

TIAGO FERREIRA LEAL

**POTENCIAL DO *Trichoderma deliquescens* J-7 PARA
PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES
DESTINADA A SACARIFICAÇÃO E
BRANQUEAMENTO DA POLPA KRAFT**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

L435p
2015

Leal, Tiago Ferreira, 1985-
Potencial do *Trichoderma deliquescens* J-7 para produção
de celulases e hemicelulases destinada a sacarificação e
branqueamento da polpa Kraft / Tiago Ferreira Leal. – Viçosa,
MG, 2015.
ix, 82f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sebastião Tavares de Rezende.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.76-82.

1. *Thichoderma deliguescens*. 2. Enzimas de fungos.
3. Biomassas. 4. Celulose. 5. Hemicelulose. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.5677

TIAGO FERREIRA LEAL

**POTENCIAL DO *Trichoderma deliquescens* J-7 PARA PRODUÇÃO DE
CELULASES E HEMICELULASES DESTINADA A SACARIFICAÇÃO E
BRANQUEAMENTO DA POLPA KRAFT**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 30 de abril de 2015.



Valéria Monteze Guimarães



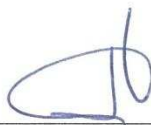
Monique Renon Eller



Larissa Mattos Trevizano



Renata Guerra de Sá



Sebastião Tavares de Rezende
(Orientador)

**“Oh, meditemos estritamente na luz adorável daquela divina Savitri
(o sol interior). Possa ela iluminar nossas mentes!”**

Gayatri Mantra (traduzido para o inglês por Aleister Crowley em Liber ABA)

BIOGRAFIA

TIAGO FERREIRA LEAL, filho de Manoel Gomes Leal e Maria de Lurdes Ferreira Leal, nasceu na cidade de Santo Antônio do Gramma, Minas Gerais, em 28 de abril de 1985.

Em março de 2008, graduou-se em Farmácia pela Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

Em junho de 2010, tornou-se mestre em Ciências Biológicas com ênfase em Bioquímica Estrutural e Fisiológica pela Universidade Federal de Ouro Preto, iniciando em 2011, o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, submentendo-se a defesa de tese em 30 de abril de 2015.

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente agradecido à vida! Tudo que posso pensar em viver, eu vivo.

Ao Professor Sebastião Tavares de Rezende por ter aceitado orientar este trabalho;

À Professora Valéria Monteze Guimarães que sempre acreditou em meu potencial;

À Professora Renata Guerra por seus ensinamentos no início de minha jornada científica;

Ao colaborador Professor Jorge Luiz Colodette e sua equipe, principalmente ao Lucas Recla e Phelipe de Souza Ávila por auxiliar nos experimentos de branqueamento da polpa Kraft;

Ao Eduardo Pereira Monteiro, sempre disposto quando eu chegava correndo na secretaria;

Um agradecimento especial aos meus colegas do grupo de pesquisa por me aturarem e sempre darem forças para que seguisse meu caminhando: Daniel Falkoski, Maíra Nicolau, Larissa Trevisano, Gabriela Maitan Alfnas, Rosilene Rodrigues, Lílian Fialho, Evan Visser, Rafaela Ladeira, Rafaela Ventorini, Mariana Furtado, Elisa Barreto, Mariana Bicalho e Tiago Dutra.

Aos amigos que fiz em Viçosa, principalmente, meu primo Lucas Lima que me atura e nunca reclamou, ao Elieseu Tanada que sempre me ajuda em tudo que preciso, à Nayara Guerra e Luiza Fornero sempre me abrigando, todos vocês fizeram meus dias melhores.

Enfim, a todos que contribuíram direto ou indiretamente para a conclusão de mais esta etapa de minha agradecida vida.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1. Revisão da literatura.....	7
CAPÍTULO 2. Produção de celulases e xilanases pelo <i>Trichoderma deliquescens</i> J-7 para sacarificação de bagaço de cana.....	30
CAPÍTULO 3. High production and characterization of xylanase from <i>Trichoderma deliquescens</i> J-7 and its action on biobleaching KRAFT pulp.....	52
CONCLUSÃO GERAL.....	76
BIBLIOGRAFIA.....	77

RESUMO

LEAL, Tiago Ferreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2015.
Potencial do *Trichoderma deliquescens* J-7 para produção de celulases e hemicelulases destinada a sacarificação e branqueamento da polpa Kraft.
Orientador: Sebastião Tavares de Rezende.

A biotecnologia pode contribuir para tornar os processos industriais mais competitivos e sustentáveis. No processamento convencional da cana de açúcar, cerca de 50% do bagaço poderá ser utilizado como matéria prima para a produção do etanol de segunda geração, após a redução dos custos do processo, que atualmente inviabilizam o processo. No branqueamento da polpa Kraft, o emprego de enzimas leva à redução de resíduos tóxicos. Neste trabalho o isolado *Trichoderma deliquescens* J-7 foi avaliado quanto ao seu potencial para produção de enzimas lignocelulolíticas visando suas aplicações em processos biotecnológicos, mais precisamente, processos de sacarificação do bagaço de cana de açúcar e no branqueamento da polpa Kraft de eucalipto. O fungo foi cultivado em meio líquido contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio e, após sete dias de cultivo, os extratos produzidos foram coletados e analisados. A palha de milho foi a melhor opção para produção de celulases embora uma maior produção de β -glicosidase tenha sido observada para o cultivo com palha de cana. Testes estatísticos com delineamentos fatoriais foram então utilizados para avaliar o efeito das concentrações dos componentes do meio afim de se otimizar a produção das enzimas, sendo otimizada a produção de xilanase (784 U/mL). Contudo não foi possível ajustar um modelo para a atividade CMC_{case}. As enzimas foram mais ativas entre 50 °C e 65 °C e no pH 4,5 a 5,5. O tempo de meia vida a 50 °C das celulases foi de

aproximadamente 32 horas e da xilanase de 66 minutos a 60 °C. Na aplicação das enzimas foi observado um menor rendimento na conversão de glicose na sacarificação da biomassa comparando o extrato do *T. deliquescens* com o extrato comercial Multifect® CL. Entretanto o rendimento na conversão de xilana foi aproximadamente 4 vezes maior. Quando aplicada no branqueamento da polpa, a xilanase produzida pelo fungo possibilitou a uma redução de 14% da utilização de dióxido de cloro além de maiores níveis de alvura da polpa. Estes dados nos mostraram o grande potencial da utilização dos extratos enzimáticos produzidos pelo isolado J-7 de *T. deliquescens* nos processos estudados.

ABSTRACT

LEAL, Tiago Ferreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2015. **Potential of *Trichoderma deliquescens* J-7 for the production of cellulases and hemicellulases intended to saccharification and Kraft pulp bleaching.** Adviser: Sebastião Tavares de Rezende.

Biotechnology can help to make industrial processes more competitive and sustainable. In conventional processing of sugar cane, about 50% of the bagasse could be used as raw material for the production of second generation ethanol after reduction of process costs. In Kraft pulp bleaching, biotechnology with the use of enzymes leads to a reduction of toxic wastes. The *Trichoderma deliquescens* J-7 strain was evaluated for its potential to produce lignocellulolytic enzymes aiming their applications in biotechnological processes, more precisely, in saccharification of sugar cane bagasse and bleaching of eucalyptus kraft pulp. The fungus was grown in liquid medium with different sources of carbon and nitrogen and after seven days of growth, produced extracts were collected and analyzed. Corn husk proved to be the best option for production of cellulases while increased production of β -glucosidase was observed when using sugar cane straw. Statistical factorial designs were used to evaluate the concentrations of the medium components in order to optimize the production of enzymes, being optimized to produce xylanase (784 U/mL). However it was not possible to fit a model to CMCase activity. The enzymes are most active between 50 °C and 65 °C, pH 4.5 to 5.5. The half-life for cellulases at 50 °C was approximately 32 hours and for xylanase 66 minutes at 60 °C. In application of enzymes was observed lower yield on glucose conversion in the saccharification of biomass comparing *T. deliquescens* extract and the commercial extract Multifect® CL. However, the yield of xylan conversion was about 4 times

higher. When applied in pulp bleaching, a GH11 xylanase produced by the fungus led to a 14% reduction in the use of chlorine dioxide as well as higher levels of pulp brightness. These data have shown us the great potential of the use of enzymatic extracts produced by the strain J-7 of *T. deliquescens* in studied processes.

Introdução Geral

No contexto atual em que o crescimento sustentável é o caminho encorajado pela União das Nações Unidas (ONU); diversos países, empresas e a sociedade visam reduzir os impactos ambientais de suas ações diárias. Esse conceito de sustentabilidade está baseado na produção e entrega de bens e serviços a preços competitivos e que satisfaçam as necessidades humanas, promovendo qualidade de vida, ao mesmo tempo em que progressivamente, são reduzidos os impactos ambientais e a intensidade do consumo de recursos naturais, em consonância com a capacidade estimada da Terra em prover estes recursos e absorver os impactos (UNEP-DTIE, 2001).

Para atingir esse objetivo, novas tecnologias surgem à medida que as pesquisas e parcerias do setor público e do privado caminham, tal como as biorrefinarias. O conceito de biorrefinaria baseia-se na utilização de moléculas de carbono extraído de plantas, a fim de substituir as moléculas oriundas do petróleo e do gás natural (KAMM; KAMM, 2004). Considerando-se o ciclo do carbono, o uso global de biomassa poderia limitar o impacto do dióxido de carbono sobre o aquecimento global. A substituição de moléculas fósseis por moléculas derivadas de biomassas utilizaria partes das plantas, especialmente as partes não utilizadas como gêneros alimentícios. Estratégia esta, que também reduz o acúmulo de possíveis resíduos e subprodutos.

A valorização destas porções, que atualmente não utilizamos, das plantas vai induzir o desenvolvimento de novos processos industriais e uma nova química à base de derivados de moléculas de vegetais com objetivo de criar um crescimento econômico sustentável, incluindo novos mercados baseados em produtos renováveis e ambientalmente amigáveis. Mas a biomassa poderá contribuir para suprir a necessidade global de energia e moléculas somente se ocorrerem grandes inovações.

Assim, as biorrefinarias forneceriam energia (biocombustíveis e calor), as moléculas (insumos químicos, cosméticos e medicinais), materiais (plásticos e compostos) e também ingredientes alimentares (OCTAVE; THOMAS, 2009a).

A bioconversão de celulose em açúcares fermentescíveis é a área da biorrefinaria em que se tem investido enormes esforços e investigação, por ser um pré-requisito para a posterior produção de bioetanol celulósico. Sacarose e amido compreendem a matéria-prima para 90% do etanol produzido hoje, mas as formas mais predominantes de açúcar na natureza são a celulose e hemicelulose. A biomassa lignocelulósica pode ser convertida em etanol por hidrólise enzimática das biomassas e fermentação ajusante, em um processo mais complexo do que a fermentação da sacarose e do amido. Contudo, a um custo mais elevado, ainda não competitivo (LAUREANO-PEREZ et al., 2005).

As hemicelulases (xilanases) também têm sido usadas na indústria de papel e celulose, logo após os estudos de VIKARRI et al. (1986). Sua principal utilização no processo industrial é nos estágios de pré-branqueamento da polpa de celulose, o que reduz a concentração necessária de agentes químicos nas etapas subsequentes do branqueamento, levando também à redução dos resíduos tóxicos gerados.

Mas além dessas aplicações, as celulasas e hemicelulasas podem ser importantes em outros cenários econômicos, como revisado por KUHAD; GUPTA; SINGH, (2011) e POLIZELI et al., (2005) utilizadas como aditivo alimentar em rações para aves, para a melhoria da qualidade da farinha de trigo, bem como na qualidade do pão, na extração de óleo e amido, melhora nutricional de silagens e utilizadas em conjunto no clareamento de sucos.

Para que a utilização dessas enzimas possa auxiliar na sustentabilidade é primordial pesquisar sua produção e características para aplicá-las em processos industriais a um custo competitivo.

Dessa forma, neste trabalho foi proposto otimizar a produção e atividade de celulasas e hemicelulasas pelo fungo *Trichoderma deliquescens*, purificar e caracterizar a xilanase para avaliar sua utilização, em escala laboratorial, na sacarificação do bagaço de cana e no branqueamento de polpa Kraft.

Para isso, este trabalho foi dividido nos seguintes capítulos:

Capítulo 1 apresenta a revisão da literatura sobre a biomassa lignocelulósica e sua hidrólise por enzimas produzidas por microrganismos, com foco na produção de celulasas e hemicelulasas pela espécie *Trichoderma* sp. Também estão reunidos processos industriais nos quais celulasas e hemicelulasas são utilizadas, com ênfase na produção de etanol e no biobranqueamento da polpa Kraft.

Capítulo 2 apresenta, na forma de artigo científico em português, os experimentos realizados para avaliar o potencial de produção de celulasas e hemicelulasas pelo isolado J-7 do *Trichoderma deliquescens* e a comparação da utilização do extrato produzido pelo fungo com o extrato enzimático comercial Multifect na conversão de celulose e xilana em glicose e xilose.

Capítulo 3 apresentada, na forma de artigo científico em inglês submetido a avaliação para publicação pela revista *Applied Biochemistry*, a purificação e caracterização de uma xilanase, altamente expressa durante cultivo do *Trichoderma deliquescens*, no processo de biobranqueamento de polpa Kraft.

Capítulo 1

Revisão da literatura

1.1 A biomassa lignocelulósica

A biomassa provém da matéria orgânica que constitui os organismos vivos e seus resíduos. Assim, do ponto de vista ecológico, a biomassa é a quantidade total de matéria orgânica dos organismos existentes em um ecossistema. Enquanto, do ponto de vista energético, o termo biomassa abrange os derivados de vegetais ou dejetos orgânicos (SOARES et al., 2006). A biomassa lignocelulósica é constituída principalmente por resíduos vegetais.

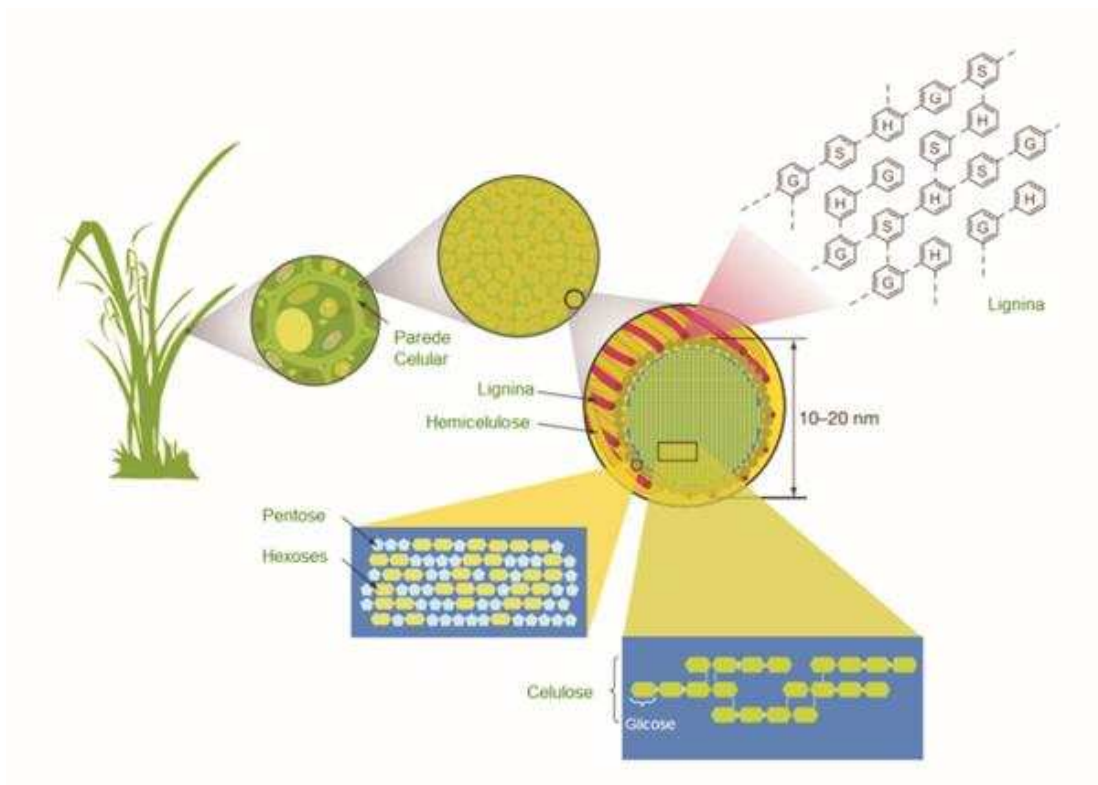


Figura 1: Representação da estrutura e componentes da biomassa lignocelulósica. Estruturas de celulose, hemicelulose e lignina formam as estruturas chamadas microfibrilas, que são organizadas em macrofibrilas, que medeiam a estabilidade estrutural na parede celular das plantas (adaptado de POTTERS, et al., 2010)

O termo lignocelulósico refere-se à parede celular dos vegetais. A parede celular é constituída por microfibrilas de celulose em uma matriz formada por

hemicelulose, lignina, pectina e proteínas estruturais. Os componentes da matriz estão fortemente entrelaçados e quimicamente ligados por forças não covalentes ou por ligações covalentes. A biomassa lignocelulósica apresenta variação da composição e da proporção de seus constituintes de acordo com a planta que a origina (SÁNCHEZ, 2009), sendo a celulose o componente mais abundante, seguido das hemiceluloses e da lignina, como exemplificado na Tabela 1. Devido à diversidade das fontes de biomassas lignocelulósicas, estas são classificadas em cinco grupos: resíduos agroindustriais (bagaço de cana, palha de milho, palha de trigo, entre outros); madeiras; resíduos de celulose (papéis de jornal, papéis de reciclagem); biomassas herbáceas (alfafa, brachiaria, entre outras plantas forrageiras) e os resíduos sólidos industriais e municipais (BALAT; BALAT; ÖZ, 2008).

Tabela 1: Proporção dos principais constituintes da biomassa lignocelulósica de diferentes biomassas (SÁNCHEZ, 2009).

Biomassa	Celulose %	Hemicelulose %	Lignina %
Caule angiosperma	40-55	24-40	18-25
Caule gimnosperma	45-50	25-35	30-40
Gramínea	25-40	25-50	10-30
Bagaço de cana	32-44	27-32	19-24
Bambu	26-43	15-26	21-31
Capim elefante	22	24	23,9
Jornal	40-55	25-40	18-30

2.2.1 Principais componentes da biomassa lignocelulósica

A celulose é um polímero linear de moléculas D-glicopiranoose, unidas por ligações glicosídicas β -(1-4). As microfibrilas são formadas por agregados de cadeias de celulose interligadas por ligações de hidrogênio inter e intra moleculares entre os

grupos hidroxilas presentes nos resíduos de glicose que a formam (Figura 2). Essas interações levam a formação de regiões bem organizadas (estrutura cristalina) que conferem grande resistência ao tecido vegetal. Contudo, em determinadas partes, os resíduos de glicose não estão tão bem organizadas, formando estruturas menos rígidas (estrutura amorfa) (LAUREANO-PEREZ et al., 2005). Na região cristalina, as fibras têm maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação que na região amorfa, onde a fibra possui sua maior flexibilidade (VASQUEZ et al., 2007). Estas regiões cristalinas, juntamente com o envoltório de hemicelulose e lignina, conferem à celulose grande resistência física e à hidrólise enzimática (ARANTES; SADDLER, 2010).

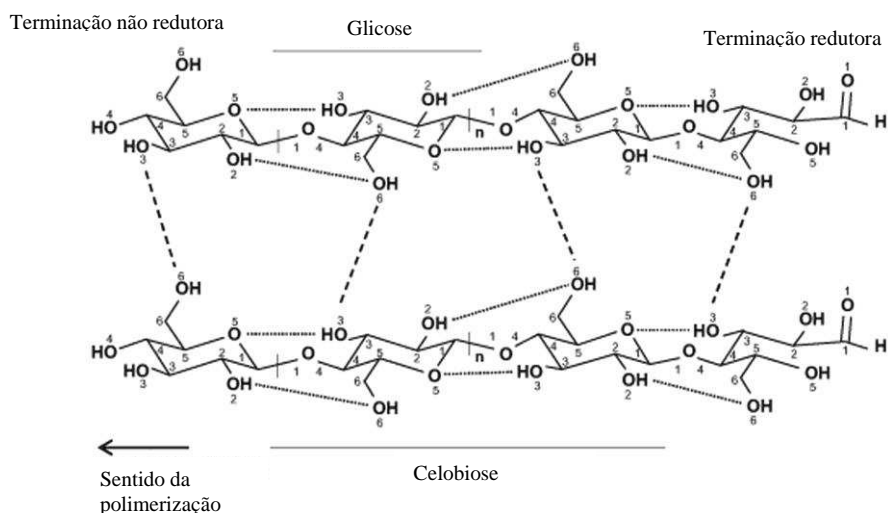


Figura 2: Estrutura e as ligações de hidrogênio inter- e intra-moleculares da celulose cristalina. As linhas tracejada são as ligações de hidrogênio inter-moleculares e as linhas com pontos são as ligações de hidrogênio intra-moleculares (adaptado de FESTUCCI-BUSELLI; OTONI; JOSHI, 2007).

Em geral, o segundo maior constituinte das biomassas lignocelulósicas são as hemiceluloses. As hemiceluloses são polímeros complexos, ramificados, compostos de monossacarídeos e derivados, dentre os quais podemos citar a glicose, xilose, manose, arabinose, ácido 4-O-metilglicurônico e ácido 4-O-metilgalacturônico.

Além de seus constituintes, as hemiceluloses diferem da celulose por possuírem um menor grau de polimerização e possuírem ramificações na cadeia principal. Esta cadeia principal é formada por monômeros de pentoses ou hexoses unidos, em geral, por ligações glicosídicas β -(1-4) com pontos de ramificações unidos à cadeia principal por ligações glicosídicas β -(1-2), β -(1-3) e/ou β -(1-6) (SHALLOM; SHOHAM, 2003).

As hemiceluloses são classificadas de acordo com sua composição (Figura 3): β -mananas possuem cadeia principal formada por ligações glicosídicas β -(1-4) entre os resíduos de manose ou entre resíduos de manose e de glicose distribuídos aleatoriamente. Galacto-glicomananas contêm cadeias laterais de galactose, ligadas à cadeia principal de glicomanana por ligação glicosídica β -(1-6). A arabinana possui cadeia principal de unidades de L-arabinose unidas por ligações glicosídicas α -(1-5) e cadeias laterais com resíduos de L-arabinose unidas a cadeia principal por ligação glicosídica α -(1-2) e α -(1-3). Já a cadeia principal das arabinogalactanas é composta de resíduos de galactose unidos por ligações glicosídicas β -(1-3), com cadeias laterais composta por resíduos de galactose unidos por ligações β -(1-6) além de resíduos de L-arabinose ou arabinanas.(SHALLOM; SHOHAM, 2003).

Dentre as hemiceluloses, as mais abundantes, e ainda não citada, são as xilanas. Em comum, as xilanas são compostas por uma cadeia principal de resíduos de xilose unidos por ligações glicosídicas β -(1-4) nas plantas terrestres, no entanto, cadeias com ligações glicosídicas β -(1-3) unindo os resíduos de xilose foram caracterizadas em algas, como também foi encontrado cadeias com os dois tipos de ligações em *Palmeria palmata* (BARRY; DILLON, 1940; DEKKER; RICHARDS, 1976).

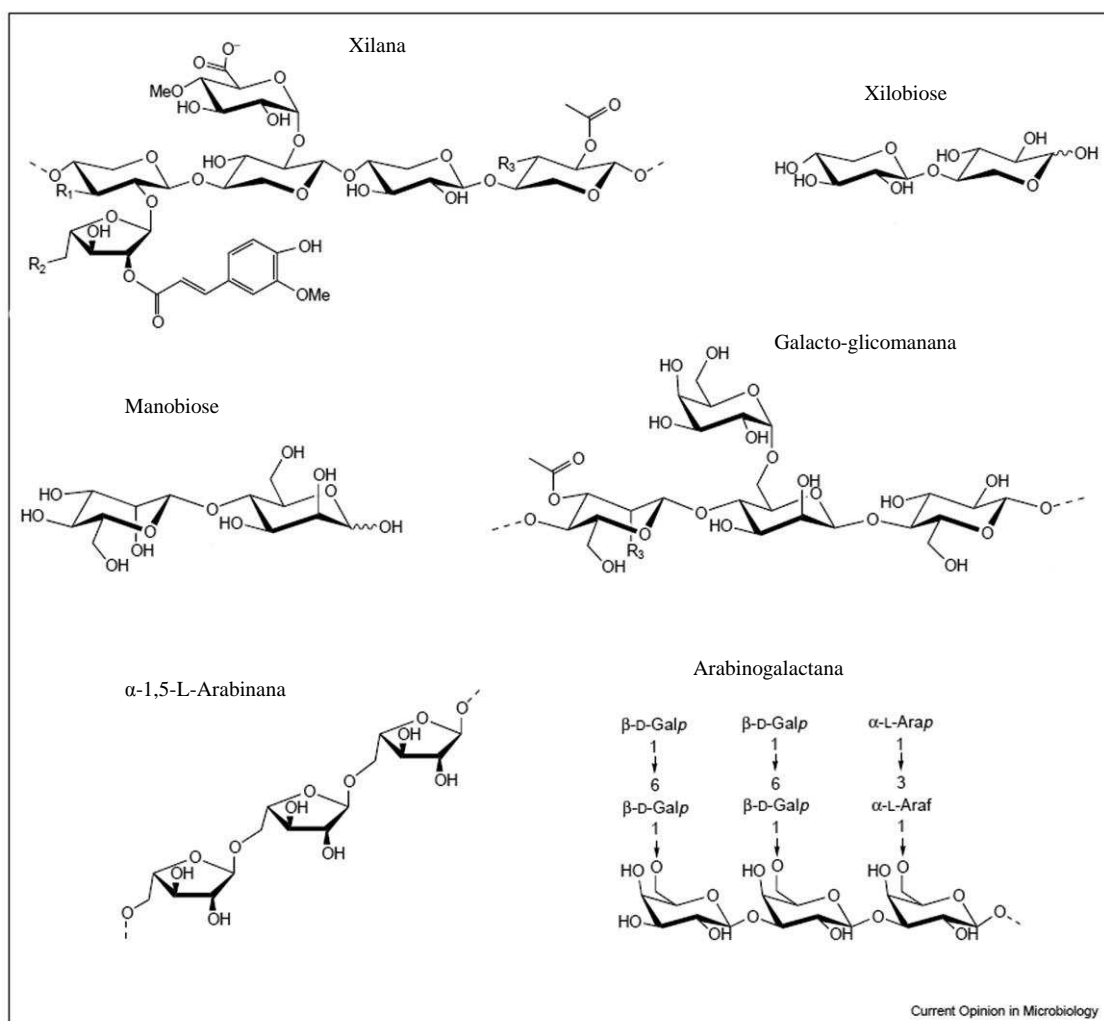


Figura 3: Componentes básicos encontrados na hemicelulose. Me, metil; R₁,OH ou arabinofuranosil; R₂,OH ou ácido ferúlico; R₃,OH ou acetil (SHALLOM E SHOHAM, 2003).

As xilanas podem ser denominadas de homoxilana, arabinoxilana, glucuronoxilana e arabinoglicuronoxilana. Esta categorização depende das moléculas que estão ligadas à cadeia principal compondo as ramificações. As madeiras duras (angiospermas) (Figura 4) possuem como cadeia principal O-acetil-O-metilglucuronoxilana, na qual, 10% dos carbonos 2 (C2) dos resíduos de xilose estão ligados ao ácido 4-O-metil- α -D-glicurônico enquanto aproximadamente 70% dos resíduos estão acetilados no C2, no carbono 3 (C3) ou em ambos. Já as madeiras macias (gimnospermas) possuem como cadeia principal arabino-4-O-

metilglicuronoxilana a uma proporção entre a β -D-xilopiranosose, ácido 4-O-metil- α -D-glicurônico e L-arabinofuranose de 100:20:13. O ácido glicurônico está ligado pelo C2 e a L-arabinose ligada pelo C3 dos resíduos de xilose da cadeia principal sendo que raramente ocorre acetilação. As evidências suportam a presença de pequenas quantidades dos ácidos feruloil e p-cumaroil ligados à L-arabinose, os quais formam pontos de ligação covalente entre a hemicelulose e a lignina (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

A xilana encontrada em gramíneas possui maior grau de ramificações comparado às oriundas da madeira dura e macia. Além disso, ela apresenta cadeias laterais com resíduos de galactose, xilose ou de xilose-arabinose unidos à cadeia principal pelos carbonos 2 e 3 dos resíduos de xilose. Outra característica estrutural única de xilanas de gramíneas é a presença de grupos feruloil na posição C5 dos resíduos de arabinofuranose (FAIK, 2010).

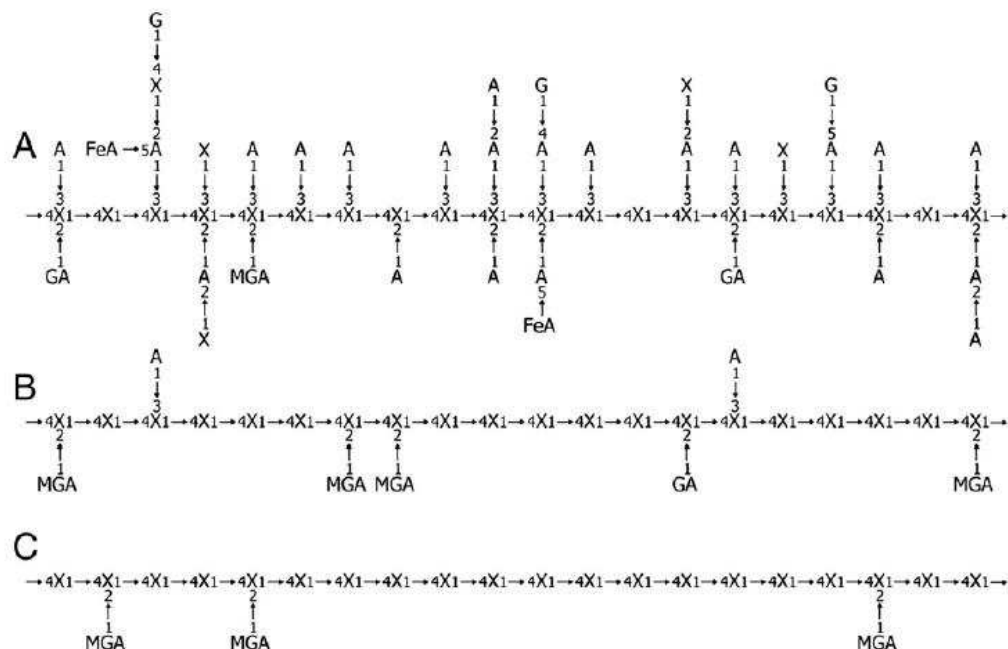


Figura 4: Representação da estrutura de xilanas: A) gramíneas e cereais, B) Madeiras macias e C) madeiras duras, que refletem a cadeia principal e as ramificações com suas frequências aproximadas. (X – xilose, A – arabinose, G – galactose, GA – ácido glicurônico, MGA – ácido 4-O-metilglicurônico, FeA – ácido ferúlico). Retirado de FAIK, (2010).

A lignina é ligada à celulose e à hemicelulose, formando uma vedação física que é uma barreira impenetrável na parede da célula da planta. Sua função, na parede celular é dar apoio estrutural, impermeabilidade e resistência contra ataque microbiano e estresse oxidativo. É um heteropolímero amorfo, não solúvel em água e opticamente inativo, formado a partir de unidades de fenilpropano unidas entre si por ligações do tipo éter (SÁNCHEZ, 2009). Em geral, é composta pelos alcoóis de fenilpropanóides, coniferil, cumaril e sinapil, dispostos aleatoriamente, formando uma macromolécula tridimensional (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003).

Sabe-se que as plantas lenhosas e mais velhas contêm maiores níveis de lignina depositada na parede celular, o que resulta em uma maior rigidez e resistência, já que a parede celular das plantas torna-se assim mais impermeável à água e protegida contra os efeitos de possíveis patógenos (SUHAS; CARROTT; RIBEIRO CARROTT, 2007). A lignina é extremamente recalcitrante e sua presença no tecido vegetal é um dos maiores entraves para o processamento da biomassa (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

2.2 Degradação da biomassa lignocelulósica

Na natureza, os resíduos lignocelulósicos são a maior parte da biomassa. Consequentemente, a sua degradação é essencial para o funcionamento do ciclo global do carbono e os organismos predominantemente responsáveis pela degradação dos resíduos lignocelulósicos são os fungos, sendo os basidiomicetos os mais rápidos degradadores neste grupo (TEN HAVE; TEUNISSEN, 2001).

Para degradação completa dos materiais lignocelulósicos, os microrganismos utilizam diversas enzimas intracelulares e extracelulares devido a insolubilidade e complexidade dos polímeros lignina, hemicelulose e celulose. São necessários dois sistemas enzimáticos: um sistema oxidativo lignolítico extracelular, que degrada

lignina e abre os anéis fenólicos, facilitando também o acesso de enzimas à fração hemicelulósica e celulósica da fibra. Entretanto, este sistema não é encontrado em todos os microrganismos.

O outro sistema é o hidrolítico, que produz hidrolases extracelulares e intracelulares para degradação das hemiceluloses e da celulose. Pode-se dividir três diferentes estratégias adotadas pelo mundo microbiano para a hidrólise de carboidratos. Microrganismos aeróbios, tais como os fungos *Trichoderma* e *Aspergillus*, secretam altas concentrações de uma grande variedade de hemicelulases e celulasas que trabalham em sinergia. Esta massa de enzimas degrada completamente os polímeros em monossacarídeos ou dissacarídeos que podem ser utilizados por microrganismos circundantes (DE VRIES; VISSER, 2001). Bactérias aeróbicas, como por exemplo, os bacilos e os *Cellvibrio*, secretam um número mais moderado de enzimas que degradam as cadeias principais dos polissacarídeos, as quais produzem relativamente grandes oligossacáridos. A completa hidrólise desses oligossacarídeos é realizada por enzimas associadas à célula ou por enzimas intracelulares (NAGY et al., 2002). Esta estratégia dificulta a utilização dos produtos de degradação por outros microrganismos concorrentes. Finalmente, bactérias anaeróbicas, como clostrídios, evoluíram um único complexo multi-enzima, os celulosomos, que integram muitas celulasas e hemicelulasas (KOSUGI; MURASHIMA; DOI, 2002).

Esta variedade de enzimas necessárias a degradação da biomassa lignocelulósica está compilada no banco de dados CAZy (do inglês, Carbohydrate-Active enZymes) (cazy;<http://www.cazy.org>). Este banco é continuamente atualizado e oferece acesso online a classificação em famílias, baseadas na similaridade das sequências gênicas, correlacionando-as com a especificidade de substratos e a

estrutura 3D de enzimas que sintetizam, modificam e degradam oligo- e polissacáridos (LOMBARD et al., 2014). Enzimas como as que degradam a lignina, não agem sobre os carboidratos, mas, como a lignina é invariavelmente e intimamente associada com os carboidratos na parede celular das plantas, as enzimas lignolíticas cooperam com depolimerases de polissacáridos clássicas, assim estas enzimas e outras enzimas acessórias também são categorizadas no banco de dados (LEVASSEUR et al., 2013).

A biodegradação da lignina é um processo oxidativo e as enzimas-chave são as fenol oxidases (peroxidases de lignina (LiP) (EC 1.11.1.14), manganês peroxidase (MnP) (EC 1.11.1.13)) e lacases (EC 1.10.3.2). LiP e de MnP foram descobertos, em meados dos anos 1980, em *P.chrysosporium* e descritos como verdadeiras lignases por causa do seu elevado valor do potencial redox (MARTINEZ et al., 2004). LiP e MnP oxidam o substrato por dois passos consecutivos de oxidação por um elétron, com formação de um intermediário cátion radical. LiP degrada unidades não-fenólicas da lignina (até 90% do polímero), enquanto que a MnP gera Mn^{3+} , o qual atua como um oxidante difusível entre as unidades fenólicas ou não-fenólicas via reações de peroxidação lipídica. As lacases são oxidases que catalisam a oxidação de um elétron em compostos fenólicos e outros substratos ricos em elétrons (HAMMEL, 1997). Recentemente, outras enzimas têm sido relacionadas à degradação da lignina em um ciclo para formação de compostos oxidantes, como o H_2O_2 e O_2^{*-} que auxiliam na degradação. Estas incluem arilalcool oxidase, arilalcool dehidrogenase e quinona redutase.

A degradação da hemicelulose impõe vários desafios para o microrganismo. O polímero é de alto peso molecular, insolúvel ou associado com celulose e lignina.

A hemicelulose também é altamente variável na sua estrutura, portanto, diversas enzimas são necessárias para sua completa hidrólise (Tabela 2).

Tabela 2: Enzimas hemicelulolíticas e seus substratos (SHALLOM; SHOHAM, 2003).

Enzima	Substrato	EC
Endo-β-1,4-xylanase	β -1,4-xilana	3.2.1.8
Exo- β-1,4-xylosidase	B-1,4-xilooligomeros e xilbiose	3.2.1.37
A-L-arabinofuranosidase	A-arabinofuranosil(1-2) ou (1-3) xilooligomeros e α -1,5-arabinana	3.2.1.55
Endo-α-1,5-arabinase	A-1,5-arabinana	3.2.1.55
A-glicuronidase	4-O-metil- α -ácido glicurônico (1-2) xilooligomeros	3.2.1.139
Endo- β-1,4-mananase	B-1,4-manana	3.2.1.78
Exo- β-1,4-manosidase	B-1,4-manooligomeros e manobiose	3.2.1.25
A-galactosidase	A-galactopiranosil(1-6) manooligomeros	3.2.1.22
B-glicosidase	B-glicopiranosil(1-4) manopiranosil	3.2.1.21
Endo-galactanase	B-1,4-galactana	3.2.1.89
Xilana acetil esterase	2- ou 3-O-acetilxilana	3.1.1.72
Manana acetil esterase	2- ou 3-O-acetilmanana	3.1.1.6
Ácido Ferúlico e p-cumárico esterase		3.1.1.73

A degradação da xilana, por exemplo, necessita da ação sinérgica de diversas enzimas. Endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8), exo- β -xilosidase (EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α -glucuronidase (EC 3.2.1), acetil xilano esterase (EC 3.1.1.6), (ácido ferúlico e ácido p-cumárico) esterase (EC 3.2.1).

Além desta gama de enzimas envolvidas na degradação da xilana, se olharmos apenas para as endo- β -1,4-xilanases, por exemplo, veremos como a complexidade das hemiceluloses acarretaram numa gama de endo- β -1,4-xilanases diferentes. Endo- β - (1,4) -xilanases com um domínio catalítico único estão classificadas nas famílias GH 5, 8, 10, 11 e 30. Elas diferem essencialmente em sua estrutura e especificidade pelos substratos. Xilanases GH5 têm um domínio (β / α)₈ e são específicas para arabinoxilana . Xilanases GH30 também possuem o dobramento

$(\beta / \alpha)_8$ e são xilanases apêndices-dependente que necessitam 4-O-metil-d-glucuronosil como cadeia lateral de modo a ficarem ativas. GH10 partilha a mesma estrutura tridimensional das GH5 e GH30, mas são muito mais versáteis, uma vez que podem hidrolisar muitos tipos de heteroxilanas e algumas clivam também aril-celobiosídeos, mas não clivam celulose. Contrariamente à GH10, GH11 que são as menores xilanases com uma arquitetura de β -jelly-roll, são altamente específicas e não toleram elevadas substituições na cadeia principal da xilana. Finalmente, xilanases GH8 têm um mecanismo catalítico diferente e o dobramento $(\alpha / \alpha)_6$, mas encontram-se perto de GH10 pela sua especificidade do substrato (revisto por PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

Enfim, a hidrólise da celulose ocorre de maneira sinérgica entre três tipos de celulasas: endocelulasas, exocelulasas e β -glicosídates. As endocelulasas, 4- β -D-glicano 4-glicanohidrolase (EC 3.2.1.4) hidrolisam ligações β -(1-4) internas da celulose. Elas não atuam sobre a celulose cristalina, sendo ativas sobre as frações amorfas da celulose e substratos solúveis. A hidrólise aleatória de ligações β -glicosídicas internas na molécula de celulose reduz o tamanho da fibra, o que aumenta os terminais redutores e não redutores, sendo estas extremidades os substratos para as exocelulasas. A exocelulase 4- β -D-glicana celobiohidrolase (EC 3.2.1.91) hidrolisa a celulose pela remoção de celobiose e a 4- β -D-glicana glicobiohidrolase (EC 3.2.1.74) hidrolisa a celulose pela remoção de glicose da celulose e de celodextrinas. À medida que o tamanho da cadeia diminui a taxa de hidrólise das exocelulasas também diminui. A celobiose liberada pela ação conjunta das enzimas citadas acima é o substrato para o quarto grupo de enzimas responsáveis pela degradação da celulose, as β -glicosídates (β -D-glicosídeo glicohidrolase EC 3.2.1.21). Elas também são capazes de remover unidades de glicose de terminais não

reduzores das celodextrinas pequenas. Ao contrário das exocelulases, a taxa de hidrólise da β -glicosidase aumenta com a redução no tamanho da cadeia das celodextrinas (DUFF; MURRAY, 1996; KUMAR; MURTHY, 2013).

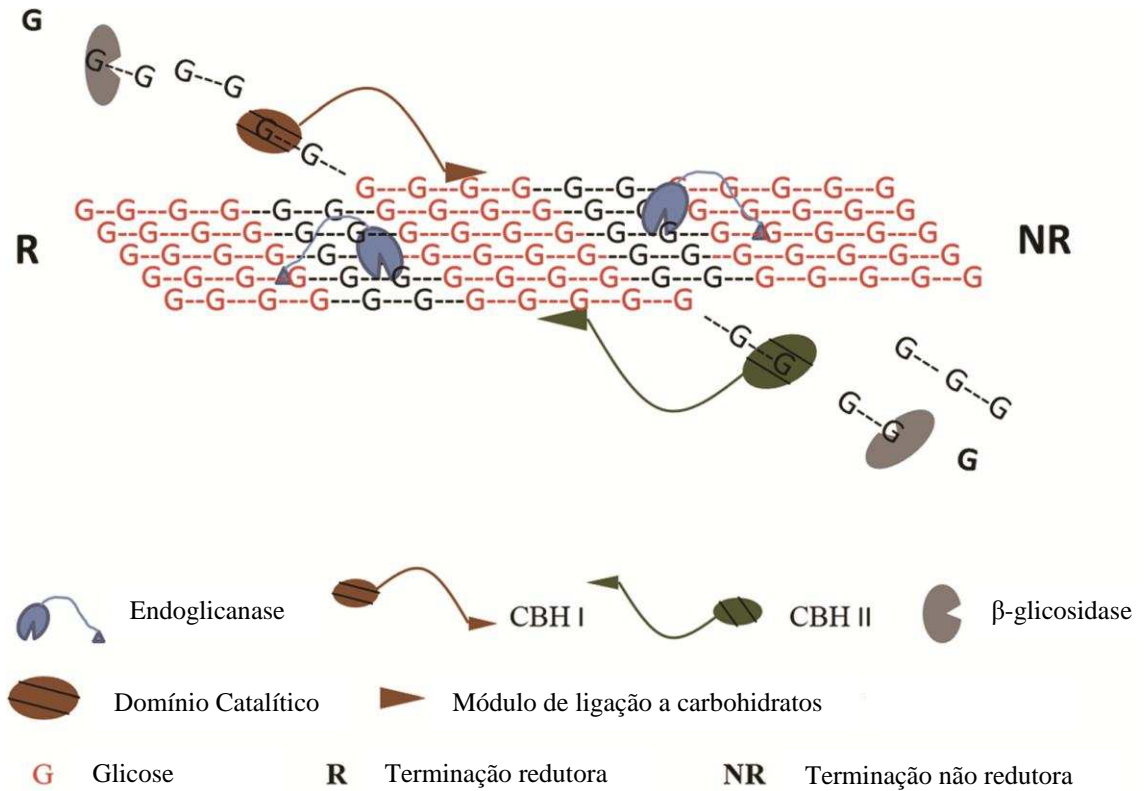


Figura 5: Ação de diferentes celulasas na camada superficial da celulose. Ilustra a ação das três principais classes de celulase. Resíduos de glicose em vermelho representam a região cristalina da celulose enquanto os resíduos em preto representam a região amorfa. CBHI e CBHII são exocelulasas (KUMAR; MURTHY, 2013).

2.3 Fontes microbianas de celulasas e hemicelulasas

Por serem os responsáveis pela degradação da biomassa lignocelulósica na natureza, fungos e bactérias têm sido utilizados para a produção de enzimas que hidrolisam esta biomassa para fins comerciais. Bactérias dos gêneros *Clostridium*, *Cellulomas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus* entre outros, podem produzir celulasas e hemicelulasas com alta atividade específica, contudo, por produzirem baixos níveis totais de enzima e por serem anaeróbicos, a produção industrial destas

enzimas por fungos é majoritária. Fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp.e *Trichoderma* sp. já são utilizados para produção em larga escala de celulases e hemicelulases. Eles são uma boa fonte para produção de enzimas devido a sua alta capacidade de adaptação a diversos ambientes, diversidade de substratos para crescimento e por suas estratégias de secretar grandes quantidades dessas enzimas naturalmente (KARBOUNE; GERAERT; KERMASHA, 2008).

Os fungos que crescem em solo rico em material orgânico, fitopatógenos e extremófilos, têm sido alvo da busca contínua por novos fungos produtores de enzimas uma vez que neles, estas são geralmente induzíveis e secretadas, e porque, suas características aumentarem a probabilidade da enzima ser utilizada em processos industriais (CHERRY; FIDANTSEF, 2003).

Assim como substrato para o crescimento dos fungos e produção das enzimas, os resíduos agroindustriais lignocelulósicos como bagaço de cana, palha de trigo, farelo de trigo e palha de arroz, palha de milho, entre outros, que possuem uma grande produção global a um baixo custo, têm sido utilizados e têm-se demonstrado bons para o crescimento dos fungos e para a secreção de celulases e hemicelulases (DE ALMEIDA et al., 2011, 2014; FALKOSKI et al., 2012).

2.3.1 O genero *Trichoderma* spp

O gênero *Trichoderma* é cosmopolita em solos e em decomposição de madeira e produtos vegetais. Espécies de *Trichoderma* spp. são frequentemente componentes dominantes da microflora do solo nos mais variados habitats. Isto pode ser atribuído às diversas capacidades metabólicas de espécies de *Trichoderma* spp. e sua agressiva natureza competitiva. Os isolados de *Trichoderma* spp. raramente são associados à doenças de plantas, embora um isolado de *T. harzianum* agressivo provoque uma doença significativa em cultivo de cogumelos.

O complexo celulolítico do fungo *Trichoderma reesei* é composto por no mínimo duas exoglicanases, cinco endoglucanases e duas β -glicosidases. Entretanto, o uso de extratos enzimáticos deste fungo ainda é limitado devido à baixa termoestabilidade de suas enzimas e pela baixa atividade β -glicosidases (KARBOUNE; GERAERT; KERMASHA, 2008).

Especificamente sobre o *Trichoderma deliquescens* (sinônimo de *Gliocladium deliquescens* e *Gliocladium viride* – JAKLITSCH, 2011), grande parte das publicações é voltada para as propriedades de micoparasitismo e antibiose para utilização como agente no biocontrole de outros fungos e bactérias em diferentes culturas agrícolas. Há poucos artigos sobre a produção de xilanases pelo *T. deliquescens* apesar das evidências de seu habitat e modo de vida. Três artigos da década de 80 citam o *T. deliquescens* como produtor de celulases, contudo a quantificação das enzimas não é apresentada (YEOH; TAN; TIAN, 1984). MITRA et al., (2011) estudaram a secreção de xilanase em conjunto com a formação de biofilme, com o intuito de avaliar a adesão de células e formação de biofilmes quando *T. deliquescens* e o *Chaetomium crispatum* são cultivados em xilana oat spelt.

Em outro estudo, CHRISTOV; SZAKACS; BALAKRISHNAN, (1999) avaliaram a secreção de xilanase celulase-free, que é a secreção de xilanase com baixíssimos níveis de celulase ou ausência desta no extrato produzido, pelo isolado *T. deliquescens* (CBS109832). A atividade xilanase celulase-free foi produzida pelo fungo quando cultivado em farelo de trigo e sabugo de milho. Neste estudo também foi avaliado a atuação desta xilanase no branqueamento da polpa preparada pelo processo de polpação com sulfito em meio ácido em uma sequência de

branqueamento totalmente livre de cloro, demonstrando um efeito positivo do tratamento com xilanase na alvura do papel gerado.

2.4 Delineamento fatorial como ferramenta para otimizar a produção de enzimas.

A otimização do meio de fermentação por delineamentos estatísticos fatoriais, examina a complexa interação dos componentes do meio com a atividade metabólica da célula analisando a variável resposta (produção da enzima) para uma modelagem detalhada e satisfatória. O delineamento experimental estatístico é usado com sucesso por várias décadas e pode ser empregado em várias fases da otimização tais como ensaios do rastreio de fatores importantes para a resposta alvo.

A otimização pode ser dividida em estágios que se caracterizam por: (i) definição da função objetivo (resposta), podendo ser observado um ou mais critérios; (ii) determinação dos fatores (variáveis) que podem apresentar influências significativas sobre a resposta que se deseja otimizar; (iii) otimização propriamente dita, isto é, a busca da combinação dos valores dos fatores selecionados que resultem na melhor resposta (maximização ou minimização).

O delineamento fatorial Plackett-Burman e a metodologia de superfície de resposta são boas escolhas na aplicação estatística para projetos de bioprocessamento (LIU et al., 2003), por fornecerem resultados precisos de forma eficiente (VOHRA; SATYANARAYANA, 2008; BURKERT et al., 2006). Após seleção das variáveis que tenham influência nas respostas, passa-se aos delineamentos mais detalhados que permitirão a otimização das condições, como o delineamento do composto central (DCC). Os DCC's são delineamentos fatoriais simétricos (todos os pontos equidistantes do ponto central) e de segunda ordem, que possuem características interessantes para a busca de um ponto que dê a resposta ótima: um número menor

de tratamentos em relação aos fatoriais completos e o fato de poderem ser realizados sequencialmente. Podem ser do tipo ortogonal ou rotacional. Os pontos centrais melhoram as estimativas dos efeitos quadráticos e possibilitam graus de liberdade adicionais para o erro. Além disso, os pontos centrais permitem informação extra quanto ao centro da região experimental, onde os melhores valores resposta estão frequentemente localizados (DE ALMEIDA et al., 2014).

2.5 Utilização industrial de celulases e xilanases.

O etanol, principal biocombustível utilizado no Brasil, é produzido a partir do cultivo da cana de açúcar. Porém, somos somente o segundo maior produtor de etanol perdendo para os EUA, que produzem o etanol a partir do amido de milho. Contudo, considerando o atual potencial de produção de etanol a partir destas duas matérias-primas e a crescente necessidade de ampliação da produção de biocombustíveis, projeta-se uma série de dificuldades principalmente em termos de competição com a produção de alimentos, que limitam a ampliação da utilização destas tecnologias (STOEGLEHNER; NARODOSLAWSKY, 2009).

A produção de etanol a partir de culturas que são empregadas também na produção de alimentos pode provocar uma competição pela produção dessas culturas. Assim, tecnologias baseadas na produção de etanol a partir de biomassa lançam-se como uma alternativa promissora para a produção do etanol. É estimado a duplicação da produção no Brasil, sem aumento de áreas cultivadas, se a palha da cana e 30% do bagaço forem convertidos a etanol (SILVA, 2012).

A produção do etanol de biomassa pelo método bioquímico, hidrólise enzimática seguida de fermentação dos açúcares liberados, ainda não é comercialmente viável devido a grande recalcitrância da lignocelulose. A primeira etapa para trabalhar com a biomassa é o seu pré-tratamento. O pré-tratamento tem

como objetivo romper a parede celular da planta e melhorar o acesso enzimático aos polissacarídeos. Vários estudos têm mostrado uma direta correlação entre a remoção de lignina e hemicelulose e o rendimento da hidrólise da celulose (GRAY; ZHAO; EMPTAGE, 2006). Assim, o pré-tratamento é requerido para modificar a estrutura da biomassa lignocelulósica, tornando a celulose mais acessível às enzimas que convertem os polímeros de carboidratos em açúcares fermentescíveis na etapa subsequente de hidrólise enzimática.

Vários processos físicos, físico-químicos, químicos e biológicos têm sido usados para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Os pré-tratamentos físicos são aqueles caracterizados pela fragmentação do material por meio de uma ação mecânica, seja por trituração, moagem ou esfarelamento, sendo que esta fragmentação não altera sua composição química. Os tratamentos físico-químicos consistem na submissão do material a altas temperaturas, catalisados ou não, por agentes químicos. Caracterizam-se pelas condições drásticas de temperatura que são utilizadas (SUN; CHENG, 2002a). Os pré-tratamentos químicos variam de muito ácido para bastante alcalino, tendo assim, diferentes efeitos nos principais componentes da biomassa. Por exemplo, o pré-tratamento ácido hidrolisa a fração de hemicelulose, já os pré-tratamentos alcalinos têm mais efeito na estrutura da lignina. Os pré-tratamentos químicos também afetam a composição do açúcar no hidrolisado, por exemplo, o tratamento ácido pode resultar em altas concentrações de furfurais na fase líquida, sendo que os alcalinos podem resultar em altas concentrações de ferulato e acetatos no hidrolisado. Estes compostos presentes no meio podem ter efeitos deletérios nos microrganismos fermentativos (GRAY; ZHAO; EMPTAGE, 2006).

O pré-tratamento químico alcalino ocorre devido a uma saponificação das ligações éster cruzadas intermolecular entre hemiceluloses e outros componentes, por exemplo, entre hemiceluloses e lignina, aumentando porosidade dos materiais

lignocelulósicos com a remoção das ligações cruzadas. O tratamento com NaOH diluído causa um inchamento, levando a um aumento na área da superfície interna, à diminuição no grau de polimerização assim como da cristalinidade, à separação da ligação estrutural entre lignina e carboidratos e a um rompimento da estrutura da lignina (SUN; CHENG, 2002b).

Já o pré-tratamento ácido consiste na hidrólise da fração hemicelulósica, que é mais susceptível ao tratamento ácido, sendo que as frações de celulose e lignina permanecem inalteradas. Soluções ácidas de H_2SO_4 ; HCl; HNO_3 e H_3PO_4 são comumente empregados como catalisadores nestes processos (AGUILAR et al., 2002). Os ácidos liberam prótons que atuam nas ligações glicosídicas entre os monômeros de açúcar nas cadeias poliméricas. O rompimento destas ligações libera uma série de compostos, principalmente açúcares como xilose, glicose e arabinose. São liberados também produtos indesejáveis para o processo fermentativo tais como o furfural proveniente da degradação de pentoses e o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) oriundo da desidratação de hexoses, havendo ainda formação de ácido fórmico pela degradação de compostos derivados do furano (furfural ou 5-HMF) e de ácido levulínico produzido a partir da degradação de 5-HMF. São gerados ainda ácido acético provenientes dos grupos acetil, compostos não estruturais correspondentes à fração extrativa e produtos de degradação da lignina (fenóis e outros compostos aromáticos) e metais pesados como cromo, cobre, ferro e níquel provenientes da corrosão dos equipamentos de hidrólise. Uma vez presentes no hidrolisado, estes compostos são inibidores do metabolismo microbiano (LEE; DALE, 2004).

Na explosão a vapor ou auto-hidrólise, os resíduos lignocelulósicos são aquecidos em alta pressão e temperatura. Durante este tratamento, o vapor d'água penetra nos resíduos e inicia uma reação de auto-hidrólise, na qual os ácidos

orgânicos inicialmente formados dos grupos acetila presentes na biomassa catalisam a hidrólise principalmente da hemicelulose. Logo, o pré-tratamento explosão a vapor é uma reação de auto-hidrólise química que remove hemicelulose, e, em menor quantidade, a lignina (DUFF; MURRAY, 1996).

O tipo da biomassa e a sequência das etapas posteriores ao pré-tratamento são fatores a serem considerados na escolha do melhor tratamento, podendo combinar mais de um destes para obter máxima hidrólise com a menor formação de agentes tóxicos e inibidores. Contudo, mais pesquisas devem ser realizadas para se aperfeiçoar os diferentes tipos de pré-tratamentos a fim de reduzir os custos do processo que ainda são altos (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

A sacarificação realizada após o pré-tratamento consiste na conversão enzimática dos polissacarídeos da lignocelulose em açúcares fermentescíveis. Até o momento a comunidade científica ainda não chegou a uma conclusão sobre qual a proporção ideal das enzimas para a hidrólise da biomassa lignocelulósica. Essa indefinição deve-se a adequação do coquetel a uma determinada biomassa e ao tipo de pré-tratamento ao qual ela foi submetida, o que leva a distintas composições do substrato a ser hidrolisado, levando à necessidade de proporções diferentes de enzimas para a sua hidrólise (FALKOSKI et al., 2013).

Muitos estudos recentes têm mostrado que, além das celulases, a presença de outras enzimas acessórias é muito importante para a formulação de um bom coquetel enzimático. Dentre estas enzimas estão as hemicelulases, que atuam sobre a hemicelulose residual e contribuem para uma hidrólise mais eficiente da biomassa. Além disso, alguns trabalhos têm demonstrado que as hemicelulases também podem atuar sinergisticamente com as celulases, aumentando a eficiência da hidrólise da biomassa como com a utilização de xilanases, que agem em sinergismo com

celulases, reduzindo a adição destas e levando à liberação quase total da glicose da biomassa (HU; ARANTES; SADDLER, 2011). Coquetéis com a presença das enzimas que hidrolizam a lignina mostraram melhores rendimento da hidrólise da celulose (FALKOSKI et al., 2012).

A eficiência da sacarificação enzimática também pode ser influenciada pela inibição das endoglicanases e exoglicanases pelos produtos finais de hidrólise, a celobiose e glicose (DUFF; MURRAY, 1996). Este fato, entretanto, pode ser amenizado pela suplementação de β -glicosidase ao coquetel enzimático ou então promovendo as etapas de sacarificação e fermentação simultaneamente (processo conhecido como SSF – do inglês simultaneous saccharification and fermentation) (OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008).

Diferentemente do caldo de cana, a fermentação do xarope rico em açúcares produzido após a sacarificação da biomassa inicia com uma mistura complexa de vários açúcares, derivados de furano, ácidos orgânicos e compostos fenólicos. Contudo, as cepas industriais de leveduras fermentadoras ainda não são capazes de fermentar as pentoses, e o desenvolvimento de cepas capazes de utilizar os açúcares provenientes da hemicelulose é muito recente para sua aplicação industrial. Além as cepas devem ser tolerantes aos inibidores de crescimento produzidos durante os processos anteriores à fermentação (KUHAD et al., 2011).

As hemicelulases, principalmente as xilanases, foram primeiramente descritas como aditivos para o branqueamento de polpas de celulose para fabricação de papel. Posteriormente, ganharam evidência e sua aplicação em diversos processos industriais passou a ser investigada.

A utilização das xilanases foi proposta para o branqueamento da polpa de celulose visto que, no processo Kraft, parte da xilana solubilizada se precipita na superfície das fibras de celulose e carrega cromóforos e resíduos da lignina. A xilanase nesta polpa hidrolisa parte da xilana e auxilia na solubilização e retirada dos cromóforos ligados a ela. No entanto, o que se busca não é a hidrólise total da xilana, mas somente a liberação dos cromóforos (DE ARAÚJO; DE MORAES; ZANIN, 1999).

A remoção mesmo que de uma pequena porção da xilana pode ser suficiente para abrir o polímero e facilitar a remoção da lignina residual por oxidantes, o que reduz a quantidade de oxidantes a ser utilizada. O principal objetivo da aplicação dos métodos biotecnológicos é a remoção seletiva da xilana sem degradar celulose. A degradação da celulose é o principal problema associado com o processo de produção de pasta convencional, que afeta, invariavelmente, a fibra de celulose e, assim, a qualidade de papel (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002). Xilanases também estão sendo aplicadas na produção de pães onde a adição de xilanase faz com que as massas fiquem mais macias e frouxas (CHO; JUNG; PACK, 1995). As xilanases são utilizadas como fortalecedores da massa, uma vez que proporcionam excelente tolerância às variações de parâmetros de processamento e na qualidade da farinha. Elas também aumentam significativamente o volume do pão assado (HARBAK; THYGESEN, 2002).

As celulasas e hemicelulasas também são empregados para clarear sucos e vinhos, para a extração de óleos e amidos, para melhorar as propriedades nutricionais das silagens agrícolas e da alimentação com grãos de bovinos e suínos (BEG et al., 2001, MALATHI; DEVEGOWDA, 2001) e na indústria têxtil, conferindo maciez e conforto ao jeans (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000).

O Brasil com sua enorme biodiversidade aliada a bioprospecção e às pesquisas sobre a produção e caracterização das enzimas, pode fornecer tecnologia nacional que venha suprir a dependência de insumos de base tecnológica estrangeira, além de reduzir o custo desses insumos e aumentar a eficiência de processos industriais.

Capítulo 2

Produção de celulasas e xilanases pelo *Trichoderma deliquescens* J-7 para sacarificação de bagaço de cana

RESUMO

A busca por biocombustíveis, principalmente o etanol derivado de biomassa, para substituir os derivados de petróleo ainda não é uma realidade no mercado global principalmente devido a gargalos econômicos e tecnológicos. Neste trabalho avaliamos as características do complexo celulolítico produzido pelo fungo *Trichoderma deliquescens* através da hidrólise de papel de filtro e de carboximetilcelulose, para avaliarmos seu potencial na hidrólise de bagaço de cana em açúcares fermentescíveis. O fungo foi cultivado em fermentação submersa, utilizando palha de milho como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Neste cultivo o fungo produziu os maiores níveis de celulases, sendo observado que diferentes fontes de carbono apresentam diferenças no padrão enzimático no zimograma. As atividades celulolíticas foram mais ativas entre 50 °C e 60 °C e entre os pHs 4,5 e 5 apresentando tempo de meia vida de 32 horas a 50 °C. O extrato bruto do *T. deliquescens* foi aplicado na sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com 1% NaOH e os rendimentos foram comparados aos observados para a sacarificação do bagaço de cana com coquetel de celulases comercial. Foram convertidos à glicose 26% e 32% da celulose quando utilizamos o extrato do *T. deliquescens* e o coquetel comercial Multifect® CL, respectivamente. Contudo, observamos uma grande diferença na conversão da xilana à xilose sendo que o extrato do *T. deliquescens* teve um rendimento aproximado 4 vezes melhor que o coquetel comercial. Os resultados mostraram que o isolado *T. deliquescens* é um bom produtor de celulases além de um excelente produtor de hemicelulases com potencial a ser explorado para a produção do etanol celulósico.

1 Introdução

Lignocelulose é a fonte mais abundante de carboidratos na Terra representando cerca de 70% do total de biomassa de plantas e, portanto, sua utilização como matéria-prima apresenta inúmeras vantagens (DUCHESNE; LARSON, 1989). Além disso, seu uso não gera conflitos com a indústria alimentícia pois grande parte é subproduto da própria indústria, além dos resíduos agrícolas (SCHUBERT, 2006). O etanol de segunda geração é produzido pela transformação de lignocelulose, o que leva ao desenvolvimento das biorrefinarias. No Brasil, tais biorrefinarias basearão sua atividade na valorização, principalmente, de subprodutos do cultivo da cana de açúcar. Existem duas maneiras diferentes de hidrolisar lignocelulose para produção de bioetanol, um processo termo-químico conhecido como método de Fischer-Tropsch (TIJMENSEN et al., 2002) e um método biotecnológico que baseia-se na hidrólise por enzimas (celulases e hemicelulases) e posterior ou concomitante fermentação dos monossacarídeos liberados (OCTAVE; THOMAS, 2009b).

A obtenção de celulases para aplicação na indústria é obtida por cultivo de microrganismos. Bactérias e fungos podem produzir grandes quantidades de celulases para a hidrólise dos materiais lignocelulósicos. Atualmente, pesquisas são realizadas com o intuito de encontrar enzimas com potencial para utilização e alta produção, afim de reduzir o custo do processo de sacarificação (DE ALMEIDA et al., 2011, 2014; FALKOSKI et al., 2012, 2013). Estas pesquisas focam, principalmente, no estudo de novos organismos produtores de celulases bem como na avaliação de sistemas de cultivo e utilização de fontes de carbono que induzam eficientemente a produção das enzimas.

Utilizando experimentos fatoriais, DE ALMEIDA et al., (2014) demonstraram a otimização da produção de celulasas e xilanasas em *Fusarium* em diferentes concentrações dos componentes do meio de cultura, fato também observado em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa ainda não publicados. Também tem-se dado atenção a possível reutilização destas enzimas em uma série de hidrólises (VISSER et al., 2015), o que levaria à redução dos custos desta etapa (sacarificação) que é o gargalo tecnológico e econômico para a produção do etanol de biomassa, com custo das enzimas representando 24% do custo final do biotanol, tornando o processo oneroso, o que inviabiliza sua produção em escala comercial (SINGHANIA et al., 2010).

Trichoderma sp. possui o sistema enzimático de celulase com elevada capacidade de secretar tais enzimas. O gênero *Trichoderma* e cepas mutantes de espécies do gênero ganharam atenção após a segunda guerra com a primeira crise do petróleo e, atualmente, o *Trichoderma reesei* é um dos importantes fungos utilizados para produção de enzimas para utilização industrial. Seu sistema celulolítico é constituído de, pelo menos, duas exoglicanases, cinco endoglicanases e duas β -glicosidases embora não secrete altos níveis desta última. Apesar disso, o extrato enzimático deste fungo apresenta baixa termoestabilidade (JUHÁSZ et al., 2005) e ausência do sistema oxidativo (HERPOËL-GIMBERT et al., 2008) que reduz o potencial de sua utilização. A seleção de um novo tipo selvagem de *Trichoderma* sp. com melhor produção de β -glicosidase é uma forma alternativa para seleção de isolados afim de desenvolver um coquetel de lignocelulasas. Os coquetéis de lignocelulasas também podem ser obtidos a partir da mistura de extratos enzimáticos de diferentes fungos, complementando suas atividades enzimáticas e assim aumentando o sinergismo da cadeia hidrolítica (VISSER et al., 2013).

Trichoderma deliquescens (sinônimo *Gliocladium deliquescens* e *Gliocladium viride*) foi isolado da madeira e é citado como produtor dos três tipos de celulases, apresentando melhor produção destas enzimas em celulose comparado ao crescimento em carboximetilcelulose (CMC), amido de batata e celobiose (YEOH; TAN; TIAN, 1984). Entretanto, um isolado não produtor de celulases foi encontrado em um estudo que avaliou a produção de xilanase utilizando-se farelo de trigo, sabuco de milho e xilana “oat-spelt” como fonte de carbono para o crescimento (CHRISTOV; SZAKACS; BALAKRISHNAN, 1999). Neste trabalho utilizamos cinco biomassas lignocelulósicas diferentes como fontes de carbono para o crescimento do *T. deliquescens* J-7 além de experimentos fatoriais para avaliar a influencia dos componentes do meio de cultura na produção de celulases e hemicelulases para aplicação na sacarificação do bagaço de cana.

2 Materiais e métodos

2.1 Microrganismo

O fungo *T. deliquescens* J-7 foi obtido a partir da coleção micológica do Laboratório de Patologia Florestal do departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. Foi rotineiramente propagado em placas contendo meio ágar de dextrose de batata a 28 °C durante 5 dias. Cinco discos de 10 milímetros do isolado fúngico foram cortados e usados como inóculo em 50 mL de meio.

2.2 Ensaio enzimático

Os ensaios para a determinação das atividades das celulases FPase e endoglicanase foram adaptados de GHOSE, (1987). A atividade de FPase foi

determinada utilizando papel de filtro Whatman nº 1 (1 x 5 cm) como substrato, em um volume total da reação de 1,5 mL e tempo de incubação de 60 minutos. A atividade de endoglicanase foi determinada utilizando CMC como substrato (concentração final de 1% m/v) em um volume total de 1 mL por 30 min. Já para a atividade de xilanase foi utilizada a xilana birchwood como substrato (concentração final de 1% m/v) em um volume de 1 mL por 15 min. A concentração dos açúcares liberados durante os ensaios enzimáticos foi determinada utilizando-se o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), e a curva padrão de glicose (0,11 – 1,11 $\mu\text{mol/mL}$).

Para as atividades β -glicosidase, β -xilosidase e α -arabinofuranosidase foram utilizados os substratos sintéticos, p NPGlicose, p NPXilose e p NParabinose, respectivamente. Para a realização dos ensaios foram utilizados 100 μL do extrato enzimático diluído apropriadamente, 125 μL da solução do substrato (para uma concentração final de 1 mM) e 275 μL de tampão. A mistura de reação foi incubada por 30 min. Após este tempo, a reação foi finalizada pela adição de 0,5 mL de carbonato de sódio (0,5 M). As absorbâncias das reações foram mensuradas a 420 nm e a quantidade de p -nitrofenol liberada foi estimada a partir de uma curva padrão.

A atividade de lacase foi determinada pelo monitoramento da oxidação do ABTS em uma reação contendo 100 μL da solução de enzimas diluída apropriadamente, 100 μL da solução do substrato (para uma concentração final de 1 mM) e 800 μL de tampão. A mistura reacional foi incubada a 50 °C por 15 min e, posteriormente, os valores de absorbância foram imediatamente mensurados em 420 nm. A quantidade do ABTS oxidado produzido foi calculada utilizando-se o valor do

seu coeficiente de extinção molar ($3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e a equação de Lambert-Beer, adaptado de SODEN et al. (2002).

Todos os ensaios enzimáticos foram feitos em tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 5, a 50 °C e foram realizados em triplicata. Os valores dos desvios padrões relativos aos ensaios enzimáticos foram menores que 5 %. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol do produto, por minuto sob as condições do ensaio.

2.3 Zimograma

Os zimogramas foram realizados por SDS-PAGE com exceção à etapa de desnaturação por 5 minutos em banho fervente com o tampão de amostra. Foi incorporado 0,1% de carboximetilcelulose antes da polimerização dos géis para a análise da atividade CMCase,. Para revelar as bandas enzimáticas, primeiramente foi feito uma renaturação da enzima em uma solução tampão acetato 100 mM, pH 5,5, 25% de isopropanol seguida do equilíbrio do gel no tampão seguido da incubação a 45 °C. Após a incubação, o gel foi corado com vermelho congo 0,1% e descorado com NaCl 1 M até visualização das bandas.

2.4 Seleção de fontes de carbono e fontes de nitrogênio

A fim de determinar a melhor fonte de nitrogênio e carbono para a indução de lignocelulases, o fungo foi cultivado em fermentação submersa em meio de cultura contendo: 50 mg / L de KCl, 10 mg / L de ZnSO_4 , 18 mg / L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g / L de MgSO_4 , 1,5 g / L de KH_2PO_4 , 0,25 g / L CuSO_4 , 1 g / L de CaCl_2 , 0,3% g / L da fonte de nitrogênio (peptona, extrato de levedura, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou NH_4NO_3) e 0,5% de farelo de trigo como fonte de carbono. Após a escolha da fonte de nitrogênio, o fungo foi cultivado em fermentação submersa, com 1,5% de cada uma

das fontes de carbono: palha de milho, farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, brichwood xylan e CMC.

2.5 Delineamentos fatoriais

Foram utilizadas duas técnicas de otimização diferentes. Inicialmente, o método Plackett-Burman, resolução III, foi utilizado para rastrear e identificar componentes do meio significativos para a produção das enzimas carboximetilcelulases (CMCase) e xilanase. Os fatores e níveis de cada fator (-1 e +1) analisados neste passo foram KH_2PO_4 (0,75 e 2,25 g / L), MgSO_4 (0,25 e 0,75 g / L), CuSO_4 (0,125 e 0,375 g / L), NH_4NO_3 (1 e 3 g / L), CaCl_2 (0,5 e 1,5 g / L), FeSO_4 (0,009 e 0,027 g / L), ZnSO_4 (0,005 e 0,015 g / L), extrato de levedura (1,5 e 4,5 g / L) e palha de milho (0,75 e 3%). Em seguida, o Delineamento do Composto Central (DCC) foi utilizado e gerou uma tabela com pontos cúbicos, centrais axiais e usando $\alpha = 1,682$, indicado pelo programa para reconhecer o modelo de segunda ordem. Os fatores e níveis do fator (-1,682, -1, 0, 1 e 1,682) analisados nesta etapa foram palha de milho (0,31, 1, 2, 3 e 3,68%), extrato de levedura (0,47, 1,5, 3, 4,5 e 5,52 g / L) e KH_2PO_4 (0,23, 0,75, 1,5, 2,25 e 2,76 g / L). A variável y representa as unidades de atividade CMCase.

2.6 Efeito do pH e da temperatura

A influência do pH e da temperatura sobre a atividade CMCase e FPase foram avaliadas utilizando-se o ensaio padrão como descrito no ítem 2.2. Para avaliar o pH as atividades das enzimas foram determinadas como o pH variando de 2,6 a 8,0 utilizando tampão ácido cítrico/fosfato (McIlvaine). Para avaliar a temperatura ótima, as atividades das enzimas foram determinadas variando a temperatura do ensaio entre 30 e 70 °C a temperatura do ensaio enzimático. Para a determinação da

termoestabilidade, amostras das enzimas foram pré-incubadas por diferentes períodos de tempo a 50°C. Alíquotas foram coletadas e mantidas sob refrigeração. As atividades residuais foram determinadas utilizando o ensaio enzimático padrão.

2.7. Hidrólise enzimática do bagaço de cana

Previamente aos experimentos de hidrólise, 25 g de biomassa seca e moída foram pré-tratadas com uma solução de hidróxido de sódio 1% (m/v), sendo a carga de sólidos final de 10% (m/v). Os tratamentos foram realizados em duplicata em autoclave por 60 minutos. A fração sólida resultante foi lavada cuidadosamente com água destilada, filtrada, colocada em recipiente hermético e então armazenada a -20 °C. A composição química do bagaço de cana pré-tratado e não tratado foi determinada utilizando-se o método de lignina Klason modificado da TAPPI T222 om-98 (TAPPI, 1999).

Foi analisada a capacidade do coquetel enzimático de hidrolisar o bagaço de cana pré-tratado. Para fins de comparação, utilizou-se também um extrato de celulases comercial (Multifect® CL). A sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado foi realizada em frascos contendo 50 mL do coquetel enzimático diluído apropriadamente em tampão acetato 100 mM, pH 5,5. Foi analisada carga enzimática de 10 unidades de FPase por grama de biomassa seca (FPU/g). A carga de sólidos final foi sempre 2% (m/v). Para evitar possíveis contaminações, foi adicionado ao meio azida sódica e tetraciclina nas concentrações de 10 mM e 1 mg/mL, respectivamente. Por fim, os frascos foram acondicionados em um agitador orbital, a 50 °C e 150 rpm por 150 h. Amostras de 0,5 mL foram periodicamente retiradas da mistura reacional e imediatamente colocadas em banho fervente para a completa desnaturação das enzimas. Posteriormente, as mesmas foram centrifugadas a 10.000

x g por 10 min e o sobrenadante foi estocado a -20 °C para as análises posteriores. Todas as reações de sacarificação foram realizadas em duplicata.

As amostras resultantes das reações de sacarificação foram analisadas em HPLC utilizando-se um cromatógrafo da marca Shimadzu, série 10A, equipado com a coluna Aminex HPX87P (300 x 7,8 mm) e com detector de índice de refração. A fase móvel utilizada foi água e o fluxo foi de 0,6 mL/min, a 80 °C. A taxa de conversão de glicanas foi calculada pela razão entre a concentração de glicose liberada pela reação e o total de glicana adicionada à reação e a taxa de conversão de xilana foi calculada pela razão entre a concentração de xilose liberada pela reação e o total de xilana adicionada à reação. Em ambos os cálculos foram deduzidos o peso da água adicionada aos monômeros de glicose e xilose durante a hidrólise enzimática.

3 Resultados e discussão

3.1 Escolha da fonte de carbono e nitrogênio para produção de celulasas e xilanase

O nitrogênio é um constituinte essencial às células, uma vez que é necessário à formação de aminoácidos e ácidos nucleicos. Os microrganismos, em geral, apresentam grande diversidade na assimilação de fontes de nitrogênio. Para testar qual a melhor fonte de nitrogênio na indução das atividades das celulasas e xilanasas, foram utilizadas duas fontes orgânicas, peptona e extrato de levedura, e duas fontes inorgânicas, NaNO₃ e (NH₄)₂NO₃ (Tabela 1). O nitrato de amônio foi a fonte de nitrogênio que apresentou melhores resultados para todas as atividades analisadas. Contudo, o extrato de levedura foi relativamente melhor à peptona, por isso estas (nitrato de amônio e extrato de levedura) foram as fontes de nitrogênio utilizadas nos próximos experimentos de otimização da produção enzimática.

Tabela 1: Produção de celulases e xilanase (atividades - U.mL⁻¹) pelo *Trichoderma deliquescens* crescido em diferentes fontes de nitrogênio

Fonte de nitrogênio	Enzimas			
	CMCase	FPase	β-glicosidase	Xilanase
Peptona	0,15 ± 0,01	0,03 ± 0,007	0,01± 0,003	4,3 ± 0,5
Extrato de levedura	0,83 ± 0,09	0,04 ± 0,01	0,03±0,003	8,5 ± 0,6
NaNO₃	0,14 ±0,06	0,01 ± 0,006	0,07±0,004	1,9 ± 0,4
(NH₄)₂NO₃	4,87 ± 0,3	0,1 ± 0,01	1,03± 0,007	31 ± 0,9

Várias biomassas também foram testadas como fonte de carbono para a indução das atividades enzimáticas de CMCase, FPase, β-glicosidase e xilanase. A maior produção de celulases foi observada quando se utilizou carboximetilcelulose como fonte de carbono. Já a produção de β-glicosidase foi mais induzida quando se utilizou palha de cana como fonte de carbono. Contudo a palha de milho foi a fonte de carbono que induziu a produção mais homogênea entre as celulases como também um alto título de xilanase. (Tabela 2). A indução diferenciada da produção de enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico dependendo da composição da fonte de carbono utilizada (ADAV; RAVINDRAN; SZE, 2012) é um fato que torna importante testar diferentes fontes de carbono, principalmente de baixo custo, para que assim reduzir o custo final destas enzimas. Assim, para favorecer a produção da maioria das enzimas, principalmente a FPase e xilanase, a palha de milho foi a fonte de carbono escolhida para ser utilizada nas próximas etapas deste trabalho.

Tabela 2: Produção de celulases e xilanase (atividade – U.mL⁻¹) pelo *Trichoderma deliquescens* em diferentes fontes de carbono

Fonte de carbono	Enzimas			
	CMCase (U.mL ⁻¹)	β -glicosidase (U.mL ⁻¹)	FPase (U.mL ⁻¹)	Xilanase (U.mL ⁻¹)
Capim elefante	3,75 ± 0,1	0,272 ± 0,04	0,154 ± 0,01	115,9 ± 2,3
Forrageira	0,32 ± 0,15	0,011 ± 0,007	0,042 ± 0,009	24,5 ± 1,0
Palha de cana	4,16 ± 0,12	0,515 ± 0,06	0,134 ± 0,01	148,1 ± 4,2
Sabugo de milho	2,38 ± 0,08	0,168 ± 0,04	0,112 ± 0,008	146,5 ± 3,7
Palha de milho	4,06 ± 0,12	0,367 ± 0,05	0,190 ± 0,009	457,1 ± 4,1
Farelo de trigo	3,17 ± 0,1	0,185 ± 0,03	0,132 ± 0,011	130,1 ± 2,5
Bagaço de cana	0,95 ± 0,07	0,270 ± 0,04	0,095 ± 0,005	333,5 ± 2,9
Xilana de Bétula	0,29 ± 0,08	0,412 ± 0,07	0,099 ± 0,007	137,3 ± 3,7
CMC	12,8 ± 0,25	0,182 ± 0,01	0,179 ± 0,012	15,3 ± 2,1

O zimograma mostra bandas de atividade CMCase no qual podemos constatar a expressão de duas isoenzimas comuns a todos os cultivos, porém com produção diferenciada (seta 1 e 2). Para o cultivo com palha de milho observamos bandas de maior mobilidade eletroforética que não aparecem nos demais cultivos (seta 3) e podemos perceber também uma banda de atividade aparentemente única (seta 4) no cultivo com farelo de trigo.

Estas diferentes bandas observadas provavelmente indicam diferentes enzimas induzidas pelas fontes de carbono. Pois dependendo da composição da fonte de carbono utilizada, cada fungo pode induzir de forma diferenciada a produção das enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico ((DE ALMEIDA et al., 2011; FALKOSKI et al., 2012) ou diferentes associações das celulases com outras proteínas secretadas no meio formando complexos proteicos (SILVA et al., 2012), contudo estudos dos complexos e purificação das proteínas são necessários para avaliar estas hipóteses.

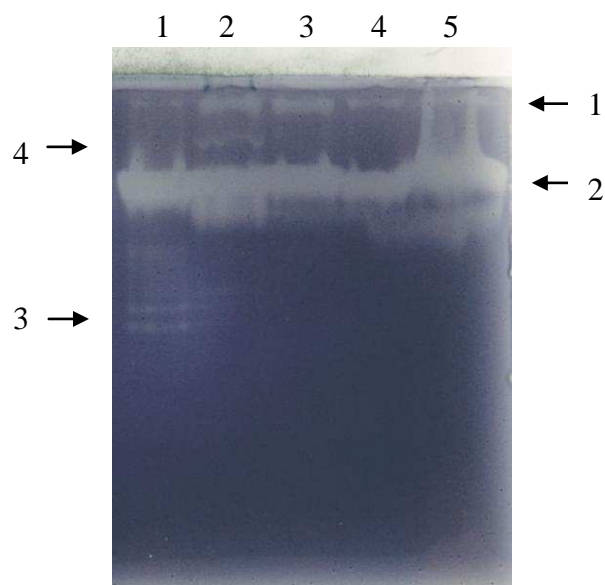


Figura 1: Zimograma. 0,1% de CMC foi incorporado ao gel SDS-PAGE e corada com vermelho congo para revelar as bandas de atividade para a enzima CMCCase. As setas indicam as bandas de atividade. Os extratos avaliados foram cultivados por 7 dias nas fontes de carbono: (1) palha de milho; (2) farelo de trigo, (3) bagaço de cana, (4) xilana de bétula e (5) CMC.

3.2 Análise da produção de CMCCase por Delineamento Fatorial e superfície de resposta.

O delineamento estatístico Plackett-Burman foi utilizado para a busca de fatores com efeito significativo na produção de CMCCase durante o cultivo do *T. deliquescens* utilizando palha de milho como fonte de carbono. Neste estudo foi possível avaliar o meio de cultura à procura de fatores (concentração dos constituintes do meio de cultura) que induzam ou reprimam a produção de CMCCase. Os resultados da atividade CMCCase nos diversos meios de cultura estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Tabela gerada pelo delineamento Placket-Burman com as concentrações dos componentes do meio de cultura e atividade CMC_{ase} produzida após 7 dias de cultivo.

RunOrder	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	CuSO ₄	NH ₄ NO ₃	CaCl ₂	FeSO ₄	ZnSO ₄	Extrato de levedura	Palha de milho	CMCase U.mL ⁻¹
1	0,75	0,25	0,125	3	1,5	9	15	4,5	3	0,9
2	2,25	0,75	0,125	1	1,5	27	15	4,5	0,75	1,58
3	2,25	0,25	0,125	3	0,5	9	5	1,5	3	3,64
4	0,75	0,25	0,125	1	1,5	27	15	4,5	3	1,45
5	2,25	0,25	0,375	3	0,5	27	15	4,5	0,75	1,08
6	2,25	0,25	0,375	3	1,5	9	15	1,5	3	3,18
7	0,75	0,75	0,375	3	1,5	27	5	1,5	0,75	1,68
8	1,5	0,5	0,25	2	1	18	10	3	1,5	2,71
9	2,25	0,75	0,125	3	1,5	9	5	4,5	3	4,37
10	0,75	0,25	0,125	3	0,5	27	15	4,5	3	1,42
11	2,25	0,25	0,375	1	1,5	27	5	4,5	3	4,92
12	0,75	0,75	0,375	1	1,5	27	15	1,5	3	2,91
13	0,75	0,75	0,125	1	0,5	27	5	1,5	3	3,52
14	0,75	0,25	0,375	3	0,5	9	15	1,5	0,75	1,42
15	2,25	0,75	0,125	3	1,5	27	5	1,5	0,75	2,72
16	2,25	0,75	0,375	1	0,5	9	5	4,5	3	3,11
17	0,75	0,75	0,125	3	0,5	9	5	4,5	0,75	0,96
18	2,25	0,75	0,375	1	0,5	9	15	4,5	0,75	1,41
19	2,25	0,75	0,125	3	0,5	27	15	1,5	3	3,74
20	0,75	0,75	0,375	3	1,5	9	15	4,5	0,75	1,28
21	0,75	0,25	0,375	1	0,5	27	5	4,5	0,75	0,75
22	2,25	0,25	0,125	1	0,5	27	15	1,5	0,75	2,31
23	0,75	0,75	0,375	3	0,5	27	5	4,5	3	0,97
24	0,75	0,75	0,125	1	1,5	9	15	1,5	0,75	2,32
25	2,25	0,25	0,375	3	1,5	27	5	1,5	0,75	2,58
26	0,75	0,25	0,375	1	1,5	9	5	1,5	3	2,88
27	0,75	0,25	0,125	1	0,5	9	5	1,5	0,75	2,19
28	2,25	0,25	0,125	1	1,5	9	5	4,5	0,75	1,58
29	1,5	0,5	0,25	2	1	18	10	3	1,5	2,56
30	2,25	0,75	0,375	1	0,5	9	15	1,5	3	2,56
31	1,5	0,5	0,25	2	1	18	10	3	1,5	2,49

* as unidades das concentrações estão descritas em materiais e métodos.

As análises do delineamento Plackett-Burman mostraram dois fatores (palha de milho e fosfatomonobásico de potássio) com efeito positivo sobre a produção de CMC_{ase}, sendo que o extrato de levedura e o sulfato de zinco mostraram efeito negativo para esta mesma resposta. Fato observado pelo valor dos coeficientes e visualmente no gráfico de probabilidade normal dos efeitos padronizados (Figura 2).

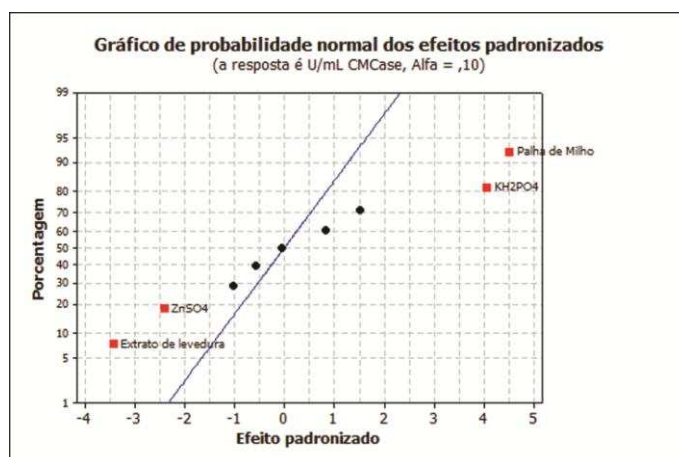


Figura 2: Gráfico de Probabilidade normal dos efeitos padronizados. Os pontos em vermelho indicam os fatores que têm efeito significativo na produção de CMCCase. Pontos à esquerda da linha indicam efeitos negativos e pontos à direita indicam efeitos positivos.

O KH_2PO_4 apresentou um efeito estimado de 1,01, $p = 0,001$, $p = 0,083$ e palha de milho apresentou um efeito estimado de 1,12, $p = 0,000$, enquanto extrato de levedura apresentou um efeito estimado de $-0,849$, $p = 0,003$ e sulfato de zinco apresentou um efeito estimado de 0,545, $p = 0,026$. Em delineamentos de screening, como o Plackett-Burmann, um nível de significância de 0,1 (valor do alfa), ou seja, 10% probabilidade de erro é considerado apropriado. O p-valor representa a probabilidade de se cometer um erro quando se realiza um teste de hipótese, ou seja, a probabilidade de se rejeitar uma hipótese quando ela é verdadeira.

Assim para etapa seguinte foi proposto um delineamento fatorial completo, $\alpha < 5$, para estes quatro fatores, e desta forma analisar os efeitos principais com mais detalhes além dos efeitos de interação entre os fatores. Para isso, foi elevada a faixa de concentração para a palha de milho e para o fosfatomonosódico de potássio e mantidas as concentrações de extrato de levedura e sulfato de zinco de acordo com

os efeitos observados no delineamento Plackett-Burman. Contudo, foram observadas diferenças estatísticas na produção de CMC_{Case} pela variação da concentração de extrato de levedura. Os resultados continuaram a indicar que esta fonte de nitrogênio é um fator negativo para a produção das enzimas e o máximo de atividade atingido nos testes foi de 4,2 U.mL⁻¹ (dados não mostrados). Assim, para a superfície de resposta, no DCC foram avaliados os mesmos níveis estudados dos fatores KH₂PO₄, extrato de levedura e palha de milho no delineamento fatorial Plackett-Burman. Os demais constituintes do meio de cultura foram mantidos na concentração do ponto central.

3.3 Delineamento do Composto Central

A metodologia utilizada para gerar a superfície de resposta foi o Delineamento do Composto Central, utilizando o programa estatístico Minitab 14, que gerou 20 corridas para o estudo de três fatores significativos no rastreamento, em cinco níveis: -1,68, -1, 0, +1 e +1,68.

As análises através do DCC produzem resultados mais completos, passíveis de serem representados por um modelo matemático com maior precisão por utilizar mais níveis e testar um maior número de combinações entre os fatores. Neste delineamento, foi utilizado um nível de significância de 0,05, contudo, não foi possível ajustar um modelo para a produção de CMC_{Case} nestas faixas de concentração dos fatores estudados. Apesar de não obter um modelo ajustado para a produção, podemos observar uma maior produção nas condições do teste 8 (MgSO₄ 0,5 g/L, CuSO₄ 0,25 g/L, NH₄NO₃ 2 g/L, CaCl₂ 1 g/L, FeSO₄ 18 mg/L, ZnSO₄ 10 mg/L, KH₂PO₄ 4,5 g/L, extrato de levedura 6 g/L e palha de milho 6% (p/v)) de 4,7 U.mL⁻¹ (Tabela 4).

Tabela 4: Delineamento do Composto Central com as concentrações dos componentes do meio de cultura e atividade CMCase produzida após 7 dias de cultivo

Teste	PtType	Palha de milho (✓)	Extrato de levedura (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	CMCase U.mL ⁻¹
1	1	2	2	1,5	3,35
2	1	6	2	1,5	3,74
3	1	2	6	1,5	1,45
4	1	6	6	1,5	2,20
5	1	2	2	4,5	3,57
6	1	6	2	4,5	4,15
7	1	2	6	4,5	3,07
8	1	6	6	4,5	4,78
9	-1	0,63	4	3	2,35
10	-1	7,36	4	3	4,42
11	-1	4	0,63	3	3,46
12	-1	4	7,36	3	1,89
13	-1	4	4	0,47	1,94
14	-1	4	4	5,52	4,16
15	0	4	4	3	4,05
16	0	4	4	3	4,10
17	0	4	4	3	3,90
18	0	4	4	3	4,00
19	0	4	4	3	3,95
20	0	4	4	3	3,93

O fungo *T. deliquescens* J-7 foi crescido no mesmo meio de cultura que iniciamos as análises dos componentes do meio de cultivo porque não houve diferença significativa em sua produção que justificassem o aumento de componentes honerosos ao cultivo, por exemplo, o extrato de levedura.

3.4 Efeito do pH e temperatura na atividade das as enzimas FPase e CMCase

O extrato enzimático obtido foi parcialmente caracterizado para verificar se o mesmo poderia ser aplicado de forma eficaz em processos de sacarificação de

biomassas lignocelulósicas. Os resultados do efeito da temperatura e do pH sobre as atividades de CMCase, FPase e xilanase estão mostrados na Figura 3.

As celulasas apresentaram, de forma geral, maiores atividades em temperaturas compreendidas entre 50 °C e 60 °C e em valores de pH mais ácidos, entre 4,5 e 5,0, com tempo de meia vida a 50 °C de 32,63 horas. Além disso, todas as enzimas foram sensíveis a altos valores de pH, no entanto a CMCase mostrou-se resistente ao pH baixo, retendo 85% de atividade em pH 2,6, dados estes comumente observados em celulasas fúngicas (FALKOSKI et al., 2012).

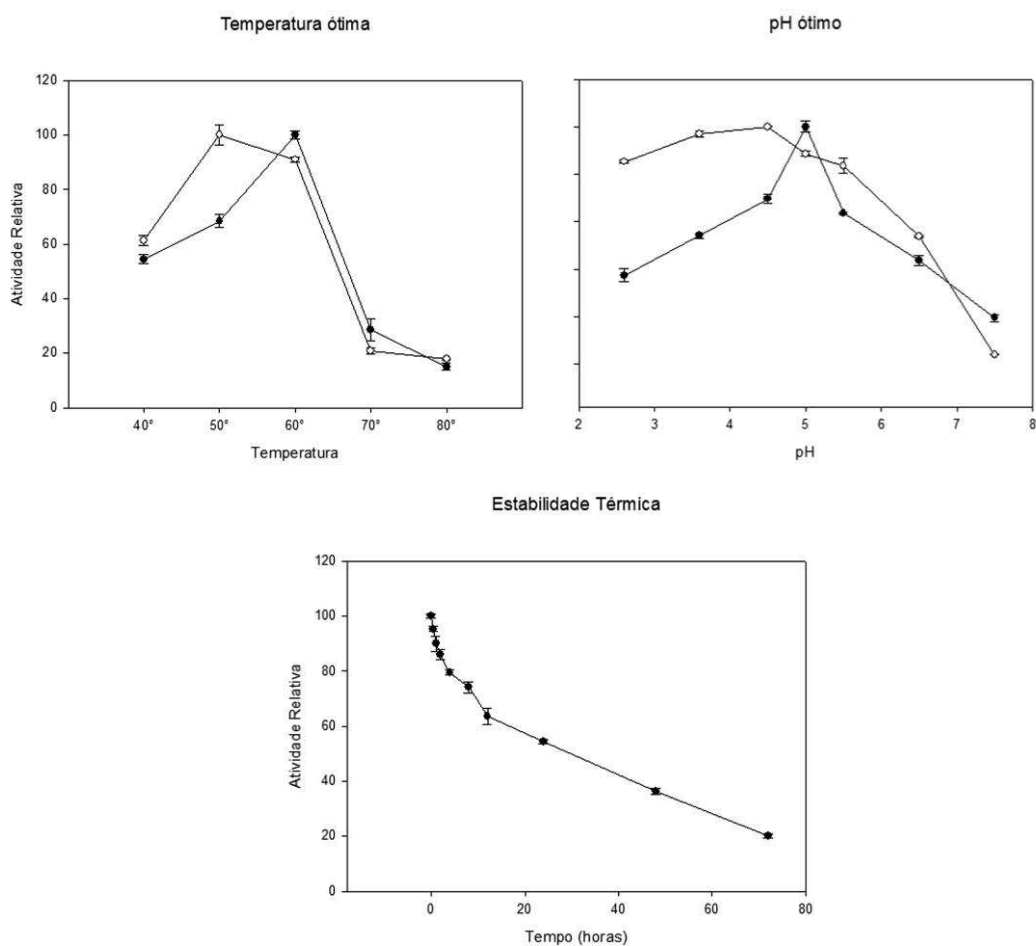


Figura 3: Temperatura ótima, pH ótimo e atividade residual a 50 °C das celulasas produzidas durante o crescimento do *T. deliquescens*. (●) FPase e (○) CMCase

3.5 Sacarificação do bagaço de cana de açúcar

A biomassa foi caracterizada antes e após o pré-tratamento com 1% de NaOH, possibilitando o cálculo das porcentagens do rendimento do processo. Verificou-se que o pré-tratamento realizado foi efetivo na remoção da lignina presente no bagaço de cana, a qual foi de 82,5% como pode ser observado na tabela 5. O pré-tratamento alcalino foi o escolhido devido sua melhor ação na retirada da lignina e manutenção dos níveis de hemicelulose e celulose, uma vez que foram observadas alta produção de xilanase e ausência de indícios das enzimas que degradam a lignina durante o crescimento em palha de milho. Removendo a lignina da biomassa consequentemente se reduz a cristalinidade da celulose e aumenta-se a porosidade dos materiais lignocelulósicos, o que facilita o acesso das enzimas hidrolíticas na subsequente sacarificação da biomassa (KUMAR et al., 2009).

Tabela 5: Composição química do bagaço de cana pré-tratado com NaOH 1% (m/v). Os valores são indicados como porcentagem de matéria seca.

Amostras	Glicanas	Xilanas	Galactanas	Mananas	Arabinanas	Lignina
Não tratado	45,4 ± 0,3	21,7 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,1	1,8 ± 0,0	22,0 ± 0,4
Pré-tratado	51,5 ± 1,3	27,9 ± 0,3	n.d.*	n.d.*	2,8 ± 0,1	8,1 ± 0,3

Para utilização do extrato produzido pelo *T. deliquescens* na sacarificação da biomassa do bagaço de cana, as atividades de diferentes celulasas e hemicelulasas produzidas foram medidas e comparadas com as atividades do extrato enzimático comercial Multifect® Novozyme, como mostrado na tabela 6.

Tabela 6: Comparação das atividades enzimáticas produzidas pelo *T. deliquescens* J-7 e Multifect® CL. Os valores das atividades estão expressos em relação à atividade FPase de cada extrato celulolítico.

Atividade Enzimática	Extrato <i>T. deliquescens</i>	Multifect® CL
FPase	1,00	1,00
CMCase	17,95	54,10
β-glicosidase	1,6	0,85
Xilanase	2218,3	32,81
β-xilosidase	2,52	n.d
α-Arabinofuranosidase	2,91	n.d
Lacase	n.d	n.d

n.d: não detectado

Podemos observar menores níveis enzimáticos de CMCase, contudo o extrato do *T. deliquescens* J-7 apresentou o dobro de atividade β -glicosidase, importante enzima na sacarificação da celulose, alta atividade xilanase como também enzimas desramificadoras que não estão presentes no extrato comercial. Essa melhor produção da β -glicosidase é desejável para não haver acúmulo de celobiose, um potente inibidor de endoglicanases e celobiohidrolases. As xilanases e as enzimas desramificadoras não agem diretamente sobre a celulose porem ao removerem polissacarídeos ligados à celulose elas facilitam o acesso das celulasas ao seu substrato (HU; ARANTES; SADDLER, 2011).

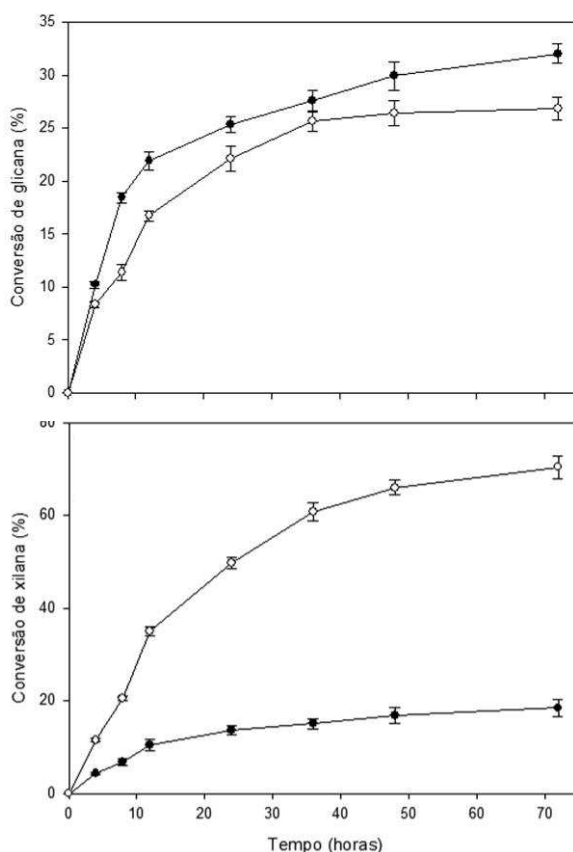


Figura 4: Produção de glicose e xilose em diferentes períodos de tempo na sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com NaOH 1% (m/v) utilizando o extrato de *T. deliquescens* (○) e o extrato comercial Multifect® CL (●).

O extrato enzimático do *T. deliquescens* e o Multifect foram aplicados na hidrólise de 2% p/v de bagaço de cana previamente pré-tratado e a porcentagem de glicose e xilose liberadas após 72 horas de hidrólise pode ser observada na Figura 4. O extrato bruto de *T. deliquescens* converteu 26, 8% da celulose em glicose enquanto o coquetel comercial foi mais eficiente convertendo 32% da celulose em glicose. Este fato pode ser relacionado às diferenças nos rendimentos de conversão das glicanas observadas entre os extratos enzimáticos, como a maior atividade CMCase do Multifect, embora o *T. deliquescens* produza maiores níveis de β -glicosidase. Entretanto, o extrato bruto do *T. deliquescens* converteu 70,4% da xilana em xilose

enquanto o coquetel comercial converteu apenas 18,4%. A grande diferença dos níveis de xilanases entre os extratos foi crucial para a hidrólise da xilana, sendo que o extrato do *T. deliquescens* liberou 3,8 vezes mais xilose que o coquetel enzimático.

O potencial do extrato do *T. deliquescens* J-7 para sacarificação da celulose não ultrapassou o extrato comercial já existente, somado ao fato de outros extratos de fungos terem mostrado melhores taxas de conversão da glicana (FALKOSKI et al., 2013) sua utilização fica limitada, necessitando de mais experimentos como a complementação do extrato produzido pelo *T. deliquescens* com outros extratos de fungos para avaliar se haverá melhora da conversão de glicanas. Mas sua alta performance em hidrolizar a xilana presente na biomassa pode ser útil para outros processos e não descarta o potencial deste isolado em produzir enzimas para utilização industrial.

4 Conclusão

Dentre as diferentes fontes de carbono e nitrogênio testadas, a palha de milho e o nitrato de amônio foram os que mais induziram a produção de celulases e hemicelulases. Contudo, não foi possível ajustar um modelo utilizando delineamentos fatoriais nas faixas de concentração estudadas, mas foi possível identificar meios de cultura que apresentaram produção média de $4,16 \pm 0,32 \text{ U.mL}^{-1}$ de CMCase. As enzimas foram mais ativas a $50 \text{ }^\circ\text{C} - 60 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 4,5 -5, parâmetros utilizados na sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com 1% NaOH. Após 72 horas de hidrólise, o coquetel comercial teve um rendimento da conversão de celulose 19% maior que o extrato do *T. deliquescens* enquanto o extrato foi mais eficaz na hidrólise da xilana, com rendimento 280% maior que o coquetel enzimático.

Capítulo 3

High production and characterization of a xylanase from *Trichoderma deliquescens* and its action on biobleaching of kraft pulp

T. F. LEAL¹, V. M. GUIMARÃES¹, C. GACHET¹, E. M. VISSER¹, A.C. ALFENAS², J. L. COLODETTE³, S. T. de REZENDE¹

1 Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

2 Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia

3 Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Engenharia Florestal

ABSTRACT

The production of xylanase from *T. deliquescens* was reported only twice in the Pubmed database despite knowledge that the genera *Trichoderma* spp. is a fundamental organism in forest soils due to its involvement in decomposition and nutrient cycling. Lignocellulosic residues have shown to be good carbon sources for inducing hydrolytic enzymes. The present study indicates medium composed of NH_4NO_3 , yeast extract and corn husk, whose main hemicellulose is xylan, to induce secretion of xylanase by *T. deliquescens*. Statistical design experiments were applied, including a 9 factor factorial Plackett-Burman (PB) design with confidence level $\alpha = 0.1$ and a response surface design for 3 factors (NH_4NO_3 , yeast extract and corn husk) obtained from the Central Composite Design (CCD), including cubic, axial and central points in one block. After the PB, 3 factors investigated in a CCD showed an optimum region in which approximately 789 U.mL^{-1} of xylanase was produced. One xylanase was purified and identified by MS/MS. This xylanase from *T. deliquescens* showed optimum pH and temperature of 5.5 and 60-65 °C, respectively, and a half-life of 66 minutes at 50°C. 1 mM 2-mercaptoethanol and Mg^{2+} increased activity while SDS and Hg^{2+} caused a decrease. Calculated values of K_m and V_{max} were 0.36 mg.mL^{-1} and 4866, respectively. The treatment of pre-bleached Kraft pulp with xylanase from *T. deliquescens* allowed for a 14% reduction in the quantity of chlorine dioxide used in the TFC bleaching sequence and result a paper with high brightness.

1. Introduction

Industry has paid special attention to xylanases since the first report of their potential as a bleaching agent of cellulose pulp (VIAKARI et al., 1986). More recently, many researchers have published processes in which xylanases can be added to improve characteristics of a final product, such as the nutritional properties of agricultural silage and grain feed, baked bread and quality of dough for example (MALATHI; DEVEGOWDA, 2001; BUTT et al., 2008). The use of xylanase may significantly reduce the overall cellulase loading required to achieve fast, nearly complete hydrolysis of a cellulosic substrate (HU; ARANTES; SADDLER, 2011), indicating a potential application for ethanol production from biomass.

Pulp and paper factories have applied xylanase to reduce chemical consumption, mainly chlorine, in the conventional bleaching sequence. This enzyme is also applied to the totally free chlorine bleaching sequence or to reduce xylans in pulp when desired. Biotechnological treatments optimize consumption of chemicals by enhancing chemical processing involved in pulp bleaching by structural modifications of carbohydrates and lignin. Reduction in bleaching chemicals would result in reduction in organochlorine compounds in the effluent (VIAKARI et al., 2010). Xylanase enzymes hydrolyse xylans precipitated on the surface of the fiber. Thus it opens the pulp structure to increase access of bleaching chemicals to the lignin layer (PAICE et al., 1988). Hemicellulases are also known to release chromophores associated with carbohydrates (PATEL et al., 1993).

Xylanase (EC 3.2.1.8) is an enzyme belonging to the class of hydrolases, which catalyzes endohydrolysis of (1→4)-β-D-xylosidic linkages in xylans and has an important role in the carbon cycle. The CAZy database classifies carbohydrate hydrolases, as well as others carbohydrate active enzymes, based on similarity of

sequenced genes (LOMBARD et al., 2014). True β -(1, 4)-acting xylanases with a unique catalytic domain are restricted to families 5, 8, 10, 11, and 30. They have different structures and substrate specificity. Enzymes of the family GH11 are the smallest xylanases and are highly specific; these do not tolerate high substitutions on the xylan backbone (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012). Most enzymes of GH11 have molecular weight less than 30 kDa and basic pI (KOCABAS et al., 2015). These low molecular weight xylanases are important enzymes in the paper and pulp industry (SUBRAMANIYAN, 2012).

Xylanases applied at an industrial scale are principally produced by *Aspergillus* and *Trichoderma*. The GH11 xylanase 2 (Xyn2) secreted by *Trichoderma reesei* represents more than 50% of the total xylanolytic activity of *T. reesei* cultivated on xylan and together with GH10 xylanase 1 (Xyn1) represent more than 90% of the xylan-degrading ability of this fungus (LI et al., 2015). *Trichoderma deliquescens* (Sopp) (synonymy to *Gliocladium viride* and *Gliocladium deliquescens*) is able to grow on a variety of complex carbon substrates such as wheat bran and corn cobs, and secrete xylanases as shown by CHRISTOV; SZAKACS; BALAKRISHNAN, (1999) and using statistical experimental designs could improve protein production with screening experiments for targeted responses and response optimization. The Plackett-Burman design and response surface methodology are good choices for applying statistical designs to bioprocesses and provided accurate results for optimizing uricase production from *T. deliquescens* (NANDA et al., 2012). This study showed optimization of medium component concentration to induce high production of xylanase activity, the purification of one xylanase from *Trichoderma deliquescens* and its purification, characterization and application on kraft pulp bleach.

2 Materials and methods

2.1. Microorganism

The fungus *T. deliquescens* J-7 was obtained from the mycological collection of the Forest Pathology Laboratory, Phitopatology department, Federal University of Viçosa, MG, Brazil. It was routinely propagated on potato dextrose agar slants at 28 °C for 5 days. Five 10mm discs of the fungal strain were cut and used to inoculate 50 mL of culture medium.

2.2. Enzyme assay and protein determination

The xylanase standard reaction assay consisted of 50 µL of 500 mM sodium acetate buffer (pH 5.5), 50 µL of an appropriate enzyme dilution and 400 µL of 1.25% (w/v) xylan birchwood. The enzymatic reaction was carried out for 15 minutes at 50 °C. The release of reducing sugars was determined using the 3,5-dinitrosalicylic acid reagent (MILLER, 1959) and was calculated according to the xylose standard curve. One enzyme unit was defined as the amount of enzyme necessary to produce 1 µmol of glucose equivalent per minute. The protein concentration in the enzymatic extracts was determined by the Coomassie Blue binding method using bovine serum albumin as the standard (BRADFORD, 1976).

2.3 Optimization of Xylanase Secretion

2.3.1 Selection of the Carbon and Nitrogen Sources

In order to determine the best source of nitrogen and carbon for the induction of xylanase, the fungus was grown in submerged fermentation and the culture medium used was: 50 mg/L KCl, 10 mg/L ZnSO₄, 18 mg/L FeSO₄.7H₂O, 0.5 g/L

MgSO₄, 1.5 g/L KH₂PO₄, 0.25 g/L CuSO₄, 1 g/L CaCl₂, 0.3% g/L of the nitrogen source (peptone, yeast extract, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄ or NH₄NO₃) and 0.5% of the wheat bran as the carbon source. After selection of the nitrogen source, the fungus was grown in submerged fermentation with 1.5% of the different carbon sources evaluated: corn husk, wheat bran, sugarcane bagasse, brichwood xylan and CMC (Table 1).

2.3.2 Statistical experiments design

In the present study, MINITAB ®14 was used to optimize the culture medium. Two different optimization techniques were used to optimize the fermentation medium composition. Initially, a Plackett-Burman method was used to screen and identify significant media components for the production of xylanase enzymes. The factors and factor levels (-1 and +1) analyzed in this step were KH₂PO₄ (0.75 and 2.25 g/L), MgSO₄ (0.25 and 0.75 g/L), CuSO₄ (0.125 and 0.375 g/L), NH₄NO₃ (1 and 3 g/L), CaCl₂ (0.5 and 1.5 g/L), FeSO₄ (0.009 and 0.027 g/L), ZnSO₄ (0.005 and 0.015 g/L), yeast extract (1.5 and 4.5 g/L) and corn husk (0.75 and 3%). The table generated by MINITAB had 28 runs (Resolution III) as represented in Table 2. Then, the Central Composite Design (CCD) method was used to generate a table (Table 3) with cubic, central and axial points using the default $\alpha = 1.682$, indicated by the program to recognize the second order model. The factors and factor levels of -1.682, -1, 0, +1 and +1.682 analyzed in this step were corn husk (0.31, 1, 2, 3 and 3.68%), yeast extract (0.47, 1.5, 3, 4.5 and 5.52 g/L) and KH₂PO₄ (0.23, 0.75, 1.5, 2.25 and 2.76 g/L). The variable (y) was units of xylanase activity and it was measured using the standard assay described above.

2.4 Xylanase purification

Enzyme purification was carried out at room temperature in a FPLC system and in all steps of the process the protein content (A280) and xylanase activity of the collected fractions were measured. Xylanase was purified by chromatography in a 5 mL column of HiTrap Q sepharose FF, at pH 9.5, and the enzymatic pool was concentrated in an Amicon Ultrafiltration system (Millipore Co., Billerica, MA, USA) using a membrane filter YM-10 (Cut-off Mr 10,000 Da) and then applied in a column composed of HiPrep 16/60 sephacryl S-200 HR, pH 5.5. The columns were purchased from GE Healthcare Bio-Sciences Corp. Piscataway, NJ, USA.

2.5 SDS-PAGE and zymogram analysis

SDS-PAGE, 12% polyacrylamide gel, was used for screen purification. The molecular mass standard used was Novex® Sharp Unstained Protein Standard.

For zymogram analysis, samples were applied to a 12% SDS-PAGE gel containing 0.1% (w/v) birchwood xylan polymerized within the gel matrix. After electrophoresis, the gel was washed twice with a solution of 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, containing 20% isopropanol, followed by washing in a 100 mM sodium acetate buffer solution, pH 5.5. The hydrolysis of xylan was performed by incubating the gel in sodium acetate buffer at 50 °C for 30 min. After hydrolysis, the gel was stained with congo red 0.1% (w/v), and destained by washing with 1 M NaCl. In order to increase the contrast with the background, the gel was washed with acetic acid 5% (w/v). Xylanase activity was visible as a clear band.

2.6 Protein identification by mass spectrometry (MS)

2.6.1 Sample preparation

The protein bands were removed manually from the gels, reduced by DTT (10 mM) and alkylated by iodoacetamide (100 mM). Digestion was carried out with trypsin in 50 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 7.8, containing 20.0 ng/ μ L of sequencing grade trypsin (Promega) at 37°C overnight. Peptides were extracted from the spots with 50 mM ammonium bicarbonate. Tryptic peptides were solubilized in 30 μ L of MS grade water (Sigma–Aldrich) containing acetonitrile 50% and trifluoroacetic acid 0.1% (v/v).

2.6.2 Protein identification by MS

Mass spectrometry was used to determine the molecular weight and to identify the purified xylanase from *T. deliquescens*. The protein and tryptic peptides obtained were resuspended in 20 μ L of 50% acetonitrile acidified with 0.1% trifluoroacetic acid. The matrix α -cyano-4-hydroxycinnamic acid - HCCA was used (Bruker Daltonics, Germany) and solubilized in the same solution in that the tryptic peptides were resuspended at a concentration of 10 mg.mL⁻¹. Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics, Germany) was used for calibration of the analytical method MS1. Plating was performed manually in duplicate, applying a 1 μ L + 1 μ L sample matrix for each spot. For the standard 0.5 μ L + 0.5 μ L was applied for each spot. The spectra were acquired in a mass spectrometer MALDI TOF / TOF, model Ultraflex III (Bruker Daltonics, Germany). The MS1 data were acquired in the reflective well, with a detection range 500-5000 Da. After data acquisition, they were processed using flexAnalysis software, version 3.3 (Bruker Daltonics, Germany).

The ions whose mass charge ratio (m/z) showed intensity greater than 3.000 were chosen for realization of MS2 using the LIFT in positive mode.

All data were managed by the Flexcontrol software, version 3.3 (Bruker Daltonics, Germany), and the spectra resulting from MS1 and MS2 analysis processed with the aid of flexAnalysis software, version 3.3 (Bruker Daltonics, Germany). The lists of MS1 peaks were generated in extensible markup language (XML) format. The MS2 peak lists were generated in Mascot Generic Format (MGF) by Biotoools software, version 3.2 (Bruker Daltonics, Germany). Batch Mascot searches were performed locally against the NCBI Fungi protein database using the MASCOT DAEMON CLIENT, with a precursor tolerance of 0.1 Da for the product ions, allowing for methionine oxidation and deamidation (NQ) as a variable modification, carbamidomethylation as a fixed modification, one missed cleavage, charge states 2⁺, 3⁺, and 4⁺, and trypsin as the enzyme.

2.7 Effect of pH and temperature

The influence of pH on xylanase activity was studied using the standard assay described above, but varying the pH using citrate–phosphate buffer solutions (pH 3.0–8.0). The effect of temperature on xylanase activities was determined within a temperature range of 30–70 °C, maintaining all other conditions as described in the standard assay. For determination of thermal stability, the enzyme fractions were pre-incubated with sodium acetate buffer, pH 5.5, at 50 and 60 °C. Samples were collected at several periods and kept on ice for at least 1 hour. The residual activity was determined using the standard assay at the optimum temperature and pH. Results were presented as the mean of the three measurements and analyzed by Curve expert version 1.3 for Windows.

2.8 Effect of ions, reducing agents and denaturants on xylanase activity

The effects of ions, reducing agents and SDS on xylanase activity were determined by performing the standard assay and including the compound under analysis at the final concentration of 0.01% for SDS or 1 mM for ions, EDTA and β -mercaptoethanol.

2.9 Application of xylanase in the Kraft pulp bleaching sequence.

The bleaching sequence used was XD_{HT}E_{op}D₁. X: treatment with 100 U of xylanase from *T. deliquescens* per gram of pulp at previously determined optimal conditions. D_{HT}: treatment with chlorine dioxide at 90 °C, final pH 2.5. E_{op}: oxidative extraction with hydrogen peroxide. D₁: treatment with chlorine dioxide at 85 °C, final pH 4.5. The sequence steps are presented in more detail in Table 4. The amounts of sulfuric acid and ammonium hydroxide added to X, D_{HT} and D₁ were calculate based on three different bleaching mini tests with different pH. Brightness and physico chemical properties kappa number, viscosity and pentosan content were measured using TAPPI standard methods (T452 om-08; T236 om-06; T230 om-08 and T223 ts-63).

Results and discussion

3.1 Nitrogen and carbon sources to induce the secretion of xylanases.

The first compounds tested for difference in xylanase induction were the inorganic and organic nitrogen sources in 0.5 % w/v of wheat bran as substrate

for growth. $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$, showed to be better inducer of xylanase secretion, exceeding 30 U.mL^{-1} (Table 1). Nevertheless, the growth medium selected to produce the enzyme was supplemented with both inorganic and organic source of nitrogen. Thus, yeast extract was selected because it was a better xylanase inducer than peptone.

Table 1: Nitrogen and carbon sources test for xylanase secretion from *T. deliquescens* J-7

Nitrogen and carbon sources	Xylanase activity (U.mL^{-1})
NaNO₃	1.9 ± 0.4
(NH₄)₂NO₃	31 ± 0.9
Yeast extract	8.5 ± 0.6
Peptone	4.3 ± 0.5
Corn husk	457 ± 28.3
Wheat bran	130 ± 10.5
Sugar cane bagasse	333 ± 26
Birchwood xylan	137 ± 10.9
CMC	15 ± 0.9

In an attempt to further increase the secretion of xylanases, *T. deliquescens* was cultivated in 1.5% w/v of five carbon sources. The corn husk was the best carbon source to induce xylanase, as showed in Table I. Maximum activity was observed at 6, 8 and 10 days of growth (457 U/mL). We achieved a high production when compared to MITRA et al., (2011), who observed the secretion of 16 U/mL xylanase from *T. deliquescens* when grown on oat spelt xylan; and CHRISTOV; SZAKACS; BALAKRISHNAN, (1999) observed the secretion of 32, 1.5 and 49.5 U/mL when *T. deliquescens* was grown on wheat bran, corn cobs and oat spelt xylan. These data emphasize that different carbon sources can result in different secretion levels and also that different strains of *T. deliquescens* can secrete different levels of xylanase.

3.2 Statistical experiment design for high secretion of xylanase

Two strategies were used to evaluate the levels of fermentation medium composition and its relation with xylanase secretion. First, the Plackett-Burman design method was used to screen and test all the growth medium components. Table II shows the design table and enzyme values, where the production of more than 700 U/mL can be observed in runs 11 and 16. Three factors were selected: corn husk (C), yeast extract (N) and KH_2PO_4 (P) that cause significant differences ($p < 0.1$) in xylanase induction as shown in the Normal Probability Plot of the standardized effects (Figure 1 A).

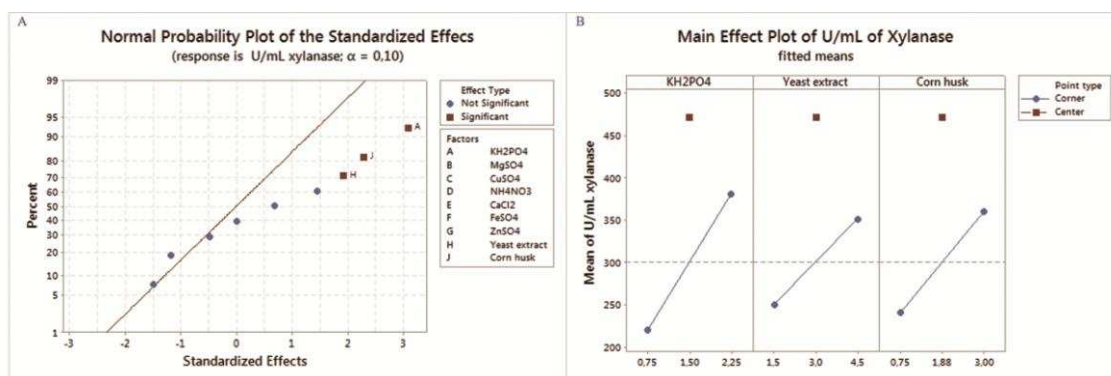


Figure 1: (A) Normal probability plot of the standardized effects: red square indicates significant factors. (B) Main effect plot: showing the media activity of coner and central points analysed. These graphs are generated by Minitab.

These three variables were further evaluated in the CCD with the same concentration as in the screening design, because the analyses of the main effect plot shows that the center point induced more xylanase than the corners, indicating a second-order model (Figure 1 B).

Table 2: Plackett-burman table design and xylanase activity of each growth medium.

RunOrder	PtType	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	CuSO ₄	NH ₄ NO ₃	CaCl ₂	FeSO ₄	ZnSO ₄	Yeast extract	Corn husk	U/mL xylanase
1	1	0,75	0,25	0,125	3	1,5	9	15	4,5	3	242,8
2	1	2,25	0,75	0,125	1	1,5	27	15	4,5	0,75	292,2
3	1	2,25	0,25	0,125	3	0,5	9	5	1,5	3	227,2
4	1	0,75	0,25	0,125	1	1,5	27	15	4,5	3	388,9
5	1	2,25	0,25	0,375	3	0,5	27	15	4,5	0,75	237,1
6	1	2,25	0,25	0,375	3	1,5	9	15	1,5	3	251,0
7	1	0,75	0,75	0,375	3	1,5	27	5	1,5	0,75	245,3
8	0	1,5	0,5	0,25	2	1	18	10	3	1,5	472,8
9	1	2,25	0,75	0,125	3	1,5	9	5	4,5	3	835,5
10	1	0,75	0,25	0,125	3	0,5	27	15	4,5	3	256,7
11	1	2,25	0,25	0,375	1	1,5	27	5	4,5	3	712,5
12	1	0,75	0,75	0,375	1	1,5	27	15	1,5	3	253,8
13	1	0,75	0,75	0,125	1	0,5	27	5	1,5	3	176
14	1	0,75	0,25	0,375	3	0,5	9	15	1,5	0,75	171,3
15	1	2,25	0,75	0,125	3	1,5	27	5	1,5	0,75	323,2
16	1	2,25	0,75	0,375	1	0,5	9	5	4,5	3	748,8
17	1	0,75	0,75	0,125	3	0,5	9	5	4,5	0,75	112
18	1	2,25	0,75	0,375	1	0,5	9	15	4,5	0,75	334,2
19	1	2,25	0,75	0,125	3	0,5	27	15	1,5	3	204,8
20	1	0,75	0,75	0,375	3	1,5	9	15	4,5	0,75	151,8
21	1	0,75	0,25	0,375	1	0,5	27	5	4,5	0,75	77,8
22	1	2,25	0,25	0,125	1	0,5	27	15	1,5	0,75	342,7
23	1	0,75	0,75	0,375	3	0,5	27	5	4,5	3	247,1
24	1	0,75	0,75	0,125	1	1,5	9	15	1,5	0,75	263,1
25	1	2,25	0,25	0,375	3	1,5	27	5	1,5	0,75	278,7
26	1	0,75	0,25	0,375	1	1,5	9	5	1,5	3	226,4
27	1	0,75	0,25	0,125	1	0,5	9	5	1,5	0,75	268,8
28	1	2,25	0,25	0,125	1	1,5	9	5	4,5	0,75	274,8
29	0	1,5	0,5	0,25	2	1	18	10	3	1,5	442,6
30	1	2,25	0,75	0,375	1	0,5	9	15	1,5	3	274,1
31	0	1,5	0,5	0,25	2	1	18	10	3	1,5	437,6

*(the growth medium concentration units are shown in materials and methods)

The CCD and the results of enzyme activity are presented in Table 3. Using a regression analysis, second-order models were obtained for xylanase activity ($y = -281 + 149C + 165.8N + 227P - 74.4C^2 - 57.32N^2 - 130.6P^2 + 48.7CN + 71.8CP + 62.5NP$, $R^2: 92.12\%$). The model may be considered as predictive since t values were significant ($p < 0.05$) and the percentages of variation explained by the model were

appropriate ($R^2 = 92.12\%$), so the model was used to generate the contour plots (Figure 2).

The positive interactions between C, N and P were important factors for xylanase secretion, where all double interactions were statistically significant. The central points presented little variation and the highest activity was 793 U/mL in run 8. The optimum predicted production of xylanase was 789 and the concentrations of corn husk, yeast extract and KH_2PO_4 in this model were 3.68%, 4.5 g/L and 2.76 g/L respectively.

Table 3: CCD table design and xylanase activity measured and predicted for each growth medium. * (the growth medium concentration units are shown in materials and methods)

OrdemEns	Corn Husk	Yeast Extract	KH_2PO_4	Xylanase activity	Predicted activity
1	1	1,5	0,75	131,3252	207,1939
2	3	1,5	0,75	254,0694	163,4748
3	1	4,5	0,75	72,71762	-40,2379
4	3	4,5	0,75	175,115	208,3068
5	1	1,5	2,25	252,9636	208,2664
6	3	1,5	2,25	278,6182	380,0684
7	1	4,5	2,25	163,1723	242,2615
8	3	4,5	2,25	793,7013	706,3273
9	0,318207	3	1,5	152,9989	149,0545
10	3,681793	3	1,5	482,3071	502,5226
11	2	0,477311	1,5	168,9225	138,3863
12	2	5,522689	1,5	157,8645	204,6717
13	2	3	0,238655	68,07325	118,7103
14	2	3	2,761345	572,7619	538,3958
15	2	3	1,5	520,1256	536,2942
16	2	3	1,5	501,8266	536,2942
17	2	3	1,5	600,6302	536,2942
18	2	3	1,5	496,4614	536,2942
19	2	3	1,5	536,7127	536,2942
20	2	3	1,5	564,8001	536,2942

The validity of the model was confirmed by testing five growths on optimum concentrations of corn husk, yeast extract and KH_2PO_4 . The result (784 ± 65.9 U/mL) was very similar to the predicted value and consequently the model was

successfully validated. In a study with higher concentrations of these same three factors in another CCD, 518 U/ml was observed as the maximal xylanase activity (LEAL et al., 2013), which is lower than obtained in the present study, demonstrating that higher concentrations do not increase the production of xylanase during cultivation.

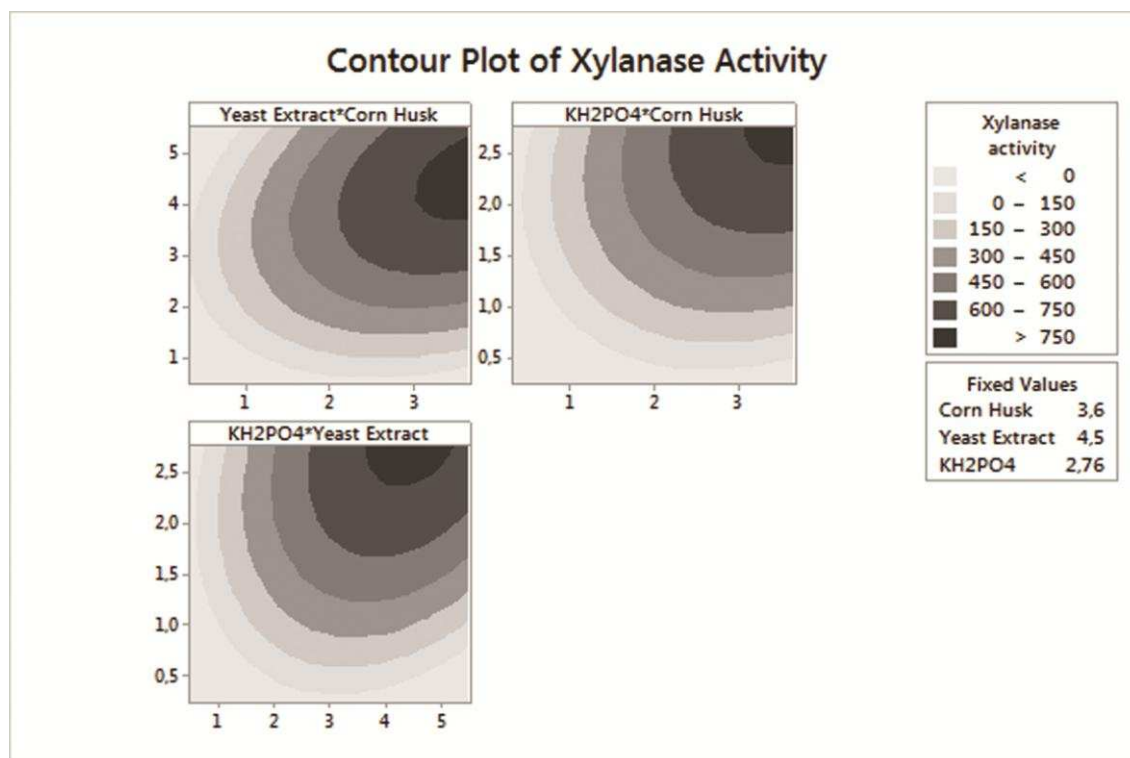


Figure 2: Contour plot to response xylanase activity produced by *Trichoderma deliquescens* J-7 in relation to factors corn husk, KH_2PO_4 and yeast extract concentration.

3.3 Purification and Characterization

Xylanase was purified by a two sequential chromatography column technique, anion exchange and gel filtration. We used Q-sepharose anion exchange resin equilibrated in basic pH, 9.5. The objective was to separate xylanase with a high pI value. To do this, the crude extract was first dialyzed against Tris.HCl buffer 50 mM. Precipitated proteins were visible after dialyze, and the xylanase and cmcase

activities were measured in the dialyzed extract. The xylanase was stable and maintained 89.5% of its initial activity but cmcase and FPU lost almost all their activity after dialyze.

After the anion exchange, one xylanase from the crude extract did not attach to the resin charges and was eluted in the first fractions (Fig 3 A and 3 B, line 7). High yields of a basic pI xylanase were recovered, 65% of initial activity, and a high purification factor could be observed (Table 4) and visualized by SDS-PAGE, where only three protein bands were dyed with coomassie blue (Fig. 3 B, line 3). To separate xylanase from the remaining contaminant proteins, gel filtration chromatography was performed with S-200, equilibrated with 50 mM acetate buffer, pH 6.0. As observable on SDS-PAGE, a xylanase with low molecular weight was purified (Figure 3 B, line 4) and further characterized.

Table 4: Summary of steps involved in the purification of xylanase

Step	Total Protein* (mg)	Total activity (U)	Specific Activity (U/mg protein)	Yield (%)	Purificatioin factor
Crude extract	57,2	2538	44,37	-	1
Dialysis pH 9,5	41,2	2271	55,12	89,47	1,24
Q-sepharose	3,7	1673	447,46	65,91	10,01
S-200 sephacryl	0,22	1072	4866	42,22	109,66

* Determined with the procedure of Bradford

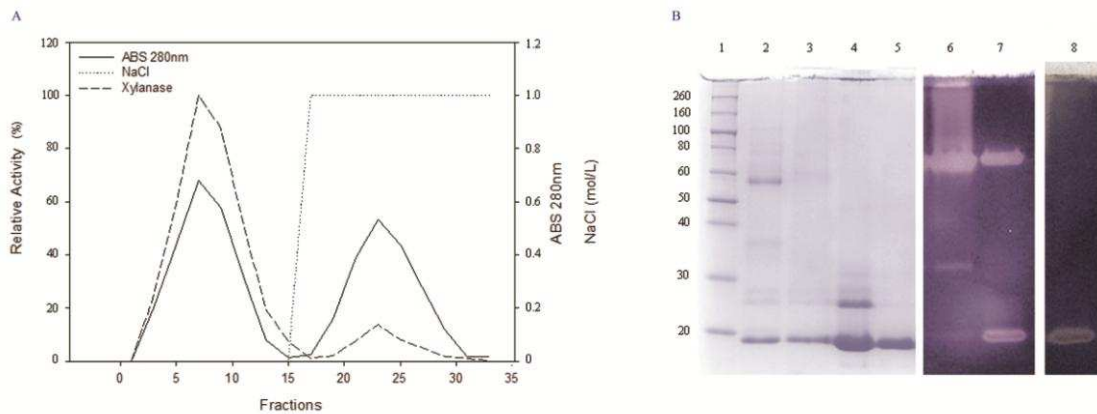


Figure 3: (A) Q-sepharose chromatogram; (B) SDS-PAGE of purification steps 1 – molecular weight; 2 – crude extract; 3 – dialysed extract; 4 – Q-sepharose enzyme pool and 5 – S200 sephacryl enzyme pool. (B) Zymogram, 6 - unboiled crude extract; 7 - boiled crude extract and 8 - purified xylanase boiled.

3.4 Identification of purified xylanase

After a MASCOT search of the GenBank database, it was verified that the band present in the gel contained a unique endoxylanase. Only two peptides were sequenced and only one peptide (R.VNQPSIIGTATFYQYWSVR.R) match with *T. reesei* xylanase GH11, covering approximately 9% of total protein. We could identify only one peptide fragment because *T. deliquescens* do not have its genome sequenced yet. Thus MASCOT search of similarity have a little chance to find peptides with 100% of similarity. When linear MS were used, the PMF show more two peptides with approximately 6000 Da (data not show) but they are too large to be analyzed with tandem approach on MALDI-TOF and contribute to low covering of xylanase protein observed. Although this evidence, with enzyme characteristics observed like high pI, indirectly measure in ion exchange chromatography and low molecular weight in electrophoresis, we could suggest this purified protein is a GH11 xylanase family member.

3.5. Effect of temperature and pH on xylanase activity

The purified GH11 xylanase from *T. deliquescens* was most active at 60° and 65 °C, but the activity decreased rapidly at 70 °C, indicating that the xylanase had moderate thermal stability. The thermal stability was then measured at 65°C and 50 °C, which showed half-lives of 11.8 and 66 minutes, respectively. High activity was also observed as of pH 4, reaching optimum levels at pH 5.5, with 50% of relative activity at pH 6.5, decreasing dramatically to near 10% relative activity at pH 8.0 (Figure 4). *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) presents two known GH11 families of xylanases, one of them XYNII (basic pI, 4.5-5.5 as optimum pH range and 55-60 °C as optimum temperature range, but with a short half-life (> 1 minute) at 65 °C), which had similar characteristics to the xylanase purified on this work, except for the half-life in which case the xylanase from *T. deliquescens* was more resistant (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

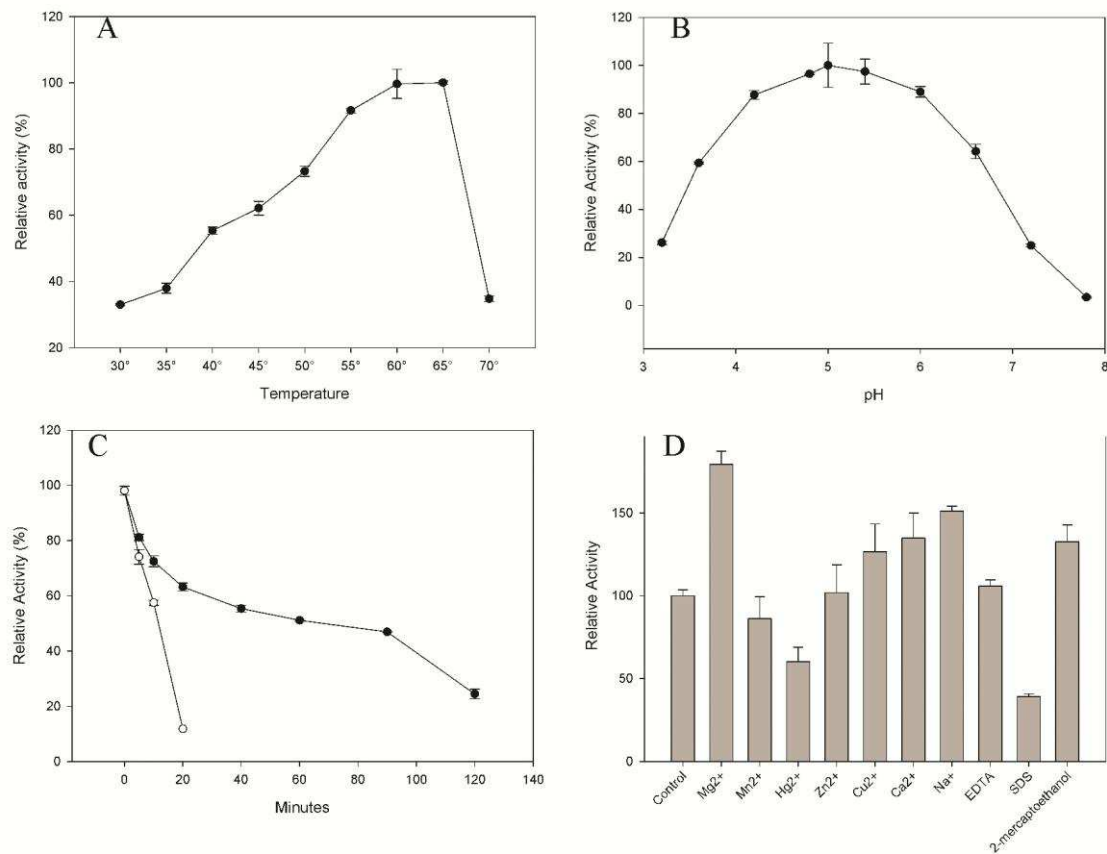


Figure 4: (A) Effect of pH; (B) temperature; (C) thermal stability (○) 60 °C and (●) 50 °C; (D) ions and denaturants on purified xylanase activity.

3.6. Effect of metal ions on xylanase activity

The influence of certain inhibitors and activators on xylanase activity was studied. Xylanase activity was stimulated by Mg²⁺, Na⁺ and 2-mercaptoethanol by 1.79, 1.51 and 1.32 fold. Xylanase was inhibited by Hg²⁺ and strongly by SDS. The enzyme activity was little or uninfluenced by Zn²⁺, Mn²⁺, K⁺, Ca²⁺, Cu²⁺ and EDTA (Figure 4D). Mg²⁺ was the only ion observed which activated GH11 xylanase from *Clostridium beijerinckii* G117 (Ng et al., 2015). For *Thermobifida halotolerans* YIM 90462 (ZHANG, et al., 2012) it was observed that DTT enhanced activity while heavy-metals and SDS decreasing activity of GH11 xylanase.

3.7 Effects of xylanase treatment on eucalyptus Kraft pulp bleaching

The oxygen bleached kraft pulp (O) was treated with two different xylanase extracts from *T. deliquescens*: dialyzed extract (Xd) and purified enzyme (Xp). The presence of cellulases enzymes found in the crude extract are negative factors for bleach pulping and the use of the dialyzed crude extract is because this process reduces cellulase activity near to zero. Dialyze is a low cost method to prepare cellulase-free xylanase compared to complete purification steps.

Table 5: Pulp bleaching sequence parameters and results.

Enzymatic bleaching of Kraft pulp with GH 11 xylanase from <i>T. deliquescens</i>													
		Control sequence (CS)				Dialyzed extract sequence (XqS)				Purified Xylanase (XpS)			
Conditions	O	Xc	D	Eop	D	Xd	D	Eop	D	Xp	D	Eop	D
Consistence (%)		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Temperature (°C)		60	90	85	85	60	90	85	85	60	90	85	85
Time (minutes)		90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
Xylanase (U/g)						100				100			
Kappa factor			0.22										
Cl ₂ O (kg/ton)			9.8		8		7.3		8		7.5		8
H ₂ O ₂ (kg/ton)				4				4				4	
NaOH (kg/ton)				8	2.5			8	2.5			8	2.5
H ₂ SO ₄ (kg/ton)		6.5	2			6.5	2			6.5	2		
Final step pH		5.71	2.47	9.95	4.52	5.65	2.5	9.89	4.46	5.57	2.46	9.91	4.46
Results													
Kappa number	12.15	11.72		2.8	0.56	8.77		2.5	0.28	9.02		2.4	0.37
Brightness (% ISO)	46.86	49.86	66.89	81.31	90.23	52.83	69.8	83.13	91.87	53.85	69.96	83.77	92.25
Viscosity (dm ³ /kg)	990				666.5				639.5				661

The X_d pulp treatment changed the kappa number to 8.77, which is correlated to the effect on brightness, where brightness of the treated pulp increased from 46.86% ISO in oxygen bleached pulp to 52.83% ISO. A slight difference was observed for the X_p treatment where the kappa number was 9.02 but brightness (53.85%) was greater than that obtained for the X_d treatment. This higher brightness after the X_p treatment, despite the higher kappa number, may be explained by correlation of the kappa number with the Klason lignin percentage, while brightness is correlated with the chromophore characteristics of residual lignin and hemicelluloses (DE ARAÚJO et al., 1999) The reason why X_d and X_p had different effects on pulp could not be established in this work, but some differences in enzyme content of the dialyzed extract, such as 0,002 FPU and 0,12 U/ mL of β -glucosidase were observed.

The bleaching sequences continue with chlorine oxidation (D_{HT}) as the next step, which reduces the kappa number more than the common D treatment (VENTORIM, et al., 2009). To calculate the amount of chlorine dioxide, the kappa factor of 0.22 was chosen. Thus different chlorine dioxide amounts (9.8, 7.5 and 7.3 kg/ton), were used in each of the sequence SC, X_p , and X_d , according to the kappa number observed after xylanase treatment. The next two steps were equal in all sequences to reach the brightness threshold of 90% ISO.

We estimated xylan content based on pentosan percent (PALMEIRAS et al., 2010). The O pulp initially has 16.49% xylan. After the control sequence, the xylan content was 15.01%; the xylanase treatment decrease the xylan content to 13% for the sequence with X_d and to 11.54% for the sequence with X_p . After the bleaching sequence, viscosity did not differ between sequences submitted to the X_c (666.5 dm^3/kg) and X_p (661 dm^3/kg) treatments, but X_d (639.5 dm^3/kg) showed a small

reduction, probably due to residual cellulase activity in the dialyzed extract. All treatments achieved brightness exceeding 90% ISO, however the sequences involving X_d (91.87%) and X_p (92.25%), showed higher brightness than the control treatment (90.23%). The pulps treated with xylanase achieved a high brightness despite the use of 14% less chlorine dioxide compared to the control. Compatible reductions of chlorine compounds are found in literature, as reported by (BAJPAI et al., 2006; VIIKARI et al. 2009).

4 Conclusions

In this study xylanase production from *T. deliquescens* was optimized, rating 784 U/mL. An enzyme with high specific activity was purified and suggested to be part of GH11 xylanase family. The process parameters was indicated by optimum pH and temperature, 5.5 and 60-65 °C, respectively, and a half-life of 66 minutes at 50 °C.

This xylanase has potential to be used in bleach sequence because reduces the total xylan amount in kraft pulp and allowed for a 14% reduction in the quantity of chlorine dioxide used bleaching sequence and also achieved high brightness.

5 Acknowledge

We are grateful to the Núcleo de Análise de Biomoléculas of the Universidade Federal de Viçosa for providing the facilities to conduct the experiments. The authors also acknowledge the financial support by the following Brazilian agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conclusão Geral

Neste estudo foi possível identificar diferentes fontes de carbono nas quais o fungo *Trichoderma deliquescens* produziu celulasas e hemicelulasas, com destaque para a palha de milho, substrato no qual o fungo produziu níveis satisfatório das enzimas desejadas. Esta fonte de carbono foi então utilizada nos experimentos de otimização da produção das enzimas e foi possível ajustar um modelo que otimizou a produção de xilanase pelo *T. deliquescens*, contudo não foi possível ajustar um modelo para otimizar a produção de celulasas.

O extrato do fungo *T. deliquescens* não apresentou melhora da conversão de glicana quando comparado ao extrato enzimático Multifect® CL na sacarificação do bagaço de cana, mas apresentou uma conversão muito superior de xilana em xilose, o que limitou seu potencial para utilização como insumo para produção do bioetanol, contudo seu potencial de hidrólise da xilana nos sugeriu sua utilização em outros processos como o branqueamento da polpa KRAFT.

No processo de branqueamento da polpa KRAFT a xilanase foi primeiramente purificada para evitar que celulasas agissem durante o processo. A caracterização da xilanase purificada indicou os parâmetros para sua utilização e foi observada a redução dos agentes químicos alvejantes em 14% além de alvura superior, o que demonstrou o potencial para utilização da xilanase produzida pelo *T. deliquescens* no processo de biobranqueamento da polpa.

Bibliografia

ADAV, S. S.; RAVINDRAN, A.; SZE, S. K. Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* on different lignocellulosic biomass. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 5, p. 1493–1504, 2012.

AGUILAR, R. et al. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v. 55, n. 4, p. 309–318, 2002.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, p. 4, 2010.

BAJPAI, P. et al. Enzymes improve ecf bleaching of pulp. **Bioresources**, v. 1, n. Pryke 1997, p. 34–44, 2006.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, 34: 551-573, 2008.

BARRY, V. C.; DILLON, T. Occurrence of Xylans in Marine Algæ. **Nature**, v. 146, n. 3706, p. 620–620, 1940.

BEG, Q. K. et al. Microbial xylanases and their industrial applications: A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326–338, 2001.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual review of plant biology**, v. 54, p. 519–546, 2003.

BRADFORD, M.M., Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein–dye binding. **Anal. Biochem.**, 72, pp. 248–254, 1976.

BURKERT, J. F. M. et al. Parameters optimization for enzymatic assays using experimental design. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 2, p. 163–170, jun, 2006.

BUTT, M. S. et al. Xylanases and their applications in baking industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 22–31, 2008.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: An update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 438–443, 2003.

CHO, K. H.; JUNG, K. H.; PACK, M. Y. Xylanase encoded by genetically engineered *Clostridium thermocellum* gene in *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 2, p. 157–160, 1995.

CHRISTOV, L. P.; SZAKACS, G.; BALAKRISHNAN, H. Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching. **Process**

Biochemistry, v. 34, n. 5, p. 511–517, 1999.

DE ALMEIDA, M. N. et al. Cellulases and hemicellulases from endophytic acromonium species and its application on sugarcane bagasse hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 2, p. 594–610, 2011.

DE ALMEIDA, M. N. et al. Optimization of endoglucanase and xylanase activities from *Fusarium verticillioides* for simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 3, p. 1332–1346, 2014.

DE ARAÚJO, J. H.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Bleaching of kraft pulp with commercial xylanases. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 77-79, p. 713–722, 1999.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 497–522, 2001.

DEKKER, R. F. H.; RICHARDS, G. N. Hemicellulases: Their Occurrence, Purification, Properties, and Mode of Action. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 32, n. C, p. 277–352, 1976.

DUCHESNE, L. C.; LARSON, D. W. Cellulose and the Evolution of Plant Life. **BioScience**, v. 39, n. 4, p. 238–241, 1 abr. 1989.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste celluloses to fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 1, p. 1–33, jan, 1996.

FAIK, A. Xylan biosynthesis: news from the grass. **Plant physiology**, v. 153, n. 2, p. 396–402, 2010.

FALKOSKI, D. L. et al. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 6, p. 1586–1603, 2012.

FALKOSKI, D. L. et al. *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 296–305, 2013.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; OTONI, W. C.; JOSHI, C. P. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plantsBrazilian. **Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 1, p. 1-132007.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in**

Chemical Biology, 10: 141–146, 2006.

HAMMEL, K. Fungal degradation of lignin. **Driven by nature: plant litter quality and decomposition.**, p. 33–45, 1997.

HARBAK, L.; THYGESEN, H. V. Safety evaluation of a xylanase expressed in *Bacillus subtilis*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 1–8, 2002.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 100, 10-18, 2009.

HERPOËL-GIMBERT, I. et al. Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. **Biotechnology for biofuels**, v. 1, n. 1, p. 18, 2008.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 36, 2011.

JAKLITSCH, W. M. European species of *Hypocrea* part II: Species with hyaline ascospores. **Fungal Diversity**, v. 48, p. 1–250, 2011.

JUHÁSZ, T. et al. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 3519–3525, 2005.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 64 (2) p. 137-145 2004.

KARBOUNE, S.; GERAERT, P. A.; KERMASHA, S. Characterization of selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *penicillium funiculosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry. Anais**, 2008

KOCABAŞ D. S., GÜDER, NESLIHAN ÖZBEN, N. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Volume 115, Pages 66-75, 2015

KOSUGI, A.; MURASHIMA, K.; DOI, R. H. Xylanase and acetyl xylan esterase activities of XynA, a key subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome for xylan degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6399–6402, 2002.

KUHAD, R. C. et al. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 15, 4950-4962, 2011.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial

- applications. **Enzyme research**, v. 2011, p. 280696, 2011
- KUMAR, D.; MURTHY, G. S. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 63, 2013.
- KUMAR, P. et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, 15 abr. 2009.
- LAUREANO-PEREZ, L. et al. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and ...**, v. 124, n. 1-3, p. 1081–1099, 2005.
- LEAL, T.F., et al. Optimization of xylanase production from *Gliocladium viride* J-7 in submerged fermentation culture using corn stover as a carbon source. **In: Proceedings of XIX Bioprocess National Symposium**, Foz do Iguaçu, PR, Brazil. 2013.
- LEE, Y. Y.; DALE, B. E. Biomass pretreatment and hydrolysis. **Applied biochemistry and biotechnology**, 113-116, 935-936, 2004.
- LEVASSEUR, A. et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 41, 2013.
- LI Y., et al. High-level expression and characterization of a thermostable xylanase mutant from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, 108, 90-96, 2015
- LIU, J.-Z. et al. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* in a benchtop bioreactor using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 317–323, 2003.
- LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 490–495, 2014.
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 64, n. 3, p. 461–488, 2000.
- MALATHI, V.; DEVEGOWDA, G. In vitro evaluation of nonstarch polysaccharide digestibility of feed ingredients by enzymes. **Poultry science**, v. 80, n. 3, p. 302–305, 2001.
- MARTINEZ, D. et al. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 695–700, 2004.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.

Analytical Chemistry, 31:426-428, 1959.

MITRA, S. et al. Cellulase and xylanase activity in relation to biofilm formation by two intertidal filamentous fungi in a novel polymethylmethacrylate conico-cylindrical flask. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 9, p. 1087–1101, 2011.

NAGY, T. et al. The membrane-bound β -glucuronidase from *Pseudomonas cellulosa* hydrolyzes 4-O-methyl-D-glucuronoxyloligosaccharides but not 4-O-methyl-D-glucuronoxylan. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 17, p. 4925–4929, 2002.

NANDA, P. et al. Studies on Production, Optimization and Purification of Uricase from *Gliocladium viride*. **Research in Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 35–46, 2012.

OCTAVE, S.; THOMAS, D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. **Biochimie**, v. 91, n. 6, p. 659–664, 2009.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for biofuels**, v. 1, n. 1, p. 7, 2008.

PAËS, G.; BERRIN, J. G.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 564–592, 2012.

PAICE, M.G., BERNIER JR, R., JURASEK, L. Viscosity enhancing bleaching of hardwood kraft pulp with xylanase from a cloned gene. **Biotechnology and Bioengineering**, 32, pp. 235–239, 1988.

PALMEIRAS, L. P. S. et al. Análise comparativa entre vários métodos de quantificação da hemicelulose da madeira de eucalipto. **Quim. Nova**, 7, 1569-1571, 2009.

PATEL, R.N., GRABSKI, A.C., JEFFRIES, T.W. Chromophore release from kraft pulp by purified *Streptomyces roseiscleroticus* xylanases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 39, pp. 405–412, 1993.

POTTERS, G.; VAN GOETHEM, D.; SCHUTTE, F. Promising Biofuel Resources: Lignocellulose and Algae. **Nature Education** 3(9):14, 2010.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185–194, 2009.

SCHUBERT, C. Can biofuels finally take center stage? **Nature biotechnology**, v.

24, n. 7, p. 777–784, 2006.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219–228, 2003.

SILVA, A. J. DA et al. Blue native-PAGE analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multienzymatic complexes. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2729–2738, 2012.

SILVA, F. V. Panorama e perspectivas do etanol lignocelulósico. **Revista Liberato**, v. 13, n. 20, p. 43 – 58, 2012.

SUBRAMANIYAN S. Isolation, Purification and Characterisation of Low Molecular Weight Xylanase from *Bacillus pumilus* SSP-34. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 166, 1831–1842, 2012.

SINGHANIA, R. R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 46 (7) p. 541-549 2010.

SOARES, T. S. et al. Uso Da Biomassa Florestal Na Geração. **REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE ENGENHARIA FLORESTAL - ISSN 1678-3867**, v. 8, n. Iv, 2006.

SODEN et al. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. **Microbiology** 148, 4003-4014, 2002.

STOEGLEHNER, G.; NARODOSLAWSKY, M. How sustainable are biofuels? Answers and further questions arising from an ecological footprint perspective. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 16, p. 3825–3830, 2009.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical reviews in biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33–64, 2002.

SUHAS; CARROTT, P. J. M.; RIBEIRO CARROTT, M. M. L. Lignin - from natural adsorbent to activated carbon: A review. **Bioresource Technology**, 98(12):2301-12, 2007.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002a.

TAPPI. Technical Association of the Pulp and Paper Industry. **Tappi Standard Methods** (T-222 om-98). Atlanta, 1999.

TEN HAVE, R.; TEUNISSEN, P. J. M. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 11, p. 3397–3413, 2001.

TIJMENSEN, M. J. A. et al. Exploration of the possibilities for production of Fischer Tropsch liquids and power via biomass gasification. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, n. 2, p. 129–152, 2002.

UNEP-DTIE. United Nations Environmental Programmes. Cleaner production – Related Concepts. Paris: UNEP. 2001.

VASQUEZ, M. P. et al. Enzymatic Hydrolysis Optimization to Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, n. 2, p. 141–153, 2007.

VIKARI, L.; PAUNA, M.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. Bleaching with enzymes. In: **Proceedings of the Third International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry**, Stockholm, pp. 67-69, 1986.

VIKARI, L., et al. Forest products: biotechnology in pulp and paper processing. In: Schaechter, M. (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology*, 3rd ed. Academic Press, pp. 80–94. 2009.

VENTORIM, G., COLODETTE, J. L., EIRAS, K. M. M., The fate of chlorine species during high-temperature chlorine dioxide bleaching. **O Papel**, 70, 39-50. 2009.

VISSER, E. M. et al. Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 587–594, 2013.

VISSER, E. M. et al. Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse from enzyme recycling. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2015.

VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. Phytases: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, 29 set. 2008.

YEOH, H. H.; TAN, T. K.; TIAN, K. E. Cellulolytic enzymes of fungi isolated from wood materials. **Mycopathologia**, v. 87, n. 1-2, p. 51–55, 1984.

ZHANG, F., et al. Cloning, expression, and characterization of an alkaline thermostable GH11 xylanase from *Thermobifida halotolerans* YIM 90462^T. **J Ind Microbiol Biotechnol** 39:1109–1116, 2012.