by Hg^{2+} at a concentration of 2×10^{-6} M. Kim et al. [32] also studied the effects of various reagents on purified xylanase I from *Trichoderma koningii* (ATCC 26113) and verified that at a concentration of 10 mM, Hg^{2+} inhibited this enzyme's activity. The authors also demonstrated that xylanase I, which is inactivated by Hg^{2+} , could be completely reactivated by the addition of 10 mM cysteine. Teixeira et al. [57] verified that purified PXII-1 xylanase from *Aspergillus awamori* was inhibited 100% by Hg^{2+} , probably due to its interaction with its sulfhydryl groups. Vieira et al. [63] evaluated the influence of various ions on xylanase and mannanase activity of the partially purified enzyme complex from the thermophilic cellulolytic bacterium *Clostridium thermocellum* (ISO II). A significant negative effect on xylanase and mannanase activity was observed with Co^{2+} . Calcium (Ca^{2+}) did not affect the xylanase activity. Fe^{3+} and Ca^{2+} inhibited mannanase activity but not xylanase activity.

Recent studies carried out by Thakur et al. [59] with a purified and characterized polygalacturonase from the saprophytic fungus, *Mucor circinelloides* (ITCC 6025),

identified inhibition ranging from 5% to 15% of the polygalacturonase enzyme activity in the presence of Mn^{2+} , Co^{2+} , and Mg^{2+} , while Fe^{3+} and Zn^{2+} caused inhibition ranging from 27% to 31%. In contrast, the activity of the purified extracellular pectinase produced by the thermotolerant fungus *Acrophialophora nainiana* was completely inactivated by Cu^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Al^{3+} , Mn^{2+} , and Zn^{2+} [14].

Within the group of holocellulases, pectinases are the first cell wall-degrading enzymes that are secreted by microorganisms; therefore, they are exposed to inhibitors, which are mostly proteins [38]. Several plants produce proteins with inhibitory activity against extracellular holocellulases of fungal pathogens [1, 6, 15, 17]. The finding of a powerful glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase (PME) in ripe kiwi was reported by Balestrieri et al. [5]. The glycoprotein inhibitor was described as having a molecular mass of 28 kDa and specificity for PME from several sources, including orange-, tomato-, potato-, apple-, and banana-producing plants. Furthermore, it was hypothesized to be involved in the pathogen defense mechanism of plants and in the control mechanism of the plant's growth and/or maturation. In addition, a protein from sugar beet roots inhibited the pectin lyase (PNL) activity of *Rhizoctonia solani* [12]. This inhibitor was equally effective against the PNL from *Phoma betae* and was less effective against the PNL from *Aspergillus japonicus*.

Ethanol inhibition is much less potent than cellobiose and glucose inhibition [56, 65], but the inhibitory effect of ethanol on cellulase enzymes is of a particular concern in performing the simultaneous saccharification and fermentation of biomass because the cellulase enzyme and ethanol coexist in the same reactor [7, 64]. Ethanol has been found to inhibit the crude exoglucanase enzyme at a much higher rate than it inhibits purified Cel 7A, which in fact appears to be almost not inhibited by ethanol.

Conclusion

The reaction between an enzyme and a complex polymeric substrate is not simple, nor is it, in this case, fully understood as yet [39, 71]. This problem is even more complicated when the polymer substrate is insoluble, thereby requiring the initial enzyme attack on crystalline portions of the cellulosic fiber [64]. The initial stage of the enzymatic saccharification of the holocellulose (amorphogenesis) is closely associated with the enzymatic access to the insoluble cellulose microfibrils which is limited by lignin and hemicelluloses, encasing the microfibrils [3]. Economical processing of lignocellulose at high-solid concentrations is challenging, not only due to mass transfer limitations, low water activities, and insufficient mixing but also because of the presence of soluble inhibitors. Soluble inhibitors, such

as phenolic and xylooligosaccharide compounds, are major inhibitors that lead to decrease holocellulase activity. In addition, inhibitors not derived from the biomass, including ions and ethanol, can deeply affect the holocellulase activity. The isolation or development of holocellulases with increased resistance to inhibition of sugars, phenols, and inhibitors not derived from the biomass would enhance lignocelluloses hydrolysis activity.

Acknowledgments E.X.F. acknowledges the receipt of a research fellowship from the Brazilian Research Council (CNPq). P.M.D.J. and L.R.S.M acknowledge the receipt of a postgraduate maintenance scholarship from CNPq and Coordination for the Improvement of Higher Education, respectively. This work is funded by CNPq (research grants 563260/2010-6 and 563823/2010-0), Foundation for Research Support of Federal District (Brazil, Pronex Program) and National Institute of Science and Technology of Bioethanol. The authors would like to thank Dr. Eduardo de Aquino Ximenes for proofreading the manuscript.

References

1. Abu-Goukh AA, Greve LC, Labavitch JM (1983) Purification and partial characterization of 'Bartlett' pear fruit polygalacturonase inhibitors. *Physiol Plant Pathol* 23:111–122
2. Andreus J, Filho EXF, Bon EPS (2008) A review on biotechnology of holocellulose-degrading enzymes. In: Hou CT, Shaw JF (eds) *Biocatalysis and bioenergy*. Wiley, New Jersey, pp 1–41
3. Arantes V, Jack N, Saddler JN (2010) Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol Biofuels* 3:4
4. Bae HD, McAllister TA, Yanke J, Cheng KJ, Muir AD (1993) Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl Environ Microbiol* 59:2132–2138
5. Balestrieri C, Castaldo D, Giovane A, Quagliuolo L, Servillo L (1990) A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). *Eur J Biochem* 193:183–187
6. Barmore CR, Nguyen TK (1985) Polygalacturonase inhibition in rind of Valencia orange infected with *Diplodia natalensis*. *Phytopathol* 75:446–449
7. Bezerra RMF, Dias AA (2005) Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis inhibition by ethanol and cellobiose. *Appl Biochem Biotech* 126:49–59
8. Bezerra RMF, Dias AA, Fraga I, Pereira AN (2006) Simultaneous ethanol and cellobiose inhibition of cellulose hydrolysis studied with integrated equations assuming constant or variable substrate concentration. *Appl Biochem Biotech* 134:27–38
9. Borjesson J, Engqvist M, Sipos B, Tjerneld F (2007) Effect of poly (ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocelluloses. *Enz Microb Technol* 41:186–195
10. Borneman WS, Ljungdahl LG, Hartley RD, Akin DE (1993) Feruloyl and p-coumaroyl esterases from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2: properties and functions in plant cell wall degradation. In: Coughlan MP Hazlewood GP (eds) *Hemicellulose and hemicellulases*. Portland, London, pp 85–102
11. Boukari I, O'Donohue M, Rémond C, Chabbert B (2011) Probing a family GH11 endo- β -1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: role of functional phenolic groups. *J Mol Cat B: Enzymatic* 72:130–138
12. Bugbee WM (1993) A pectin lyase inhibitor protein from cell walls of sugar beet. *Phytopathol* 83:63–68
13. Can HK, Guner A (2006) Investigation of adsorption-desorption dynamism of bovine serum albumin on crosslinked N, N-diethylaminoethyl dextran microbeads: solution phase. *J Appl Polym Sci* 99:2288–2299
14. Celestino SMC, de Freitas SM, Medrano FJ, de Souza MV, Filho EXF (2006) Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physico-chemical properties. *J Biotechnol* 123:33–42
15. Cervone F, De Lorenzo G, Degra L, Salvi G, Bergami M (1987) Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 85:631–637
16. Coughlan MP, Thuohy MG, Filho EXF, Puls J, Claeysens M, Vrsanská M et al. (1993) Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems. In: Coughlan MP Hazlewood GP (eds) *Hemicellulose and hemicellulases*. Portland, London, pp 53–84
17. D'hallewin G, Schirra M, Powell ALT, Greve C, Labavitch JM (2004) Properties of a polygalacturonase-inhibiting protein isolated from "Oroblanco" grapefruit. *Physiol Plantarum* 120:395–404
18. Dekker RFH (1986) Kinetic, inhibition, and stability properties of a commercial β -D-glucosidase (cellobiase) preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocelluloses. *Biotechnol Bioeng* 28:1438–1442
19. El Modafar C, El Boustani E (2001) Cell wall-bound phenolic acid and lignin contents in date palm as related to its resistance to *Fusarium oxysporum*. *Biol Plantarum* 44:125–130
20. Eriksson T, Borjesson J, Tjerneld F (2002) Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme Microb Technol* 31:353–364
21. Fang X, Shen Y, Zhao J, Bao X, Qu Y (2010) Status and prospect of lignocellulosic bioethanol from China. *Biores Technol* 101:4814–4819
22. Fenske JJ, Griffin DA, Penner MH (1998) Comparison of aromatic monomers in lignocellulosic biomass prehydrolysates. *J Ind Microbiol Biotechnol* 20:364–368
23. Gamble GR, Snook ME, Henriksson G, Akin DE (2000) Phenolic constituents in the bast tissue and inhibition of cellulose and pectinase. *Biotechnol* 22:741–746
24. Goldstein JL, Swain T (1956) The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochem* 4:185–192
25. Gong CS, Ladisch MR, Tsao GT (1977) Cellobiase from *Trichoderma viride*: purification, properties, kinetics, and mechanism. *Biotechnol Bioeng* 19:959–981
26. Gruno M, Våljamä P, Petterson G, Johansson G (2004) Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. *Biotechnol Bioeng* 86:503–511
27. Gustavson KH (1956) *The chemistry of tannins processes*. Academic, New York
28. Hodge DB, Karim MN, Schell DJ, McMillan JD (2008) Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biores Technol* 99:8940–8948
29. Jing X, Zhang X, Bao J (2009) Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol* 159:696–707
30. Kawakubo T, Karita S, Araki Y, Watanabe S, Oyadomari M et al. (2010) Analysis of exposed cellulose surfaces in pretreated wood biomass using carbohydrate-binding module (CBM)-cyan fluorescent protein (CFP). *Biotechnol Bioeng* 105:49–508
31. Keskar SS, Srinivasan MC, Deshpande VV (1989) Chemical modification of a xylanase from a thermotolerant *Streptomyces*. Evidence for essential tryptophan and cysteine residues at the active site. *Biochem J* 261:49–55

32. Kim HJ, Kang SO, Yung CH (1993) Purification and characterization of xylanase I from *Trichoderma koningii* ATCC 26113. Korean J Microbiol 31:63–71
33. Kim Y, Ximenes EA, Mosier NS, Ladisch MR (2011) Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. Enz Microbiol Technol 48:408–415
34. Kristensen JB (2009) Enzymatic hydrolysis of lignocellulose substrate interactions and high solids loadings. In: Faculty of Life Sciences, Vol. Doctor of Philosophy (PhD), University of Copenhagen, Frederiksberg, p 130
35. Kumar R, Wyman CE (2009) Effect of additives on the digestibility of corn stover solids following pretreatment by leading technologies. Biotechnol Bioeng 102:1544–1557
36. Ladisch MR, Gong C-S, Tsao GT (1977) Corn crop residues as a potential source of single cell protein: kinetics of *Trichoderma viride* cellobiase action. Dev Ind Microbiol Ser 18:157–168
37. Ladisch M, Mosier N KY, Ximenes EA, Hogsett D (2010) Conversion of cellulose to biofuels. Chem Eng Progress 106:56–63
38. Lagaert S, Belien T, Volckaert G (2009) Plant cell walls: protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. Sem Cell Develop Biol 20:1064–1073
39. Mandels M, Reese ET (1965) Inhibition of cellulases. Annu Rev Phytopathol 3:85–102
40. McNeil M, Darvill AG, Fry SC, Albersheim P (1984) Structure and function of the primary cell walls of plants. Annu Rev Biochem 53:625–663
41. McAllister TA, Bae HD, Yanke LJ, Cheng KJ (1994) Effect of condensed tannins from birdsfoot trefoil on endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by ruminal fungi. Can J Microbiol 40:298–305
42. McMillan JD (1994) Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel ME, Baker JO, Overend RP (eds) Enzymatic conversion of biomass for fuels production. ACS symposium series, vol. 566. ACS, Washington, DC, pp 292–324
43. Mohamed SA, Farid NM, Hossiny EN, Bassuiny RI (2006) Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. J Biotechnol 127:54–64
44. Mohana S, Shah A, Divecha J, Madamwar D (2008) Xylanase production by *Burkholderia* sp. DMAX strain under solid state fermentation using distillery spent wash. Biores Technol 99:7553–7564
45. Moreira LRS, Filho EXF (2008) An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. Appl Microbiol Biotechnol 79:165–178
46. Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapfle M et al. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Biores Technol 96:673–686
47. Panagiotou G, Olsson L (2007) Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. Biotechnol Bioeng 96:250–258
48. Qing Q, Yang B, Wyman CE (2010) Impact of surfactants on pretreatment of corn stover. Biores Technol 101:5941–5951
49. Qing Q, Yang B, Wyman CE (2010) Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. Biores Technol 101:9624–9630
50. Qing Q, Wyman CE (2011) Supplementation with xylanase and β -xylosidase to reduce xylooligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover. Biotechnol Biofuels 4:18
51. Ryan SE, Nolan K, Thompson R, Gubitzi GM, Savage AV, Tuohy MG (2003) Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. Enz Microb Technol 33:775–785
52. Saha B (2003) Hemicellulose bioconversion. J Ind Microbiol Biotechnol 30:279–291
53. Sineiro J, Dominguez H, Núñez MJ, Lema JM (1997) Inhibition of cellulase activity by sunflower polyphenols. Biotechnol Lett 19:521–524
54. Siqueira FG, Filho EXF (2010) Plant cell wall as substrate for the production of enzymes with industrial applications. Mini-Rev Org Chem 7:54–60
55. Szengyel Z, Zacchi G, Varga A, Réczey K (2000) Cellulase production of *Trichoderma reesei* Rut C30 using steam-pretreated spruce. Appl Biochem Biotechnol 84–86:679–691
56. Takagi M (1984) Inhibition of cellulase by fermentation products. Biotechnol Bioeng 26:1506–1507
57. Teixeira RSS, Siqueira FG, Souza MV, Filho EXF, Bon EPS (2010) Purification and characterization studies of a thermostable β -xylanase from *Aspergillus awamori*. J Ind Microbiol Biotechnol 37:1041–1051
58. Tejrarian A, Xu F (2011) Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. Enz Microb Technol 48:239–247
59. Thakur A, Pahwa R, Singh S, Gupta R (2010) Production, purification and characterization of polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. Enz Res 2010:1–7
60. Tu M, Pan X, Saddler JN (2009) Adsorption of cellulase on cellulolytic enzyme lignin from lodgepole pine. J Agric Food Chem 57:7771–7778
61. Våljamäe P, Sild V, Petterson G, Johansson G (1998) The initial kinetics of hydrolysis by cellobiohydrolases I and II is consistent with a cellulose surface—erosion model. Eur J Biochem 253:469–475
62. Várnai A, Siika-aho M, Viikari L (2010) Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicelluloses. Enz Microb Technol 46:185–193
63. Vieira WB, Moreira LRS, Monteiro Neto A, Filho EXF (2007) Production and characterization of an enzyme complex from a new strain of *Clostridium thermocellum* with emphasis on its xylanase activity. Braz J Microbiol 38:237–242
64. Walton JD (1994) Deconstructing the cell wall. Plant Physiol 104:1113–1118
65. Wu Z, Lee YY (1997) Inhibition of the enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol. Biotechnol Lett 19:977–979
66. Wu HS, Luo J, Raza W, Liu YX, Gu M, Chen G et al. (2009) Effect of exogenously added ferulic acid on *in vitro* *Fusarium oxysporum* f. sp. Niveum. Sci Horticult 124:448–453
67. Xiao Z, Zhang X, Gregg D, Saddler J (2004) Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. Appl Biochem Biotechnol 115:1115–1126
68. Ximenes EA, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M (2010) Inhibition of cellulases by phenols. Enz Microb Technol 46:170–176
69. Ximenes EA, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M (2011) Deactivation of cellulases by phenol. Enz Microb Technol 48:54–60
70. Yang B, Wyman CE (2006) BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. Biotechnol Bioeng 94:614–617
71. Yang B, Willies DM, Wyman CE (2006) Changes in the enzymatic hydrolysis rate of Avicel cellulose with conversion. Biotechnol Bioeng 94:1122–1128
72. Zhang YHP, Himmel ME, Mielenz JR (2006) Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. Biotechnol Adv 24:452–481

APÊNDICE B – PREPARAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ELETROFORESE EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (adaptado de Sambrook et al., 1989)

Preparo das placas e do gel desnaturante em presença de SDS, a 12%

Duas placas de vidro sendo uma externa (10,2 x 8,3 cm) e uma interna (10,2 x 7,3 cm) foram separadas por dois espaçadores de vidro, permanentemente aderidos à placa externa, e com 0,75 mm de espessura, fazem parte do sistema “Mini Protean[®] Tetra Cell” (Bio Rad, EUA).

O preparo do gel (12 %) foi realizado pela mistura das seguintes soluções do Quadro abaixo:

Soluções utilizadas	Gel Separador (volume mL)	Gel Concentrador (volume mL)
H ₂ O ultrapura	1,60	2,10
Acril-bis-acril (30:0,8%)	2,00	0,50
Tris-HCl 1,5 mol.L ⁻¹ , pH 8,8	1,30	-----
Tris-HCl 1,0 mol.L ⁻¹ , pH 6,8	-----	0,38
SDS (10%)	0,05	0,03
Persulfato de Amônio (10 %)	0,05	0,03
TEMED	0,003	0,003

À amostra de proteína foi adicionada de meio volume da solução tampão de amostra [tris-HCl 125 mmol.L⁻¹, pH 6,8; SDS 2,0% (v/v); azul de bromo fenol 0,05% (m/v); glicerol 20% (v/v) e β-mercaptoetanol 5,0% (v/v)]. As misturas foram fervidas por três minutos a 100°C.

Depois de polimerizado, as duas placas contendo o gel foram conectadas a uma mini-cuba de policarbonato, também componente do sistema citado acima. O conjunto foi acoplado a uma fonte elétrica universal, modelo PowerPac[™] Basic 300 (Bio Rad, EUA). Uma solução tampão [tris-HCl 25 mmol.L⁻¹, glicina 192 mmol.L⁻¹ e SDS 0,1% (v/v), pH 8,3 após diluição] foi utilizada para equilíbrio tamponante o cátodo e ânodo. Por fim, a eletroforese foi realizada à temperatura ambiente, submetida a 25 miliampères constante por 50 minutos.

Referências bibliográficas

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edition ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.

APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO:

Duarte, G. C.; Moreira, L. R. S.; Gómez-Mendoza, D. P.; Siqueira, F. G.; Batista, L. R.; Amaral, L. I. V.; Ricart, C. A. O.; Filho, E. X. F., Use of residual biomass from the textile industry as carbon source for production of a low-molecular-weight xylanase from *Aspergillus oryzae*. *Applied Sciences* **2012**, 2, 754-772.

Article

Use of Residual Biomass from the Textile Industry as Carbon Source for Production of a Low-Molecular-Weight Xylanase from *Aspergillus oryzae*

Gilvan Caetano Duarte ¹, Leonora Rios de Souza Moreira ², Diana Paola Gómez-Mendoza ³, Félix Gonçalves de Siqueira ⁴, Luís Roberto Batista ⁵, Lourdes Isabel Velho do Amaral ⁶, Carlos André Ornelas Ricart ³ and Edivaldo Ximenes Ferreira Filho ^{2,*}

¹ Laboratory of Genetics and Biochemistry, Biological Sciences Course, Federal University of Tocantins, Porto Nacional, TO, CEP 77500-000, Brazil

² Laboratory of Enzymology, Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, DF, CEP 70910-900, Brazil

³ Laboratory of Biochemistry and Protein Chemistry, Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, DF, CEP 70910-900, Brazil

⁴ Laboratory of Industrial Microbiology and Enzymology, Multidisciplinary Institute for Health, Federal University of Bahia, Vitoria da Conquista, BA, CEP 45029-094, Brazil

⁵ Laboratory of Food Microbiology, Department of Food Science, Federal University of Lavras, Lavras, MG, CEP 37200-000, Brazil

⁶ Laboratory of Plant Physiology, Department of Botany, University of Brasília, Brasília, DF, CEP 70910-900, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: eximenes@unb.br; Tel.: +55-613-107-2976; Fax: +55-613-107-2904.

Received: 18 September 2012; in revised form: 12 October 2012 / Accepted: 12 October 2012 /

Published: 23 October 2012

Abstract: Pretreated dirty cotton residue (PDCR) from the textile industry was used as an alternative carbon source for the submerged cultivation of *Aspergillus oryzae* and the production of xylanases. The filtered culture supernatant was fractionated by ultrafiltration followed by three chromatographic steps, which resulted in the isolation of a homogeneous low-molecular-weight xylanase (Xyl-O1) with a mass of 21.5 kDa as determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) co-polymerized with 0.1% oat spelt xylan. Enzyme catalysis was the most efficient at 50 °C and pH 6.0. The K_m values ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) for the soluble fraction of oat spelt and birchwood xylyns were 10.05 and 3.34, respectively. Xyl-O1 was more stable in the presence of 5,5-dithio-bis-(2-

nitrobenzoic acid) (DTNB), 1,4-dithiothreitol (DTT), L-cysteine or β -mercaptoethanol, which increased the rate of catalysis by 40%, 14%, 40% or 37%, respectively. The enzyme stability was improved at pH 7.0 in the presence of 20 mM L-cysteine, with the retention of nearly 100% of the activity after 6 h at 50 °C. Xyl-O1 catalyzed the cleavage of internal β -1,4 linkages of the soluble substrates containing D-xylose residues, with a maximum efficiency of 33% for the hydrolysis of birchwood xylan after 12 h of incubation. Identification of the hydrolysis products by high-performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) indicated the predominance of the hydrolysis products X2-X6 during the first 12 h of incubation and the accumulation of higher xylooligomers after the elution of the last xylooligomer standard, xylohexaose.

Keywords: agro-industrial residues; hemicellulose; enzyme purification; xylanase; hydrolysis

1. Introduction

Agricultural and forestry residues, municipal solid waste, industrial processing residues and energy crops are readily available, low-cost sources of large quantities of holocellulose materials that can be used to obtain chemical feedstocks, biofuels, foods and feeds [1,2]. Dirty cotton residue is produced during cotton processing and when harvested cotton is brought to spinners where it is processed into yarn for weaving. The bales that are unsuitable for yarn processing comprise cotton powder, brittle fibers and large quantities of cotton plant waste, such as stalks, stems, leaves and seed hulls, and are referred to as dirty cotton residue. This dirty cotton residue is marketed to re-processing industries to produce new, second-quality cotton fibers and filter cotton powder [3].

Biotechnological use of lignocellulosic residues, including dirty cotton residue, requires the action of enzymes that degrade cellulose, hemicellulose and pectin [4,5]. The enzymes that catalyze these reactions are generally obtained from microorganisms that contain synergistic, multi-catalyst systems [6]. The utilization of abundant, low-cost agricultural by-products as substrates for xylanase production substantially reduces enzyme production costs [7].

β -Xylanase (1,4- β -D-xylan xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) is a representative of an important group of endo-glycosyl hydrolases. It catalyzes the breakdown of β -1,4 glycosidic bonds in xylan, a linear polymer of β -D-xylopyranosyl units [8], to yield short xylooligomers [9]. Xylooligomers are further hydrolyzed into single xylose units by side-chain enzymes [10] that are essential for the efficient breakdown of the second most abundant natural polysaccharide in hardwoods and softwoods, [11]. The xylanases of microorganisms have a number of major biotechnological applications, including clarifying fruit juices and wines, food processing in combination with cellulases, improvement of the nutritional properties of agricultural silage, grain feed and poultry feed, degumming of plant fibers, and bio-pulping [7]. The use of low-molecular-weight xylanases in prebleaching of cellulose pulp has become an alternative approach in eliminating chlorine in bleaching and reducing chlorinated organic compounds in bleach plant effluents. It is worth stressing that their small size may represent an

advantage for the biobleaching application once the effects of enzymes on pulps depend largely on their penetration into the fibre wall of cellulose pulp.

Numerous reports describe the use of filamentous fungi, primarily those of the *Aspergillus* genus, in the production of xylanases. Among these fungi, *Aspergillus oryzae*, the so-called koji mold, has been used extensively in traditional Japanese fermentation products, such as sake (rice wine), shoyu (soy sauce), and miso (soybean paste), for more than 1000 years [12]. The long history of *A. oryzae* in the food fermentation industries prompted the United States Food and Drug Administration (FDA) to include *A. oryzae* in the list of Generally Recognized as Safe (GRAS) organisms [13]. In addition to its use in the manufacture of fermented foods, *A. oryzae* is an efficient producer of xylanases.

In light of the biotechnological importance of xylanases in plant cell wall degradation, this study aimed to use pretreated dirty cotton residue (PDCR) as a carbon source for *A. oryzae* cultivation and the subsequent production and purification of a low-molecular-weight xylanase. Some biochemical properties, such as pH, optimum temperature, thermal stability, and hydrolysis activity, are compared with other xylanolytic enzymes described in the literature. This report is the first on the purification and characterization of a xylanase produced by *A. oryzae* grown on textile industry residue.

2. Experimental Section

2.1. Feed Residue, Substrate and Chemicals

Dirty cotton residue was kindly supplied by Hantex (Textile Waste Co., Blumenau, Santa Catarina, Brazil). Microcrystalline cellulose (avicel) was obtained from Fluka (Seelze, Germany). Other chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

All the experiments described below were performed at least three times. The standard deviation of the enzyme assay experiments was less than 20% of the mean.

2.2. Residue Pretreatment

Dirty cotton residue was thoroughly washed with tap water and autoclaved at 121 °C for 2 h. After autoclaving, it was dried at 65 °C for 48 h and then ground to form a homogeneous blend. A fine powder was obtained and used as the substrate for the enzymatic hydrolysis experiments.

2.3. Organism and Enzyme Production

A. oryzae was isolated from the natural composting of textile wastes and was identified by the Laboratory of Food Microbiology, Lavras, Brazil. The fungus was maintained in PDA medium (2% potato broth, 2% dextrose and 2% agar). For xylanase production, an aliquot (5.0 mL) of spore suspension (10^8 spores/mL) was inoculated into Erlenmeyer flasks. The cultures were incubated at 28 °C with constant agitation at 120 rpm for six days in 500 mL liquid medium containing (w/v) 0.7% KH_2PO_4 , 0.2% K_2HPO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 0.16% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at pH 7.0, with 1% (w/v) PDCR as the carbon source. The crude extract obtained from these cultures was centrifuged at 10,500 g for 10 min at 20 °C, filtered through a Büchner funnel with filter paper (Whatman No. 1), and stored at 4 °C.

2.4. Enzyme Assays

The xylanase activity was determined by mixing 25 μL of enzyme solution with 50 μL of oat spelt xylan ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium acetate buffer, pH 5.0, at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min, as described by Filho *et al.* [14]. The release of the reducing sugar was measured using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method [15], and the xylanase activity was expressed as micromoles of reducing sugar released per min per milliliter ($\text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$). The β -1,3-glucanase, β -1,4-glucanase and β -mannanase assays were performed under the same conditions as described above. The activity against filter paper was measured as described by Ghose [16]. β -Xylosidase, α -arabinofuranosidase, β -glucosidase and β -mannosidase activities were determined as reported elsewhere [17]. For the kinetics experiments, the soluble and insoluble fractions of oat spelt and birchwood xylans were used as substrates in a concentration range of $6.0\text{--}26.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The substrates were prepared as described by Filho *et al.* [14]. K_m and V_{max} were estimated from the Michaelis-Menten equation with a non-linear regression data analysis program (Enzfitter) [18]. The effect of temperature on Xyl-O1 activity was determined in the temperature range of 30 to $80 \text{ }^\circ\text{C}$ in $35 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium acetate buffer, pH 5.0. To determine the effect of pH on Xyl-O1 activity at $50 \text{ }^\circ\text{C}$, the Xyl-O1 activity in the pH range of 3.0 to 9.0 was determined. The following buffers were used for these experiments: $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium acetate (pH 3.0–6.0), $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium phosphate (pH 6.5–7.5), and $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.0–9.0). All buffers, regardless of pH, were adjusted to the same ionic strength with NaCl [19]. Xyl-O1 stability was determined by pre-incubating the enzyme at pH 7.0 at either 50 or $55 \text{ }^\circ\text{C}$. At various time points, aliquots were withdrawn, and the residual activity was measured in the presence of $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium acetate, pH 6.0 (ionic strength adjusted with NaCl), at $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Purified xylanase activity was determined in the presence of the metal ions Ag^+ , K^+ , Na^+ , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} and Fe^{3+} at final concentrations of 1.0 and $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. The effects of the reagents $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ N-bromosuccinimide (NBS), $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and $2,2$ -dithiodipyridine, $5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-tryptophan, iodoacetamide, diethyl pyrocarbonate (DEPC), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) and β -mercaptoethanol, and $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT (1,4-dithiothreitol), L-cysteine and sodium dodecyl sulfate (SDS) were also determined in the presence of $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium acetate, pH 6.0 (ionic strength adjusted with NaCl), at $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Prior to these tests, the purified enzyme was added to either the ions or the reagents and pre-incubated for 20 min at $28 \text{ }^\circ\text{C}$. The exception to this was the experiments with Mn^{2+} , which was tested at a final concentration of $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ and pre-incubated for 40 min. Appropriate controls were included for all the experiments, and the average values are reported as relative activity (%). The amino acids L-cysteine and L-tryptophan and the ion Mn^{2+} interfered with the quantification of the reducing sugars by the DNS assay by 20% and 40%, respectively, which were corrected to obtain the final value of xylanase activity.

2.5. Determination of Protein Concentration

Protein concentration was determined by the Bradford method [20] using a Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and bovine serum albumin as the reference protein according to the manufacturer's instructions.

2.6. Enzyme Purification

A sample (110 mL) of filtered culture supernatant (FCS) was obtained after *A. oryzae* cultivation and was concentrated by ultrafiltration using an Amicon System with a 10 kDa cut-off point membrane (PM-10; Amicon Millipore Co., Billerica, MA, USA). The ultrafiltrate contained approximately 50% of the xylanolytic activity from the FCS and was subjected to lyophilization (Freeze Dryer Liobrás, Brazil) for 48 h. The lyophilized material was resuspended in 50 mmol·L⁻¹ sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 150 mmol·L⁻¹ NaCl and 0.02% NaN₃. The solution was then centrifuged at 10,500 g at 4.0 °C for 10 min. This supernatant was used in the subsequent chromatographic steps. Aliquots of 4.5 mL were fractionated by gel filtration chromatography using a Sephacryl S-100 column (45 × 2.6 cm) that had been pre-equilibrated with 50 mmol·L⁻¹ sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 150 mmol·L⁻¹ NaCl and 0.02% NaN₃. The enzyme sample was eluted at a flow rate of 20 mL·h⁻¹, and 3.0 mL fractions were collected and analyzed by absorbance at a wavelength of 280 nm. Fractions with xylanolytic activity were pooled, and a combined volume of 6.5 mL was re-subjected to gel filtration chromatography on a Sephadex G-50 column (65 × 2.6 cm) that was pre-equilibrated in the same buffer described above. Fractions were eluted with at a flow rate of 20 mL·h⁻¹, and 3.0 mL aliquots containing xylanase activity were collected and pooled. Finally, a volume of 20 mL that was obtained in the earlier fractionation was pooled and dialyzed at 4.0 °C overnight against 20 mmol·L⁻¹ sodium phosphate buffer, pH 7.0, with 0.02% NaN₃. The dialyzed volume was subjected to ion exchange chromatography on a Q-Sepharose column (2.6 × 4.0 cm) and equilibrated with 20 mmol·L⁻¹ sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.02% NaN₃. The column was washed with the same buffer and eluted with a linear gradient of NaCl (0–1.0 mol·L⁻¹). The fractions were eluted at a flow rate of 20 mL·h⁻¹, and 3.0 mL aliquots containing xylanolytic activity were collected and pooled for further characterization. All chromatographic steps were performed at room temperature.

2.7. Electrophoresis

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed on 12% gels according to Laemmli [21], and the protein bands were visualized with silver stain [22]. The Low Molecular Weight (LMW) marker (GE Healthcare, Brazil) was used as the standard. Xyl-O1 activity was detected using a zymogram technique with 0.1% oat spelt xylan as the substrate [23]. In this procedure, a 12% gel was co-polymerized with oat spelt xylan solution and was stained for xylanase activity in a 0.1% Congo red solution for 30 min at room temperature. The gel was then washed with 1.0 mol·L⁻¹ NaCl to remove any excess dye and fixed with 0.5% acetic acid.

2.8. Measurement of Substrate Specificity

The Xyl-O1 specificity for the type of glycosidic linkage and glycan moiety, and for soluble *versus* insoluble xylans, was investigated by monitoring the amount of reducing sugar released when the purified enzyme was incubated with a variety of polysaccharides (oat spelt xylan, birchwood xylan, beechwood xylan, 4-*O*-methyl-glucurono-D-xylan, CM-cellulose, pectin and mannan) at a final concentration of 6.67 mg·mL⁻¹. The assays were performed under the same conditions as described in

Section 2.4 for the xylanase assay. Other substrates, such as filter paper and avicel, were used as described in Section 2.4. For the experiments involving *p*-nitrophenylglycosides, the activities of β -xylosidase, α -arabinofuranosidase, β -glucosidase and β -mannosidase were determined by measuring the amount of *p*-nitrophenol (PNP) released. The assays were performed at 50 °C in 50 mmol·L⁻¹ sodium acetate buffer, pH 6.0, with *p*-nitrophenyl- β -D-xyloside (PNPX), PNPA (*p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside), PNPG (*p*-nitrophenyl- β -D-glucoside) and PNPM (*p*-nitrophenyl- β -D-mannoside) as substrates [17]. The β -1,3-glucanase activity was measured by mixing 25 μ L of enzyme solution with 25 μ L of 1.0% laminarin as a substrate in 50 mmol·L⁻¹ sodium acetate buffer, pH 6.0. The enzyme mixture was incubated at 45 °C for 30 min, and the amount of reducing sugar released was determined using the DNS method according to Noronha and Ulhoa [24].

2.9. Enzymatic Hydrolysis

Reaction mixtures containing 1/3 purified Xyl-O1 (6.0 μ g·mL⁻¹) and 2/3 substrate solution (soluble or insoluble birchwood xylans (10 mg·mL⁻¹) prepared according to Filho *et al.* [14]) were incubated for 6, 12, 18 or 24 h at 28 °C with agitation at 120 rpm in a final reaction volume of 0.3 mL. Aliquots of 75 μ L were removed at the specified intervals and analyzed for the amount of total reducing sugars. The xylooligosaccharides released during these intervals were identified and quantified with high-performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) as described previously by Ryan *et al.* [25]. In this process, 75 μ L aliquots were boiled for 10 min at 100 °C, lyophilized and then dissolved in 500 μ L Milli-Q water. The hydrolysis products were analyzed on a Dionex ICS-3000 Ion Chromatography DC System equipped with a CarboPac PA100 column and guard column with an operating flow rate of 0.25 mL·min⁻¹ at 28 °C. Samples (10 μ L) were injected using an AS40 auto sampler (Dionex Co.). The products were eluted for 70 min using 100 mmol·L⁻¹ NaOH (50% solution, Dionex) and a gradient of 0–500 mmol·L⁻¹ sodium acetate (Dionex). The column was re-equilibrated for 15 min with 100 mmol·L⁻¹ NaOH solution between successive injections. Xylooligosaccharides were identified with an ED40 Electrochemical Detector (Dionex) and analyzed using Chromeleon 6.8 software (Dionex). Xylooligosaccharides that had a degree of polymerization from 2 to 6 D-xylose units (xylobiose, X2; xylotriose, X3; xylotetraose, X4; xylopentaose, X5; xylohexaose, X6; Megazyme Co., Wicklow, Ireland) and xylose (X1; 15 μ g·mL⁻¹) were used as standards for the analysis of the reaction products.

3. Results and Discussion

3.1. Enzymatic Characterization of the FCS from *Aspergillus oryzae* Grown on PDCR

The enzymatic profiles of the FCS from *A. oryzae* grown for 6 days at 28 °C on PDCR are shown in Table 1. The xylanase and pectinase activity values under these culture conditions were 0.488 and 0.258 IU·mL⁻¹, respectively. The mannanase, CM-cellulase and FPase activities were all approximately 0.100 IU·mL⁻¹. The tests for avicelase activity revealed a residual enzymatic activity with a value close to zero. Based on the data in Table 1, it can be inferred that the use of PDCR as a carbon source for *A. oryzae* cultivation primarily induces hemicellulases, with an emphasis on xylanase production.

Our results are consistent with those of Siqueira *et al.* [3], who used agro-industrial residues such as sugarcane bagasse, banana stalks and dirty cotton for the cultivation of various fungi, including *A. oryzae*, which produced a large amount of xylanase. Other researchers have used lignocellulosic biomass from agro-industrial residues to produce cellulase and xylanase [26–31]. The use of lignocellulosic biomass waste for enzyme production would significantly reduce the cost of enzyme production because the productivities are comparable to those obtained with industrial carbon sources. According to Siqueira *et al.* [3], agro-industrial residues are cheap carbon sources for the growth of microorganisms, including filamentous fungi, and for the production of hemicellulases. The diversity of hemicellulases produced by *A. oryzae* may be related to the nature of the lignocellulosic biomass components. The untreated dirty cotton residue was subjected to bromatological analysis (results not shown), which indicated that this residue consisted of 56.7% total fibers and a holocellulose portion (the carbohydrate fraction of lignocellulose) of 75.5%. The analysis of individual polymers showed that the untreated dirty cotton residue was composed of 65.7% cellulose, 9.8% hemicellulose and 6.3% lignin. The cotton plant fragments were readily apparent in addition to the fibrous profile of this residue.

Table 1. Enzymatic activities of the filtered culture supernatant (FCS) from *Aspergillus oryzae* grown on pretreated dirty cotton residue (PDCR) for 6 days at 28 °C.

Enzymatic activity	IU·mL ⁻¹
Xylanase	0.488 ± 0.011
Pectinase	0.258 ± 0.048
Mannanase	0.098 ± 0.006
CM-cellulase	0.095 ± 0.004
FPase	0.081 ± 0.015
Avicelase	0.009 ± 0.001

3.2. Xyl-O1 Purification

Xyl-O1 was purified by ultrafiltration through a PM-10 ultrafiltration membrane, gel filtration chromatography on Sephacryl S-100 and Sephadex G-50 and ion exchange chromatography on Q-Sepharose. In the first step, a xylanase activity of only 0.294 IU·mL⁻¹ was detected in the ultrafiltrate. Because this ultrafiltrate had low protein concentration, the solution was lyophilized prior to chromatography. The chromatographic profiles from the gel filtration columns (results not shown) initially showed that the enzyme sample subjected to chromatography on a Sephacryl S-100 column eluted in two peaks that had xylanase activity. The second peak was selected because it contained a xylanase activity that was approximately 3.5 times higher than the first peak and corresponded to the fractions with the greatest absorbance at 280 nm. The pooled fractions were applied onto a Sephadex G-50 column. The xylanase activity was eluted off this column in a single peak with a low absorbance at 280 nm. An additional peak was eluted with a greater absorbance at 280 nm and an unidentified colored substance. As shown in Figure 1, fractionation on a Q-Sepharose column revealed that Xyl-O1 eluted before the salt gradient at pH 7.0. According to Wong *et al.* [32], there is a conserved relationship between molecular weight and pI when xylanases from different species are compared. Low-molecular-weight xylanases tend to be basic, whereas high molecular weight is associated with a

more acidic pI. An exception to this relationship is the *Schizophyllum commune* xylanase (21 kDa; pI 4.5); however, the relationship is conserved even in yeast-like fungi that lack multiple xylanases, e.g., *Cryptococcus* sp.

Figure 1. Ion exchange chromatography of Xyl-O1 on Q-Sepharose. Absorbance at 280 nm is represented by closed diamonds [—◆—], xylanase activity is represented by thin Xs [—*—], and the linear gradient (0–1.0 mol·L⁻¹ NaCl in equilibration buffer) is represented by a solid line [—].

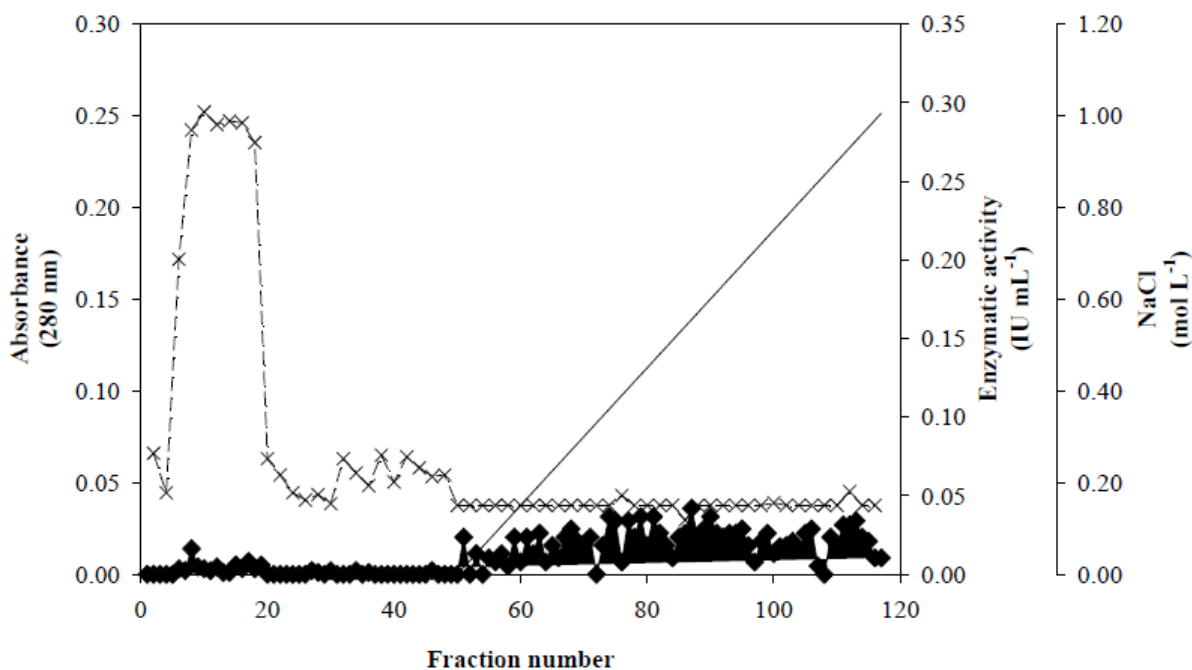


Table 2. Summary of purification of Xyl-O1.

Purification steps	Total volume (mL)	Total protein (mg)	Total activity (IU)	Specific activity (IU·mg ⁻¹)*	Purification (fold)	Yield (%)
Filtered culture supernatant	110.00	5.830	53.350	9.151	1.000	100.00
Ultrafiltrate	100.00	1.500	29.400	19.600	2.142	55.11
Lyophilization	4.50	0.828	1.647	1.989	0.217	3.08
Sephacryl S-100 (fractions 58–64)	21.00	0.441	7.833	17.762	1.941	14.68
Sephadex G-50 (fractions 71–84)	40.00	0.080	9.880	123.500	13.496	18.52
Q-Sepharose FF (fractions 7–18)	36.00	0.036	8.928	248.000	27.101	16.74

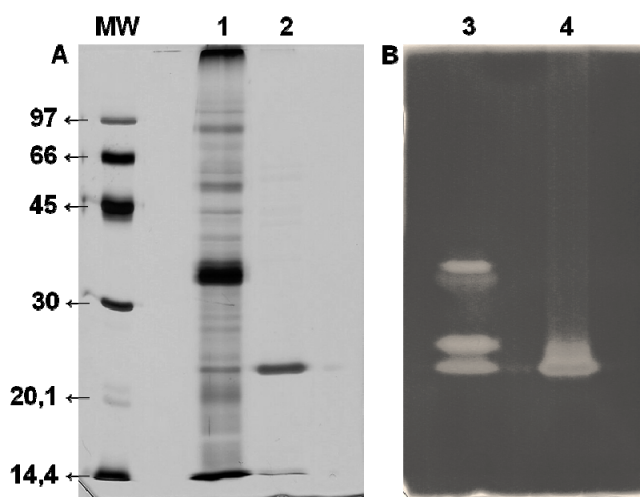
* Specific activity (IU·mg⁻¹) was determined with soluble oat spelt xylan as substrate.

As noted in Table 2, the xylanolytic activity remaining in the ultrafiltrate portion after lyophilization was considerably recovered during fractionation using gel filtration and ion exchange chromatography. In addition, Table 2 also shows Xyl-O1 purification and yield values of 27.1% and 16.7%, respectively. These values are consistent with other studies involving xylanase purification in

which the recovery was low [33–36]. The ultrafiltration procedure retained most of the β -xylanase activity in the concentrate. The absence of other isoforms or isoenzymes of xylanase in the ultrafiltrate portion, which act synergistically in the hydrolysis of the substrate, may have underestimated the purification and yield values during the final fractionation step [14].

However, our fractionation method, beginning with protein concentration by lyophilization, resulted in higher purification and yield compared to other fractionation methods that are initiated by precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (results not shown). However, the total xylanase activity of the ultrafiltrate (29.400 IU) was significantly reduced to 1.647 IU after the lyophilization step. This finding suggests the presence of xylanase inhibitors that were produced as a result of PDCR degradation and that were also concentrated during the lyophilization step. According to Panagiotou and Olsson [37], the lignin derivatives (furans, phenols and low-molecular-weight acids) that are found in the hydrolysate of pretreated wheat straw inactivated both a mixture of commercial enzymes and a crude enzyme sample from *Penicillium brasilianum* IBT 20888 during the enzymatic digestion of filter paper and xylan. The purification procedures provided an apparently homogeneous preparation of xylanase activity from *A. oryzae*. An increase in the specific activity from $9.15 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ in the FCS to $248 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ at the end of chromatography was observed. This is an approximately 27-fold increase and confirms the efficiency of the Xyl-O1 purification. The apparent purity of the enzyme was demonstrated by SDS-PAGE because under denaturing conditions, the gel showed a single band (Figure 2).

Figure 2. SDS-PAGE (12%) of purified Xyl-O1. The gel was stained with (A) silver nitrate or (B) 0.1% Congo red. MW—molecular weight marker (phosphorylase b (97 kDa), albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and α -lactalbumin (14.4 kDa)); Lane 1—FCS from *Aspergillus oryzae* (10 μg); Lane 2—Purified Xyl-O1 (5.0 μg); Lane 3—FCS from *A. oryzae*; Lane 4—Purified Xyl-O1.



The molecular weight of the purified Xyl-O1 was 21.5 kDa, as estimated by the relative migration of the standard markers. A low-molecular-weight xylanase can be useful in pulp bleaching, since smaller enzymes can penetrate further the fiber wall structure and alter more efficiently pulp properties. The molecular weight of Xyl-O1 was also estimated by gel filtration chromatography on

Sephadex G-50; however, the value was less than 10 kDa (result not shown), suggesting that the enzyme interacted with the matrix. The same phenomenon has been described for β -xylosidase from *Trichoderma harzianum* strains [17] and for a low-molecular-weight xylanase from *A. fumigatus* Fresenius [34]. According to Poutanen [35], the reason for the lower apparent molecular weight that is obtained by gel filtration could be the retarded migration of the enzyme in the gel matrix.

3.3. Enzyme Characterization

The xylanase activities of the FCS and purified Xyl-O1 were greatest in the temperature range of 45–60 °C and the pH range of 5.5 to 6.0. The two samples were stable in the temperature range of 45–60 °C, with xylanase activity greater than 70%. The greatest FCS activity was observed at 55 °C, and the greatest Xyl-O1 activity was at 50 °C. The two enzyme samples presented the best activity at pH 6.0 in sodium acetate buffer. The activity of the two samples was greater than 90% in the pH range of 5.5 to 6.0. Other studies involving the purification and characterization of endo- β -1,4-xylanases from filamentous fungi have indicated that 50 °C is the most effective temperature for enzyme activity [33,38,39]. Our results are consistent with Kimura *et al.* [40], who found that the greatest activity for a xylanase, XynG2, that was isolated from a genomic library of *A. oryzae* KBN616 was at pH 6.0. However, its greatest enzymatic activity was at 58 °C, and it displayed a different K_m value (5.1 mg·mL⁻¹) on birchwood as the substrate. The K_m values (mg·mL⁻¹) of Xyl-O1 on a soluble fraction of oat spelt and birchwood xylans were 10.05 and 3.34, respectively. The apparent K_m values indicated that the purified Xyl-O1 had a preference for birchwood xylan as a substrate. Birchwood xylan contains 90% xylose, whereas oat spelt xylan contains 75% xylose, 10% arabinose and 15% glucose residues. The preference of Xyl-O1 for substrates containing a higher proportion of D-xylose residues is a relevant property that can be used in the future targeting of this enzyme for alternative methods of cellulose pulp biobleaching.

The Xyl-O1 enzyme activity was reduced to 86 and 8% in the presence of Hg²⁺ at concentrations of 1.0 and 10 mmol·L⁻¹, respectively. The same inhibitory effect was observed for Ag⁺ at a concentration of 10 mmol·L⁻¹. The inhibitory effects of Hg²⁺ and Ag⁺ on xylanase activity are known [7,25,41,42]. According to Sandrim *et al.* [41], the addition of Hg²⁺ drastically inhibits xylanolytic activity, suggesting the existence of thiol groups in the catalytic site of the enzyme. In general, purified Xyl-O1 remained stable in the presence of most of the ions that we tested. However, Mn²⁺, which is commonly referred to as an activator of xylanase activity, showed an inhibitory effect at a concentration of 10 mmol·L⁻¹ and promoted a 10% reduction in activity compared to the control. The same inhibitory effect was observed when the enzyme was pre-incubated for 40 min at 28 °C with the same concentration of Mn²⁺. Conversely, Carmona *et al.* [43] and Teixeira *et al.* [39] reported an activating effect of 10 mmol·L⁻¹ Mn²⁺ on xylanase from *A. versicolor* and *A. awamori* 2B.361 U2/1. Here, purified Xyl-O1 in the presence of amino acid-modifying reagents and amino acids remained relatively stable or was activated by certain reagents (Table 3). The enzyme retained 74% of its xylanolytic activity in the presence of 20 mmol·L⁻¹ SDS.

The reaction mixture containing 5.0 mmol·L⁻¹ L-tryptophan did not have increased enzymatic activity. However, for compounds containing thiol groups, such as L-cysteine, DTT and β -mercaptoethanol, the xylanase activity increased by 40, 14 and 37%, respectively. The enzyme was

stable in the presence of NBS and EDC reagents at concentrations of 1.0 and 5.0 mmol·L⁻¹, respectively. However, the enzyme activity was completely inhibited by NBS at a concentration of 10 mmol·L⁻¹ (result not shown). Teixeira *et al.* [39] also reported the inhibition of xylanase from *A. awamori* by NBS at the same concentration. NBS is an effective inhibitor of xylanases [44,45] and promotes the oxidation of tryptophan residues that are involved in enzymatic catalysis. Xyl-O1 was slightly inhibited by the alkylating reagent iodoacetamide, indicating the need for thiol groups in catalysis. DEPC and DTP reduced the Xyl-O1 activity by 15 and 12%, respectively (Table 3).

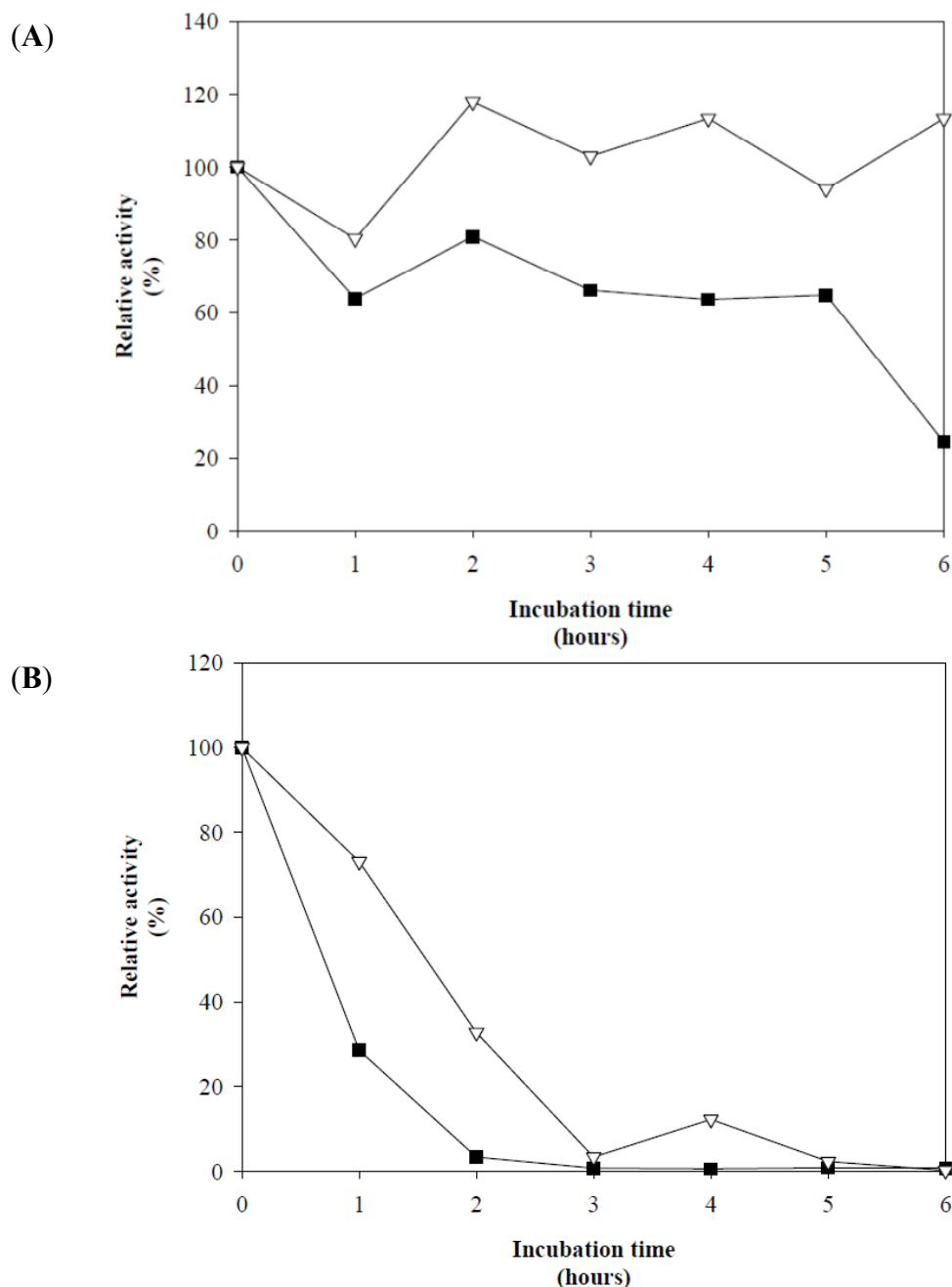
Table 3. Effect of modifying agents and amino acids on the xylanolytic activity of purified Xyl-O1.

Modifying agents or amino acids	Activity (IU·mL ⁻¹)	Relative activity (%)	Concentration (mmol·L ⁻¹)
H ₂ O control	0.262 ± 0.021	100.00	---
4% Ethanol control	0.285 ± 0.026	100.00	---
NBS	0.285 ± 0.079	108.42	1
DTNB *	0.399 ± 0.025	140.02	2
DTT	0.300 ± 0.037	114.35	20
L-Cysteine	0.367 ± 0.076	140.04	20
H ₂ O control	0.290 ± 0.029	100.00	---
4% Ethanol control	0.322 ± 0.006	100.00	---
DTP *	0.285 ± 0.025	88.43	2
L-Tryptophan	0.285 ± 0.012	98.13	5
Iodoacetamide	0.255 ± 0.046	87.71	5
DEPC	0.248 ± 0.037	85.32	5
EDC	0.291 ± 0.046	100.08	5
β-Mercaptoethanol	0.397 ± 0.026	136.68	5
H ₂ O control	0.306 ± 0.031	100.00	---
SDS	0.225 ± 0.025	73.56	20

* These compounds were diluted in 4% ethanol. Enzymatic activity: 0.320 ± 0.014 IU·mL⁻¹.

The assays investigating the effect of incubation time on Xyl-O1 activity at pH 7.0 revealed that at 50 °C, the enzyme remained active for 5.0 h, retaining 60% of its activity. Conversely, at 55 °C, the activity decreased to less than 30% within the first hour of incubation. The thermostability of Xyl-O1 at 50 °C was greatly increased in the presence of 20 mmol·L⁻¹ L-cysteine, and the activity remained close to 100% for an incubation period of 6.0 h (Figure 3(A)). At 55 °C, the xylanase activity was enhanced in the presence of L-cysteine and remained stable for 1.0 h, with the catalytic activity remaining greater than 75% (Figure 3(B)).

Figure 3. Effect of 20 mmol·L⁻¹ L-cysteine on the thermostability of purified Xyl-O1 at pH 7.0 and (A) 50 °C or (B) 55 °C [—▽—]. The control without L-cysteine [—■—].



The purified Xyl-O1 efficiently hydrolyzed the substrates that contained D-xylose residues, especially the soluble fraction of oat spelt and the birchwood and beechwood xylans (Table 4). These results suggest that Xyl-O1 is a potential candidate for the pulp bleaching processes, whereas the application of xylanases in the pulp and paper industry requires a cellulase-free activity [8,11,41,46]. However, the enzyme activity was significantly reduced in the insoluble fractions of the same substrates, especially for oat spelt xylan, which had a relative activity of less than 1.0%. The enzyme also showed a hydrolysis efficiency of 49.87% when tested with 4-*O*-methyl-glucurono-D-xylan as the substrate. The relative activities for the birchwood and beechwood xylans were 85 and 84.4%, respectively (Table 4). The residual activity was less than 10% for filter paper, CM-cellulose,

laminarin, mannan and pectin, indicating that these substrates might have been contaminated with pentosan, which is susceptible to hydrolysis [14]. Furthermore, Xyl-O1 was completely inactive against the avicel and *p*-nitrophenylglycoside substrates (Table 4).

Table 4. Substrate specificity of purified *Aspergillus oryzae* Xyl-O1.

Substrate	Main chain linkage	Activity (IU·mL ⁻¹)	Purified Xyl-O1 (% RA) ^a
Oat spelt xylan (S) ^b	β-1,4	0.659 ± 0.005	100.00
Oat spelt xylan (I) ^c	β-1,4	0.003 ± 0.004	0.39
Birchwood xylan (S)	β-1,4	0.560 ± 0.011	85.03
Birchwood xylan (I)	β-1,4	0.228 ± 0.025	34.60
Beechwood xylan (S)	β-1,4	0.556 ± 0.030	84.38
Beechwood xylan (I)	β-1,4	0.024 ± 0.030	3.58
4- <i>O</i> -methyl-glucurono-D-xylan (I)	β-1,4	0.328 ± 0.028	49.87
Filter paper	β-1,4	0.010 ± 0.007	1.46
CM-cellulose	β-1,4	0.045 ± 0.004	6.82
Avicel	β-1,4	0.000 ± 0.002	0.00
Laminarin	β-1,3	0.039 ± 0.018	5.93
Pectin	β-1,4	0.024 ± 0.019	3.62
Mannan	β-1,4	0.002 ± 0.003	0.37
PNPX	PNP-β-1,4	0.000 ± 0.000	0.00
PNPA	PNP-α-1,4	0.000 ± 0.000	0.00
PNPG	PNP-β-1,4	0.000 ± 0.000	0.00
PNPM	PNP-β-1,4	0.000 ± 0.000	0.00

^a Relative activity to oat spelt xylan; ^b (S): Soluble fractions; ^c (I): Insoluble fractions.

The specificity of Xyl-O1 was determined by analyzing the hydrolysis products of the soluble and insoluble birchwood xylan using the DNS method and HPLC on a Dionex system. The results presented in Table 5 show that the enzyme was more active on the soluble fraction, with a maximum hydrolysis of approximately 33% obtained after 12 h of incubation. A similar effect was observed with the insoluble fraction, but the hydrolysis reached only 17.5%. These results are consistent with the observations of Ryan *et al.* [25], who also found higher rates of hydrolysis for soluble xylan. The preference of Xyl-O1 for the soluble fraction of the substrate may indicate a catalytic efficiency for the branched sites of *O*-acetyl-(4-*O*-methyl-D-glucurono) in the structure of the birchwood xylan. According to Coughlan and colleagues, certain constituents in the structure of the xylan act as binding sites for the catalytic activity of some xylanases [11]. The residues that comprise these sites in the branching structure were partially removed during the preparative alkaline and acid extractions that were performed on the soluble and insoluble fractions of the substrate. However, as shown in Table 5, we observed that 18- and 24 h hydrolysis periods did not increase the amount of reducing sugar that was released. It is possible that Xyl-O1-promoted hydrolysis is more efficient after 12 h and represents a plateau of activity that remains constant for longer incubations.

Table 5. Hydrolysis of soluble or insoluble birchwood xylan catalyzed by purified Xyl-O1.

Hydrolysis time (h)	Soluble		Insoluble	
	Specific reducing sugar (mg) *	Hydrolysis (%)	Specific reducing sugar (mg) *	Hydrolysis (%)
0	0.000 ± 0.000	0.00	0.031 ± 0.006	1.55
6	0.434 ± 0.011	21.72	0.209 ± 0.036	10.47
12	0.667 ± 0.029	33.35	0.351 ± 0.057	17.54
18	0.554 ± 0.025	27.69	0.345 ± 0.039	17.23
24	0.554 ± 0.025	27.70	0.350 ± 0.037	17.50

Reaction mixtures (final volume of 0.3 mL) containing $\frac{1}{3}$ purified Xyl-O1 ($6.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and $\frac{2}{3}$ substrate solution with soluble or insoluble birchwood xylans ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) were incubated at 28 °C with agitation at 120 rpm. * The amount of the reducing sugar released was estimated by the DNS method.

The identification and quantitative analysis of the soluble xylooligosaccharides that were released seem to indicate that the enzyme catalyzes the random cleavage of internal glycosidic linkages in the soluble and insoluble fractions of the birchwood xylan (Table 6). A similar activity has been described for other enzymes, including the endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum* [25], *Cephalosporium* sp. RYM-202 strain [38], *A. fumigatus* Fresenius [34] and *Acrophialophora nainiana* [33]. As shown in Table 6, the hydrolysis products X2-X6 predominated during the first 12 h of incubation. During the subsequent 12 h, either the X4-X6 xylooligomers predominated, or it was not possible to identify the products, as shown for the insoluble fraction after 24 h (Table 6). The decreased identification or quantification of the hydrolysis products by HPAEC-PAD indicated the accumulation of higher xylooligomers after the elution of the xylohexaose standard primarily during incubation periods of 18 and 24 h (results not shown). This suggests that the purified Xyl-O1 is involved in transglycosylation reactions at certain times. In this case, the chromatographic profile showed irregular peaks presenting more intense electrochemical signals and longer retention times than those of established xylooligomers patterns. Because only xylooligosaccharides containing six or fewer xylose units could be detected with the selected chromatographic parameters, we postulated that the products with a higher degree of polymerization (DP) could not be identified by the absence of xylooligomer patterns with longer retention times. With regard to the highest hydrolysis percentage obtained with the DNS method, we hypothesize that the identification of the hydrolysis products by their retention times results in greater specificity. Conversely, the detection of reducing sugars by the DNS method, even using xylose as reference, would not distinguish between the reducing ends of the xylose or more complex xylooligomers. Indeed, the effect of transglycosylation could explain the constant rate of hydrolysis obtained by the DNS method after 12 h of incubation (Table 5). As reported by Biely and Vranská [47], the transfer of glycosyl groups is a well-known activity of glycosidases and glycanases. Consistent with the findings of these authors, the enzyme acts on oligosaccharides or aryl glycosides (e.g., invertase, β -galactosidase, *A. niger* β -glucosidase) to catalyze the formation of various positional isomers of the oligosaccharides. These positional isomers retain the configuration of the glycosidic linkage without specificity for the saccharide acceptor molecule and one particular linkage. For endo-acting glycanases, such as lysozyme, α -amylases and cellulases, the specificity is evident, and the same type of glycosidic linkage in the saccharide acceptors is formed from the oligosaccharide glycosyl donors that were cleaved previously. In addition, the xylanase produced by

Anoxybacillus flavithermus BC [48] catalyzes this transglycosylation activity. In other studies, endo-1,4- β -xylanases and β -xylosidases have been used for the synthesis of specific oligosaccharides [49,50] to obtain a cellulose-xylan polymer hybrid [51]. Our results suggest that the transglycosylation reaction catalyzed by Xyl-O1 can occur after a period of effective hydrolysis, in this case, after a 12 h incubation at 28 °C. However, specific testing of the transglycosylation reaction is required to confirm this hypothesis of Xyl-O1-promoted catalysis. Table 6 shows the general profile of hydrolysis over the 6.0–24 h incubation period, confirming the predominance of X2 because of the action of Xyl-O1 on the soluble and insoluble fractions of the substrate. For the insoluble and soluble fractions, Xyl-O1 showed a hydrolysis profile with a more relaxed specificity, allowing for the quantification of the products X1 to X6 within six hours of incubation. During this incubation period, xylobiose was the main hydrolysis product released through the activity of the enzyme (Table 6).

Table 6. Identification and quantitative analysis by high-performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) of the xylooligosaccharides released during the hydrolysis reactions catalyzed by purified Xyl-O1.

Xylooligosaccharide products *	Hydrolysis (%) Soluble Fraction				Hydrolysis (%) Insoluble Fraction			
	Incubation time (h)				Incubation time (h)			
	6	12	18	24	6	12	18	24
X1	0.005	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000	0.000
X2	0.178	0.280	0.000	0.000	0.245	0.000	0.000	0.000
X3	0.078	0.000	0.008	0.000	0.083	0.047	0.000	0.000
X4	0.022	0.000	0.045	0.016	0.102	0.063	0.027	0.000
X5	0.031	0.000	0.005	0.005	0.066	0.055	0.005	0.000
X6	0.033	0.000	0.005	0.000	0.052	0.022	0.010	0.000

Reaction mixtures (final volume of 0.3 mL) containing $\frac{1}{3}$ purified Xyl-O1 ($6.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and $\frac{2}{3}$ substrate solution with soluble or insoluble birchwood xylans ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) were incubated at 28 °C with agitation at 120 rpm. * Xylose (X1), xylobiose (X2), xylotriose (X3), xylo-tetraose (X4), xylo-pentaose (X5) and xylo-hexaose (X6).

The reduced percentage of X1, especially during the incubation period of 6 h, suggests that Xyl-O1 has an endo-acting mechanism, whereas the predominant hydrolysis product released by Xyl-O1 was X2, corresponding to 0.458% in the range of 6 to 12 h for the soluble fraction and 0.245% for the insoluble fraction after 12 h of incubation (Table 6). Additionally, the total hydrolysis percentages obtained by the release of X4, X5 and X6 from the insoluble fraction were 0.192, 0.126 and 0.084%, respectively, in the range of 6 to 18 h. This result shows that the purified Xyl-O1 presents catalytic flexibility by acting on both soluble and insoluble substrates.

4. Conclusions

The use of agro-industrial PDCR as a carbon source for the submerged cultivation of *A. oryzae* is a viable and inexpensive alternative for the production of holocellulose-degrading enzymes, mainly xylanases. A low-molecular-weight xylanase was purified and characterized using standard assays. Xyl-O1 was optimally active at 50 °C and pH 6.0. It seems to belong to the group of xylanases with an

endo-acting mechanism. This xylanase hydrolyzed preferentially xylan as the substrate, being an attractive enzyme for potential future applications in the pulp and paper industries. The lignocellulosic biomass contained in the agro-industrial residues, such as PDCR, may enable the efficient production of enzymes at a low cost, thereby reducing the financial support necessary to apply these catalysts to biotechnology.

Acknowledgments

Edivaldo Ximenes Ferreira Filho acknowledges the receipt of a research fellowship from the Brazilian Research Council (CNPq). This work was funded by CNPq (research grants 563260/2010-6 and 563823/2010-0), the Foundation for Research Support of the Federal District (Brazil, Pronex Program) and the National Institute of Science and Technology of Bioethanol.

References

1. Howard, R.L.; Abotsi, E.; van Rensburg, E.L.J.; Howard, S. Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production. *Afr. J. Biotechnol.* **2003**, *2*, 602–619.
2. Andreaus, J.; Filho, E.X.F.; Bon, E.P.S. A Review on Biotechnology of Holocellulose-Degrading Enzymes. In *Biocatalysis and Bioenergy*; Hou, C.T., Shaw, J.F., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2008; pp. 195–229.
3. Siqueira, F.G.; Siqueira, E.G.; Jaramillo, P.M.D.; Silveira, M.H.L.; Andreaus, J.; Couto, F.A.; Batista, L.R.; Filho, E.X.F. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2010**, *64*, 20–26.
4. Csiszár, E.; Szakács, G.; Rusznák, I. Combining traditional cotton scouring with cellulase enzymatic treatment. *Text. Res. J.* **1998**, *68*, 163–167.
5. Csiszár, E.; Urbánszki, K.; Szakács, G. Biotreatment of desized cotton fabric by commercial cellulase and xylanase enzymes. *J. Mol. Catal. B* **2001**, *11*, 1065–1072.
6. Turner, P.; Mamo, G.; Karlsson, E. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb. Cell. Fact.* **2007**, *6*, 1–23.
7. Murthy, P.; Naidu, M. Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. *Food Bioprocess Technol.* **2010**, *5*, 657–664.
8. Polizeli, M.L.T.M.; Rizzatti, A.C.S.; Monti, R.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A.; Amorim, D.S. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 577–591.
9. Salles, B.C.; Cunha, R.B.; Fontes, W.; Sousa, M.V.; Ferreira-Filho, E.X. Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *J. Biotechnol.* **2000**, *81*, 199–204.
10. Vries, R.P.; Visser, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, *65*, 497–522.
11. Cardoso, O.A.V.; Filho, E.X.F. Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *223*, 309–314.
12. Kobayashi, T.; Abe, K.; Asai, K.; Gomi, K.; Juvvadi, P.R.; Kato, M.; Kitamoto, K.; Takeuchi, M.; Machida, M. Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, *71*, 646–670.

13. Maeda, H.; Yamagata, Y.; Abe, K.; Hasegawa, F.; Machida, M.; Ishioka, R.; Gomi, K.; Nakajima, T. Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 778–788.
14. Filho, E.X.F.; Puls, J.; Coughlan, M.P. Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1993**, *11*, 171–180.
15. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 426–428.
16. Ghose, T.K. Measurement of cellulase activities. *Int. Union Pure Appl. Chem.* **1987**, *59*, 257–268.
17. Ximenes, F.A.; Silveira, F.Q.P.; Filho, E.X.F. Production of β -xylosidase activity by *Trichoderma harzianum* strains. *Curr. Microbiol.* **1996**, *33*, 71–77.
18. Leatherbarrow, R.J. *Enzfitter Manual, a Non-Linear Curve Fitting Program for Windows*; Biosoft: London, UK, 1999.
19. Segel, I.H. Effects of pH and Temperature. In *Enzyme Kinetics—Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, NY, USA, 1993; pp. 885–942.
20. 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.* **1976**, *72*, 248–254.
21. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
22. Blum, H.; Beier, H.; Gross, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **1987**, *8*, 93–99.
23. Sunna, A.; Puls, J.; Antranikian, G. Characterization of the xylanolytic enzyme system of the extreme thermophilic anaerobic bacteria *Thermotoga maritima*, *T. neapolitana*, and *T. thermarum*. *Comp. Biochem. Physiol. A* **1997**, *118*, 453–461.
24. Noronha, E.F.; Ulhoa, C.J. Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *183*, 119–123.
25. Ryan, S.E.; Nolan, K.; Thompson, R.; Gubitz, G.M.; Savage, A.V.; Tuohy, M.G. Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *33*, 775–785.
26. Adsul, M.G.; Ghule, J.E.; Singh, R.; Shaikh, H.; Bastawde, K.B.; Gokhale, D.V.; Varma, A.J. Polysaccharides from bagasse: Applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *57*, 67–72.
27. Gawande, P.V.; Kamat, M.Y. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. *J. Appl. Microbiol.* **1999**, *87*, 511–519.
28. Chipeta, Z.; du Preez, J.; Szakacs, G.; Christopher, L. Xylanase production by fungal strains on spent sulphite liquor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *69*, 71–78.
29. Chipeta, Z.; du Preez, J.; Christopher, L. Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *35*, 587–594.
30. Kronbauer, E.A.W.; Peralta, R.M.; Osaku, C.A.; Kadowaki, M.K. Xylanase production by *Aspergillus casielus* induced with different carbon sources. *Bol. Cent. Pesqui. Process Aliment.* **2007**, *25*, 207–216.

31. Isil, S.; Nilufer, A. Investigation of factors affecting xylanase activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2005**, *48*, 187–193.
32. Wong, K.K.; Tan, L.U.; Saddler, J.N. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications. *Microbiol. Rev.* **1988**, *52*, 305–317.
33. Ximenes, F.A.; Sousa, M.V.; Puls, J.; da Silva, F.G.; Filho, E.X.F. Purification and characterization of a low-molecular-weight xylanase produced by *Acrophialophora nainiana*. *Curr. Microbiol.* **1999**, *38*, 18–21.
34. Silva, C.H.C.; Puls, J.; Sousa, M.V.; Filho, E.X.F. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Rev. Microbiol.* **1999**, *30*, 114–119.
35. Poutanen, K. An α -L-arabinofuranosidase of *Trichoderma reesei*. *J. Biotechnol.* **1988**, *7*, 271–281.
36. Fang, H.-Y.; Chang, S.-M.; Lan, C.-H.; Fang, T.J. Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. *Process Biochem.* **2008**, *43*, 49–55.
37. Panagiotou, G.; Olsson, L. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *96*, 250–258.
38. Kang, M.; Maeng, P.; Rhee, Y. Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic *Cephalosporium* sp. strain RYM-202. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 3480–3482.
39. Teixeira, R.S.S.; Siqueira, F.G.; Souza, M.V.; Filho, E.X.F.; Bon, E.P.S. Purification and characterization studies of a thermostable β -xylanase from *Aspergillus awamori*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *37*, 1041–1051.
40. Kimura, T.; Suzuki, H.; Furuhashi, H.; Aburatani, T.; Morimoto, K.; Karita, S.; Sakka, K.; Ohmiya, K. Molecular cloning, overexpression, and purification of a major xylanase from *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 2734–2738.
41. Sandrim, V.C.; Rizzatti, A.C.S.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A.; Milagres, A.M.F.; Polizeli, M.L.T.M. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. *Process Biochem.* **2005**, *40*, 1823–1828.
42. Soren, D.; Jana, M.; Sengupta, S.; Ghosh, A. Purification and characterization of a low molecular weight endo-xylanase from mushroom *Termitomyces clypeatus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *162*, 373–389.
43. Carmona, E.C.; Fialho, M.B.; Buchgnani, É.B.; Coelho, G.D.; Brocheto-Braga, M.R.; Jorge, J.A. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. *Process Biochem.* **2005**, *40*, 359–364.
44. Keskar, S.S.; Srinivasan, M.C.; Deshpande, V.V. Chemical modification of a xylanase from a thermotolerant *Streptomyces*. Evidence for essential tryptophan and cysteine residues at the active site. *Biochem. J.* **1989**, *261*, 49–40.
45. Marui, M.; Nakanishi, K.; Yasui, T. Chemical modification of xylanases from *Streptomyces* sp. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1993**, *57*, 662–663.
46. Christov, L.P.; Szakacs, G.; Balakrishnan, H. Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching. *Process Biochem.* **1999**, *34*, 511–517.

47. Biely, P.; VrŠanskÁ, M. Synthesis and hydrolysis of 1,3- β -xylosidic linkages by endo-1,4- β -xylanase of *Cryptococcus albidus*. *Eur. J. Biochem.* **1983**, *129*, 645–651.
48. Kambourova, M.; Mandeva, R.; Fiume, I.; Maurelli, L.; Rossi, M.; Morana, A. Hydrolysis of xylan at high temperature by co-action of the xylanase from *Anoxybacillus flavithermus* BC and the β -xylosidase/ α -arabinosidase from *Sulfolobus solfataricus* Oa. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *102*, 1586–1593.
49. Eneyskaya, E.V.; Brumer, H.; Backinowsky, L.V.; Ivanen, D.R.; Kulminskaya, A.A.; Shabalin, K.A.; Neustroev, K.N. Enzymatic synthesis of β -xylanase substrates: transglycosylation reactions of the β -xylosidase from *Aspergillus* sp. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 313–325.
50. Jiang, Z.; Zhu, Y.; Li, L.; Yu, X.; Kusakabe, I.; Kitaoka, M.; Hayashi, K. Transglycosylation reaction of xylanase B from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima* with the ability of synthesis of tertiary alkyl β -D-xylobiosides and xylosides. *J. Biotechnol.* **2004**, *114*, 125–134.
51. Fujita, M.; Shoda, S.-I. Xylanase-catalyzed synthesis of a novel polysaccharide having a glucose-xylose repeating unit, a cellulose-xylan hybrid polymer. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6411–6412.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Anexos

ANEXO A - PROTOCOLO PARA DETERMINAÇÃO DE CELULOSE, HEMICELULOSE, LIGNINA E EXTRAÍVEIS [adaptado de Li et al. (2004) e Lin et al. (2010)]

Análise dos Extraíveis

Pesar, com precisão, 5 g do material lignocelulósico (m_0) e transferir para um extrator Soxhlet. Deixar em extração por 8 horas, usando cerca de 300 mL de hexano PA. Após a extração, secar a 35-40°C e pesar (m_1). A diferença de massa corresponde ao teor de extraíveis ($m_1 - m_0$).

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

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

Análise da Hemicelulose

Pesar, com precisão, 1 g (m_1) do material lignocelulósico (livre de extraíveis) e acrescentar 10 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio (500 mmol.L⁻¹; 20 g.L⁻¹). Ferver a mistura por 3,5 horas, filtrar e lavar com água destilada. O resíduo sólido deve ser seco a 35-40°C e pesado (m_2). A diferença das massas corresponde a hemicelulose.

O percentual de hemicelulose (%HC) pode ser determinado por:

$$\%HC = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \times 100$$

Análise de Lignina

Pesar, com precisão, 1 g (m_3) do material lignocelulósico (livre de extraíveis) e acrescentar 30 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico (72%; 72 mL de ácido sulfúrico concentrado com 28 mL de água destilada). Deixar a mistura em repouso por 24 horas. Depois, diluir com 300 mL de água destilada e aquecer, levando a ebulição por 1 hora. Filtrar e lavar o resíduo sólido com água destilada. O resíduo sólido deve ser seco a 35-40°C e pesado (m_4). Esta massa corresponde ao teor de lignina.

O percentual de lignina (%L) pode ser determinado por:

$$\%L = \frac{m_4}{m_3} \times 100$$

Análise de Celulose

A celulose será determinada pela diferença entre a massa original e os teores de hemicelulose, lignina e extraíveis

O percentual de celulose (%/C) pode ser determinado por:

$$\%C = 100 - \%E - \%HC - \%L$$

Referências Bibliográficas

Li, S.; Xu, S.; Liu, S.; Yang, C.; Lu, Q., Fast pyrolysis of biomass in free-fall reactor for hydrogen-rich gas. *Fuel Processing Technology* **2004**, *85*, 1201-1211.

Lin, L.; Yan, R.; Liu, Y.; Jiang, W., In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass wastes based on three major components: Cellulose, hemicellulose and lignin. *Bioresource Technology* **2010**, *101*, 8217-8223.

ANEXO B – PRÉ-TRATAMENTO E ANÁLISE QUÍMICA COMPOSICIONAL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Bagaço pré-tratado por explosão a vapor em escala industrial utilizando reator de 5000 litros – Usina Vale do Rosário

O bagaço de cana na sua forma “in natura”, com 50% de umidade utilizado para o pré-tratamento foi analisado quanto a sua composição, de acordo com a metodologia descrita por Rocha et al. (1997) e validada por Gouveia et al. (2009).

Composição química do bagaço “in natura” empregado:

Componentes	% em massa
Celulose	43,8 ± 1,1
Polioses	25,8 ± 0,8
Lignina total	22,1 ± 0,8
Cinzas	1,4 ± 0,2
Extrativos (ciclo hexano/etanol 2;1)	6,1 ± 0,3
Total	99,2 ± 0,8

O bagaço “in natura”, contendo aproximadamente 50% de umidade foi carregado em reator de 5000 litros fabricado pela Caldema Equipamentos Industriais Ltda., somando aproximadamente 1000 kg de bagaço úmido. O reator foi fechado pneumaticamente e pressurizado com vapor fluente até atingir uma pressão de 15,7 kg/cm². Manteve-se pressurizado durante 7 minutos (pressão final 15,3 kg/cm² (equivalente a 200°C). Após este tempo o reator foi despressurizado subitamente, tendo a abertura total da válvula em aproximadamente 10 segundos. O material pré-tratado foi recolhido em um ciclone. Este material, 2500 kg (3 reações) foi transportado para a EEL/USP onde foi exaustivamente lavado até a remoção total dos componentes solubilizados na reação de auto hidrólise, seco ao ar livre e devidamente armazenado para futuras reações. Uma pequena quantidade deste material (3 amostras diferentes) foram caracterizadas quanto a sua composição química.

Rendimento médio das reações de pré-tratamento foi de 68%.

Composição química média de 3 reações:

Componentes	% em massa	Rend.=68%
Celulose	53,7 ± 0,6	36,5 ± 0,6
Polioses	8,9 ± 0,1	6,0 ± 0,1
Lignina total	32,3 ± 0,3	22,0 ± 0,3
Cinzas	5,5 ± 0,2	3,7 ± 0,2
Extrativos (ciclo hexano/etanol 2;1)	ND	ND
Total	100,3 ± 0,4	

Bagaço pré-tratado com solução de ácido sulfúrico em escala piloto

O bagaço “in natura” empregado nestes experimentos apresentou a seguinte composição:

Composição química do bagaço “in natura” empregado nestes experimentos

Componentes	% em massa
Celulose	43,4 ± 0,8
Polioses	27,3 ± 0,6
Lignina total	22,3 ± 0,2
Cinzas	3,1 ± 0,1
Extrativos (ciclo hexano/etanol 2;1)	4,5 ± 0,3
Total	100,6 ± 0,5

O pré-tratamento do bagaço na sua forma natural (**BN**) com aproximadamente 50% de umidade foi efetuado em escala piloto em um reator de ferro revestido de aço inoxidável com capacidade de 350L, com uma solução de ácido sulfúrico contendo 100 mg por grama de bagaço seco (1% m/v) e relação sólido/líquido de 1:10, a uma temperatura de 120°C por 10 minutos. Após este período, procedeu-se a separação do bagaço pré-tratado com solução de ácido sulfúrico (**H⁺**) da fração sólida por centrifugação.

Esse material foi lavado em uma centrífuga semi-industrial com capacidade de 100 litros a 1100 rpm até a completa remoção dos açúcares presentes.

O rendimento do experimento piloto foi de 65%, sendo solubilizadas 35% de seus componentes.

Observação: os cálculos da segunda coluna são feitos a partir do rendimento do pré-tratamento. Desta forma podemos comparar com o bagaço “in natura”.

Exemplo: $89,0 \times 0,65 = 38,0$

Composição química do bagaço pré-tratado com solução de ácido sulfúrico (H^+)

Componentes	% em massa	Rend.=68%
Celulose	$58,4 \pm 1,4$	$38,0 \pm 1,2$
Polioses	$6,5 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,3$
Lignina total	$32,0 \pm 0,2$	$20,8 \pm 0,4$
Cinzas	$2,9 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,1$
Total	$99,3 \pm 0,6$	$64,9 \pm 0,8$

Referências Bibliográficas

Gouveia, E. R.; Nascimento, R. T. d.; Souto-Maior, A. M.; Rocha, G. J. d. M., Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova* **2009**, 32, 1500-1503.

Rocha, G. J. M.; Silva, F. T.; Araújo, G. T.; Curvelo, A. A. S., A fast and accurate method for determining the cellulose and polyoses through HPLC. In *V Brazilian Symposium Proceedings on the Chemistry of Lignin and Other Wood Components*, Curitiba, 1997; Vol. 5, pp 113-115.

ANEXO C – PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *A. oryzae*

Para a confirmação da posição taxonômica do fungo por meio de análise molecular, um disco de micélio com 0,7 cm de diâmetro, foi crescido em meio de cultura Czapek (em 100 mL de água destilada, 30 g de NaNO₃, 5 g de KCl, 5 g de MgSO₄, 0,1 g de FeSO₄) com extrato de levedura (CYA) (Pitt e Hocking, 1985) por três dias, 28°C, a 120rpm. A recuperação do micélio foi feita por meio de filtração com auxílio de uma bomba de vácuo, com lavagem com água destilada e esterilizada, para remoção de todo resíduo do meio de cultura. A maceração manual foi conduzida com auxílio de nitrogênio líquido. O DNA genômico foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (Raeder e Broda, 1985), contendo no tampão de extração Tris HCl 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM e SDS 0,5% pH 7,0. A quantificação do DNA total foi realizada visualmente por comparação com o marcador padrão *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) por meio de eletroforese em gel de agarose 1% e 1 µg/ml de brometo de etídio.

A amplificação das regiões espaçadoras intergênicas do DNA ribossomal (rDNA) nuclear (ITS 1 e 2) utilizando *primers* universais ITS5 e ITS4 foi conduzida em um volume final de 25 µL, contendo 14,37 µL de água Milli-Q, 2,5 µL de Tampão da *Taq* polymerase (*Phonotria*) 1X, 1,0 µL do *primer forward* e 1,0 µL do *primer reverse* (10mM), 2,0 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,125 µL de *Taq* polymerase (*Phonotria*) (5 U/µl) e 4,0 µL de DNA (concentração de 20 ng/µL). O programa de termociclagem utilizado foi de desnaturação inicial à 94°C por 4 minutos, desnaturação do DNA à 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento do *primer* de 50°C por 1 minuto, extensão de 72°C por 1 minuto, extensão final de 72°C por 5 minutos e conservação da reação à 10°C. Os três passos de desnaturação do DNA, anelamento e extensão foram repetidas 39 vezes.

O seqüenciamento da região rDNA ITS foi realizado em seqüenciador ABI 3130xl (Applied Biosystems) nos sentidos *forward* e *reverse*, onde a reação de seqüenciamento foi conduzida com 15ng do produto da PCR, 3,2 pmol.L⁻¹ do *primer forward* (ITS5) e 3,2 pmol.L⁻¹ do *primer reverse* (ITS4), e 3 µL do *kit* BigDye V3.1 (Applied Biosystems). A análise de bioinformática das sequências foi realizada utilizando o programa *Sequencher* v4.8 (Gene Codes Corporation) para o alinhamento, edição e formação de *contigs*, e o BLASTn das sequências contra o banco de dados GenBank no NCBI.

Referências Bibliográficas

Pitt, J. I.; Hocking, A. D., *Fungi and food spoilage*. Academic Press: Sydney and Orlando, 1985; p 413.

Raeder, U.; Broda, P., Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* **1985**, *1*, 17-20.