



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL**

UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS XILANASES NO PROCESSO DE BRANQUEAMENTO DE PASTAS QUÍMICAS CELULÓSICAS

PEDRO HENRIQUE VIEIRA MARTINS DE SIQUEIRA

BRASÍLIA – DF

2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL

**UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS XILANASES NO PROCESSO DE
BRANQUEAMENTO DE PASTAS QUÍMICAS CELULÓSICAS**

PEDRO HENRIQUE VIEIRA MARTINS DE SIQUEIRA

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Gonçalves

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade de Brasília como parte das exigências para obtenção do título de Engenheiro Florestal.

Brasília – DF

2018

DEDICATÓRIA

À minha mãe que sempre foi exemplo de força, dedicação, perseverança; e a todas as pessoas que não me deixaram desistir e me fizeram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha mãe, aos meus avós e ao meu irmão por todo o suporte durante essa árdua e longa caminhada.

Aos meus amigos de graduação que tornaram a caminhada menos sofrida e mais leve, em especial: Ivo, João Carrijo e Maitê.

Ao professor Edivaldo Ximenes, Leonora Moreira e toda a equipe do laboratório de Enzimologia, do Instituto de Biologia da UnB.

Àquela portinha que fica no segundo andar do departamento, que me fez ser uma pessoa melhor, a me desafiar e que também me fez ficar aqui tanto tempo, ECOFLOR, deixo aqui meu muito obrigado por me fazer conhecer um mundo totalmente novo, no qual eu viajo e sempre digo com muito orgulho que passei por aí.

Ao Movimento Empresa Júnior, em especial a CONCENTRO e a BJ que me fez conhecer milhares de pessoas, dezenas de estados e que me faz acreditar que o futuro do país passa por todos nós e que “Somos gigantes pela própria natureza”.

À AmBev que sempre me apoiou, teve paciência comigo, me contratou e me fez realizar o sonho de sair da graduação empregado, desejo de 9 em cada 10 formandos, em especial Diego Oliveira, Rafael Schnabl, Illana Kern, Rebeca Harumi, Lucas Pereira, Lucas Maki, Daniela Lima, Bruna Tassinari, Giuliana Vespa dentre vários outros que me ensinaram como ser excelentes profissionais, acreditaram e brigaram por mim.

Aos meus melhores amigos que tornaram essa jornada bem engraçada, divertida e cheia de emoções, em especial: Vitória Ambrózio, Carol Leal, Ivo Leão, João Carrijo, Lustosa, Max, Marco, Daniela Lima, Luciana Propato, Júlia Facure, Lucas Oliveira, senta que lá vem história!

Em especial a quem tem tornado minha vida mais leve, simples, divertida e me aturado nesse final de caminhada, minha namorada Júlia Facure, muito obrigado.

SUMÁRIO

1. Introdução	7
2. Revisão bibliográfica	11
3. Metodologia	15
3.1. Materiais	15
3.2. Manutenção do fungo e Produção de enzimas	15
3.3. Pré tratamento da fonte de carbono	16
3.4. Curva de indução e Ensaio enzimáticos (DNS)	16
3.5. Ensaio enzimáticos (Orcinol férrico)	17
3.6. Purificação da xilanase	17
3.7. Caracterização da enzima purificada.....	18
3.7.1. <i>Quantificação de proteínas pelo método de Bradford</i>	18
3.7.2. <i>Determinação do efeito do pH e da temperatura na atividade de xilanase</i>	18
3.7.3. <i>Cinética enzimática</i>	19
3.7.4. <i>Efeito de íons metálicos na atividade xilanolítica de Xyl T3</i>	19
3.7.5. <i>Inibidores fenólicos</i>	19
3.7.6. <i>Hidrólise da polpa de celulose</i>	20
3.7.7. <i>Análises dos Resultados</i>	20
4. Resultados e Discussão	21
4.1. Purificação.....	21
4.2. Caracterização da xilanase purificada	23
4.2.1. <i>Efeito do pH e temperatura</i>	23
4.2.2. <i>Efeito de íons metálicos na atividade xilanolítica de Xyl T3</i>	25
4.2.3. <i>Ensaio com outros substratos</i>	26
4.2.4. <i>Cinética enzimática</i>	27
4.2.5. <i>Inibidores fenólicos</i>	28
4.2.6. <i>Hidrólise da polpa de celulose</i>	30
5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do processo de purificação da Xyl T3.....	18
Figura 2 - Cromatografia de filtração em gel sephadex G-50 da fração ultrafiltrada em membrana de exclusão de 10 kDa. Tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, fluxo 20 mL/hora	21
Figura 3 - Pico de proteína após aplicação do superloop na Hi Trap Desalting 5 mL.Em azul está representado a absorbância, em vermelho as frações em verde o gradiente de sal.....	22
Figura 4 - Atividade de xilanase obtida na cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap SPFF (1 mL) em tampão Acetato de sódio pH 5,0	22
Figura 5 - Efeito do pH na atividade de xilanase de Xyl T3.....	24
Figura 6 - Efeito do pH na atividade de xilanase de do extrato bruto de <i>A. terreus</i>	24
Figura 7 - Efeito da temperatura na atividade de xilanase do extrato bruto e de Xyl T3	25
Figura 8 - Efeitos de íons metálicos na atividade da Xyl T3.....	26
Figura 9 - Atividade de EB em diferentes substratos	27
Figura 10 - Atividade de Xilanase (UI/mL) em relação ao tempo de incubação (horas).....	29
Figura 11 - Influência dos compostos fenólicos na atividade enzimática de Xyl T3	29
Figura 12 - Açúcares redutores liberados durante a incubação da polpa clara com amostra enzimática ultrafiltrada em PM 10 kDa por 3 horas a 50°C.....	30
Figura 13 - Açúcares redutores liberados durante a incubação da polpa Pré-branqueada com amostra enzimática ultrafiltrada em PM 10 kDa por 3 horas a 50°C.....	31
Figura 14 - Açúcares redutores liberados durante a incubação da polpa escura com amostra enzimática ultrafiltrada em PM 10 kDa por 8 horas a 50°C.....	31
Figura 15 - Açúcares redutores liberados durante a incubação da polpa escura com amostra enzimática ultrafiltrada em PM 10 kDa por 48 horas a 28°C.....	33
Figura 16 - Absorbância em diferentes comprimentos de compostos provenientes da incubação da polpa clara com amostra enzimática ultrafiltrada em PM 10 kDa por 3 horas a 50°C	33
Figura 17 - Absorbância em diferentes comprimentos de compostos provenientes da incubação da polpa pré branqueada com amostra enzimática ultrafiltrada em PM 10 kDa por 3 horas a 50°C.....	34
Figura 18 - Absorbância em diferentes comprimentos de compostos provenientes da incubação da polpa escura com amostra enzimática ultrafiltrada em PM 10 kDa por 3 horas a 28°C.....	34
Figura 19 - Absorbância em diferentes comprimentos de compostos provenientes da incubação da polpa escura com amostra enzimática ultrafiltrada em PM 10 kDa por 48 horas a 28°C	35
Figura 20 - Liberação de xilo oligômeros ao final da primeira hora de ensaio de incubação da amostra com a polpa clara	35
Figura 21 - Liberação de xilo oligômeros ao final da terceira hora de ensaio de incubação da amostra com a polpa clara.....	36
Figura 22 - Liberação de xilo oligômeros na terceira hora de ensaio da amostra com a polpa pré branqueada.....	36
Figura 23 - Liberação de xilo oligômeros no tempo zero do ensaio de incubação da amostra com a polpa pré branqueada.....	37
Figura 24 - Liberação de xilo oligômeros na oitava hora da incubação da amostra com a polpa escura.....	37
Figura 25 - Liberação de xilo oligômeros na sexta hora da incubação da amostra com a polpa escura.....	38
Figura 26 - Liberação de xilo oligômeros com 24 horas de incubação da amostra com a polpa escura.....	38
Figura 27 - Liberação de xilo oligômeros com 20 horas de incubação da amostra com polpa escura	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento da purificação de Xyl T1.....	23
Tabela 2 - Parâmetros cinéticos de Xyl T3 sobre xilana birchwood solúvel e insolúvel.....	27
Tabela 3 - Meia-Vida em Horas de Xyl T3 incubada com os compostos fenólicos	29

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo purificar, caracterizar e testar a possibilidade de aplicação da xilanases de *Aspergillus Terreus*, no processo de branqueamento de polpa de celulose para uso industrial.

O fungo foi incubado em laboratório conforme padrão através de repiques em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). O fungo foi cultivado em triplicata em frascos tipo Erlenmeyer de 500 ml e em seguida foram retiradas amostras de enzimas para o processo de purificação onde foram separadas por tamanho, carga elétrica e posteriormente concentradas.

Após o processo de purificação foram realizados alguns ensaios para determinar a cinética enzimática, pH ótimo, efeitos de íons metálicos, inibidores fenólicos e por fim a hidrólise da polpa de celulose.

A enzima apresentou uma boa estabilidade quando a testamos em diferentes temperaturas, mantendo no mínimo 74% de atividade independente da faixa de temperatura.

A fração purificada da enzima demonstrou uma melhor atividade em pH mais ácido.

Em todos os testes com todos os tipos de polpa celulose, a liberação de glicose pela amostra foi igual a zero.

Devido a todas essas características acima, é possível concluir que o pool enzimático possui um bom potencial de aplicação industrial, portanto recomendam-se maiores pesquisas tanto em relação à aplicação prática da mesma, quanto aos estudos de viabilidade financeira e aplicabilidade, já que na última década, o tema sustentabilidade está em alta, e as tecnologias industriais limpas, tecnologias verdes entram ainda mais em foco midiático e por consequência, o investimento em pesquisas aumenta.

Palavras-chave: Xilanase, *Aspergillus Terreus*, enzima

RESUMO

This work aimed to purify, characterize and test the possibility of application of *Aspergillus Terreus* xylanases in the pulp bleaching process for industrial use.

The fungus was incubated in the laboratory according to standard by rinsing in Petri dishes containing potato-dextrose-agar (BDA) culture medium. The fungus was cultured in triplicate in 500 ml Erlenmeyer flasks and then enzyme samples were taken for the purification process where they were separated by size, electric charge and then concentrated.

After the purification process, some tests were carried out to determine the enzymatic kinetics, optimum pH, metal ion effects, phenolic inhibitors and, finally, the hydrolysis of the cellulose pulp.

The enzyme presented good stability when tested at different temperatures, maintaining at least 74% of activity independent of the temperature range.

The purified fraction of the enzyme demonstrated a better activity at more acidic pH.

In all tests with all cellulose pulp types, the glucose release by the sample was zero.

Due to all of the above characteristics, it is possible to conclude that the enzymatic pool has a good potential for industrial application, therefore more research is recommended both with respect to the practical application of the same, as with the studies of financial feasibility and applicability, since in the last decade, the theme of sustainability is on the rise, and clean industrial technologies, green technologies are even more media-focused.

Key-Words: Xyllanase, *Aspergillus Terreus*, enzyme

1. Introdução

Desde o início de sua história o ser humano registrava suas atividades gravando símbolos, desenhos e palavras em pedras ou em metais. Isso fez com que, ao contrário da tradição oral, a comunicação gráfica dos registros não se extinguisse com o tempo. O papel também conta a história da humanidade e tem sua origem mais remota no papiro – planta nativa dos pântanos egípcios, que provavelmente começou a ser utilizada para gravações três milênios antes de Cristo. Tal como é conhecido hoje, o papel remonta à China do século II (NAVARRO, 2004).

No Brasil, o papel começou a ser fabricado em 1809, no Rio de Janeiro e chegou a São Paulo com o desenvolvimento da indústria, impulsionado pela vinda de imigrantes europeus para trabalhar na cultura do café que trouxeram conhecimento sobre o processo de produção de papel em sua bagagem.

O papel é um dos produtos mais consumidos no mundo e, há séculos, faz parte do cotidiano da humanidade, como meio básico de educação, comunicação e informação para a maioria das pessoas, é o suporte físico para livros, jornais, revistas, documentos e cartas e, assim, contribui para a transmissão do conhecimento. Serve, também, a um amplo leque de usos comerciais e residenciais, a exemplo das caixas para transporte de mercadorias, das embalagens que protegem alimentos e centenas de outros produtos, como também usado para as folhas para impressão por computadores e em uma variedade de produtos para higiene e limpeza.

Segundo a ABCTP o setor de papel e celulose vem conseguindo atravessar os anos de crise de forma estável, afirmação perceptível com o crescimento da produção de celulose 8,1% em 2016 e a de papel e a de embalagens caíram relativamente pouco – 0,2% e 0,6%, respectivamente. Apesar dos resultados, as perspectivas ainda são cautelosas. Por conta do cenário econômico ainda desafiador.

Analisando os dados da Lafis (Latin American Financial Investment Services) em termos de produção, preveem um aumento de 3,5% em 2017, o que potencialmente levará o Brasil do quarto para o segundo lugar em produção mundial de celulose já no início de 2018, ultrapassando Canadá e China e ficando atrás apenas dos Estados Unidos.

Acompanhando o crescimento tecnológico, as aplicações do papel e celulose se diversificam para tornar mais fácil, ágil e produtiva a vida dos consumidores, das empresas, governos e instituições. Para suprir essa necessidade, é primordial a produção e consumo do papel dentro de padrões sustentáveis, um desafio para o qual a indústria está atenta, inova, investe e vem obtendo resultados positivos.

Quando pensamos em padrões sustentáveis, logo nos vem à mente processos duradouros que apresentam uma organização, como também a vertente ecológica de sustentabilidade, que é algo importante, não só para o meio ambiente como também para agregar valor a uma organização e suas marcas. Dessa forma, a indústria de papel e celulose vem se preocupando e investindo cada vez mais em pesquisas a fim de encontrar métodos menos poluentes de branqueamento de papel e tão eficientes quanto o método químico.

Os principais processos de branqueamento de papel são: mecânicos, físicos, químicos e biotecnológicos. Sendo os processos químicos os mais eficientes e que apresentam o menor custo benefício, mas em contraposição são os mais agressivos ao meio ambiente. Branquear a celulose é levar a fibra ao seu estado natural de alvura que é branco. Em função do grau de alvura desejado, a eliminação da lignina se faz em vários estágios, tanto por razões técnicas como econômicas (NAVARRO, 2004).

Durante o processo de fabricação e branqueamento de grandes quantidades de lignocelulose, são gerados diariamente resíduos industriais, contribuindo para o um aumento da poluição ambiental. Desta forma, o uso destes resíduos como fonte renovável de energia, via produção de açúcares que podem ser convertidos a combustíveis líquidos, tem sido de grande interesse nos últimos anos (DEMAIN, NEWCOMB, WU, 2005; KUMAR, SINGH, SINGH, 2008).

A xilana é o segundo principal polissacarídeo componente da parede celular vegetal, e, portanto, compõe uma grande parte dos resíduos agroindustriais produzidos pela sociedade moderna. A busca pelo aproveitamento desta imensa carga de resíduos e por tecnologias industriais mais limpas estimula o estudo de catalisadores biológicos, as enzimas. As xilanases têm sido utilizadas em variados processos industriais como o de branqueamento da polpa de celulose e têm grande potencial de aplicação em processos de bioconversão de resíduos agroindustriais lignocelulósicos a produtos de maior valor agregado (NAVARRO, 2004)

O objetivo deste trabalho é a purificação, caracterização e utilização de enzimas xilanases durante o processo químico de branqueamento da polpa celulósica

2. Revisão bibliográfica

Segundo a Associação Brasileira de Papel e Celulose (Bracelpa), em 1952 o Brasil produzia cerca de 262 mil toneladas de todos os tipos de papel, com destaque para os de embalagem, que correspondiam a 48% do total. Já a produção de fibras totalizava 121 mil toneladas, das quais 45% de celulose, a maioria fibra longa, e 54% de pastas de alto rendimento.

No período entre 1957 e 1973, a produção de papel aumentou e quadruplicou, e o consumo praticamente triplicou. Por outro lado, a produção de celulose e pastas de alto rendimento aumentou substancialmente mais que o consumo, possibilitando o início das exportações, em especial da celulose derivada do eucalipto (VIDAL, 2010).

Já entre 1974 e 1980, a produção brasileira de celulose cresceu 201%, atingindo 2,9 milhões de toneladas. No mesmo período, a fabricação de papéis aumentou 81%. O espantoso crescimento da produção de celulose ocorreu em razão da entrada em operação de dois importantes projetos financiados pelo BNDES: a Aracruz Celulose e a Cenibra, que produziam celulose branqueada de fibra curta para exportação. (VIDAL, 2010).

Já nos anos 90, a indústria de celulose e papel atingiu a maturidade e passou a ter seu avanço ditado pelo próprio mercado e pelas necessidades de expansão das empresas, e não mais pelas exigências do desenvolvimento planejado do país. (NAVARRO, 2004).

Todo esse crescimento e desenvolvimento econômico resultante do uso da celulose, que é um composto natural existente nos vegetais, de onde é extraída, podendo ser encontrada nas raízes, tronco, folhas, frutos e sementes. A celulose é um polissacarídeo linear, constituído por um único tipo de unidade de açúcar, e é formada por unidades de monossacarídeos β - D glucose, que se ligam entre si através dos carbonos 1 e 4, originando um polímero linear (NAVARRO, 2004).

Outros componentes encontrados na celulose são: a hemicelulose, que também é um polissacarídeo, porém, difere da celulose por ser constituída por vários tipos diferentes de açúcar, além de ser um polímero ramificado e de cadeia curta; e a lignina, que é um

polímero amorfo, de composição química complexa e que confere firmeza e rigidez ao conjunto de fibras de celulose. Os demais constituintes são denominados extrativos (NIKITIN,1966).

Existem muitos métodos diferentes para a preparação de pasta celulósica, desde os puramente mecânicos até os químicos, nos quais a madeira é tratada com produtos químicos, sob pressão e ação de calor (temperaturas maiores que 150°C), para dissolver a lignina, existindo incontáveis variações entre os dois extremos (ABTCP, 2002), sendo os processos químicos os mais utilizados no Brasil, porque a resistência das fibras é preservada e dissolve bem a lignina, formando uma pasta branqueável e forte.

Branqueamento é o tratamento químico das fibras celulósicas para aumentar a alvura, seja por descoloração ou dissolução de componentes coloridos na polpa, principalmente lignina.

Aumentando a alvura aumenta-se a qualidade visual e assim, o valor dos papéis para impressão e escrita e dos materiais para embalagem. O processo também é uma forma de se obter uma celulose mais estável (que não se altere com o tempo), que permita um tingimento controlado, mas o ponto principal é para se obter um papel branco com as vantagens que ele traz para a impressão (RYDLHOLM, S. A., 1965).

Segundo o Instituto de Pesquisa Tecnológica (1988), o primeiro processo de branqueamento de expressiva quantidade de fibras surgiu na Europa em meados do século XVIII. O processo consistia em submeter as fibras a uma exposição prolongada à luz solar, em presença de substâncias alcalinas (como, por exemplo, cinza de madeira). A preparação do cloro, em 1774, por Scheele, um químico sueco, possibilitou o desenvolvimento do primeiro agente de branqueamento a ser usado em escala industrial, o pó de branqueamento, obtido pela reação do cloro gasoso com cal.

Por sua vez, com o intuito de não poluir o meio ambiente, dois diferentes processos usando enzimas, têm sido seguidos desde o começo dos anos oitenta para alcançar este objetivo, mas apenas um sucesso em plantas industriais (SJÖTRÖM, E., 1993).

As enzimas são catalisadores de reações altamente específicas e como tais não são consumidas e apenas uma pequena quantidade é requerida para a realização de uma reação. Enzimas são compostas principalmente de carbono, oxigênio, hidrogênio e

nitrogênio. São classificadas como proteínas, quando moléculas compostas por organismos vivos.

As enzimas são frequentemente chamadas pelo sufixo "-ase" adicionado ao nome do substrato específico sobre o qual elas catalisam as reações. Por exemplo, a celulase catalisa a hidrólise da celulose e a xilanase catalisa a hidrólise da xilana. Estas enzimas catalisam apenas reações muito específicas, o que as faz muito importantes para a indústria de celulose e papel.

Além de tudo, a xilana constitui mais de 90% da celulose na polpa de folhosa e 50% na polpa de coníferas. Devido à reprecipitação, as hemiceluloses estão concentradas nas superfícies das microfibrilas das fibras, apesar de que uma parte ainda se mantém no seu lugar original na fibra (DENCE, et al. 1996).

Uma das hipóteses predominantes para o mecanismo da atividade da xilanase no branqueamento, é que estas enzimas catalisam a hidrólise da xilana reprecipitada na superfície das fibras, fazendo os fragmentos de lignina serem mais fáceis de remover no processo de branqueamento seguinte e nos estágios de extração alcalina (VIKARI et al. 1994) e (KAMTELINEN et al. , 1991).

O branqueamento com xilanase é interessante devido as seguintes razões (DENCE et al.1996):

- As xilanases reagem seletivamente com as xilanas;
- O tratamento com xilanase permite maiores valores de alvura alcançados para algumas polpas;
- O tratamento com xilanase permite que seqüências de branqueamento sejam usadas, produzindo efluentes, contendo quantidades reduzidas de compostos organoclorados;
- O tratamento com xilanase pode ser instalado numa planta moderna integrada de branqueamento sem necessidade de alto investimento.

Os efeitos benéficos das enzimas no branqueamento dependem da sequência de branqueamento usada, do teor de lignina na polpa, alvura final requerida e das preocupações ambientais da fábrica.

Os principais objetivos no branqueamento com enzimas foram direcionados no sentido de reduzir o consumo de produtos químicos derivados de cloro e diminuir o conteúdo de organoclorados (AOX) nos efluentes, portanto as enzimas têm ganhado

bastante importância no campo da biotecnologia pois sua aplicação em diversos processos industriais tais como produção de papel, tecidos e biopolpação de madeiras (CHERRY e FIDANTSEF, 2003), que são produtos de extrema importância econômica para o país.

Dada a grande proporção, natural de xilana, muitos microorganismos produzem sistemas enzimáticos para hidrolisar completamente este polissacarídeo em açúcares mais simples que possam ser usados como energia e fonte de alimentos.

A purificação de xilanases torna-se fundamental para o uso das mesmas no biobranqueamento da polpa de celulose (KUHAD e SINGH,1993) já que a degradação enzimática dos complexos xilana-lignina presentes na polpa auxilia na remoção presentes na polpa.

Xilanases usadas nesse processo não precisam estar purificadas, mas devem ter atividade em altas temperaturas e não ter atividade de celulase para preservar as fibras de celuloses (POLIZELI et al, 2005).

3. Metodologia

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Enzimologia, do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

a. Materiais

Os seguintes substratos: xilana "birchwood", carboximetilcelulose (CMC), pectina e manana, além dos compostos β -mercaptoetanol, N-bromosuccinimide (NBS), iodoacetamide, diethyl pyrocarbonate (DEPC), 5,5-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimide (EDC), 2,2-dithiodipyridine, 1,4-dithiothreitol (DTT), L-cisteína and L-triptofano foram adquiridos da Sigma Chemical Co.

Papel de filtro (FP) (Whatman No. 1). Dodecil sulfato de sódio (SDS) é proveniente da Gibco BRL Life Technologies. N,N,N',N'-tetrametilenediamino (TEMED) e congo red são da ICN Biomedicals, Inc. A resina cromatográfica utilizada foi Sephadex G-50 (GE Healthcare Life Sciences) e as colunas acopladas ao AKTA purifier foram HiTrap Desalting 5ml e posteriormente uma HiTrap SPFF 1 ml.

Xilooligômeros foram adquiridos da Megazyme. Os compostos fenólicos ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, vanilina, ácido tanínico, ácido 4-hidroxi-benzóico, ácido cinâmico são provenientes da Sigma Aldrich. Kit glicose oxidase da BioSystem. Todos outros químicos utilizados foram de grau analítico.

O sistema de ultrafiltração utilizado e membrana de exclusão molecular da Amicon. O espectrofotômetro usado foi o SpectraMax M2 da Molecular Devices®. HPLC Dionex ICS 3000 DC.

b. Manutenção do fungo e Produção de enzimas

O fungo *Aspergillus terreus* foi mantido através de repiques em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). O fungo foi cultivado em triplicata em frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio líquido com a seguinte composição em g/L : 7,0g de KH_2PO_4 , 2,0g de K_2HPO_4 , 0,1g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6g de extrato de levedura, 1% de piolho de algodão sujo pré tratado como fonte de carbono, em pH 7,0.

A suspensão de esporos era obtida através da raspagem de uma placa de cultura do fungo e introdução do raspado em solução salina 0,9%. A contagem de esporos foi feita usando-se a câmara de Newbauer (10^7 a 10^8 esporos/ml). Os cultivos foram

mantidos em um agitador durante 9 dias, a 120 RPM e a 28°C. Após o crescimento, o meio líquido era então filtrado a vácuo com papel de filtro, em um funil Büchner e o extrato bruto (EB) contendo o secretoma era obtido. Azida sódica (interruptora da cadeia transportadora de elétrons) foi adicionada ao EB para inibir o crescimento de microrganismos indesejados.

c. Pré tratamento da fonte de carbono

O piolho de algodão sujo foi cedido pela Indústria de re-beneficiamento de algodão Hantex Resíduos Têxteis (Gaspar-SC). Os resíduos foram submetidos a pré-tratamento, sendo inicialmente autoclavados a 121°C por duas horas, seguido por lavagens exaustivas em água, secagem a 65°C por 72 horas e por fim, fragmentados por trituração em moinho de bancada. Os resíduos pré-tratados foram utilizados como fonte de carbono para cultivo do fungo.

d. Curva de indução e Ensaio enzimáticos (DNS)

O fungo *A. terreus* foi incubado a 28°C, sob agitação constante de 120 RPM por 20 dias, com a fonte de carbono pré-tratada piolho de algodão sujo. Foram retiradas alíquotas diárias, a contar do tempo zero de incubação, e realizados ensaios enzimáticos para determinação da atividade de xilanase.

Ao longo do projeto, foram feitos dois tipos de ensaios de teste de atividade xilanolítica, denominados ensaio comum e micro ensaio, usados de acordo com a necessidade.

Para o ensaio comum de xilanases, 50 µL da solução enzimática foi misturada a 100µL da solução de xilana do tipo birchwood solúvel 1% (p/v) e, então incubada a 50°C por 30 minutos. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 300µL de ácido dinitrosalicílico (DNS) e posterior imersão em um banho fervente. A mistura fervida era então diluída em 1,5mL de água destilada. Uma alíquota de 200µL da mistura foi pipetada em uma placa, para realização de leitura em espectrofotômetro. (absorbância 540nm). O micro ensaio consiste em 1/10 do volume do ensaio comum, sendo mantidas todas as proporções na mistura, e sendo realizado em um termociclador.

A atividade xilanolítica é determinada pela quantidade de açúcar redutor produzido. Os açúcares redutores formados pela ação enzimática reduzem o DNS, transformando-o em um composto “alaranjado” que absorve luz no comprimento de onda

de 540nm (MILLER,1959). Uma curva padrão de xilose foi feita para os dois tipos de ensaios e usada como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (UI/mL) foi expressa como a concentração de açúcares redutores liberados por minuto, por mililitro (μmol de açúcar redutor/ min/mL). Todos os experimentos foram feitos em triplicata, com desvio padrão menor que 10% da média.

e. Ensaios enzimáticos (Orcinol férrico)

Para quantificação de pentoses e hexoses, 100 μL de ácido tricloroacético (10% p/v) foram misturados a 100 μL de solução enzimática e fervidos por 15 minutos. Posteriormente 600 μL de orcinol férrico e voltou-se a ferver a mistura por 20 minutos. A reação foi diluída 10x e lida nos comprimentos de onda de 660nm (pentoses) e 520nm (hexoses) (WHITE, C.A. e KENNEDY,1981).

f. Purificação da xilanase

O processo de purificação procedeu-se , primeiramente com a ultrafiltração do EB com uma membrana de retenção de 10kDa (PM10). Da ultrafiltração, obteve-se uma fração concentrada e uma fração ultrafiltrada. As duas alíquotas foram aplicadas separadamente em uma coluna de exclusão molecular do tipo Sephadex G-50 e a alíquota proveniente do ultrafiltrado foi escolhida para posteriores processos de purificação. A coluna foi pré-equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 μM , pH 7,0, e a amostra foi eluída com a mesma solução. Frações de 5mL foram coletadas a um fluxo de 20mL/h.

Ensaio de xilanase e determinação da concentração de proteínas (absorbância a 280nm) foram feitos para cada fração coletada. As frações que apresentaram maior atividade xilanolítica foram reunidas e armazenadas a 4°C.

As frações provenientes da G-50 foram concentradas duas vezes, usando o *speed vac* e ressuspendidas em água destilada. Esta amostra foi aplicada no AKTA purifier primeiramente em uma coluna HiTrap Desalting (5mL), o pico de proteína era coletado e aplicado com o *superloop* em uma coluna HiTrap SPFF (1mL), em acetato de sódio pH 5,0.

Após esse processo, a quantidade de proteínas e atividade xilanolítica das frações foi analisada. As frações com atividade xilanolítica foram denominadas Xyl T3. O esquema de purificação de Xyl T3 está demonstrado na figura 1.

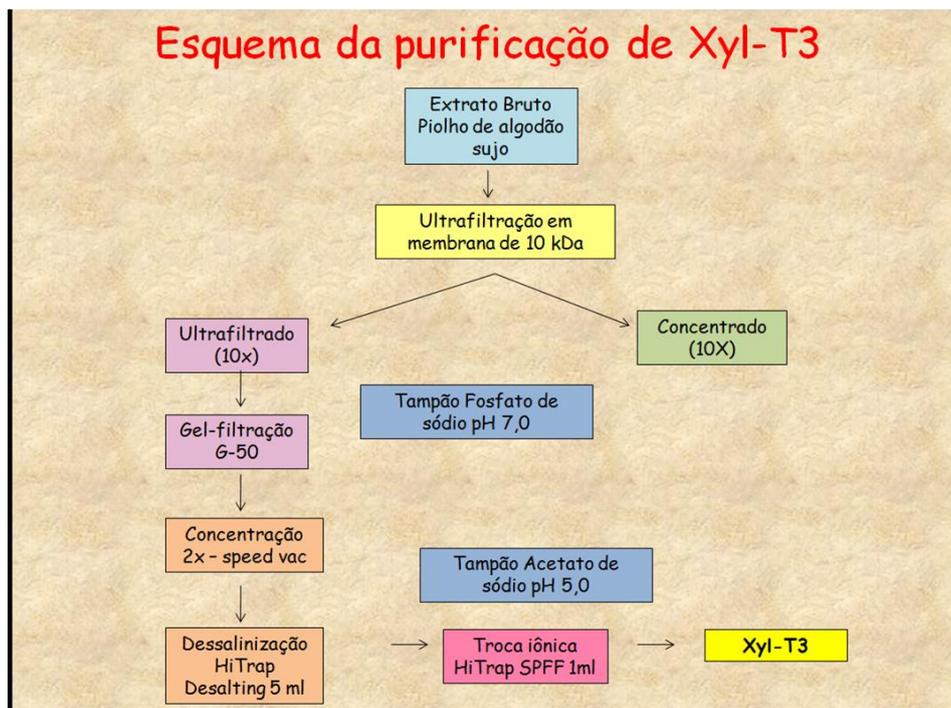


Figura 1 - Esquema do processo de purificação da Xyl T3

g. Caracterização da enzima purificada

i. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

A concentração de proteínas totais contidas nos sobrenadantes das amostras coletadas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD,1976), utilizando uma solução de albumina bovina (BSA) como padrão.

ii. Determinação do efeito do pH e da temperatura na atividade de xilanase

Ensaio enzimáticos foram feitos em diferentes pHs e temperaturas para se determinar o efeitos dessas variáveis na atividade do extrato bruto e de Xyl T3. Para os testes de temperatura, ensaios foram realizados no intervalo de 30 a 80°C, com variação de 10°C.

Para os testes de pH, foram utilizados os seguintes tampões, todos a 50mM: Acetato de sódio para pH 3,0 – 6,0; Fosfato de sódio para pH 6,0 – 7,0 e Tris-HCl para pH 7,0 – 9,0.

iii. Cinética enzimática

Foram estimadas as constantes de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) para xilana birchwood solúvel e insolúvel. O K_m indica a concentração de substrato na qual a enzima atinge metade de sua velocidade máxima. Para realizar os ensaios enzimáticos, soluções 1% (10mg/mL) foram diluídas para as concentrações finais 0,66 a 6,60 mg/mL. Tais diluições foram incubadas com a enzima purificada a 50°C por 30 minutos e submetidas ao método de DNS. Foi utilizado o software Enzifitter para determinação dos valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

V_0 : Velocidade inicial da reação

$V_{m\acute{a}x}$: Velocidade máxima da reação

K_m : Constante de Michaelis-Menten

[S]: Concentração do Substrato

iv. Efeito de íons metálicos na atividade xilanólítica de Xyl T3

O ensaio com íons metálicos Ag^+ , K^+ , Na^+ , Co^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Al^{+3} e Fe^{+3} foi realizado pré-incubando as amostras enzimáticas às soluções dos íons nas concentrações finais de 1,0 e 10 mM. O período de pré-incubação de 20 minutos à temperatura de 28°C. A atividade xilanólítica residual das amostras enzimáticas foi determinada. Os resultados foram expressos em atividade relativa, sendo que 100% das atividades enzimáticas corresponderam às atividades observadas nos controles que foram feitos substituindo-se a quantidade usada. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

v. Inibidores fenólicos

A amostra purificada Xyl T3 foi incubada com os seguintes compostos fenólicos: ácido ferúlico, ácido p-cumárico, vanilina, ácido tanínico, ácido 4-hidroxi-benzóico, ácido cinâmico, todos na concentração de 1 mg/mL. A concentração final de cada inibidor nos ensaios foi de 0,02%. As misturas foram incubadas por 7 dias, com alíquotas retiradas em

intervalos determinados e realizados ensaios de xilanase. Os controles foram feitos substituindo o volume de inibidor por água ou álcool, dependendo do caso.

vi. Hidrólise da polpa de celulose

A enzima purificada foi incubada juntamente com três tipos de polpas de celulose (1%): polpa clara, polpa pré branqueada com O₂ e polpa escura, mantendo-se as mesmas proporções de enzima e substrato usados nos ensaios enzimáticos. A mistura foi incubada a 50°C, 120 RPM, por 3 horas com a polpa clara e pré branqueada e por 8 horas com a polpa escura. A polpa escura foi ainda incubada a 28°C, 120 RPM, por 48 horas.

Foram retiradas alíquotas em intervalos determinados e realizados ensaios de DNS, orcinol férrico a 660nm e 520nm, kit glicose oxidase, além de leituras a 237nm, 254nm, 280nm e 456nm. Alíquotas foram congeladas para detecção de quantidade de açúcares por HPLC (Dionex).

vii. Análises dos Resultados

Os resultados foram realizados com auxílio da estatística descritiva e por comparação entre componentes estudados e da literatura.

4. Resultados e Discussão

a. Purificação

A fração ultrafiltrada em membrana de exclusão de 10 kDa, foi aplicada em coluna de gel-filtração do tipo sephadex G-50, conforme perfil demonstrado na figura 2-

As frações de 49 a 52 foram reunidas. Após diversas repetições aplicadas em coluna de dessalinização HiTrap Desalting 5 mL e posteriormente em coluna HiTrap SPFF 1 mL, conforme resultados mostrados nas figuras 3 e 4.

Da cromatografia de troca iônica foram reunidas as frações de 2 a 10 e esse *pool* enzimático foi denominado de Xyl T3.

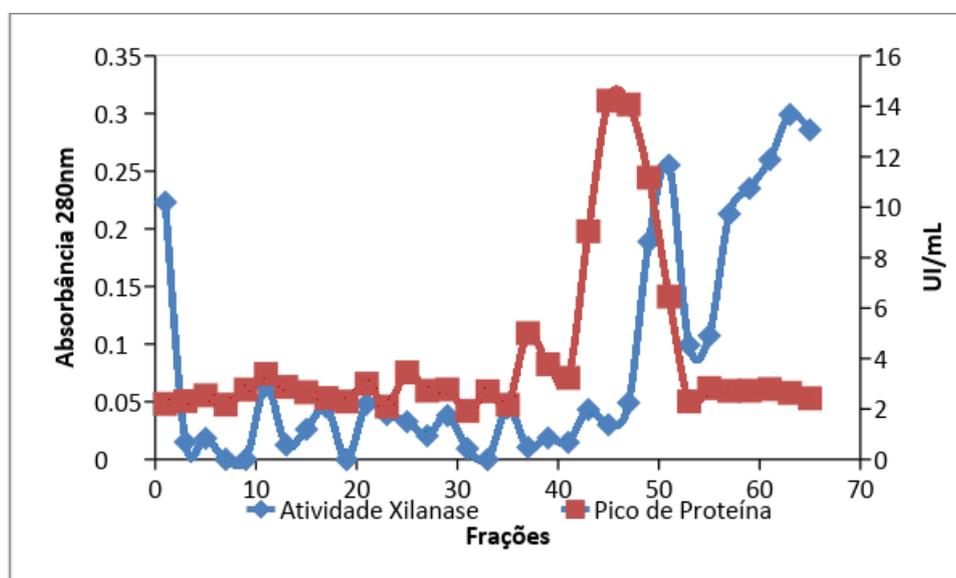


Figura 2 - Cromatografia de filtração em gel sephadex G-50 da fração ultrafiltrada em membrana de exclusão de 10 kDa. Tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, fluxo 20 mL/hora

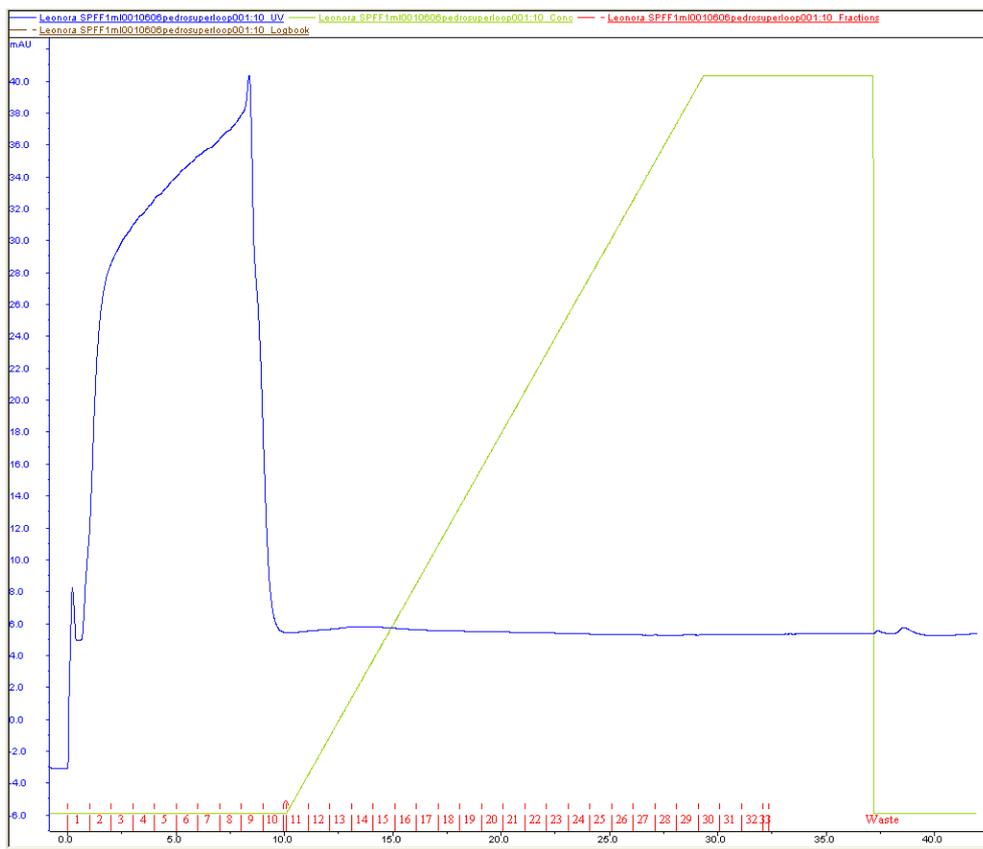


Figura 3 - Pico de proteína após aplicação do superloop na Hi Trap Desalting 5 mL. Em azul está representado a absorvância, em vermelho as frações em verde o gradiente de sal

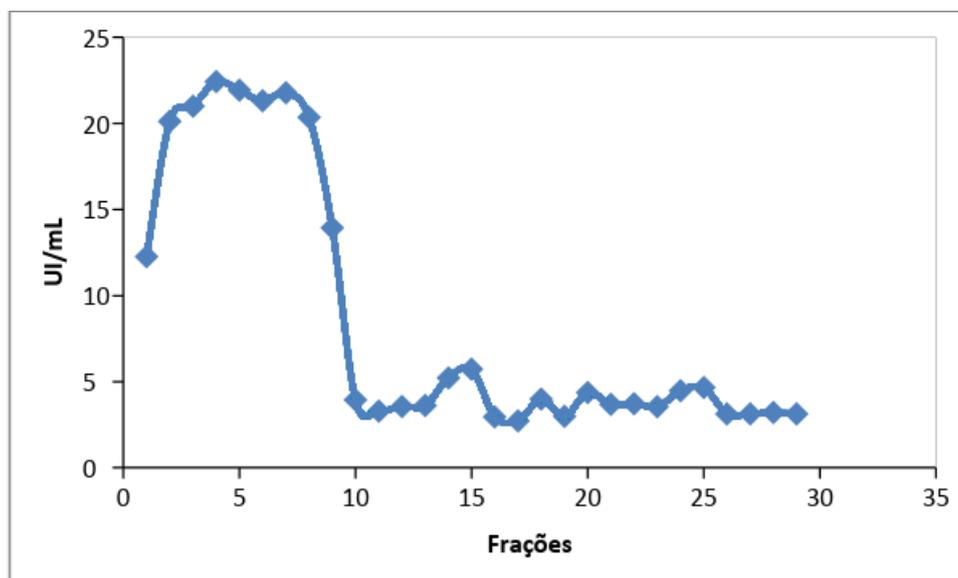


Figura 4 - Atividade de xilanase obtida na cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap SPFF (1 mL) em tampão Acetato de sódio pH 5,0

O rendimento desses passos de purificação são mostrados na tabela 1:

Tabela 1 - Rendimento da purificação de Xyl T1

Amostra	Proteínas Totais (mg)	Atividade total (UI/mL)	Atividade específica (UI/mg)	Rendimento (%)
EB	62,741	32507,464	518,121	100,000
Concentrado	32,391	4000,000	123,492	51,626
Ultra	16,939	26053,796	1538,121	26,998
G50	-	-	-	-
T3	0,098	36,808	377,053	0,303

b. Caracterização da xilanase purificada

i. Efeito do pH e temperatura

As figuras 5, 6 e 7 mostram o efeito da temperatura e pH nas atividades do EB e de Xyl T3.

O EB teve melhor atividade a 50°C, mostrando boa estabilidade em diferentes temperaturas, mantendo no mínimo 70% de sua atividade em todas as temperaturas estudadas. Xyl T3 também apresentou melhor atividade a 50°C, entretanto mostrou-se ainda mais estável que o EB em todas as faixas de temperatura analisadas. Xyl T3 manteve 98% de sua atividade a 60°C e manteve no mínimo 74% de sua atividade, independente da temperatura de incubação.

Quanto ao efeito do pH, o EB apresentou melhor performance em pH 6.0, tanto no tampão fosfato quanto acetato de sódio. Já Xyl T3 apresentou melhor atividade em pH 4.5. Tanto o EB quanto Xyl T3 apresentaram melhores atividades em faixa de pH ácido, tendo acentuada perda de atividade em pHs básicos.

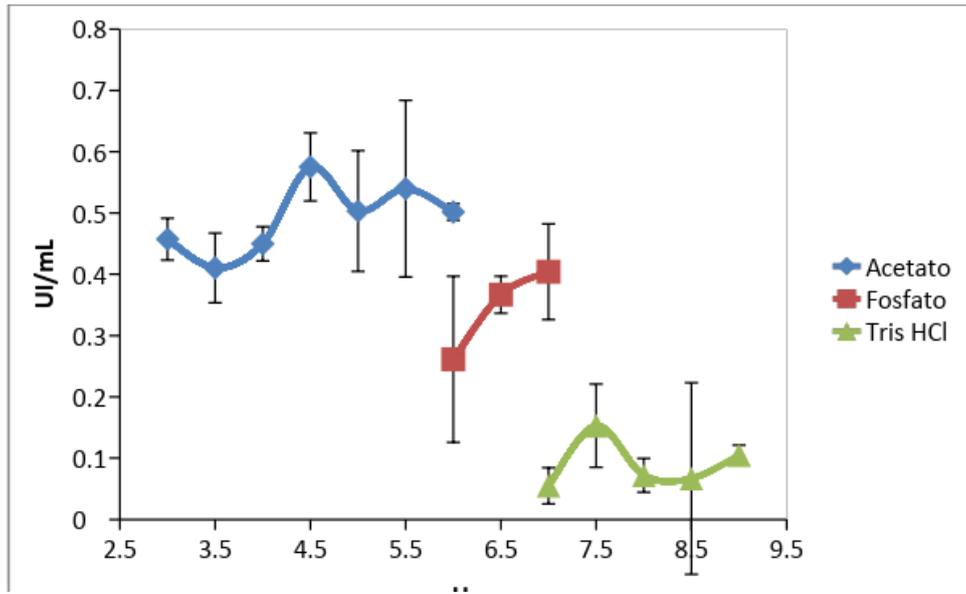


Figura 5 - Efeito do pH na atividade de xilanase de Xyl T3

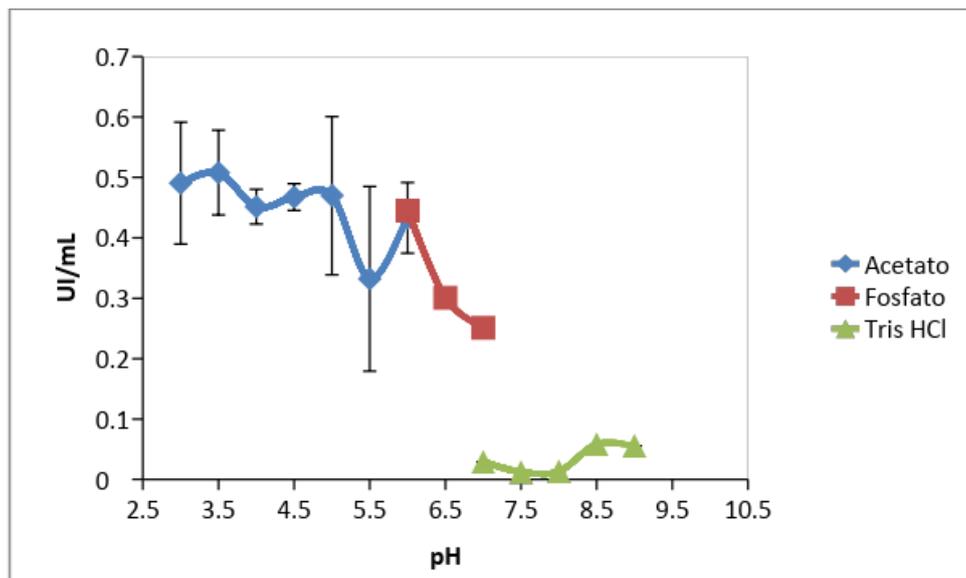


Figura 6 - Efeito do pH na atividade de xilanase de do extrato bruto de A. terreus

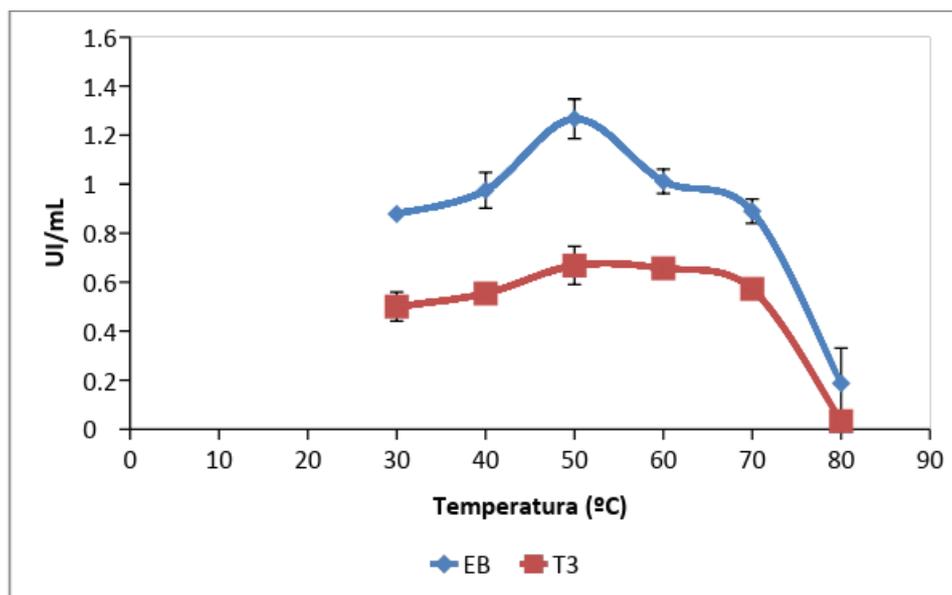


Figura 7 - Efeito da temperatura na atividade de xilanase do extrato bruto e de Xyl T3

Geralmente as xilanases de origem fúngica têm melhor atividade na faixa de pH de 4 a 6 (TENKANEN et al. 1997) e intervalo de temperaturas entre 35 e 65°C (BEG et al. 2001).

Em geral a polpa Kraft de papel é processada em temperaturas entre 80 e 90°C em condições alcalinas (BUCHERT et al.1994).

Outras aplicações biotecnológicas para as xilanases, como para hidrólise de biomassa e como aditivo de ração animal, requerem atividade enzimática sob pH 4,8 – 5,5 e temperatura 40 – 50°C(BON e WEBB, 1993)

As características de pH e temperatura ótima tanto do EB quanto da Xyl T3 são condizentes com o uso em processos industriais.

ii. Efeito de íons metálicos na atividade xilanólítica de Xyl T3

A determinação do papel ativador ou inibitório de compostos químicos selecionados, constitui uma ferramenta de grande utilidade na caracterização da estrutura e as possíveis interações que ocorrem no sítio ativo e o mecanismo de ação de enzimas xilanólíticas. Desta maneira, a função dos íons metálicos na atividade de Xyl T3 foi determinada conforme gráfico abaixo (Figura 8).

De forma geral, todos os íons na concentração de 1mM ativaram a enzima, sendo que a maior ativação foi observada com o íon FeSO_4 e AgNO_3 com 83% e 72% de aumento, respectivamente.

Por outro lado, com a concentração de 10mM, foram observadas inibições na grande parte dos íons estudados, sendo as maiores inibições observadas com EDTA e ZnSO_4 , com aproximadamente 26% de inibição. AgNO_3 , CuSO_4 , EDTA, ZnSO_4 , ZnCl_2 , KCl tiveram efeitos opostos na atividade de Xyl T3, aumentando a atividade na concentração de 1mM e diminuindo na concentração de 10 mM, esses efeitos antagônicos podem ser devidos a uma saturação do sítio ativo da enzima.

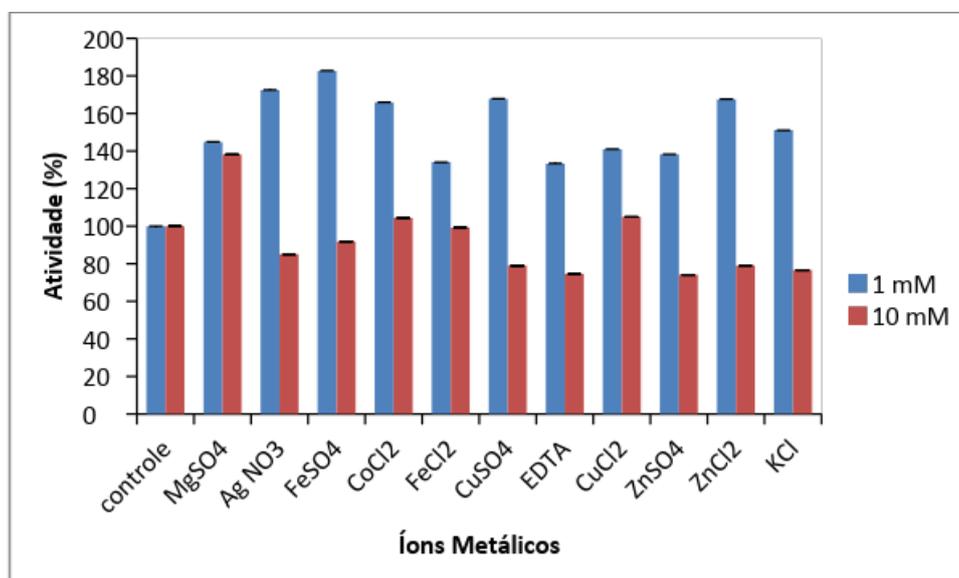


Figura 8 - Efeitos de íons metálicos na atividade da Xyl T3

iii. **Ensaio com outros substratos**

Foram feitos ensaios utilizando o extrato bruto de *A. terreus* crescido em pilho de algodão sujo e os seguintes substratos: Xilana, Manana, Pectina e CMC, conforme dados mostrados na figura 9.

Observou-se que o extrato bruto possui uma alta atividade de xilanase e mananase. Com pectina e CMC o extrato bruto demonstrou menor atividade.

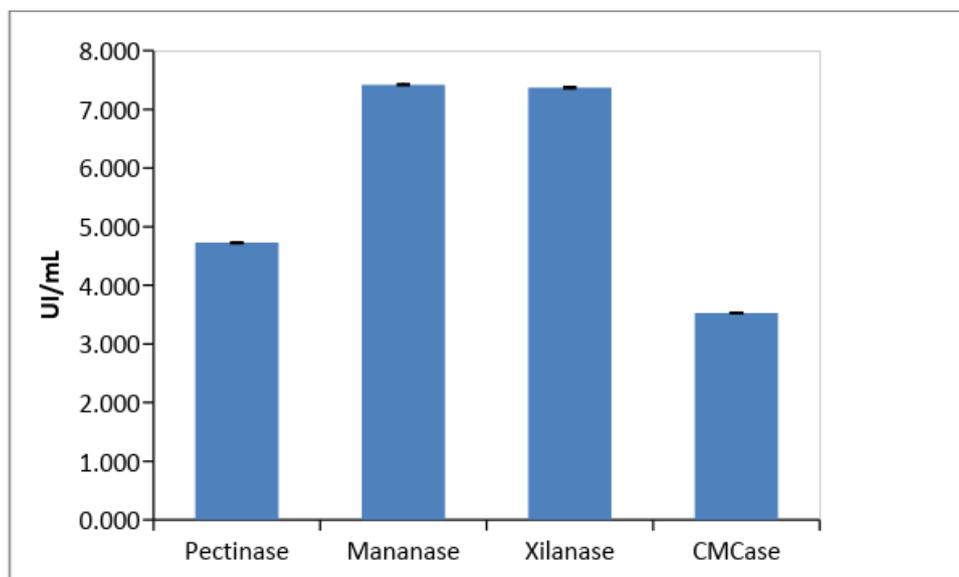


Figura 9 - Atividade de EB em diferentes substratos

iv. **Cinética enzimática**

Os parâmetros cinéticos obtido para a Xyl T3 estão apresentados na tabela 2:

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos de Xyl T3 sobre xilana birchwood solúvel e insolúvel

Xilana birchwood	Solúvel	Insolúvel
Km	6,54 mg /mL	4,67 mg/mL
Vmáx	3,09 UI/mL	0,84 UI/mL

Observou-se um Km e Vmáx menores para xilana insolúvel que para xilana solúvel, demonstrando uma maior afinidade desta enzima pela xilana insolúvel. Em relação à outras duas xilanas previamente purificadas deste mesmo fungo, nota-se tanto Km_s quanto Vmáx intermediários. Se compararmos os parâmetros cinéticos da Xyl T3 com xilanas provenientes de *Bacillus pumilus* (DUARTE, 2000) observa-se que Xyl T3 só não teve Km menor que a xilana 5₁₄ (1,1 mg/mL), e a Vmáx de Xyl T3 também foram menores que o de todas as xilanas de *Bacillus pumilus*. Xyl T3 demonstrou uma maior afinidade, tendo como base os Km_s, do que qualquer uma das xilanas de *Bacillus pumilus*.

v. *Inibidores fenólicos*

Xyl T3 foi incubada com compostos fenólicos, após 7 dias de incubação observou-se que a vanilina e o ácido tanínico inibem fortemente essa enzima, já que a meia vida da enzima, em presença desses compostos, é de apenas 1 hora e a atividade de xilanase chega a zero com 5 dias de incubação. Por outro lado, a meia vida da enzima incubada com ácido *p*-cumárico foi de 72 horas, evidenciando um menor efeito inibitório deste composto, conforme dados mostrados na Tabela 3.

Durante a incubação de Xyl T3 com os ácidos ferúlico, *p*-cumárico e 4-hidroxi-benzóico, houve um aumento da atividade enzimática relativa ao controle após o 2º dia de incubação. Isso pode ser devido a um efeito estabilizador da enzima quando incubada com os compostos citados acima, pois no controle, há uma queda acentuada de atividade após esse mesmo tempo de incubação (figura 10) e essa queda não ocorre nos ensaios, conforme demonstrado na figura 11.

Fenóis, em plantas superiores, variam de moléculas simples e de baixo peso molecular, glicosídeos fenólicos a compostos poliméricos. Acredita-se que vários deles e seus metabólitos exercem papéis fundamentais nos mecanismos de defesa da planta (XIMENES et al.2011).

Fenóis, incluindo produtos de degradação da lignina, são liberados durante o pré tratamento da biomassa lignocelulósica (XIMENES et al.2011). Durante a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos pré tratados, podem ocorrer modificações na estrutura da lignina, levando a liberação de radicais fenólicos. Em consequência dessa liberação, compostos fenólicos derivados da lignina tem um efeito inibitório sobre a conversão enzimática da biomassa lignocelulósica a produtos químicos úteis e de maior valor agregado (DUARTE et al. 2012).

Tabela 3 - Meia-Vida em Horas de Xyl T3 incubada com os compostos fenólicos

Compostos fenólicos	Tempo (h)
Ácido Ferúlico	8
Ácido p-cúmarico.	72
Ácido Cinâmico	2
Vanillina	1
Ác. 4-Hidroxibenzóico	4
ÁcidoTanínico	1

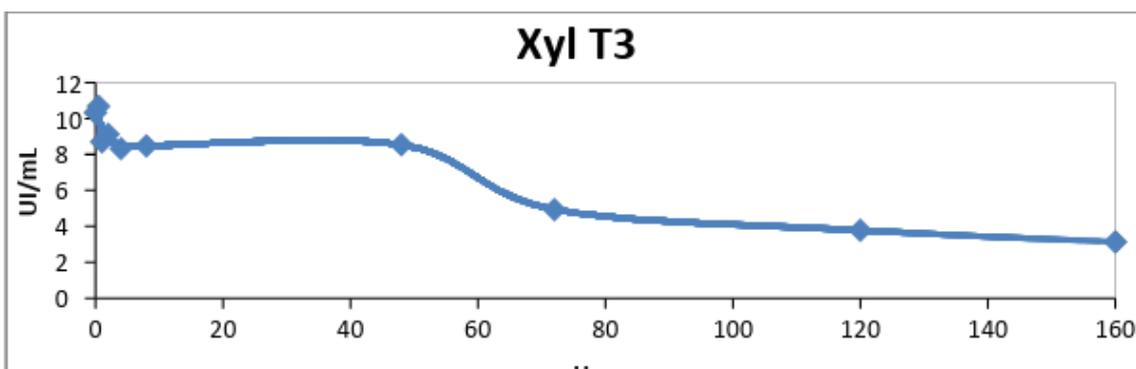


Figura 10 - Atividade de Xilanase (UI/mL) em relação ao tempo de incubação (horas)

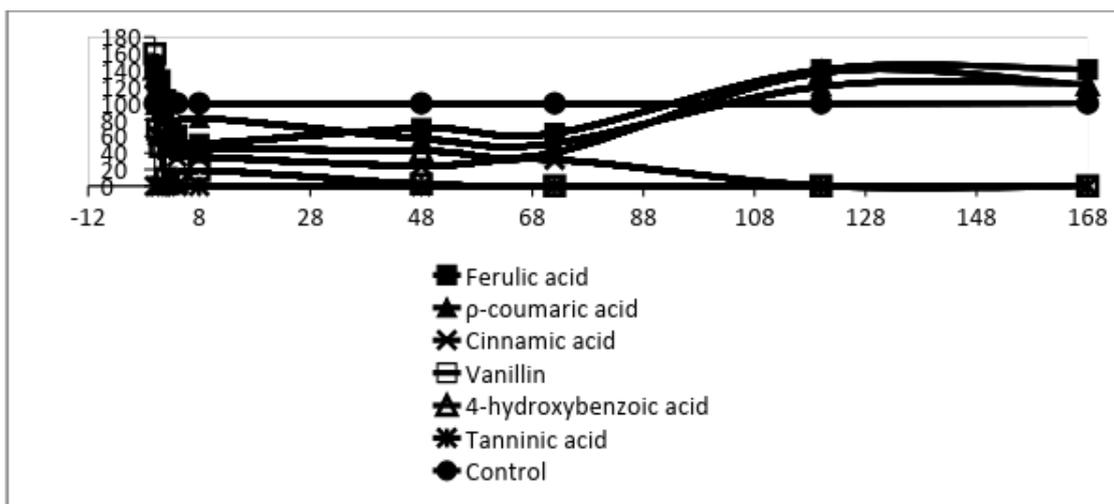


Figura 11 - Influência dos compostos fenólicos na atividade enzimática de Xyl T3

vi. Hidrólise da polpa de celulose

Também foi feito ensaio com o ultrafiltrado e com a amostra que sai da G50 para atestar a presença de celulases, e foi comparado com o extrato bruto do mesmo fungo mudando apenas sua fonte de carbono, o bagaço de cana.

O extrato bruto e a amostra proveniente da G50 que utilizaram o piolho de algodão como fonte de carbono apresentaram uma presença de celulases menor que as amostras que utilizaram o bagaço de cana como fonte de carbono. Como esperado a presença de celulases diminuiu após a passagem da amostra pela G50.

Para avaliar uma possível viabilidade de utilização de xilanses parcialmente purificadas de *A. terreus* no processo de branqueamento de polpa de celulose, a fração ultrafiltrada em membrana de exclusão de 10kDa foi incubada juntamente com amostras de polpa clara, pré branqueada com O₂ e polpa escura. Quando incubado com a polpa clara durante 3 horas (figura 12), foi detectada liberação de uma maior quantidade de pentoses, aproximadamente 50 mg/mL com 1 hora e 66 mg/mL ao final do ensaio.

Houve também a liberação de hexoses, porém em menor quantidade, aproximadamente 34 mg/mL com 1 hora e ao final das 3 horas, 41 mg/mL.

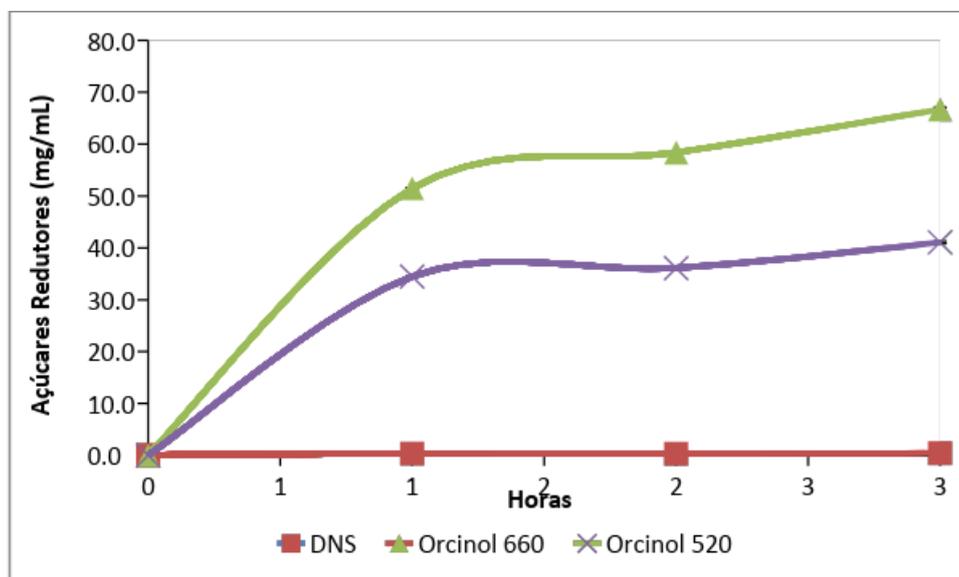


Figura 12 - Açúcares redutores liberados durante a incubação da polpa clara com amostra enzimática ultrafiltrada em PM 10 kDa por 3 horas a 50°C

No ensaio com a polpa pré branqueada houve grande liberação de pentoses, conforme dados mostrados na figura 13. A maior liberação ocorreu com 2 horas de ensaio chegando a aproximadamente 75 mg/mL de pentoses. Com 3 horas de incubação,

houve uma redução na liberação de pentoses para aproximadamente 35 mg/mL, possivelmente devido à uma reação de transglicosilação após a segunda hora de incubação. Durante o ensaio também ocorreu liberação gradual de pentoses, sendo a maior liberação de açúcares com 3 horas de incubação, com aproximadamente 72 mg/mL.

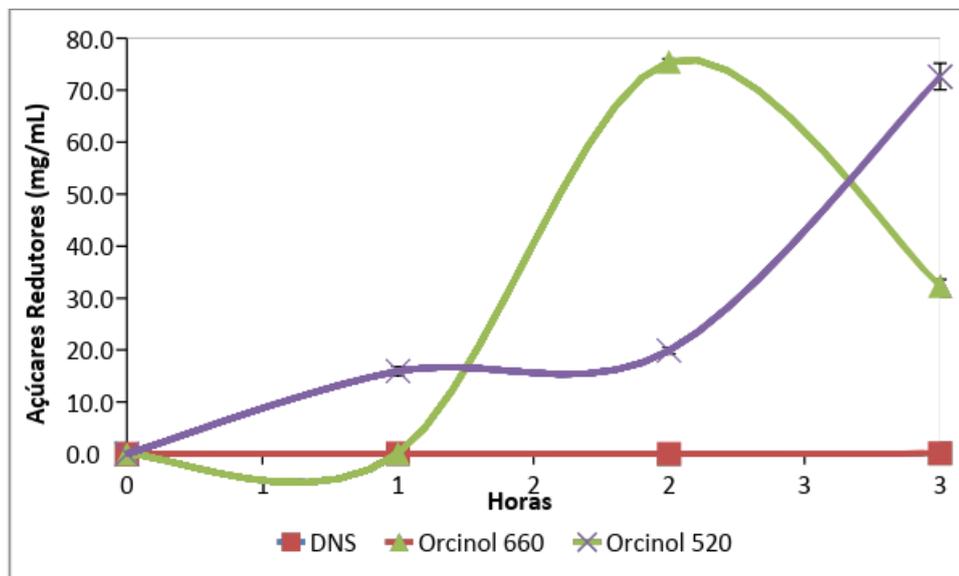


Figura 13 - Açúcares redutores liberados durante a incubação da polpa Pré-branqueada com amostra enzimática ultrafiltrada em PM 10 kDa por 3 horas a 50°C

Quando incuba-se essa amostra enzimática com a polpa escura durante 8 horas, as quantidades de açúcares redutores liberados foi bem menor em comparação com as outras polpas (figura 14), provavelmente devido à recalcitrância desse substrato.

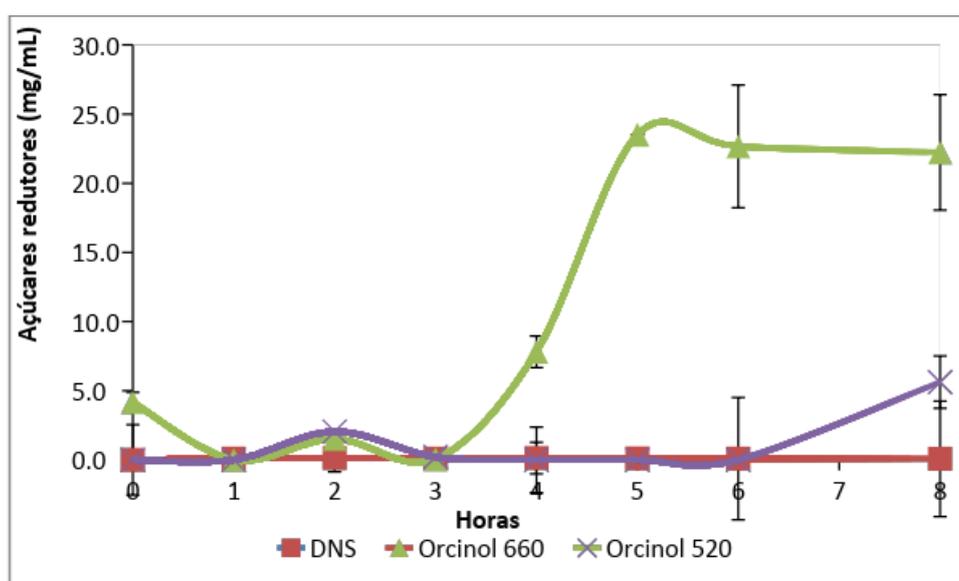


Figura 14 - Açúcares redutores liberados durante a incubação da polpa escura com amostra enzimática ultrafiltrada em PM 10 kDa por 8 horas a 50°C

Por essa razão, a polpa escura foi reincubada com essa amostra enzimática por 48 horas. Devido à instabilidade da enzima em elevadas temperaturas, a hidrólise de 48 horas foi feita a 28°C. Os dados desta hidrólise estão mostrados na figura 15. A liberação de pentoses com 20 horas foi de aproximadamente 54 mg/mL e atingiu seu máximo com 24 horas, liberando 73 mg/mL.

A liberação de hexoses com 20 horas foi de aproximadamente 48 mg/mL. Ocorreu uma diminuição gradual na liberação de pentoses ao longo do tempo de incubação.

A liberação de glicose durante a hidrólise das polpas pelo ultrafiltrado de *A. terreus* foi avaliada pelo kit glicose oxidase.

Em todos os tipos de polpas de celulose, a liberação de glicose pelo ultrafiltrado foi igual a zero, demonstrando bom potencial de aplicação industrial deste *pool* enzimático.

Além dos ensaios enzimáticos já citados, todas as amostras de hidrolisados foram submetidas à leituras nos comprimentos de onda de 237 nm, 254 nm, 280 nm e 454 nm. Esses comprimentos de onda relacionam-se com liberação de lignina e outros compostos hidrofóbicos da polpa de celulose. A liberação de cromóforos é um indicador melhor dos efeitos da xilanase sobre a polpa de celulose que a liberação de açúcares redutores, pois estes continuaram sendo produzidos como resultado do ataque de xilanases aos xilo oligômeros liberados pela hidrólise inicial da xilana contida na superfície da fibra (GARG et al. 1998)

Com exceção da hidrólise da polpa escura (8 horas, a 50°C), de forma geral, a liberação de compostos que absorvem os comprimentos de onda supracitados aumentaram com o passar das horas de incubação, sugerindo que a enzima foi mais ativa com o passar do tempo. De acordo com (ELEGIR et al. 1995) a liberação de material absorvendo o comprimento de onda de 237 nm se correlaciona com a liberação de cor e aumenta o brilho da polpa após o branqueamento.

As figuras 16-19 mostram as absorbâncias nos 4 comprimentos de onda das polpas clara, pré branqueada com O₂ e polpa escura (incubada por 8 e 48 horas).

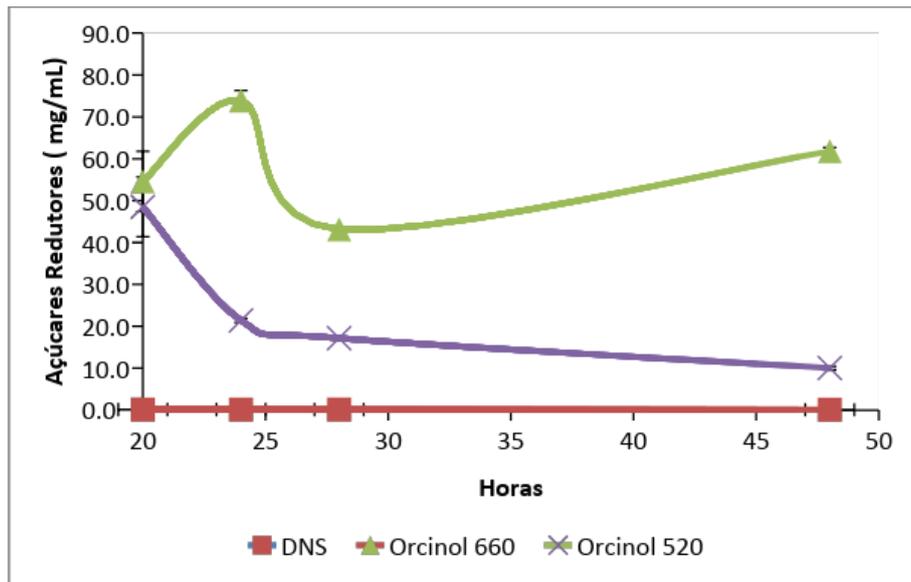


Figura 15 - Açúcares redutores liberados durante a incubação da polpa escura com amostra enzimática ultrafiltrada em PM 10 kDa por 48 horas a 28°C

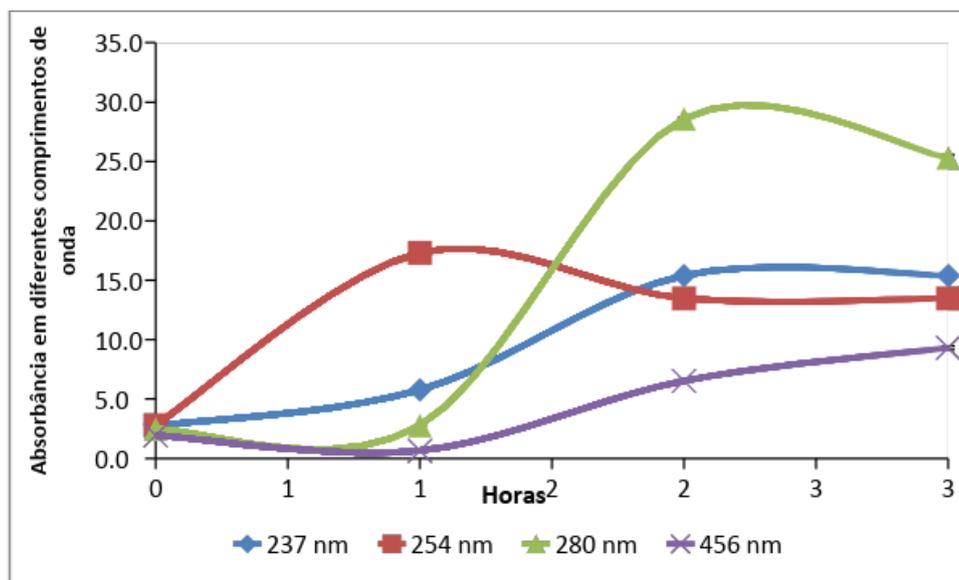


Figura 16 - Absorbância em diferentes comprimentos de compostos provenientes da incubação da polpa clara com amostra enzimática ultrafiltrada em PM 10 kDa por 3 horas a 50°C

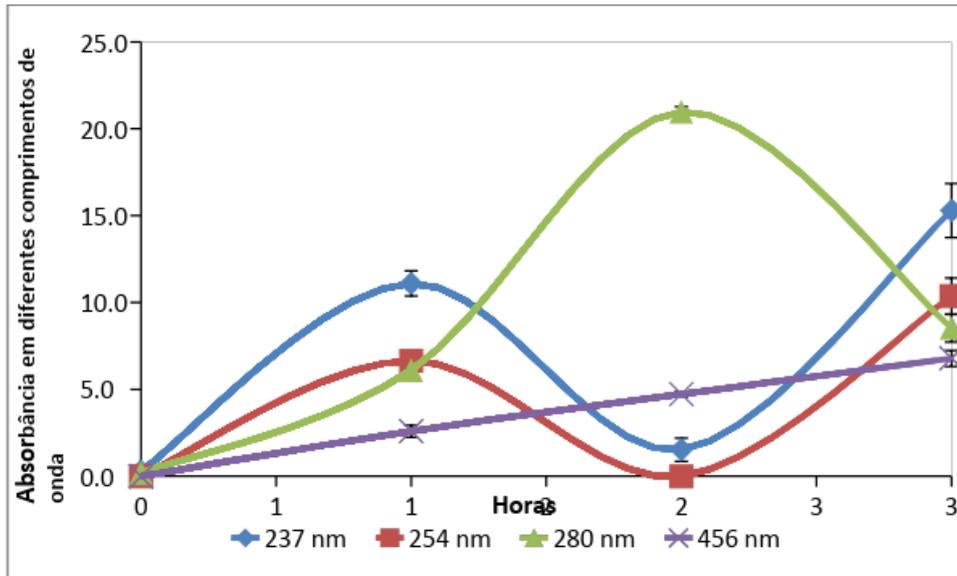


Figura 17 - Absorbância em diferentes comprimentos de compostos provenientes da incubação da polpa pré branqueada com amostra enzimática ultrafiltrada em PM 10 kDa por 3 horas a 50°C

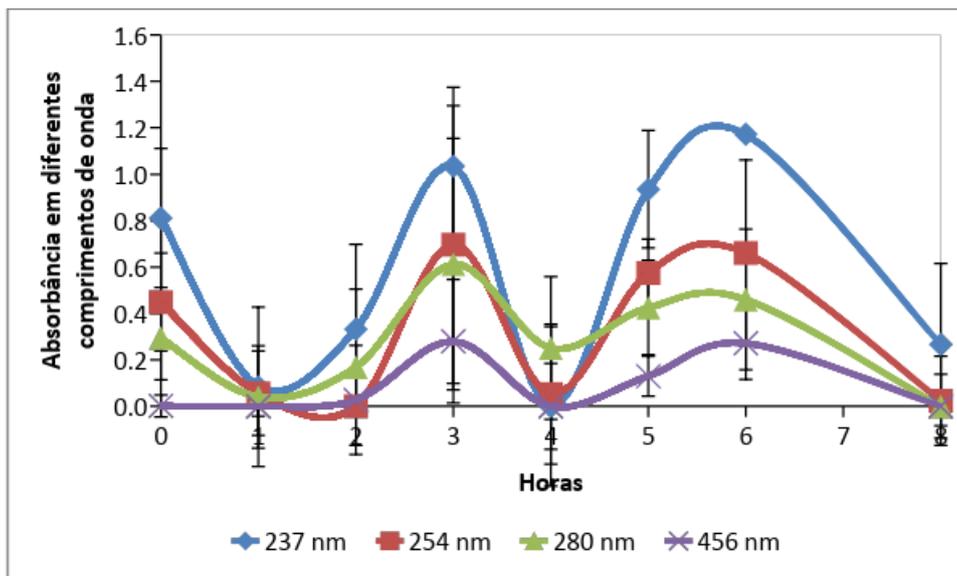


Figura 18 - Absorbância em diferentes comprimentos de compostos provenientes da incubação da polpa escura com amostra enzimática ultrafiltrada em PM 10 kDa por 3 horas a 28°C

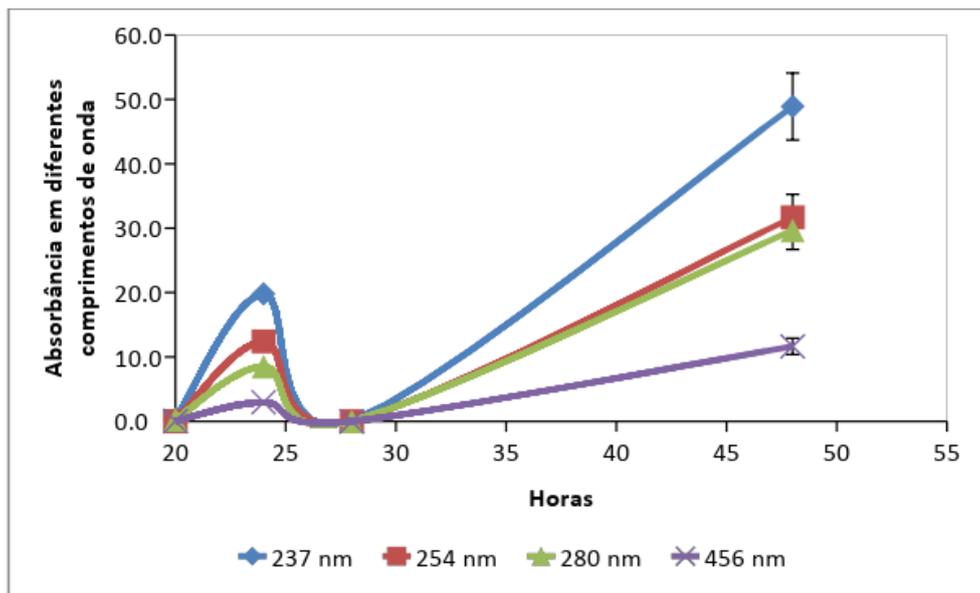


Figura 19 - Absorbância em diferentes comprimentos de onda de compostos provenientes da incubação da polpa escura com amostra enzimática ultrafiltrada em PM 10 kDa por 48 horas a 28°C

Durante esses ensaios foram retiradas alíquotas para serem analisadas no HPLC para identificação dos xilo oligômeros liberados pela ação enzimática.

Na análise da incubação da polpa clara com amostra enzimática ultrafiltrada em PM 10 kDa, foi notado que houve a liberação de xilose, xilobiose, xilotriose, xilotetraose, xilopentaose e xilohexaose.

A maior liberação ocorrida durante o período do ensaio foi de xilose nos tempos iniciais como mostra a figura 20 e na última hora houve grande liberação de xilotetraose e xilohexaose como fica evidente na figura 21.

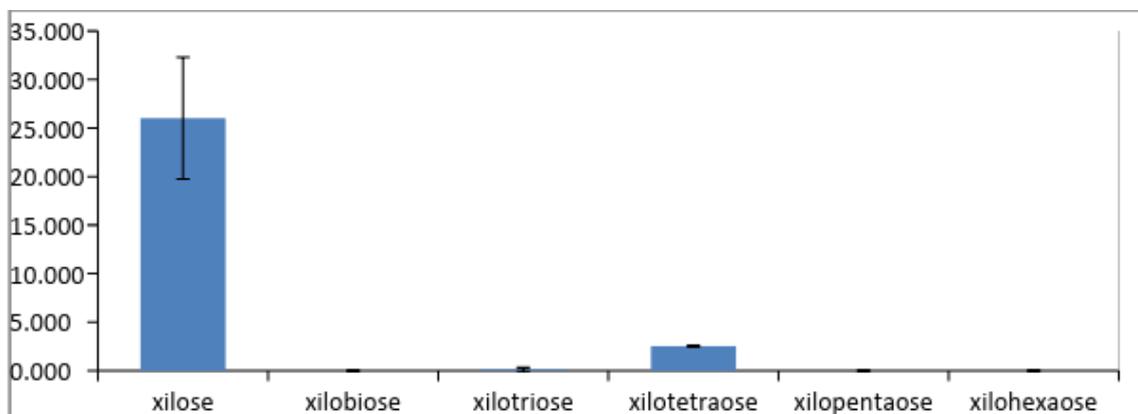


Figura 20 - Liberação de xilo oligômeros ao final da primeira hora de ensaio de incubação da amostra com a polpa clara

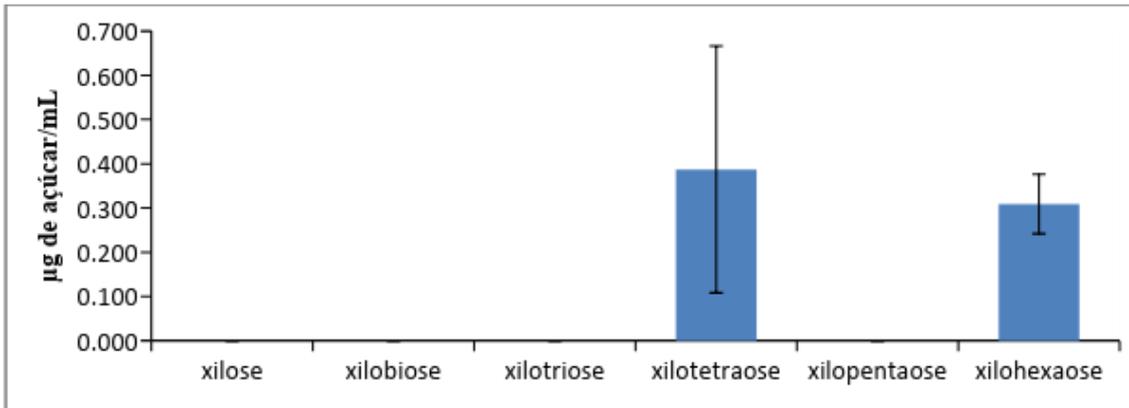


Figura 21 - Liberação de xilo oligômeros ao final da terceira hora de ensaio de incubação da amostra com a polpa clara

Já quando a amostra foi incubada com a polpa pré branqueada, houve grandes liberações de xilobiose durante todo o ensaio, como mostra a figura 22. Houve liberação de todos os xilo oligômeros a exceção de xilose, como mostra a figura 23.

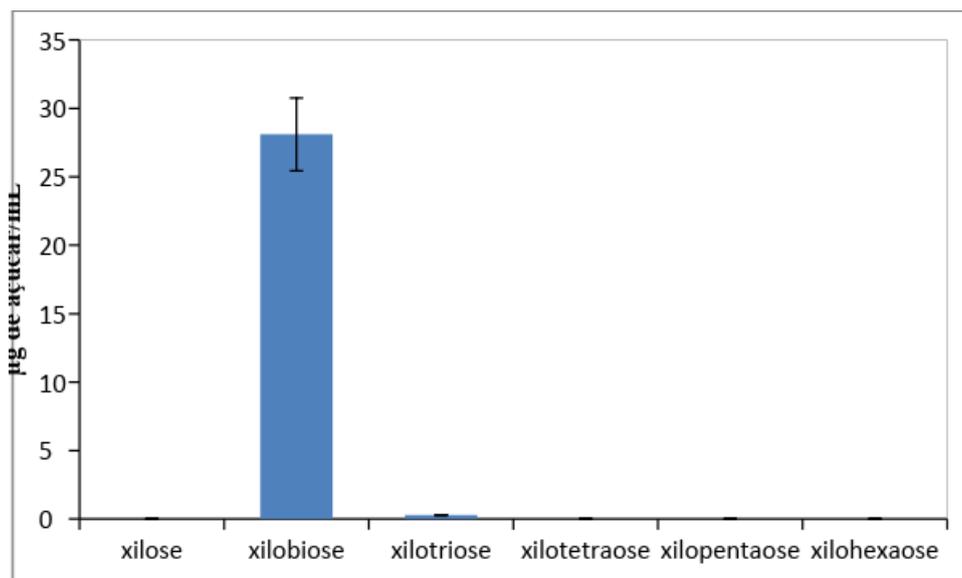


Figura 22 - Liberação de xilo oligômeros na terceira hora de ensaio da amostra com a polpa pré branqueada

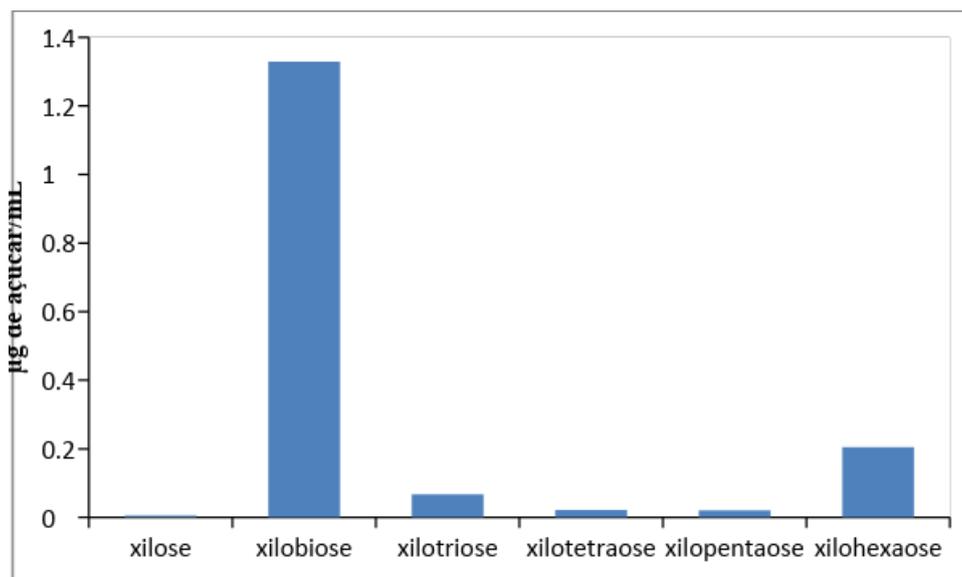


Figura 23 - Liberação de xilo oligômeros no tempo zero do ensaio de incubação da amostra com a polpa pré branqueada

Durante as 8 horas de incubação da amostra com polpa escura foi averiguada grande liberação de xilose e xilobiose como mostra a figura 24. Também houve a liberação de xilotriose como mostra a figura 25.

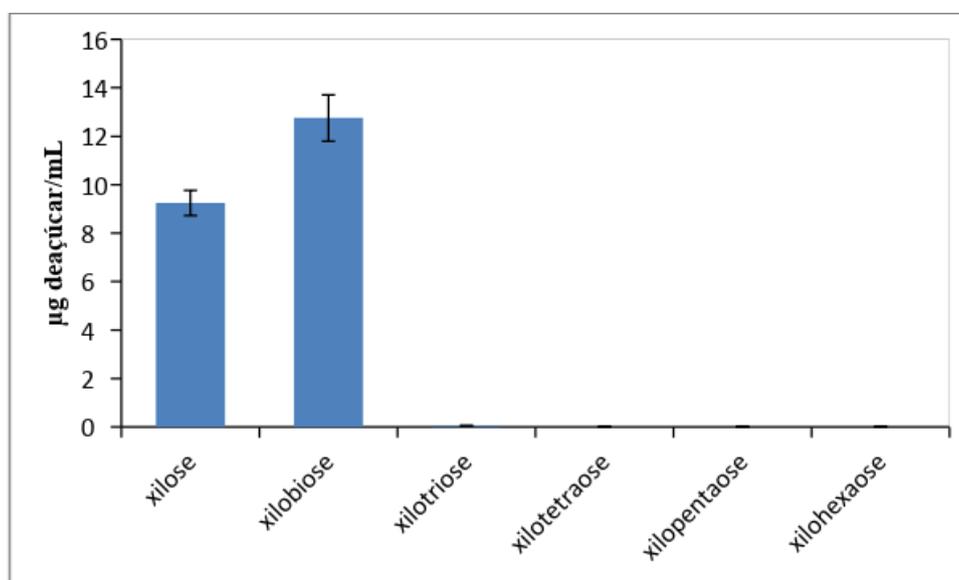


Figura 24 - Liberação de xilo oligômeros na oitava hora da incubação da amostra com a polpa escura

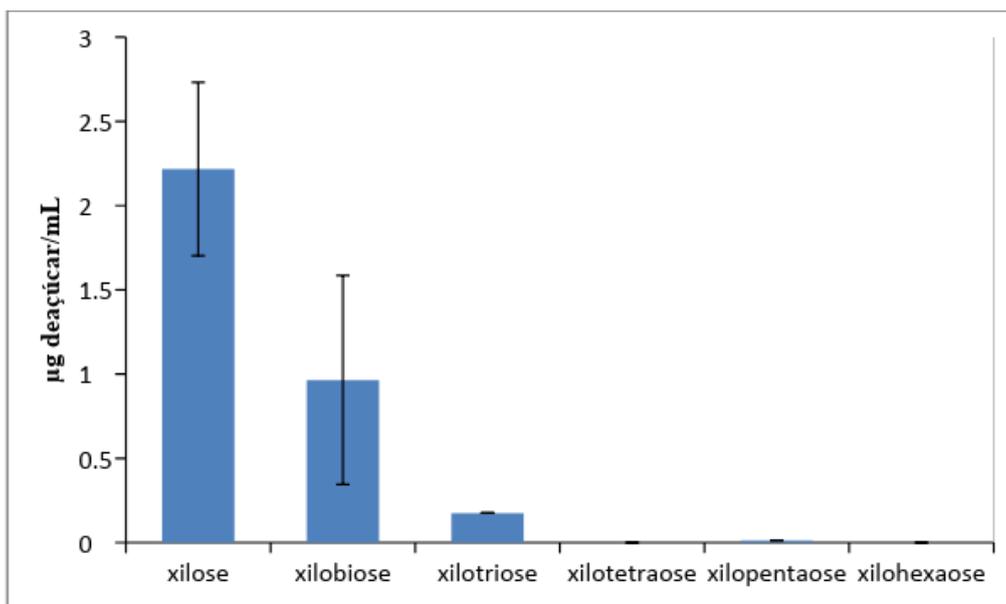


Figura 25 - Liberação de xilo oligômeros na sexta hora da incubação da amostra com a polpa escura

Quando incubada durante 48 horas a polpa escura apresenta resultados diferentes de quando é incubada por 8 horas. Quando incubada por mais tempo ocorre a liberação de todos os açúcares (figura 26), mas mesmo assim a liberação maior continua sendo de xilose, xilobiose e agora também xilotriose (figura 27).

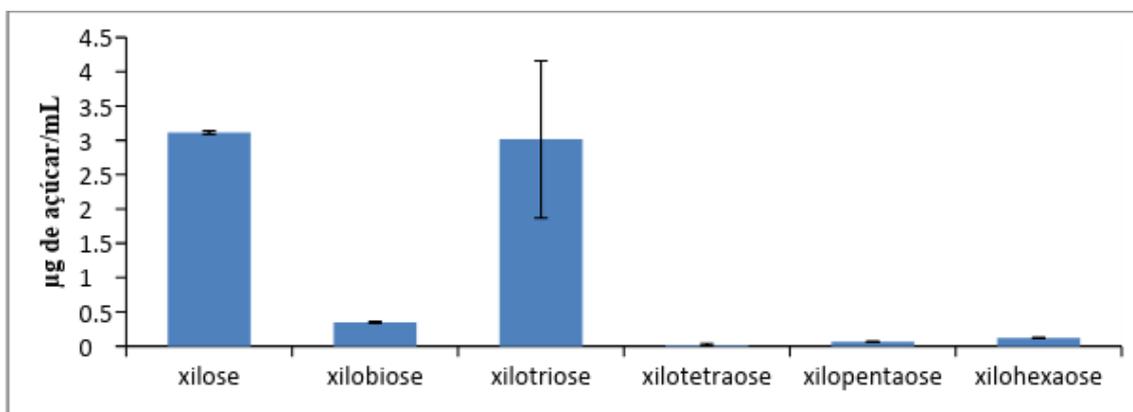


Figura 26 - Liberação de xilo oligômeros com 24 horas de incubação da amostra com a polpa escura.

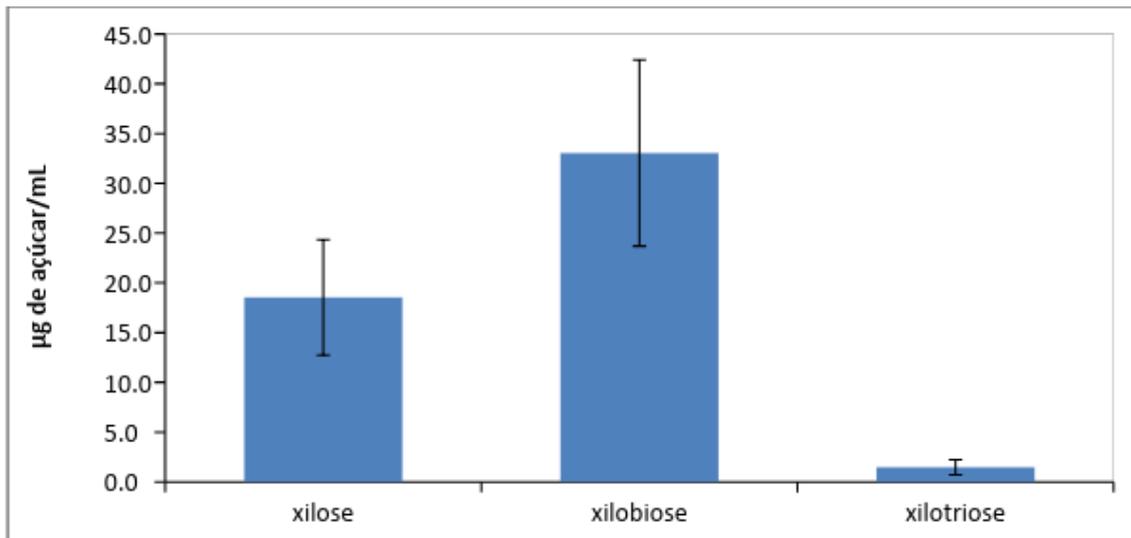


Figura 27 - Liberação de xilo oligômeros com 20 horas de incubação da amostra com polpa escura

Os ensaios de polpa de celulose mostraram que esse pool enzimático tem bom potencial de aplicação industrial, uma vez que consegue hidrolisar grandes quantidades e variedades de açúcares solúveis presentes na fibra de celulose, não liberando nenhuma quantidade de glicose.

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

A enzima apresentou uma boa estabilidade quando a testamos em diferentes temperaturas, mantendo no mínimo 74% de atividade independente da faixa de temperatura.

A fração purificada da enzima demonstrou uma melhor atividade em pH mais ácido.

Em todos os testes com todos os tipos de polpa celulose, a liberação de glicose pela amostra foi igual a zero.

Devido a todas essas características acima, é possível concluir que o *pool* enzimático possui um bom potencial de aplicação industrial, portanto recomendam-se maiores pesquisas tanto em relação à aplicação prática da mesma, quanto aos estudos de viabilidade financeira e aplicabilidade, já que na última década, o tema sustentabilidade está em alta, e as tecnologias industriais limpas, tecnologias verdes entram ainda mais em foco midiático e por consequência, o investimento em pesquisas aumenta. A purificação e caracterização de xilanases de fungos filamentosos é uma excelente forma de reaproveitamento de resíduos orgânicos além do uso em indústrias de branqueamento de papel de uma forma menos agressiva ao ambiente.

Com esta xilanase purificada, abre-se um leque de possibilidades de caracterizações físico-químicas e bioquímicas, visando uma aplicação prática e industrial futura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Associação Brasileira Técnica de Celulose e Papel – ABTCP.** www.abtcp.com.br – extraído agosto 2017
- BAJPAI, P. 1999. **Application of enzymes in the pulp and paper industry**, Biotechnol. Progr. 15: 147-157.
- BEG Q.K., BHUSHAN B., KAPOOR M., HOONDAL G.S. 2001. **Microbial and their applications: a review**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56(34): 326-28.
- BON E. P. S., WEBB C. 1993. **Glucoamylase production and nitrogen nutrition in *Aspergillus awamori***. Appl. Biochem. Biotechnol. 39 :349-369.
- BRADFORD, M. M. (1976) **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical Biochem, 72, 248-254.
- BUCHERT J., KANTELINEN A., TENKANEN M., VIKARI. 1994. **Application of xylanases in the pulp and paper industry**. Bioresour. Technol. 50 (1): 65-72.
- CASTRO, A. M. & JUNIOR, N. P. 2010. **Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial residues**. Quím. Nova 33: 182
- CHERRY, J. R. & FIDANTSEF, A. L. 2003. **Directed evolution of industrial enzymes: an update** Curr. Opin. Biotechnol. 14:438.
- CHRISTOV, L. P., G. SZAKACS e H. BAKAKRISHNAN. 1999. **Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching**. Process Biochem.34:511-517.
- DEMAIN, A. L.; NEWCOMB, M.; WU, D.J.H (2005) **Cellulase, Clostridia, and Ethanol**. **Microbiology and Molecular Biology** Reviews, 69,124-154.
- DUARTE, G. C.; MOREIRA, L. R. S.; JARAMILLO, P. M.; FILHO, E. X. F. BioEnergy Res. 2012 "in Press".
- DUARTE, Marta Cristina Teixeira et al . **Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilus***. Braz. J. Microbiol., São Paulo, v. 31, n. 2, jun.2000 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822000000200005&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 26 ago. 2017.
- ELEGIR G., SYKES M. and JEFFRIES T. (1995),**Differential and synergistic action of *Streptomyces* endoxylanases in prebleaching of kraft pulps**.Enzyme Microb. Technol., 17, 954-959.

GARG A. P., ROBERTS J. C. and McCARTHY A. J. (1998), **Bleach boosting effect of cellulase-free xylanase of *Streptomyces thermoviolaceus* and its comparison with two commercial enzyme preparations on birchwood kraft pulp.** *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 594-598.

KAMTELINEN, A. SUNDQUIST, J., LINKO, M. VIIKARI, L. **The Role of Reprecipitated Xylan in the Enzymatic Bleaching of Kraft Pulping, Sixth international Symposium on Wood and Pulping Chemistry. Parkville Victoria, Australia, 1991.**

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. (2008) **Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives.** *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 377–391.

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

MOREIRA, L. R. S.; MILANEZI, N. vG.; FILHO, E. X. F. (2011) **Enzymology of Plant Cell Wall Breakdown: An Update.** In: BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. (Eds) *Routes to celulosic ethanol.* New York. Springer. 7396.

NAVARRO, R. M. S. **Estudo dos diferentes tipos de processos de branqueamento de celulose objetivando a comparação entre seus métodos e a geração do potencial de poluentes em seus respectivos efluentes.** Campinas 2004

NIKITIN, N. I. **The Chemistry of Cellulose and Wood.** Jerusalem, Israel Program, 1966.

PENDEY, A. SOCCOL, C. R., NIGAM, P. e SOCCOL, V. T. 2000. **Production of *Flammulina velutipes* on Coffee Husk and Coffee Spent-ground Biores.** *Technol.* 74:69.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. (2005) **Xylanases from fungi: properties and industrial applications.** *Appl Microbiol Biotechnol* 67, 577–591.

R.C. KUHAD, R. C. & SINGH, A. 1993. **Lignocellulosic biotechnology: Current and future prospects.** *Crit. Rev. Biotechnol.* 13:151-172.

SILVA, R., LAGO, E. S., MERHEB, C.W. MACCHIONE, M. M., PARK, Y. K. e GOMES, E. 2005. **Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe Brazilian** *J. Microbiology*, 36: 235.

SJÖTRÖM, E. **Wood Chemistry: Fundamentals and Applications.** "San diego 1993

SUBRAMANIYAN S., PREMA P. 2000. **Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms.** *FEMS Microbiol Lett.* 183: 1-20.

TENKANEN M., VIIKARI L., BUCHERT J. 1997. **Use of acid tolerant xylanase for bleaching of kraft pulps.** *Biotechnol. Tech.* 11(12):935-38.

VIIKARI, L., KANTELINEN, A., BUCHERT, J., PULS, J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994.

WHITE, C.A. and KENNEDY, J.F. (1981): **Manual and Automated Spectrophotometric Techniques for the Detection and Assay of Carbohydrates and Related Molecules.**

In: *Techniques in the Life Sciences: Biochemistry*, Vol. B3, *Techniques in Carbohydrate Metabolism*, H.L. Kornberg, J.C. Metcalfe, D.H. Northcote, C.I. Pogson, and K.F. Tipton, Eds., Ireland: Elsevier North-Holland Scientific Publishers Ltd., B312, pp. 1-65.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. **Inhibition of cellulases by phenols** *Enz and Microbial Technol.* 2011 48, 54-60.