

APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS
PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR
ESPÉCIES DE *Bacillus* sp.

SILVANIA ALVES LADEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO-UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
MAIO 2013

APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS
PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR
ESPÉCIES DE *Bacillus* sp.

SILVANIA ALVES LADEIRA

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientadora: Profa. Meire Leis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
MAIO 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 078/2013

Ladeira, Silvania Alves

Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulares e xilanases por espécies de *Bacillus* sp. / Silvania Alves Ladeira. – 2013.

139f. : il.

Orientador: Meire Lelis Leal Martins.

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Bibliografia: f. 123 – 139.

1. *Bacillus* 2. Xilanase 3. Celulase 4. Lignocelulose 5. Resíduos I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 660.62

APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS
PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR
ESPÉCIES DE *Bacillus* sp.

SILVANIA ALVES LADEIRA

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal.

Aprovada em 21 de Maio de 2013.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Raquel Vieira de Carvalho (Doutora, Produção Vegetal) - UFES

Prof^a. Luciana R. C. O. Mansur (Doutora, Produção Vegetal) - UNESA

Silvia Menezes de Faria Pereira (Doutora, Engenharia e Ciências dos Materiais) -
UENF

Prof^a. Meire Lelis Leal Martins (Ph.D. Microbiologia) - UENF
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por mostrar-me o caminho certo e colocar pessoas maravilhosas na minha vida;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pela oportunidade de realização do curso;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo;

À Professora Meire Lelis Leal Martins pela orientação, profissionalismo, conduta, apoio, confiança e amizade;

Aos pesquisadores Luis Manoel Gonçalves e Susana Alves (LNEG), pela orientação no período de estágio no exterior e depois dele, pela enorme contribuição na minha formação e por toda confiança e carinho que em mim depositaram;

Aos demais pesquisadores do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG), que tão bem me acolheram;

Ao pesquisador Carlos Wanderley Piller, por sua contribuição neste trabalho;

Aos professores integrantes da banca examinadora, Raquel Vieira de Carvalho, Luciana Coutinho e Sílvia Menezes de Faria Pereira por terem aceitado contribuir com este trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia de Alimentos: João, Andréia, Natiele, Erika, Priscila e Vanessa, pela colaboração, troca de experiência e amizade;

Ao meu marido Francisco, pelo carinho, incentivo, e por ter conseguido aturar-me nestes últimos meses;

A todos os funcionários do LTA, pela presteza;

Aos amigos de longe, mas sempre muito presentes em minha vida: Rosane, Claudiane, Míriam, Tatiana, Elaine, Rosângela e Júlio;

Aos meus pais, irmãos e cunhado pelo imenso incentivo, respeito e amor sempre demonstrado. Agradeço por acreditarem em mim;

Aos meus lindos sobrinhos, os quais amo muito, pelo amor incondicional;

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| RESUMO | xvi |
| ABSTRACT | xix |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 4 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 4 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 4 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA..... | 6 |
| 3.1. Características estruturais de biomassa lignocelulósica | 6 |
| 3.1.1. Celulose..... | 10 |
| 3.1.2. Hemicelulose | 13 |
| 3.1.3. Lignina | 16 |
| 3.2. Degradação de biomassa lignocelulósica por enzimas | 17 |
| 3.2.1. Degradação de celulose | 17 |
| 3.2.2. Degradação de Hemiceluloses | 20 |
| 3.2.3. Biodegradação de Resíduos Agroindustriais | 22 |
| 3.3. Aplicações industriais das lignocelulases..... | 24 |
| 3.4. Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos | 26 |
| 4. TRABALHOS | 29 |
| 4.1. OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA- DE-AÇÚCAR COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO | 29 |
| RESUMO | 29 |

| | |
|--|----|
| ABSTRACT..... | 30 |
| INTRODUÇÃO..... | 30 |
| MATERIAIS E MÉTODOS..... | 33 |
| Biomassa lignocelulósica..... | 33 |
| Pré-tratamento alcalino com KOH..... | 34 |
| Metodologia do planejamento experimental..... | 34 |
| Determinação dos polissacarídeos e lignina no bagaço tratado..... | 35 |
| Microscopia eletrônica de varredura..... | 36 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 36 |
| Níveis de polissacarídeos e lignina no bagaço de cana tratado..... | 36 |
| Validação dos dados experimentais..... | 43 |
| Microscopia Eletrônica de varredura..... | 44 |
| CONCLUSÃO..... | 45 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 46 |
| 4.2. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE CELULASES EM CULTURAS SUBMERSAS DE <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 CONTENDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO..... | 49 |
| RESUMO..... | 49 |
| ABSTRACT..... | 50 |
| INTRODUÇÃO..... | 50 |
| MATERIAIS E MÉTODOS..... | 53 |
| Micro-organismo..... | 53 |
| Substrato..... | 53 |
| Meio de cultura..... | 54 |
| Ativação da linhagem e preparo do inóculo..... | 54 |
| Condições da fermentação..... | 55 |
| Obtenção das enzimas..... | 55 |
| Purificação parcial das enzimas..... | 55 |
| Determinação da produção de carboximetilcelulase e avicelase por meio de ensaio enzimático..... | 55 |
| Determinação da proteína..... | 56 |
| Efeito do pH na atividade e estabilidade das enzimas..... | 56 |
| Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas..... | 57 |

| | |
|---|----|
| Efeito de íons na estabilidade das enzimas | 57 |
| Aplicação do extrato enzimático na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar | 58 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 58 |
| Composição do bagaço de cana-de-açúcar | 58 |
| Perfil do crescimento e da atividade das enzimas avicelase e carboximetilcelulase (CMCase) no meio de cultura contendo bagaço de cana e suplementado com água de maceração de milho | 59 |
| Produção das enzimas avicelase e CMCase no bagaço de cana tratado | 62 |
| Purificação parcial das celulases | 64 |
| Efeito do pH na atividade e estabilidade das celulases | 65 |
| Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas | 67 |
| Efeito de íons na estabilidade das celulases | 70 |
| Aplicação do extrato enzimático na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar | 72 |
| CONCLUSÃO | 74 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 75 |
| 4.3. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE XILANASES DE <i>BACILLUS</i> SP. SMIA-2 EM CULTURAS SUBMERSAS CONTENDO BAGAÇO DE CANA E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO | 81 |
| RESUMO | 81 |
| ABSTRACT | 81 |
| INTRODUÇÃO | 82 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 84 |
| Micro-organismo | 84 |
| Meio de cultura e condições de fermentação | 84 |
| Bagaço de cana-de-açúcar | 85 |
| Purificação parcial da enzima | 85 |
| Determinação da produção de endo-xilanase por meio de ensaio enzimático | 85 |
| Determinação da proteína | 86 |
| Efeito do pH na atividade e estabilidade da xilanase | 86 |
| Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da xilanase | 86 |

| | |
|--|-----|
| Efeito de íons na estabilidade da xilanase | 87 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 87 |
| Perfil do crescimento do micro-organismo e atividade da xilanase..... | 87 |
| Purificação parcial da enzima | 89 |
| Efeito do pH na atividade e estabilidade da xilanase | 90 |
| Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da xilanase | 92 |
| Efeito de íons na estabilidade da xilanase | 94 |
| CONCLUSÃO | 95 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 95 |
| 4.4. PRODUÇÃO DE XILANASE POR <i>Anoxybacillus</i> sp. 3M EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA USANDO SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS | 101 |
| RESUMO | 101 |
| ABSTRACT | 102 |
| INTRODUÇÃO..... | 102 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 104 |
| Micro-organismo | 105 |
| Meio de cultura e condições de fermentação..... | 105 |
| Matérias-primas | 106 |
| Determinação da produção de xilanase por meio de ensaio enzimático..... | 107 |
| Efeito do pH e da temperatura na atividade da xilanase..... | 107 |
| Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da xilanase | 107 |
| Detecção de atividade de xilanase após PAGE..... | 107 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 108 |
| Perfil do crescimento do micro-organismo e atividade da xilanase..... | 108 |
| Efeito do pH na atividade e estabilidade da xilanase | 111 |
| Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da xilanase | 112 |
| Detecção de atividade de xilanase por eletroforese..... | 114 |
| CONCLUSÃO | 115 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 116 |
| 5. CONCLUSÃO E CONCLUSÕES | 120 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 123 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 6 |
| Tabela 1. Composição química de biomassas lignocelulósicas (Fonte: Santos et al., 2012)..... | 8 |
| Tabela 2. Diferenças entre celulose e hemicelulose (Fonte: Bon et al.,2008)..... | 15 |
| 4. TRABALHOS..... | 29 |
| 4.1. OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO | 29 |
| Tabela 1. Planejamento experimental para deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar..... | 35 |
| Tabela 2. Caracterização química do bagaço de cana submetido a diferentes tratamentos de acordo com planejamento estatístico..... | 37 |
| Tabela 3 - Parâmetros dos modelos polinomiais que representam as respostas estudadas..... | 39 |
| 4.2. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE CELULASES EM CULTURAS SUBMERSAS DE <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 CONTENDO | |

| | |
|---|-----------|
| BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO | 49 |
| Tabela 1. Teores de Celulose, Hemicelulose e Lignina no bagaço de cana “in natura” e tratado com álcali e com álcali e ácido | 59 |
| Tabela 2. Purificação parcial de avicelase de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 | 64 |
| Tabela 3. Purificação parcial de CMCase de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 | 65 |
| Tabela 4. Efeito de diferentes íons na atividade da avicelase | 71 |
| Tabela 5. Efeito de diferentes íons na atividade da CMCase | 72 |
| | |
| 4.3. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE XILANASES DE BACILLUS SP. SMIA-2 EM CULTURAS SUBMERSAS CONTENDO BAGAÇO DE CANA E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO..... | 81 |
| Tabela 1. Purificação parcial de xilanase de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 | 90 |
| Tabela 2. Efeito da adição de íons na atividade da xilanase secretada por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2..... | 94 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----------|
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 6 |
| Figura 1. Modelo da parede celular elucidando o complexo lignocelulolítico (Fonte: Sticklen, 2008)..... | 7 |
| Figura 2. Série histórica de geração de resíduos lignocelulósicos no Brasil (Fonte: Castro e Pereira Jr, 2010)..... | 9 |
| Figura 3. Estrutura da celobiose e da ligação β -glicosídica na celulose (Fonte: Sandgren et al., 2005)..... | 11 |
| Figura 4. Estrutura cristalina da celulose. Representação das ligações de hidrogênio entre cadeias (inter) e entre resíduos de glicose da mesma cadeia (intra) (Fonte: Radford et al. 1996)..... | 12 |
| Figura 5. Representação das regiões amorfa e cristalina da fibra de celulose (Fonte: Siqueira, 2006)..... | 13 |
| Figura 6. Segmento de um polímero de lignina (Fonte: Menezes, 2007)..... | 17 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 7. Representação esquemática da hidrólise de celulose pelo sistema celulolítico. O esquema mostra a região de ação de cada uma das celulasas (Fonte: Lynd et al., 2002)..... | 19 |
| Figura 8. Mecanismos de ação das hemicelulasas (Fonte: Collins et al.,2005)..... | 21 |
| 4. TRABALHOS..... | 29 |
| 4.1. OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO | 29 |
| Figura 1. Gráfico de superfície de resposta que mostra o efeito da concentração de KOH e tempo de autoclavagem na concentração de celulose do bagaço tratado..... | 41 |
| Figura 2. Gráfico de superfície de resposta que mostra o efeito da concentração de KOH e tempo de autoclavagem na concentração de polissacarídeos totais do bagaço tratado..... | 41 |
| Figura 3. Gráfico de superfície de resposta que mostra o efeito da concentração de KOH e tempo de autoclavagem na concentração de hemicelulose do bagaço tratado..... | 42 |
| Figura 4. Gráfico de superfície de resposta que mostra o efeito da concentração de KOH e tempo de autoclavagem na concentração de lignina do bagaço tratado..... | 42 |
| Figura 5. Eletromicrografias eletrônicas de superfície da amostra de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> (a e b) e tratado com solução de KOH 10% por 35 minutos (c e d)..... | 45 |
| 4.2. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE CELULASES EM CULTURAS SUBMERSAS DE <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 CONTENDO | |

BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO49

Figura 1. Crescimento (*), pH(■) e atividade da Avicelase (○) e Carboximetilcelulase (Δ), secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2, quando cultivado em meio líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (5,0 g.L⁻¹) e água de maceração de milho (5,0 g.L⁻¹) por 264 horas a 50 °C.60

Figura 2. Atividade enzimática da avicelase e CMCase em meio de cultura contendo o bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento (1), tratado com álcali (2) e tratado com álcali e depois com ácido (3). * Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 95% de probabilidade pelo teste de tukey.....63

Figura 3. pH ótimo (A) e estabilidade ao pH (B) da avicelase em extrato bruto (■), extrato precipitado (★) e extrato dialisado (□) secretada pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (5 g.L⁻¹) e água de maceração de milho (5 g.L⁻¹). (100% de atividade = 0,996 U.mg ptn⁻¹- bruto; 1,553 U.mg ptn⁻¹- precipitado e 3,994 U.mg ptn⁻¹- dialisado)66

Figura 4. pH ótimo (A) e estabilidade ao pH (B) da CMCCase em extrato bruto (■), extrato precipitado (★) e extrato dialisado (□) secretada pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (5 g.L⁻¹) e água de maceração de milho (5 g.L⁻¹). (100% de atividade = 0,315 U.mg ptn⁻¹- bruto; 0,501 U.mg ptn⁻¹- precipitado e 1,137 U.mg ptn⁻¹- dialisado).67

Figura 5. Temperatura ótima (A) e estabilidade térmica (B) da avicelase em extrato bruto (■), extrato precipitado (★) e extrato dialisado (□), secretada pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (5 g.L⁻¹) e água de maceração de milho (5 g.L⁻¹), durante 3 horas a pH 7,0. (100% de atividade = 0,790 U.mg ptn⁻¹- bruto; 1,748 U.mg ptn⁻¹- precipitado e 4,705 U.mg ptn⁻¹- dialisado).68

Figura 6. Temperatura ótima (A) e estabilidade térmica (B) da CMCase em extrato bruto (■), extrato precipitado (★) e extrato dialisado (□), secretado pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (5 g.L⁻¹) e água de maceração de milho (5 g.L⁻¹). (100% de atividade = 0,304 U.mg ptn⁻¹- bruto; 0,521 U.mg ptn⁻¹- precipitado e 1,3 U.mg ptn⁻¹- dialisado).69

Figura 7. Hidrólise enzimática em bagaço de cana-de-açúcar, sendo: 1 (controle): Bagaço + água destilada estéril; 2: Bagaço + extrato enzimático estéril; 3: Bagaço + extrato enzimático estéril+ 1mM de Co⁺².73

4.3. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE XILANASES DE BACILLUS SP. SMIA-2 EM CULTURAS SUBMERSAS CONTENDO BAGAÇO DE CANA E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO.....81

Figura 1. Crescimento (★), pH (■) e xilanase (○) secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2, quando cultivada em meio líquido contendo bagaço de cana e água de maceração de milho por 264 horas a 50 °C.....89

Figura 2. pH ótimo (A) e estabilidade ao pH (B) da xilanase em extrato bruto (■), extrato precipitado (★) e extrato dialisado (□) secretada pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (5 g.L⁻¹) e água de maceração de milho (5 g.L⁻¹). (100% de atividade = 0,611 U.mg ptn⁻¹- bruto; 1,304 U.mg ptn⁻¹- precipitado e 3,01 U.mg ptn⁻¹- dialisado).91

Figura 3. Temperatura ótima (A) e estabilidade térmica (B) da xilanase em extrato bruto (■), extrato precipitado (★) e extrato dialisado (□), secretada pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (5 g.L⁻¹) e água de maceração de milho (5 g.L⁻¹), a pH 7,0. (100% de atividade = 0,611 U.mg ptn⁻¹- bruto; 1,304 U.mg ptn⁻¹- precipitado e 3,01 U.mg ptn⁻¹- dialisado).93

4.4. PRODUÇÃO DE XILANASE POR *Anoxybacillus* sp. 3M EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA USANDO SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS101

Figura 1. Crescimento (▲) e atividade da xilanase (■), secretada por *Anoxybacillus* sp. 3M, quando cultivada em meio líquido contendo BSG (10,0 g.L⁻¹) durante 168 horas a 50 ° C.....109

Figura 2. Atividade do extrato enzimático de *Anoxybacillus* sp. 3M cultivados durante 144 horas a 50 °C em meio de cultura contendo diferentes substratos.110

Figura 3. Atividade de extrato enzimático de *Anoxybacillus* sp. 3M cultivado durante 144 horas a 50 °C em meio de cultura contendo concentrações diferentes de dreche cervejeiro.111

Figura 4. pH ótimo (□) e estabilidade (▲) de xilanase secretada pelo *Anoxybacillus* sp.3M cultivado em meio líquido contendo dreche (10 g.L⁻¹) durante 96 horas a 60 ° C. (100% de atividade = 0,920 U. ml⁻¹).112

Figura 5. Temperatura ótima (▲) e estabilidade térmica (□) de xilanase secretada por *Anoxybacillus* sp. 3M, crescido em meio de cultura líquido contendo dreche (10 g.L⁻¹) durante 96 horas (100% de atividade = 1,23 U.ml⁻¹)......113

Figura 6. Estabilidade a 60 ° C da xilanase secretada por *Anoxybacillus* sp. 3M, crescido em meio de cultura líquido contendo dreche (10 g.L⁻¹) durante 28 dias (100% de atividade = 1,23 U.ml⁻¹)......114

Figura 7. Análise zimograma de atividade de xilanase no sobrenadante da cultura de *Anoxybacillus* sp. 3M crescida em: banda 1- Bagaço de Cana-de-açúcar; banda 2- Dreche cervejeiro, banda 3- farelo de trigo.

As alíquotas carregadas no gel continham 21 mU de atividade da
xilanase.....115

RESUMO

LADEIRA, Silvania Alves; DSc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Maio, 2013. APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR ESPÉCIES DE *Bacillus* sp. Orientadora: Prof^a: Meire Leis Leal Martins.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense (Campos dos Goytacazes-RJ-Brasil) em parceria com o Laboratório Nacional de Energia e Geologia (Lisboa-Portugal), com o objetivo de estudar a produção das enzimas celulases e xilanases por duas espécies de micro-organismos termofílicos do gênero *Bacillus* sp. , utilizando-se resíduos agroindustriais como matéria-prima, e ainda estudar algumas características bioquímicas destas enzimas. Primeiramente foram estudadas algumas condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com solução de hidróxido de potássio com o intuito de deslignificar o material usando a abordagem estatística. As condições estudadas foram concentração do hidróxido de potássio e o tempo de autoclavagem do bagaço de cana-de-açúcar e seus efeitos sinérgicos. Para isso, foi realizado um planejamento experimental para duas variáveis de acordo com a distribuição uniforme de Doehlert utilizando variáveis de resposta como concentração de celulose, hemicelulose, polissacarídeos totais e lignina. De acordo com a condição de pré-tratamento com KOH, foi possível observar variações nos teores dos componentes (celulose, hemicelulose, polissacarídeos totais e lignina) nos bagaços de cana pré-tratados. Dentre os fatores que foram avaliados no pré-tratamento, a variável que mais

influenciou no teor de celulose, polissacarídeos e lignina foi a concentração do álcali. Mantendo-se um tempo de extração constante de 35 minutos, as concentrações de KOH entre 5 e 10% produziram as mais elevadas taxas de extração da lignina. As eletromicrografias de varredura do bagaço de cana pré-tratado com solução de KOH 10% por 35 minutos mostraram a alteração da estrutura do material, com o aparecimento de estruturas desfeitas, que podem ser atribuídas ao tratamento aplicado no bagaço de cana. Posteriormente, a cepa termofílica brasileira de *Bacillus* sp. SMIA-2 foi estudada quanto a produção de celulasas e xilanases, e viu-se que esta cepa produziu bons níveis de avicelase, CMCase e xilanase em fermentação submersa, utilizando bagaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho como substratos de baixo custo. A produção das enzimas começou na fase de crescimento exponencial, atingindo um máximo a 72 h para a xilanase, 120 h para a avicelase e a 168 h no caso da CMCase. Os estudos de caracterização indicaram que os valores de pH ótimo foram de 8,5; 7,5 e 7,5 para a avicelase em extrato bruto, precipitada e dialisada, respectivamente; para a CMCase os valores de pH ótimo foram de 9,0, 8,0 e 8,0 para a CMCase em extrato bruto, precipitado e dialisado, respectivamente; e para a xilanase foram de 7,5; 7,0 e 7,0 para a enzima em extrato bruto, precipitada e dialisada, respectivamente. A temperatura para uma atividade ótima das três enzimas foi de 70°C nos três estados. Os resultados mostraram também que as enzimas permaneceram 100% estáveis a 60°C durante 3 horas e que foram estimuladas por Mn^{2+} e Co^{2+} . O estudo da produção da enzima xilanase pela cepa portuguesa *Anoxybacillus* sp. 3M mostrou que a estirpe foi capaz de produzir altos níveis de xilanase extracelular em fermentação submersa utilizando subprodutos agroindustriais (Dreche cervejeiro, farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho e tupinambo) como substrato. Embora a melhor produção de xilanase ($1,35 U.ml^{-1}$) tenha sido obtida em meio de crescimento contendo dreche cervejeiro 1% (m/v), a atividade xilanolítica também foi observada quando o farelo de trigo ($1,32U.ml^{-1}$), bagaço de cana-de-açúcar ($0,80 U.ml^{-1}$), tupinambo ($0,32 U.ml^{-1}$), sabugo de milho ($0,30 U.ml^{-1}$) e xilana industrial ($0,21U.ml^{-1}$) foram utilizados como substratos. A xilanase de *Bacillus* sp. 3M foi caracterizada em termos de perfil de temperatura e pH. A melhor atividade da enzima foi observada na temperatura de 60 °C e no pH de 5,3. A enzima manteve 100% da sua atividade original depois de 96 h a 60°C e pH 7,0. Análise de zimograma do

sobrenadante das culturas revelou a presença de uma enzima de peso molecular 420 KDa em todos os experimentos. As enzimas extracelulares secretadas podem ser consideradas como biocatalisadores termo-tolerantes, apresentando, assim, propriedades que atendem aquelas frequentemente necessárias em ambiente industrial.

ABSTRACT

LADEIRA, Sylvania Alves; DSc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. May, 2013. UTILIZATION OF AGROINDUSTRIAL WASTE FOR THE PRODUCTION OF CELLULASES AND XYLANASES FOR SPECIES OF *Bacillus* sp. Orientadora: Prof^a: Meire Leis Leal Martins.

The present work was carried out at the Laboratório de Tecnologia de Alimentos of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Campos dos Goytacazes-Brazil) in partnership with the Laboratório Nacional de Energia e Geologia (Lisbon-Portugal), in order to study the production of xylanase and cellulase enzymes by two species of thermophilic microorganisms of the gender *Bacillus* sp. , using agroindustrial waste as a raw material, and further study some biochemical characteristics of these enzymes. First some conditions were studied to pre-treatment of sugarcane bagasse with a solution of potassium hydroxide in order to delignify the material using the statistical approach. The conditions studied were the concentration of potassium hydroxide and esterilization time sugarcane bagasse and their synergistic effects. For this, we conducted an experimental design for two variables according to the uniform distribution of Doehlert using response as the concentration of cellulose, hemicellulose, lignin and total polysaccharides. Under the condition that pre-treatment with KOH, we observed variations in the contents of components (cellulose, hemicellulose, and lignin polissacarídeos total) in the bagasse pretreated. Among the factors that were assessed at pre-treatment, the variable that most influenced the content of cellulose, lignin and polysaccharides was the concentration of alkali. Maintaining a

constant extraction time of 35 minutes, the KOH concentrations between 5 and 10% produced the highest rates of lignin extraction. The scanning electron micrographs of sugar cane bagasse pre-treated with 10% KOH solution for 35 minutes showed a change in the structure of the material, with the appearance of loose and broken structures, which can be attributed to the treatment in sugar cane bagasse. Subsequently, the Brazilian thermophilic strain of *Bacillus sp.* SMIA-2 was studied for the production of cellulases and xylanases, and saw that this strain produced good levels of avicelase, CMCCase and xylanase in submerged fermentation using sugarcane bagasse and corn steep liquor as low cost substrates. The production of enzyme began at exponential growth phase, reaching a maximum at 72 h of xylanase, 120 h to avicelase and 168 h in the case of CMCCase. The characterization studies indicated that the optimum pH values were 8.5, 7.5 and 7.5 for avicelase in crude extract, precipitated and dialyzed, respectively, for CMCCase optimum pH values were 9.0 and 8.0 for CMCCase in crude extract and precipitate / dialysate, respectively, and for the xylanase were 7.5, 7.0 and 7.0 for the enzyme in crude extract, precipitated and dialyzed, respectively. The optimum temperature for activity of the three enzymes was 70 ° C in the three states. The results also showed that the enzyme remained 100% stable at 60 ° C for 3 hours and were stimulated by Mn^{2+} and Co^{2+} . The latter was xylanase enzyme production by the Portuguese strain *Anoxybacillus sp.* 3M. This bacterial strain was able to produce high levels of extracellular xylanase in submerged fermentation using agroindustrial by products (Brewer's spent grain, wheat bran, sugar cane bagasse, corn cob and Jerusalem artichoke) as substrate. Although the best xylanase production (1.35 U.ml^{-1}) was obtained in growth medium containing Brewer's spent grain 1% (w / v), the xylanolytic activity was also observed when wheat bran (1.32 U.ml^{-1}), sugar cane bagasse (0.80 U.ml^{-1}), Jerusalem artichoke (0.32 U.ml^{-1}), corn cob (0.30 U.ml^{-1}) and xylan industrial (0.21 U.ml^{-1}) were used as substrates. The xylanase of *Anoxybacillus sp.* 3M was characterized in terms of pH and temperature profile. The best enzyme activity was observed at a temperature of 60 ° C and pH 5.3. The enzyme retained 100% of its original activity after 96 h at 60 ° C and pH 7.0. Zymogram analysis of culture supernatants revealed the presence of an enzyme of molecular weight 420 kDa. Thus, the secreted extracellular enzymes as biocatalysts may be considered

thermo-tolerant, showing thus that meet those properties often necessary in industrial environments.

1. INTRODUÇÃO

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, sendo compreendidas, majoritariamente, pelos materiais agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas. Dentre essas, os materiais agroindustriais se destacam pelo caráter de resíduo, conferido por sua obtenção após o processamento de matérias-primas que apresentam maior valor agregado (Aguiar e Ferraz, 2011).

O Brasil possui uma vocação natural para biotecnologia, particularmente no setor industrial, considerando sua alta capacidade de geração de resíduos agroindustriais, sendo predominante entre eles o bagaço de cana-de-açúcar. No ano de 2010, o Brasil processou 719,1 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, sendo 625 milhões de toneladas para a produção de açúcar e etanol de primeira geração, e o restante para cachaça e rapadura (doce tradicional do Brasil), produzindo cerca de 200 milhões de toneladas de bagaço de cana (Hofsetz e Silva, 2012). Este bagaço é por vezes utilizado para a geração de eletricidade por combustão ou como ração animal. No entanto, ainda há um grande excedente que, na maioria dos casos, continua a ser armazenado no campo ou em fábricas, e sua degradação pode representar um problema ambiental (Cardona et al., 2010).

As biomassas lignocelulósicas são constituídas por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, que são unidas entre si por ligações

covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos. Essas frações majoritárias são responsáveis por 97-99% de toda massa seca destes materiais (Castro e Pereira Jr, 2010).

Os polímeros de carboidratos (celulose e hemicelulose) que compoem 75% do material lignocelulósico são potenciais fontes para produção de glicose, biocombustíveis, biofertilizantes entre outros produtos de alto valor agregado (Liu et al., 2006). Esta produção ocorre pela hidrólise deste material que pode ser realizada por meio de processos químicos, geralmente mais poluentes e de maior custo de realização, ou por hidrólise enzimática.

A biodegradação ou bioconversão da celulose e da hemicelulose em açúcares monoméricos é conduzida por ações conjuntas de enzimas, sendo as principais delas as celulasas e xilanases (Liu et al., 2006).

Celulasas são enzimas capazes de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em produtos de maior valor agregado (Castro e Pereira Jr., 2010).

A hemicelulose é composta por polímeros de xilose (xilanas), e de arabinose (arabanas) com pequena quantidade de outras pentoses ou hexoses, que são encontradas em plantas superiores. As hemicelulasas facilitam a hidrólise da celulose, expondo suas fibras e tornando-as mais acessíveis. A maioria dos estudos sobre hemicelulasas tem se centrado até agora na hidrólise de xilana. As hemicelulasas de micro-organismos e algumas plantas superiores hidrolisam as xilanas, arabanas e arabinoxilanas a xilose, arabinose e oligossacarídeos de baixa massa molecular (Peixoto, 2006).

A produção de celulasas em escala industrial começou em meados da década de 80, visando sua aplicação como um aditivo para ração animal. Mais tarde essas enzimas começaram a ser utilizadas como insumo para a indústria de alimentos, onde foi utilizada na indústria da panificação com o objetivo de melhorar propriedades sensoriais de massas, no processamento de bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos e a manutenção de uma reologia estável do produto final. Posteriormente, as enzimas celulolíticas começaram a ser utilizadas em larga escala na indústria têxtil, nos processos de

biopolimento e bioestonagem; na indústria de polpa e papel e em lavanderias (Castro e Pereira Jr., 2010).

Já na década de 90, as celulases e as hemicelulases, representavam mais de 20% do mercado mundial de enzimas. No que tange ao cenário nacional, em 2008, apenas considerando-se importações e exportações brasileiras, as celulases movimentaram um montante de 1,35 milhões de dólares americanos (Castro e Pereira Jr., 2010). Entretanto, o uso destas enzimas tem como entrave o custo de produção, que pode ser superado utilizando organismos geneticamente modificados (bactérias, leveduras e plantas) na produção das enzimas e a necessidade de produzir enzimas mais eficientes (Sun e Cheng, 2002). A expectativa é de que o mercado de celulases seja superior a 400 milhões de dólares no ano de 2014 com a possível utilização destas enzimas na hidrólise de palha de milho nos Estados Unidos da América para a produção de etanol de biomassa (Bon et al., 2008).

A procura por novas cepas de micro-organismos produtores de enzimas lignocelulolíticas com melhores características fisiológicas em relação à temperatura, ao pH, à maior variedade de fermentação do substrato, à resistência e adaptabilidade à toxicidade de substratos de baixo custo ainda é necessária, tendo em conta a grande biodiversidade existente (Girio et al., 2010).

Sendo assim, o estudo de novas linhagens de micro-organismos e fontes de carbono alternativas para fermentação, como os resíduos agroindustriais, pode levar a uma produção de enzimas mais eficaz e com menores custos. Dentro deste contexto, este trabalho teve como enfoque principal, estudar a produção das enzimas celulases e xilanases pelos micro-organismos termofílicos *Bacillus* sp. SMIA-2 e *Anoxybacillus* sp. 3M em fermentação submersa utilizando como substrato resíduos agroindustriais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a produção de celulasas e xilanases pelos micro-organismos termofílicos *Anoxybacillus* sp. 3M e *Bacillus* sp. SMIA-2, através de fermentação submersa utilizando como substratos resíduos agroindustriais, bem como a caracterização bioquímica destas enzimas.

2.2. Objetivos Específicos

- Otimizar um processo de pré-tratamento alcalino para deslignificação de bagaço de cana-de-açúcar;
- Avaliar o perfil do crescimento e da atividade das celulasas e xilanases de *Bacillus* sp. SMIA-2 utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar;
- Avaliar o crescimento microbiano e a atividade das celulasas e xilanases secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 utilizando o bagaço de cana submetido a diferentes tratamentos;
- Fazer a caracterização bioquímica das enzimas produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 em seu estado bruto e parcialmente purificadas;
- Avaliar a eficácia das enzimas produzidas em hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar.

- Avaliar o crescimento microbiano e a atividade da xilanase secretada por *Anoxybacillus* sp. 3M utilizando resíduos agroindustriais e xilana comercial como substrato para a fermentação;
- Avaliar o perfil do crescimento e da atividade de xilanase de *Anoxybacillus* sp. 3M utilizando dreche cervejeira como substrato para fermentação;
- Fazer a caracterização bioquímica da xilanase produzida por *Anoxybacillus* sp. 3M.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Características estruturais de biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica constitui a maior fonte natural de carboidratos do mundo, representa mais de 90% do peso seco de uma célula vegetal e é constituída por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, que estão unidas fortemente entre si por forças não covalentes e ligações covalentes (Bon et al.,2008).

As paredes das células das plantas são compostas por diferentes camadas, que diferem umas das outras quanto à estrutura e à composição química. Internamente, as fibrilas da fração celulósica encontram-se dispostas como espirais, de forma a conferir força e flexibilidade ao material. Esta fração encontra-se envolvida pela lignina, polímero aromático heterogêneo formado por ligações éter biologicamente estáveis, cuja função é aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos. A terceira e última fração principal, a hemicelulose, atua como um elo químico entre a celulose e a lignina, como mostra a Figura 1. Estas características resultam em materiais flexíveis, porém altamente resistentes a espécies químicas (Castro e Pereira Jr, 2010).

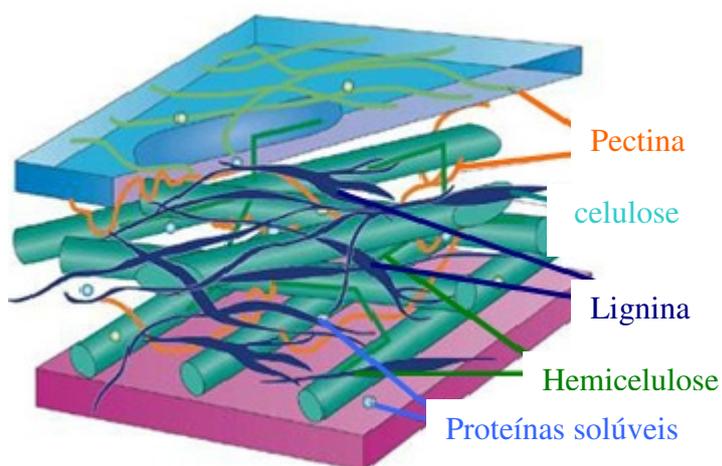


Figura 1. Modelo da parede celular elucidando o complexo lignocelulolítico (Fonte: Sticklen, 2008).

A composição química da biomassa lignocelulósica, geralmente contém 35-50% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas. Esta composição varia em função do tipo de biomassa, conforme mostrado na Tabela 1. Mesmo presente em quantidades menores em relação à fração celulósica, a lignina confere limitação suficiente para retardar, ou mesmo impedir completamente, a atuação microbiana sobre o material (Santos et al.,2012).

Tabela 1. Composição química de biomassas lignocelulósicas (Fonte: Santos et al., 2012)

| Biomassa Lignocelulósica | % Celulose | % Hemicelulose | % Lignina |
|---------------------------------|-------------------|-----------------------|------------------|
| Palha de cana | 40-44 | 30-32 | 22-25 |
| Bagaço de cana | 32-48 | 19-24 | 23-32 |
| Madeira dura | 43-47 | 25-35 | 16-24 |
| Madeira mole | 40-44 | 25-29 | 25-31 |
| Talo de milho | 35 | 25 | 35 |
| Espiga de milho | 45 | 35 | 15 |
| Algodão | 95 | 2 | 0,3 |
| Palha de trigo | 30 | 50 | 15 |
| Sisal | 73,1 | 14,2 | 11 |
| Palha de arroz | 43,3 | 26,4 | 16,3 |
| Forragem de milho | 38-40 | 28 | 7-21 |
| Fibra de coco | 36-43 | 0,15-0,25 | 41-45 |
| Fibra de bananeira | 60-65 | 6-8 | 5-10 |
| Palha de cevada | 31-45 | 27-38 | 14-19 |

O Brasil possui vocação natural para geração de matérias-primas lignocelulósicas, como pode ser visto na Figura 2, que apresenta séries históricas de geração destes materiais no Brasil, com as massas representadas em base úmida. O bagaço de cana-de-açúcar, dentre as biomassas consideradas, é a predominante, com uma geração em 2007 de 147 milhões de toneladas. Igualmente, é notória a quantidade gerada das demais biomassas lignocelulósicas. No ano de 2007, os materiais apresentados na Figura 2 somaram uma massa gerada no Brasil de 606 milhões de toneladas, das quais cerca de 105 milhões de toneladas correspondem à fração celulósica (Castro e Pereira Jr, 2010).

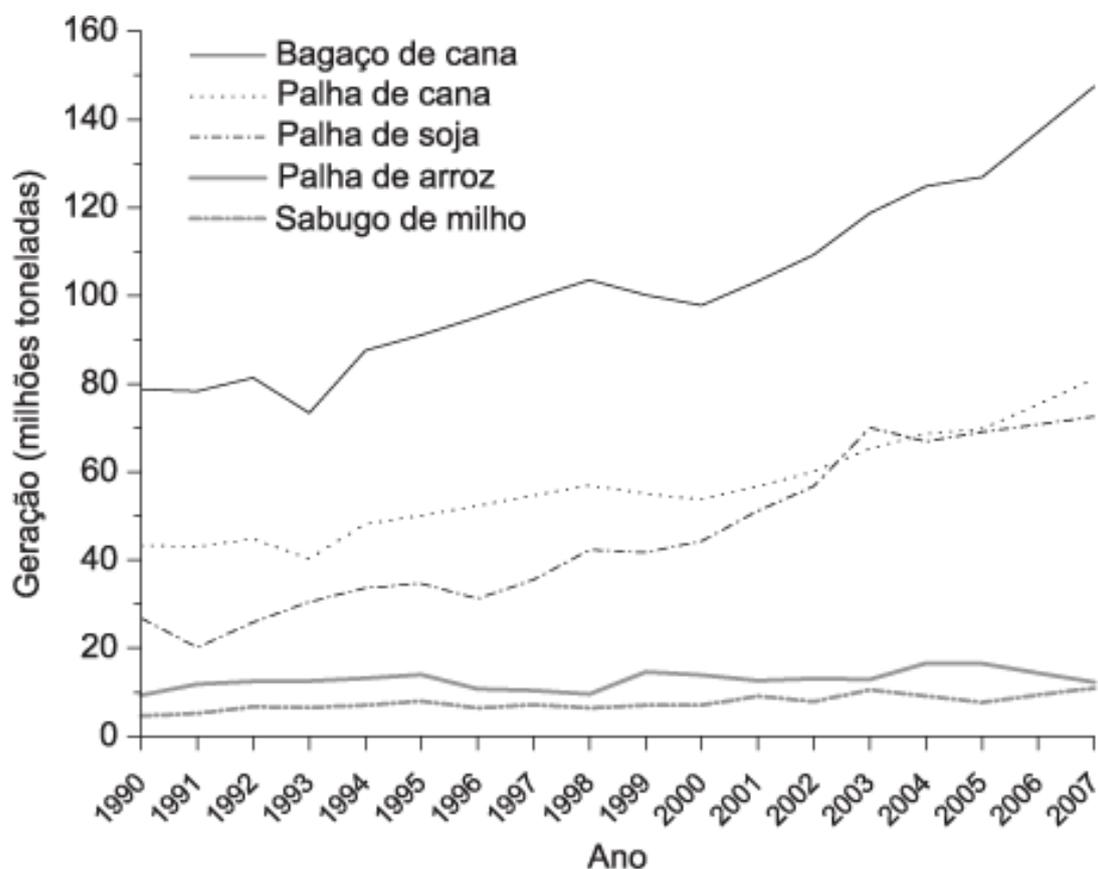


Figura 2. Série histórica de geração de resíduos lignocelulósicos no Brasil (Fonte: Castro e Pereira Jr, 2010).

Além de outros resíduos agroindustriais que não estão apresentados na figura 2, como é o caso do bagaço de malte, mais conhecido como dreche cervejeiro. É um resíduo resultante do processo inicial da fabricação de cervejas, e provém do processo de obtenção do mosto, pela fervura do malte moído e dos adjuntos, que após filtração, resulta em um resíduo muito utilizado na alimentação animal (Lima, 2001). Constituído basicamente pelas cascas da cevada malteada, é o principal subproduto da indústria cervejeira e se encontra disponível o ano todo, em grandes quantidades e baixo custo (Aliyu e Muntari, 2011).

O bagaço de malte é quantitativamente o principal subproduto do processo cervejeiro, gerando de 14 a 20 Kg a cada 100 litros de cerveja produzida (Santos et al., 2005). A grande produção anual de cerveja no Brasil, 12,6 bilhões de litros no ano de 2010 (Sindicerv), demonstra a enorme quantidade deste subproduto gerado. Este subproduto é um material lignocelulósico com uma composição

química média de 30% de hemicelulose, 20% de celulose, 10% de lignina e 20% de proteínas (Aliyu e Muntari, 2011).

Uma grande variedade de fungos e bactérias consegue degradar o material lignocelulósico usando enzimas hidrolíticas e oxidativas (Aguiar e Ferraz, 2011). A celulose e a hemicelulose podem ser hidrolisadas formando açúcares que serão metabolicamente utilizados por micro-organismos na produção de vários produtos como o etanol, butanol, acetona, ácidos orgânicos, glicerol, enzimas, entre outros (Wyman, 2003).

Porém, a complexa estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica, no geral, é resistente à bioconversão. A utilização da biomassa como fonte de carboidratos para obtenção de combustíveis e produtos químicos de alto valor agregado tem sido severamente dificultada pela sua recalcitrância (Sannigrahi et al., 2010).

3.1.1. Celulose

A celulose é um polímero linear formado por unidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas β -1,4, formando cadeias longas e paralelas, insolúveis em água e possui massa molecular que varia entre 50 mil e 2,5 milhões de Dalton, dependendo da sua origem. Esses polímeros de D-glicose, podem ser representados por uma série de anéis piranosídicos rígidos conectados por um átomo de oxigênio, que faz ponte entre dois átomos de carbono. A extremidade da cadeia em que se encontra o resíduo de glicose, cujo carbono anomérico não está livre é chamada de extremidade redutora. Já a outra extremidade é conhecida como não redutora (Sandgren et al., 2005). A junção de duas moléculas de glicose forma o dissacarídeo celobiose, como mostrado na Figura 3.

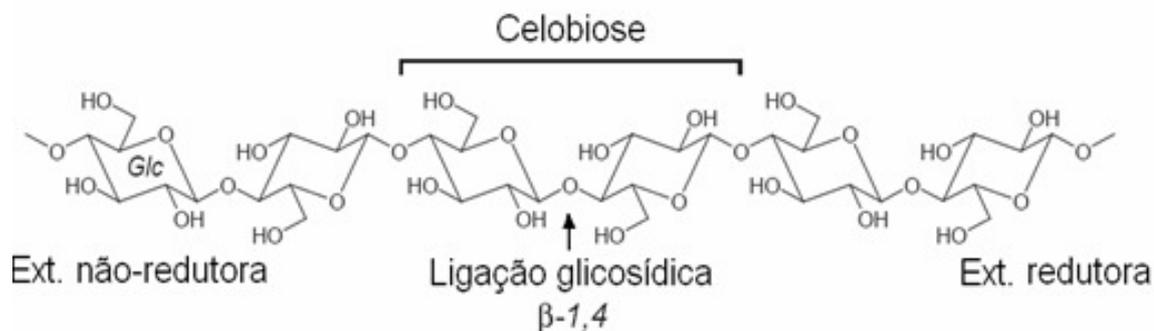


Figura 3. Estrutura da celobiose e da ligação β-glicosídica na celulose (Fonte: Sandgren et al., 2005).

A celulose é o mais abundante componente de biomassa em plantas, encontrada principalmente na parede celular destas, correspondendo a aproximadamente 35-50% do peso da planta. Pode ser encontrada na forma pura, como no algodão, ou mais comumente, associada a lignina e hemicelulose na parede celular (Castro e Pereira Jr., 2010; Aguiar e Ferraz, 2011).

As moléculas de celulose têm forte tendência para formar ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, na qual se estabelecem múltiplas ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas das distintas cadeias justapostas de glicose, fazendo-as impenetráveis à água e, portanto, insolúveis, originando fibras compactas e que constituem a parede celular dos vegetais (Ogeda e Petri, 2010).

Os grupos hidroxilas (OH) são os responsáveis pelo comportamento físico e químico da celulose. Em função de seu posicionamento na unidade glicosídica, são capazes de formar dois tipos de ligações de hidrogênio: ligações de hidrogênio entre os grupos OH de unidades adjacentes da mesma molécula de celulose (intramoleculares) e ligações entre grupos OH de moléculas adjacentes de celulose (intermoleculares), como mostrado na Figura 4 (Radford et al., 1996).

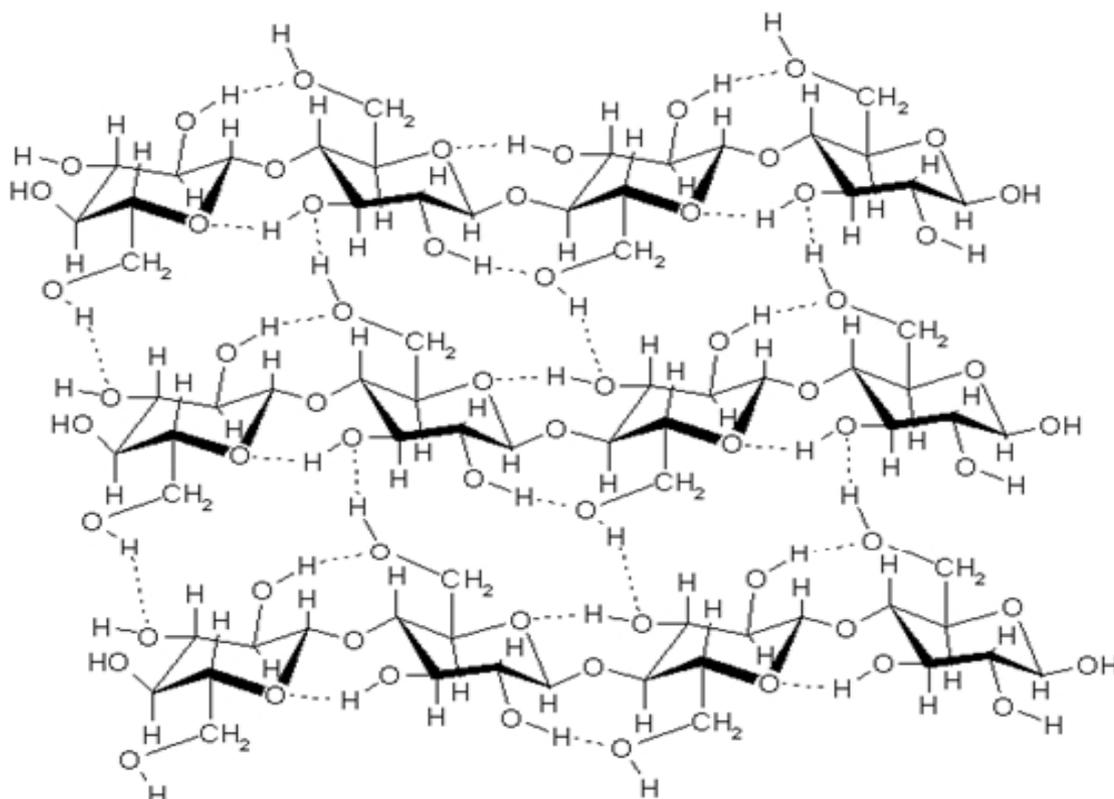


Figura 4. Estrutura cristalina da celulose. Representação das ligações de hidrogênio entre cadeias (inter) e entre resíduos de glicose da mesma cadeia (intra) (Fonte: Radford et al. 1996).

Cada uma das fibrilas que compõe a estrutura da celulose é formada pela agregação de cerca de 250 microfibrilas, sendo que cada uma delas é formada por um pequeno número de feixes de molécula de celulose (fibrilas elementares), que por sua vez é formada por mais de mil unidades de glicose, as quais se interligam por ligações de hidrogênio. Em alguns pontos das fibrilas elementares, as moléculas de celulose estão dispostas de maneira desordenada (regiões amorfas), em outros elas se dispõem ordenadamente, formando as micelas de estrutura cristalina, como mostrado na Figura 5. Entre as fibrilas, microfibrilas e fibrilas elementares, se encontram os outros componentes da parede celular como a hemicelulose e a lignina (Menezes, 2007).

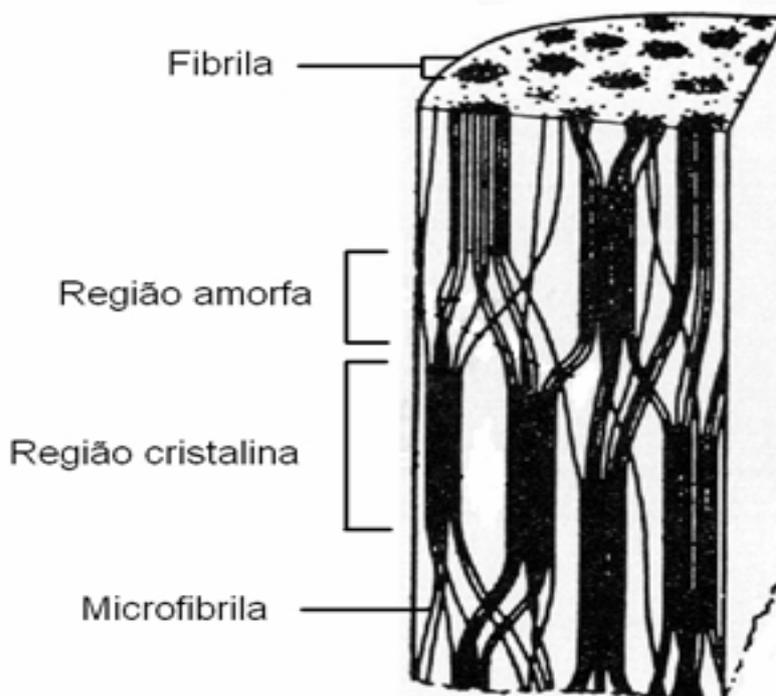


Figura 5. Representação das regiões amorfa e cristalina da fibra de celulose (Fonte: Siqueira, 2006).

A celulose possui polimorfismo, ou seja, dependendo da origem ou das condições de isolamento ou conversão, a molécula pode adquirir uma conformação de cristais reticulados. A resistência da celulose a processos de hidrólise é devida muito mais à sua estrutura cristalina do que à existência de ligações glicosídicas do tipo β -1,4. As ligações de hidrogênio conferem às cadeias de celulose uma estrutura altamente ordenada e rígida. As regiões menos ordenadas são mais sensíveis à hidrólise, formando microcristais (Lynd et al., 2002).

A molécula de celulose é insolúvel em água ou ácidos diluídos. Em soluções de ácidos concentrados, a celulose pode sofrer severa degradação, enquanto que soluções cáusticas causam extensivo crescimento e dissolução da porção de baixa massa molecular, que são as ligninas (Peixoto, 2006).

3.1.2. Hemicelulose

As hemiceluloses compreendem um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados, que se ligam, firmemente entre si e à superfície das microfibrilas de

celulose, cobrindo-as e mantendo ligações cruzadas, via ligações de hidrogênio, em uma rede complexa. Quimicamente, as hemiceluloses são compostas de uma série de heteropolissacarídeos, não-amiláceos e não-celulósicos, formados por vários resíduos de pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-manose, D-glicose e D-galactose) e por seus ácidos urônicos (Chandel et al., 2007; Girio et al., 2010). Os monossacarídeos estão ligados entre si por ligações glicosídicas β -1,4, formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo, a partir do qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares. Sua estrutura de ramificações e cadeias laterais interage facilmente com a celulose dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (Ramos, 2003; Santos et al., 2012). De acordo com os seus monômeros, as hemiceluloses podem ser classificadas como xilanas, mananas, arabinoxilanas, arabinogalactanas e arabinanas (Ogeda e Petri, 2010).

As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas e concentram-se, principalmente, nas camadas primárias e secundárias, onde estão intimamente associadas à celulose e lignina. Em madeiras duras e em uma série de resíduos agroindustriais, o componente hemicelulósico apresenta alto conteúdo de xilanas (Menezes, 2007).

Nos polímeros ou heteropolímeros formados de galactose, manose, xilose, e arabinose, as xiloglicanas (compostas de moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 e ramificações de xilose em ligações α -1,6) e as xilanas (compostas de cadeias de xilose com ligações β -1,4) são os constituintes predominantes nas paredes primárias e secundárias da parede celular, respectivamente, sendo que as xilanas são as formas mais comuns de hemiceluloses (Girio et al., 2010).

A hemicelulose possui certa similaridade com a celulose, porém é constituída de unidades de pentoses (xilanas) ou unidades alternadas de manoses e glicoses ou unidades de galactoses. Além disso, todas as hemiceluloses possuem cadeias laterais constituídas de ácido acético, pentoses, ácidos hexurônicos e deoxihexoses que são responsáveis pela solubilidade da hemicelulose em água e em álcalis (Menezes, 2007).

As cadeias da hemicelulose podem ser constituídas por apenas uma unidade monossacarídica, como é o caso das xilanas, ou por duas ou mais unidades, como no caso das glucoxilanas, xiloglucanas ou arabinoxilanas (Ogeda e

Petri, 2010). A natureza química das hemiceluloses varia, nas plantas, em relação ao tipo de tecido vegetal e à espécie a que pertencem. Em geral, as hemiceluloses participam nas madeiras em 20 a 30% da composição total, enquanto que, nas gramíneas, estes valores podem chegar a 50% (Ebringerová et al, 2005; Fasanella, 2008).

A hemicelulose de natureza heteropolissacarídea, pode ser extraída quase que integralmente do complexo lignocelulósico, por processos que utilizam tratamento térmico na presença de ácido inorgânico como catalisador em pequenas concentrações. Este processo pode ser seguido ou não de rápida descompressão e deste modo desarranjando a estrutura física do material e facilitando a extração de um licor, composto principalmente de xilose com pequeno grau de polimerização, e, portanto, de fácil hidrólise (Betancur e Pereira Jr., 2010).

A tabela 2 resume as principais características da hemicelulose e celulose, componentes de biomassa lignocelulósica. O entendimento destas características é de importância fundamental para a definição das estratégias de aproveitamento dessas biomassas como matérias-primas para a produção de enzimas ou outras substâncias químicas.

Tabela 2. Diferenças entre celulose e hemicelulose (Fonte: Bon et al.,2008)

| Celulose | Hemicelulose |
|--|--|
| Consiste em unidades de glicose ligadas entre si | Consiste em várias unidades de pentoses e hexoses ligadas entre si |
| Alto grau de polimerização (1000 a 15000 monômeros) | Baixo grau de polimerização (50 a 300 monômeros) |
| Forma arranjo fibroso | Não forma arranjo fibroso |
| Apresenta regiões cristalinas e amorfas | Apresenta somente regiões amorfas |
| É degradada lentamente por ácido inorgânico diluído a quente | É degradada rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente |
| É insolúvel em álcalis | É solúvel em álcalis |

3.1.3. Lignina

A lignina é um constituinte da parede celular de todas as plantas vasculares. É uma macromolécula de alto peso molecular e de estrutura irregular constituída de unidades de fenilpropano. A lignina apresenta uma conformação tridimensional e amorfa, mais hidrofóbica que a celulose e a hemicelulose. É um dos biopolímeros mais abundantes na biosfera, constituindo uma parte considerável do carbono fixado por fotossíntese. Devido à estreita associação entre celulose, hemicelulose e lignina, esses compostos não estão uniformemente distribuídos na parede celular das plantas. A parede secundária contém alta quantidade de celulose, enquanto a lamela média possui maior quantidade de lignina. Entretanto, todos estes três compostos podem ser encontrados em todas as camadas da parede celular vegetal, sendo que a lignina representa de 20 a 30% do total dos materiais lignocelulósicos (Azevedo, 2004).

As funções biológicas da lignina são fornecer suporte estrutural à parede secundária de plantas vasculares, tornar a parede celular vegetal hidrofóbica, permitindo assim o desenvolvimento eficiente dos tecidos para transporte de água em plantas vasculares e conferir resistência contra ataques microbianos (Fasanella, 2008).

A lignina representa um dos maiores estoques de carbono da natureza e é, ainda, o maior depósito natural de estruturas químicas aromáticas, constituindo-se em uma fonte potencial de valiosos insumos para a indústria química. Apresenta estrutura não uniforme, altamente complexa, com massa molecular extremamente elevada. A lignina é uma macromolécula tridimensional formada pela união covalente de três tipos de monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. A distribuição e proporção destes monômeros obedecem à origem filogenética de cada vegetal. Estas ligações do tipo éter resistem a vários agentes hidrolíticos e diversos sistemas enzimáticos degradativos. A quantidade relativa de cada monômero difere significativamente, dependendo da origem da lignina (angiospermas ou gimnospermas) (Fukushima e Hatfield, 2003; Ziegler et al., 2004).

Existe uma grande variação na composição monomérica de ligninas de diferentes espécies, órgãos, tecidos e até mesmo de frações da parede celular (Bon et al., 2008; Santos et al., 2012).

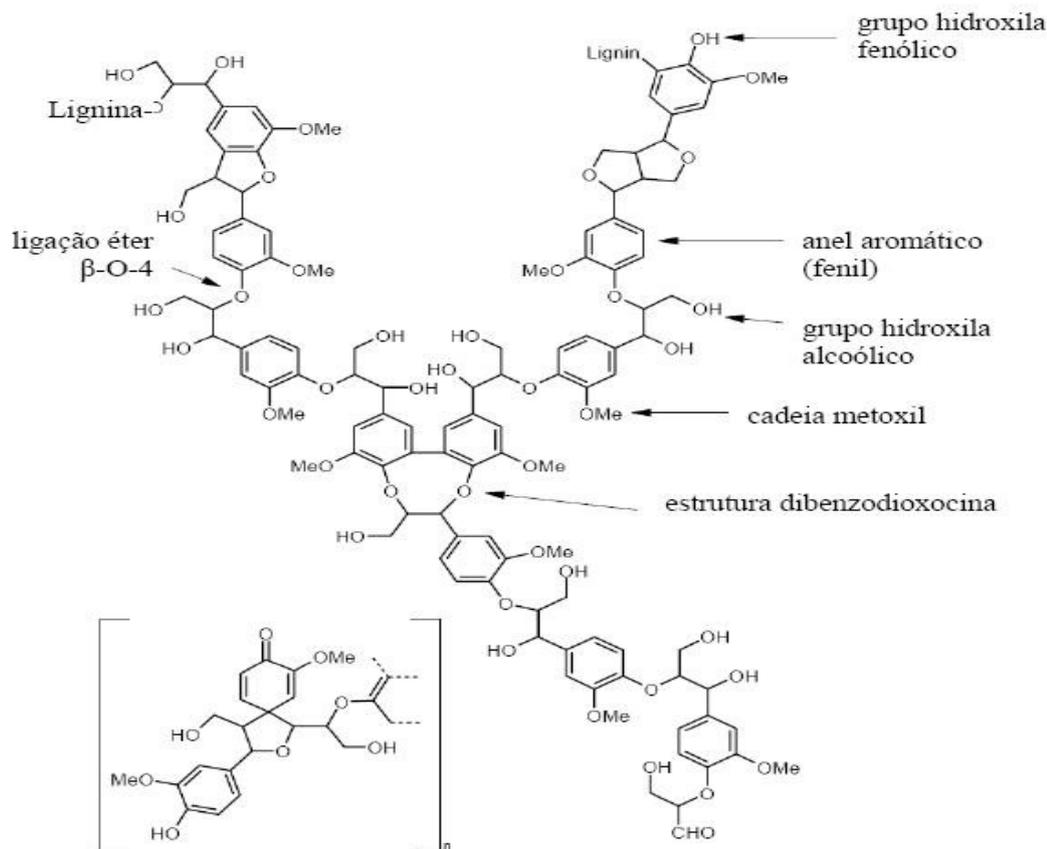


Figura 6. Segmento de um polímero de lignina (Fonte: Menezes, 2007).

3.2. Degradação de biomassa lignocelulósica por enzimas

3.2.1. Degradação de celulose

Celulases são enzimas capazes de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. São biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em produtos com maior valor agregado, dentre eles o etanol (Castro e Pereira Jr., 2010).

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações glicosídicas. Sua classificação, de acordo com o local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases, que atuam na região externa

da celulose; e β -glucosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (Lee e Moon, 2003; Ogeda e Petri, 2010; Santos et al., 2012).

Endoglucanase, classificada com o EC 3.2.1.4, possui como nome sistemático, segundo a IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolase, também conhecida por carboximetilcelulase (CMCase). É a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise. Tal enzima hidrolisa randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, quebra as ligações dentro da cadeia de celulose, liberando glicose, celobiose e celodextrinas, criando extremidades não redutoras para subsequente ação das exoenzimas. A endoglucanase é a enzima celulolítica responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico, devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (Tomme et al., 1995; Lynd et al. 2002; Lee e Moon, 2003; Ogeda e Petri, 2010; Bano et al., 2013).

As exoglucanases, também conhecidas por avicelases, têm maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e principalmente celobiose como produto. O grupo das exoglucanases é constituído por celobio-hidrolase (CBH) e glucano-hidrolase (GH). A glucano-hidrolase (EC 3.2.1.74), cujo nome sistemático é 1,4- β -D-glucana-glucano-hidrolase, é pouco reportada, mas possui estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero (Castro e Pereira Jr., 2010). Já a celobio-hidrolase (EC 3.2.1.91) possui o nome sistemático 1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase e hidrolisa os terminais redutores e não redutores da molécula. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (Lynd et al. 2002; Lee e Moon, 2003; Ogeda e Petri, 2010).

O terceiro e último grande grupo de enzimas do complexo celulolítico engloba a β -glucosidase, ou β -glucosídeo gluco-hidrolase (EC 3.2.1.21), que é seu nome sistemático. A β -glucosidase tem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (Castro e Pereira Jr., 2010). Assim como a celobio-hidrolase, sofre inibição por seu produto de hidrólise (Lynd et al., 2002; Lee e Moon, 2003; Ogeda e Petri, 2010).

Quando atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras. Esse efeito é conhecido

como sinergia. A Figura 7 ilustra a ação sinérgica entre exoglucanases, endoglucanase e β -glicosidase na hidrólise da fibra celulósica (Lynd et al., 2002).

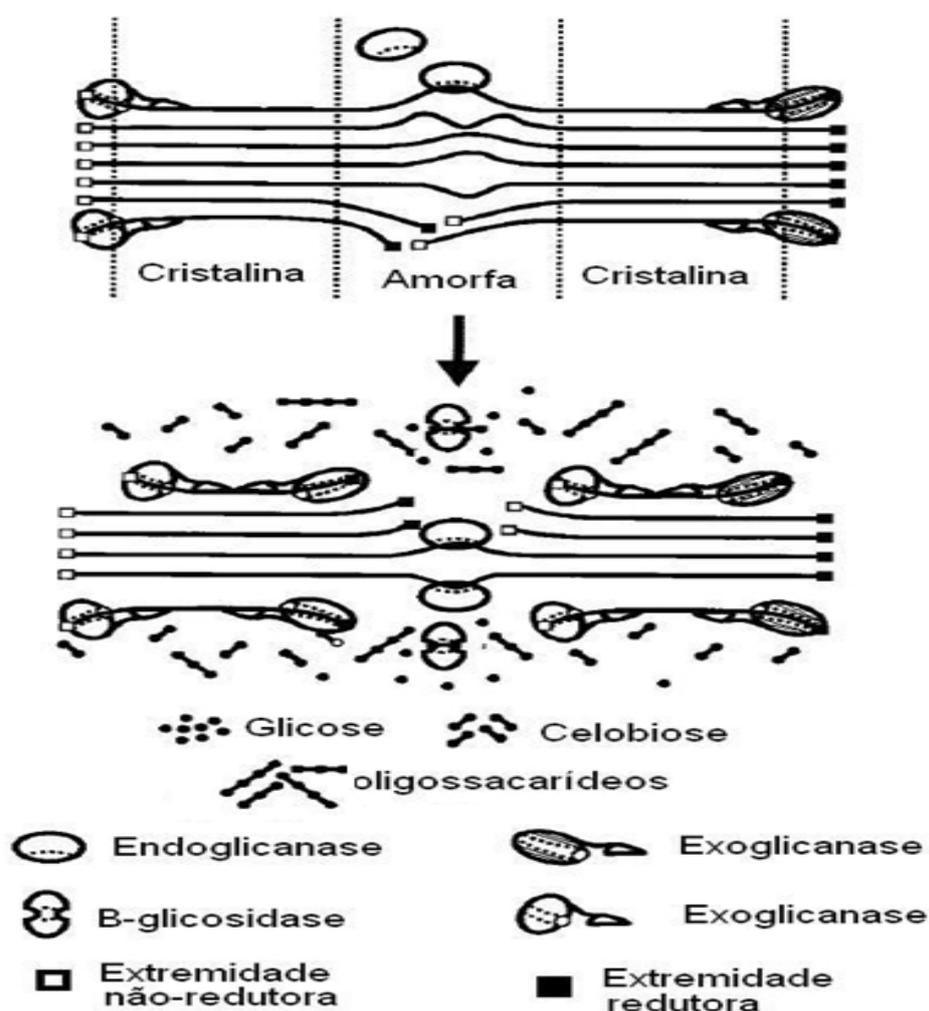


Figura 7. Representação esquemática da hidrólise de celulose pelo sistema celulolítico. O esquema mostra a região de ação de cada uma das celulases (Fonte: Lynd et al., 2002).

A ação da celulase em determinado substrato depende, preponderantemente, da origem do substrato e da sua composição ou, ainda, de pré-tratamentos químicos ou físicos em ação sinérgica com outras classes de enzimas como xilanases, pectinases, peroxidases, lactases, fenoloxidasas, dentre outras. Bactérias são reconhecidamente produtores de endoglucanases intra e extracelulares, enquanto fungos produzem endoglucanases predominantemente extracelulares (Ladisich et al., 1983).

Na natureza, existe uma grande variedade de micro-organismos que produzem celulases; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, algodão e papel de filtro, dentre outros, são usados como substratos indutores para a produção de exoglucanases e para medir a atividade do complexo celulolítico (Ruegger et al., 2004).

3.2.2. Degradação de Hemiceluloses

As propriedades químicas e estruturais das hemiceluloses podem ser influenciadas pela presença de uma grande diversidade de resíduos, onde deste modo, necessitam de uma série de enzimas para a sua degradação total. O sistema enzimático responsável pela degradação total das hemiceluloses é composto por β -1,4- endoxilânase e β -xilosidase (fazem a hidrólise da xilana); α -D-glucuronidase (EC 3.2.1.139), que age hidrolisando as ligações α -1,2 entre ácido glucurônico e resíduos de xilose em glucuroxilana; α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) que remove resíduos de L-arabinose substituídos nas posições 2 e 3 das unidades de xilose; acetilxilana esterase (EC 3.1.1.72) que remove o grupo O-acetil das posições 2 e 3 dos resíduos de xilose da acetil xilana; ácido ferúlico e p-cumárico esterases (EC 3.1.1.73) que clivam na xilana, as ligações éster entre resíduos de arabinose e ácido ferrúlico ou ácido p-cumárico, respectivamente. Todas essas enzimas agem em conjunto permitindo a conversão da hemicelulose em seus açúcares constituintes (Girio et al, 2010; Sharma e Arora ,2010).

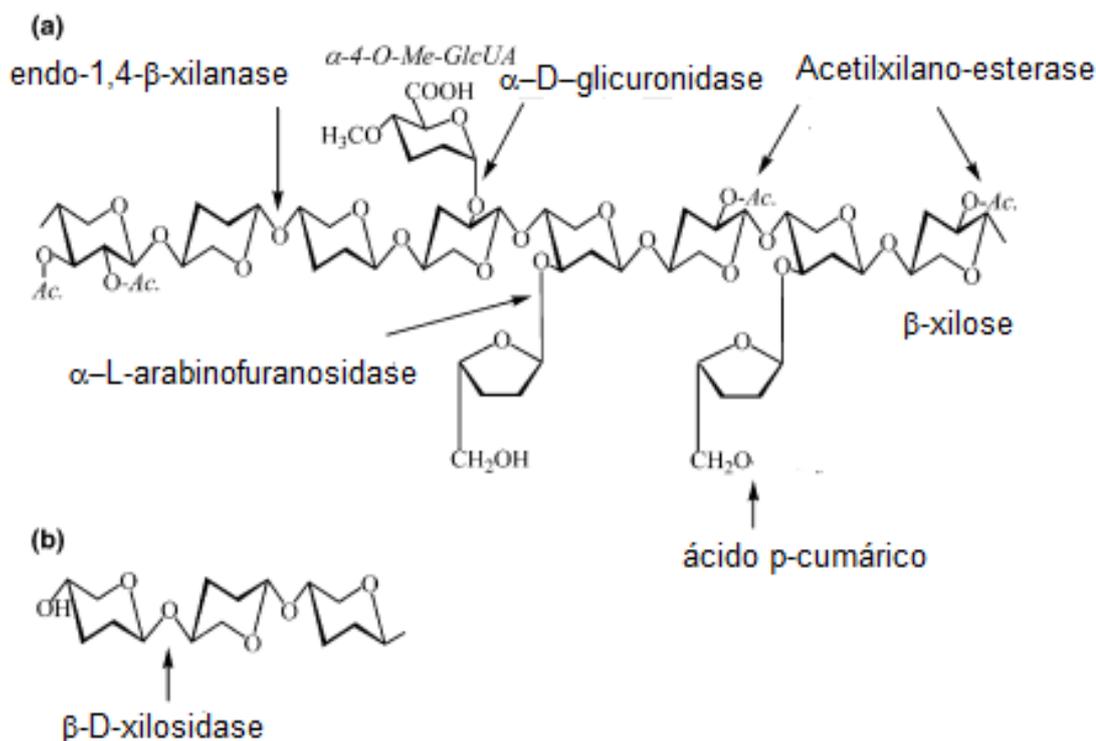


Figura 8. Mecanismos de ação das hemicelulases (Fonte: Collins et al.,2005).

As hemicelulases facilitam a hidrólise da celulose, expondo suas fibras e tornando-as mais acessíveis. A maioria dos estudos sobre hemicelulases tem-se centrado até agora na hidrólise de xilana.

As xilanases compreendem o grupo de enzimas responsáveis pela hidrólise da xilana. As principais enzimas envolvidas nesta hidrólise são β-1,4-endoxilanase e a β-D-xilosidase (Girio et al, 2010, Nawel et al.,2011).

A enzima β-1,4-endoxilanase (1,4-β-D-xilana-xilohidrolase, E.C. 3.2.1.8) provoca a quebra das ligações glicosídicas do esqueleto heteroxilana resultando na diminuição do grau de polimerização do substrato. O ataque ao substrato não é feito ao acaso e as ligações a serem hidrolisadas dependem da natureza do substrato como, por exemplo, o comprimento e o grau de ramificação do composto e a presença de substituintes, sendo que os principais compostos formados no início da hidrólise da xilana são os xilo-oligossacarídeos (Vicente, 2002; Girio et al., 2010; Nagar et al.,2011).

As β-xilosidasas (β-1,4-D-xilosídeo-xilo-hidrolase; EC 3.2.1.37) são exoglicosidasas que hidrolisam xilo-oligossacarídeos e xilobiose, a partir da

extremidade não redutora, liberando resíduos xilopiranosil. Esta enzima sozinha não hidrolisa a xilana e tem maior afinidade pela xilobiose. Sua afinidade aos xilo-oligossacarídeos é inversamente proporcional ao seu grau de polimerização (Girio et al., 2010).

As xilanases são encontradas em bactérias terrestres e marinhas, em bactérias presentes no sistema digestivo dos ruminantes, dos fungos, das algas marinhas, dos protozoários, dos caracóis, dos crustáceos, dos insetos e das sementes de plantas terrestres. No entanto, xilanases comerciais podem ser obtidas a partir de bactérias, como por exemplo, de *Bacillus* sp. Pesquisas têm demonstrado que a biossíntese de xilanase é induzida por xilana, xilose, xilobiose ou ainda vários resíduos de β -D-xilopiranosil adicionados ao meio de cultura durante o crescimento microbiano, por outro lado, repressão catabólica por glicose é um fenômeno comum observado na biossíntese de xilanases (Girio et al., 2010; Nagar et al., 2011).

A procura por novas cepas de micro-organismos produtores de xilanases com melhores características fisiológicas em relação à temperatura, ao pH do meio, à maior variedade de fermentação do substrato, à resistência e adaptabilidade à toxicidade de substratos de baixo custo ainda é necessária, tendo em conta a grande biodiversidade existente (Girio et al., 2010; Kumar et al., 2012).

3.2.3. Biodegradação de Resíduos Agroindustriais

A economia brasileira é uma das mais importantes do mundo, baseada na agricultura, produzindo e exportando café, cana-de-açúcar, soja, mandioca, frutas entre outros. Entretanto, o acúmulo de resíduos agroindustriais na natureza aumenta a cada ano, causando deterioração do meio ambiente e perda de recursos. Esse aumento é uma contribuição significativa para o problema da reciclagem e conservação da biomassa. Diversos processos são desenvolvidos para utilização desses materiais como fonte de carbono em bioprocessos, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, proteínas, ácidos orgânicos, aminoácidos, compostos de aroma, entre outros. A utilização destes resíduos agroindustriais é uma alternativa racional para produção de substratos, além de ajudar a solucionar o problema da

poluição ambiental (Pandey et al., 2000; Uenojo e Pastore, 2007; Rezende et al., 2011; Santos et al., 2012).

Vários resíduos agroindustriais são usados como fontes alternativas de substratos para a produção de enzimas, devido à disponibilidade local e por representar uma fonte de baixo valor comercial, principalmente quando o objetivo é a produção destas enzimas em larga escala (Hernandez et al., 2005). Com o advento de inovações biotecnológicas, principalmente na área de tecnologia enzimática e processos fermentativos, caminhos novos têm sido abertos para sua utilização (Pandey et al., 2000; Soccol et al., 2010).

As matérias-primas de origem lignocelulósicas contêm de 20 a 60% de celulose, que pode ser totalmente convertida em glicose, por ação enzimática. Em etapas seguintes, este monossacarídeo pode ser utilizado como matéria-prima para a obtenção de uma imensa gama de produtos, que abrange desde biocombustíveis até polímeros, sendo o etanol uma das moléculas de maior interesse ultimamente (Castro e Perreira Jr., 2010).

O bagaço da cana-de-açúcar é resultante do processo de moagem do colmo extraído para a obtenção do caldo que passa por processos até a obtenção de açúcar e álcool. Para cada tonelada de cana-de-açúcar colhida, aproximadamente 30% de bagaço é produzido (Silva, 2007). O bagaço é um subproduto do qual ficam apenas alguns constituintes do material original e, no caso da cana-de-açúcar, resta a fibra e alguma quantidade de açúcar. A composição química do bagaço varia de acordo com vários fatores, dentre eles, a variedade da cana, o tipo de solo de plantio, as técnicas de colheita e de manuseio (Aguiar Filho, 2008). O bagaço de cana pode conter de 32 a 44% de celulose, 27 a 32% de hemicelulose, 20 a 24% de lignina e 4,5 a 9,0% de cinzas (Soccol et al., 2010).

Embora o bagaço possa ser utilizado para geração de energia ou como suplemento animal, ainda há um grande excedente que pode ser utilizado para produção de diversos bens da sociedade. Algumas alternativas para sua utilização como matéria-prima são a produção de etanol, papel e celulose, revestimentos acústicos, madeira prensada, forragem para agricultura, álcool, alcaloides e enzimas (Carvalho, 2005).

3.3. Aplicações industriais das lignocelulases

A produção de celulases em escala industrial começou em meados da década de 80, visando sua aplicação em aditivo para ração animal, de forma a aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos. Essas enzimas começaram a ser utilizadas como insumo na indústria de alimentos, cujo objetivo era de melhorar propriedades sensoriais de produtos de panificação. Nesse setor, as celulases também foram utilizadas no processamento de bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos e a manutenção de uma reologia estável do produto final. Posteriormente, as enzimas celulolíticas foram utilizadas em larga escala nas indústrias têxtil, nos processos de biopolimento (desfibrilação de tecidos como algodão, linho, lã e viscose) e bioestonagem (amaciamiento e desbotamento do brim); de polpa e papel e em lavanderias (Castro e Pereira Jr., 2010).

Já na década de 90, as celulases, juntamente com as hemicelulases, representavam mais de 20% do mercado mundial de enzimas. No que tange ao cenário nacional, em 2008, apenas considerando-se importações e exportações brasileiras, as celulases movimentaram um montante de 1,35 milhões de dólares americanos (Castro e Pereira Jr., 2010). A expectativa é de que o mercado de celulases seja superior a 400 milhões de dólares no ano de 2014 com a possível utilização das enzimas na hidrólise de palha de milho nos Estados Unidos da América para a produção de etanol de biomassa (Bon et al., 2008).

Na indústria alimentícia, as celulases são usadas em vários processos, principalmente, na extração de componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais e aromatizantes. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja e do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas, atuando juntamente com as pectinases e xilanases, bem como na indústria cervejeira, em conjunto com amilases e pectinases para maior aproveitamento dos cereais utilizados como fonte de carbono (Peixoto, 2006).

Existe uma tendência mundial para a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, buscando açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol em larga escala (Zhang et al., 2006). O uso de celulases para este fim tem como entrave o custo de produção, que pode ser superado utilizando organismos

geneticamente modificados (bactérias, leveduras e plantas) para a produção das enzimas, utilização de matérias-primas de baixo custo e produção de enzimas mais eficientes (Sun e Cheng, 2002).

Na indústria de polpa e papel, as celulases estão presentes na fabricação de papel reciclado, pois sua ação enzimática colabora no processo de despigmentação da matriz celulósica, permitindo o aumento da drenagem da água presente na polpa de papel para a formação de folhas de papel (Lima et al., 2001).

Na indústria têxtil as celulases são utilizadas no processamento têxtil de fibras celulósicas com o objetivo de eliminar microfibrilas superficiais e criar uma superfície mais lisa, aumentar o brilho, evitar formação de peloteamento, desbotar peças confeccionadas tingidas ou ainda, obter um aspecto de tecido usado. Estudos usam celulases também para a remoção do material celulósico em tecidos de fibras mistas (poliéster/algodão) para produzir tecidos mais finos (Vasconcelos e Cavaco-Paulo, 2006).

A utilização de celulases na hidrólise da celulose ocorre em condições mais brandas de pressão, temperatura e pH do que os processos químicos, e exibe elevada especificidade, eliminando a chance de ocorrência de substâncias tóxicas (furfurais e derivados de lignina) às células microbianas que serão utilizadas para fermentação do meio hidrolisado. Na rota enzimática, embora o custo de produção dos biocatalisadores ainda seja alto, são detectados pontos de economia no processo, tanto do ponto de vista energético, como metalúrgico, visto que os equipamentos podem ser confeccionados com materiais menos nobres (Castro e Pereira Jr., 2010).

As enzimas que degradam a xilana possuem um grande potencial em várias aplicações na área da biotecnologia. As xilanases estão envolvidas na bioconversão da xilana, presente em grandes quantidades em resíduos agrícolas e em resíduos provenientes de indústrias alimentícias, em xilose, o qual age como substrato na obtenção de etanol, por processos fermentativos, (Chandrakant e Bisaria, 2000) e em xilitol, utilizado como adoçante em vários tipos de alimentos (Parajó et al., 2004). Xilanases também são usadas na indústria de alimentos como panificação, indústrias de sucos e vinho, bem como na fabricação de papel e ração animal (Girio et al., 2010).

3.4. Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

A habilidade em decompor biomassa celulósica em glicose, a qual poderá ser convertida em produtos de valor agregado e energia, tem tornado as celulases um dos sistemas enzimáticos multicomponentes mais investigados. Entretanto, biomassas lignocelulósicas contêm, além de 75-80% de polissacarídeos (celulose e hemicelulose), 20-25% de lignina e, por isso, não podem ser facilmente convertidos em simples açúcares monoméricos, devido à natureza recalcitrante dessas moléculas. Para tornar a celulose disponível ao ataque das celulases, pré-tratamentos físicos e químicos são geralmente utilizados. Algumas opções de pré-tratamento são: tratamento com ácido, com álcali, com vapor, com solventes orgânicos e com água quente (Adsul et al., 2005, Aguiar e Ferraz, 2011; Rezende et al., 2011).

Devido à recalcitrância do material lignocelulósico, muitos processos de produção têm sido desenvolvidos no intuito de converter os carboidratos presentes na biomassa em açúcares fermentescíveis, buscando por melhores rendimentos e menores custos de processamento (Himmel et al., 2007; Canilha et al., 2010).

A etapa de pré-tratamento consiste em uma das etapas operacionais mais relevantes em termos de custo direto, além de influenciar diretamente os custos das etapas anteriores e subsequentes do processo (Wyman et al., 2005). O pré-tratamento tem por finalidade alterar ou remover a lignina e a hemicelulose, aumentar a área superficial e diminuir o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, o que acarreta em aumento na digestibilidade do complexo enzimático e, conseqüentemente, em elevados rendimentos em açúcar (Wyman et al., 2005, Canilha et al., 2010).

Vários métodos de pré-tratamentos têm sido propostos e desenvolvidos. Esses métodos podem ser classificados de diferentes formas, pré-tratamentos físicos, químicos, biológicos ou uma combinação destes no intuito de reduzir a recalcitrância da biomassa lignocelulósica. Dentre os métodos, os pré-tratamentos químicos e combinados têm recebido uma maior atenção, já que removem a lignina sem degradar a cadeia celulósica. Como a lignina está quimicamente ligada às hemiceluloses, uma degradação parcial das

hemiceluloses ocorre no processo de pré-tratamento químico (Aguiar e Ferraz, 2011).

Segundo Fan et al. (1987), a dificuldade de degradação dos materiais lignocelulósicos é atribuída às características morfológicas existentes entre os três principais componentes da parede celular das plantas. Estruturas microfibrilares de celulose encontram-se embebidas em uma matriz composta por hemicelulose e lignina, cuja função estrutural é de agir como barreira natural à degradação enzimática e microbiana.

Dentre os pré-tratamentos, a hidrólise ácida utilizando ácido sulfúrico é a mais utilizada devido aos seus bons resultados, como alto rendimento de recuperação de açúcares. Porém, pontos contrários, como a necessidade de neutralização antes da fermentação, para que não haja inibição do processo fermentativo e o alto custo da instalação das fábricas para que os equipamentos suportem as condições agressivas do fluido reagente dificultam a viabilidade econômica desta tecnologia. Os processos físico-químicos de pré-tratamento utilizando ácido diluído, vapor de alta pressão ou água quente possibilitam a remoção seletiva das hemiceluloses, produzindo soluções sacarídicas (pré-hidrolisados) com elevado teor de pentoses e reduzido teor de lignina (Hamelinck et al., 2005).

Outro tratamento que vem sendo muito estudado é o alcalino, utilizando como principais catalisadores o hidróxido de sódio, de potássio e o hidróxido de cálcio. Uma vantagem importante neste tipo de tratamento é que praticamente toda a lignina e parte da hemicelulose são removidas, resultando em uma maior disponibilidade da celulose. Por outro lado, a desvantagem deste processo é o tempo de residência, visto que este pode durar horas, diferentemente dos outros processos (Moiser et al., 2005).

Processos alcalinos tendem a promover maior dissolução da lignina e menor solubilização das hemiceluloses. Embora muitos métodos de pré-tratamento tenham sido experimentados ao longo dos últimos anos, constata-se a crescente necessidade em desenvolver alternativas tecnológicas eficientes em termos de custo global e competitividade econômica. Basicamente, extrações seletivas de componentes não celulósicos (lignina e hemiceluloses) utilizando-se álcalis ou ácidos têm sido obtidas a custos relativamente razoáveis (Baudel, 2006). Com a remoção de lignina e hemicelulose pelos pré-tratamentos ácidos e álcalis a

celulose torna-se mais acessível à hidrólise por enzimas. Segundo Santos et al. (2012), a presença de lignina limita o processo de difusão da enzima no substrato e, conseqüentemente, a liberação de glicose.

Quando se compara os dois pré-tratamentos, verifica-se que as condições de operação da hidrólise alcalina é menos corrosiva, resultando em um custo de implantação menor do que o da hidrólise ácida. Entretanto, esse processo torna-se mais oneroso que a hidrólise ácida, devido ao custo do reagente e da alta quantidade necessária (Hamelinck et al., 2005).

Uma característica a ser considerada na escolha do pré-tratamento da biomassa, é a questão dos resíduos que são gerados, pois estes não podem ser prejudiciais para as etapas posteriores, principalmente na hidrólise da celulose e no processo fermentativo. Outro ponto importante é que esta etapa é significativa em termos de custo no processo de aproveitamento da celulose, já que ela representa mais de 33% da despesa total do processo (Hamelinck et al., 2005).

Sendo assim, é necessário ressaltar a importância da etapa de pré-tratamento, visto que o rendimento do processo é superior a 90% quando há pré-tratamento e inferior a 20% quando esta etapa não é realizada (Hamelinck et al., 2005).

4. TRABALHOS

4.1. OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar como algumas condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com solução de hidróxido de potássio influenciam na sua deslignificação, usando uma abordagem estatística. As condições estudadas foram a concentração do hidróxido de potássio e o tempo de autoclavagem do bagaço de cana-de-açúcar e seus efeitos sinérgicos. Para isso, foi realizado um planejamento experimental para duas variáveis de acordo com a distribuição uniforme de Doehlert utilizando como variáveis de resposta a concentração de celulose, hemicelulose, polissacarídeos totais e lignina. De acordo com a condição de pré-tratamento com KOH, foi possível observar variações nos teores dos componentes nos bagaços de cana pré-tratados. Dentre os fatores que foram avaliados no pré-tratamento, a variável que mais influenciou nos teores de celulose, polissacarídeos e lignina foi a concentração do álcali. Mantendo-se o tempo de extração constante de 35 minutos, as concentrações de KOH entre 5 e 10% produziram as mais elevadas taxas de extração da lignina. As

eletromicrografias de varredura do bagaço de cana pré-tratado com solução de KOH 10% por 35 minutos mostraram a alteração da estrutura do material, com o aparecimento de estruturas desfeitas, que podem ser atribuídas ao tratamento aplicado no bagaço de cana.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate how some conditions of pre-treatment of sugar cane bagasse with a solution of potassium hydroxide influence their delignification, using a statistical approach. The conditions studied were the concentration of potassium hydroxide and esterilization time bagasse sugar cane and their synergistic effects. For this, we conducted an experimental design for two variables according to the uniform distribution of Doehlert using as response variables with the concentration of cellulose, hemicellulose, lignin and total polysaccharides. Under the condition that of pre-treatment with KOH, we observed variations in the concentration of the components in the bagasse pre-treated. Among the factors that were assessed at pre-treatment, the variable that most influenced the levels of cellulose, polysaccharides and lignin was the concentration of alkali. Keeping constant extraction time of 35 minutes the KOH concentrations between 5 and 10% produced the highest rates of lignin extraction. The scanning electron micrographs of sugar cane bagasse pre-treated with 10% KOH solution for 35 minutes showed a change in the structure of the material, with the appearance of broken structures, which can be attributed to the treatment in sugar cane bagasse.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma gramínea normalmente cultivada em países tropicais. Apresenta um grande interesse industrial, especialmente como matéria-prima para a produção de etanol e açúcar (Betancur

e Pereira, 2010; Peng et al, 2010). No Brasil, cerca de 720 milhões de toneladas de cana foram processadas em 2010, sendo 625 milhões de toneladas para a produção de açúcar e de etanol de primeira geração, e o restante para cachaça e rapadura (doce tradicional do Brasil) (Hofsetz e Silva, 2012). Neste processo, e após a cana ser moída para a extração do açúcar sob a forma de caldo, o bagaço obtido é considerado um resíduo (Betancur e Pereira, 2010).

O bagaço de cana-de-açúcar é o principal resíduo agroindustrial brasileiro, sendo produzido cerca de 250 kg por tonelada de cana-de-açúcar processada. Apesar do grande potencial desta biomassa lignocelulósica (60-70% carboidratos) para a produção de combustíveis e de produtos químicos, parte do que é gerado é queimado em usinas de açúcar e destilarias de álcool para a geração de energia, uma fração menor é utilizada para alimentação animal, e grande parte é descartada como resíduo agrícola (Cardona et al., 2010). Além disso, existe a perspectiva de aumento da produção de cana em resposta ao crescimento da demanda mundial de etanol (66-125 milhões de m³ entre 2008 e 2020), o que resultará em mais bagaço disponível (Balat e Balat, 2009).

A composição principal do bagaço de cana-de-açúcar é constituída por duas frações de polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e uma macromolécula polifenólica (lignina). O componente mais abundante é a celulose (33-36%), um polissacarídeo que consiste de uma cadeia linear constituída por várias unidades de $\beta(1,4)$ -D-glicose ligados de forma a gerar regiões cristalinas que, conseqüentemente, aumentam sua resistência a processos hidrolíticos. A hemicelulose, segunda fração predominante (28-30%), é um heteropolissacarídeo que possui uma composição variada de acordo com a sua fonte. Hemicelulose de bagaço de cana é composta de heteroxilanas, com predomínio de xilose, que pode ser quimicamente hidrolisada mais facilmente do que a celulose. A lignina é uma estrutura complexa formada pela polimerização de álcoois aromáticos, é resistente ao ataque enzimático e à degradação, e, assim, o seu conteúdo e distribuição são reconhecidos como os fatores mais importantes que determinam a recalcitrância à hidrólise da parede celular (Ververis et al., 2007; Rezende et al., 2011). A lignina presente na biomassa lignocelulósica pode, ainda, se ligar às enzimas que as degradam, tornando-se assim um inibidor destas enzimas (Goshadrou et al., 2011).

As tecnologias do pré-tratamento aplicadas a substratos lignocelulósicos são necessárias para diminuir a recalcitrância, hidrolisar lignina e hemicelulose e conseqüentemente melhorar o rendimento em açúcares fermentáveis que são liberados por hidrólise enzimática (Kumar et al., 2009; Goshadrou et al., 2011). Diferentes métodos de pré-tratamento têm mecanismos de ação singulares. Alguns podem diminuir a cristalinidade de celulose e o grau de polimerização, aumentar a superfície acessível ou remover seletivamente a hemicelulose e lignina da matriz lignocelulósica. Uma estratégia de pré-tratamento eficaz deve também minimizar a degradação dos carboidratos e a produção de inibidores de enzimas e produtos tóxicos para fermentação de micro-organismos (Krishnan et al., 2010; Carrasco et al., 2010; Monte et al., 2011).

Uma variedade de pré-tratamentos pode ser aplicada a diferentes matrizes lignocelulósicas. Estes incluem processos físicos, tal como moagem e irradiação; tratamentos físico-químicos, utilizando água quente, tais como explosão a vapor ou explosão de amônia, solventes orgânicos e iônicos, fluidos supercríticos, ácidos diluídos, a base de sulfito, nitrobenzeno e cobre e, por fim, pré-tratamentos biológicos utilizando bactérias e fungos (Rezende et al., 2011).

Tratamentos alcalinos foram inicialmente utilizados para aumentar a biomassa, e a digestibilidade desta, usada na alimentação animal. Soluções alcalinas diluídas levam à ruptura da parede celular lignocelulósica por dissolver a lignina, hemicelulose e sílica, hidrolisando ácidos urônicos e os ésteres de ácido acético e por inchar a celulose (Zhang e Lynd, 2004; Himmel et al., 2007; Pauly e Keegstra, 2008). A decomposição da lignina é geralmente atribuída à clivagem das ligações aril-éter dos compostos polifenólicos. Os monômeros de açúcares são consequência da dissolução da celulose e hemicelulose, enquanto o inchaço é consequência do enfraquecimento das ligações de hidrogênio (Jayapal et al., 2013). As bases fortes, quando aplicadas nos pré-tratamentos, promovem a maior degradação do resíduo e maiores rendimentos nos processos fermentativos subsequentes quando comparados com outros álcalis, como o carbonato de sódio, hidróxido de amônio, hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio (Rezende et al., 2011).

A conversão rentável de diferentes tipos de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis com baixos níveis de derivados inibitórios para a fermentação continua a ser um desafio para a produção de etanol de celulose

(Dagnino et al., 2013). O pré-tratamento alcalino dos substratos para a remoção de lignina é um dos gargalos, porque aumenta substancialmente o custo global de produção e também contribui para questões ambientais. Há uma grande necessidade de desenvolver processos mais eficazes para deslignificação da biomassa lignocelulósica (Asgher et al., 2013).

Este trabalho teve como principal objetivo a otimização de um processo de pré-tratamento alcalino com vista à deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar para deixá-lo mais suscetível a uma posterior hidrólise enzimática. Neste contexto, os efeitos da concentração de KOH e do tempo de autoclavagem a 121°C nos níveis de celulose, hemicelulose, polissacarídeos totais e lignina do bagaço de cana-de-açúcar foram estudados de acordo com um planejamento estatístico para duas variáveis. A presença de inibidores de fermentação também foi determinada nas diferentes amostras de bagaço de cana tratada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Biomassa lignocelulósica

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi doado pela Usina sucroalcooleira Paraíso situada na cidade de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Foi exaustivamente lavado com água destilada para a remoção de partículas de materiais e resíduos de açúcar, secado em desidratador profissional marca Pardal em bandejas de tela a aproximadamente 60°C por 48 horas. Em seguida foi triturado em moinho de facas tipo Wily, peneira 35 mesh, e armazenado sob refrigeração.

O bagaço assim preparado foi transportado para o Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG) em Lisboa – Portugal, onde os experimentos foram realizados.

A composição química do bagaço de cana *in natura* utilizado no estudo, analisado segundo o NREL (National Renewable Energy Laboratório - EUA) laboratório de procedimentos analíticos (Sluiter et al., 2011), foi de 4,35% de

umidade; 42,43% de celulose; 28,96% de hemicelulose; 18,61% de lignina insolúvel e 1,47% de cinzas.

Pré-tratamento alcalino com KOH

Para remover a lignina do bagaço de cana triturado, este foi submetido a uma hidrólise alcalina com KOH. O bagaço de cana (10 g) foi misturado em 70 ml (razão sólido-líquido 1:7) de soluções de KOH, com diferentes concentrações que variaram de 1-10%, e submetidos a um tratamento térmico em autoclave (121 °C) por diferentes tempos. O bagaço tratado foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada até pH neutro. Os efeitos da concentração de KOH e do tempo de autoclavagem a 121°C nas concentrações de celulose, hemicelulose, polissacarídeos totais e lignina no bagaço de cana-de-açúcar foram estudados de acordo com um planejamento experimental estatístico.

Metodologia do planejamento experimental

Foi realizado um planejamento experimental para duas variáveis de acordo com a distribuição uniforme de Doehlert (1970) para produzir superfícies de respostas. Catorze experimentos (incluindo duplicatas) foram realizados dentro de um domínio experimental com concentrações de KOH (X1) entre 1% e 10% e o tempo de autoclavagem a 121°C (X2) variando entre 10 e 60 minutos (tabela 1). Os valores de intervalo de tempo foram selecionados depois da realização de ensaios preliminares. A representação codificada das variáveis foi utilizada para fins de cálculo.

Tabela 1. Planejamento experimental para deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar

| Ensaio | X1 (KOH) | X2 (Tempo) | KOH (%) | Tempo (minutos) |
|--------|-------------|---------------|------------|--------------------|
| 1 | 0 | 0 | 5,5 | 35 |
| 2 | 0 | 0 | 5,5 | 35 |
| 3 | 1 | 0 | 10 | 35 |
| 4 | 1 | 0 | 10 | 35 |
| 5 | -1 | 0 | 1 | 35 |
| 6 | -1 | 0 | 1 | 35 |
| 7 | 0,5 | 0,87 | 7,75 | 56,65 |
| 8 | 0,5 | 0,87 | 7,75 | 56,65 |
| 9 | -0,5 | -0,87 | 3,25 | 13,35 |
| 10 | -0,5 | -0,87 | 3,25 | 13,35 |
| 11 | 0,5 | -0,87 | 7,75 | 13,35 |
| 12 | 0,5 | -0,87 | 7,75 | 13,35 |
| 13 | -0,5 | 0,87 | 3,25 | 56,65 |
| 14 | -0,5 | 0,87 | 3,25 | 56,65 |

As respostas estudadas (Y_i) neste planejamento foram: os níveis de celulose, hemicelulose, polissacarídeos totais e lignina no bagaço de cana-de-açúcar. O modelo utilizado para expressar as respostas foi um modelo polinomial de segunda ordem: $Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2$ onde Y_i , corresponde às respostas experimentais i , β são parâmetros do modelo polinomial e X é o nível da variável experimental (unidades codificadas).

Determinação dos polissacarídeos e lignina no bagaço tratado

O bagaço de cana-de-açúcar tratado foi analisado de acordo com o NREL (National Renewable Energy Laboratório - EUA) laboratório de procedimentos analíticos (Sluiter et al., 2011) para a determinação de sua composição em polossacarídeos (celulose e hemicelulose), lignina, cinzas, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF).

O método baseia-se na hidrólise completa do material em ácido sulfúrico concentrado (72%) em autoclave, filtragem do hidrolisado, carbonização da parte sólida em mufla (540 °C por 4 h) (lignina+cinzas), restando as cinzas. As cinzas correspondem à fração inorgânica remanescente após o filtrado insolúvel em H₂SO₄ ser carbonizado em mufla. O hidrolisado filtrado foi caracterizado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a determinação dos valores de celulose, hemicelulose, furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético. As porcentagens de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas foram calculadas em uma base de peso seco, enquanto a quantidade de lignina total foi calculada de acordo com a concentração de lignina insolúvel (Sluiter et al., 2011).

Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de bagaço obtidas nos tratamentos descritos anteriormente e também as não tratadas, previamente secas em estufa (umidade inferior a 10%) foram fixadas manualmente sobre fitas condutoras dupla face e dispostas em “stub” de alumínio para observação em microscópio eletrônico de varredura, Hitachi, modelo TM 3000 (Hitachi, Tóquio, Japão), utilizando um feixe de elétrons de 15 kV. Micrografias eletrônicas foram tiradas com ampliações 150X e 500X.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Níveis de polissacarídeos e lignina no bagaço de cana tratado

Neste estudo foi avaliado o efeito da concentração de KOH e do tempo de autoclavagem a 121°C como variáveis que influenciam a eficácia da extração da lignina do bagaço de cana. A tabela 2 apresenta os resultados dos experimentos seguindo a metodologia de planejamento experimental de acordo com a distribuição de Doehlert para duas variáveis. Na tabela encontram-se ainda os resultados da caracterização química avaliada para as diferentes amostras de cana tratada (cinzas, ác. acético, furfural, HMF).

Tabela 2. Caracterização química do bagaço de cana submetido a diferentes tratamentos de acordo com planejamento estatístico

| Ensaio | Celulose ^a (%) | Hemicelulose ^a (%) | Polissacarídeos totais ^a (%) | Lignina ^a (%) | Cinzas (%) | Ácido Acético (%) |
|--------|------------------------------|----------------------------------|--|-----------------------------|---------------|----------------------|
| 1 | 68,92 | 26,56 | 95,48 | 5,32 | 0,18 | 3,34 |
| 2 | 68,81 | 26,55 | 95,36 | 4,93 | 0,16 | 2,69 |
| 3 | 79,86 | 19,34 | 99,19 | 4,53 | 0,31 | 5,03 |
| 4 | 80,42 | 13,81 | 94,24 | 5,24 | 0,34 | 0,15 |
| 5 | 47,31 | 27,73 | 75,04 | 17,97 | 1,07 | 3,99 |
| 6 | 47,57 | 28,32 | 75,89 | 17,43 | 0,63 | 1,48 |
| 7 | 73,59 | 20,43 | 94,02 | 4,97 | 0,12 | 0,23 |
| 8 | 75,48 | 21,32 | 96,80 | 4,62 | 0,10 | 4,25 |
| 9 | 64,05 | 30,51 | 94,55 | 5,47 | 0,55 | 0 |
| 10 | 64,38 | 31,45 | 95,83 | 5,51 | 0,51 | 0 |
| 11 | 72,85 | 20,61 | 93,46 | 6,04 | 0,53 | 3,05 |
| 12 | 74,26 | 21,49 | 95,75 | 5,54 | 0,54 | 0,22 |
| 13 | 62,34 | 30,59 | 92,93 | 4,94 | 0,42 | 0 |
| 14 | 62,13 | 30,49 | 92,61 | 5,20 | 0,52 | 2,23 |

^aRespostas do planejamento experimental (Y_i)

Nota: Nenhuma das amostras de cana tratada (1-14) continha furfural ou HMF.

A partir da análise da tabela 2, pode-se constatar que quando se varia o tempo de 13,4 para 56,7 minutos mantendo-se a concentração de KOH em 7,75% (ensaio: 11, 12, 7 e 8), os níveis de celulose, hemicelulose, polissacarídeos totais e lignina no bagaço são semelhantes. Da mesma forma, quando se utiliza uma quantidade menor de KOH, 3,25% (ensaio: 9, 10, 13 e 14), a variação do tempo de autoclavagem origina respostas semelhantes. Estas observações mostram que o tempo de autoclavagem a 121°C não é um elemento chave no processo. A extração de lignina utilizando KOH 3,25% ou KOH 7,75% foi semelhante, no entanto os níveis de celulose e hemicelulose variaram apesar do conteúdo de polissacarídeos total também ter sido mantido. Quando se manteve um tempo de autoclavagem constante de 35 minutos, o aumento da concentração de KOH resultou em um aumento crescente dos níveis médios de celulose (de 47,4% para 68,9%) e dos polissacarídeos totais (de 75,5% para 95,4%) no

bagaço (ensaios 1 a 6), no entanto os níveis médios de hemicelulose foram diminuindo (de 28% para 16,6%). A extração da lignina por autoclavagem durante 35 minutos foi mais eficiente quando se utilizou KOH 10%, obtendo-se bagaço com baixos níveis de lignina (4,53%-5,24%; ensaios 3 e 4). A extração da lignina aumenta cerca de 70% para uma variação de dez vezes na concentração de KOH (1% para 10%), no entanto a lignina removida com KOH 5,5% ou KOH 10% foi muito parecida, atingindo-se níveis médios semelhantes de polissacarídeos totais. Apenas a proporção celulose/hemicelulose varia com o aumento da concentração de KOH, de 5,5 para 10% (ensaios 1 a 4). De acordo com os resultados da Tabela 2, as taxas mais elevadas de extração de lignina foram obtidas nos tratamentos com concentrações de KOH entre 5 e 10%.

Os resultados dos níveis de celulose, hemicelulose, polissacarídeos totais e lignina obtidos da aplicação do planejamento experimental foram utilizados para uma análise de regressão e os parâmetros derivados do modelo polinomial aplicado (β_0 a β_{22}) estão apresentados na tabela 3. Os parâmetros β dos modelos polinomiais utilizados para estimar as respostas têm significados específicos: β_0 representa a resposta analisada no centro do domínio experimental; a magnitude de β_1 e β_2 indica a importância das variáveis 1 e 2 (concentração de KOH e tempo de autoclavagem, respectivamente) nas respostas obtidas; β_{12} , o parâmetro de interação das variáveis 1 e 2, indica como o efeito de uma variável depende da outra variável. Os valores de β_{11} e β_{22} , parâmetros da auto-interação e ajuste, determinam como a superfície de respostas se dobra para baixo (valores negativos) ou para cima (valores positivos) quadraticamente, mais ou menos rapidamente, dependendo da magnitude do valor absoluto (Silva et al., 2013).

Tabela 3 - Parâmetros dos modelos polinomiais que representam as respostas estudadas.

| | Modelo | Celulose | Hemicelulose | Polissacarídeos totais | Lignina |
|---|---|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Parâmetros dos modelos | β_0 | 68,88 | 26,56 | 95,44 | 5,13 |
| | β_1 | 14,51 | -7,08 | 7,42 | -4,27 |
| | β_2 | -0,29 | -0,18 | -0,47 | -0,41 |
| | β_{12} | 1,71 | 0,15 | 1,86 | -0,33 |
| | β_{11} | -5,09 | -4,26 | -9,34 | 6,16 |
| | β_{22} | 1,37 | 0,49 | 1,85 | -1,84 |
| Validação do modelo (Teste de Fischer) | Eficácia dos parâmetros | 48,77 | 14,06 | 6,15 | 6,16 |
| | Nível de Significância (%) | F(5,8), $\alpha = < 0,01$ | F(5,8), $\alpha =$ 0,01 | F(5,8), $\alpha =$ 0,01 | F(5,8), $\alpha = 0,01$ |
| | Falta de ajuste | 93,48 | 9,27 | 43,12 | 5652,34 |
| | Nível de Significância (%) | F(1,7), $\alpha =$ < 0,01 | F(1,7), $\alpha = <$ 0,1 | F(1,7), $\alpha =$ <0,01 | F(1,7), $\alpha = <0,01$ |
| R^2 | Coefficiente de determinação múltipla | 0,97 | 0,90 | 0,79 | 0,79 |

(β_0 , resposta no centro do domínio experimental; β_1 e β_2 , parâmetros das variáveis 1 e 2, respectivamente; β_{12} , o parâmetro de interação das variáveis 1 e 2; β_{11} e β_{22} , parâmetros da auto-interação das variáveis 1 e 2, respectivamente).

Considerando a Tabela 3, os valores de β_1 e β_2 dos modelos revelam o peso relativo de cada uma das variáveis, KOH e tempo de autoclavagem, no processo de pré-tratamento do bagaço de cana. Em todos os casos, o valor de β_1 é muito maior do que o valor de β_2 , o que significa que a concentração de KOH é a variável que virtualmente controla o processo de tratamento. O nível de interação (β_{12}) é também pequeno embora seja maior do que a contribuição do tempo de autoclavagem para as respostas finais.

Os valores dos parâmetros β nos modelos expressam que os níveis de hemicelulose e lignina apresentam valores negativos. β_1 para a hemicelulose é um parâmetro mais negativo do que β_1 para a lignina. O efeito destes valores em ambas as respostas é observado na tabela 2. Mantendo um tempo de autoclavagem constante de 13,4 minutos, e variando a concentração de KOH de 3,25 para 7,75% a quantidade de hemicelulose no bagaço cai 32% (ensaio 9, 10, 11 e 12). A mesma variação de KOH para um tempo de autoclavagem de 56,7 minutos produziu a mesma diminuição de 32% nos níveis de hemicelulose (ensaio de 7, 8, 13 e 14). Nas mesmas condições, o aumento da concentração de KOH não teve efeito sobre os níveis de lignina. Contudo, tanto para as respostas que aumentam com a concentração de KOH como para as respostas que diminuem com a concentração de KOH, os níveis obtidos não são os mesmos ao longo do domínio experimental.

As Figuras 1 e 2 mostram a variação da celulose e dos polissacarídeos totais dentro do domínio experimental. Ambas as respostas aumentam com a concentração de KOH e a forma vertical dos gráficos nas suas superfícies de resposta mostra o peso limitado da variável "tempo de autoclavagem" nessas respostas, sendo a representação gráfica dos valores relativos de β_1 e β_2 (Tabela 3). Na Figura 2 pode-se observar que a extração da lignina utilizando KOH na concentração entre 5 e 9%, independente do tempo de autoclavagem, permite a obtenção de um elevado nível de polissacarídeos totais (> 96%). Em concentrações elevadas de KOH (> 9%) os níveis de polissacarídeos totais aumentam devido ao aumento nos níveis de celulose (Figura 1) compensando a diminuição da hemicelulose (Figura 3).

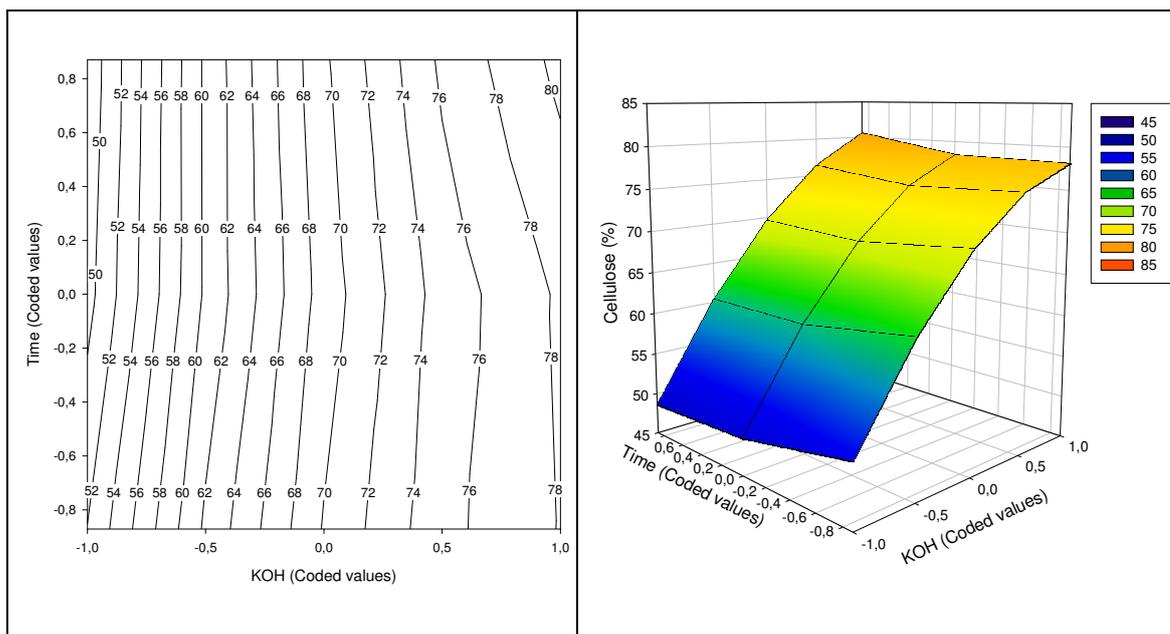


Figura 1. Gráfico de superfície de resposta que mostra o efeito da concentração de KOH e tempo de autoclavagem na concentração de celulose do bagaço tratado.

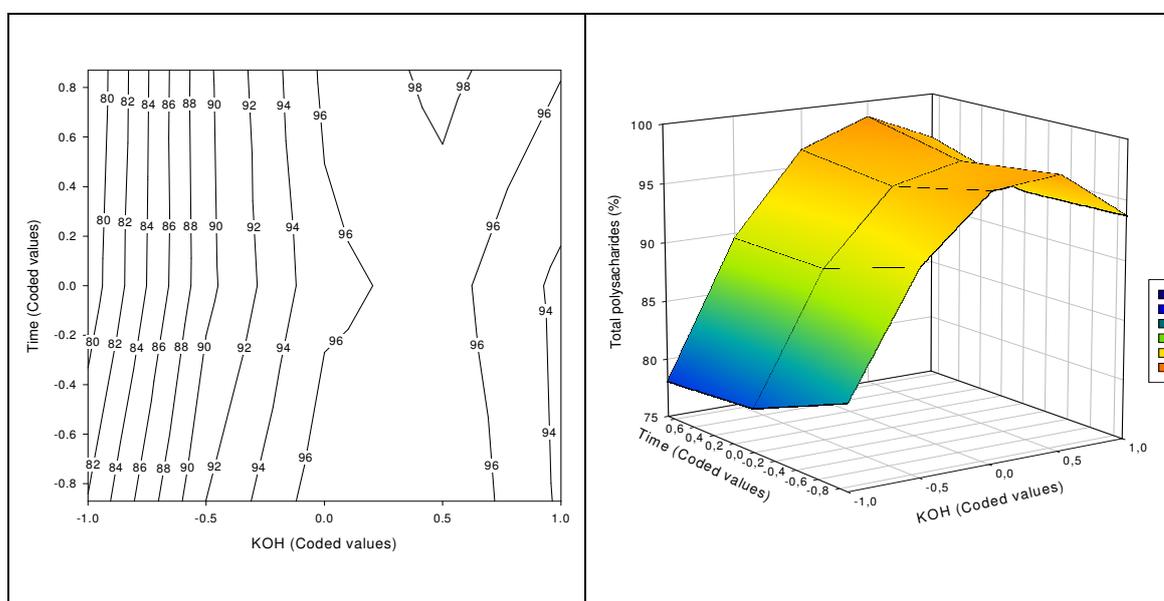


Figura 2. Gráfico de superfície de resposta que mostra o efeito da concentração de KOH e tempo de autoclavagem na concentração de polissacarídeos totais do bagaço tratado.

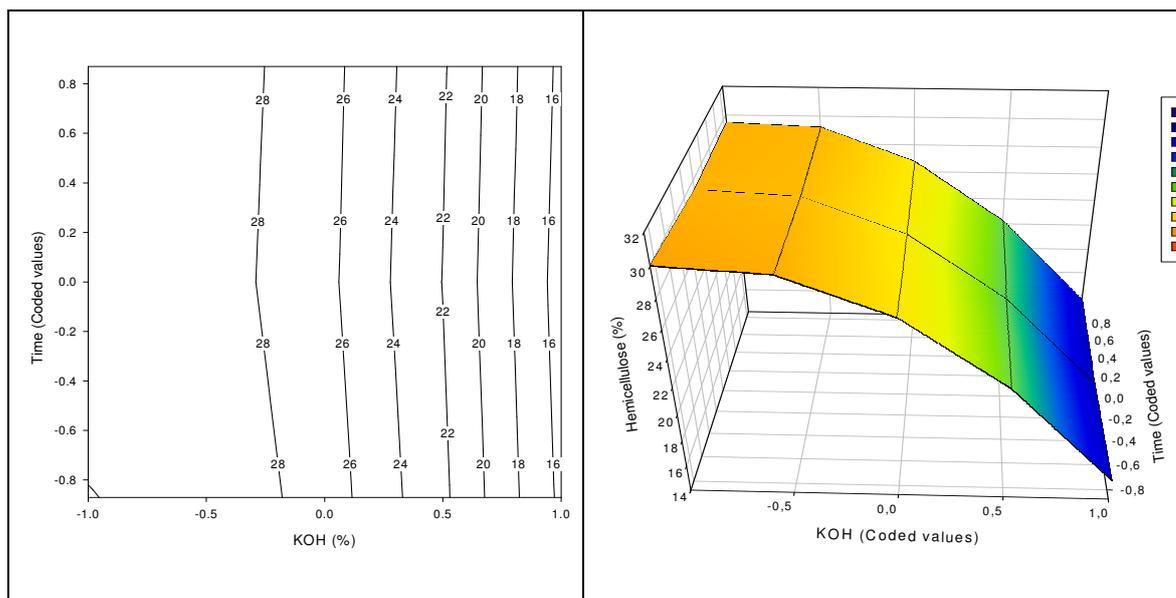


Figura 3. Gráfico de superfície de resposta que mostra o efeito da concentração de KOH e tempo de autoclavagem na concentração de hemicelulose do bagaço tratado.

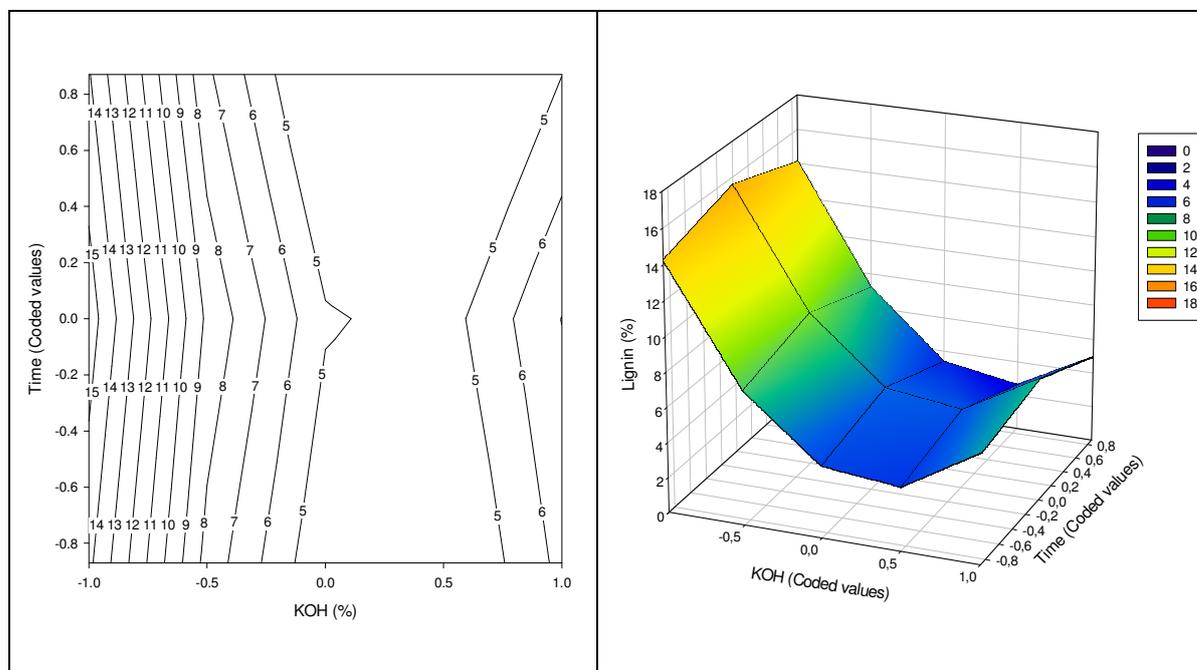


Figura 4. Gráfico de superfície de resposta que mostra o efeito da concentração de KOH e tempo de autoclavagem na concentração de lignina do bagaço tratado.

As figuras 3 e 4 apresentam a variação da concentração de hemicelulose e lignina dentro do domínio experimental. Estes gráficos também representam o efeito negativo dos parâmetros β , ou seja, os valores das respostas diminuem à medida que aumenta a quantidade de KOH. As autoclavagens com concentrações de KOH mais elevadas originam níveis de hemicelulose (Fig. 3) e lignina (Fig. 4) mais baixos, mas os níveis de celulose aumentam (Fig. 1) no bagaço tratado. A Figura 4 mostra que as melhores condições de tratamento a aplicar ao bagaço de cana para a extração de lignina são: tempo de autoclavagem menor que 35 minutos, e concentração de KOH entre 5% e 10%. Estas condições possibilitam uma redução da lignina do bagaço de 18,6% para níveis menores que 5%, com um aumento dos polissacarídeos totais para níveis maiores que 95%.

A redução da lignina no bagaço de cana permite uma maior acessibilidade aos polissacarídeos totais (celulose e hemicelulose), o que pode constituir uma vantagem quando se pretende a aplicação de enzimas (celulases e xilanasas) num processo de produção de bioetanol, utilizando processos de SHF (hidrólise e fermentação separadas) ou SSF (sacarificação e fermentação simultânea).

Validação dos dados experimentais

A validação estatística das equações polinomiais foi realizada por análise de variância (ANOVA) (Deming e Morgan, 1987). A adequação dos modelos a aplicar aos conjuntos de dados foi realizada por meio de dois testes estatísticos: (i) o teste F para a eficácia das variáveis, o qual determina se a origem da variância, incluída nos resíduos, é devida à insuficiência dos modelos para reproduzir dados experimentais, e (ii) o teste F para a adequabilidade do ajuste, que é realizado a fim de detectar se a origem da variância foi devido a erro experimental. A Tabela 3 mostra as razões de variação de Fisher e dos níveis de confiança avaliados para cada teste F.

O teste F para a eficácia das variáveis aplicadas a todas as respostas mostrou um nível de confiança de 0,01% para o qual a hipótese nula (H_0) pode ser rejeitada. Assim, com um elevado nível de confiança pode presumir-se que uma quantidade significativa da variância nos dados foi representada pelas

variáveis nos modelos, isto é, as variáveis, tal como aparecem nos modelos, têm um efeito sobre as respostas analisadas.

O teste F para a adequabilidade do ajuste, também parece ser altamente significativo para todas as respostas, pois a hipótese nula pode ser rejeitada com um nível de confiança igual ou inferior a 0,01%. Nestas condições, a hipótese alternativa (H_a) é aceita, o que significa que a falta de predição perfeita dos modelos é explicada pelo erro experimental. Todos os modelos se ajustaram bem aos conjuntos de dados.

A análise do modelo pelo coeficiente de determinação múltipla (R^2) também foi realizada (Tabela 3). Este coeficiente mostra que apenas uma quantidade limitada da soma dos quadrados corrigida para a média pode ser contabilizada pelos resíduos.

Microscopia Eletrônica de varredura

As eletromicrografias de varredura podem ser visualizadas na Figura 5. O bagaço controle, ou seja, que não foi submetido a nenhum pré-tratamento pode ser visto nas Figuras 5a e 5b, com suas fibras intactas, sem nenhuma alteração ou ruptura da parede celular. Nas Figuras 5c e 5d, é possível observar a alteração da estrutura da fibra, com o aparecimento de fibras desestruturadas, que podem ser atribuídas ao tratamento com solução de KOH 10% por 35 minutos aplicado no bagaço de cana.

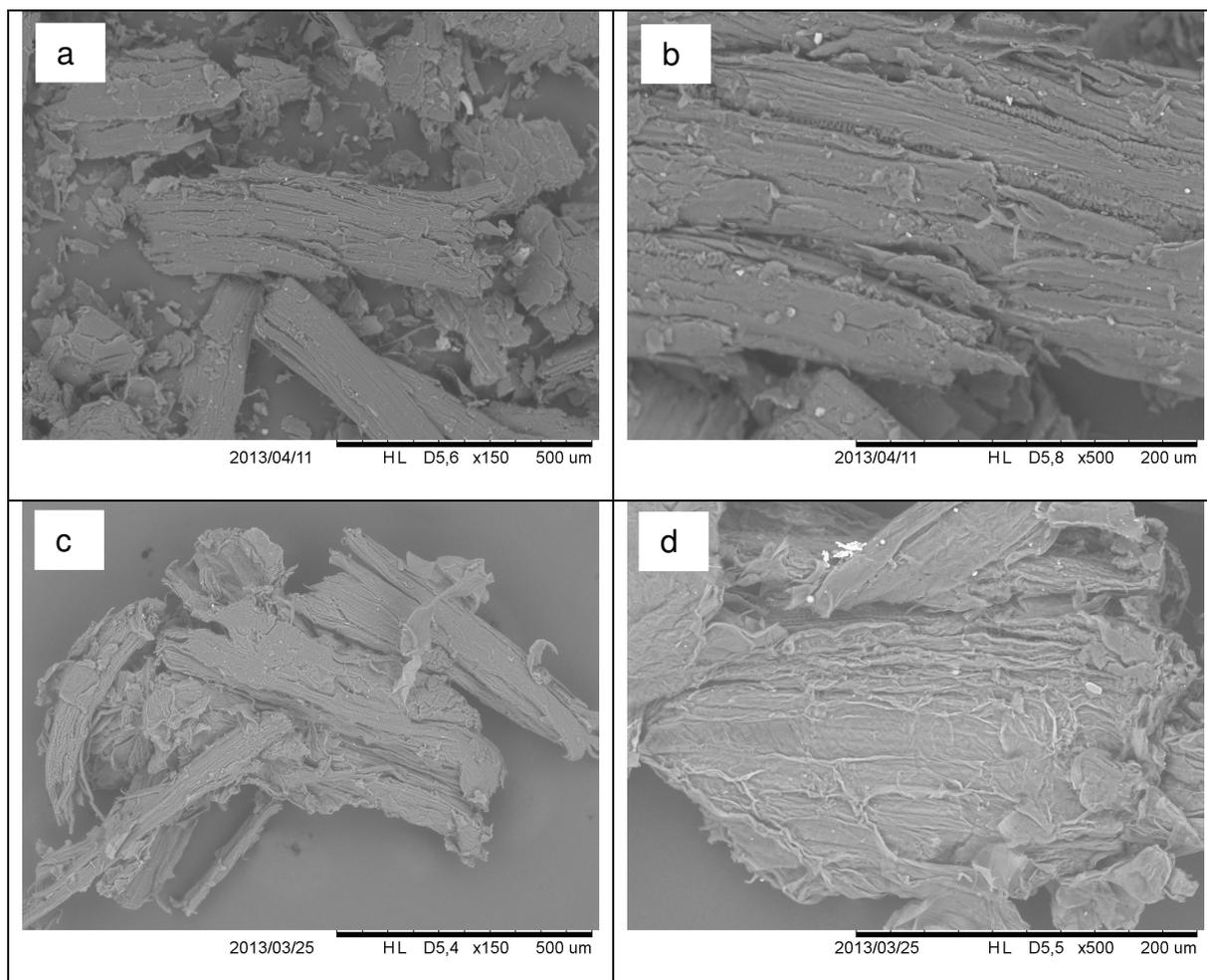


Figura 5. Eletromicrografias eletrônicas de superfície da amostra de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (a e b) e tratado com solução de KOH 10% por 35 minutos (c e d).

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados no trabalho pode-se concluir que o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com solução de KOH influenciou na composição química deste resíduo. A variável com maior poder de influência no teor de celulose, hemicelulose, polissacarídeos totais e lignina foi a concentração da solução de KOH. As melhores condições de tratamento a aplicar o bagaço de cana para a extração de lignina são: tempo de autoclavagem maior que 35 minutos, concentração de KOH entre 5% e 10%. Estas condições

possibilitam uma redução da lignina do bagaço de 18,6% para níveis abaixo de 5%, com um aumento dos polissacáridos totais para níveis maiores que 95%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asgher, M., Ahmad, Z., Iqbal, H.M.N. (2013) Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, 44:488– 495.
- Balat, M., Balat, H. (2009) Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. *Applied Energy*. 8: 2273-2282.
- Betancur, G.J.V., Pereira, N.J. (2010) Sugarcane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part 1: diluted acid pretreatment optimization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13:1–9.
- Cardona, C.A., Quintero, J.A., Paz, I.C. (2010) Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresour. Technol.* 101:4754–4766.
- Carrasco, C., Baudel, H.M., Sendelius, J., Modig, T., Roslander, C., Galbe, M., Hahn-Hägerdal, B., Zacchi, G., Lidén, G. (2010) SO₂-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. *Enzyme Microb. Technol.* 46:64–73.
- Dagnino, E.P., Chamorro, E.R., Romano, S.D., Felissia, F.E., Area, M.C. (2013) Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. *Ind. Crops Prod.* 42:363–368.
- Deming, S.N., Morgan, S.L. (1987) Experimental Design: a Chemometric Approach, 1st edn. *Elsevier Science Publishers*.
- Doehlert, D.H. (1970) Uniform shell designs. *Appl Stat* .19:231–239

- Goshadrou, A., Karimi, K., Taherzadeh, M.J. (2011) Bioethanol production from sweet sorghum bagasse by *Mucor hiemalis*. *Ind. Crops Prod.* 34:1219–1225.
- Himmel, M.E., Ding, S.Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D. (2007) Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*. 315:804-807.
- Hofsetz, K., Silva, M.A., (2012) Brazilian sugarcane bagasse: energy and non-energy consumption. *Biomass Bioenergy*, 46:564-576.
- Jayapal, N., Samanta, A.K., Atul P.K., Senani, S., Suresh, K.P., Sampath, K.T. (2013) Value addition to sugarcane bagasse: Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. *Industrial Crops and Products*, 42:14–24.
- Krishnan, C., Sousa, L.C., Jin, M., Chang, L., Dale, B.E., Balan, V. (2010) Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. *Biotechnol Bioeng.* 107:441-450.
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P. (2009) Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind Eng Chem Res.* 48:3713-3729.
- Monte, J.R., Brienza, M., Milagres, A.M.F. (2011) Utilization of pineapple stem juice to enhance enzyme-hydrolytic efficiency for sugarcane bagasse after an optimized pre-treatment with alkaline peroxide. *Appl. Energy*, 88.403–408.
- Pauly, M., Keegstra, K. (2008) Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J.* 54:559-568.
- Peng, F., Ren, J.L., Xu, F., Bian, J., Peng, P., Sun, R.C. (2010) Fractional studies of alkali soluble hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugar cane bagasse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 58:1768–1776.

- Rezende, C.R., Lima, M.A., Maziero, P., Azevedo, E.R., Garcia, W., Polikarpov, I. (2011) Sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuel*, 4:54.
- Silva, T.P., Paixão S.M., Teixeira, A.V., Roseiro, J.C., Alves, L. (2013) Optimization of low sulfur carob pulp liquor as carbon source for fossil fuels biodesulfurization. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (DOI 10.1002/jctb.3921).
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D.(2011) *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*. Technical Report NREL/TP-510-42618. 18p.
- Ververis, C., Georghiou, K., Danielidis, D., Hatzinikolaou, D.G., Santas, P., Santas, R., Corleti, V. (2007) Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Bioresource Technology* 98: 296-301.
- Zhang, Y.P., Lynd, L.R. (2004) Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng.* 88:797-824.

4.2. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE CELULASES EM CULTURAS SUBMERSAS DE *Bacillus* sp. SMIA-2 CONTENDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO.

RESUMO

A cepa termofílica brasileira de *Bacillus* sp. SMIA-2 produziu bons níveis de avicelase e CMCase em fermentação submersa, utilizando bagaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho como substratos de baixo custo. A produção das enzimas teve início na fase de crescimento exponencial, atingindo um máximo a 120 h para a avicelase e a 168 h para a CMCase. Os estudos de caracterização das enzimas indicaram que os valores de pH ótimo para a atuação das enzimas foram de 8,5; 7,5 e 7,5 para a avicelase em extrato bruto, precipitada e dialisada, respectivamente. Já para a CMCase os valores de pH ótimo foram de 9,0 em extrato bruto e 8,0 para a CMCase precipitado e dialisado, respectivamente. A temperatura para uma atividade ótima de ambas as enzimas foi de 70 °C nos três estados. Os resultados mostraram também que as enzimas permaneceram 100% estáveis a 60 °C durante 3 horas e que foram estimuladas por Mn^{2+} e Co^{2+} . Assim, as enzimas extracelulares secretadas apresentaram propriedades que atendem aquelas frequentemente necessárias em ambiente industrial.

ABSTRACT

The Brazilian strain of thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 produced good levels of avicelase and CMCase in submerged fermentation using sugar cane bagasse and corn steep liquor as substrates for low cost. The production of the enzymes was started in the exponential growth phase, peaking at 120 h to avicelase and 168 h for the CMCase. The characterization studies of enzymes indicated that the pH optimum for the enzyme activity were 8.5, 7.5 and 7.5 for avicelase in crude extract, precipitated and dialyzed, respectively. But for CMCase optimum pH values were 9.0 in the crude extract and 8.0 to precipitate and dialysate CMCase. The temperature for an optimal activity of both enzymes was 70 °C in the three states. The results also showed that the enzyme remained 100% stable at 60 °C for 3 hours and were stimulated by Mn^{2+} and Co^{2+} . Thus, the secreted extracellular enzymes had properties that meet those often required in industrial environments.

INTRODUÇÃO

A hidrólise enzimática completa de materiais celulósicos necessita de pelo menos três tipos diferentes de celulasas; endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.91) e β -glucosidase-D (EC 3.2.1.21) (Singhania et al., 2010).

A endoglucanase (1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolase), também conhecida por carboximetilcelulase (CMCase), é a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise. É caracterizada pela sua atividade junto à celulose amorfa e celuloses modificadas quimicamente como a carboximetilcelulose (CMC), gerando oligossacarídeos de menor peso molecular, chamados de celodextrinas, e celobiose, criando extremidades não redutoras para subsequente ação das exoenzimas (Lee et al., 2010). Em contraste, as exoglucanases (exo-1,4- β -D-glucanases, celobiohidrolase, celulase microcristalina ou avicelase) é operacionalmente definida pela sua habilidade para degradar a celulose microcristalina (Avicel), mas não a CMC. Portanto, é

assumido que a endoglucanase pode somente hidrolisar a região amorfa da molécula de celulose. A degradação da região cristalina da celulose é creditada a ação da exoglucanase ou avicelase, que catalisa a liberação de resíduos de celobiose a partir das extremidades não redutoras da cadeia da celulose (Lynd et al., 2002; Lee e Moon, 2003; Ogeda e Petri, 2010).

A capacidade de degradar a celulose é amplamente distribuída em grupos de fungos dentro do domínio *Eukaria* e entre muitos gêneros do domínio *Bacteria* (Lynd et al., 2002). Entre as bactérias, o grande potencial celulolítico do gênero *Bacillus* tem levado muitos pesquisadores a clonar e superexpressar os genes envolvidos na síntese de enzimas celulolíticas, usando micro-organismos como leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e bactérias (*Zymomonas*) nesse processo (Lynd et al., 2002). As características do gênero *Bacillus*, como sua atividade metabólica em condições ácidas, neutras e alcalinas, combinadas com a presença de termófilos fazem com que espécies deste gênero tenham alcançado espaço no mercado, principalmente nos processos de biorremediação e uso em detergentes. Entre algumas espécies com potencial celulolítico estão *Bacillus brevis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. cereus* e *Paenibacillus polymyxa* (Shabeb et al., 2010).

O gênero *Bacillus* tem sido muito bem caracterizado quanto à produção de celulasas alcalinas, com grande interesse na indústria de detergentes. Devido à restrição da grande maioria das espécies deste gênero em produzir as três classes de celulasas (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidasas), os estudos envolvendo a caracterização enzimática de *Bacillus* sp envolvem principalmente CMC como substrato (Shabeb et al., 2010; Kim et al., 2011).

As celulasas são enzimas industrialmente importantes e são vendidas em grandes volumes (Singhania et al., 2010) para utilização em diferentes aplicações industriais (Karmakar et al., 2011; Shi et al., 2011) como: extração de chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes, utilização na indústria têxtil, no mercado de detergentes, na indústria de alimentos, na indústria de polpa e de papel, no tratamento de resíduos e na produção de bioetanol de segunda geração (Zhang et al., 2006; Vasconcelos e Cavaco-Paulo, 2006; Peixoto, 2006; Castro e Pereira Jr., 2010).

O uso das celulasas tem sido explorado no âmbito da utilização da enzima purificada em produtos comercializados, extrato bruto ou com o próprio micro-

organismo na sua forma latente, a escolha depende da aplicação. Na indústria de detergentes se emprega a enzima parcialmente purificada e com atividade em condições alcalinas. Já no caso de tratamento de efluentes da indústria de papel, a aplicação direta do micro-organismo tem demonstrado resultados satisfatórios, além de um custo menor (De Marco, 2012).

O maior obstáculo para a utilização das celulasas em processos industriais está relacionado ao seu alto custo de produção. Isto inclui uma série de fatores que influenciam negativamente a produção econômica das celulasas como, por exemplo, o tipo e fonte da celulose empregada para sua produção, a complexidade da estrutura da celulose e também baixas quantidades de celulasas produzidas por micro-organismos celulolíticos devido à repressão catabólica (Sridevi et al., 2009).

A substituição da celulose pura comumente utilizada como substrato indutor da síntese enzimática por substratos relativamente mais baratos como materiais lignocelulósicos tem se mostrado como efetiva para a redução do custo de produção das celulasas (Muthukrishnan, 2007).

A utilização de resíduos de baixo custo como substratos na produção de enzimas é especialmente interessante para os países onde resíduos agroindustriais são abundantes. Bagaço de cana-de-açúcar é o principal resíduo agroindustrial brasileiro. Estima-se que cerca de 200 milhões de toneladas de bagaço gerados no Brasil por ano é utilizado em centrais de produção de energia, enquanto a outra metade não tem destino definido (Cardona et al., 2010, Soccol et al., 2010; Hofsetz e Silva, 2012).

O bagaço é composto principalmente de duas frações de polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e uma macromolécula polifenólica (lignina). A celulose é o componente mais abundante, seguido por hemicelulose. A capacidade de alguns micro-organismos de metabolizar celulose os torna potencialmente importantes tendo em vista que estes resíduos representam mais de 50% do peso seco de resíduos agrícolas (Souza et al., 2012).

A água de maceração de milho, subproduto na moagem da indústria de milho, é um substrato de baixo custo e disponível em larga escala, capaz de ser utilizado como um componente do meio de cultura para crescimento de micro-organismos, pois possui em sua composição elementos orgânicos e inorgânicos que podem satisfazer as exigências nutricionais dos micro-organismos. Este

resíduo tem sido satisfatoriamente usado para uma variedade de fermentações tais como produção de solventes, antibióticos e enzimas (Lima et al. 2001).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi estudar a produção das enzimas CMCelulase e avicelase por uma cepa termofílica de *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo bagaço de cana-de-açúcar e suplementada com água de maceração de milho. Além disso, algumas propriedades bioquímicas das enzimas brutas e parcialmente purificadas foram determinadas a fim de explorar o potencial das mesmas para aplicações industriais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismo

A cepa da bactéria utilizada neste estudo foi um termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2, anteriormente isolada a partir de uma amostra coletada de solo na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil (Souza e Martins, 2001). Culturas foram estocadas em glicerol 20% (v/v) a -20 °C em ultrafreezer.

Substrato

O bagaço de cana utilizado como substrato neste trabalho foi coletado na Usina Sucroalcooleira Paraíso - Campos dos Goytacazes-RJ, e levado para o Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

No laboratório, o bagaço de cana foi exaustivamente lavado com água destilada e seco em desidratador profissional marca Pardal em bandejas de tela a aproximadamente 60°C por 48 horas. Em seguida foi triturado em moinho de facas tipo Wily, peneirado em peneira 35 mesh e estocado sob refrigeração até o seu uso.

O bagaço de cana foi submetido a tratamentos químicos com o objetivo de se retirar parte da lignina da composição deste bagaço e ainda alterar a estrutura

recalcitrante deste material, de acordo com o estudado no trabalho 1. Assim, os tratamentos foram os seguintes:

- Tratamento (1) – Bagaço sem tratamento (controle);
- Tratamento (2) – Bagaço tratado com solução de hidróxido de potássio (KOH - 10%); razão sólido líquido 1:7; 35 min em autoclave a 121 °C.
- Tratamento (3) – Bagaço tratado com solução de hidróxido de potássio (KOH - 10%); razão sólido líquido 1:7; 35 min em autoclave a 121 °C e posteriormente tratado com solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄- 1,2%); razão sólido líquido 1:8, 150 min em autoclave a 121 °C.

Após cada tratamento, o bagaço foi filtrado e lavado com água destilada até pH neutro.

Para verificar a eficiência da hidrólise do bagaço nos diferentes tratamentos foram quantificados os teores de celulose, hemicelulose e lignina de acordo com Sluiter et al.(2011).

Meio de cultura

O meio de cultura utilizado neste trabalho para produção da CMCase e avicelase continha (g.L⁻¹ de água destilada): Bagaço de cana-de-açúcar-5,0, água de maceração de milho -5,0, KCl-0,3, MgSO₄-0,5, K₂HPO₄-0,87, CaCl₂ -0,29, ZnO-2,03x10⁻³, FeCl₃.6H₂O-2,7x10⁻², MnCl₂.4H₂O-1,0x10⁻², CuCl₂.2H₂O-8,5x10⁻⁴, CoCl₂.6H₂O-2,4x10⁻³, NiCl₃.6H₂O-2,5x10⁻⁴, H₃BO₃-3,0x10⁻⁴. O pH do meio foi ajustado para 7,2 com NaOH 1,0 M e posteriormente esterilizado por autoclave a vapor a 121 °C, 1 atm durante 15 minutos.

Ativação da linhagem e preparo do inóculo

O micro-organismo foi estriado em placas de Petri contendo meio TSY (triptona 20 g.L⁻¹; NaCl 10 g.L⁻¹; extrato de levedura 10 g.L⁻¹; ágar 20 g.L⁻¹ e água 1 L). As placas foram incubadas em estufa QUIMIS modelo Q 315 D26 a 50°C por 18 horas. Após este período, 5 mL do meio de cultura descrito acima foram transferidos para as placas para ressuspender as células que foram posteriormente sugadas com o auxílio de uma pipeta estéril. Estas células foram inoculadas em frascos erlenmeyers de 250mL contendo 50mL do respectivo meio

de crescimento, incubadas por mais 18 horas a 50°C em “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 150 rpm. Este meio foi denominado inóculo.

Condições da fermentação

O meio (50 mL em frascos Erlenmeyer de 250 mL) foi inoculado com 1 mL do inóculo (número inicial de células por ml de 10^4) e incubado a 50 °C em um agitador orbital (Thermo Forma, Ohio, EUA), operado a 150 rpm durante 264 horas. A contagem de células foi realizada em placas por UFC (Unidades Formadoras de Colônias).

Obtenção das enzimas

Amostras dos cultivos foram retiradas em intervalos prédeterminados para análises posteriores. As amostras foram centrifugadas em uma centrífuga da marca HERMLEZ 382K-a 5.000 g por 15 minutos a 4 °C para obtenção do sobrenadante isento de células (extrato bruto).

Purificação parcial das enzimas

Para a purificação parcial das enzimas, o sobrenadante livre de células foi tratado com NH_4SO_4 60% e após 18 horas de repouso a 4°C, foi novamente centrifugado a 9000g por 30min. Em seguida o precipitado formado foi ressuspenso em tampão tris/HCl 0,01M, pH 7,5, e dialisado em membrana contra o mesmo tampão a 4°C por 18horas.

Determinação da produção de carboximetilcelulase e avicelase por meio de ensaio enzimático

A atividade da enzima carboximetilcelulase (EC 3.2.1.4) foi medida por meio da quantificação da liberação de açúcares redutores da hidrólise de carboximetilcelulose (Sigma). A mistura de reação que continha 0,5 ml de solução de substrato (1%, p/v) preparado em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,0, e 0,5 mL de

solução de enzima foi incubada a 70 °C. A enzima e os ensaios em branco também foram simultaneamente incubados com amostras de teste. Após 10 min de reação, 1 mL de ácido dinitrossalicílico (DNS) foi adicionado e deixado em ebulição em banho-maria durante 5 min para paralisar a reação. As amostras resultantes foram, em seguida resfriadas em banho de gelo, e a absorvância foi medida a 540 nm (Miller, 1959). Uma unidade (U) de atividade de CMCase foi definida como 1 micromol de glicose equivalente liberado por minuto sob as condições de ensaio acima descritos, usando uma curva padrão de glicose.

A atividade da enzima avicelase (EC 3.2.1.91) foi medida pela quantificação da liberação de açúcares redutores da hidrólise de avicel (PH-101, Sigma-cell 20). A mistura de reação que continha 0,5 ml de solução de substrato (1%, m/v) preparado em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, e 0,5 mL de solução de enzima foi incubada a 70 °C. A enzima e os ensaios em branco também foram simultaneamente incubados com amostras de teste. Após 10 min de reação, 1 mL de ácido dinitrossalicílico (DNS) foi adicionado e deixado em ebulição em banho-maria durante 5 min. As amostras resultantes foram, em seguida resfriadas em banho de gelo, e a absorvância foi medida a 540 nm (Miller, 1959). Uma unidade (U) de atividade de avicelase foi definida como 1 micromol de glicose equivalente liberado por minuto sob as condições de ensaio acima descritos, usando uma curva padrão de glicose.

Determinação da proteína

A dosagem de proteína nos filtrados da cultura foi medida pelo método de Lowry modificado por Peterson (Peterson, 1977), usando albumina de soro bovino (BSA) como um padrão.

Efeito do pH na atividade e estabilidade das enzimas

O pH ótimo das enzimas secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 foi estimado no intervalo de pH de 4,0-11,0 utilizando tampões de ensaio diferentes. O ensaio das enzimas foi conduzido com o substrato (carboximetilcelulose ou avicel) dissolvido em tampões diferentes (fosfato-citrato, pH 4,0-6,5, fosfato de sódio, pH 7,0-7,5, Tris-HCl, pH 8,0-9,0 e bórax-NaOH, pH 9,5-11,0). A atividade das

enzimas obtidas no pH ótimo foi utilizada para calcular a atividade das enzimas em termos de porcentagem relativa em relação a outros valores de pH. O efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas foi determinado por meio da pré-incubação do extrato enzimático, sem substrato, a diferentes valores de pH (4,0-11,0) por 3 h à temperatura ambiente, e medindo a atividade enzimática residual em condições de ensaio padrão no pH ótimo.

Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas

O efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas foi determinado realizando o procedimento de ensaio padrão a uma faixa de temperatura de 30-90 °C, com intervalos de 10 °C. A atividade das enzimas obtida à temperatura ótima foi utilizada para calcular a atividade enzimática relativa percentual em outros valores de temperatura. A estabilidade térmica das enzimas secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 foi testada por determinação da atividade de enzima remanescente após incubação da enzima em banho-maria à temperatura de 30-90 °C, por 3 h. A atividade residual foi determinada sob condições de pH e temperatura ótima, como descrito acima. A atividade inicial foi assumida como sendo 100% e utilizada para calcular a atividade da enzima como porcentagem da atividade inicial durante o período de incubação.

Efeito de íons na estabilidade das enzimas

O efeito dos íons metálicos como Ba⁺² (BaCl₂), Cs⁺² (CsCl), Ni⁺² (NiCl₂), Cu⁺² (CuSO₄), Fe⁺² (FeSO₄), K⁺ (KCl), Na⁺ (NaCl), Hg⁺² (HgCl₂), Ca⁺² (CaCl₂), Mn⁺² (MnCl₂), Mg⁺² (MgCl₂), Co⁺² (CoCl₂) e Zn⁺² (ZnCl₂) sobre a atividade das enzimas foi determinado. Os extratos enzimáticos foram pré-incubados com a concentração final de 1 mM do sal correspondente em tampão fosfato de sódio, pH 7,0 a 40 °C durante 15 min e a reação foi realizada em condições de ensaio padrão. A atividade relativa foi medida.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos como valores médios.

Aplicação do extrato enzimático na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar

Com o intuito de avaliar a capacidade das enzimas produzidas em sacarificar o bagaço de cana-de-açúcar tratado e o bagaço de cana-de-açúcar não tratado, bem como comparar a hidrólise realizada pelo mesmo extrato adicionado de íons Co^{+2} , o bagaço foi submetido, após cada tratamento, à hidrólise destas enzimas.

Todas as hidrólises foram realizadas em frascos Erlenmeyers contendo 1 grama do bagaço de cana e 20 ml de extrato enzimático (puro e adicionado de Co^{+2} na concentração de 1mM), de forma que a carga de enzimas foi de: 12U de xilanase, 16U de avicelase e 6,2U de carboximetilcelulase, por grama de bagaço de cana. Assim, os tratamentos testados foram:

Tratamento 1 (controle): Bagaço de cana-de-açúcar (com e sem tratamento alcalino e/ou ácido) + água destilada estéril;

Tratamento 2: Bagaço de cana-de-açúcar (com e sem tratamento alcalino e/ou ácido) + extrato enzimático esterilizado por ultramembrana;

Tratamento 3: Bagaço de cana-de-açúcar (com e sem tratamento alcalino e/ou ácido) + extrato enzimático estéril + 1mM de solução de Co^{+2} ;

Os frascos foram levados ao shaker rotatório por 72 horas a 50°C e 80 rpm. Após este período as amostras foram retiradas, centrifugadas por 15 min na rotação de 10.000 rpm e o teor de açúcar redutor contido nas amostras foi quantificado pelo método do DNS (Miller, 1959).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição do bagaço de cana-de-açúcar

Os teores de celulose, hemicelulose e lignina no bagaço de cana utilizado neste trabalho estão mostrados na Tabela 1. Como pode-se observar os teores foram similares aos encontrados no bagaço de cana analisado por vários autores (Canilha et al., 2007; Rabelo, 2007; Rodrigues, 2007). A constituição química do bagaço depende de diversos fatores entre eles o tipo de solo, a variedade de cana, as técnicas de colheita e o manuseio empregado (Hamelink et al., 2005).

Tabela 1. Teores de Celulose, Hemicelulose e Lignina no bagaço de cana “in natura” e tratado com álcali e com álcali e ácido

| Tratamentos | Celulose (%) | Hemicelulose (%) | Lignina (%) |
|---|--------------|------------------|-------------|
| Bagaço sem tratamento (Literatura) | 32-48 | 19-28 | 20-26 |
| Bagaço sem tratamento | 42,42 | 28,96 | 18,61 |
| Bagaço tratado com KOH | 81,05 | 18,75 | 5,45 |
| Bagaço tratado com KOH e H ₂ SO ₄ | 91,57 | 9,82 | 4,73 |

Perfil do crescimento e da atividade das enzimas avicelase e carboximetilcelulase (CMCase) no meio de cultura contendo bagaço de cana e suplementado com água de maceração de milho.

A fim de determinar o tempo ideal de fermentação para a produção das enzimas avicelase e CMCase, ou seja, o tempo de incubação do micro-organismo no qual se obtém produtividade enzimática máxima, *Bacillus* sp. SMIA-2 foi cultivado por 264 horas em meio de cultivo contendo bagaço de cana como fonte de carbono suplementado com água de maceração de milho (Fig. 1).

O crescimento da bactéria foi monitorado tanto pela leitura da densidade ótica do meio de cultura, quanto pela contagem de células viáveis em placas de petri em diferentes tempos de cultivo. *Bacillus* sp. SMIA-2 apresentou taxa de crescimento muito rápida aumentando progressivamente em relação ao tempo de cultivo até o tempo de 12 horas. Após este tempo, a taxa de crescimento permaneceu inalterada até 72 horas e a partir deste tempo o número de células viáveis decresceu.

O pH do meio de cultura aumentou com o início do desenvolvimento microbiano, provavelmente devido ao consumo de nitrogênio orgânico, como aminoácidos e peptídeos decorrentes da utilização da água de maceração de milho, e estabilizou próximo a 8,5 até 120 horas de incubação da cultura. Posteriormente, os valores do pH do meio declinaram para aproximadamente 7,8, o que pode ter ocorrido devido à produção de alguns ácidos pela bactéria

decorrentes da utilização de açúcares presentes no meio de cultura e permaneceu o mesmo até o final da fermentação.

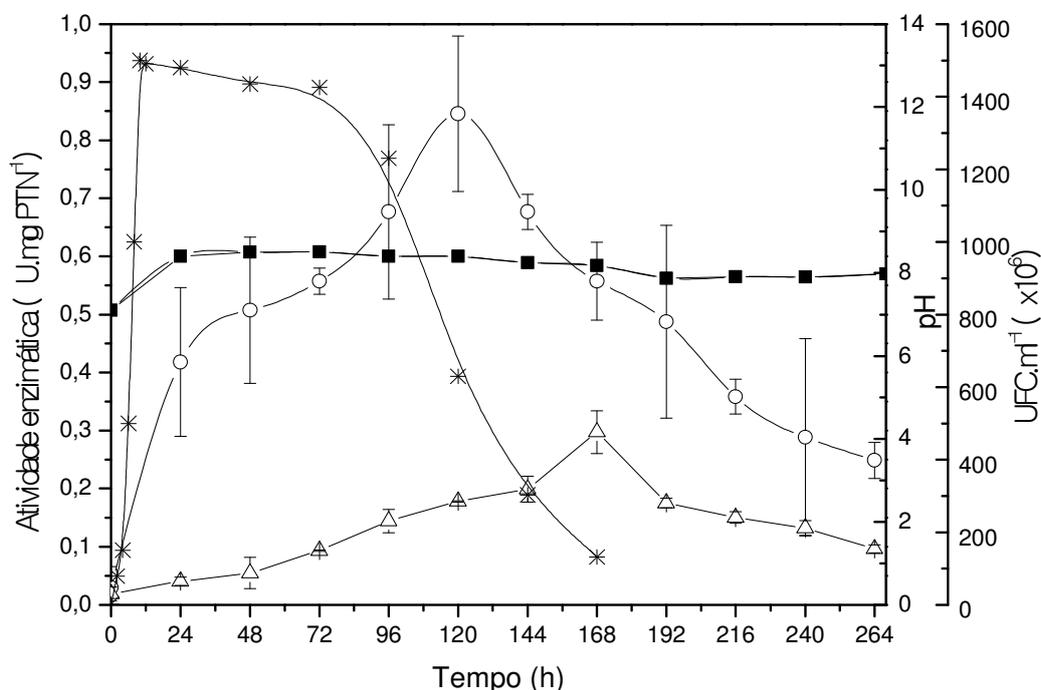


Figura 1. Crescimento (*), pH(■) e atividade da Avicelase (○) e Carboximetilcelulase (Δ), secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2, quando cultivado em meio líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (5,0 g.L⁻¹) e água de maceração de milho (5,0 g.L⁻¹) por 264 horas a 50 °C.

As análises das atividades das enzimas avicelase e CMCCase no sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. SMIA-2 contendo bagaço de cana e água de maceração de milho, utilizando avicel e carboximetilcelulose como substratos, respectivamente, revelaram que este micro-organismo foi capaz de secretar ambas as enzimas celulolíticas.

As máximas atividades da avicelase e CMCCase foram alcançadas após 120 horas e 168 horas de incubação do micro-organismo, com níveis de 0,85 e 0,30 U.mg proteína⁻¹ respectivamente, quando o crescimento já havia sido cessado e a cultura se encontrava na fase de declínio (Figura 1). Um comportamento similar foi observado para as celulasas de *Curvularia lunata* e de *Bacillus subtilis* em que a atividade destas enzimas aumentou durante a fase exponencial de crescimento,

alcançando os níveis máximos quando as culturas estavam na fase estacionária de crescimento (Assunção et al., 2006).

A partir da Fig. 1 pode-se observar, através de uma análise conjunta dos perfis de produção de avicelase e CMCCase ao longo do tempo de cultivo da bactéria, que ambas as enzimas foram produzidas simultaneamente, embora os níveis de atividade da avicelase foram maiores que os da CMCCase. Isto sugere que os perfis da avicelase e da CMCCase estão mais próximos de um perfil constitutivo de expressão enzimática.

Uma das características interessantes de espécies do gênero *Bacillus* é a sua habilidade para degradar substratos amorfos tais como a carboximetilcelulase, apesar de sua incapacidade para degradar Avicel (Makky, 2009). Por isso, poucos estudos reportam a produção de celulasas na presença de celulose microcristalina (avicel) (Ratanakhanokchai, 2007). Entretanto, *Bacillus* sp. SMIA-2 também mostrou capacidade para sintetizar a avicelase, quando cultivado em meio de cultura contendo bagaço de cana como fonte de carbono. De acordo com Susumu (1997), os membros do gênero *Bacillus* normalmente requerem carboximetilcelulose para a produção de celulasas. Entretanto, *Bacillus* sp. KSM-635 produziu celulase quase constitutivamente, em termos de quantidade, em hidratos de carbono diferentes, e aparentemente nenhum padrão foi observado em relação à estrutura ou composição da fonte de carbono utilizada.

De acordo com Kubicek (2009), as celulasas, assim como as demais hidrolases extracelulares, são induzidas quando há a necessidade de serem secretadas pelos micro-organismos, para que estes cresçam em celulose. Na síntese das enzimas do complexo celulolítico pelos fungos *Trichoderma reesei* Rut C30 e *Humicola grisea* var. *thermoidea*, não foi observada correlação direta com a fonte de carbono utilizada para a indução, visto que mesmo quando as linhagens foram cultivadas na presença apenas de celobiose como substrato, endoglucanases (CMCase) e exoglucanases (avicelases) também foram excretadas pelas células.

Produção das enzimas avicelase e CMCCase no bagaço de cana tratado

Muitos pesquisadores que estudaram sobre a produção de celulases por micro-organismos utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, usaram este resíduo lignocelulósico após algum pré-tratamento físico ou químico e obtiveram sucesso na produção enzimática (Kocher et al., 2008; Acharya et al., 2008; Sukumaran, 2010). O propósito do pré-tratamento é a remoção de parte da lignina e hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose e o aumento da porosidade dos materiais lignocelulósicos (Singh et al., 2009). De fato, quando se tratou o bagaço de cana com KOH e com KOH e H₂SO₄, os resultados alcançados foram bastante satisfatórios uma vez que os teores de celulose aumentaram e os de hemicelulose e lignina reduziram (Tabela 1). No bagaço tratado com KOH e com KOH e H₂SO₄ os teores de celulose dobraram e em relação à lignina, para ambos os tratamentos foi observada uma queda de quase 4 vezes nos valores deste componente, quando comparado com os teores no bagaço sem tratamento. Entretanto, em relação à produção da avicelase e CMCase pela bactéria, não foi observado diferenças na atividade das mesmas, quando foi utilizado como substrato, o bagaço de cana tratado com KOH. Além disso, quando foi utilizado o bagaço tratado com KOH e H₂SO₄, os níveis de atividade da avicelase e CMCases foram reduzidos em relação à utilização do bagaço não tratado.

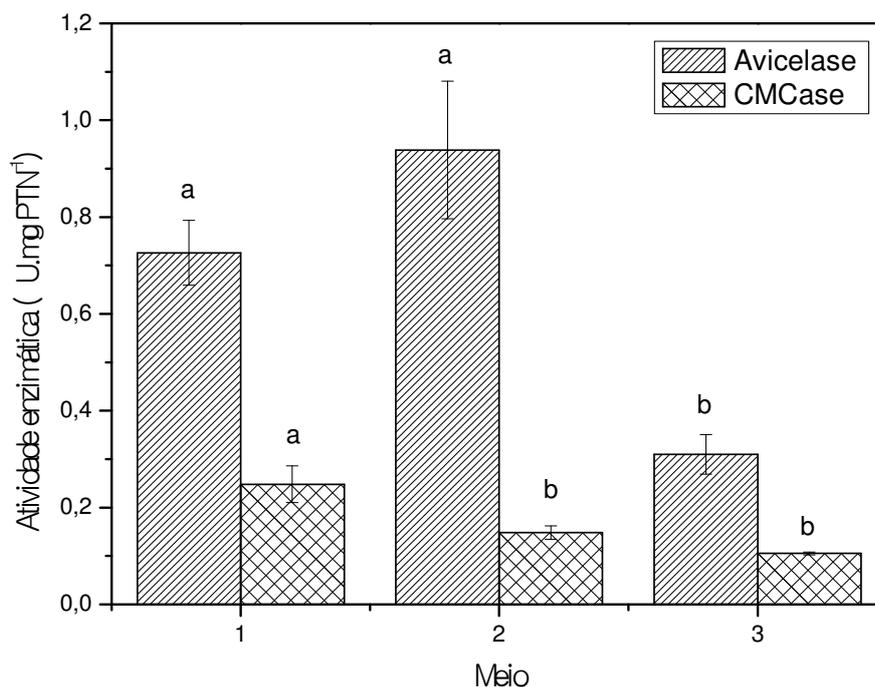


Figura 2. Atividade enzimática da avicelase e CMCCase em meio de cultura contendo o bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento (1), tratado com álcali (2) e tratado com álcali e depois com ácido (3). * Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 95% de probabilidade pelo teste de Tukey.

De acordo com Sun e Cheng (2002) e Mosier et al. (2005), as etapas de pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos, apresentam algumas desvantagens como o aumento do custo do processo. Além disso, no caso dos tratamentos químicos, existe a possibilidade de liberação de subprodutos indesejáveis que podem inibir os micro-organismos nas etapas seguintes do processo, além da liberação de efluentes tóxicos. Tais características fazem com que ainda seja interessante o desenvolvimento de pesquisas a fim de se alcançar bons resultados de produção enzimática com a utilização de substratos sem sofrer tratamentos químicos, já que são indutores baratos para a produção enzimática por micro-organismos.

Purificação parcial das celulasas

A purificação de uma enzima oferece a possibilidade de estudar mais detalhadamente as características desta proteína. Este processo além de remover as impurezas indesejadas, concentra a proteína e possibilita torná-la menos vulnerável, já que ela acaba sendo transferida para um ambiente mais estável.

As enzimas secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 foram parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônio (60% saturação) seguido da diálise. Na Tabela 3 e Tabela 4 estão representados os valores de atividade, a quantidade de proteína e o grau de purificação de cada etapa do processo de purificação da avicelase e CMCCase, respectivamente.

Como muitos extratos brutos enzimáticos, o extrato contendo as enzimas apresentou uma concentração elevada de proteínas. A avicelase obtida mostrou atividade inicial específica de 0,790 U.mg⁻¹ proteína. No entanto, depois das etapas de purificação a atividade específica foi de 4,7 U.mg⁻¹ proteína, o que corresponde aproximadamente a 5 vezes a purificação.

Tabela 2. Purificação parcial de avicelase de *Bacillus* sp. SMIA-2

| Tratamento | Atividade total (U) | Atividade (U.mL ⁻¹) | Proteína (mg.mL ⁻¹) | Atividade específica (U.mg ptn ⁻¹) |
|---------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|
| Extrato bruto | 2501,1 | 0,794 | 1,005 | 0,790 |
| Precipitado | 225,3 | 1,408 | 0,805 | 1,748 |
| Dialisado | 229,5 | 1,35 | 0,286 | 4,705 |

Em relação a CMCCase, a enzima obtida mostrou atividade inicial específica de 0,304 U.mg⁻¹. No entanto, depois das etapas de purificação a atividade específica da CMCCase foi de 1,3 U.mg⁻¹ proteína, o que corresponde aproximadamente a 5 vezes a purificação. O aumento da atividade específica mostrou que as proteínas e outros compostos indesejáveis foram removidos do extrato enzimático obtido.

Tabela 3. Purificação parcial de CMCase de *Bacillus* sp. SMIA-2

| Tratamento | Atividade total (U) | Atividade (U.mL ⁻¹) | Proteína (mg.mL ⁻¹) | Atividade específica (U.mg ptn ⁻¹) |
|---------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|
| Extrato bruto | 963,9 | 0,306 | 1,005 | 0,304 |
| Precipitado | 67,20 | 0,420 | 0,805 | 0,521 |
| Dialisado | 63,24 | 0,372 | 0,286 | 1,30 |

Efeito do pH na atividade e estabilidade das celulases

A faixa de pH entre 4,0 e 11,0 foi usada para estudar o efeito do pH sobre a atividade das enzimas (Figura 3). A avicelase secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 foi capaz de apresentar um bom desempenho dentro de uma faixa de pH entre 6,0-9,0. A avicelase no extrato bruto mostrou o seu pH ótimo em 8,5, já a avicelase no extrato precipitado e dialisado mostrou o seu pH ótimo em 7,5. Estes valores de pH ótimo foram um pouco maiores do que o relatado por Makky (2009) para a linhagem de *Geobacillus stearothermophilus*, que era pH 7,0. O extrato enzimático bruto manteve mais de 70% da sua atividade máxima após a incubação à temperatura ambiente durante 3 h, a pH 6,0-8,5, sendo desta forma estável a uma ampla faixa de pH.

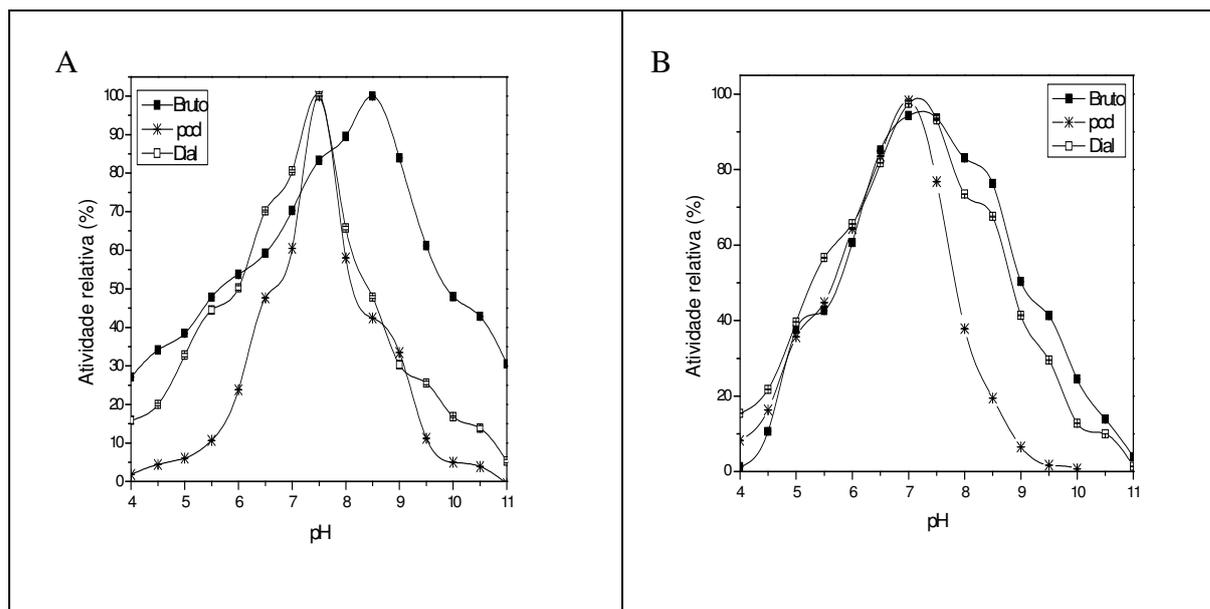


Figura 3. pH ótimo (A) e estabilidade ao pH (B) da avicelase em extrato bruto (■), extrato precipitado (★) e extrato dialisado (□) secretada pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (5 g.L^{-1}) e água de maceração de milho (5 g.L^{-1}). (100% de atividade = $0,996 \text{ U.mg ptn}^{-1}$ - bruto; $1,553 \text{ U.mg ptn}^{-1}$ - precipitado e $3,994 \text{ U.mg ptn}^{-1}$ - dialisado)

A CMCCase secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 foi capaz de apresentar um bom desempenho dentro de uma gama de pH entre 5,0-10,0 (figura 4). A CMCCase no extrato bruto mostrou o seu pH ótimo em 9,0, já a CMCCase no extrato precipitado e dialisado mostrou o seu pH ótimo em 8,0, resultado este parecido com o de uma endocelulase isolada a partir de uma estirpe de *Bacillus alcalifilica*, *Bacillus agaradhaerens* JAM-KU023, que mostrou seu pH ótimo a partir de 7 - 9,4 (Hirasawa et al., 2006).

Os extratos enzimáticos mantiveram mais de 60% da atividade máxima de CMCCase após a incubação à temperatura ambiente durante 3 h, a pH 6,0-9,0. A estabilidade ao longo de um amplo intervalo de pH parece ser característica de endoglucanases de *Bacillus* (Mawadza et al., 2000).

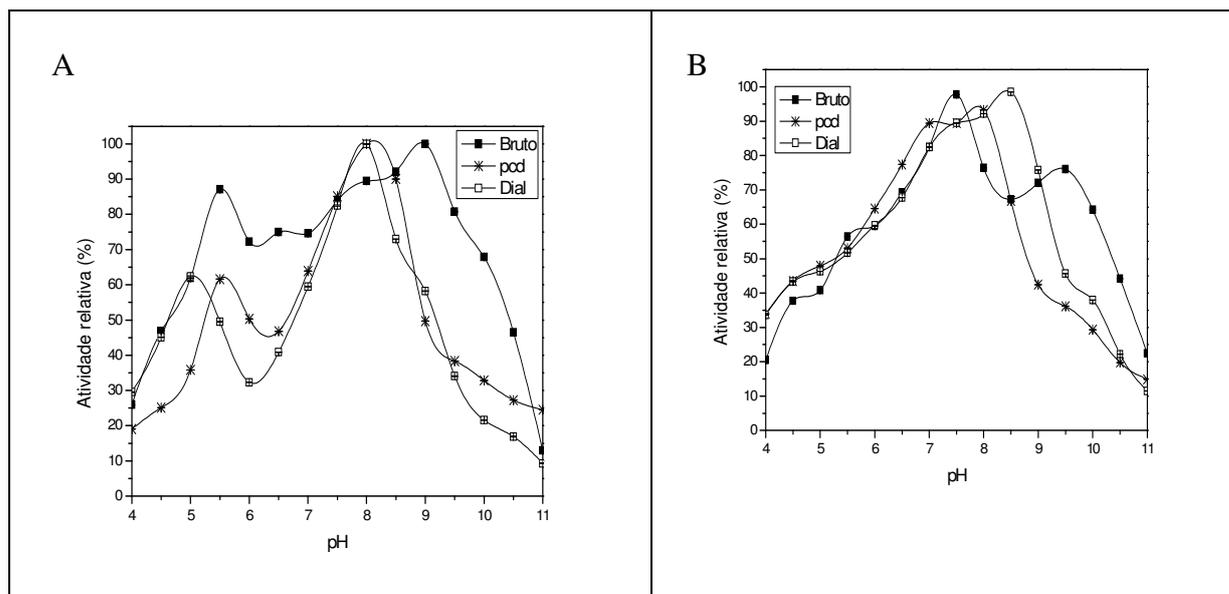


Figura 4. pH ótimo (A) e estabilidade ao pH (B) da CMCase em extrato bruto (■), extrato precipitado (★) e extrato dialisado (□) secretada pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (5 g.L⁻¹) e água de maceração de milho (5 g.L⁻¹). (100% de atividade = 0,315 U.mg ptn⁻¹- bruto; 0,501 U.mg ptn⁻¹- precipitado e 1,137 U.mg ptn⁻¹- dialisado).

A remoção das proteases e os fragmentos de proteínas frequentemente presentes no extrato bruto, o qual, em alguns casos pode ser considerado como a enzima de estabilização de substâncias, poderia promover a susceptibilidade da atividade enzimática de alterações nos valores de pH (Braga et al, 2012). Estas alterações mostram a importância de estudar as propriedades de ambas as enzimas, em extrato bruto e purificada, já que, dependendo da enzima e sua aplicação, a purificação pode ser apropriada ou não.

Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas

O efeito da temperatura na atividade e estabilidade das celulases de *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em bagaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho foram testadas (Figuras 5 e 6). As atividades da avicelase (extrato bruto, precipitado e dialisado) aumentaram com a temperatura dentro da faixa de 30 °C a 70 °C (Figura 5A). Uma redução na atividade das avicelases foi observada a valores superiores a 70 °C. A temperatura ótima da avicelase foi 70

°C e a 80 °C, a enzima bruta e precipitada ainda mantinha 90% da sua atividade máxima. Ao comparar este valor com os trabalhos disponíveis sobre a atividade de avicelase bruto na literatura, verificou-se que o *Bacillus* sp. SMIA-2 em estudo tem uma temperatura ideal para a atividade da avicelase semelhante aos relatados na literatura para outras linhagens de *Bacillus* (Mawadza et al., 2000, Liang et al., 2010, Assareh et al., 2012).

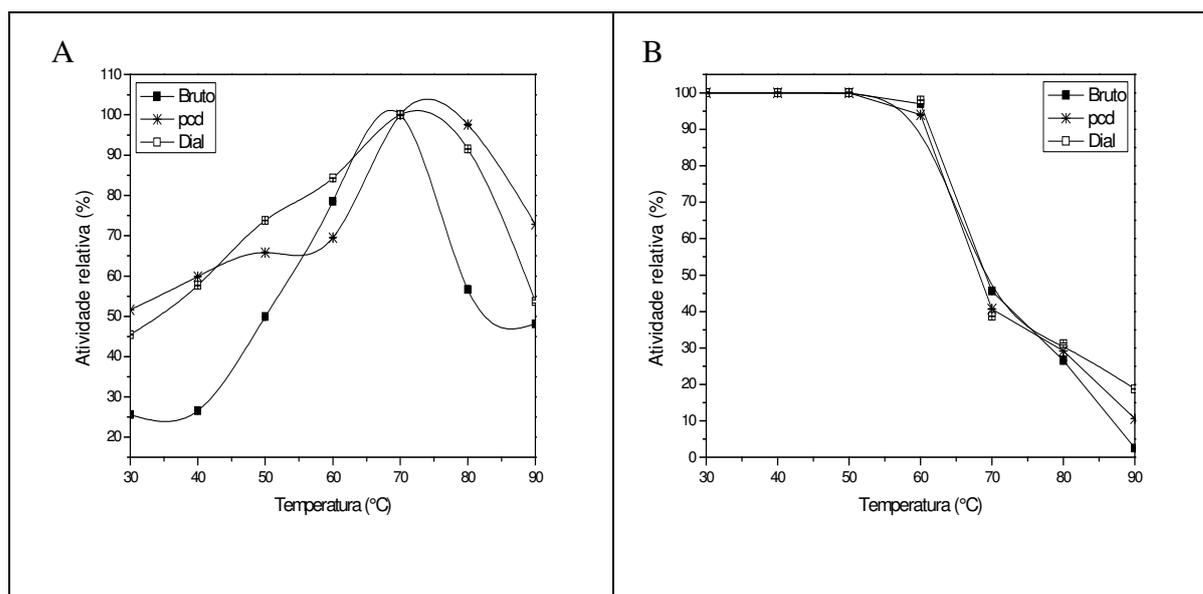


Figura 5. Temperatura ótima (A) e estabilidade térmica (B) da avicelase em extrato bruto (■), extrato precipitado (★) e extrato dialisado (□), secretada pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (5 g.L⁻¹) e água de maceração de milho (5 g.L⁻¹), durante 3 horas a pH 7,0. (100% de atividade = 0,790 U.mg ptn⁻¹- bruto; 1,748 U.mg ptn⁻¹- precipitado e 4,705 U.mg ptn⁻¹- dialisado).

O efeito da temperatura na estabilidade da avicelase é mostrado na Figura 5 (B). A enzima permaneceu mais de 90% estável até temperaturas menores que 60 °C, com forte queda de atividade a partir desta temperatura. A 70 °C, em torno de 40% da atividade máxima da avicelase foi ainda detectada após o tratamento para a avicelase em extrato bruto, precipitado e dialisado.

CMCase de *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em bagaço de cana e água de maceração de milho foi significativamente ativo na faixa de temperatura testada

(Figura 6). As atividades da enzima (extrato bruto, precipitado e dialisado) aumentaram com a temperatura dentro da faixa de 30 °C a 70 °C (Fig. 6A). Uma redução na atividade das enzimas foi observada a valores superiores a 70 °C. A temperatura ótima da CMCCase foi a 70 °C e níveis de atividade de cerca de 40% foram detectados a 90 °C. Ao comparar este valor com outros trabalhos disponíveis sobre a atividade de CMCCase bruta na literatura, verificou-se que *Bacillus* sp. SMIA-2 em estudo tem uma temperatura ótima semelhante aos relatados na literatura para outras linhagens de *Bacillus* (Assareh et al., 2012).

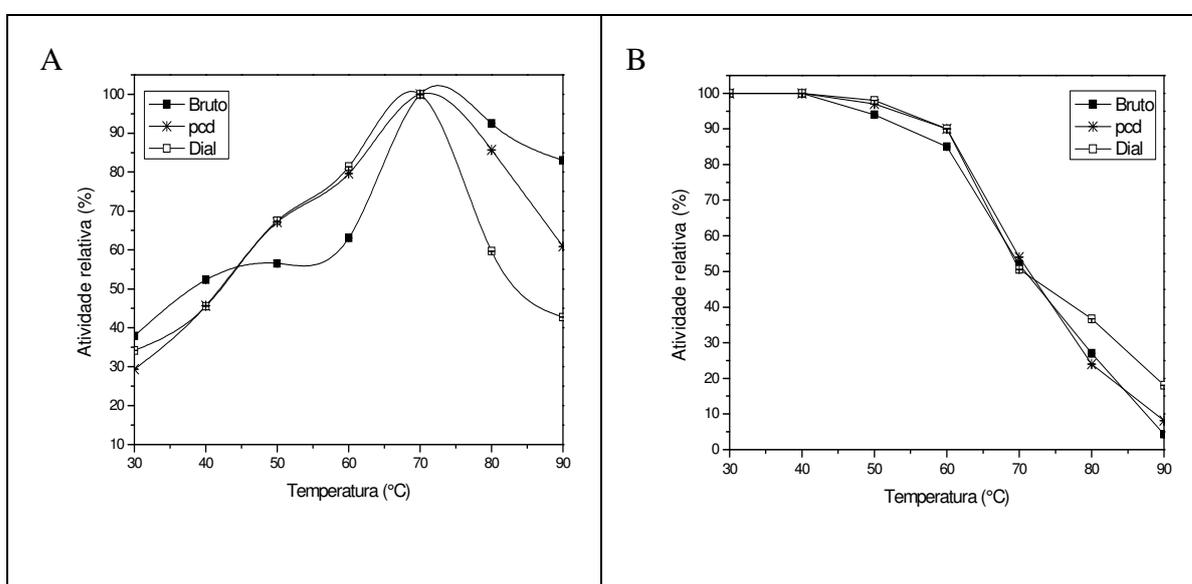


Figura 6. Temperatura ótima (A) e estabilidade térmica (B) da CMCCase em extrato bruto (■), extrato precipitado (★) e extrato dialisado (□), secretado pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (5 g.L⁻¹) e água de maceração de milho (5 g.L⁻¹). (100% de atividade = 0,304 U.mg ptn⁻¹-bruto; 0,521 U.mg ptn⁻¹- precipitado e 1,3 U.mg ptn⁻¹- dialisado).

O efeito da temperatura na estabilidade da enzima é mostrado na Fig. 6 (B). A enzima permaneceu mais de 90% estável até temperaturas menores que 60 °C, com forte queda de atividade a partir desta temperatura. A 70 °C, em torno de 50% da atividade máxima de CMCCase foi ainda detectada após o tratamento para a enzima em extrato bruto, precipitado e dialisado. O que demonstra que a enzima investigada apresentou boa termoestabilidade.

Carboximetilcelulase tem sido amplamente detectada em bactérias e fungos filamentosos. A maioria delas apresenta atividade ótima em temperaturas inferiores a 50 °C, desta forma CMCase ativa a temperaturas mais elevadas é de grande interesse nas indústrias (Lee et al., 2010).

Uma endocelulase termoestável de *Bacillus subtilis* DR, extraído de uma fonte quente, apresentou temperatura ótima a 50 °C e manteve 70% da sua atividade máxima a 75 °C após incubação durante 30 minutos (Li et al., 2008).

É sabido que as condições de crescimento e da natureza do meio podem estabilizar a enzima contra a desnaturação térmica. A presença de protease induzida pela composição diferente da do meio pode também afetar a estabilidade da enzima (Gomes et al., 2000).

Cultivo de termófilos oferece várias vantagens, visto que reduz o risco de contaminação, reduz a viscosidade e conduz a um elevado grau de solubilidade do substrato, tornando as reações mais rápidas, enquanto reduz o custo de resfriamento. Estas tornaram-se importantes propriedades depois que as celulases começaram a ser usadas em aplicações industriais, como a bioconversão de lignocelulose (Makky, 2009).

Efeito de íons na estabilidade das celulases

O efeito de alguns íons metálicos sobre a atividade das enzimas foi estudado. Cobalto (II) estimulou a atividade enzimática da avicelase (Tabela 4) aumentando-se para 125%, 135% e 146% da atividade inicial para a presença de Co^{+2} na concentração final de 1 mM no extrato bruto, precipitado e dialisado da enzima, respectivamente.

Tabela 4. Efeito de diferentes íons na atividade da avicelase

| Íons | Atividade relativa (%) - Extrato bruto | Atividade relativa (%) - Extrato precipitado | Atividade relativa (%) - Extrato dialisado |
|------------------|--|--|--|
| Controle | 100 | 100 | 100 |
| Ca ²⁺ | 113,4 | 116,6 | 98,2 |
| K ⁺ | 108,6 | 113,8 | 87,4 |
| Ba ²⁺ | 109,0 | 113,0 | 85,5 |
| Cs ²⁺ | 99,8 | 90,8 | 83,6 |
| Hg ²⁺ | 62,4 | 91,9 | 93,2 |
| Ni ²⁺ | 90,2 | 100,3 | 94,3 |
| Cu ²⁺ | 72,2 | 84,3 | 82,9 |
| Zn ²⁺ | 98,8 | 96,0 | 84,6 |
| Mn ²⁺ | 129,0 | 117,0 | 96,2 |
| Fe ²⁺ | 57,2 | 62,4 | 88,4 |
| Mg ²⁺ | 90 | 123,8 | 81,0 |
| Co ²⁺ | 125,8 | 135,2 | 146,7 |
| Na ⁺ | 92,1 | 104,7 | 103,3 |

*100% de atividade = 0,985 U.mg ptn⁻¹- bruto; 1,229 U.mg ptn⁻¹- precipitado e 3,63 U.mg ptn⁻¹- dialisado.

Manganês e Cobalto (II) estimularam a atividade enzimática da CMCase (Tabela 5), sendo que o Cobalto foi o íon que apresentou o efeito mais relevante sobre a atividade da enzima, aumentando-se para 248%, 173% e 238% da atividade inicial para a presença de Co⁺² na concentração final de 1 mM no extrato bruto, precipitado e dialisado da enzima, respectivamente.

Tabela 5. Efeito de diferentes íons na atividade da CMCase

| Íons | Atividade relativa (%) - Extrato bruto | Atividade relativa (%) - Extrato precipitado | Atividade relativa (%) - Extrato dialisado |
|------------------|--|--|--|
| Controle | 100 | 100 | 100 |
| Ca ²⁺ | 145,5 | 100,7 | 110,4 |
| K ⁺ | 91,0 | 106,2 | 97,5 |
| Ba ²⁺ | 94,1 | 159,8 | 83,9 |
| Cs ²⁺ | 84,8 | 94,6 | 90,5 |
| Hg ²⁺ | 69,6 | 109,0 | 109,4 |
| Ni ²⁺ | 91,8 | 89,7 | 103,4 |
| Cu ²⁺ | 118,6 | 96,8 | 98,2 |
| Zn ²⁺ | 96,5 | 98,0 | 101,0 |
| Mn ²⁺ | 194 | 102,5 | 126,2 |
| Fe ²⁺ | 127,2 | 95,4 | 95,1 |
| Mg ²⁺ | 84,4 | 86,9 | 86,3 |
| Co ²⁺ | 248 | 173,2 | 238,0 |
| Na ⁺ | 94,5 | 100,2 | 96,8 |

*100% de atividade = 0,256 U.mg ptn⁻¹- bruto; 0,461 U.mg ptn⁻¹- precipitado e 1,055 U.mg ptn⁻¹- dialisado.

Enzimas microbianas extracelulares são geralmente conhecidas por exigirem cations divalentes para a atividade e sua estabilização. A enzima foi estimulada por Co⁺², que é de grande ocorrência em sistemas biológicos. Lin (2012) descobriu que, em estirpes de *Bacillus thuringiensis* a atividade de celulase foi aumentada por Mn⁺².

Aplicação do extrato enzimático na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar

Para verificar qual o pré-tratamento foi o mais eficaz em termos de acessibilidade das enzimas ao substrato, a hidrólise foi conduzida a partir do bagaço com e sem o pré-tratamento. Após 72 h de hidrólise a 40 °C verificou-se uma grande produção de açúcar redutor (125 mg/g de bagaço), quando utilizou-se o extrato enzimático adicionado de 1 mM de Co⁺² na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar tratado com solução alcalina, conforme a figura 7.

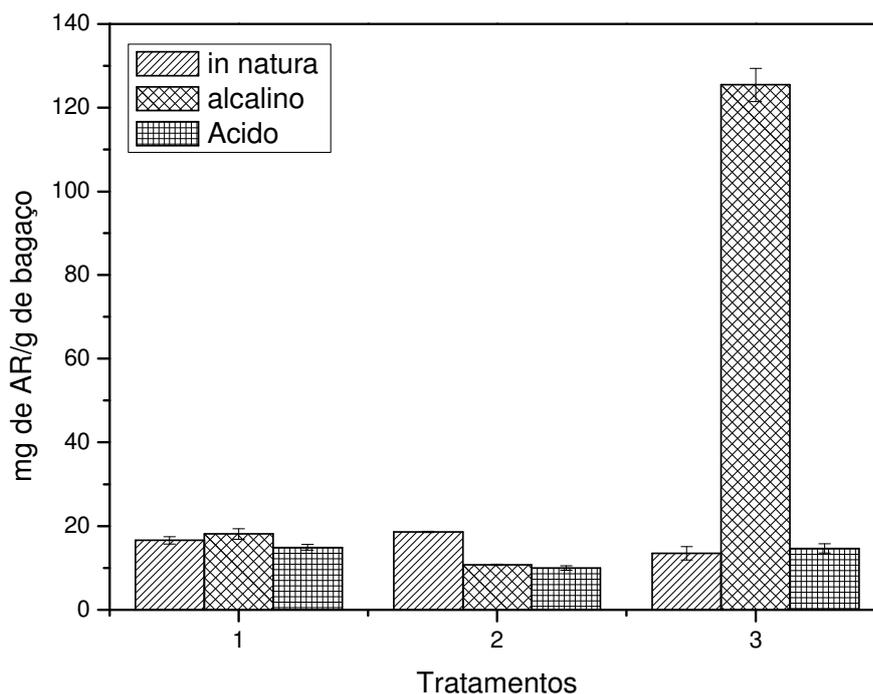


Figura 7. Hidrólise enzimática em bagaço de cana-de-açúcar, sendo: 1 (controle): Bagaço + água destilada estéril; 2: Bagaço + extrato enzimático estéril; 3: Bagaço + extrato enzimático estéril+ 1mM de Co^{+2} .

Foram observados níveis altos de produção de açúcar redutor (125 mg de AR/ g de bagaço de cana) quando o bagaço de cana-de-açúcar tratado com solução alcalina foi hidrolisado com extrato enzimático acrescido de 1mM de Co^{+2} por 72 horas a 50 °C.

Segundo Nakagame et al. (2011), a presença de lignina limita o processo de difusão da enzima no substrato, tanto pela diminuição da superfície de acesso a celulose, como pelas interações hidrofóbicas que a lignina faz com as celulasas, limitando consequentemente, a liberação de glicose. Vasquez et al. (2007) observaram o mesmo efeito quando analisaram a hidrólise do bagaço de cana submetida a pré-tratamento com ácido sulfúrico ou pré-tratamento ácido-álcali (ácido sulfúrico e hidróxido sódio).

CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que *Bacillus* sp SMIA-2 produz avicelase e CMCase usando resíduos de baixo custo, como o bagaço de cana-de-açúcar, quando suplementado com a água de maceração de milho. Uma observação bastante comum em bactérias do genero *Bacillus* é que não possuem o sistema de celulase completo, a atividade principal é de carboximetilcelulase (endoglucanase), que não hidrolisa a celulose cristalina (Mawadza et al., 2000).

Os resultados mostraram também a vantagem de utilizar bagaço de cana e água de maceração para a produção de enzimas por *Bacillus* sp. SMIA-2. O uso da biomassa lignocelulósica para a produção de celulase está a tornar-se uma tendência comum nos últimos anos, uma vez que reduz significativamente os custos de produção da enzima (Adsul et al., 2005). Além disso, água de maceração de milho, um grande subproduto da indústria de moagem de milho, é um substrato barato disponível em larga escala (Parekh et al., 1999), capaz de fornecer uma fonte de nitrogênio adicional, proporcionando peptídios e aminoácidos prontamente disponíveis para o metabolismo das células. Este resíduo barato tem sido utilizado com sucesso em determinados meios de cultura para a produção de celulase (Abdel-Fattah et al., 2007). No entanto, até o presente momento, esta é a primeira vez que tem sido relatado o uso de bagaço de cana combinado com água de maceração para a produção de celulases por *Bacillus* ou outro grupo de micro-organismo. Portanto, a co-utilização destes subprodutos é uma opção atraente para a produção destas enzimas por *Bacillus* sp. SMIA-2.

As características apresentadas pelas celulases de *Bacillus* sp. SMIA-2 em extrato bruto, precipitado e dialisado mostraram que estas enzimas podem apresentar comportamentos diferentes quando purificadas. Corroborando assim a importância de determinar as características desta enzima em seu extrato bruto e purificado para utilização em processos biotecnológicos, e considerar esta informação de acordo com as aplicações que se pretende.

As características apresentadas pelas avicelase e CMCase de *Bacillus* sp. SMIA-2 demonstram que estas enzimas podem ser muito úteis em aplicações biotecnológicas. Podendo se tornar uma fonte nova e interessante de enzimas de degradação de lignocelulose com importantes vantagens econômicas. De fato, os

resultados sobre o pH e os perfis de temperatura, além das características de estabilidade térmica em comparação com outros *Bacillus*, têm mostrado que a estirpe é promissora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Fattah, Y.R., El-Helow, E.R., Ghanem, K.M., Lotfy, W.A. (2007) Application of Factorial Designs for Optimization of Avicelase Production by a Thermophilic *Geobacillus* Isolate. *Research Journal of Microbiology*, 2:13-23.
- Acharya, P. B., Acharya, D. K., Modi, H. A. (2008) Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate. *African Journal of Biotechnology*, 7: 4147-4152.
- Adsul, M.G., Ghuleb, J.E., Singhb, R., Shaikhb, H. (2005) Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 62:6-10.
- Assareh, R., Zahiri, H.S., Noghabi, K.A., Aminzadeh, S., Khaniki, G.B. (2012) Characterization of the newly isolated *Geobacillus* sp. T1, the efficient cellulase-producer on untreated barley and wheat straws. *Bioresource Technology*, 120:99–105.
- Braga, A.R.C., Manera, A.P., Ores, J.C., Sala, L., Maugeri, F., Kali, S. J. (2012) Kinetics and Thermal Properties of Crude and Purified β -Galactosidase with Potential for the Production of Galactooligosaccharides.
- Canilha, L., Carvalho, W., Rocha, G. J. M., Almeida e Silva, J. B., Giulietti, M. (2007). Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura, extraído com etanol ou ciclohexano/etanol. In: *47º Congresso Brasileiro de Química - CBQ*, Disponível em: www.abq.org.br. Acessado em 20 jul. 2012.
- Cardona, C.A., Quintero, J.A., Paz, I.C. (2010) Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresour Technol.* 101:4754–4766.

- Castro, A.M., Pereira Jr.,N. (2010) Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quim. Nova*, 33:181-188.
- De Marco, G.E. (2012) *Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de Bacillus sp.* Dissertação-Porto Alegre-RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRS, 87p.
- Gomes, I., Gomes, J., Gomes, D.J., Steiner, W. (2000) Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and β -glucosidase by the wild thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *App Microbiol Biotechnol.* 53:461-468.
- Hamelinck, C. N. et al. (2005) Etanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long term. *Biomass and Bioenergy*, 28.
- Hirasawa, K., Uchimura, K., Kashiwa, M., Grant, W.D., Ito, S., Kobayashi, T., Horikoshi, K. (2006) Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89:211-219.
- Hofsetz, K., Silva, M.A. (2012) Brazilian sugarcane bagasse: energy and non-energy consumption. *Biomass Bioenergy*, 46:564-573
- Kim, Y., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., Holtzaple, M.T., Falls, M., Ramirez, R.S., Donohoe, B.S., Vinzant, T.B., Elander, R.T., Hames, B., Thomas, S., Warner, R.E., Wyman, C.E. (2011) Application of cellulase and hemicellulase to pure xylan, pure cellulose, and switchgrass solids from leading pretreatments. *Bioresource Technology*, 102:80–88.
- Karmakar, M., Ray, R.R. (2011) Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases. *Research Journal of Microbiology*, 6:41-53.
- Kocher, G.S., Kalra, K.L., Banta, G. (2008) Optimization of cellulase production by submerged fermentation of rice straw by *Trichoderma harzianum* Rut-C 8230. *The Internet J. Microbiol.*, 5.

- Kubicek, C.P., Mikus, M., Schuster, A., Schmoll, M., Seiboth, B. (2009) Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnology for Biofuels*, 2:19.
- Ladisich, M.R., K.W. Lin, M. Voloch, Tsao, G.T. (1983) Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Microb. Technol.*, 5:82-102.
- Lee, K., Jeya, M., Joo, A., Singh, R., Kim, I., Lee, J. (2010) Purification and characterization of a thermostable endo-beta-1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 46:206–211.
- Li, W., Zhang, W.W., Yang, M.M., Chen, Y.L. (2008) Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Mol Biotechnol.*, 2:195-201.
- Lima, U.A., Basso, L.C., Amorim, H.V. (2001) Produção de etanol. In: Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. (Ed.) *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher LTDA.
- Assunção, I.P., Lima, G.S.A., Amorim, E.P.R., Muniz, M.F.S., Endres, I. (2006) Ocorrência de *curvularia lunata* em jurubeba no estado de alagoas. *Summa phytopathologica*. 34:386-387.
- Lima, A.L.G., Nascimento, R.P., Bom, E.P.S., Coelho, R.R.R. (2005) Cellulase activity produced by *Streptomyces drozdowiczii* using low cost agro-industrial by-products and tests for biotechnological application. *Enz Microb Technol.* 37:272–277.
- Lin, L., Kan, X., Yan, H., Wang, D. (2012) Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15:1-7.
- Liang, Y., Yesuf, J., Schmitt, S., Bender, K., Bozzola, J. (2010) Study of cellulases from a newly isolated thermophilic and cellulolytic *Brevibacillus* sp. strain JXL. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 36:961-70.

- Makky, E.A. (2009) Avicelase Production by a Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* Isolated from Soil using Sugarcane Bagasse. *World Academy Science Engineering Technology*, 57:487-491.
- Mawadza,C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R., Mattiasson, B. (2000) Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology*, 83:177–187.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., Ladish, M. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Techonology*, 96:673-686.
- Muthukrishnan, R. (2007) Characterisation of cellulase from organisms isolated from rumen fluid. *Pharmaceutical Reviews*, 3.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-429.
- Nakagame, S., Chandra, R.P., Kadla, J.F., Saddler, J.N. (2011) The isolation, characterization and effect of lignin isolated from steam pretreated Douglas-fir on the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresource Technology*, 102:4507–4517.
- Parekh, M., Formanek, J., Blaschek, H.P. (1999) Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using a low-cost corn steep water based fermentation medium. *Applied Microbiol. Biotechnol*, 51:152-157.
- Peterson, G.L.A. (1977) Simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochem.*, 83:346-356.
- Peixoto, A.B. (2006) *Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas, 84p.
- Rabelo, S. C. (2007) Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-deaçúcar.

Dissertação (Mestrado)-Campinas-SP, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 93p.

Rodrigues, F. A. (2007) *Avaliação da tecnologia de hidrólise ácida de bagaço de cana*. Dissertação (Mestrado)- Campinas-SP, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 89p.

Scridevi, A., Narasimba, G., Reddy, B.R. (2009) Production of cellulases by *Aspergillus Niger* on natural na pretreated lignocellulosic wastes. *The internet Journal of Microbiology*. 7:1.

Singh, R., Varma, A.J., Laxman, R.S., Rao, M. (2009) Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: comparison with commercial cellulose. *Bioresource Technology*, 100:6679-6681.

Shabeb, M.S.A.,Younis, M.A.M., Hezayen,F.F., Nour-Eldein, M.A.(2010) Production of cellulase in low cost médium by *Bacillus Subtilis* KO strain. *Word Aplied science journal*, 8:35-42.

Shi, J., Ebrik, M.A., Yang, B., Garlock, R.J., Balan, V., Dale, B.E., Pallapolu, V.R., Lee, Y.Y., Kim, Y., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., Holtzapple, M.T., Falls, M., Ramirez, R.S., Donohoe, B.S., Vinzant, T.B., Elander, R.T., Hames, B., Thomas, S., Warner, R.E., Wyman, C.E. (2011) Application of cellulase and hemicellulase to pure xylan, pure cellulose, and switchgrass solids from leading pretreatments. *Bioresource Technology*, 102:80–88.

Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, A. (2010) Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microbial Technology*, 46:541-549.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. (2011) *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*. Technical Report NREL/TP-510-42618. 18p.

Socol, C.R., Vandenberghe, L.P.S., Medeiros, A.B.P., Karp, S.G., Buckeridge, M., Ramos, L.P., Pitarelo, A.P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L.M.F.,

- Ferrara, M.A., Bom, E.P.S., Moraes, L.M.P., Araújo, J.A., Torres, F.A.G. (2010) Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Bioresour Technol.*, 101:4820–4825
- Souza, A.N., Martins, M.L.L. (2001) Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32:271-275.
- Souza, C.J.A., Costa, D.A., Rodrigues, M.Q.R.B., Santos, A.F., Lopes, M.R., Abrantes, A.B.P., Costa, P.S., Silveira, W.B., Passos, F.M.L., Fietto, L.G. (2012) The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 109:63–69.
- Sukumaran, R.K., Surender, V.J., Sindhu, R., Binod, P., Janu, K.U., Sajna, K.V., Rajasree, K.P., Pandey, A. (2010) Lignocellulosic ethanol in India: Prospects, challenges and feedstock availability. *Bioresour Technol.*, 101:4826-33.
- Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresouce Technology*, 83:1-11.
- Susumu, I. (1997) Alkaline cellulases from alkaliphilic *Bacillus*: Enzymatic properties, genetics and application to detergents. *Extremophiles*, 1:61-66.
- Vasconcelos, A., Cavaco-Paulo, A. (2006) Enzymatic removal of cellulose from cotton/polyester fabric blends. *Cellulose*, 13:611-618.
- Vásquez, M. P., Silva, J., N.C., Souza, M. B., Pereira Jr., N. (2007) Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137:141-153.
- Zhang, P., Himmel, M.E., Mielenz, J.R. (2006) Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24:452-481.

4.3. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE XILANASES DE *BACILLUS* SP. SMIA-2 EM CULTURAS SUBMERSAS CONTENDO BAGAÇO DE CANA E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO

RESUMO

A cepa termofílica brasileira de *Bacillus* sp. SMIA-2 produziu bons níveis de xilanase em fermentação submersa, utilizando bagaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho como substratos de baixo custo. A produção de xilanase começou na fase de crescimento exponencial, atingindo um máximo a 72 h. Os estudos de caracterização indicaram que os valores de pH ótimo foram de 7,5; 7,0 e 7,0 para a xilanase em extrato bruto, precipitada e dialisada, respectivamente, e que a temperatura para uma atividade ótima da enzima foi de 70 °C nos três estados. Os resultados mostraram também que a enzima permaneceu 100% estável a 60 °C durante 3 horas e que foi estimulada por Mn^{2+} e Co^{2+} . Assim, a enzima extracelular secretada apresentou propriedades que atendem aquelas frequentemente necessárias em ambiente industrial.

ABSTRACT

The Brazilian strain of thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 produced good levels of xylanase in submerged fermentation using sugar cane bagasse and corn steep liquor as substrates for low cost. The xylanase production was started in the exponential growth phase, reaching a maximum at 72 h. The characterization studies indicated that the optimum pH values were 7.5, 7.0 and 7.0 for xylanase in the crude extract, precipitated and dialyzed, respectively, and the temperature for an optimal activity of the enzyme was 70 °C in the three states. The results also showed that the enzyme remained 100% stable at 60 °C for 3 hours and was stimulated by Mn^{2+} and Co^{2+} . Thus, the extracellular enzyme secreted had properties that meet those often required in industrial environments.

INTRODUÇÃO

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, representando cerca de 25-35% da biomassa lignocelulósica (Santos et al., 2012). A xilana, por sua vez, é o principal constituinte da hemicelulose. É formada por resíduos de xilopiranosil ligados por ligações do tipo 1,4-glicosídicas e apresenta um grande potencial para ser convertida em produtos de interesse comercial (Girio et al., 2010; Kumar et al, 2012).

A degradação microbiana da hemicelulose abrange uma diversidade de hidrolases glicosídicas com diferentes especificidades e modos de ação. Esse polissacarídeo se apresenta na natureza na forma insolúvel. Por isso, os microorganismos que o utilizam devem possuir enzimas extracelulares, livres, ou associadas à parede celular, para convertê-lo em produtos solúveis, que podem ser transportados para o interior da célula (Warren, 1996).

A hidrólise enzimática de xilanas ao seu principal monômero, xilose, é um processo complexo envolvendo um conjunto de enzimas que operam em sinergismo. Elas são classificadas como endo- e exo-xilanases. Endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8) cliva ligações glicosídicas produzindo xilo-oligossacarídeos e exo- β -1,4-xilosidase (EC 3.2.1.37) é responsável pela degradação final de xilo-oligossacarídeos em xilose (Girio et al., 2010; Kumar et al, 2012). Exo-xilanase é algumas vezes referida como xilanase extracelular (Hiremath e Patil, 2011).

Poucos são os micro-organismos que possuem o sistema xilanolítico completo, ou seja, todas as enzimas necessárias para a completa degradação das heteroxilanas. A maioria das bactérias secreta xilanases extracelulares que agem no material hemicelulósico liberando xilose como um produto assimilável, permitindo o crescimento do micro-organismo. Dentre as bactérias, espécies de *Bacillus* secretam quantidades apreciáveis de xilanases extra-celulares (Srinivasan e Meenakshi, 1999). A capacidade das diferentes espécies de *Bacillus* em metabolizar em condições ácidas, neutras e alcalinas, combinada com a presença de termófilos no gênero, tem levado ao desenvolvimento de uma variedade de novos produtos de enzimas comerciais com a temperatura desejada, a atividade de pH e propriedades de estabilidade para tratar uma variedade de aplicações industriais específicas (Schallmeyer et al., 2004).

As xilanases microbianas são as preferidas para os processos de hidrólise em virtude da sua especificidade, das condições suaves de reação, das poucas perdas de substrato e da sua biodegradabilidade. No entanto, o custo da hidrólise enzimática ainda é um fator limitante do processo (Michelin et al., 2008).

O fator básico para a produção de xilanases é a escolha de um substrato apropriado. A utilização de resíduos de baixo custo como substratos na produção de enzimas é especialmente interessante para os países onde resíduos agroindustriais são abundantes. Bagaço de cana-de-açúcar é o principal resíduo agroindustrial brasileiro, estima-se que cerca de 186 milhões de toneladas de bagaço são gerados no Brasil por ano (Cardona et al., 2010, Soccol et al., 2010). Ele é composto principalmente de duas frações de polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e uma macromolécula polifenólica (lignina). A celulose é o componente mais abundante (32-48%), seguido por hemicelulose (19-24%), os quais sofrem o processo de hidrólise enzimática por micro-organismo, liberando carboidratos que são utilizados como fontes de energia e carbono. Esse processo degradativo é de fundamental importância biológica e industrial (Santos et al., 2012).

A aplicação biotecnológica das xilanases tem aumentado nas últimas décadas. Grande destaque tem sido dado para as xilanases termoestáveis. A termoestabilidade é essencial para certas aplicações industriais que se desenvolvem em temperaturas elevadas (Wu et al., 2004). Xilanases termoestáveis têm sido usadas na indústria de panificação (Haros et al., 2002;

Jiang et al., 2008) e na produção de papel (Jiang et al., 2008; Bae et al., 2008; Santos e Ishii, 2011). Estas enzimas têm ainda aplicação na maceração dos vegetais, na clarificação de sucos e vinhos, na extração de sucos, perfumes e pigmentos, em biobranqueamento de celulose, entre outros (Girio et al., 2010; Song e Wei, 2010).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo estudar a produção de xilanase extracelular obtida de culturas submersas de *Bacillus* sp. SMIA-2, contendo bagaço de cana e água de maceração de milho. Além disso, algumas propriedades bioquímicas da enzima foram estudadas, em extrato bruto e parcialmente purificada, a fim de explorar seu potencial para aplicações industriais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismo

A cepa da bactéria utilizada neste estudo foi um termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2, anteriormente isolada a partir de uma amostra coletada de solo na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil (Souza e Martins, 2001). Culturas foram estocadas em glicerol 20% (v/v) a -20 °C em ultrafreezer.

Meio de cultura e condições de fermentação

O meio de cultura utilizado neste trabalho para produção da xilanase continha (g.L⁻¹ de água destilada): Bagaço de cana-de-açúcar-5,0, água de maceração de milho -5,0, KCl-0,3, MgSO₄-0,5, K₂HPO₄-0,87, CaCl₂ -0,29, ZnO-2,03x10⁻³, FeCl₃.6H₂O-2,7x10⁻², MnCl₂.4H₂O-1,0x10⁻², CuCl₂.2H₂O-8,5x10⁻⁴, CoCl₂.6H₂O-2,4x10⁻³, NiCl₃.6H₂O-2,5x10⁻⁴, H₃BO₃-3,0x10⁻⁴. O pH do meio foi ajustado para 7,2 com NaOH 1,0 M e o meio foi esterilizado por autoclave a vapor a 121 °C, 1 atm durante 15 minutos. O meio (50 mL em frascos Erlenmeyer de 250 mL) foi inoculado com 1 mL de inóculo (número inicial de células de 10⁴) e incubado a 50 °C em um agitador orbital (Thermo Forma, Ohio, EUA), operado a

150 rpm durante 264 horas. Frascos foram retirados em intervalos pré-determinados e, antes do ensaio, o sobrenadante isento de células foi obtido por centrifugação (HERMLEZ 382K (Wehingen, Alemanha) a 5000 rpm durante 15 min a 4 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata e o erro padrão foi calculado.

Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana utilizado neste trabalho foi doado pela Usina sucroalcooleira Paraíso- Campos dos Goytacazes-RJ, e em seguida foi levado ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos-LTA-UENF. No laboratório o bagaço foi exaustivamente lavado com água destilada e seco em desidratador profissional marca Pardal em bandejas de tela a aproximadamente 60°C por 48 horas. Em seguida foi triturado em moinho de facas tipo Wily, peneirado em peneira 35 mesh e estocado sob refrigeração até seu uso.

Os teores de celulose, hemicelulose e lignina foram quantificados de acordo com Sluiter et al. (2011).

Purificação parcial da enzima

A enzima parcialmente purificada foi obtida pela adição de sulfato de amônio sólido a 60% de saturação ao extrato enzimático bruto, obtido após a fermentação submersa, com agitação constante por 18 horas, à temperatura de 4 °C. O precipitado foi recolhido por centrifugação a 12.000 rpm durante 20 min a 4 °C. Este precipitado foi dissolvido em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,5 e parte desta solução foi reservada para caracterizações bioquímicas e outra parte foi dialisada por 18 horas contra o mesmo tampão. O dialisado foi utilizado como a solução de enzima dialisada.

Determinação da produção de endo-xilanase por meio de ensaio enzimático

A atividade da enzima endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8) foi medida pela quantificação da liberação de açúcares redutores da hidrólise de xilana Oalt Spelts (Sigma). A mistura de reação que continha 0,5 ml de solução de substrato

1% (m/v) preparado em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, e 0,5 mL de solução de enzima foi incubada a 70 °C. Após 10 min de reação, 1 mL de ácido dinitrossalicílico (DNS) foi adicionado e deixado em ebulição em banho-maria durante 5 min para paralisar a reação. As amostras resultantes foram em seguida resfriadas em banho de gelo, e a absorvância foi medida a 540 nm (Miller, 1959). Uma unidade (U) de atividade de xilanase foi definida como 1 micromol de xilose equivalente liberado por minuto sob as condições de ensaio acima referidos, usando uma curva padrão de xilose.

Determinação da proteína

A dosagem de proteína nos filtrados da cultura foi medida pelo método de Lowry modificado por Peterson (Peterson, 1977), usando albumina de soro bovino (BSA) como um padrão.

Efeito do pH na atividade e estabilidade da xilanase

O pH ótimo da enzima secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 foi estimado no intervalo de pH de 4,0-11,0 utilizando tampões de ensaio diferentes. O ensaio da enzima foi conduzido com xilana dissolvida em tampões diferentes (fosfato-citrato, pH 4,0-6,5, fosfato de sódio, pH 7,0-7,5, Tris-HCl, pH 8,0-9,0 e bórax-NaOH, pH 9,5-11,0). A atividade da enzima obtida no pH ótimo foi utilizada para calcular a atividade da enzima em termos de porcentagem relativa em relação a outros valores de pH. O efeito do pH sobre a estabilidade da enzima foi determinado pela pré-incubação do extrato enzimático, sem substrato, a diferentes valores de pH (4,0-11,0) por 3 h à temperatura ambiente, e medindo a atividade enzimática residual em condições de ensaio padrão no pH ótimo.

Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da xilanase

O efeito da temperatura sobre a atividade da enzima foi determinado realizando o procedimento de ensaio padrão a uma faixa de temperatura de 30-90 °C. A atividade da enzima obtida à temperatura ótima foi utilizada para calcular a atividade enzimática relativa percentual em outros valores de temperatura. A

estabilidade térmica da xilanase secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 foi testada por determinação da atividade de enzima remanescente após incubação da enzima em banho-maria à temperatura de 30-90 °C, por 3 h. A atividade residual foi determinada sob condições de pH e temperatura ótima, como descrito acima. A atividade inicial foi assumida como sendo 100% e utilizada para calcular a atividade da enzima como porcentagem da atividade inicial durante o período de incubação.

Efeito de íons na estabilidade da xilanase

O efeito dos íons metálicos como Ba⁺² (BaCl₂), Cs⁺² (CsCl), Ni⁺² (NiCl₂), Cu⁺² (CuSO₄), Fe⁺² (FeSO₄), K⁺ (KCl), Na⁺ (NaCl), Hg⁺² (HgCl₂), Ca⁺² (CaCl₂), Mn⁺² (MnCl₂), Mg⁺² (MgCl₂), Co⁺² (CoCl₂) e Zn⁺² (ZnCl₂) sobre a atividade da enzima foi determinado. As enzimas foram pré-incubadas com a concentração final de 1 mM do sal correspondente em tampão fosfato de sódio, pH 7,0 a 40 °C durante 15 min e a reação foi realizada em condições de ensaio padrão. A atividade relativa foi medida.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos como valores médios.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil do crescimento do micro-organismo e atividade da xilanase

Bacillus sp. SMIA-2 foi capaz de crescer e secretar xilanases em níveis satisfatórios quando cultivado em meio de cultura contendo como substratos o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e a água de maceração de milho (Figura 1).

O bagaço de cana-de-açúcar tratado vem sendo utilizado em diversos trabalhos para a produção de enzimas com resultados promissores (Adsul et al., 2005, Ko et al., 2010; Kumar et al., 2012). A obtenção de xilanases utilizando o bagaço de cana sem tratamento prévio viabiliza ainda mais a produção destas enzimas, uma vez que as etapas de fracionamento dos componentes

lignocelulósicos são de alto custo energético. Entretanto, considerando que o teor de nitrogênio presente no bagaço de cana é pequeno para suportar um bom crescimento e produção enzimática e que a fonte de nitrogênio e sua quantidade afetam a produção de xilanases (Park et al., 2002), a co-utilização do bagaço de cana e água de maceração de milho foi uma escolha atraente para a produção de xilanases por *Bacillus* sp. SMIA-2. A água de maceração de milho, um subproduto da indústria de moagem de milho, é um substrato barato disponível em larga escala (Parekh et al., 1999), capaz de fornecer uma fonte de nitrogênio adicional, proporcionando peptídios e aminoácidos prontamente disponíveis para o metabolismo das células. Este resíduo de baixo custo tem sido utilizado com sucesso em determinados meios de cultura para a produção de celulases (Abdel-Fattah et al., 2007).

De acordo com o perfil do crescimento e da atividade de xilanase mostrado na Figura 1, a secreção da xilanase começou na fase de crescimento exponencial, atingindo um máximo em 72 horas ($0,507 \text{ U.mg proteína}^{-1}$), quando a cultura já se encontrava na fase estacionária de crescimento, com uma diminuição após este período. Este perfil sugere que a xilanase produzida pelo micro-organismo em estudo teve um caráter indutivo, já que inicialmente foi sintetizada em pequenas quantidades e aumentou sua concentração na presença do substrato, no caso o bagaço de cana. O caráter indutivo pode ser devido a um acesso gradual as fibras de hemicelulose, o que estimula a produção e liberação gradual de enzimas hidrolíticas para o consumo do substrato.

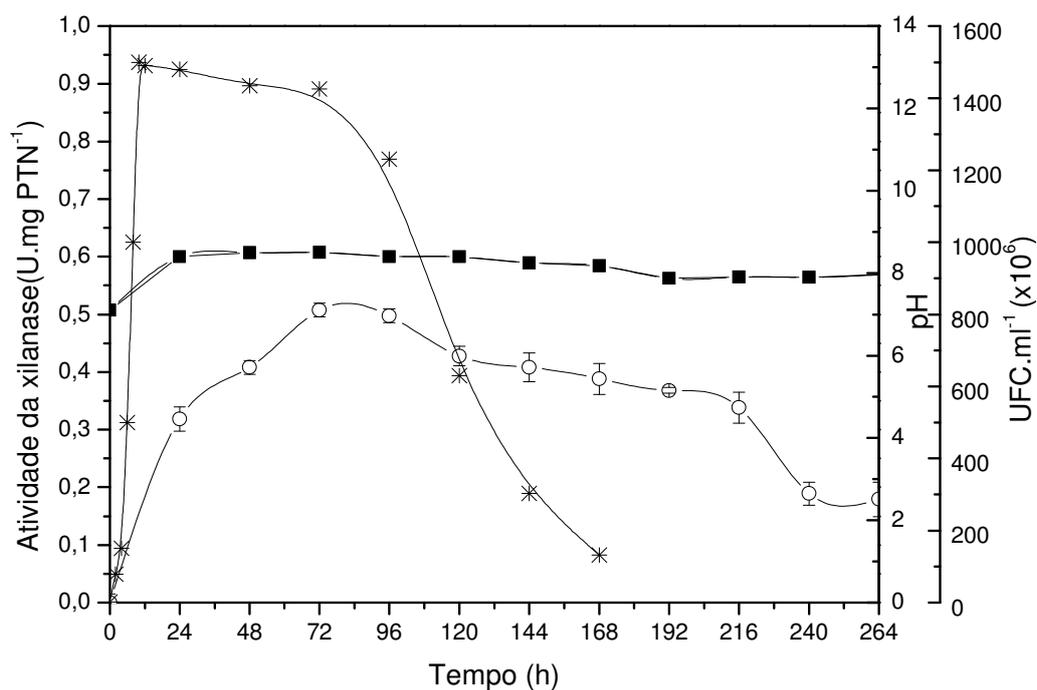


Figura 1. Crescimento (★), pH (■) e xilanase (○) secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2, quando cultivada em meio líquido contendo bagaço de cana e água de maceração de milho por 264 horas a 50 °C.

O pH do meio de cultura aumentou logo após a incubação da cultura de 7,0 para 8,5 após 48 h e então estabilizou. O valor do pH de um meio de cultura tende a variar em resposta às atividades metabólicas dos micro-organismos, seja por meio da produção de ácidos durante a fermentação ou mesmo do consumo destes e a formação de compostos como ureia, que tendem a elevar o pH (Raimbault,1998).

Purificação parcial da enzima

Com base na curva de crescimento do micro-organismo e visando a obtenção de maior quantidade da xilanase foi estabelecido o período de 72 horas para o crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 no meio líquido contendo bagaço de cana *in natura* suplementado com água de maceração de milho. Após este período, as células foram removidas do meio de cultura e a enzima presente no

extrato bruto foi parcialmente purificada e caracterizada visando o aproveitamento destes resíduos e a aplicação biotecnológica da xilanase.

Para a realização da purificação parcial da xilanase, foram realizadas duas etapas. A primeira etapa consistiu da precipitação das proteínas, com sulfato de amônio 60% de saturação, a partir do extrato bruto obtido com o cultivo de *Bacillus* sp. SMIA-2 por 72 horas. Na segunda etapa foi realizada a diálise para a eliminação do sal da fase de precipitação. Após cada etapa foi determinada a atividade da enzima (Tabela 1). A xilanase dialisada exibiu uma atividade específica de 3,0 U.mg de proteína⁻¹, o que correspondeu aproximadamente a 5 vezes a purificação da enzima (Tabela 1). Este aumento de atividade demonstrou que com as etapas utilizadas houve a remoção de impurezas indesejadas presentes no extrato bruto e uma maior concentração da enzima. O grau de purificação depende da finalidade do uso da enzima. Para algumas aplicações, o extrato bruto é suficiente. Em indústrias de alimentos e detergentes, geralmente não é necessário um alto grau de pureza para a enzima produzida (Shah e Madamwar, 2005). Contudo, somente com a enzima purificada é possível estimar seu real potencial biotecnológico (Queiroz et al., 2008).

Tabela 1. Purificação parcial de xilanase de *Bacillus* sp. SMIA-2

| Tratamento | Atividade total (U) | Atividade (U.mL ⁻¹) | Proteína (mg.mL ⁻¹) | Atividade específica (U.mg ptn ⁻¹) |
|---------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|
| Extrato bruto | 1934,1 | 0,614 | 1,005 | 0,611 |
| Precipitado | 168,0 | 1,050 | 0,805 | 1,304 |
| Dialisado | 146,2 | 0,860 | 0,286 | 3,010 |

Efeito do pH na atividade e estabilidade da xilanase

A faixa de pH entre 4,0 e 11,0 foi usada para estudar o efeito do pH sobre a atividade da enzima (Figura 2). A xilanase no extrato bruto mostrou o seu pH ótimo em 7,5, já a xilanase no extrato precipitado e dialisado mostrou o seu pH ótimo em 7,0. A atividade enzimática do extrato precipitado e dialisado caiu para cerca de 50% para valores de pH abaixo de 5,5 e acima de 9,0, já no extrato bruto

a atividade enzimática manteve mais de 80% de sua atividade a pH 5,5 e mais de 60% de sua atividade a pH 9,0, sendo desta forma ativa em uma ampla faixa de pH. Esta enzima reteve mais de 60% da sua atividade máxima após a incubação à temperatura ambiente durante 3 h, a pH 5,5-8,5, sendo desta forma estável a uma ampla faixa de pH. Valores extremos de pH podem causar considerável desnaturação protéica e consequente inativação enzimática. Por isso, é muito útil saber em que faixa de pH a enzima é mais estável, já que o pH de máxima estabilidade nem sempre coincide com o de máxima atividade.

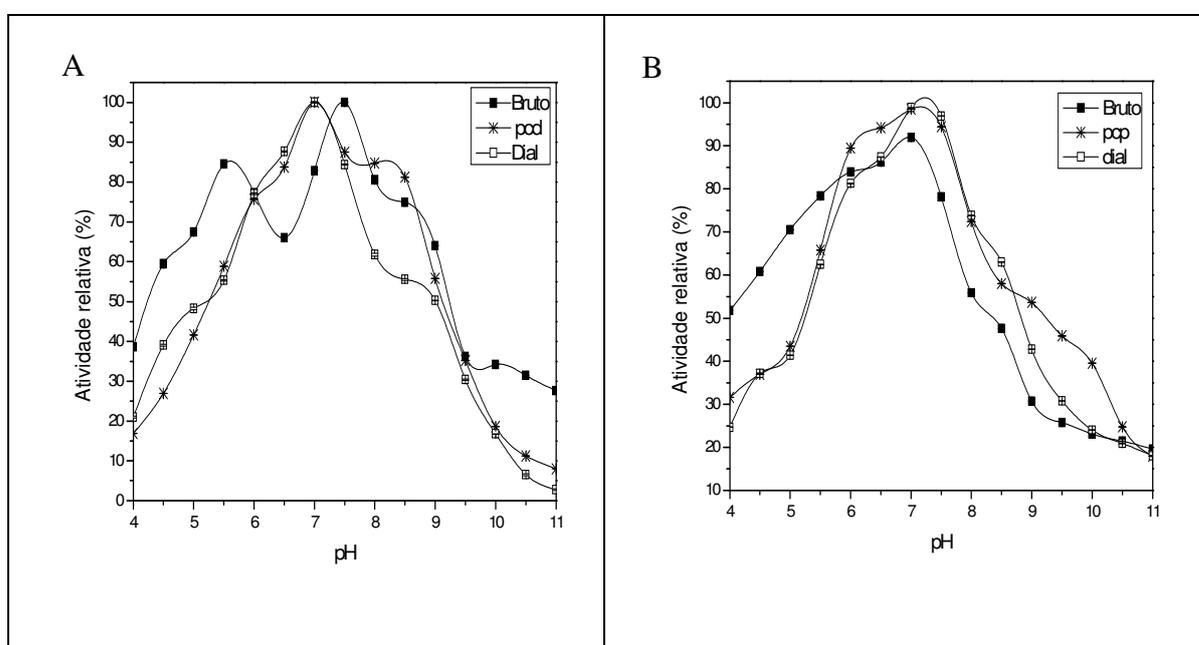


Figura 2. pH ótimo (A) e estabilidade ao pH (B) da xilanase em extrato bruto (■), extrato precipitado (★) e extrato dialisado (□) secretada pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (5 g.L^{-1}) e água de maceração de milho (5 g.L^{-1}). (100% de atividade = $0,611 \text{ U.mg ptn}^{-1}$ - bruto; $1,304 \text{ U.mg ptn}^{-1}$ - precipitado e $3,01 \text{ U.mg ptn}^{-1}$ - dialisado).

O pH ótimo encontrado para a xilanase de *Bacillus* sp. SMIA-2 neste trabalho (7,0- 7,5) foi semelhante a outras endoxilanases de *Streptomyces* sp. RCK-2010 (Kumar et al., 2012) e de *Bacillus* sp. (Takahashi et al., 2000). Vários trabalhos relatam que o pH ótimo para a xilanase produzida a partir de bactérias,

normalmente, não excede pH 7, como nos casos de *Bacillus* sp. (Okazaki, et al., 1985; Nakamura, et al., 1994; Blanco, et al., 1995; Nagar et al., 2011) com uma faixa de pH ótimo entre 6,0-6,5. No entanto, valores de pH ótimo na faixa alcalina (7-9) foram relatados para *Bacillus* sp. (Nakamura, et al. 1994; Kiddinamoorthy, et al. 2008).

Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da xilanase

O efeito da temperatura na atividade e estabilidade da xilanase de *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em bagaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho foi investigado (Figura 3). As atividades da enzima (extrato bruto, precipitado e dialisado) aumentaram com a temperatura dentro da faixa de 30 °C a 70 °C (Figura 3A). Uma redução na atividade das enzimas foi observada a valores superiores a 70 °C. A temperatura ótima da xilanase foi a 70 °C e níveis de atividade de cerca de 40% foram detectados a 90 °C. O efeito da temperatura na estabilidade da enzima é mostrado na Figura 3 (B). A enzima permaneceu mais de 90% estável até temperaturas menores que 60 °C, com forte queda de atividade a partir desta temperatura. A 70 °C, 55%, 35% e 35% da atividade máxima de xilanase foi ainda detectada após o tratamento para a xilanase em extrato bruto, precipitado e dialisado, respectivamente.

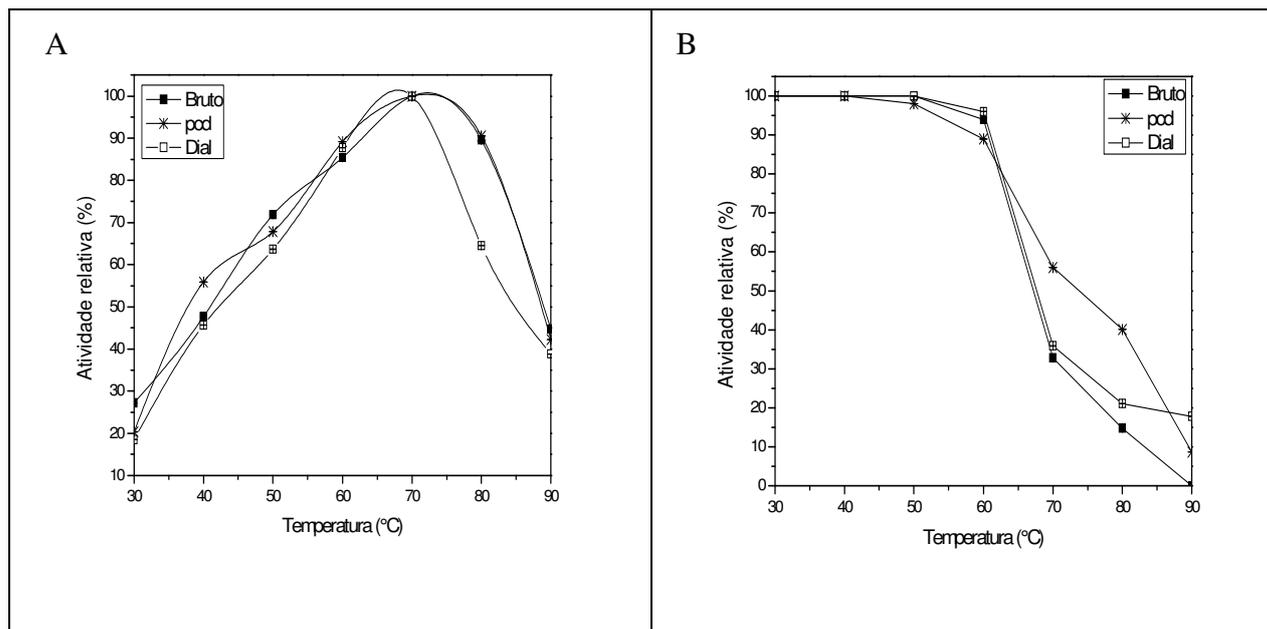


Figura 3. Temperatura ótima (A) e estabilidade térmica (B) da xilanase em extrato bruto (■), extrato precipitado (★) e extrato dialisado (□), secretada pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (5 g.L⁻¹) e água de maceração de milho (5 g.L⁻¹), a pH 7,0. (100% de atividade = 0,611 U.mg ptn⁻¹ - bruto; 1,304 U.mg ptn⁻¹ - precipitado e 3,01 U.mg ptn⁻¹ - dialisado).

Ao comparar estes resultados com outros trabalhos disponíveis na literatura sobre a atividade de xilanase bruta, verificou-se que *Bacillus* sp. SMIA-2 em estudo tem uma temperatura ótima semelhante aos relatados na literatura para outras linhagens de *Bacillus* (Marques et al., 1998; Takahashi et al., 2000, Ko et al., 2010; Nagar et al., 2011, Assareh et al., 2012). Além disso, a enzima investigada apresentou boa termoestabilidade, sendo maior que aquela apresentada por *Streptomyces* sp. RCK-2010, que foi de 40% de sua atividade original depois de 4 h incubada a 60 °C (Kumar et al., 2012).

É sabido que as condições de crescimento e natureza do meio podem estabilizar a enzima contra a desnaturação térmica (Gomes, 2000). Cultivo de termófilos oferece várias vantagens, visto que reduz o risco de contaminação, reduz a viscosidade e conduz a um elevado grau de solubilidade do substrato, tornando as reações mais rápidas, enquanto reduz o custo de resfriamento. Estas características tornaram-se mais importantes depois que as hemicelulases

começaram a ser usadas em aplicações industriais, como a bioconversão de lignocelulose (Maki et al., 2009) e na indústria de panificação (Jiang et al., 2008).

Efeito de íons na estabilidade da xilanase

O efeito de alguns íons metálicos sobre a atividade da enzima foi estudado. Cobalto (II) e manganês (II) apresentaram relevantes efeitos sobre a atividade de xilanase que aumentou mais que o dobro para a enzima no extrato bruto na presença destes íons na concentração final de 1 mM (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da adição de íons na atividade da xilanase secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2.

| Íons | Atividade relativa (%) | | Atividade relativa (%) - Extrato |
|------------------|------------------------|---------------------|----------------------------------|
| | Extrato bruto | Extrato precipitado | |
| Controle | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| Ca ²⁺ | 99,6 | 98,0 | 92,5 |
| K ⁺ | 85,8 | 103,4 | 70,3 |
| Ba ²⁺ | 108,5 | 118,9 | 69,3 |
| Cs ²⁺ | 80,0 | 96,1 | 76,3 |
| Hg ²⁺ | 61,0 | 101,9 | 107,0 |
| Ni ²⁺ | 89,4 | 103,5 | 97,9 |
| Cu ²⁺ | 110,1 | 100,3 | 85,1 |
| Zn ²⁺ | 81,7 | 101,3 | 75,0 |
| Mn ²⁺ | 214,4 | 117,2 | 117,0 |
| Fe ²⁺ | 114,4 | 124,2 | 90,9 |
| Mg ²⁺ | 79,4 | 115,1 | 78,8 |
| Co ²⁺ | 236,0 | 170,4 | 172,5 |
| Na ⁺ | 96,6 | 98,7 | 81,4 |

Enzimas microbianas extracelulares são geralmente conhecidas por exigir cations divalentes para a atividade e sua estabilização. A xilanase de *Bacillus* sp. SMIA-2 foi estimulada por Mn²⁺ e Co²⁺, que são de grande ocorrência em sistemas biológicos, resultado este semelhante à da xilanase de *Chromohalobacter* sp. TPSV 101 que também teve sua atividade aumentada por Mn²⁺ e Co²⁺ (Prakash et al., 2012). Nascimento et al. (2002) relataram que em uma estirpe de *Streptomyces* sp. AMT-3 a atividade da xilanase foi realçado por

Na⁺, bem como Nawel et al. (2011), que trabalhando com uma estirpe de *Jonesia denitrificans* tiveram a atividade da xilanase aumentada por Mn⁺².

Essas características apresentadas pela xilanase de *Bacillus* sp. SMIA 2- podem ser muito úteis quando se pensa em aplicações biotecnológicas. De fato, os resultados sobre o pH e os perfis de temperatura, e também as características de estabilidade térmica em comparação com outros *Bacillus*, têm mostrado que *Bacillus* sp. SMIA-2 é uma estirpe promissora.

CONCLUSÃO

O presente estudo foi realizado para investigar o desempenho catalítico de xilanase produzida em culturas submersas de *Bacillus* sp. termofílico SMIA-2, contendo bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e água de maceração de milho. As características apresentadas pela enzima sugerem que a cepa *Bacillus* sp. SMIA-2 pode se tornar uma fonte nova e interessante de enzimas de degradação de hemiceluloses com potencial aplicação em diversos setores industriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Fattah, Y.R., El-Helow, E.R., Ghanem, K.M., Lotfy, W.A. (2007) Application of Factorial Designs for Optimization of Avicelase Production by a Thermophilic *Geobacillus* Isolate. *Research Journal of Microbiology*, 2:13-23.
- Adsul, M.G., Ghuleb, J.E., Singhb, R., Shaikhb, H. (2005) Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 62:6-10.
- Assareh, R., Zahiri, H.S., Noghabi, K.A., Aminzadeh, S., khaniki, G.B. (2012) Characterization of the newly isolated *Geobacillus* sp. T1, the efficient cellulase-producer on untreated barley and wheat straws. *Bioresource Technology*, 120:99–105.

- Bae, H. J., Kim, H. J., Kim, Y. S. (2008) Production of a recombinant xylanase in plants and its potential for pulp biobleaching applications. *Bioresource Technology*, 99:3513-3519.
- Blanco, A. et al. (1995) Purification and properties of xylanase A from alkalitolerant *Bacillus* sp. strain BP-23. *Appl. Env. Microbiol.*, 61: 4468–4470.
- Cardona, C.A., Quintero, J.A., Paz, I.C. (2010) Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresour Technol.*, 101:4754–4766.
- Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Łukasik, R. (2010) Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology.*, 101:4775–4800.
- Gomes, I., Gomes, J., Gomes, D.J., Steiner, W. (2000) Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and β -glucosidase by the wild thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *App Microbiol Biotechnol.*, 53:461-468.
- Haros, M., Rosell, C. M., Benedito, C. (2002) Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. *European Food Research and Technology*, 215:425-430.
- Hiremath, K.S., Patil, C.S. (2011) Isolation, production and characterization of alkalo thermostable xylanase from newly isolated *bacillus* sp. *International Journal of Biotechnology Applications*, 3:48-51.
- Jiang, Z., Bail, A. L., Wu, A. (2008) Effect of the thermostable xylanase B (XynB) from *Thermotoga maritima* on the quality of frozen partially baked bread. *Journal of Cereal Science*, 47:172-179.
- Kiddinamoorthy, J. et al. (2008) Production, purification and characterization of *Bacillus* sp. GRE7 xylanase and its application in eucalyptus Kraft pulp biobleaching. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 605–612

- Ko, C.H., Lin, Z.P., Tu, J., Tsai, C.H., Liu, C.C., Chen, H.T., Wang, T.P. (2010) Xylanase production by *Paenibacillus campinasensis* BL11 and its pretreatment of hardwood kraft pulp bleaching. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64: 13–19.
- Kumar, A., Gupta, R., Shrivastava, B., Khasa, Y.P., Kuhad, R.C. (2012) Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp.RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74:170–177.
- Maki, M., Leung, K.T., Qin, W. (2009) The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int J Bio Sci.*, 5:500-516.
- Marques, S., Alves, L., Ribeiro, S., Gírio, F.M., Amaral-Collaço, M.T. (1998) Characterization of a Thermotolerant and Alkalotolerant Xylanase from a *Bacillus* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 73:159-172.
- Michelin, M., Polizeli, M.L.T.M., Ruzene, D.S., Silva, D.P., Vicente, A.A., Jorge, J.A., Terenzi, H.F. (2008) A new strategy for xylanase production using wheat straw autohydrolysis liquor as substrate. *Proceedings of the 10 th International Chemical and Biological Engineering Conference*. Braga. Portugal.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-429.
- Nakamura, S. et al. (1994) Thermophilic alkaline xylanase from newly isolated alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. strain TAR-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58:78–81.
- Nagar, S., Mittal, A., Kumar, D., Kumar, L., Kuhad, R.C., Gupta, V.K. (2011) Hyper production of alkali stable xylanase in lesser duration by *Bacillus pumilus* SV-85S using wheat bran under solid state fermentation. *New Biotechnology*. 28:581-587.

- Nascimento, R.P., Coelho, R.R.R., Marques, S., Alves, L., Girio, F.M., Bom, E.P.S., Amaral-Collaço, M.T. (2002) Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*, 31:549–555.
- Nawel, B., Said, B., Estelle, C., Hakim, H., Duchiron, F. (2011) Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. *Process Biochemistry*, 46:519–525.
- Park, Y.S., Kang, S.W., Lee, J.S., Hong, S.I., Kim, S.W. (2002) Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58:761–766.
- Peterson, G.L.A. (1977) Simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochem.*, 83:346-356.
- Raimbault, M. (1998) General and Microbial aspects of solid substrate fermentation. *Elec. J. Biotechnol.*, 1:174-188.
- Queiroz, C. (2008) Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control. *Food Rev. Int.* 24: 361-375.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol.* 50:1–17.
- Santos, F.A., Queiróz, J.H., Colodette, J.L., Fernandes, S.A., Guimarães, V.M.; Rezende, S.T. (2012) Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quim Nova*, 35:1004-1010.
- Santos, L.F., Ishii, P. L. (2011) Xilanases: Principais Metodologias e Parâmetros Cinéticos. *Journal of Biotechnology and Biodiversity.* 2:7-15.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. (2011) *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass.* Technical Report NREL/TP-510-42618. 18p.

- Shah, A.R., Madamwar, D. (2005) Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochem.*, 40:1763-1771.
- Socol, C.R., Vandenberghe, L.P.S., Medeiros, A.B.P., Karp, S.G., Buckeridge, M., Ramos, L.P., Pitarelo, A.P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L.M.F., Ferrara, M.A., Bom, E.P.S., Moraes, L.M.P., Araújo, J.A., Torres, F.A.G. (2010) Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Bioresour Technol.*, 101:4820–4825.
- Srinivasan, M. C., Meenakshi, V. R. (1999) Microbial xylanase for paper industry. *Current Science*, 77:137-142.
- Song, J. M., Wei, D. Z. (2010) Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. *Biomassa and bioenergy*, 34: 1930-1934.
- Souza, A.N., Martins, M.L.L. (2001) Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32:271-275.
- Takahashi, H., Nakai, R., Nakamura, S. (2000) Purification and partial characterization of a basic xylanase produced by thermoalkalophilic *Bacillus* sp. strain TAR-1. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 64:887–890.
- Parekh, M., Formanek, J., Blaschek, H. P. (1999) Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using a low-cost corn steep water based fermentation medium. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 51:152-157.
- Prakash, B., Vidyasagar, M., Jayalakshmi, S.K., Sreeramulu, K. (2012) Purification and some properties of low-molecular-weight extreme halophilic xylanase from *Chromohalobacter* sp. TPSV 101. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74:192–198.
- Okazaki, W. et al. (1985) Purification and characterization of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. W-1. *Agric. Biol. Chem.*, 49:2033–2039.

Warren, R. A. J. (1996) Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annual Reviews in Microbiology*, 50:183-212.

Wu, Y. B., V. Ravindran, D. G. Thomas, M. J. Birtles and W. H. Hendriks. (2004) Influence of method of whole wheat inclusion and xylanase supplementation on the performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology of broilers. *Br. Poult. Sci.*, 45:385-394.

4.4. PRODUÇÃO DE XILANASE POR *Anoxybacillus* sp. 3M EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA USANDO SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS.

RESUMO

Uma cepa de termofílico *Anoxybacillus* sp. 3M foi capaz de produzir altos níveis de xilanase extracelular em fermentação submersa utilizando subprodutos agroindustriais (Dreche cervejeiro, farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho e tupinambo) como substrato. Embora a melhor produção de xilanase ($1,35 \text{ U.ml}^{-1}$) tenha sido obtida em meio de crescimento contendo dreche cervejeiro 1% (m/v), a atividade xilanolítica também foi observada quando o farelo de trigo ($1,32 \text{ U.ml}^{-1}$), o bagaço de cana-de-açúcar ($0,80 \text{ U.ml}^{-1}$), o tupinambo ($0,32 \text{ U.ml}^{-1}$), o sabugo de milho ($0,30 \text{ U.ml}^{-1}$) e a xilana industrial ($0,21 \text{ U.ml}^{-1}$) foram utilizados como substratos. A xilanase de *Anoxybacillus* sp. 3M foi caracterizada quanto a temperatura e pH. A melhor atividade da enzima foi observada na temperatura de $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e no pH de 5,3. A enzima manteve 100% da sua atividade original depois de 96 h a $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH 7,0. Análise de zimograma do sobrenadante das culturas revelou a presença de uma enzima de peso molecular de 420 KDa. Como tal, esta xilanase pode ser considerada como um biocatalisador termotolerante sendo interessante para aplicações biotecnológicas.

ABSTRACT

A strain of thermophilic *Anoxybacillus* sp. 3M was able to produce high levels of extracellular xylanase in submerged fermentation using agroindustrial byproducts (Brewer's spent grain, wheat bran, sugar cane bagasse, corn cob and Jerusalem artichoke) as substrate. Although the best xylanase production (1.35 U.ml^{-1}) was obtained in growth medium containing Brewer's spent grain 1% (w / v), the xylanolytic activity was also observed when wheat bran (1.32 U.ml^{-1}), crushed cane sugar (0.80 U.ml^{-1}), Jerusalem artichoke (0.32 U.ml^{-1}), corn cob (0.30 U.ml^{-1}) and xylan industrial (0.21 U.ml^{-1}) were used as substrates. The xylanase *Anoxybacillus* sp. 3M has been characterized as the temperature and pH. The best enzyme activity was observed at a temperature of $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and pH 5.3. The enzyme retained 100% of its original activity after 96 h at $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and pH 7.0. Zymogram analysis of culture supernatants revealed the presence of an enzyme molecular weight of 420 kDa. As such, this xylanase may be considered as a biocatalyst thermotolerant and it is interesting for biotechnological applications.

INTRODUÇÃO

As endo- β -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) são enzimas extracelulares, produzidas principalmente por bactérias e fungos filamentosos, que fazem a hidrólise das ligações β -1,4 na xilana, principalmente. A xilana, o componente principal do complexo hemicelulose, é um polissacarídeo heterogêneo encontrado na parede celular das plantas e é composta por resíduos de β -xilopiranosose, unidos por ligações do tipo β -1,4 glicosídicas, com graus variáveis de substituições em suas cadeias laterais. Os produtos da hidrólise das xilanas são constituídos de monômeros D-xilose e xilo-oligossacarídeos de diferentes tamanhos (Nascimento et al., 2002; Heck et al., 2006; Janis et al., 2007; Kumar et al., 2012). O sistema envolve, entre outras hemicelulases, endo-1,4-xilanase, que cliva as ligações internas do esqueleto de heteroxilana, que resulta em diminuição

do grau de polimerização do substrato, e as β -xilosidases (EC 3.2.1.37), que clivam xilo-oligossacarídeos produzindo xilose (Girio et al., 2010).

As xilanases são encontradas em bactérias terrestres e marinhas, bactérias do sistema digestivo dos ruminantes, dos fungos, das algas, dos protozoários, dos caracóis, dos crustáceos, dos insetos e das sementes de plantas terrestres. As xilanases comerciais podem ser obtidas a partir de bactérias, tais como as de *Bacillus* sp. A busca por novas estirpes de micro-organismos que produzam xilanases com melhores características fisiológicas em função do pH, da temperatura, e uma maior variedade de utilização do substrato, da resistência e da capacidade de adaptação à toxicidade de substratos de baixo custo é ainda necessária, levando-se em conta a grande diversidade biológica existente (Girio et al., 2010).

Essas enzimas são normalmente produzidas quando os micro-organismos são cultivados em meios de cultura suplementados com xilana ou xilana hidrolisada como fontes de carbono. No entanto, xilana pura comercialmente disponível possui elevado custo para ser usado em fermentação em escala industrial. Alternativamente, subprodutos agroindustriais que contêm celulose, hemicelulose e lignina, podem servir como fontes de baixo custo para a produção dessas enzimas. A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante na natureza e o uso de subprodutos agroindustriais e outros compostos naturais para o cultivo de micro-organismos xilanolíticos pode ser uma alternativa interessante para a produção de enzimas com custos de produção mais baixos (Santos e Ishii, 2011; Kumar et al., 2012).

Os problemas de poluição associados aos resíduos agroindustriais, assim como a escassez de locais para sua disposição, opções mais caras de tratamento desses resíduos e aumento da necessidade de poupar recursos valiosos têm forçado a encorajar a utilização e bioconversão de resíduos em produtos de alto valor industrialmente úteis. A reciclagem de recursos está se tornando uma atividade econômica válida e viável e é cada vez mais mencionada como uma solução para alguns dos problemas mais graves do homem. As enormes quantidades de biomassa vegetal residual considerada como um resíduo pode, potencialmente, ser usada para produzir vários produtos de valor agregado, como os biocombustíveis, as rações para animais, os produtos químicos, as enzimas, entre outros. A demanda por enzimas industriais, principalmente de origem

microbiana é crescente devido às suas aplicações em uma ampla variedade de processos (Chapla et al., 2010).

Vários resíduos agroindustriais são utilizados como substratos alternativos para a produção de enzimas, devido à disponibilidade local e por representarem uma fonte alternativa de baixo valor comercial, especialmente quando o objetivo é a produção destas enzimas em larga escala (Hernandez et al., 2005). Substratos hemicelulósicos de baixo custo, tais como farelo de trigo, sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar foram pesquisados para serem utilizados na produção de hidrolases por certos micro-organismos (Nascimento et al., 2002, Nagar et al., 2011). Além disso, a utilização de tais fontes na produção de enzimas lignocelulolíticas pode reduzir o custo de produção destas enzimas, bem como a bioconversão desses substratos em xaropes fermentáveis pode ajudar a reduzir o impacto ambiental causado pelo acúmulo de resíduos sobre o meio ambiente (Song e Wei, 2010).

Xilanases têm um largo emprego industrial. Várias pesquisas exploram sua aplicabilidade no tratamento da indústria têxtil, papel e alimentos (Haros et al., 2002; Jiang et al., 2008; Bae et al., 2008, Song e Wei, 2010). Xilanases termoestáveis apresentam-se como uma boa estratégia como aditivos em produtos de panificação nas etapas de produção e armazenamento (Haros et al., 2002; Jiang et al., 2008), e podem ainda ser utilizadas na produção de papel (Santos e Ishii, 2011). Elas facilitam a deslignificação da pasta de papel para a produção de papel de alta qualidade. Assim, os agentes de branqueamento contendo cloro, que é um problema sério do ponto de vista ecológico, podem ser reduzidos a sua utilização (Song e Wei, 2010).

Tendo em vista a discussão anterior, o presente trabalho teve como objetivo explorar a produção de xilanase em fermentação submersa utilizando *Anoxybacillus* sp. 3M e resíduos agroindustriais como substrato, bem como a caracterização bioquímica da enzima.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo

A cepa bacteriana utilizada neste estudo foi *Anoxybacillus* sp. 3M, uma bactéria termofílica, isolada na Unidade de Bioenergia do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG), Lisboa-Portugal, a partir de amostras de fontes termais terrestres (temperatura, 90 °C) coletadas em São Miguel, Açores - Portugal (Marques et al., 1998). Anteriormente designada por *Bacillus* sp. de acordo com a identificação morfológica e bioquímica, esta estirpe bacteriana, foi recentemente identificada por Leibniz Institute DSMZ - Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas Celulares (Alemanha), utilizando-se análise da sequência genica 16S rRNA, como um *Anoxybacillus*.

Culturas foram estocadas em meio de ágar TSY (20 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl, 10 de extracto de levedura g/L e 20 g de agar /L) a 4 ° C e 30% de glicerol (v/v) a -20 °C em ultrafreezer.

Meio de cultura e condições de fermentação

O meio de cultura utilizado no presente trabalho para a produção de xilanase (EC 3.2.1.8) era composto por (g.L⁻¹ de água destilada): (NH₄)₂SO₄- 1,5 g; KH₂PO₄- 1,7 g; Na₂HPO₄•2H₂O- 1,7 g; MgSO₄•7H₂O- 0,2 g; solução mineral (por litro: 25 g de EDTA; 2,14 g de ZnCl₂; 2,5 g MnCl₂•4H₂O; 0,3 g CoCl₂•6H₂O; 0,2 g CuCl₂•2H₂O; 0,4 g NaMoO₄•2H₂O; 4,5 g de CaCl₂•2H₂O; 2,9 g FeCl₃•6H₂O; 1,0 g de H₃BO₃; 0,1 g de KI) - 1,0 mL; extrato de levedura- 1 g e de peptona- 1 g. O pH foi ajustado para 6,9-7,0 com NaOH 1,0 M e este meio base foi esterilizado em autoclave a 121 ° C, 1 atm durante 15 minutos. O meio foi suplementado com as seguintes fontes de carbono a 1,0% (m/v): Dreche cervejeiro (BSG), farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, tupinambo e xilana.

O inóculo foi preparado por inoculação do micro-organismo em placas de Petri contendo o meio TSY (g.L⁻¹): triptona 20, NaCl 10, extrato de levedura 10; agar 20 e 1L de água. As placas foram incubadas a 50 ° C durante 12 horas. Após este período, as células foram transferidas para um frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de crescimento básico descrito acima. O frasco foi incubado a 50 °C em um agitador orbital (New Brunswick Scientific Co., EUA) a

150 rpm durante 15 horas e subsequentemente utilizado para inocular o meio de crescimento.

O meio de cultura (100 mL em frascos de erlenmeyer de 500 ml) foi inoculado com 4 ml de inóculo e incubado a 50 °C em um agitador orbital (New Brunswick Scientific Co., EUA), operado a 150 rpm durante 144 horas (6 dias). Em intervalos periódicos frascos foram retirados para análise. As células bacterianas foram removidas do extrato de cultura por centrifugação (7673 g durante 15 min a 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios enzimáticos.

A fim de encontrar a melhor concentração de dreche cervejeiro para a produção de xilanase, sua quantidade no meio de cultura foi variada a partir de 0,1% a 2,0%.

Matérias-primas

Diferentes subprodutos agroindustriais foram usados como fontes de carbono para a produção de xilanase pelo *Anoxybacillus* sp. 3M: dreche cervejeiro, sabugo de milho, bagaço de cana e palha de trigo. A dreche foi fornecida pela cervejaria SCC-Sociedade Central de Cervejas e Bebidas, Vialonga, Portugal. O material foi levado ao laboratório, seco a 50 °C até atingir um teor de umidade inferior a 10%, e triturado em moinho de facas até o tamanho da partícula atingir cerca de 0,5 mm de espessura. O material era constituído de (p/p) 25,6% de celulose, 23,5% de hemicelulose, 9,4% de lignina e 26,5% de proteína. A Palha de trigo foi fornecida por produtores da Estação Nacional de Melhoramento de Plantas, Elvas, Portugal, seco e triturado até as partículas atingirem cerca de 0,5 mm de espessura. A amostra era composta de 38,8% de celulose, 27,6% de hemicelulose e 16% de lignina. Bagaço de cana-de-açúcar foi fornecido pela empresa brasileira Companhia Açucareira Paraíso, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Essa matéria-prima foi seca em estufa a 60 °C e moída até suas partículas atingirem 0,5 mm de tamanho. A amostra era composta de 43,2 % de celulose, 29% de hemiceluloses e 18,5% de lignina. O sabugo de milho foi obtido a partir de espigas da Companhia das Lezírias (Samora Correia, Portugal), foi seca até atingir um teor de umidade inferior a 10%, e moída até suas partículas atingirem 3 mm de espessura. A composição média desta matéria-prima foi de 38% de celulose, 35% de hemicelulose e 19% de

lignina.

Determinação da produção de xilanase por meio de ensaio enzimático

A atividade da endo-1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8) foi estimada pela determinação da liberação de açúcares redutores a partir de uma solução 1% (m/v) de xilana (oalt spelts - Sigma) preparada em tampão de citrato de sódio 50 mM (pH 5,3) a 60 °C, de acordo com Bailey et al. 1992. Os açúcares redutores foram determinados pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). Uma unidade de atividade de endo- β -1,4-xilanase (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 micromol de xilose por minuto, nas condições do ensaio. Utilizando uma curva padrão de xilose.

Efeito do pH e da temperatura na atividade da xilanase

Para a determinação da temperatura ótima da enzima, ensaios enzimáticos foram realizados para o intervalo de temperatura de 30-90 °C, a pH 5,3. Para a determinação do pH ótimo foram utilizadas, as soluções de tampão com pH variando entre 3,0-10,5 a 60 °C. Tampão citrato de sódio foi usado para pH 3,0-5,5; tampão citrato de sódio-fosfato para pH 5,5-7,0; tampão Tris-HCl para pH 7,0-9,0 e tampão glicina-NaOH para pH 9,0-10,5.

Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da xilanase

Para estudar a estabilidade térmica de xilanase, o extrato enzimático foi incubado a 30, 40, 50, 60, 70, 75 e 80 °C durante 96 horas e ainda a 60 °C durante 4 semanas. A atividade enzimática residual foi determinada em condições ótimas (pH 5,3 e 60 °C). A estabilidade da xilanase em diferentes valores de pH foi avaliada por incubação do extrato enzimático nos tampões descritos acima (2,5 ml de extrato enzimático + 2,5 ml de tampão 50 mM) durante 96 horas a 60 °C. Após este tratamento, a atividade residual de xilanase foi determinada como descrito anteriormente.

Detecção de atividade de xilanase após PAGE

Os sobrenadantes das culturas a partir de células cultivadas em diferentes substratos foram analisados por eletroforese em gel de dodecilsulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) contendo 10% (m/v) de poliacrilamida e 0,1% (m/v) de xilana oalt spelts (Sigma). A eletroforese foi realizada a voltagem constante (85 V), a 4 °C durante a noite. Amostras de diferentes volumes contendo 21mU de atividade foram carregadas. Para a detecção de atividade de xilanase, os géis foram incubados 10 min a 60 °C em tampão citrato-fosfato (pH 5,3) 50 mM e submersos em 0,1% (m/v) de solução de vermelho Congo durante 10 min. O gel foi lavado com NaCl 1 M até a visualização das bandas de enzimas. Para determinação do peso molecular das enzimas por electroforese, padrões de pesos moleculares variando de 67-669 kDa (HMW Kit de calibração de electroforese da Pharmacia Biotech) foram utilizados, e o gel correspondente foi corado utilizando o método cromassie azul.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil do crescimento do micro-organismo e atividade da xilanase

A Figura 1 mostra o perfil de crescimento de *Anoxybacillus* sp. 3M cultivado em meio básico suplementado com 1,0% (m/v) de dreche cervejeiro (BSG), tal como descrito na seção Materiais e Métodos. *Anoxybacillus* sp. 3M foi capaz de produzir endo- β -1,4-xilanase extracelular usando BSG, um subproduto da indústria da cerveja. A atividade desta enzima foi detectada no sobrenadante da cultura apenas no final da fase de crescimento exponencial (após 24 horas de incubação da cultura), semelhante aos resultados relatados por Damiano et al. (2003) para *Bacillus licheniformis* 77-2 e por Pason et al. (2006) para *Paenibacillus curlanolyticus* B-6. *Anoxybacillus* sp 3M excretou xilanase a uma taxa quase constante até 120 h, quando as maiores atividades volumétricas (1,41 U.mL⁻¹) foram obtidas.

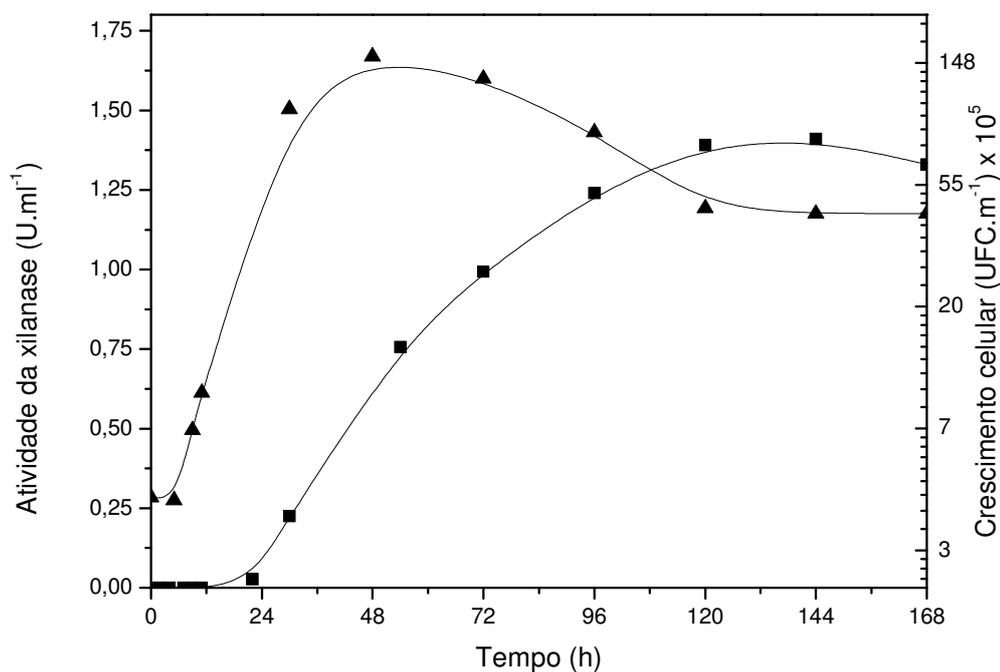


Figura 1. Crescimento (▲) e atividade da xilanase (■), secretada por *Anoxybacillus* sp. 3M, quando cultivada em meio líquido contendo BSG (10,0 g.L⁻¹) durante 168 horas a 50 ° C.

O efeito de diferentes materiais de subprodutos agroindustriais na produção da xilanase por *Anoxybacillus* sp. 3M foi avaliado. Os dados de produção de xilanase apresentados na Figura 2 revelaram que o micro-organismo foi capaz de crescer e produzir xilanase em todos os materiais selecionados. No entanto, a atividade da xilanase é variável dependendo do tipo de material do subproduto agroindustrial, provavelmente devido a variações na composição dos carboidratos. As melhores fontes de carbono no presente estudo para a secreção de xilanase foram dreche cervejeiro (1,35 U.ml⁻¹) e farelo de trigo (1,32 U.ml⁻¹). A indução na secreção da enzima por esses materiais foi melhor do que pela utilização de xilana pura (0,21 U.ml⁻¹), um indutor de xilanase de custo mais dispendioso. Moderada a boa quantidade de atividade de xilanase foi produzida na presença de bagaço de cana-de-açúcar (0,80 U.ml⁻¹), tupinambo (0,32 U.ml⁻¹) e sabugo de milho (0,30 U.ml⁻¹).

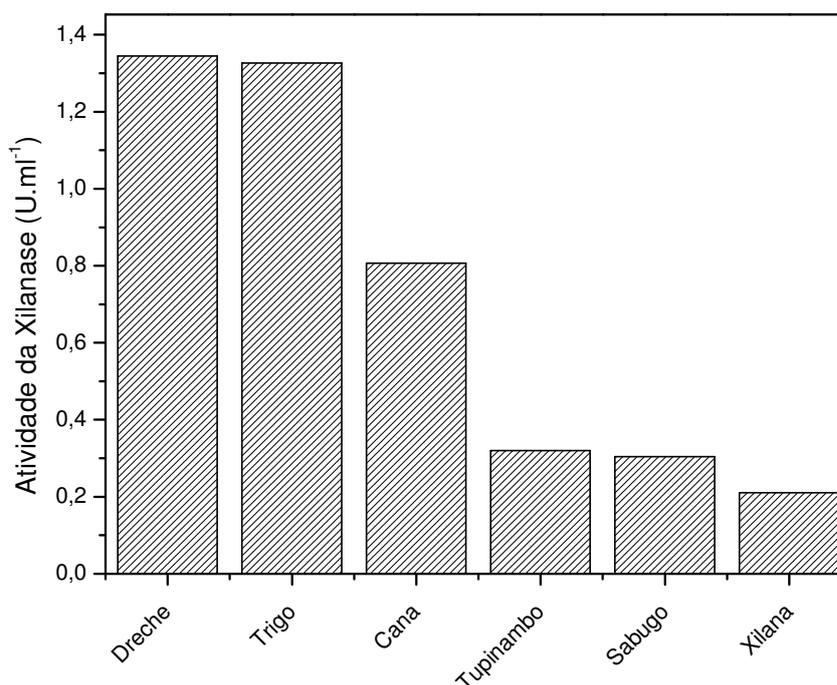


Figura 2. Atividade do extrato enzimático de *Anoxybacillus* sp. 3M cultivados durante 144 horas a 50 °C em meio de cultura contendo diferentes substratos.

Vários pesquisadores têm relatado altos valores de atividade de xilanase quando resíduos agroindustriais são utilizados como fonte de carbono. Alta atividade de xilanase foi observada quando palha de sorgo (Sonia et al., 2005.), resíduos de soja (Heck et al., 2005.) e farelo de trigo (Chapla et al., 2010; Nagar et al., 2011) foram utilizados como substratos.

Visando o aumento da produção de xilanase, sem aumentar seu custo de produção, o meio foi manipulado no que diz respeito à concentração do dreche cervejeiro. Com concentrações crescentes no meio de produção até 1,0% (m/v), o aumento substancial na produção da enzima pode ser observado na figura 3. Em concentrações mais elevadas de dreche (acima de 1%), a atividade da enzima foi comparativamente mais baixa, possivelmente devido a alguma repressão ou a presença de um fator de inibição do substrato.

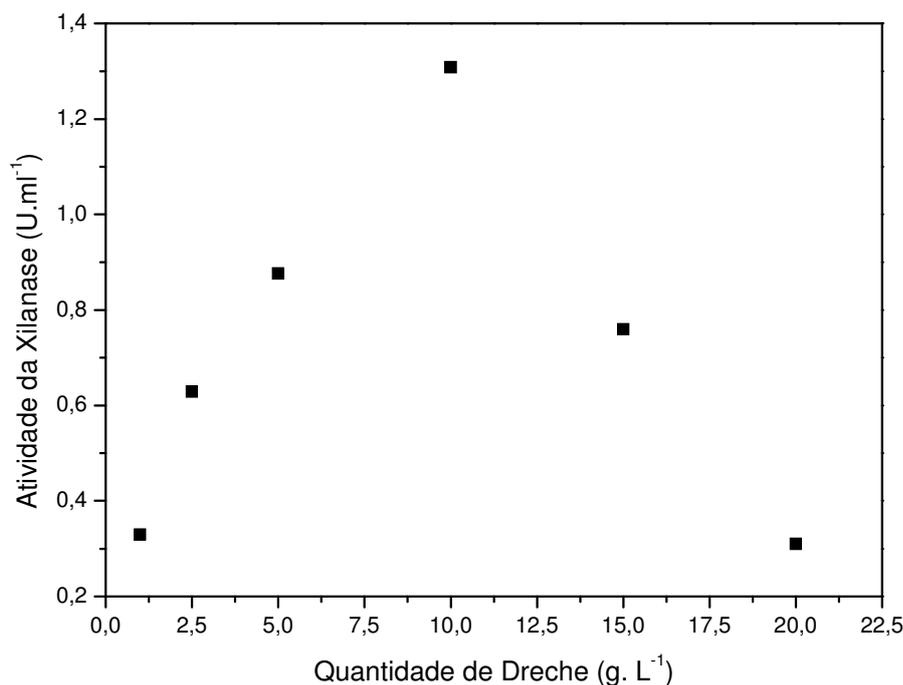


Figura 3. Atividade de extrato enzimático de *Anoxybacillus* sp. 3M cultivado durante 144 horas a 50 °C em meio de cultura contendo concentrações diferentes de dreche cervejeiro.

Efeito do pH na atividade e estabilidade da xilanase

Um intervalo de pH entre 3,0 e 10,5 foi usado para estudar o efeito do pH sobre a atividade da xilanase (Figura 4). O pH ótimo foi encontrado em 5,3, porém níveis significativos de atividade (acima de 85% da atividade máxima) foram encontrados entre pH 7,0 e 8,5. Este comportamento é semelhante ao descrito para outra endoxilanase de *Streptomyces* sp. RCK-2010 (Kumar et al., 2012). Embora, a maioria das xilanases conhecidas, são ativas em pH ácido ou neutro (Dhillon et al, 2000; Ohta et al, 2001; Saha, 2002), várias xilanases alcalotolerantes também têm sido relatadas na eficiência de branqueamento de pasta de papel (Ninawe e Kuhad, 2008; Kapoor e Kuhad, 2007). Além disso, as xilanases alcalinas, que são operacionalmente estáveis a temperaturas mais elevadas, são mais benéficas pela economia em termos de custo e tempo de resfriamento (Kapoor e Kuhad, 2007).

Após a incubação da solução enzimática bruta a 60 °C por 96 h em pH 3,0-10,5, foi observado que em pH de 3,0 a 4,5 não houve atividade residual da enzima, pouca atividade residual foi observada em pH 5,0 e acima deste valor. Assim, verificou-se cerca de 40% de sua atividade original a pH 5,5. Houve um crescente aumento de atividade residual até pH 7,0. Em pH na faixa de 7,0-9,0 a enzima reteve mais do que 85% da atividade máxima, e a pH 10,5 ainda mantinha 46% de sua atividade original. Assim, xilanase de *Anoxybacillus* sp. 3M parece ser ativa e estável em uma ampla faixa de pH.

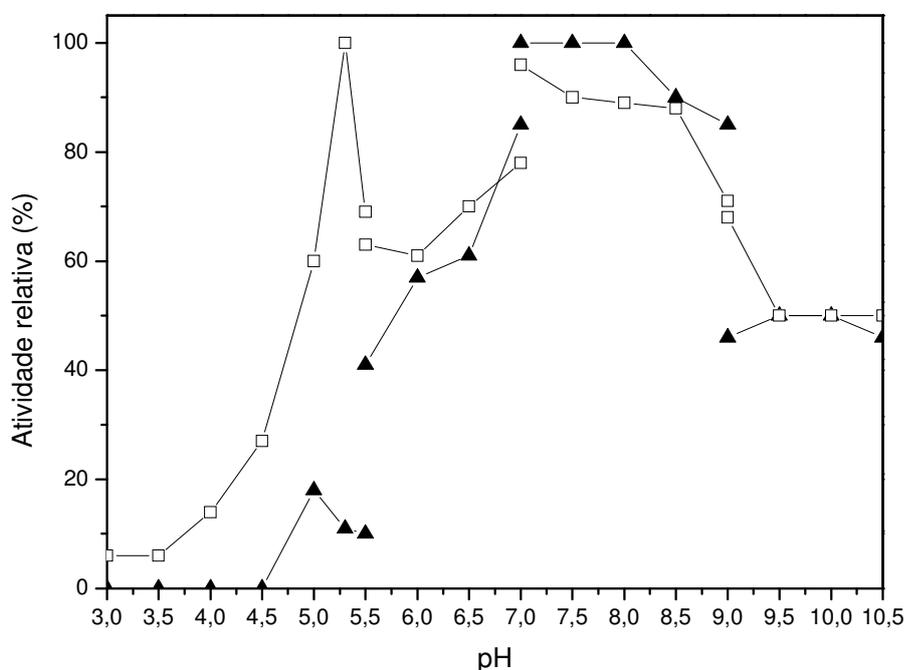


Figura 4. pH ótimo (□) e estabilidade (▲) de xilanase secretada pelo *Anoxybacillus* sp.3M cultivado em meio líquido contendo dreche (10 g.L^{-1}) durante 96 horas a 60 ° C. (100% de atividade = $0,920 \text{ U. ml}^{-1}$).

Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da xilanase

Para a verificação do efeito da temperatura na atividade da xilanase, o extrato enzimático foi estudado em diferentes temperaturas que variaram de 30 °C-90 °C, a um pH constante de 5,3 (Figura 5). A atividade da enzima aumentou

com a temperatura dentro da faixa de 30 °C a 60 °C. Uma redução na atividade da enzima foi observada a valores superiores a 60 °C. A temperatura ótima desta xilanase foi de 60 °C, o que foi semelhante a outras xilanases (Ohta et al., 2001; Kapoor e Kuhad, 2007; Ninawe e Kuhad, 2008; Kumar et al., 2012). A termoestabilidade da xilanase foi analisada pela determinação das atividades residuais da enzima após incubação do extrato enzimático a várias temperaturas entre 30 °C e 90 °C, pH 7, durante 96 h (Figura 5).

O perfil de termoestabilidade demonstrou que a enzima permaneceu com 100% de sua atividade original depois de 96 horas de incubação em temperaturas inferiores ou igual a 60 °C e que a 70 °C permaneceu com 73% de sua atividade original (Figura 5). Esta enzima foi mais estável que a xilanase de *Streptomyces* sp. RCK-2010 que reteve 40% da atividade original após o tratamento térmico a 60 °C por 4 horas (Kumar et al., 2012) e a xilanase de *Bacillus pumilus* SV-85S que reteve 72% da atividade original após 30 min a 60 °C (Nagar et al., 2011).

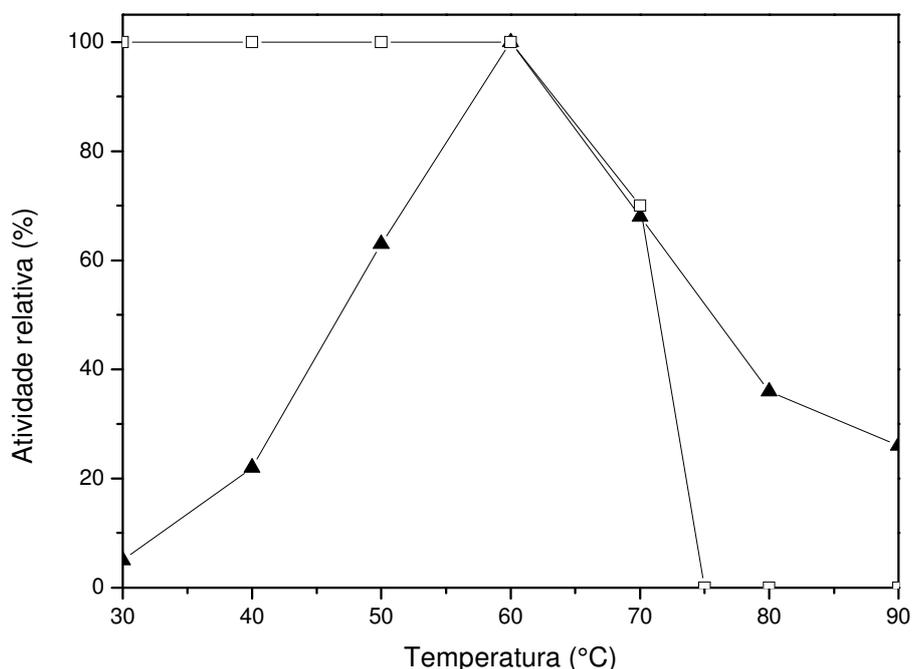


Figura 5. Temperatura ótima (▲) e estabilidade térmica (□) de xilanase secretada por *Anoxybacillus* sp. 3M, crescido em meio de cultura líquido contendo dreche (10 g.L^{-1}) durante 96 horas (100% de atividade = $1,23 \text{ U.ml}^{-1}$).

A estabilidade térmica, além da temperatura e pH ótimos, constitui uma propriedade muito importante quando se pretende estudar a aplicação industrial de uma dada enzima. Desta forma, a termoestabilidade da xilanase foi analisada pela determinação das atividades residuais após incubação da enzima a 60 ° C durante 28 dias (Figura 6). O perfil de termoestabilidade revelou que a enzima manteve mais de 70% de sua atividade original após 14 dias de incubação e 45% da sua atividade original depois de 28 dias de incubação, demonstrando sua potencial aplicabilidade em condições industriais similares.

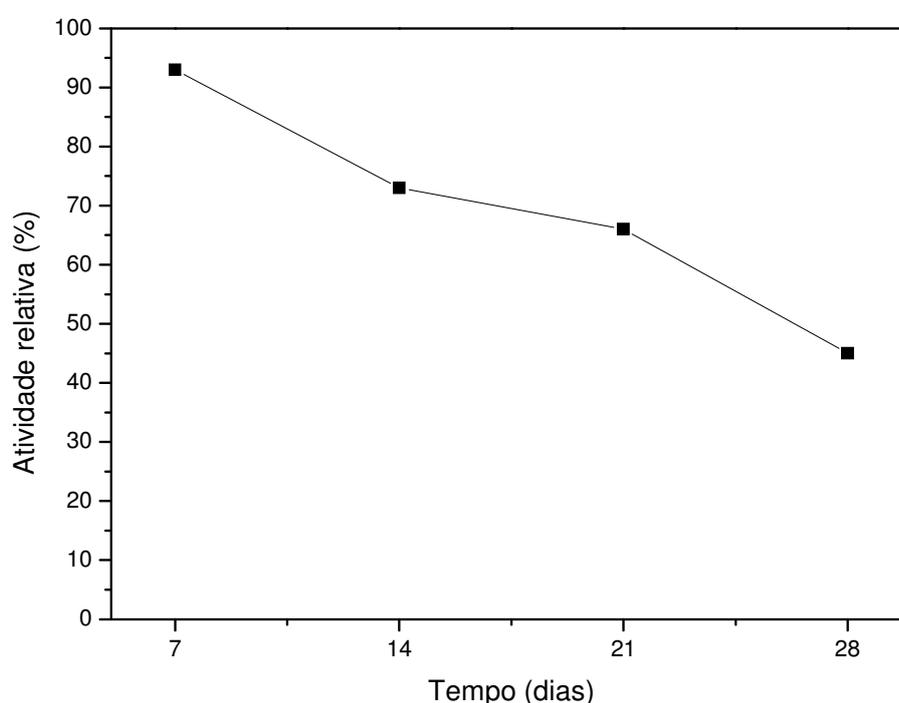


Figura 6. Estabilidade a 60 ° C da xilanase secretada por *Anoxybacillus* sp. 3M, crescido em meio de cultura líquido contendo dreche (10 g.L⁻¹) durante 28 dias (100% de atividade = 1,23 U.ml⁻¹).

Detecção de atividade de xilanase por eletroforese

A caracterização por PAGE de xilanase excretada durante o crescimento de *Anoxybacillus* sp. 3M em subproduto agroindustrial é mostrada na figura 7. O zimograma confirma que a produção da enzima foi induzida por subprodutos

agroindustriais como o dreche cervejeiro, o bagaço de cana-de-açúcar e o farelo de trigo.

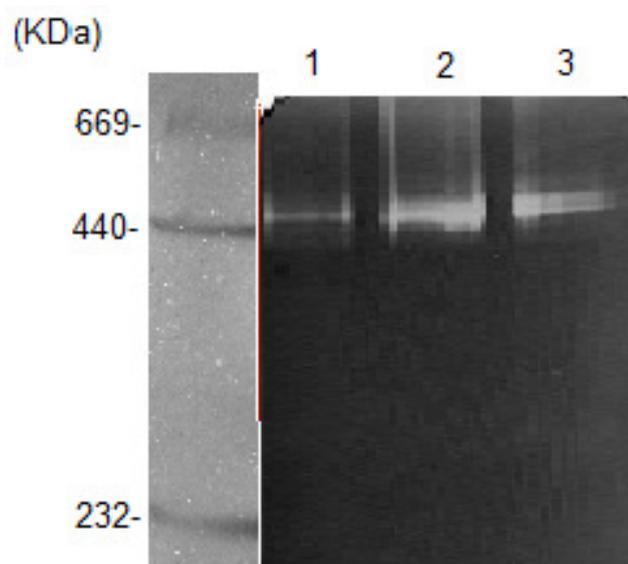


Figura 7. Análise zimograma de atividade de xilanase no sobrenadante da cultura de *Anoxybacillus* sp. 3M crescida em: banda 1- Bagaço de Cana-de-açúcar; banda 2- Dreche cervejeiro, banda 3- farelo de trigo. As alíquotas carregadas no gel continham 21 mU de atividade da xilanase.

O zimograma demonstra ainda que há uma xilanase de mesmo peso molecular (440 KDa) produzida por *Anoxybacillus* sp. 3M presente em todas as preparações. Nascimento et al. 2002 em seu estudo de produção de xilanase por *Streptomyces* sp. AMT-3, utilizando subprodutos agroindustriais encontraram quatro bandas correspondentes de xilanase no zimograma. Duas delas com peso molecular acima de 600 kDa e as outras duas bandas detectadas em torno de 240 e 170 kDa.

CONCLUSÃO

A cepa de *Anoxybacillus* sp. 3M estudada neste trabalho foi capaz de crescer e produzir xilanases usando xilana comercial e subprodutos

agroindustriais como fonte de carbono no meio de cultura. A maior taxa de produção de enzima ($1,35 \text{ U.ml}^{-1}$) foi observada para a utilização de dreche cervejeiro como fonte de carbono em meio de cultura básico. O pH e a temperatura ótima da enzima foram 5,3 e $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente, e a enzima manteve 100% da sua atividade durante 96 h, a $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH 7,0. As propriedades estudadas colocam essa enzima como promissora para aplicações biotecnológicas. A análise por PAGE indicou no zimograma que uma enzima de mesmo peso molecular estava presente nos experimentos, cujo peso molecular é aproximadamente 440 kDa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bae, H. J., Kim, H. J., Kim, Y. S. (2008) Production of a recombinant xylanase in plants and its potential for pulp biobleaching applications. *Bioresource Technology*, 99:3513-3519.
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K. (1992) Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23:257-270.
- Chapla, D., Divecha, J., Madamwar, D., Shah, A. (2010) Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. *Biochemical Engineering Journal*. 49:361–369.
- Damiano, V. B., Bocchini, D. A., Gomes, E., Da Silva, R. (2003) Application of crude xylanase from *Bacillus licheniformis* 77-2 to the bleaching of eucalyptus kraft pulp. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 19:139-144.
- Dhillon, A., Gupta, J.K. and Khanna, S. (2000) Enhanced production, purification and characterization of a novel cellulase-poor thermostable, alkalitolerant xylanase from *Bacillus circulans* AB 16. *Process Biochem.*, 35:849-856

- Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Łukasik, R. (2010) Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101:4775–4800.
- Haros, M., Rosell, C. M., Benedito, C. (2002) Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. *European Food Research and Technology*, 215:425-430.
- Heck, J. et al. (2005) Optimization of cellulase free xylanase activity by *Bacillus coagulans* BL69 in solid state cultivation. *Process. Biochem.*, 40:107–112
- Heck, J. X., Soares, L. H. B., Hertz, P. F., Ayub, M. A Z. (2006) Purification and properties of a xylanase produced by *Bacillus circulans* BL53 on solid-state cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, 32:179-184.
- Hernández, M. S., Rodríguez M. R., Guerra, N. P., Rosés, R. P. (2005) Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*, 33:275-280.
- Jänis, J., Pulkkinen, P., Rouvinen, J., Vainiotalo, P. (2007) Determination of steady-state kinetic parameters for a xylanase-catalyzed hydrolysis of neutral underivatized xylooligosaccharides by mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 365:165-173.
- Jiang, Z., Bail, A. L., Wu, A. (2008) Effect of the thermostable xylanase B (XynB) from *Thermotoga maritima* on the quality of frozen partially baked bread. *Journal of Cereal Science*, 47:172-179.
- Kapoor, M., Kuhad, R.C. (2007) Immobilization of Xylanase from *Bacillus pumilus* Strain MK001 and its Application in Production of Xylo-oligosaccharides *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142:125–138.
- Kumar, A., Gupta, R., Shrivastava, B., Khasa, Y.P., Kuhad, R.C. (2012) Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 74:170–177.

- Marques,S., Alves,L., Ribeiro,S., Gírio,F.M., Amaral-Collaço, M.T. (1998) Characterization of a Thermotolerant and Alkalotolerant Xylanase from a *Bacillus* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 73:159-172.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-429.
- Nagar,S., Mittal,A., Kumar,D., Kumar,L., Kuhad,R.C., Gupta, V.K. (2011) Hyper production of alkali stable xylanase in lesser duration by *Bacillus pumilus* SV-85S using wheat bran under solid state fermentation .*New Biotechnology*, 28:6.
- Nascimento, R.P., Coelho, R.R.R., Marques, S., Alves, L., Gírio, F.M., Bom, E.P.S., Amaral-Collaço, M.T. (2002) Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*,31:549–555.
- Ninawe, S., Kapoor, M. and Kuhad, R.C. (2008) Purification and Characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresource Technology*, 99:1252-1258.
- Ohta, K., Moriyama, S., Tanaka, H., Shige, T., Akimoto, H. (2001) Purification and characterization of an acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* var. melanigenum and sequence analysis of encoding gene. *J Biosci Bioeng*, 92(3):262-270.
- Pason, P., Kyu, K.L., Ratanakhanokchai, K. (2006) *Paenibacillus curdlanolyticus* Strain B-6 Xylanolytic-Cellulolytic Enzyme System That Degrades Insoluble Polysaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*,72:2483-2490.
- Saha, B.C. (2002) Production, purification and properties of a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Proc. Biochem.*, 37: 1279-1284.
- Santos, L.F. e Ishii, P. L. (2011) Xilanases: Principais Metodologias e Parâmetros Cinéticos. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 2:7-15.
- Song, J. M., Wei, D. Z. (2010) Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted

bagasse and minimal nutrient medium M9. *Biomass and bioenergy*, 34: 1930-1934.

Sonia, K.G. et al. (2005) Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D2W3) under solid state fermentation. *Bioresour. Technol.*96:1561–1569.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense (Campos dos Goytacazes-RJ-Brasil) em parceria com o Laboratório Nacional de Energia e Geologia (Lisboa-Portugal), com o objetivo de estudar a produção das enzimas celulasas e xilanasas por duas espécies de micro-organismos termofílicos do gênero *Bacillus* sp. , utilizando-se resíduos agroindustriais como matéria-prima, e ainda estudar algumas características bioquímicas destas enzimas.

Primeiramente foram estudadas algumas condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com solução de hidróxido de potássio com o intuito de deslignificar o material usando uma abordagem estatística.

As condições estudadas foram a concentração do hidróxido de potássio e o tempo de autoclavagem do bagaço de cana-de-açúcar e seus efeitos sinérgicos. Para isso, foi realizado um planejamento experimental para duas variáveis de acordo com a distribuição uniforme de Doehlert utilizando variáveis de resposta como concentração de celulose, hemicelulose, polissacarídeos totais e lignina.

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho pode-se concluir que o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com solução de KOH influenciou na composição química deste resíduo. A variável com maior poder de influência no teor de celulose, hemicelulose, polissacarídeos totais e lignina foi a concentração da solução de KOH. As melhores condições de tratamento a aplicar ao bagaço de cana para a extração de lignina são: tempo de autoclavagem maior

que 35 minutos, concentração de KOH entre 5% e 10%. Estas condições possibilitam uma redução da lignina do bagaço de 18,6% para níveis abaixo de 5%, com um aumento dos polissacáridos totais para níveis maiores que 95%.

Posteriormente, a cepa termofílica brasileira de *Bacillus* sp. SMIA-2 foi estudada quanto a produção de celulases e xilanases. A cepa produziu bons níveis de avicelase, CMCase e xilanase em fermentação submersa, utilizando bagaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho como substratos de baixo custo. A produção das enzimas começou na fase de crescimento exponencial, atingindo um máximo a 72 h para a xilanase, 120 h para a avicelase e a 168 h no caso da CMCase. Os estudos de caracterização indicaram que os valores de pH ótimo foram de 8,5; 7,5 e 7,5 para a avicelase em extrato bruto, precipitada e dialisada, respectivamente; para a CMCase os valores de pH ótimo foram de 9,0, 8,0 e 8,0 para a CMCase em extrato bruto, precipitado e dialisado, respectivamente; e para a xilanase foram de 7,5; 7,0 e 7,0 para a enzima em extrato bruto, precipitado e dialisado, respectivamente. A temperatura para uma atividade ótima das três enzimas foi de 70 °C nos três estados. Os resultados mostraram também que as enzimas permaneceram 100% estáveis a 60 °C durante 3 horas e que foram estimuladas por Mn^{2+} e Co^{2+} .

As características apresentadas pelas celulases de *Bacillus* sp. SMIA-2 em extrato bruto, precipitado e dialisado mostraram que estas enzimas podem apresentar comportamentos diferentes quando purificadas, corroborando a importância de determinar as características e parâmetros desta enzima em seu extrato bruto e purificado para utilização em processos biotecnológicos, e considerar esta informação de acordo com as aplicações que se pretende.

As características apresentadas pelas avicelase e CMCase de *Bacillus* sp. SMIA 2- demonstram que estas enzimas podem ser muito úteis em aplicações biotecnológicas. Podendo se tornar uma fonte nova e interessante de enzimas de degradação de lignocelulose com importantes vantagens econômicas. De fato, os resultados sobre o pH e os perfis de temperatura, e também as características de estabilidade térmicas em comparação com outros *Bacillus*, têm mostrado que a estirpe é promissora.

O último estudo foi de produção da enzima xilanase pela cepa portuguesa *Anoxybacillus* sp. 3M. Este micro-organismo foi capaz de crescer e produzir

xilanases usando xilana comercial e subprodutos agroindustriais como fonte de carbono no meio de cultura. A maior taxa de produção de enzima ($1,35 \text{ U.ml}^{-1}$) foi observada para a utilização de dreche cervejeiro como fonte de carbono em meio de cultura básico. O pH e a temperatura ótima da enzima foram 5,3 e $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente, e a enzima manteve 100% da sua atividade durante 96 h, a $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH 7,0. Estas propriedades colocam esta enzima como promissora para aplicações biotecnológicas. A análise indicou no zimograma que uma enzima de mesmo peso molecular (440 kDa) estava presente nos experimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Fattah, Y.R., El-Helow, E.R., Ghanem, K.M., Lotfy, W.A.(2007) Application of Factorial Designs for Optimization of Avicelase Production by a *Thermophilic Geobacillus* Isolate. *Research Journal of Microbiology*, 2:13-23.
- Acharya, P. B., Acharya, D. K., Modi, H. A.(2008) Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate. *African Journal of Biotechnology*,7: 4147-4152.
- Adsul, M.G., Ghuleb, J.E., Singhb, R., Shaikhb, H. (2005) Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymers.*, 62:6-10.
- Aguiar, A., Ferraz, A. (2011) Revisão: Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. *Quim. Nova*, 34:1729-1738.
- Aguiar Filho, J.A.M. (2008) *Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Piracicaba - SP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-Universidade de São Paulo, 79p.
- Aliyu,S., Bala, M. (2011) Review: Brewer’s spent grain: A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology*, 10:324-331.

- Asgher, M., Ahmad, Z., Iqbal, H.M.N. (2013) Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. *Industrial Crops and Products*, 44:488–495.
- Assareh, R., Zahiri, H.S., Noghabi, K.A., Aminzadeh, S., Khaniki, G.B.(2012) Characterization of the newly isolated *Geobacillus* sp. T1, the efficient cellulase-producer on untreated barley and wheat straws. *Bioresource Technology*, 120:99–105.
- Azevedo, J.L. (2004) *Genética de fungos*. In: ESPÓSITO, E. Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul. Educs, Cap. 5, 173-214.
- Bae, H. J., Kim, H. J., Kim, Y. S. (2008) Production of a recombinant xylanase in plants and its potential for pulp biobleaching applications. *Bioresource Technology*, 99:3513-3519.
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., (1992) Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23:257-270.
- Balat, M.; Balat, H.(2009) Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy*, 8:2273-2282.
- Bano,S.,Qader, S.A.,Aman, F., Syed, M.N., Durrani, K. (2013) High production of cellulose degrading endo-1,4-glucanase using bagasse as a substrate from *Bacillus subtilis* .*Carbohydrate Polymers*, 91:300–304.
- Baudel, H.M. (2006) Pré-tratamento e hidrólise. In: *Workshop tecnológico sobre: Hidrolise para produção de etanol, projeto programa de pesquisas em políticas públicas*. Campinas. Palestra. Campinas: UNICAMP,. Disponível em: <http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/Hidrolise%20Baudel%20Apresenta%20E7%E3o.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2008.
- Betancur, G.J.V., Pereira, N.J. (2010) Sugarcane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part 1: diluted acid pretreatment optimization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13:1–9.

- Birsan, C., Johnson, P., Joshi, M., Macleod, A., Mcintosh, L., Monem, V., Nitz, M., Rose, D. R., Tull, D., Wakarchuck, W. W., Wang, Q., Warren, R. A., Whithe, A., Withers. S. G. (1998) Mechanisms of cellulases and xylanases. *Biochemical Society Transactions*, 26:156–160.
- Blanco, A. et al. (1995) Purification and properties of xylanase A from alkalitolerant *Bacillus* sp. strain BP-23. *Appl. Env. Microbiol.*, 61:4468–4470
- Bon, E.P.S., Ferrara, M.A., Corvo, M.L. (2008) *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência. 506p.
- Braga, A.R.C., Manera, A.P., Ores, J.C., Sala, L., Maugeri, F., Kali, S. J. (2012) Kinetics and Thermal Properties of Crude and Purified β -Galactosidase with Potential for the Production of Galactooligosaccharides.
- Canilha, L., Milagres, A. M. F., Silva, S. S., Silva, J. B. A., Felipe, M. G. A., Rocha, G. J. M., Carvalho, W. (2010) *Rev. Anal.*, 44-48.
- Cardona, C.A., Quintero, J.A., Paz, I.C. (2010) Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresour. Technol.* 101:4754–4766.
- Carrasco, C., Baudel, H.M., Sendelius, J., Modig, T., Roslander, C., Galbe, M., Hahn-Hägerdal, B., Zacchi, G., Lidén, G. (2010) SO₂-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. *Enzyme Microb. Technol.* 46:64–73.
- Carvalho, G.B.M., Ginóris, Y.P., Cândido, E.J., Canilha, L., Carvalho, W., Almeida e Silva, J.B. (2005) Estudos do hidrolisado de eucalipto em diferentes concentrações utilizando evaporação a vácuo para fins fermentativos. *Revista Analyca.* 14:54-57.
- Castro, A.M., Pereira Jr., N. (2010) Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quim. Nova.*, 33:181-188.

- Chandel, A.K., Es, C., Rudravaram, R., Narasu, M.L., Rao, L.V., Ravindras, P. (2007) Economics and environmental impacts of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology*, 2:14-32.
- Chandrakant, P., Bisaria, V.S. (2000) Simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of xylose isomerase. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 53:301-309.
- Chapla, D., Divecha, J., Madamwar, D., Shah, A. (2010) Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. *Biochemical Engineering Journal*, 49:361–369.
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G. (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29:3–23.
- Dagnino, E.P., Chamorro, E.R., Romano, S.D., Felissia, F.E., Area, M.C. (2013) Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. *Ind. Crops Prod.*, 42:363–368.
- Damiano, V. B., Bocchini, D. A., Gomes, E., Da Silva, R. (2003) Application of crude xylanase from *Bacillus licheniformis* 77-2 to the bleaching of eucalyptus kraft pulp. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 19:139-144.
- Deming, S.N., Morgan, S.L. (1987) Experimental Design: a Chemometric Approach, 1st edn. *Elsevier Science Publishers*.
- Dhillon, A., Gupta, J.K., Khanna, S. (2000) Enhanced production, purification and characterization of a novel cellulase-poor thermostable, alkalitolerant xylanase from *Bacillus circulans* AB 16. *Process Biochem.*, 35:849-856
- Doehlert, D.H. (1970) Uniform shell designs. *Appl Stat.*, 19:231–239
- Ebringerova, A., Hromadkova, Z., Heinze, T. (2005) Hemicellulose. *Adv. Polym. Sci.*, 186:1–67.
- Fan, L.T., Gharpuray, M.M., Lee, Y.-H., 1987. In: *Cellulose Hydrolysis*

Biotechnology Monographs. Springer, Berlin, p. 57.

- Fasanella, C.C. (2008) *Ação de enzimas lignocelulolíticas produzidas por Aspergillus niger e Penicillium sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Piracicaba-SP, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 80p.
- Fukushima, S. R., Hatfield, R. D. (2003) Espectros de duas formas de lignina obtidos por ressonância magnética nuclear. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38:505-511.
- Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R. (2010) Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101:4775–4800.
- Gomes I, Gomes J, Gomes DJ, Steiner W. (2000) Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and β -glucosidase by the wild thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *App Microbiol Biotechnol*, 53:461-468.
- Goshadrou, A., Karimi, K., Taherzadeh, M.J. (2011) Bioethanol production from sweet sorghum bagasse by *Mucor hiemalis*. *Ind. Crops Prod.*, 34:1219–1225.
- Hamelinck, C.N., Hooijdonk, G.V., Faaij, A.P.C. (2005) Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 28:384-410.
- Haros, M., Rosell, C. M., Benedito, C. (2002) Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. *European Food Research and Technology*, 215:425-430.
- Heck, J. et al. (2005) Optimization of cellulase free xylanase activity by *Bacillus coagulans* BL69 in solid state cultivation. *Process. Biochem.*, 40:107–112.

- Heck, J. X., Soares, L. H. B., Hertz, P. F., Ayub, M. A Z. (2006) Purification and properties of a xylanase produced by *Bacillus circulans* BL53 on solid-state cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, 32:179-184.
- Hernández, M. S., Rodríguez M. R., Guerra, N. P., Rosés, R. P. (2005) Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*, 33:275-280.
- Himmel, M.E., Ding, S.Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D. (2007) Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315:804-807.
- Hirasawa, K., Uchimura, K., Kashiwa, M., Grant, W.D., Ito, S., Kobayashi, T., Horikoshi, K. (2006) Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89:211-219.
- Hiremath, K.S.; Patil, C.S. (2011) Isolation, production and characterization of alkalo thermostable xylanase from newly isolated *bacillus* sp. *International Journal of Biotechnology Applications*, 3:48-51.
- Hofsetz, K., Silva, M.A. (2012) Brazilian sugarcane bagasse: energy and non-energy consumption. *Biomass Bioenergy*, 46:564-576.
- Jänis, J., Pulkkinen, P., Rouvinen, J., Vainiotalo, P. (2007) Determination of steady-state kinetic parameters for a xylanase-catalyzed hydrolysis of neutral underivatized xylooligosaccharides by mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 365:165-173.
- Jayapal, N., Samanta, A.K., Atul P.K., Senani, S., Suresh, K.P., Sampath, K.T. (2013) Value addition to sugarcane bagasse: Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. *Industrial Crops and Products*, 42:14–24.
- Jiang, Z., Bail, A. L., Wu, A. (2008) Effect of the thermostable xylanase B (XynB) from *Thermotoga maritima* on the quality of frozen partially baked bread. *Journal of Cereal Science*, 47:172-179.

- Kapoor, M., Kuhad, R.C. (2007) Immobilization of Xylanase from *Bacillus pumilus* Strain MK001 and its Application in Production of Xylo-oligosaccharides. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 142:125–138.
- Karmakar, M., Ray, R.R. (2011) Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases. *Research Journal of Microbiology*, 6:41-53.
- Kiddinamoorthy, J. et al. (2008) Production, purification and characterization of *Bacillus* sp. GRE7 xylanase and its application in eucalyptus Kraft pulp biobleaching. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24:605–612.
- Kim, Y., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., Holtzapple, M.T., Falls, M., Ramirez, R.S., Donohoe, B.S., Vinzant, T.B., Elander, R.T., Hames, B., Thomas, S., Warner, R.E., Wyman, C.E. (2011) Application of cellulase and hemicellulase to pure xylan, pure cellulose, and switchgrass solids from leading pretreatments. *Bioresource Technology*, 102:80–88.
- Krishnan, C., Sousa, L.C., Jin, M., Chang, L., Dale, B.E., Balan, V. (2010) Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. *Biotechnol Bioeng.*, 107:441-450.
- Ko, C.H., Lin, Z.P., Tu, J., Tsai, C.H., Liu, C.C., Chen, H.T., Wang, T.P. (2010) Xylanase production by *Paenibacillus campinasensis* BL11 and its pretreatment of hardwood kraft pulp bleaching. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64:13–19.
- Kocher, G.S., Kalra, K.L., Banta, G. (2008) Optimization of cellulase production by submerged fermentation of rice straw by *Trichoderma harzianum* Rut-C 8230. *The Internet J. Microbiol.*, 5.
- Kubicek, C.P., Mikus, M., Schuster, A., Schmoll, M., Seiboth, B. (2009) Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnology for Biofuels*, 2:19.

- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P. (2009) Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind Eng Chem Res.* 48:3713-3729.
- Kumar,A., Gupta,R., Shrivastava,B., Khasa,Y.P., Kuhad,R.C. (2012) Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp.RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 74:170–177.
- Lee, K., Moon, S.H. (2003) Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. *Journal of Biotechnology,* 102:261-268.
- Lee, K., Jeya, M., Joo, A., Singh, R., Kim, I., Lee, J. (2010) Purification and characterization of a thermostable endo-beta-1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. *Enzyme and Microbial Technology,* 46:206–211.
- Li, W., Zhang, W.W., Yang, M.M., Chen, Y.L. (2008) Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Mol Biotechnol.,* 2:195-201.
- Liang, Y., Yesuf, J., Schmitt, S., Bender, K., Bozzola, J. (2010) Study of cellulases from a newly isolated thermophilic and cellulolytic *Brevibacillus* sp. strain JXL. *J Ind Microbiol Biotechnol.,* 36:961-70.
- Lima,U.A., Aquarone,E., Borzani,W., Schmidell,W. (2001) *Biotechnologia industrial.* V3: Processos Fermentativos e Enzimáticos. 1^aed. Editora Edgard Blucher LTDA. 11- 20.
- Lima, A.L.G., Nascimento, R.P., Bom, E.P.S., Coelho, R.R.R. (2005) Cellulase activity produced by *Streptomyces drozdowiczii* using low cost agro-industrial by-products and tests for biotechnological application. *Enz Microb Technol,* 37:272–277.
- Lin, L., Kan, X., Yan, H., Wang, D. (2012) Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Electronic Journal of Biotechnology,* 15:1-7.

- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66:506-577.
- Liu, J., Yuan, X., Zeng, G., Shi, J., Chen, S. (2006) Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, 41:2347–2351.
- Maki, M., Leung, K.T., Qin, W. (2009) The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int J Bio Sci*, 5:500-516.
- Makky, E.A. (2009) Avicelase Production by a Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* Isolated from Soil using Sugarcane Bagasse. *World Academy Science Engineering Technology*, 57:487-491.
- Marques, S., Alves, L., Ribeiro, S., Gírio, F.M., Amaral-Collaço MT. (1998) Characterization of a Thermotolerant and Alkalotolerant Xylanase from a *Bacillus* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 73:159-172.
- Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R., Mattiasson, B. (2000) Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology*, 83:177–187.
- Menezes, C.R. (2007) *Estudo da atividade prebiótica de hidrolisados Lignocelulósicos*. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Campinas-SP, Universidade Estadual de Campinas, 142p.
- Michelin, M., Polizeli, M.L.T.M., Ruzene, D.S., Silva, D.P., Vicente, A.A., Jorge, J.A., Terenzi, H.F. (2008) A new strategy for xylanase production using wheat straw autohydrolysis liquor as substrate. *Proceedings of the 10 th International Chemical and Biological Engineering Conference*. Braga. Portugal.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-429

- Monte, J.R., Brienzo, M., Milagres, A.M.F. (2011) Utilization of pineapple stem juice to enhance enzyme-hydrolytic efficiency for sugarcane bagasse after an optimized pre-treatment with alkaline peroxide. *Appl. Energy*, 88:403–408.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapfel, M., Ladisch, M. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96:673-686.
- Nagar, S., Mittal, A., Kumar, D., Kumar, L., Kuhad, R.C., Gupta, V.K. (2011) Hyper production of alkali stable xylanase in lesser duration by *Bacillus pumilus* SV-85S using wheat bran under solid state fermentation. *New Biotechnology*, 28:581-587.
- Nakagame, S., Chandra, R.P., Kadla, J.F., Saddler, J.N. (2011) *Bioresource Technology*. The isolation, characterization and effect of lignin isolated from steam pretreated on the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresource Technology*, 102:4507–4517.
- Nakamura, S. et al. (1994) Thermophilic alkaline xylanase from newly isolated alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. strain TAR-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58:78–81.
- Nascimento, R.P., Coelho, R.R.R., Marques, S., Alves, L., Girio, F.M., Bom, E.P.S., Amaral-Collaco, M.T. (2002) Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*, 31:549–555.
- Nawel, B., Said, B., Estelle, C., Hakim, H., Duchiron, F. (2011) Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. *Process Biochemistry*, 46:519–525.
- Ninawe, S., Kapoor, M. and Kuhad, R.C. (2008) Purification and Characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresource Technology*, 99:1252-1258.
- Ogeda, T.L., Petri, D.F.S. (2010) Revisão: Hidrólise enzimática de biomassa.

Quim. Nova, 33:1549-1558.

- Ohta, K., Moriyama, S., Tanaka, H., Shige, T., Akimoto, H. (2001) Purification and characterization of an acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* var. melanigenum and sequence analysis of encoding gene. *J Biosci Bioeng.*, 92:262-270.
- Okazaki, W. et al. (1985) Purification and characterization of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. W-1. *Agric. Biol. Chem.* 49:2033–2039.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., Vandenberghe, L.P.S., Mohan, R (2000) Technological potential of agro-industrial residues. II:cassava bagasse. *Bioresouce Technology*, 74:81-87.
- Parajó, J.C., Garrote, G., Cruz., Dominguez, H. (2004) Production of xylooligosaccharides by autohidrolysis of lignocellulosic materials. *Trends in Food Science & Technology*, 15:115-120.
- Parekh, M., Formanek, J., Blaschek, H.P. (1999) Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using a low-cost corn steep water based fermentation medium. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 51:152-157.
- Park, Y.S., Kang, S.W., Lee, J.S., Hong, S.I., Kim, S.W. (2002) Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 58:761–766.
- Pason, P., Kyu, K.L., Ratanakhanokchai, K. (2006) *Paenibacillus curdlanolyticus* Strain B-6 Xylanolytic-Cellulolytic Enzyme System That Degrades Insoluble Polysaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:2483-2490.
- Pauly, M., Keegstra, K. (2008) Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J.* 54:559-568.
- Peng, F., Ren, J.L., Xu, F., Bian, J., Peng, P., Sun, R.C. (2010) Fractional studies of alkali soluble hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from

- sugar cane bagasse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:1768–1776.
- Peixoto, A.B. (2006) *Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas, 84p.
- Peterson GLA. 1977. Simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochem.*, 83:346-356.
- Prakash, B., Vidyasagar, M., Jayalakshmi, S.K., Sreeramulu, K. (2012) Purification and some properties of low-molecular-weight extreme halophilic xylanase from *Chromohalobacter* sp. TPSV 101. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 74:192–198.
- Queiroz, C. (2008) Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control. *Food Rev. Int.* 24:361-375.
- Rabelo, S. C. (2007) *Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-deaçúcar*. Dissertação (Mestrado)- Campinas-SP, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas,
- Radford, S.J.E., Downes, D., Solomon, P.M., Barrett, J., Sage, L.J. (1996) Resolution of the discrepancy in the CO(3-2) flux of iras. *Astronomical Journal*, 111:1021-1024.
- Raimbault, M. (1998) General and Microbial aspects of solid substrate fermentation. *Elec. J. Biotechnol.*, 1:174-188.
- Ramos, L. P. (2003) The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, 26:863-871.

- Rezende, C.R., Lima, M.A, Maziero, P., Azevedo, E.R., Garcia, W., Polikarpov, I. (2011) Sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels*, 4:54.
- Rodrigues, F. A. (2007) *Avaliação da tecnologia de hidrólise ácida de bagaço de cana*. Dissertação (Mestrado) – Campinas-SP, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. 93p.
- Ruegger, M.J.S., Tauk-Tornisielo, S.M. (2004) Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. *Revista Brasileira de Botânica*, 2:205-211.
- Saha, B.C. (2002) Production, purification and properties of a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Proc. Biochem.*, 37:1279-1284.
- Sandgren, M., Sahlberg, J., Mitchinson, C. (2005) Structural and biochemical studies of GH family cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog. Bioph. Mol. Biol.*, 89:246-291.
- Sannigrahi, P.; Miller, S.; Ragauskas, A. J.; Carbohydr. Res. (2010) 345:965.
- Santos, L.F. e Ishii, P. L. (2011) Xilanases: Principais Metodologias e Parâmetros Cinéticos. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 2:7-15.
- Santos, M.S., Ribeiro, F.M. (2005) *Cervejas e Refrigerantes*. CETESB. São Paulo. 58p.
- Santos F.A., Queiróz J.H., Colodette J.L., Fernandes S.A., Guimarães V.M., Rezende S.T. (2012) Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quim Nova*, 35:1004-1010.
- Schallmey, M., Singh, A., Ward, O.P.(2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol.*, 50:1–17.
- Scridevi, A., Narasimba, G., Reddy, B.R. (2009) Production of cellulases by *Aspergillus Niger* on natural na pretreated lignocellulosic wastes. *The internet Journal of Microbiology*. 7:1.

- Shah, A.R., Madamwar, D. (2005) Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochem.*, 40:1763-1771.
- Sharma, R. K., Arora, D. S. (2010) Production of Lignocellulolytic Enzymes and Enhancement of In Vitro Digestibility During Solid State Fermentation of Wheat Straw by *Phlebia Floridensis*. *Bioresour Technol.*, 92:48-53.
- Shi, J., Ebrik, M.A., Yang, B., Garlock, R.J., Balan, V., Dale, B.E. , Pallapolu, V.R., Lee, Y.Y., Kim, Y., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., Holtzapple, M.T., Falls, M., Ramirez, R.S., Donohoe, B.S., Vinzant, T.B., Elander, R.T., Hames, B., Thomas, S., Warner, R.E., Wyman, C.E. (2011) Application of cellulase and hemicellulase to pure xylan, pure cellulose, and switchgrass solids from leading pretreatments. *Bioresource Technology*, 102:80–88.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D.(2011) *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*. Technical Report NREL/TP-510-42618. 18p.
- SINDICERV- *Sindicato Nacional da Industria da Cerveja*. WWW.sindicerv.com.br.
- Singh, J., Batra. N, Sobti, R.C.(2001) A highly thermostable, alkaline CMCase produced by a newly isolated *Bacillus* sp. VG1. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17: 761–765
- Singh, R., Varma, A.J., Laxman, R.S., Rao, M. (2009) Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium cellulases*: comparison with commercial cellulose. *Bioresource Technology*, 100:6679-6681.
- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, A. (2010) Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microbial Technology*, 46:541-549.
- Silva, V.L.M.M., Gomes, W.C., Alsina, O.L.S. (2007) Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos.

Revista Eletrônica de Materiais e Processos, 2:27-32.

- Silva, T.P., Paixão S.M., Teixeira, A.V., Roseiro, J.C., Alves, L. (2013) Optimization of low sulfur carob pulp liquor as carbon source for fossil fuels biodesulfurization. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, (DOI 10.1002/jctb.3921).
- Siqueira, S.J.L. (2006) *Clonagem do cDNA da endoglicanase 2 de Humicola grisea var. thermoidea e sua expressão em Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação (mestre em biologia molecular)-Brasília-DF, Universidade de Brasília, 89p.
- Socol, C.R., Vandenberghe, L.P.S, Medeiros, A.B.P, Karp, S.G., Buckeridge, M., Ramos, L.P., Pitarelo, A.P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L.M.F., Ferrara, M.A., Bom, E.P.S., Moraes, L.M.P., Araújo, J.A., Torres, F.A.G. (2010) Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Bioresour Technol.*, 101:4820–4825.
- Song, J. M., Wei, D. Z. (2010) Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. *Biomass and bioenergy*, 34:1930-1934.
- Sonia, K.G. et al. (2005) Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D2W3) under solid state fermentation. *Bioresour. Technol*, 96:1561–1569.
- Souza, A.N., Martins, M.L.L. (2001) Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazillian Journal of Microbiology*, 32:271-275.
- Souza, C.J.A., Costa, D.A., Rodrigues, M.Q.R.B., Santos, A.F., Lopes, M.R., Abrantes, A.B.P., Costa, P.S., Silveira, W.B., Passos, F.M.L., Fietto, L.G. (2012) The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 109:63–69.

- Srinivasan, M. C., Meenakshi, V. R. (1999) Microbial xylanase for paper industry. *Current Science*, 77:137-142.
- Sticklen, M.B. (2008) Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews Genetics*, 9:433-443.
- Sukumaran, R.K., Surender, V.J., Sindhu, R., Binod, P., Janu, K.U., Sajna, K.V., Rajasree, K.P., Pandey, A. (2010) Lignocellulosic ethanol in India: Prospects, challenges and feedstock availability. *Bioresour Technol.*, 101:4826-33.
- Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol.*, 83:1-11.
- Susumu, I. (1997) Alkaline cellulases from alkaliphilic *Bacillus*: Enzymatic properties, genetics and application to detergents. *Extremophiles*, 1:61-66.
- Takahashi, H., Nakai, R., Nakamura, S. (2000) Purification and partial characterization of a basic xylanase produced by thermoalkalophilic *Bacillus* sp. strain TAR-1. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 64:887-890.
- Tomme, P., Warren, R.A.J., Miller, R.C., Kilburn, D.G., Gilkes, N.R. (1995) Cellulose-binding domains: classification and properties. *ACS Symposium Series*, 618:143-163.
- Uenojo, M, Pastore, G.M. (2007) Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, 30:388-394.
- Vasconcelos, A., Cavaco-Paulo, A. (2006) Enzymatic removal of cellulose from cotton/polyester fabric blends. *Cellulose*, 13:611-618.
- Vásquez, M. P., Silva, J. N.C., Souza, M. B., Pereira Jr., N. (2007) Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137:141-153.
- Ververis, C., Georghiou, K., Danielidis, D., Hatzinikolaou, D.G., Santas, P., Santas, R., Corleti, V. (2007) Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content

of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Bioresource Technology*, 98: 296-301.

Vicente, N.E.V. (2002) *Biodegradação de bagaço de cana de açúcar por linhagens/espécie de Pleurotus spp e avaliação nutricional para ruminantes*. Tese (Doutorado) – Campinas-SP, Universidade Estadual de Campinas-Unicamp.

Warren, R. A. J. (1996) Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annual Reviews in Microbiology*, 50:183-212.

Wu, Y. B., V. Ravindran, D. G. Thomas, M. J. Birtles and W. H. Hendriks. (2004) Influence of method of whole wheat inclusion and xylanase supplementation on the performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology of broilers. *Br. Poult. Sci.* 45:385-394.

Zhang, Y.P., Lynd, L.R. (2004) Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng.*, 88:797-824.

Zhang, P., Himmel, M.E., Mielenz, J.R. (2006) Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24:452-481.

Ziegler, I. M., Holmgren, A., Forsling, W., Lindberg, M., Ranheimer, M. (2004) Mechanism of the adsorption process of pinosylvin and some polyhydroxybenzenes onto the structure of lignin. *Vibrational Spectroscopy*, 36:65-72.

Wyman, C.E. (2003) Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals, and power. *Biotechnology Progress*, 19:254-262.