UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

MAIARA PAPARELE DOS SANTOS

Produção e caracterização da xilanase de *Bacillus pumilus* e potencial uso na extração de xilana do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

Lorena - SP

2017

MAIARA PAPARELE DOS SANTOS

Produção e caracterização da xilanase de *Bacillus pumilus* e potencial uso na extração de xilana do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

Tese de Doutorado apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriane Maria Ferreira Milagres

Versão Corrigida

Lorena - SP

Dezembro, 2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos, Maiara Paparele dos

Produção e caracterização da xilanase de *Bacillus pumilus* e potencial uso na extração de xilana do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado / Maiara Paparele dos Santos; orientadora Adriane Maria Ferreira Milagres - Versão Corrigida. - Lorena, 2017.
123 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2017
Orientadora: Adriane Maria Ferreira Milagres

1. Bactéria. 2. Xilana. 3. Xilanase. 4. Sacarificação. 5. Bagaço de cana-de-açúcar. I. Título. II. Milagres, Adriane Maria Ferreira, orient.

*Dedico a memória do meu filho Martín,
que me ensinou a viver um dia de cada vez;
A minha família, Ana, Odair e Tamires,
pelo carinho, apoio e incentivo;
Ao meu companheiro, Felipe,
pelo amor, calma e paciência.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força ao longo dos anos, por me fazer suportar situações que julgava não ser capaz.

A Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, pela oportunidade da realização do Doutorado.

A minha orientadora, Adriane, pela orientação, compreensão e paciência.

Aos colegas de laboratório ao longo dos anos, pela amizade e contribuição para o meu trabalho: Germano, Luciane, Fernanda, Paula, Celso, Daniele, Mariana, Bárbara, Vitor, Bianca, Juliana Vieira, Verônica, Juliana Pavan e Patrícia.

Aos amigos e colegas do Departamento de Biotecnologia, em especial aos do Laboratório de Química da Madeira e do Laboratório de Biocatalise e Bioprodutos.

Aos técnicos Zé Cobrinha e Zé Moreira, pela ajuda sempre que necessária.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biotecnologia, que contribuíram para a minha formação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos e familiares.

Aos funcionários do hospital Antoninho da Rocha Marmo, pelo acolhimento nos momentos difíceis, em especial as técnicas de enfermagem da UTI neonatal que cuidaram do meu Martín.

Muito obrigada!

Um dia é preciso parar de sonhar e, de algum modo, partir.

Amyr Klink

RESUMO

SANTOS, M. P. **Produção e caracterização da xilanase de *Bacillus pumilus* e potencial uso na extração de xilana do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.** 2017. 123p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização da xilanase presente no extrato bruto de *Bacillus pumilus*, com a finalidade de usá-la na extração de xilana do bagaço de cana-de-açúcar. Foram testados dois meios de cultura em pHs 8,5 e 9,5 com diferentes substratos. As maiores atividades de xilanase foram produzidas em xilana comercial de *oat spelts* (228 U/mL) e em farelo de trigo (220 U/mL), no pH 8,5. Independentemente das condições de cultivo empregada, não foi detectada atividades de β -xilosidase, β -glicosidase e arabinofuranosidase e a produção de endoglucanase foi baixa (< 0,7 U/mL). O perfil de proteínas em eletroforese foi amplo, e a banda com 23 kDa correspondeu a uma xilanase. A xilanase apresentou pH ótimo na faixa de 7-8, temperatura ótima entre 45-50 °C e se apresentou mais estável a 40 °C (pH8,0). A hidrólise de xilanas comerciais produziu xilotriose, xilotetraose, xilopentaose e xilo-oligossacarídeos (XOS) com massas maiores, que não foram identificados por cromatografia em camada fina (TLC). A influência de vários fatores, tais como a carga de xilanase, tipo de substrato, temperatura e a adição de vários compostos foi avaliada no rendimento de extração de xilanas desde o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. O extrato bruto de *B. pumilus*, rico em xilanas, foi aplicado em um bagaço pré-tratado com sulfito/álcali, e em um bagaço deslignificado por clorito em meio ácido, evidenciando que a menor quantidade de lignina residual como principal fator para aumentar a extração de xilana, aumentando a extração de 4,2 para 42,5%. A lavagem extensiva do material pré-tratado com sulfito alcalino também auxiliou no aumento do rendimento de xilana, de 18,5 para 25,1 %. Foram testadas outras alternativas para aumentar o rendimento de hidrólise da xilana do bagaço pré-tratado, sem a necessidade da lavagem do material. A reutilização do licor sulfito alcalino, a adição de tween 80, polietileno glicol, albumina não favoreceram a extração de xilanas, enquanto que a adição de MgSO_4 teve um pequeno efeito positivo na extração da xilana (de 18% para 20,9 %). A extração alcalina a frio, realizada após a extração enzimática, influenciou positivamente o rendimento de extração da xilana do bagaço pré-tratado com 10% Na_2SO_3 /5%NaOH. A extração de xilana obtido pela aplicação de xilanase (20 U/g) seguida da extração com 20% de NaOH produziu o mesmo resultado que utilizando apenas NaOH (70%), de 24,1 e 24,9 %, respectivamente. A extração enzimática da xilana permitiu a obtenção de um resíduo com características favoráveis para a completa sacarificação, com Cellic CTec2 na carga de 10 FPU/g de material.

Palavras-chave: bactéria, xilana, xilanase, sacarificação, bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

SANTOS, M. P. **Production and characterization of *Bacillus pumilus* xylanase and potential use in the extraction of xylan from pre-treated sugarcane bagasse.** 2017. 123p. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

The present work aimed to characterize the xylanase present in the crude extract of *Bacillus pumilus*, with the purpose of using it in the xylan extraction of the sugarcane bagasse. Two culture media were tested at pHs 8.5 and 9.5 with different substrates. The highest xylanase activities were produced in commercial xylan oat spelled (228 U / mL) and wheat bran (220 U / mL) at pH 8.5. Regardless of the culture conditions employed, β -xylosidase, β -glycosidase and arabinofuranosidase activities were not detected and endoglucanase production was low (<0.7 U/mL). The protein profile on electrophoresis was extensive, and the 23 kDa band corresponded to a xylanase. The xylanase presented optimum pH in the range of 7-8, optimal temperature between 45-50°C and was more stable at 40 °C (pH8.0). Hydrolysis of commercial xylenes produced xylotriose, xylotetraose, xylopentaose and xylooligosaccharides (XOS) with larger masses, which were not identified by thin layer chromatography (TLC). The influence of various factors, such as xylanase loading, substrate type, temperature and the addition of various compounds was evaluated in the xylan extraction yield from the pretreated sugarcane bagasse. The crude extract of *B. pumilus*, rich in xylanases, was applied to a bagasse pretreated with sulfite/alkali, and to a bagasse delignified by chlorite in acid medium, showing that the lower amount of residual lignin as the main factor to increase the extracting xylan, increasing the extraction from 4.2 to 42.5%. Extensive washing of the alkaline sulfite pretreated material also assisted in increasing xylan yield, from 18.5 to 25.1%. Further alternatives were tested to increase the hydrolysis yield of pretreated bagasse xylan without the need for material washing. The reuse of the alkali sulfite liquor, the addition of tween 80, polyethylene glycol, albumin did not favor xylan extraction, while addition of MgSO_4 had a small positive effect on xylan extraction (from 18% to 20.9%). The cold alkaline extraction, after enzymatic extraction, positively influenced the xylan extraction yield of the pretreated bagasse with 10% Na_2SO_3 /5% NaOH. Extraction of xylan obtained by applying xylanase (20 U / g) followed by extraction with 20% NaOH produced the same result as using only NaOH (70%), 24.1 and 24.9%, respectively. The enzymatic extraction of xylan allowed to obtain a residue with favorable characteristics for the complete saccharification, with Cellic CTec2 in the load of 10 FPU / g of material.

Keywords: bacterium, xylan, xylanase, saccharification, sugarcane bagasse.

LISTA DE ABREVIATURAS

AraX3	arabinoxilotriose
AraX3	arabinoxilotetraose
BC	Bagaço de cana-de-açúcar
BD	Bagaço deslignificado
BPT	Bagaço pré-tratado com sulfito alcalino
BSA	Albumina sérica bovina
Cazy	Enzimas ativas em carboidratos
CCE	<i>Cold Caustic Extraction</i> - Extração alcalina a frio
DNS	Ácido dinitrossalicílico
FT	Farelo de trigo
GH	Glicosil hidrolase
Rf	Fator de retenção
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
pNP	p-nitrofenol
pNPA	4-nitrofenil- β -D-arabinofuranosídeo
pNPG	4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo
pNPX	4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo
QTM	Quimiotermomecânico
TLC	Cromatografia em camada fina
X1	Xilose
X2	Xilobiose
X3	Xilotriose
X4	Xilotetraose
X5	Xilopentose
X6	Xilohexose
XBp	Xilanase de <i>Bacillus pumilus</i>
Xil/Ara	Xilose/Arabinose
XTm	Xilanase de <i>Thermotoga maritima</i>
XOS	Xilo-oligossacarídeos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Modelo de organização da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular das plantas.	27
Figura 2- Estrutura da celulose. A) Estrutura linear da cadeia de celulose. B) Ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose. C) Supraestrutura da molécula de celulose, mostrando as regiões altamente organizadas ou cristalinas, e as menos organizadas ou amorfas.....	28
Figura 3- Estrutura da hemicelulose do bagaço de cana- de- açúcar.....	30
Figura 4- Precursores (A) estruturas encontradas na molécula de lignina do bagaço (B). Os alcois p-coumarílico, coniferílico, sinapílico dão origem respectivamente as unidades H, G e S.	31
Figura 5- Hidrólise de uma arabinoglucuronoxilana a monômeros, bem como a atuação das enzimas do complexo hemicelulósico.	33
Figura 6- Modo de ação das xilanases GH 10 e GH 11 em uma glucuronoxilana.	34
Figura 7- Esquema da hidrólise de xilana de <i>oat spelts</i> utilizando extrato enzimático de <i>B. pumilus</i>	53
Figura 8- Atividade xilanase de <i>Bacillus pumilus</i> em diferentes substratos presentes no meio 1(A) (MANDELS; STENBERG, 1976) e meio 2 (B) (NAGAR et al., 2012), em pH 8,5 e pH 9,5 após 24 h de incubação a 45 °C.....	65
Figura 9- Concentração de proteínas nos sobrenadantes do cultivo de <i>B. pumilus</i> no meio 1 (MANDELS; STENBERG, 1976) (A) e no meio 2 (NAGAR et al., 2010) (B) em pH 8,5 e em pH 9,5 após 24 h de incubação a 45 °C.....	67
Figura 10- Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) dos sobrenadantes de cultivo de <i>B. pumilus</i> em diferentes substratos, utilizando o meio 1, no pH 8,5 e no pH 9,5 (MANDELS; STENBERG, 1976). Padrões (P), substratos: Xilana (1 e 6), bagaço (2 e 7), bagaço deslignificado (3 e 8), farelo de trigo (4 e 9) e glicose (5). Gel corado com nitrato de prata.	69
Figura 11- Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) dos sobrenadantes de cultivo de <i>B. pumilus</i> em diferentes substratos, utilizando o meio 2 no pH 8,5 e no pH 9,5 (NAGAR et al., 2012). Padrões (P), substratos: Xilana (1 e 8), bagaço (2 e 9), bagaço deslignificado (3 e 10), farelo de trigo (4 e 11), bagaço pré-tratado e lavado (5 e 12), xilo-oligômeros (6 e 13) e glicose (7 e 14). Gel corado com nitrato de prata.	69

Figura 12- Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) dos sobrenadantes de cultivo de *B. pumilus* em diferentes substratos, utilizando o meio 1 (MANDELS; STENBERG, 1976) (1 e 3) e o meio 2 (NAGAR et al., 2012) (2 e 4), cultivados com os substratos: xilana (1 e 2) e farelo de trigo (3 e 4). Foi utilizado um marcador de massa molar como padrão (P). Gel revelado com vermelho congo (Zimograma) (A) e corado com nitrato de prata (B). A banda transparente no zimograma corresponde a xilanase. No gel corado com nitrato de prata a banda mais intensa com massa molar 23 kDa, deve corresponder a xilanase.71

Figura 13- Determinação da temperatura (A) e pH (B) ótimos da xilanase de *B. pumilus* no cultivo em meio 1 com farelo de trigo (pH8,5). Para a determinação do pH ótimo a temperatura utilizada foi de 50°C (23) e para a determinação da temperatura ótima o pH utilizado foi 8.73

Figura 14- Estabilidade em temperatura (A) e pH (B) da xilanase de *B. pumilus* cultivada em farelo de trigo (pH8,5). Para a determinação do pH ótimo a temperatura utilizada foi de 50°C (23) e para a determinação da temperatura ótima o pH utilizado foi 8.74

Figura 15- Cinética de liberação de açúcares redutores (DNS) a partir das xilanas comerciais de *birchwood*, *beechwood* e de *oat spelts* e com o extrato enzimático de *B. pumilus*, em tempos curtos (A) e longos (B).76

Figura 16- Cromatografia em camada fina (TLC) dos produtos da cinética de hidrólise enzimática de xilana de *beechwood* e da xilana de *oat spelts* com o extrato de *B. pumilus*. C- controle da reação sem enzima; A- açúcares liberados na reação enzimática. Foi aplicada uma amostra com a mistura de padrões: xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4).78

Figura 17- Perfil cromatográfico da xilana *oat spelts* 1% preparada em tampão pH 8 e do sobrenadante, obtido após a hidrólise da xilana com a xilanase de *B. pumilus*, pH 8, 50 °C e 96 h em Bio-Gel P30.79

Figura 18- Cromatografia em camada fina (TLC) dos produtos de hidrólise da xilana de *oat spelts* com a xilanase de *B. pumilus* (XBp), pela xilanase comercial de *Thermotoga maritima* (XTm) e controle da reação (sem enzima). Foi aplicada uma amostra com a mistura de padrões: xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4) e xilopentaose (X5).80

Figura 19- Cromatografia em camada fina (TLC) dos produtos da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM) com 10%Na₂SO₃/5% NaOH com a xilanase de *B. pumilus* produzida em diferentes substratos, preparados no meio 2 (NAGAR et al., 2010) C- controle da reação sem enzima; xilana de *oat spelts* (X), farelo de trigo (FT), bagaço deslignificado (BD) e bagaço de cana- de- açúcar (B) nas cargas de 5 e 20 U/g bagaço. Foi aplicada uma mistura de padrões: xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4).86

Figura 20- Correlação entre a extração da xilana e a lignina removida após pré-tratamento.	90
Figura 21- Cromatografia em camada fina (TLC) dos produtos da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiatermomecanicamente (QTM) com Na ₂ SO ₃ /NaOH ou com clorito ácido (2 e 4 h) com xilanase de <i>B. pumilus</i> . C- controle da reação sem enzima; e com 5 UI/g, 10 UI/g e 20 UI/g de xilanase. Foi aplicada uma mistura de padrões: xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4).	91
Figura 22- Rendimento de extração de xilana do bagaço pré-tratado quimiatermomecanicamente (QTM) a 10% Na ₂ SO ₃ /5% NaOH pelas xilanases de <i>B. pumilus</i> (20 U/g de bagaço), em diferentes temperaturas.	92
Figura 23- TLC Cromatografia em camada fina (TLC) dos produtos da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiatermomecanicamente (QTM) com 10%Na ₂ SO ₃ /5% NaOH incubadas em diferentes temperaturas de reação (A) e dos produtos da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado QTM com 10%Na ₂ SO ₃ /5% NaOH pouco lavado e lavado exaustivamente.(B) Ambas as reações utilizaram a xilanase de <i>B. pumilus</i> (20 U/g) C- controle da reação sem enzima A- amostras Foi aplicada uma mistura de padrões: xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4).	93
Figura 24- Rendimento de extração de xilana dos bagaços pré-tratados quimiatermomecanicamente (QTM) a 10% Na ₂ SO ₃ /5%NaOH (pouco lavado e lavado exaustivamente) pelas xilanases de <i>B. pumilus</i> (20 U/g de bagaço).	94
Figura 25- Estabilidade da xilanase de <i>B. pumilus</i> na presença de diferentes concentrações de licor sulfito alcalino, recuperado do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiatermomecanicamente (QTM) com 10%Na ₂ SO ₃ /5% NaOH, pouco lavado.	96
Figura 26- Rendimento de extração de xilana do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiatermomecanicamente (QTM) com 10%Na ₂ SO ₃ /5% NaOH, com xilanase de <i>B. pumilus</i> (20U/g) e na presença de licor sulfito alcalino (5g/L).	97
Figura 27- Açúcares redutores produzidos pela hidrólise de xilana de <i>oat spelts</i> com a xilanase de <i>B. pumilus</i> (20 U/g) na presença dos compostos de xilana. MgSO ₄ e KCl (1mmol/g xilana); Tween 80 e PEG (4000 Da) (15 mg/g xilana), albumina bovina (10 mg/g xilana).	99
Figura 28- Efeito de vários compostos no rendimento de extração de xilana do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiatermomecanicamente (QTM) com 10%Na ₂ SO ₃ /5% NaOH. A extração foi feita com xilanase de <i>B. pumilus</i> (20 U/g) na presença de: MgSO ₄ e KCl (1mmol/g xilana); Tween 80 e PEG (4000 Da) (15 mg/g xilana), albumina bovina (BSA) (10 mg/g xilana).	100
Figura 29- Efeito da concentração de NaOH sobre a extração alcalina a frio (CCE) no bagaço pré-tratado quimiatermomecanicamente (QTM) com 10%Na ₂ SO ₃ /5% NaOH e a combinação de extração enzimática e subsequente extração alcalina com xilanase de <i>B. pumilus</i> (20U/g).	101

Figura 30- Perfil de distribuição em massas molares das xilanas obtidas pela hidrólise enzimática (A e D), combinação de hidrólise enzimática e subsequente extração alcalina a frio (B e E), e extração alcalina a frio (C e F). As xilanas obtidas foram analisadas por cromatografia de exclusão molécula em Bio-Gel P30 (A, B e C) e Bio-Gel P2 (D, E e F).103

Figura 31- Concentração de glicose no hidrolisado, expressa como glicose (A) e conversão de glucana (B) do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM) (linha tracejada) e após a extração de xilana pela combinação de xilanase e NaOH (linhas continuas).107

Figura 32- Concentração de xilose no hidrolisado, expressa como xilana (A) e conversão de xilose (B) do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM) (linha tracejada) e após a extração de xilana pela combinação de xilanase e NaOH (linhas continuas).108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Indutores utilizados para a produção de xilanase por <i>B. pumilus</i> e suas concentrações de acordo com o meio utilizado.	45
Tabela 2- Reagentes utilizados na preparação dos géis.	48
Tabela 3- Determinação do pH dos cultivos de <i>B. pumilus</i> em diferentes substratos presentes no meio 1 (MANDELS; STENBERG, 1976) e meio 2 (NAGAR et al., 2012).	66
Tabela 4- Composição açúcar total da fração líquida (por pós hidrólise) após a hidrólise de xilana de oat spelts, em tempos longos.	77
Tabela 5- Composição das frações da xilana de oat spelts hidrolisadas pelo extrato enzimático de <i>B. pumilus</i> (XBp) e por xilanase comercial de Thermotoga maritima (GH10) (XTm).	81
Tabela 6- Caracterização química dos bagaços in natura e dos bagaços pré-tratados.	83
Tabela 7- Rendimento da extração enzimática da xilana do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM) com 10%Na ₂ SO ₃ /5% NaOH com a xilanase de <i>B. pumilus</i> produzida em diferentes substratos no meio 2 (NAGAR et al., 2010).	85
Tabela 8- Rendimento da extração enzimática da xilana do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM), obtido após 24h de reação com a xilanase de <i>B. pumilus</i> produzida em farelo de trigo no meio 1, a 5% de consistência.	87
Tabela 9- Rendimento da extração enzimática da xilana do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com clorito em meio ácido, obtido após 24h de reação com a xilanase de <i>B. pumilus</i> produzida em farelo de trigo no meio 1 (MANDELS &STENBERG, 1976), a 5% de consistência.	89
Tabela 10- Composição química dos bagaços de cana-de-açúcar obtidas após diferentes etapas de tratamento.	105

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 Componentes do bagaço de cana-de-açúcar	27
2.1.1 Celulose	27
2.1.2 Hemicelulose	29
2.1.3 Lignina	30
2.2 Pré-tratamento sulfito alcalino do bagaço da cana-de-açúcar	31
2.3 Degradação enzimática das hemiceluloses	32
2.4 Extração das hemiceluloses	35
2.4.1 Métodos químicos de extração das hemiceluloses	35
2.4.2 Métodos enzimáticos de extração das hemiceluloses	37
2.5 <i>Bacillus pumilus</i> e xilanases	39
2.6 Aproveitamento dos polissacarídeos do bagaço de cana-de-açúcar	41
3 OBJETIVOS	43
Objetivo geral	43
Objetivos específicos	43
4 MATERIAIS E METODOS	44
4.1 Micro-organismo e preparo do inóculo	44
4.2 Cultivo em diferentes substratos	44
4.3 Atividades enzimáticas	46
4.3.1 Xilanase	46
4.3.2 Endoglucanase	47
4.3.3 β -glicosidase, β -xilosidase e arabinofuranosidase	47
4.4 Proteínas	47
4.5 Eletroforese de proteínas em gel de acrilamida	48
4.6 Coloração do gel com nitrato de prata	49
4.7 Zimograma	49
4.8 Determinação do pH e da temperatura ótimos de ação das xilanases	50
4.9 Estabilidade das xilanases ao pH e à temperatura	51
4.10 Modo de ação do extrato enzimático de <i>Bacillus pumilus</i> em xilanas	51

4.10.1 Hidrólise enzimática de xilanas comerciais	51
4.10.2 Hidrólise enzimática das frações de xilana	52
4.11 Pré-tratamentos dos bagaços de cana-de-açúcar	53
4.12 Caracterização química dos substratos	54
4.13 Determinação de condições de extração enzimática da hemicelulose dos bagaços de cana pré-tratados	55
4.13.1 Avaliação dos extratos enzimáticos de <i>B. pumilus</i> na extração de hemicelulose de bagaços de cana pré-tratados.....	56
4.13.2 Avaliação da carga de xilanase do extrato enzimático <i>B. pumilus</i> na extração de xilana de bagaços de cana pré-tratados.....	56
4.13.4 Avaliação do tipo de lavagem do bagaço de cana-pré-tratado na extração enzimática de xilana.	57
4.14 Avaliação do efeito de vários compostos na xilanase de <i>B. pumilus</i>	57
4.15 Extração alcalina a frio.....	58
4.16 Métodos de análises das xilanas.....	58
4.16.1 Composição das xilanas extraídas dos bagaços pré-tratados	58
4.16.2 Análise de açúcares por cromatografia em camada fina (TLC).....	59
4.16.3 Determinação das massas molares das xilanas extraídas	59
4.16.4 Açúcares redutores.....	60
4.17 Rendimento de xilana extraída	60
4.18 Hidrólise enzimática da celulose residual dos bagaços de cana pré-tratados	61
 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	 62
5.1 Produção de xilanase por <i>Bacillus pumilus</i>.....	62
5.2 Caracterização da xilanase de <i>Bacillus pumilus</i>	72
5.2.1 Efeito da temperatura e do pH	72
5.2.2 Modo de ação do extrato enzimático de <i>Bacillus pumilus</i>	75
5.3 Extração enzimática da xilana do bagaço de cana-de-açúcar.....	81
5.3.1 Composição química dos bagaços pré-tratados	81
5.3.2 Influência do tipo de extrato enzimático e da carga de xilanase.....	84
5.3.3 Influência do tipo de pré-tratamento e da carga de xilanase.....	86
5.3.4 Influência da temperatura.....	91
5.3.5 Influência da lavagem do bagaço	93
5.3.6 Influência de outros compostos.....	95
5.3.7 Extração alcalina a frio	100

5.4 Sacarificação enzimática de bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados quimiotermomecanicamente (QTM).....	104
6 CONCLUSÕES	110
REFERÊNCIAS	111

1 INTRODUÇÃO

O Brasil atualmente é o maior produtor de cana-de-açúcar, com a safra de 2017/18 estimada em 647,6 milhões de toneladas (CONAB, 2016). Esta planta é originária do sul e sudeste asiático e foi introduzida no Brasil no período colonial, para a produção de açúcar no Brasil colônia. Atualmente, a cana-de-açúcar é utilizada na indústria sucroalcooleira, para a produção de etanol e açúcar. Para cada tonelada de cana-de-açúcar utilizada é gerado 125 kg de bagaço seco (NOGUEIRA et al., 2008). O bagaço é constituído de aproximadamente 45% de celulose, 26% de hemicelulose, 24% de lignina e 5% de extrativos e cinzas (MENDES et al, 2011), que se encontram intimamente associados. Parte do bagaço, pode ser utilizado para queima e obtenção de energia, no entanto, devido ao baixo poder calorífico, tanto a celulose como a hemicelulose poderiam ser utilizadas para gerar produtos de maior valor agregado (SPEIGH; 2011; XUE, et al., 2016). Atualmente, a celulose do bagaço de cana-de-açúcar é utilizada para a produção do etanol de segunda geração, porém, para o seu melhor aproveitamento é necessário a extração ou redistribuição da lignina e/ou hemicelulose.

Para a separação dos componentes do bagaço, bem como a sua melhor utilização, é necessário a realização de um pré-tratamento, onde parte da lignina é removida e o acesso aos polissacarídeos pelas enzimas é aumentado. Muitos são os desafios para separar tais componentes e tornar os polissacarídeos mais acessíveis à ação enzimática (MENDES et al., 2013). Visando avançar neste tema e proporcionar uma utilização mais eficiente dos polissacarídeos do bagaço, é necessário o estudo de uma etapa de extração enzimática de hemicelulose do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino.

A hemicelulose pode ser extraída de diversas formas, porém, é necessário saber o que se deseja como produto final. A extração química da hemicelulose de materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, em geral resulta em um alto rendimento de hemicelulose, dependendo da dosagem de reagente utilizado, porém, a xilana em geral pode vir contaminada com lignina. A extração da hemicelulose por xilanases se mostra promissora, principalmente para a obtenção de xilo-oligômeros (XOS) (CARVALHO et al., 2013; VÁZQUES et al., 2000). Fungos e bactérias podem ser utilizados como fontes de enzimas, porém, as bactérias apresentam a vantagem de produzi-las em tempos curtos. Além disso, as xilanases bacterianas atuam em pH neutro a alcalino, facilitando a extração da xilana desde o material lignocelulósico.

Bacillus pumilus é um microrganismo produtor de altas atividades de xilanases extracelulares, sem a produção associada de celulasas. Pelas características da xilanase de *B. pumilus*, anteriormente descritas (BATTAN et al., 2007; GEETHA; GUNASEKARAN, 2010; NAGAR et al., 2010; 2012; POORNA, 2011; POORNA; PREMA, 2007), esta enzima se mostra com potencial para a produção de xilo-oligossacarídeos (XOS) pela hidrólise de xilanas do bagaço de cana-de-açúcar.

O estudo das características físico-químicas e do modo de ação das xilanases é um dos grandes desafios da biotecnologia; uma vez que cada enzima age de modo distinto nos substratos, dependendo de sua composição e grau de ramificação. Conforme anteriormente mencionado, uma limitação ao potencial de extração da hemicelulose é a sua íntima associação com a lignina e baixa acessibilidade, mesmo no substrato que já foi pré-tratado. Com o objetivo de aproveitar a fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar, se propôs desenvolver estudos que avaliem condições que visem aumentar a hidrólise enzimática da hemicelulose com xilanases produzidas por *Bacillus pumilus*, bem como a obtenção de um resíduo rico em celulose que possa ser facilmente hidrolisado por celulasas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Componentes do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar apresenta como principais componentes a celulose, hemicelulose e lignina, que se encontram intimamente associados na parede celular das plantas (PANDEY et al., 2000) (figura 1). A hidrofobicidade da lignina e sua distribuição topoquímica na parede celular são alguns dos fatores que conferem resistência a planta a ataques microbianos, porém, dificulta o aproveitamento dos polissacarídeos. Atualmente, o desafio é o desenvolvimento de processos que permitam uma separação seletiva e utilização de todos os componentes da biomassa, através do rompimento das ligações covalentes e pontes de hidrogênio presentes inter e entre a celulose, hemicelulose e lignina (PENG et al., 2012).

Figura 1- Modelo de organização da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular das plantas.

Fonte: Adaptado de Wang et al.(2017).

2.1.1 Celulose

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza, sendo formada por unidades menores denominada celobiose, que são constituídas por duas moléculas de glicose

unidas por ligação glicosídica beta-1,4, ocorrendo a liberação de uma molécula de água (figura 2). A ligação glicosídica liga uma unidade de celobiose à outra, formando assim uma cadeia de celulose. O tamanho desta cadeia e o grau de polimerização estão relacionados ao número de anidroglicosés repetidas, geralmente entre 7000 e 15000 resíduos de glicose (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 2- Estrutura da celulose. A) Estrutura linear da cadeia de celulose. B) Ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose. C) Supraestrutura da molécula de celulose, mostrando as regiões altamente organizadas ou cristalinas, e as menos organizadas ou amorfas.

Fonte: Adaptado de Henriksson; Lennholm (2009).

Cada molécula de anidroglicose apresenta hidroxilas livres nos carbonos 2, 3 e 6 e estas formam ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares. As ligações intramoleculares são aquelas entre hidroxilas da mesma cadeia, conferindo a rigidez da cadeia; e as intermoleculares que são ligações entre hidroxilas de cadeias adjacentes, formando assim uma estrutura supramolecular. Esta estrutura contém regiões ordenadas

(cristalinas) e menos ordenadas (amorfas) (FENGEL; WEGENER, 1989; HENRIKSSON; LENNHOLM, 2009). As moléculas de celulose se agregam umas sobre as outras, formando microfibrilas, que originam as fibrilas (FENGEL; WEGENER, 1989).

2.1.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são o segundo polissacarídeo mais abundante da Terra (BIELY, 1985; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; PRADE, 1996), e são classificadas de acordo com os principais monossacarídeos presentes (MOREIRA; FERREIRA FILHO, 2016). As hemiceluloses são heterogêneas, constituídas por vários monossacarídeos, encontrando nesta cadeia pentoses, como D-xilose e L-arabinose; hexoses como D-galactose, D-glicose e D-manose; ácidos urônicos como 4-O-metilglucurônico e ácido galacturônico (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005); e dependendo da planta, podem apresentar grupos acetil (GÍRIO et al., 2010). Apresentam uma baixa massa molar e um grau de polimerização de 80-200 (ZU-SHAN; PASZNER, 1988). Estruturalmente, as hemiceluloses são divididas em quatro grupos: xilanas, mananas, xiloglucanas e beta-glucanas mistas. A composição da hemicelulose varia de acordo com a espécie vegetal, mas a grande maioria das hemiceluloses são compostas de xilana, sendo esta um terço de todo o carbono orgânico renovável da terra (BIELY, 1985; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; PRADE, 1996).

A xilana é constituída por D-xilopiranosose ligada por ligações glicosídicas beta-(1,4) nesta cadeia principal, com substituintes ligados como resíduos de ácido glucurônico, ácido 4-O-metilglucurônico, acetil e resíduos de arabinose (FENGEL; WEGENER, 1989; KULKARNI; SHENDYE; RAO, 2006; RENNIE; SCHELLER, 2014). A estrutura da xilana pode variar entre as diferentes espécies de plantas, e também em diferentes tecidos das plantas (EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000; RENNIE; SCHELLER, 2014). As xilanas são classificadas pela natureza e grau das ramificações em homoxilanas, glucuronoxilanas, arabinoxilanas, glucoarabinoxilanas e heteroxilanas (EBRINGEROVÁ, 2006).

Na cana-de-açúcar (figura 3), a hemicelulose é composta majoritariamente por arabinoxilana, acetilada ou arabinosilada na posição C2 e/ou C3, e a arabinose pode ser esterificada com ácidos fenólicos na posição C5. Ácido metil glucurônico se encontra em pequena proporção em relação aos outros constituintes (SILVA, 2016). O ácido ferúlico faz uma ligação éster-eter entre o carboidrato e a lignina, e o ácido cumárico se encontra em maior parte esterificado à lignina (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009). A

hemicelulose é associada aos demais componentes da parede celular, como a lignina, celulose e proteínas, por ligação covalente e hidrogenada e por interações iônicas e hidrofóbicas (PENG et al., 2012; SUN; FANG; TOMKINSON, 2000).

Figura 3- Estrutura da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar.

Fonte: Adaptado de Buckeridge e Souza (2014).

2.1.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula complexa, amorfa e hidrofóbica, tendo sua origem a partir do fenil propenol. A sua biossíntese ocorre a partir da polimerização desidrogenativa de unidades precursoras: álcool *p*-cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, e estas unidades precursoras dão origem às unidades aromáticas: *p*-hiroxifenila (H), guaiacila (G) e siringil (S) (figura 4) (FENGEL; WEGENER, 1989).

Os conteúdos destas unidades aromáticas variam de acordo com o tipo de planta, sendo que em angiospermas predomina os tipos guaiacila siringila (G-S), em gimnosperma guaiacil (G) e em gramíneas, guaiacil-siringila-*p*-hidroxifenila (G-S-H) (FENGEL; WEGENER, 1989; HIGUCHI, 2006). Este polímero confere resistência mecânica em plantas vasculares e também protege os polissacarídeos da parede celular contra a degradação microbiana, o que consequentemente limita a conversão dos polissacarídeos em monossacarídeos (FENGEL; WEGENER, 1989; VANHOLME et al., 2010). No bagaço de cana-de-açúcar, as estruturas com ligações β-*O*-4' representam 83% da molécula de lignina, onde também são encontradas estruturas com ligações β-*O*-4'γ-acilada, α-ceto-β-*O*-4'alquil aril eter e fenil coumaranos (DEL RIO et al., 2015).

Figura 4- Precursores (A) estruturas encontradas na molécula de lignina do bagaço (B). Os álcoois *p*-coumarílico, coniferílico, sinapílico dão origem respectivamente as unidades H, G e S.

Fonte: Adaptado de Henriksson (2009); Del Rio et al. (2015).

2.2 Pré-tratamento sulfito alcalino do bagaço da cana-de-açúcar

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos é essencial para modificar a composição química e estrutural da biomassa, de forma que os carboidratos possam ser hidrolisados mais rapidamente e com um maior rendimento (MOSIER et al., 2005). Diversos pré-tratamentos podem ser utilizados, sendo eles químicos, físicos, biológicos e/ou uma combinação destes. Dentre os pré-tratamentos, os alcalinos são vantajosos, pois limitam a produção de moléculas inibitórias para a posterior fermentação (furfural e

hidroximetilfurfural), baixa degradação dos carboidratos e remoção de grande parte da lignina presente no material. O processo quimiotermomecânico (QTM) utilizando o licor sulfito alcalino facilita a separação das fibras de celulose através do enfraquecimento das ligações que mantêm a estrutura da parede celular vegetal. Este processo promove o inchamento das fibras pela condição alcalina, sulfonação da lignina, deslignificação e separação mecânica das fibras (KOCH et al., 2003).

Mendes et al. (2011) mostraram uma remoção de 33% da lignina e 13% da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar, quando se utilizou um pré-tratamento com 5% de NaOH, 120 °C/2 h. Por outro lado, a remoção da lignina foi de 53% e da hemicelulose de 29% no tratamento sulfito alcalino (10% sulfito de sódio: 5% NaOH). Depois de hidrolisados com uma mistura de celulasas comerciais, a conversão enzimática da celulose foi de 50% e 85 %, para os respectivos tratamentos. No processo sulfito alcalino, a remoção da maior parte da lignina ocorreu no início do pré-tratamento e depois de 30 minutos de cozimento a deslignificação foi mais lenta. Porém observou-se que a sulfonação da lignina continuou a aumentar até as duas horas de tratamento do bagaço (MENDES et al., 2013).

A carga dos reagentes, sulfito e NaOH, utilizados no pré-tratamento também influencia na remoção de componentes do bagaço. Laurito Friend et al. (2015) observaram que cargas maiores de reagentes químicos e maiores tempos de pré-tratamentos promovem uma maior remoção seletiva de lignina e uma melhor conversão enzimática da celulose. Nesse estudo também ficou demonstrado que a hidrólise enzimática foi favorecida não só pela remoção de lignina, mas também pela incorporação de sulfito no material pré-tratado.

2.3 Degradação enzimática das hemiceluloses

Em razão da complexidade estrutural da hemicelulose, várias enzimas são necessárias para sua despolimerização em oligômeros e/ou monômeros. Dentre as hemicelulasas foram descritas as endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8) que tem como função a hidrólise da cadeia principal de xilana, atuando nas ligações glicosídicas β -1,4, liberando oligossacarídeos; β -D-xilosidase (EC 3.2.1.37) que age nas extremidades não redutoras de xilobiose e de outros oligômeros de cadeia curta; α -L- arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) que atua nos grupos laterais de arabinose; α -D-glucuronidase (EC 3.2.1.139) que hidrolisa a ligação β -1,2 entre ácido glucurônico e resíduos de xilose; acetilesterase (EC 3.1.1.72) que atua na extração dos substituintes de *O*-acetil; feruloil esterases (EC 3.1.1.73) que clivam as ligações éster entre as cadeias laterais de ácido ferúlico; *p*-cumárico esterases que agem nas

ligações entre a arabinose e o ácido *p*-cumárico (EC 3.1.1.73) (BIELY, 1985; BELANCIC et al., 1995; CARVALHO et al., 2013; SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997) (figura 5).

Figura 5- Hidrólise de uma arabinoglucuronoxilana a monômeros, bem como a atuação das enzimas do complexo hemicelulósico.

Fonte: Adaptado de Biely, Sing e Puchart (2016).

As enzimas são classificadas pelo número EC (*Enzyme Commission*) baseada nas reações químicas que catalisam, organizado em números de acordo com a ação ao substrato. As EC 3 são as hidrolases, e os números adiante representam classificações mais específicas da ação da enzima. De forma complementar, o CAZY é um banco de dados de enzimas que são ativas em carboidratos, e dentre as enzimas, as Glicosídeos Hidrolases (*Glycoside hydrolases* – GHs) são um grupo que hidrolisa as ligações glicosídicas entre carbonos. As endo-xilanases (EC 3.2.1.8) são pertencentes às famílias 5, 8, 10, 11, 30, 43 e 51 (CAZY) das glicosil hidrolases (GH) e se diferem em suas propriedades físico-químicas, modo de ação, especificidade com o substrato, sequência de aminoácidos (COLLINS; GERDAY; FELL, 2005). Porém, as xilanases que apresentam ação exclusiva na ligação β-1,4 cadeia de xilana são as famílias 5, 8, 10, 11, 30 (PÄES et al., 2012). Dentre estes grupos de GHs, as que recebem maior destaque, pela sua produção e aplicabilidade industrial, são as pertencentes às famílias GH 10 e GH 11.

As xilanases da família 10 clivam as ligações glicosídicas da cadeia principal de xilana em regiões lineares e próximos aos substituintes, porém, não são específicas apenas para xilana, tendo também ação em outros substratos e em XOS (BIELY et al., 1997) (figura 6). As xilanases GH10 requerem duas xiloses não substituídas para agir na cadeia principal de xilana (BIELY; SING; PUCHART, 2016). Em geral, apresentam uma massa molar elevada (mais de 30 KDa) e um baixo ponto isoelétrico (CARVALHO et al., 2013).

As xilanases da família 11 são exclusivas de endo-1,4 xilanases (EC 3.2.1.8) e endo-1,3- β -xilanases (EC 3.2.1.32). A endo-1,4- β -xilanaase gera produtos de decomposição de glucuronoxilanas ou arabinoxilanas com maior grau de ramificação que a da família 10 (BIELY et al, 1997). As xilanases GH11 requerem três xiloses não substituídas para agir na cadeia principal de xilana (BIELY; SING; PUCHART, 2016). Esta família apresenta uma menor massa molar e um ponto isoelétrico mais elevado que a xilanaase GH 10 (CARVALHO et al., 2013).

Figura 6- Modo de ação das xilanases GH 10 e GH 11 em uma glucuronoxilana.

Fonte: Adaptado de Biely, Sing e Puchart (2016).

Uma ampla variedade de gêneros de micro-organismos podem ser produtores de xilanases; *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Fibrobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Thermoascus*, *Phanerochaete* (DECELLE; TSANG; STORMS, 2004; KORONA, B.; KORONA, D.; BIELECKI, 2006; KOSUGI; MURASHIMA; DOI, 2002; LEE, T. H.; LIM; LEE, Y. E., 2007; MILAGRES et al., 2004; NAKAMURA et al., 2002; PARADIS et al., 1993; OGASAWARA et al., 2006; TANAKA et al., 2008). Os

fungos filamentosos são amplamente estudados, pois secretam estas enzimas em concentrações maiores, quando comparada com bactérias e leveduras (POLIZELI et al., 2005). Entretanto, as bactérias têm a vantagem de crescimento rápido e produção de enzimas com atividade em faixas de pH neutro-alcalinos, altas temperaturas e produção baixa ou insignificante de celulases (NAGAR et al., 2010; MITTAL; NAGAR; GUPTA, 2013; TARAYRE et al, 2013).

2.4 Extração das hemiceluloses

A extração de hemiceluloses de biomassa lignocelulósica pode ser realizada por metodologias físicas e/ou químicas catalisados ou não. Tratamentos por explosão a vapor, irradiação por micro-ondas, hidrotérmico, extração ácidas, extração com álcali ou solventes orgânicos têm sido amplamente descritos na literatura (SUN; FANG; TOMKINSON, 2000; BENKÓ et al., 2007; ROOS et al, 2008; WESTBYE SVANBERG; GATENHOLM, 2006). Para definir o tipo de extração que será utilizado, é importante primeiramente definir qual tipo de xilana que se deseja produzir, suas propriedades e aplicações (EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000).

2.4.1 Métodos químicos de extração das hemiceluloses

A extração química da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar pode ser realizada em meios ácidos ou alcalinos. Os procedimentos de extração têm a finalidade de recuperar a xilana na forma polimérica ou despolimerizada para o melhor aproveitamento da hemicelulose na formação de bioprodutos (CHRISTOPHER, 2012) e/ou removê-la para a obtenção de uma celulose mais pura (AROLA et al., 2013; MARTÍNEZ et al., 2015).

Nas arabinoxilanas, as cadeias laterais são hidrolisadas com mais facilidade quando expostas a soluções ácidas (PENG et al, 2009). A obtenção direta de xilana em meio ácido tem-se mostrado eficiente na produção monômeros e oligômeros de baixa massa molar. Porém, os hidrolisados obtidos por estes processos contêm uma grande quantidade de subprodutos indesejáveis, quando se deseja fermentar o material em uma etapa subsequente, como formação de furfural e hidroximetilfurfural (BIAN et al., 2013), exigindo etapas de purificação (CARVALHO et al., 2013).

A maioria dos processos de extração da hemicelulose utiliza condições alcalinas, podendo estar ou não combinado a outros reagentes/processos. Os reagentes alcalinos clivam

as ligações éster entre a lignina e os polissacarídeos, com pouca redução da massa molar da hemicelulose e também aumenta a sua solubilidade (SUN et al., 2000; PERSSON et al., 2009). Aachary e Prapulla (2009) sugerem que extração alcalina é a forma mais adequada para extrair xilana, gerando xilanas de alta massa molar em rendimentos elevados, além de que a maioria das hemiceluloses é solúvel em água após extração alcalina.

Estudos reportam diferentes metodologias de extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar de forma alcalina. Por exemplo, Sun et al., (2004) ao realizar a extração da hemicelulose com duas hidrólises consecutivas com álcali e peróxido alcalino, aumentaram a efetividade do tratamento alcançando uma extração de 90,4% da hemicelulose. A extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar realizada com peróxido de hidrogênio obteve um rendimento de 80% de xilana (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2010). Peng et al. (2009) extraíram as hemicelulases em três etapas, sendo a primeira com água, seguido de uma solução de 1% de NaOH e 3% de NaOH, a 50 °C por 3 horas, extraiu 25,1% de polissacarídeos do material original, sendo deste, 74,5% de hemicelulose. Em outro estudo utilizando um pré-tratamento alcalino, seguido da combinação a um tratamento por irradiação de micro-ondas ou de líquidos iônicos, foi verificado o enriquecimento do material residual em carboidratos, e este pré-tratamento auxiliou na conversão enzimática da xilana e também da glucana (LIU et al., 2016).

Jayapal et al. (2013) mostram que aplicando entre 2-12 g de NaOH por 100 g de substrato é possível obter entre 2-12% da xilana originalmente presente no substrato, mostrando que para extrair uma maior quantidade de xilana são necessárias altas concentrações de álcali. Além da concentração de reagentes, temperatura, também influencia a extração da hemicelulose. O aumento da temperatura pode influenciar positivamente a extração de xilana e auxiliar na diminuição de reagentes durante a hidrólise, obtendo porcentagens de extração de xilanas parecidos, em 27%, 24,8% e 25,8% nas condições de 24% de KOH a 35 °C, 10% de KOH a 70 °C, 5% de KOH a 121 °C, respectivamente (FIGUEIREDO et al., 2017).

Dependendo da metodologia empregada, o tamanho da xilana extraída pode variar de xilo-oligossacarídeos a xilanas com maiores massas molares. O tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com NaOH extrai xilanas com massas de grande tamanho, 45.370 g/mol. Ao se acrescentar peróxido de hidrogênio, tem-se a extração de xilanas um pouco menores (34-38.890 g/mol) e com o aumento da concentração deste reagente de 2% para 3% ocorre a degradação das moléculas de xilanas, gerando produtos ainda menores (18.960 g/mol), porém mais solúveis (SUN et al., 2004). Após a extração, fracionamento e precipitação com

etanol observou xilanas com massas entre 12.820 a 86.720 g/mol, sendo a maior fração obtida quando se utilizou 1 e 2% de NaOH e precipitação com 30 e 60% de etanol (PENG et al., 2009).

A desvantagem do processo de extração com álcali é a baixa seletividade do processo, onde a lignina que pode vir associada às hemiceluloses extraídas. A hemicelulose caracterizada por Sun et al., (2004) apresentou a estrutura L-arabino-(4-*O*-metil-D-glucurono)-D-xilana, e um conteúdo de lignina associado, entre 0,5-5,1%. Figueiredo et al. (2017) observaram que as arabinoxilanas extraídas de bagaço de cana-de-açúcar por tratamentos distintos, empregando KOH 5 a 24%; temperatura 25 a 121 °C, tempo 0,5 a 3 h, apresentaram uma associação entre 7,2-11,2% de lignina dependendo da intensidade do tratamento.

A extração alcalina a frio (CCE - *Cold Caustic Extraction*) é uma técnica utilizada para a extração de hemicelulose, utilizando baixas temperaturas (20-40 °C) e diferentes concentrações de NaOH. Quanto maior a carga alcalina maior a extração de hemicelulose, chegando a 62% de extração de xilanas de polpas Kraft de eucalipto não branqueada com 70 % m/m de NaOH (GOMES et al., 2015). Para a extração de hemicelulose, esta técnica é vantajosa, pois em baixas temperaturas a extração alcalina não atua como etapa deslignificante (na extração de lignina), mas sim como um estágio específico para extração de xilana. Na literatura, reporta a aplicação desta técnica para o melhor aproveitamento da celulose (CARVALHO et al., 2016) e polpas de celulose (GOMES et al., 2015).

No estudo de Gomes et al. (2015) o objetivo foi a retirada de resíduos de xilana de uma polpa kraft não branqueada por extração alcalina a frio, e os resultados mostraram que apenas 5,9% da xilana permaneceu no material após o tratamento com 70% de NaOH (m/m) a 30 °C/30 min. Esta porcentagem de xilana auxilia nas propriedades físicas do papel, melhorando sua capacidade de absorção de água (papel *tissue*) e resistência ao rasgo (GOMES et al., 2015). Por outro lado, Carvalho et al., (2016) observaram que após a extração a frio da palha de cana-de-açúcar e do bagaço de cana-de-açúcar ocorreu uma maior acessibilidade das enzimas neste material, aumentando a sacarificação e, consequentemente resultando em maiores rendimentos e volume de etanol em relação aos materiais não tratados.

2.4.2 Métodos enzimáticos de extração das hemiceluloses

As extrações enzimáticas da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar são realizadas após algum pré-tratamento, para a melhor acessibilidade da enzima. A extração

enzimática ocorre com hemicelulases de origem microbiana e o maior interesse é a extração de xilanas na forma de xilo-oligossacarídeos (XOS) (CARVALHO et al., 2016). Os XOS são formados através da hidrólise da xilana, geralmente pela ação da xilanase e o seu grau de polimerização depende da xilana utilizada.

Ao se utilizar a xilanase comercial de *Trichoderma viride* em uma xilana extraída de bagaço de cana foram obtidos xilobiose (X2) e xilotriose (X3), porém com o aumento no tempo de hidrólise e na carga de enzimas ocorreu a produção de xilose (JAYAPAL et al., 2013). Mandelli et al., 2014, utilizou uma xilanase purificada de *Clostridium thermocellum*, expressa em *Escherichia coli* capaz de produzir X2 a X4 a partir do bagaço de cana *in natura* e do bagaço pré-tratado, sendo também observado a produção de xilose.

Alguns trabalhos relatam a utilização do extrato enzimático bruto, de origem bacteriana ou fúngica, contendo atividade de xilanase, para a aplicação direta no material pré-tratado e obtenção de XOS. Como exemplo, o extrato bruto de *Thermoascus aurantiacus* (60U/g de material) foi aplicado em um bagaço de cana pré-tratado, obtendo um rendimento de 37,1%, com a produção de xilobiose (X2) a xilopentose (X5), e também a produção de xilose (BRIENZO; CARVALHO; MILAGRES, 2010). Figueiredo et al. (2017), determinaram X2 e X3 a partir da hidrólise de uma arabinoxilana com o extrato bruto de *Aspergillus fumigatus* (120U/g de material), e quando aplicado um extrato de *Trichoderma reesei* na arabinoxilana (120U/g de material), foi observado a produção de xilose, além dos XOS.

Bian et al. (2013), observaram a ação do extrato enzimático bruto de *Pichia stipitis* (25U/g de material) em uma arabinoxilana extraída do bagaço de cana, e mostraram que a produção de xilobiose (X2) a xilotetraose (X4) representou 96% da produção de XOS. Os mesmos autores também verificaram que o tempo de hidrólise alterou o perfil de XOS produzidos, pois um aumento no tempo de reação de 2 horas para 12 horas diminuiu a concentração de X4, sendo que os conteúdos de X5 e X6 não foram alterados. As xilanases de *T. reesei* CCT 2768, *A. fumigatus* M51 e *A. fumigatus* U2370 proporcionaram um rendimento XOS de 11,9%, 14,7% e 7,9%, respectivamente a partir da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar, após 3 horas de reação (CARVALHO et al., 2015).

Endoxilanases de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Rhodothermus*, *Thermobifida*, etc., tem sido usada para a obtenção de XOS (CHAKDAR et al., 2016). Informação genômica detalhada são importantes para produzir os XOS desejados, por exemplo Rhee et al. (2014) engenheiraram *B. subtilis* str 168 para produzir XOS ácidos. Outro estudo foi realizado aplicando um extrato bruto de *Bacillus subtilis* contendo xilanase

e arabinofuranosidase em uma arabinoxilana, resultando em 22,2% de XOS com grau de polimerização variando de X2 a X4 (REDDY; KRISHNAN, 2016). A aplicação de xilanases de origem bacteriana se mostra mais atrativa para a produção de XOS, pelo fato de serem produzidas de forma mais pura, com baixa atividade de β -xilosidase, prevenindo a produção de xilose que tem um efeito inibitório na produção de XOS (BOONCHUAY et al., 2016; VERMA; ANAND; SATYANARAYANA, 2013).

2.5 *Bacillus pumilus* e xilanases

Bacillus pumilus é uma bactéria aeróbica, gram-positiva e produtora de esporos. Esta linhagem já foi isolada de diversos ambientes, como de uma fazenda de sal marinho (MENON et al., 2010), do efluente da indústria de processamento de alimentos (SANGEETHA; GEETHA; ARULPANDI, 2008) e, principalmente de solos (DUARTE et al., 1999; BATTAN et al., 2007; NAGAR et al., 2010). Por esta diversidade de ambientes, *B. pumilus* apresenta um grande potencial industrial, pela sua grande capacidade de produção de enzimas (WEMHOFF; MEINHARDT, 2013; KÜPPERS et al., 2014), de bioprodutos como aromatizantes utilizados na indústria alimentar e farmacêutica (Vanilina e 4-vinil guaiacol) (HUA et al., 2007; 2013); e até mesmo na agricultura, como promotora de crescimento vegetal (JOO et al., 2004).

Este micro-organismo secreta uma variedade de enzimas em altas concentrações, como proteases (KÜPPERS et al., 2014; SANGEETHA; GEETHA; ARULPANDI, 2008; WAN et al., 2009), lipases (KIM et al., 2002; SANGEETHA; GEETHA; ARULPANDI, 2008) e xilanases (BATTAN et al., 2007; NAGAR et al., 2012). Em relação às enzimas degradadoras de carboidratos, estima-se que 89 proteínas de uma estirpe de *B. pumilus* (Jo2) sejam responsáveis pelo metabolismo de carboidratos (HANDTKE et al., 2014). Dentre as enzimas ativas em carboidratos, *B. pumilus* tem recebido atenção na produção de xilanases.

A produção de xilanase é influenciada positivamente pela adição de xilana, podendo ser puras ou presentes em substratos complexos. Trabalhos mostram que os indutores mais utilizados são as xilanas de *birchwood*, *oat spelts*, farelo ou palha de trigo, palha ou farelo de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, espigas de milho em cultivos em estado sólido e submerso. O uso de resíduos agroindustriais para induzir as xilanases é uma alternativa mais barata para a produção enzimática.

Trabalhos relatam uma alta produção de xilanase em xilanas comerciais (xilana de *birchwood* e xilana de *oat spelts*) e em farelo de trigo (BATTAN et al., 2007; GEETHA; GUNASEKARAN, 2010; NAGAR et al., 2010, 2012; POORNA, 2011; POORNA; PREMA, 2007). O farelo de trigo tem sido apontado como sendo adequado para a produção de xilanase em escala comercial, pois contém nutrientes necessários para o crescimento microbiano e arabinoxilanas para a indução de enzimas. Além destas características, o farelo de trigo tem a vantagem de ter custo menor do que a xilana comercial (POORNA; PREMA, 2007).

Além da fonte de carbono, o nitrogênio é um componente importante no preparo do meio de cultivo para o crescimento do microrganismo, já que este elemento é o segundo mais requerido por todos os organismos. A maioria dos trabalhos relata a maior produção de xilanase quando se combina o extrato de levedura, peptona e nitrato de potássio (KNO_3) (BATTAN et al., 2007; NAGAR et al., 2010), ou também a combinação de extrato de levedura e peptona (GEETHA; GUNASEKARAN, 2010; NAGAR et al., 2012). Em relação ao pH e à temperatura de cultivo, o pH pode variar de pHs ácidos (pH 5-6), neutros (pH 7), ou alcalinos (pH 8-10), e as temperaturas utilizadas podem variar entre 35 a 55 ° C (BATTAN et al., 2007; DUARTE et al., 2000; NAGAR et al., 2010, 2012; POORNA; PREMA, 2007).

A produção de xilanases de *B. pumilus* ocorre de forma extracelular, e concentrações enzimáticas podem variar de 84 U/mL (GEETHA; GUNASEKARAN, 2010) até valores extremamente elevados, como 7.382,7 U/ mL (NAGAR et al., 2012). A alta atividade de xilanase produzida por *B. pumilus* foi atribuída à otimização do meio de cultivo e a cepa utilizada (GEETHA; GUNASEKARAN, 2010; NAGAR et al., 2010; 2012). Outro fator importante na sua produção é a capacidade de produzir xilanase livre de celulasas (KAMBLE; JADHAV, 2012; NAGAR et al., 2010, 2012), característica desejável para o emprego do extrato bruto sem a necessidade de purificação da xilanase, em aplicações que se deseja hidrolisar apenas a hemicelulose, preservando a celulose para etapas posteriores do processo (CHRISTOPHER, 2012).

A ausência da produção β -xilosidase extracelular é uma estratégia do *Bacillus* spp. que também é observada e descrita em *Geobacillus* spp. (SHULAMI et al., 2014). Estes microrganismos secretam endoxilanasas para hidrolisar xilana a oligossacarídeos, os quais são transportados através de permeases especializadas para sua degradação intracelular (SHULAMI et al., 1999, 2007; 2014; TEPLITSKY et al, 2000), ocasionando atividades

pouco expressivas de β -xilosidase extracelular (TEPLITSKY et al, 2000). Desta forma, o produto da degradação da xilana são xilo-oligossacarídeos.

No banco de dados de enzimas ativas em carboidratos são encontradas informações a respeito das xilanases de *B. pumilus* (CAZY). Considerando que 14 estirpes deste micro-organismo apresentam o genoma depositado no banco de dados CAZY, *B. pumilus* apresentam xilanases que pertencem às famílias glicosil hidrolases (GH) 10, 11 e 30. As GHs 10 e 30 apresentam massa molar aproximada de 47 kDa, enquanto a xilanase pertencente à família GH 11 apresenta uma massa molar de aproximadamente 25 kDa. Poorna (2011), ao cultivar *B. pumilus*, obteve três xilanases secretadas com massas de 14 kDa, 35 kDa e 60 kDa.

As características bioquímicas mostram que as xilanases produzidas por *B. pumilus* apresentam grande versatilidade, apresentando estabilidade em uma ampla faixa de pHs, de 5 até 11 e uma estabilidade em temperaturas entre 20-60 °C (BATTAN et al., 2007; NAGAR et al., 2010, 2012; POORNA, 2011). Desta forma, a xilanase de *B. pumilus* apresenta um potencial na aplicação de uma polpa Kraft, pois resultados mostraram que são capazes de reduzir a porcentagem de reagentes utilizados para o branqueamento em até 20% no consumo de cloro e 10% no dióxido de cloro (DUARTE et al., 2003; BATTAN et al., 2007); na reciclagem de papeis, sendo que a adição de enzimas antes do refino melhorou as propriedades de resistência (POORNA; PREMA, 2007); e principalmente, para a produção de xilo-oligossacarídeos (KAPOOR; KUHAD, 2007) que apresentam grande interesse na indústria farmacêutica.

A partir das características de xilanases de *B. pumilus* já descritas, se propõe o estudo da xilanase de *B. pumilus* CBMAI 0008 para hidrólise de xilanas a partir do bagaço de cana pré-tratado, bem como a obtenção de um material residual rico em celulose e, conseqüentemente, de fácil conversão.

2.6 Aproveitamento dos polissacarídeos do bagaço de cana-de-açúcar

O conceito de biorrefinaria da cana-de-açúcar é análogo ao da indústria do petróleo, que visa a produção de múltiplos combustíveis e a geração de produtos de alto valor agregado. O caldo da cana é usado para a produção de açúcar e etanol, o bagaço para ração animal, folhas e palhas permanecem no campo, a vinhaça e cinzas voltam ao campo. Na biorrefinaria integrada, o bagaço é submetido a pré-tratamentos para a produção de açúcares que podem ser convertidos a etanol, xilanas, xilitol e furfural (NOVACANA, 2017).

Após os pré-tratamentos para a diminuição de lignina e hemicelulose no material, a biomassa é submetida à hidrólise enzimática, em um processo denominado de sacarificação. As celulasas promovem a hidrólise da celulose até glicose que dependendo do interesse pode ainda ser convertida a outros bioprodutos (CHANDEL et al., 2011). Para a produção de etanol, a extração da lignina e hemicelulose do material lignocelulósico melhoram o acesso das enzimas à celulose (PENG et al., 2012). Carvalho et al., (2016) demonstraram que não apenas a extração de lignina, mas também a da hemicelulose, contribui para um aumento na liberação da glicose durante a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.

O impacto da extração de xilana nas propriedades do material celulósico residual é grande, e influencia positivamente a hidrólise da celulose à glicose para ser utilizada em diversos fins (CHANDEL et al., 2011). Outro fator importante é que a extração prévia de xilana dos materiais lignocelulósicos antes da conversão enzimática da celulose melhora a eficiência do processo. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada na produção de etanol através de um material lignocelulósicos, não fermenta açúcares de 5 carbonos, como xilose e arabinose, que são provenientes da hemicelulose (BAEYENS et al., 2015).

A xilana removida dos materiais lignocelulósicos pode ser um bioproduto para a produção de xilo-oligossacarídeos, que apresentam um grande potencial para a utilização na formulação de produtos farmacêuticos, na agricultura e em alimentos (VÁZQUEZ et al., 2000). A aplicação que mais vem tendo atenção é no campo da saúde sendo utilizados como prebióticos, pois auxiliam a proliferação de bifidobactérias, microrganismos benéficos para o intestino humano (GULLÓN et al., 2008) e inibe o crescimento de microrganismos patogênicos (MUSSATTO; MANCILHA, 2007). O grau de polimerização para ser considerado XOS é de xilobiose (X2) até X20 (CARVALHO et al., 2013; MÄKELÄINEN et al., 2010; VÁZQUES et al., 2000).

Em bagaço de cana-de-açúcar, foi verificado o potencial da produção de XOS capazes de sustentarem o crescimento de bifidobactérias, com resultados de crescimento parecidos de quando o cultivo foi acrescido de xilose (REDDY; KRISHNAN, 2016). Além do crescimento, este microrganismo foi capaz de produzir de ácidos graxos de cadeias curtas, que podem ser benéficos a saúde humana (REDDY; KRISHNAN, 2016).

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi produzir e caracterizar o sistema hemicelulolítico de *Bacillus pumilus* para aplicação no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino, visando a extração de hemiceluloses, na forma de xilo-oligômeros e a obtenção de um substrato residual que seja mais facilmente hidrolisado por celulases comerciais.

Objetivos específicos

- Cultivar *Bacillus pumilus* em diferentes meios e indutores, determinar as atividades de endoglucanase, β -glicosidase, xilanase, β -xilosidase e arabinofuranosidase;
- Caracterizar bioquímica e funcionalmente as xilanases presentes nos extratos enzimáticos;
- Avaliar a extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, com o extrato enzimático produzido por *Bacillus pumilus* em diferentes concentrações de proteína, temperaturas e lavagem do material;
- Caracterizar a hemicelulose extraída quanto a sua distribuição de massa molar;
- Avaliar o perfil de hidrolise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino, após a extração da hemicelulose por xilanase de *Bacillus pumilus*.

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 Micro-organismo e preparo do inóculo

Foi utilizada a linhagem de *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 da coleção de cultura do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA, Campinas-SP). A cultura foi mantida a 4 °C, após cultivo em meio de cultura sólido (1.5% de ágar) descrito por Mandels e Stenberg (1976), contendo os seguintes componentes: 10,0 g de glicose; 1,0 g de peptona; 1,0 g de Tween 80; 1,4 g de (NH₄)₂SO₄; 2,0 g de KH₂PO₄; 0,3 g de ureia; 0,3 g de CaCl₂; 0,3 g de MgSO₄.7H₂O; 5 mg de FeSO₄.7H₂O; 1,6 mg de MnSO₄.H₂O; 1,4 mg de ZnSO₄.7H₂O; 2,0 mg CoCl₂; diluído em 1 L de água destilada, com o pH ajustado para 8,5.

O inóculo foi preparado transferindo-se uma alçada de células (alça com 3mm de diâmetro), proveniente do repique em meio de manutenção (descrito acima), para frascos Erlenmeyer de 250 mL com 25 mL de meio líquido de Mandels e Stenberg (1976), em pH 8,5. Os frascos inoculados foram incubados a 45 °C, sob agitação, em shaker, rotatória de 200 rpm, por 20 horas (DUARTE et al., 1999, 2000). Também foi utilizado o meio de Nagar et al. (2010) para o preparo do inóculo e posterior cultivo, constituído por 20,0 g de glicose; 5,0 g de peptona; 5,0 g de extrato de levedura; 5,0 g de KNO₃; 1,0 g de KH₂PO₄; 0,1 g de MgSO₄.7H₂O; diluído em 1 L de água destilada, com o pH ajustado para 8,5.

4.2 Cultivo em diferentes substratos

A avaliação da produção de enzimas em diferentes substratos, utilizados como indutores, foi realizada através do cultivo de *B. pumilus* em meio líquido de Mandels e Stenberg (1976) (Meio 1) e também em meio líquido de Nagar et al., (2010) (Meio 2), em pHs de cultivo de 8,5 ou 9,5. Na tabela 1, estão descritos os indutores avaliados e as concentrações utilizadas em cada de meio.

Os substratos avaliados foram glicose, xilana de *oat spelts* (Sigma X-0627), farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar (como recebido da indústria) e bagaço de cana deslignificado. O bagaço foi deslignificado por 4 horas de reação em clorito em meio ácido, conforme descrito por Siqueira et al., (2011). No meio 2, além dos substratos já citados utilizados no meio 1, também foram avaliados o bagaço pré-tratado

quimiotermomecanicamente com sulfito/álcali (BPT), preparado como descrito por Mendes et al. (2011) e o hidrolisado de bagaço de cana (XOS) preparado como descrito no item 4.2.1.

Tabela 1- Indutores utilizados para a produção de xilanase por *B. pumilus* e suas concentrações de acordo com o meio utilizado.

Indutores para a produção de enzimas (Substratos)	% de indutor utilizado	
	Meio 1	Meio 2
Glicose	1%	3%
Xilana (<i>Oat splets</i>)	1%	3%
Farelo de trigo	1%	3%
Bagaço de cana-de-açúcar	1%	3%
Bagaço de cana-de-açúcar deslignificado	1%	3%
Bagaço de cana pré-tratado quimiotermomecânicamente com sulfito/álcali	-	3%
Hidrolisado de bagaço de cana (XOS)	-	0,3%

Fonte: Arquivo pessoal.

Os cultivos foram conduzidos em duplicata em frascos Erlenmeyers de 250 mL em 25 mL de meio líquido, contendo os substratos para indução das enzimas. Cada Erlenmeyer foi inoculado com culturas previamente crescidas na proporção de 8% de inóculo/100 mL de meio de cultivo, correspondendo a 10^8 células/mL, determinado por espectrofotometria ($DO_{600} = 1,5$). Os frascos foram incubados a 45 °C sob agitação constante (120 rpm). Após 24 horas de cultivo, as culturas foram centrifugadas durante 15 minutos a 4750g e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio das atividades enzimáticas de xilanase, endoglucanase, β -xilosidase, β -glicosidase e arabinofuranosidase, além de determinação do pH. Uma parte dos sobrenadantes dos cultivos de *B. pumilus* foi congelada em ultrafreezer (marca Quimis) a - 45 °C, antes de serem liofilizada (liofilizador Super Modulyo, marca Edwards) e estocada em freezer a -18 °C para posteriores experimentos de caracterização das proteínas.

Em relação aos substratos, o farelo de trigo foi adquirido em supermercado (marca Yoki Mais Vida) e utilizado diretamente no preparo do meio. O hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar foi produzido em um reator de aço inox. Vinte gramas (20g) de bagaço seco foram colocadas no reator que foi fechado e ligado a uma bomba de vácuo por 30 minutos para retirada de parte do ar dos poros do bagaço. Depois deste procedimento, o reator foi

aberto, adicionado água destilada até atingir a massa de 400 g, descontando a massa do reator vazio. O reator foi novamente conectado a uma bomba de vácuo por 15 minutos, para forçar a entrada de água nos poros do bagaço. Em seguida, o reator foi aberto e o material foi homogeneizado. O reator foi novamente fechado antes de ser colocado em banho de silicone com agitação. Depois de 30 min a temperatura do banho atingiu 190°C, e o reator foi mantido por 10 min nesta temperatura. Em seguida, o reator foi colocado em um banho com água e gelo para baixar rapidamente a temperatura até próxima de 25 °C. O reator foi aberto e o seu conteúdo foi retirado e filtrado em papel filtro (Synth) no filtro de büchner. O líquido obtido foi congelado para posteriores análises de açúcares e utilização no meio de cultura para indução de enzimas.

4.3 Atividades enzimáticas

4.3.1 Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada empregando xilana *birchwood* (SIGMA) como substrato (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992). As xilanas foram preparadas a 1% (m/v), em tampão fosfato de sódio pH 8,0 e pH 9,0 (50 mM). Tubos de ensaio com 0,1 ml de extrato enzimático bruto e 0,9 ml de substrato foram incubadas à 50 °C, por 5 min. Para determinar os açúcares redutores, foi utilizada a metodologia de Miller (1959), adicionando 1,5 ml de DNS (2-hidroxi-3,5 ácido dinitrobenzóico). Em seguida, os tubos foram colocados em banhos de água em ebulição, por 5 minutos e rapidamente resfriados, antes da leitura da absorbância à 540 nm. Foi realizado um controle da reação adicionando DNS aos tubos antes dos outros reagentes e esta amostra foi utilizada para calibrar o espectrofotômetro (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992).

A concentração de açúcares redutores liberados no meio foi determinada pela equação obtida na curva padrão de xilose. A curva padrão foi preparada utilizando xilose (previamente seca em dessecador com P₂O₅) nas concentrações de 2; 2,5; 3,33; 5 e 10 µmol/mL. Os açúcares redutores, expressos como xilose, foram divididos por 5 (tempo da reação enzimática), e multiplicados pelo fator de diluição para convertê-los em unidades internacionais de atividade enzimática (UI).

4.3.2 Endoglucanase

A determinação da atividade de endoglucanase foi realizada de acordo com Tanaka et al (1981), utilizando carboximetilcelulose (CMC viscosidade media – Sigma) como substrato. O CMC foi preparado a 0,44% (m/v), em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 8,0. Tubos de ensaio com 0,9 mL de substrato e 0,1mL de extrato enzimático bruto foram incubados a 50°C por 30 minutos. Para determinar os açúcares redutores, foi empregada a metodologia de Miller (1959), adicionando 1,5 mL de DNS. Foi feito um controle da reação adicionando DNS antes dos outros reagentes aos tubos e esta amostra foi utilizada para zerar o espectrofotômetro. Em seguida, os tubos foram colocados em banhos de água em ebulição, por 5 minutos e rapidamente resfriados, antes da leitura da absorbância à 540 nm.

A concentração de açúcares redutores liberados no meio foi correlacionada com uma curva padrão de glicose preparada a partir da glicose (previamente seca em P₂O₅) e nas concentrações de 1,38; 2,77; 4,16; 5,55; 8,83 e 11,11 µmol/mL e convertidos em unidades de atividade enzimática (UI) (GHOSE, 1987).

4.3.3 β-glicosidase, β-xilosidase e arabinofuranosidase

As atividades de β-glicosidase, β-xilosidase e arabinofuranosidase foram realizadas com os substratos 4-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (pNPG), 4-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (pNPX) e 4-nitrofenil-β-D-arabinofuranosídeo (pNPA), respectivamente (TAN, MAYERS; SADDLER, 1987). Os substratos foram preparados a 0,1% em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0. Tubos de ensaio com 0,2 ml de extrato enzimático bruto e 0,8 ml de substrato foram incubados a 50 °C por 30 minutos. A leitura das absorbâncias a 410 nm foi usada para o cálculo da atividade através dos dados obtidos de uma curva padrão de p-nitrofenol (pNP) diluída em água nas concentrações de 0 a 0,5 µmol/mL (TAN; MAYERS; SADDLER, 1987). Uma unidade de atividade enzimática corresponde a 1µmol de pNP por minuto.

4.4 Proteínas

O teor de proteínas foi determinado como descrito por Bradford (1976). A reação foi iniciada pela adição de 0,1 ml de amostra a 1 ml do reagente e após 10 minutos foi realizada

a leitura de absorbância a 595 nm. Uma curva de calibração foi feita a partir de albumina de soro bovino, nas concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200 mg/mL.

4.5 Eletroforese de proteínas em gel de acrilamida

Os géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foram preparados em duas fases compostas de um gel concentrador e um gel separador, de acordo com a tabela 2 (SAMBROOK; RUSSELL, 2006). Primeiramente foi preparado o gel separador para ser inserido entre as placas de vidro do equipamento de eletroforese. Depois de solidificado o gel concentrador foi preparado e colocado sobre o outro gel.

Tabela 2- Reagentes utilizados na preparação dos géis.

Soluções	Gel concentrador 5% (mL)	Gel separador 12% (mL)
Água	10,2	9,9
Acrilamida 30%	2,53	12
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	7,5
Tris-HCl 1,0 M pH 6,8	1,88	-
SDS 10% (p/v)	0,15	0,3
Persulfato de amônio 10% (p/v)	0,15	0,3
TEMED	0,015	0,012
Volume final	15	30

Fonte: Arquivo pessoal.

As amostras para a corrida eletroforética foram preparadas dentro de frascos eppendorf de 0,5 mL, colocando na proporção 2:1 amostra e tampão da amostra (2,0 mL de Tris-HCL a 1 mol/L, pH 6,8; 4,0 mL de SDS a 10%; 2,0 mL de β -mercaptoetanol; 5,0 mL de glicerol e 10 mg de azul de bromofenol). Os frascos foram colocados em banho de água fervente por 5 minutos e após o resfriamento, as amostras foram cuidadosamente injetadas em canaletas formadas no gel concentrador. As proteínas das amostras foram quantificadas (BRADFORD, 1976) e 15 μ g foram aplicadas em cada canaleta do gel. O gel foi colocado em uma cuba de eletroforese (SE 600 Ruby- GE Helthcare) com tampão de corrida pH 8,8 (0,025mol/L de Tris, 0,25mol/L de glicina, 0,1% de SDS). A corrida utilizou uma corrente contínua de 150 V (Electrophoresis Power Supply EPS 601- GE Helthcare). Após o azul de bromofenol das amostras sair pela extremidade inferior do gel, o aparelho foi desligado, o

gel retirado da cuba e as bandas proteicas presentes foram visualizadas após a coloração deste. Os marcadores de massas moleculares utilizado foram: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), α -lactoalbumina (14,4 kDa).

4.6 Coloração do gel com nitrato de prata

As proteínas presentes nos géis de eletroforeses foram reveladas com nitrato de prata, através da adaptação do método descrito por Blum, Beier e Gross (1987), desenvolvido para diminuir as manchas provocadas pelo arraste das proteínas no gel de eletroforese.

O gel foi incubado por 1 hora em solução contendo 50 mL de metanol, 12 mL de ácido acético glacial e 38 mL de água destilada. Esta solução foi descartada e realizadas três lavagens consecutivas com etanol 50% por 8 minutos. Em seguida, o gel foi incubado por 1 minuto, em uma solução de tiosulfato de sódio a 0,02%. Esta solução foi descartada e o gel lavado em água destilada por três vezes, com duração de 20 segundos em cada lavagem. Após as lavagens, o gel foi incubado por 25 minutos em uma solução de nitrato de prata (0,2 g de nitrato de prata, 0,037mL de formaldeído à 37% em 100mL de água destilada). Em seguida, o gel foi novamente lavado em água destilada por três vezes, com duração de 20 segundos. Após as lavagens, gel foi incubado com uma solução contendo 2g de carbonato de sódio, 1mL da solução de tiosulfato de sódio (0,02%), 0,025mL de formaldeído (37%) e água até o volume de 50mL, no qual permaneceu até o aparecimento das bandas de proteínas. A reação foi interrompida pela adição de 3mL de ácido acético glacial.

Após a coloração, os géis de eletroforeses foram escaneados e visualizados pelo *software* Labscan. As análises para determinação de massa molar das bandas de proteínas foram realizadas através do *software* Imagequant LT usando a curva padrão traçada do logaritmo da massa molar contra a mobilidade relativa dos padrões de proteína.

4.7 Zimograma

O gel para identificar a atividade de xilanase foi realizado como descrito no item 4.5 (SDS-PAGE) acrescido de 0,1% de xilana de *oat spelts* (Sigma) no gel separador. As amostras foram quantificadas quanto a sua concentração de proteínas padronizando a dosagem de proteína para 2 μ g por amostra. As amostras foram diluídas com tampão da

amostra na proporção 1: 2 (v/v) e os tubos foram levados à fervura, por 5 minutos. Além das amostras, também foi aplicado no gel os marcadores de massas molares, descrito no item 4.5. O gel foi colocado em uma cuba eletroforética com tampão de corrida inserida em um banho de gelo.

Após a corrida, o gel foi incubado com tampão fosfato pH 8,0 (50 mM) acrescido de 1,5% de Triton X-100 (Sigma) por 1 hora, a 30 °C e com agitação orbital de 30 rpm. Após este período, o gel foi incubado em tampão fosfato pH 8,0 (50 mM) por 40 minutos, a 40 °C com agitação orbital de 30 rpm, e em seguida incubado em uma solução de vermelho congo a 0,1% no período de 15 minutos, mantendo a agitação (CANO-RAMÍREZ et al, 2017). O gel foi revelado retirando a solução de vermelho congo do recipiente e adicionando cloreto de sódio (NaCl) a 1M e esperando cerca de 10 minutos até as bandas se tornarem visíveis. Para melhor visualização, o gel foi lavado com 0,1 M de ácido acético (CH₃COOH), para mudança de cor do vermelho congo para roxo, aumentando o contraste das bandas com atividades em xilana. O local de aplicação dos padrões foi recortado do gel, corado com nitrato de prata e depois remontado no gel para análise da massa molar da banda com atividade enzimática (item 4.6).

4.8 Determinação do pH e da temperatura ótimos de ação das xilanases

O extrato enzimático utilizado nestes ensaios foi obtido do cultivo de *B. pumilus* no meio 1, contendo farelo de trigo como fonte de carbono. Soluções de xilana de *birchwood* 1% (m/v) foram previamente preparadas em diferentes tampões de pH a 50 mM, conforme indicado a seguir: acetato de sódio (pH 5), fosfato de sódio (pHs 6; 7 e 8) e tampão glicina-NaOH (pHs 9 e 10).

O efeito da temperatura de reação na atividade da xilanase de *B. pumilus* foi determinado entre 30 e 80 °C, com intervalos de 10 °C, fixando o pH de reação em 8,0. A determinação da atividade de xilanase nos ensaios foi realizada a 50 °C por 5 minutos (item 4.3.1) e expressa como atividade relativa, considerando o maior valor de atividade como 100% da atividade da enzima.

4.9 Estabilidade das xilanases ao pH e à temperatura

O extrato enzimático utilizado para os ensaios de estabilidade das xilanases foi do cultivo de *B. pumilus* no meio 1, contendo farelo de trigo como fonte de carbono. O substrato foi previamente preparado nos pHs 6, 7, 8 e 9 com tampão fosfato de sódio (tamponado a 50 mM). A determinação da atividade de xilanase foi realizada a 50 °C por 5 minutos (item 4.3.1).

O efeito da temperatura de reação sobre a estabilidade da atividade da xilanase de *B. pumilus* foi determinada nas temperaturas de 40, 50 e 60°C, fixando o pH de reação em 8,0. Ambos os ensaios foram realizados até 150 minutos, retirando alíquotas nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 150 minutos. A atividade relativa foi calculada considerando o maior valor de atividade como 100% da atividade da enzima.

4.10 Modo de ação do extrato enzimático de *Bacillus pumilus* em xilanas

Foram realizadas hidrólises das xilanas de *beechwood* (Sigma), *oat spelts* (Sigma) e *birchwood* (Sigma) por diferentes tempos com o extrato enzimático de *B. pumilus*, obtido do cultivo no meio 1, pH 8,5, em farelo de trigo como fonte de carbono. A hidrólise foi realizada, a 50°C, sob agitação recíproca de 120 ciclos/min em tubos falcon, com 5% de consistência. As xilanas foram preparadas em pH 8 (tampão fosfato de sódio, a 50 mM) e o extrato enzimático foi adicionado à reação na carga de 20U/g de substrato. Os controles foram preparados nas mesmas condições de reação, porém substituindo extrato enzimático por tampão.

4.10.1 Hidrólise enzimática de xilanas comerciais

As xilanas de *birchwood* e *oat spelts* foram preparadas usando 0,5 g de xilana para 10 mL de volume reacional tamponado (fosfato de sódio 50 mM pH 8), incubadas com o extrato enzimático e retiradas alíquotas nos tempos de 10, 20, 30, 60 e 120 minutos. Ambos os experimentos foram realizados em duplicata. As amostras foram centrifugadas a 4.750g por 20 minutos e no sobrenadante foram feitas as análises dos açúcares redutores por DNS (MILLER, 1959).

Foram feitos ensaios com as xilanas de *beechwood* e *oat spelts*, com 1,25g de xilana para 25 mL de volume reacional tamponado (fosfato de sódio 50 mM pH 8), retirando alíquotas nos tempos de 2, 6, 24, 48, 72 e 96 horas. As amostras foram centrifugadas a 4.750g por 20 minutos e no sobrenadante foram feitas as análises dos açúcares.

4.10.2 Hidrólise enzimática das frações de xilana

Xilana de *oat spelts* foi preparada em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 8, na proporção de 1,25g de xilana:25 ml de tampão e hidrolisadas por 96 h com o extrato enzimático de *B. pumilus*. As amostras foram centrifugadas a 4.750g por 20 minutos e frações de xilanas foram separadas conforme descrito na figura 7.

O resíduo (solido 1) foi seco a 60 °C por 24 horas. As xilanas presentes no sobrenadante foram precipitadas, utilizando dois volumes de etanol a 95% para um volume de amostra. Esta solução foi homogeneizada e deixada em repouso *over night* e posteriormente a solução foi centrifugada por 15 minutos a 4000 g. O sólido obtido (solido 2) foi seco a 60 °C por 24 horas e armazenado para análises posteriores da composição química e distribuição de massas molares.

Os sólidos 1 e 2 foram novamente hidrolisadas pelo extrato enzimático de *B. pumilus* e também por uma xilanase GH 10 comercial de *Thermotoga maritima* (Megazyme). As reações foram conduzidas a 5% de consistência, pH 8, 50°C por 24 h, sob agitação recíproca de 120 ciclos/min em eppendorf de 2ml e volume final de 1mL. Após 24 horas, as amostras foram centrifugadas a 4.750g por 20 minutos. A fração líquida foi armazenada para posteriores análises de oligômeros e monossacarídeos.

Figura 7- Esquema da hidrólise de xilana de *oat spelts* utilizando extrato enzimático de *B. pumilus*.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.11 Pré-tratamentos dos bagaços de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi obtido na Destilaria Vale do Rio Turvo, estado de São Paulo. O bagaço foi lavado com água destilada, seco ao ar e armazenado em ambiente seco até o momento do uso.

O bagaço foi deslignificado seguindo a metodologia de Browning (1967), utilizando soluções ácidas de clorito de sódio e tempos reação de 2 e 4 horas. Para cada grama de

bagaço, foram utilizados 0,3 g de clorito de sódio, 0,1 mL de ácido acético e 32 mL de água destilada, e a cada hora de reação, foram adicionados mais 0,3 g de clorito de sódio e 0,1 mL de ácido acético. O recipiente com a reação foi colocado em banho aquecido entre 70-80 °C e após o tempo de reação, as amostras foram resfriadas a 10 °C, filtradas em filtro de placa de cerâmica com poros número 2 (40 a 100 µm) e lavadas com 80 mL de água destilada e 20 mL de acetona. Posteriormente, o bagaço foi extraído com água em soxhlet durante 6 horas para remover os resíduos de clorito do pré-tratamento.

O bagaço de cana também foi submetido a três condições de pré-tratamento com solução sulfito-alcálico. Foram utilizados: 1,25% NaOH e 2,5% Na₂SO₃; 2,5% NaOH e 5% de Na₂SO₃; e 5% NaOH e 10% de Na₂SO₃; todas as porcentagens de reagentes estão expressas em m/m seca de material lignocelulósico. Inicialmente, 600 g de bagaço seco foram adicionados a um reator de aço inox, e este foi conectado a uma bomba a vácuo por 30 minutos. Após este período, com a bomba de vácuo ligada, foram adicionados 6L da solução sulfito-alcálico, e deixado por mais 15 minutos sob vácuo da bomba. Em seguida, o reator foi aberto, a mistura homogeneizada, e em seguida transferido para dentro da autoclave. A reação foi feita a 120°C por 2h. Após autoclavado, material foi resfriado e parte do licor obtido foi retirada e, armazenada para posterior análise e uso. Ao material (suspensão de sólido e líquido) foi adicionada água até o volume final de 25L, numa consistência final de 2% para ser desfibrado em refinador de discos (Bauer MD-300 – REGMED) com uma distância de 0,1 mm entre os discos (MENDES et al., 2011).

Parte do bagaço pré-tratado com 5% NaOH e 10% de Na₂SO₃ foi lavado com água destilada até atingir o pH próximo a 7, gerando um substrato denominado como lavado extensivamente. Outra parte deste material pré-tratado foi armazenada sem lavagem pós-refino e denominado ao longo do trabalho como substrato pouco lavado.

Os processos foram monitorados quanto ao balanço de massas e os materiais pré-tratados foram caracterizados quanto à composição química.

4.12 Caracterização química dos substratos

Três gramas de bagaço moído, em peneira de 25 mesh, foram extraídas com etanol (95%) por 6 h em Soxhlet, e seco para posterior uso. Inicialmente, 0,3 g do bagaço e 3mL de ácido sulfúrico à 72% foram adicionados em tubos de ensaio (85mL), e incubados em banho-maria a 30°C. Esta mistura foi homogeneizada com bastão de vidro a cada 15 minutos

e após 1 hora, foram adicionados 79 mL de água destilada. Os tubos foram fechados e levados para a autoclave por 1 hora a 121°C. Após este período, as amostras foram retiradas da autoclave, esfriadas e filtradas em cadinhos de vidro com placa sinterizada nº 3, tipo gooch. O filtrado foi colocado em balão volumétrico de 200 mL e parte da amostra foi armazenada para análise. Os açúcares da fração solúvel foram determinados por HPLC (WATERS), usando como eluente 0,005 mol/L de ácido sulfúrico a um fluxo de 0,6 mL/min, com um detector de índice de refração a 35°C (WATERS 2414) e uma coluna BioRad HPX87H a 45° C. A celulose foi determinada a partir do conteúdo de glicose (g/L) multiplicado pelo fator de hidratação (0,9). A hemicelulose foi determinada a partir da soma de xilose e arabinose multiplicada pelo fator de hidratação (0,88). No bagaço *in natura* foi incluída na soma a concentração de acetil, determinada pelo ácido acético por HPLC e convertido a acetil pelo fator 0,53.

A lignina solúvel foi analisada por espectrofotometria a 205 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar da lignina de 105 L/g.cm. A lignina insolúvel foi determinada por gravimetria, sendo os cadinhos de placa sinterizada com as ligninas levados à estufa a 105°C para secagem até massa constante (FERRAZ et al., 2000).

4.13 Determinação de condições de extração enzimática da hemicelulose dos bagaços de cana pré-tratados

Todos os ensaios de extração enzimática da hemicelulose dos bagaços de cana-de açúcar pré-tratados foram conduzidos o extrato bruto de *B. pumilus*, com atividade de xilanase. As reações foram conduzidas em tubos falcon de 50mL e volume reacional de 10mL por 24 h, sob agitação recíproca de 120 ciclos/min. O meio reacional, com bagaço a 5% de consistência, foi tamponado (fosfato de sódio 50 mM pH 8). Após o tempo de reação enzimática, as amostras foram aquecidas em banho-maria a 100 °C durante 5 min, resfriadas e centrifugadas a 4750 g por 25min. O sobrenadante foi coletado e congelado para análises posteriores. Como controles, foram usadas as mesmas condições de reação substituindo extrato enzimático por tampão.

O rendimento de extração de xilana, a relação molar xilose/arabinose e a análise do perfil cromatográfico de oligômeros foram determinados.

4.13.1 Avaliação dos extratos enzimáticos de *B. pumilus* na extração de hemicelulose de bagaços de cana pré-tratados

Foram avaliados os extratos enzimáticos brutos de *B. pumilus*, produzidas no meio 2 (NAGAR et al., 2010) nos diferentes substratos: xilana de *oat spelts*, farelo de trigo, bagaço ou bagaço deslignificado. Os bagaços pré-tratados quimiotermomecanicamente (QTM) com 2,5%Na₂SO₃/1,25% NaOH; 5%Na₂SO₃/2,5%NaOH e 10%Na₂SO₃/5%NaOH e pouco lavados foram hidrolisados com as cargas de xilanase de 5 e 20 U/g, a 50 °C.

4.13.2 Avaliação da carga de xilanase do extrato enzimático *B. pumilus* na extração de xilana de bagaços de cana pré-tratados

O extrato bruto do cultivo de *B. pumilus* em meio 1 (MANDELS; STERNBERG, 1976), contendo farelo de trigo como fonte de carbono foi empregado nas cargas de xilanase de 5, 10 e 20 U/g de bagaço pré-tratado seco para extração das xilanas dos bagaços pré-tratados QTM com 2,5%Na₂SO₃/1,25% NaOH; 5%Na₂SO₃/2,5%NaOH e 10%Na₂SO₃/5%NaOH e pouco lavados. Uma condição excessiva de enzimas (100 U/g e 200 U/g) foi avaliada no bagaço pré-tratado com 10%Na₂SO₃/5%NaOH.

A extração de xilana do bagaço deslignificado com clorito por 2 e 4h, foi avaliada com as cargas de xilanase de 5 e 20 U/g de bagaço seco, em duplicata.

4.13.3 Avaliação da temperatura na extração enzimática de xilana do bagaço de cana pré-tratado.

Foi realizado um experimento para verificar o efeito da temperatura na eficiência de extração de xilana do bagaço pré-tratado QTM com 10%Na₂SO₃/5%NaOH e pouco lavado. No ensaio foi utilizado 20 U/g de bagaço pré-tratado seco nas temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 70 °C em pH 8.

4.13.4 Avaliação do tipo de lavagem do bagaço de cana-pré-tratado na extração enzimática de xilana.

A influência da lavagem do bagaço pré-tratado QTM com 10%Na₂SO₃/5%NaOH foi determinada realizando a extração enzimática de xilanas nos bagaços denominados como pouco lavado e lavado extensivamente (item 4.11), com carga enzimática de 20 U/g de bagaço pré-tratado seco, pH 8, a 50 °C por 24 h. Ambos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.14 Avaliação do efeito de vários compostos na xilanase de *B. pumilus*

O licor foi obtido no pré-tratamento QTM do bagaço pré-tratado com 10%Na₂SO₃/5%NaOH foi parcialmente caracterizado quanto ao teor de açúcares, ácidos e fenólicos totais. Glicose, xilose, arabinose, acetil foram determinados como descrito no item 4.17.1. Os fenólicos totais foram determinados por espectrofotometria em meio alcalino, sendo as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante obtido foi analisado a 280 nm, e a concentração calculada usando o coeficiente de absorvidade (20 L/g.cm) (MASARIN et al., 2011; GUERRA et al., 2000).

O efeito da dosagem de licor foi avaliado na hidrólise enzimática de xilana de *oat spelts* nas concentrações de: 0,11 g/L; 0,28 g/L; 0,55 g/L; 1 g/L e 5g/L, baseado na concentração de fenólicos. Os ensaios foram conduzidos com 20 U/ g de xilanase do extrato de *B. pumilus* a 50°C por 24 h, sob agitação recíproca de 120 ciclos/min em tubos falcon de 50 mL. Foram retiradas alíquotas nos tempos de 15, 30, 60, 120, 240 e 360 minutos e os açúcares redutores foram determinados para cada reação.

Também foi avaliado o efeito da adição de 5 g/L do licor sulfito alcalino na extração enzimática da hemicelulose do bagaço de cana pré-tratado QTM com 10%Na₂SO₃/5%NaOH, pouco lavado e lavado extensivamente (item 4.11). A reação foi conduzida com 20 U/g de xilanase por 24 h a 50 °C e 120 ciclos/min., com a consistência de 5% e volume reacional de 10 ml. Os controles utilizados foram: o bagaço pré-tratado incubado nas mesmas condições do ensaio na presença de 5g/L de licor e o bagaço pré-tratado incubado apenas com tampão.

O efeito de vários compostos na hidrólise de xilana de *oat spelts* foi avaliado conforme Liu e Zhu (2010). Os compostos utilizados individualmente foram sais metálicos

(MgSO₄, KCl), Tween 80, albumina bovina e PEG (4000 Da), nas concentrações de 1mmol/g xilana, 15 mg/g xilana, 10 mg/g xilana e 15 mg/g xilana, respectivamente. Os ensaios foram conduzidos com 20 U/ g de xilanase do extrato de *B. pumilus* a 50°C por 24 h, sob agitação recíproca de 120 ciclos/min em tubos falcon de 50 mL. A consistência da reação foi de 5% e volume reacional de 10 ml. Os açúcares redutores foram determinados para cada reação. Os efeitos desses mesmos compostos foram avaliados na etapa de extração enzimática da hemicelulose do bagaço de cana pré-tratado quimiotermomecanicamente com 10%Na₂SO₃/5%NaOH. As hidrólises foram realizadas em duplicata e no controle foram usadas as mesmas condições de reação substituindo extrato enzimático por tampão. Nos sobrenadantes foram feitas a pós- hidrolise para determinação de xilose e arabinose e cálculo do rendimento de extração das xilanas.

4.15 Extração alcalina a frio

Foi feita a extração alcalina a frio (CCE – *cold caustic extraction*) nos sólidos residuais do bagaço de cana, pré-tratado QTM com 10%Na₂SO₃/5%NaOH, e que teve parte da xilana extraída pela xilanase (20 U/g), a 50 °C por 24 horas. A extração alcalina a frio foi feita utilizando NaOH nas concentrações de 10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 70% (m/m) pela incubação por 30 min a 30 °C (GOMES et al., 2015). A suspensão foi centrifugada a 4750g por 20 minutos e os sobrenadantes foram congelados para análises posteriores. Foi feito um controle em que a extração alcalina foi substituída por extração em água e outro controle substituindo a enzima por água. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata,

4.16 Métodos de análises das xilanas

4.16.1 Composição das xilanas extraídas dos bagaços pré-tratados

As xilanas extraídas após os tratamentos enzimáticos foram transformadas em monômeros pela hidrólise em meio ácido, seguindo a metodologia de Sluiter et al. (2008). Uma aliquota de 200 µl de amostra foi diluída em 1 ml de água destilada e o pH foi determinado. Após a medição, foi adicionado 10 µl de HCl concentrado com a finalidade de diminuir o pH. Dependendo do pH obtido, foi adicionado um volume (tabelado), de ácido sulfúrico a 72% necessário para que a concentração final fique 4%. Após a adição do ácido, o volume final da amostra foi ajustado para 2mL em balão volumétrico e colocada em tubos

de ensaio com tampa. As amostras foram autoclavadas por 60 min a 1 atm. As concentrações dos monômeros (xilose, arabinose e glicose) liberados foram analisados em HPLC (WATERS), nas mesmas condições descritas na seção 4.12. Como controle foi utilizada 5 ml de uma solução de xilose a 0,15 g/l, a qual foi autoclavada nas mesmas condições descritas anteriormente e comparada com uma amostra de xilose 0,15 g/L, que não foi autoclavada. A degradação da xilose aceita foi de no máximo 5%.

4.16.2 Análise de açúcares por cromatografia em camada fina (TLC)

A cromatografia foi realizada em placas de sílica gel 60 F254 (Merck), utilizando como eluente uma mistura contendo acetato de etila:ácido acético:propanol:ácido fórmico:água (15:10:5:1:15) (PURCHART; BIELY, 2008). As amostras e padrões foram aplicados a 1 cm da parte inferior da placa ($\sim 1 \mu\text{L}$), a uma distância de 0,5 cm uma da outra. A placa foi seca a temperatura ambiente, antes de se iniciar a corrida cromatográfica. Uma cuba com tampa foi utilizada para acondicionar o solvente e a placa. Após o solvente ascender ao topo da placa, a mesma foi retirada e transferida para uma estufa a 45 °C até que estivesse livre de solvente. A revelação das amostras foi realizada pela aplicação de uma solução reveladora (1,8 g N(1-Naftil)etileno diamina dihidrocloreto em 200 mL de ácido sulfúrico concentrado) e incubada para em estufa a 100°C por aproximadamente 5 min. Após o aparecimento das manchas, a placa foi digitalizada (*software* Epsonscan).

4.16.3 Determinação das massas molares das xilanas extraídas

A determinação da massa das xilanas extraídas foi realizada por cromatografia de exclusão de tamanho, em coluna (100 cm x 1,5 cm) utilizando as resinas Bio-Gel P2 e Bio-Gel P30 (Bio-Rad), com as faixas de separação de 800-1800 g/mol e 2.500-40.000 g/mol, respectivamente. O eluente utilizado foi o tampão fosfato de sódio pH 8,0 (50 mM). Inicialmente, a resina utilizada foi lavada no eluente e empacotada na coluna, utilizando uma bomba peristáltica (Benchtop pump 120 U/DV - WATSON MARLOW) um fluxo de 0,3mL/minuto. Após a coluna estabilizar, foi aplicado 500 μL da amostra, e após a eluição das frações, os açúcares totais foram analisados pelo teste de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A partir destes dados, um perfil de eluição da amostra foi montado. Nas

amostras passadas na coluna P30, também foi medido a absorbância em 280 nm, para verificar a presença de proteínas e lignina na amostra.

A massa molar das xilanas foi determinada através de uma curva padrão traçada do logaritmo da massa molar contra a mobilidade relativa dos padrões. Para a calibração da coluna Bio-Gel-P2, utilizou a glicose (180 g/mol), maltose (340g/mol), rafinose (504g/mol), vitamina B12 (1.355g/mol) e dextrana T3.5 (3.500g/mol). Já para a calibração da coluna Bio-Gel P30, utilizaram-se a glicose (180 g/mol), vitamina B12 (1.355g/mol), lisozima (14.300g/mol), anidrase carbônica (29.000g/mol) e álcool desidrogenase (15.000g/mol).

4.16.4 Açúcares redutores

A determinação dos açúcares redutores foi realizada de acordo Miller (1959) com o reagente DNS (2-hidroxi-3, 5 ácidodinitrobenzóico), sendo adicionados 1,5 ml deste a 1 ml de sobrenadante. Em seguida, os tubos foram levados para ebulição à 100 °C por 5 minutos, resfriado e medido a absorbância à 540 m.

4.17 Rendimento de xilana extraída

O cálculo de extração da xilana foi realizado considerando a massa de xilose extraída do bagaço pré-tratado, pela massa de xilose presente no material original. A concentração de xilana foi determinada pela equação: $\text{Rendimento} = A \times 100/B$, conforme o exemplo:

A) cálculo da concentração de xilana extraída

Considerando xilose = 2,5 g/l (determinado por HPLC)

concentração de xilana = 2,5 g/L x 0,88 (fator de conversão) = 2,2 g/L

B) cálculo da concentração de xilana no material original:

Considerando a massa bagaço pré-tratado utilizada - 0,5 g e a

porcentagem de xilana no bagaço pré-tratado (10% de sulfito e 5% de álcali) - 23,10%

$0,5 \times 0,231 = 0,1155$ g (massa de xilana)

Massa de xilana 0,1155 g em 10 ml de reação ou 11,55 g/L

$\text{Rendimento de xilana extraída} = 2,2 \times 100 / 11,55 = 19\%$.

4.18 Hidrólise enzimática da celulose residual dos bagaços de cana pré-tratados

A hidrólise enzimática foi realizada em tubos Falcon de 50mL com agitação de 120 rpm e a 45 °C. Os substratos utilizados para esta hidrólise foram: o bagaço pré-tratado QTM (10%Na₂SO₃/5%NaOH); o bagaço pré-tratado/extraído com xilanase; o bagaço pré-tratado, hidrolisado com o extrato enzimático e extraído com 20% NaOH (m/m); o bagaço pré-tratado/extraído com xilanase/extraído com 70% NaOH (m/m) e o bagaço pré-tratado/extraído com 70% NaOH. Os ensaios de extração enzimática de hemicelulose foram conduzidos a 50 °C por 48 horas, sob agitação recíproca de 120 ciclos/min em tubos falcon (de 50 mL) e o volume reacional de 10 mL. O meio reacional, com os substratos a 5% de consistência, foi preparado em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 com azida sódica 0,01% (m/v) (acetato de sódio 50 mM, pH 4,8). A enzima utilizada para a hidrólise da celulose foi a Cellic CTec2 (Novozymes), na carga de 10 FPU/g de bagaço. Foram retiradas alíquotas nos tempos de 3, 6, 8, 24 e 48h e imediatamente fervidas a 100 °C por 5 minutos, resfriadas e centrifugadas a 4750g por 15 minutos. Os açúcares presentes no sobrenadante foram analisados por HPLC (WATERS), usando como eluente 0,005 mol/L de ácido sulfúrico a um fluxo de 0,6 mL/min, com um detector de índice de refração a 35°C (WATERS 2414) e uma coluna BioRad HPX87H a 45 °C. A conversão enzimática da celulose foi realizada utilizando a massa de glicose, multiplicada pelo fator de hidratação (0,9) obtida após a hidrólise enzimática dividida pela massa de glucana presente no bagaço. A conversão de xilana foi feita utilizando a massa de xilose multiplicada pelo fator de hidratação (0,88) obtida após a hidrólise enzimática dividida pela massa de xilana no bagaço.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de xilanase por *Bacillus pumilus*

O crescimento e a produção de xilanase por *Bacillus pumilus* foram comparados em dois meios de cultivos. O meio 1 foi reproduzido dos trabalhos desenvolvidos por Duarte et al. (1999) e Oliveira et al., (2009), com a mesma cepa de *B. pumilus*. O meio 2 foi igual ao reportado por Nagar et al., (2010), para a produção de enzimas relacionadas à hidrólise de hemicelulose por *Bacillus pumilus* SV-85S. O meio 1 apresenta uma maior variedade de sais em sua composição que o meio 2, e foi suplementado com peptona e ureia. O meio 2 foi preparado com apenas 3 sais (KNO_3 , KH_2PO_4 e MgSO_4), porém foram utilizados extrato de levedura e peptona, em uma concentração cinco vezes mais alta que a usada no meio 1. Em ambos os meios, foram utilizados substratos indutores que contém xilana em sua composição, visando a indução de enzimas. Como indutores foram utilizados o farelo de trigo (FT), o bagaço de cana-de-açúcar (BC) e o bagaço deslignificado (BD). Além destes, no meio 2 foram avaliados outros dois substratos, o bagaço pré-tratado com sulfito alcalino (BPT) e uma mistura de xilo-oligossacarídeos (XOS). Como controle, foi feito o cultivo de *B. pumilus* em xilana comercial isolada de *oat spelts* (XOA).

O conteúdo de carboidratos dos substratos é bem diferente (FT = 41,6%; BC = 64,8%, BD = 72,1%, BPT = 73,68) enquanto que, o teor de hemicelulose apresenta variações menores (FT = 33%; BC = 27,6%; BD = 26 %, BPT = 25,8%). Parte destas hemiceluloses são solubilizadas durante a autoclavagem dos meios, tornando-se mais disponíveis para serem utilizadas pela bactéria na produção das enzimas. Porém, no presente estudo, não foi quantificado quanto desta hemicelulose é solubilizada.

A figura 8 mostra as atividades de xilanases produzidas em 24 horas de cultivo de *B. pumilus* nos meios 1 e 2 em pH 8,5 ou 9,5, na presença de diferentes substratos. No cultivo de *B. pumilus* no meio 1 em pH 8,5, a maior atividade de xilanase foi produzida em farelo de trigo (37,7 U/mL). Em xilana e no bagaço de cana deslignificado, a produção de xilanase foi de 21,7 e 28,5 U/mL, respectivamente. No bagaço de cana *in natura* houve uma produção expressiva de xilanase (9,9 U/mL), apesar de ser um substrato mais recalcitrante em comparação aos demais utilizados. As máximas atividades de xilanases produzidas no cultivo em pH 9,5 em xilana, farelo de trigo, bagaço deslignificado e bagaço *in natura* foram 33,1; 29,0; 30,9; e 9,4 U/mL, respectivamente. As maiores diferenças nas atividades de xilanase em relação ao pH do meio foram encontradas em farelo de trigo e xilana *oat spelts*.

As maiores atividades de xilanase de *B. pumilus* produzidas no meio 2, em pH 8,5, foram obtidas em xilana (228 U/mL) e farelo de trigo (219,7 U/mL). Em bagaço, bagaço deslignificado, bagaço pré-tratado com sulfito alcalino e em XOS as atividades de xilanase foram de 28,4; 140,9; 15,6 e 0,1 U/ml, respectivamente. Por outro lado, as atividades de xilanase produzidas em pH 9,5 em xilana, farelo de trigo e bagaço deslignificado foram próximas, 181, 175,6 e 181 U/ml, respectivamente. Em bagaço, bagaço pré-tratado e lavado e em XOS, as atividades produzidas no meio com pH 9,5 se mostraram menores, 24, 19 e 10 U/ml, respectivamente.

A produção de xilanases foi sempre maior no meio 2, principalmente no pH 8,5. As diferenças nas atividades podem ser atribuídas à composição dos meios de cultivo, relacionadas às fontes de carbono e de nitrogênio. No meio 1, foi utilizado 1% de substrato, diferente do meio 2, que foi utilizado 3%, com exceção ao meio 2 com XOS, onde a concentração foi bem mais baixa (0,3%). Outra diferença é relativa à fonte de nitrogênio utilizada, o meio 1 continha peptona (0,1%), (NH₄)₂SO₄ (0,14%) e uréia (0,03%), enquanto que no meio 2, foi utilizada a combinação de peptona (0,5%), extrato de levedura (0,5%) e KNO₃ (0,5%).

Uma comparação da atividade de xilanase produzida em diferentes pHs mostra semelhanças para alguns substratos, e em outros a diferença foi maior, como no caso do meio 2 com XOS, onde a atividade passou de 0,1 U/ml no pH 8,5 para 10 U/ml no pH 9,5. No meio com farelo de trigo a produção de xilanases foi maior no pH 8,5. Mesmo com estas diferenças, pode ser observada uma boa produção de xilanases de *B. pumilus*, em condições alcalinas. Por outro lado, quando *B. pumilus* foi cultivado no meio 1, pH 4,8 a atividade enzimática apresentou uma diminuição significativa em todos os substratos de cultivo (XOA: 3,0 U/mL; FT: 1,1 U/mL; BC: 0,4 U/mL; BD: 0,6 U/mL). Estas observações estão de acordo com os estudos de Duarte et al. (1999), que cultivaram a mesma cepa de *B. pumilus* no meio 1 em diferentes pHs e obtiveram a maior atividade de enzimática em pH10, a qual foi drasticamente reduzida quando o pH foi diminuído para 5. Outros estudos mostram essa mesma característica para outras cepas de *Bacillus* (KAPOOR NAIR; KUHAD, 2008; NAGAR et al., 2010, 2012).

Nos cultivos com glicose, não foi observado atividade de xilanase em ambos os meios, o que também é observado em *Bacillus cereus* quando cultivado em um meio mínimo com 1% de glicose (MANDAL et al., 2012). Outros estudos com *Bacillus* spp. mostram que a adição de glicose junto com um material lignocelulósico diminui a produção de xilanase conforme o aumento da concentração desse açúcar (BATTAN; SHARMA; KUHAD, 2006;

SANGUI et al., 2008). Em *Geobacillus stearothermophilus* T-6 é observado que a adição de glicose ao meio diminui cerca de 70% a produção da xilanase extracelular (SHULAMI et al., 2014).

Quanto ao tipo de substrato, a maior atividade de xilanase foi obtida em xilana e em farelo de trigo, em ambos os meios. É importante ressaltar que a produção de xilanase em bagaço deslignificado foi próximo ao do farelo de trigo, mostrando o seu potencial como substrato para indução da xilanase. Um estudo com *B. pumilus* B20, mostra uma alta produção de xilanase em farelo de trigo, com a atividade de 84 U/ mL (GEETHA; GUNASEKARAN, 2010). Em bagaço de cana-de-açúcar, este isolado também foi capaz de produzir xilanases (25,33 U/ mL). Menon et al., (2010) também observaram a produção de xilanases de *B. pumilus* GESF-1 em bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (0,2U/ mL). Outros estudos utilizando *B. pumilus* mostram que a maior produção de xilanase ocorreu quando se utilizou o farelo de trigo (POORNA; PREMA, 2007; KUMAR et al., 2014). Os autores reportam o farelo de trigo como sendo um substrato apropriado à produção de xilanases em escala comercial, por possuir em sua composição aminoácidos e vitaminas essenciais ao crescimento microbiano. Além disso, seu custo é bem menor que de xilanas comerciais (KUMAR et al., 2014; MITTAL; NAGAR; GUPTA, 2013).

Em relação à produção e secreção de outras enzimas relacionadas à degradação de celulose e hemicelulose, foi verificada uma baixa atividade em alguns substratos, e em outros não apresentaram produção. Em ambos os meios, não foi detectada a atividade da arabinofuranosidase e as atividades de β -glicosidase e β -xilosidase foram muito baixas ($\leq 0,001$). Estes dados estão de acordo com Duarte et al. (2003), que também relataram uma baixa atividade destas duas enzimas no meio 1, preparado em pHs entre 5 e 9 de $\leq 0,07$ de β -glicosidase e $\leq 0,02$ de β -xilosidase. Em relação à β -xilosidase, é comumente observado que a mesma não é produzida por diferentes espécies de *Bacillus* (REDDY; KRISHNAN, 2016). Esta ausência da produção de β -xilosidase extracelular é relatada como sendo uma estratégia dos *Bacillus* spp., e também é observada e descrita em *Geobacillus* spp., para consumir as xilanas em maior velocidade (SHULAMI et al., 2014). Estes microrganismos secretam endoxilanases para hidrolisar xilana a oligossacarídeos, os quais são transportados através de permeases especializadas para sua degradação intracelular (SHULAMI et al., 1999; 2007, 2014; TEPLITSKY et al, 2000), produzindo atividades pouco expressivas de β -xilosidase extracelular (TEPLITSKY et al, 2000). Este dado também explica o fato do microrganismo conseguir crescer em um meio contendo XOS, sendo estes degradados por β -xilosidase intracelular.

Figura 8- Atividade xilanase de *Bacillus pumilus* em diferentes substratos presentes no meio 1(A) (MANDELS; STENBERG, 1976) e meio 2 (B) (NAGAR et al., 2012), em pH 8,5 e pH 9,5 após 24 h de incubação a 45 o C.

Fonte: Arquivo pessoal.

Especificamente no meio 1, a atividade de endoglucanase foi inferior a 0,6 U/mL em ambos os pHs e substratos e não foi detectada a atividade desta enzima quando *B. pumilus* foi cultivado no meio 2. Outros estudos utilizando *B. pumilus* relataram a sua capacidade de produzir xilanase livres de celulasas (KAMBLE; JADHAV, 2012; NAGAR et al., 2010, 2012). Para aplicações em que se deseja hidrolisar apenas a hemicelulose, preservando a celulose para etapas posteriores do processo, a ausência de celulase nos extratos enzimáticos de *B. pumilus* possibilita a utilização do extrato bruto sem a necessidade de purificação da xilanase.

Outro fator observado no cultivo foi em relação ao pH (tabela 3). Inicialmente, ambos os meios foram ajustados o pH para 8,5 e 9,5 com NaOH e após o cultivo foi observado que ocorreu uma pequena variação no pH do meio de cultivo, sendo que os meios continuavam com pHs alcalinos. A exceção foi no meio 1 com xilana de *oat spelts*, onde o pH final alterou de 8,5 para 6,1 e de 9,5 para 6,5. Estas mudanças de pH estão relacionadas ao metabolismo

do microrganismo, em que a fermentação dos carboidratos a ácidos orgânicos pode reduzir o pH do cultivo, bem como a oxidação dos ácidos orgânicos ou dos aminoácidos a amônia, pode elevar o pH do meio (ROBINSON, WIMPENN; ARNSHAW, 1991).

Tabela 3- Determinação do pH dos cultivos de *B. pumilus* em diferentes substratos presentes no meio 1 (MANDELS; STENBERG, 1976) e meio 2 (NAGAR et al., 2012).

Substratos utilizados no cultivo	Meio 1		Meio 2	
	pH inicial (0 h)	pH final (24 h)	pH inicial (0 h)	pH final (24 h)
<i>Xilana oat spelts</i>	8,5	6,1	8,5	8,9
	9,5	6,5	9,5	9,0
Farelo de trigo	8,5	8,3	8,5	8,4
	9,5	8,7	9,5	9,5
Bagaço	8,5	8,3	8,5	8,4
	9,5	8,2	9,5	9,0
Bagaço deslignificado (clorito 4 h)	8,5	7,8	8,5	8,4
	9,5	8,3	9,5	8,6
Bagaço pré-tratado	8,5	—	8,5	8,8
	9,5	—	9,5	9,0
Xilo-oligômeros (XOS)	8,5	—	8,5	8,6
	9,5	—	9,5	9,2

Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto as proteínas presentes no sobrenadante do cultivo de *B. pumilus*, foi observada uma maior concentração de proteínas no meio 2 (figura 9 B). As proteínas foram produzidas extracelularmente pela bactéria, mas uma parte destas proteínas pode ser proveniente do meio de cultivo, visto que este meio contém peptona e extrato de levedura que podem não ter sido totalmente consumidos durante o cultivo. Da mesma forma, nos meios preparados com farelo de trigo também não é possível atribuir a concentração proteica somente a proteínas produzidas pelo *B. pumilus*, já que o farelo de trigo apresenta proteínas em sua composição (15,9%), sendo muito provável que parte delas tenha sido solubilizada durante o cultivo.

Figura 9- Concentração de proteínas nos sobrenadantes do cultivo de *B. pumilus* no meio 1 (MANDELS; STENBERG, 1976) (A) e no meio 2 (NAGAR et al., 2010) (B) em pH 8,5 e em pH 9,5 após 24 h de incubação a 45 o C.

Fonte: Arquivo pessoal.

Em ambos os meios, foi observada uma maior produção de proteínas quando utilizado o farelo de trigo como substrato. Em contraponto, a menor produção de proteínas foi determinada nos meios com glicose, especialmente em pH 9,5.

No meio 1, a produção de proteínas a partir dos substratos xilana, bagaço deslignificado e farelo de trigo foram similares (~ 0,10 mg/mL) e ocorreu um aumento nas proteínas do meio com farelo de trigo em pH 9,5 (0,16 mg/mL) (figura 9 A).

No meio 2, com farelo de trigo a produção de proteínas foi maior que em xilana, em ambos os pHs de cultivo. As proteínas dos sobrenadantes dos cultivos em bagaço, bagaço pré-tratado e lavado e em XOS foram parecidos. O resultado de produção de proteínas no meio XOS é muito relevante, considerando a baixa concentração deste substrato no preparo do meio (0,3%) (figura 9 B). Esse dado reforça a informação de que os produtos de degradação de xilanas são consumidos pelo *B. pumilus*, mesmo na ausência de β -xilosidades.

O perfil de proteínas produzidas por *B. pumilus* em cada condição de cultivo pode ser visualizado em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Como pode ser observado nas figuras 10 e 11, o microrganismo secreta uma variedade de proteínas com massas molares entre 78,5 kDa e 19,5 kDa no meio 1 e entre 95,8-15,7 kDa no meio 2. Três bandas com massas molares correspondentes a 54,9 kDa, 30,9 kDa e 24,1Z kDa apareceram mais fortes nos géis (Figura 10). Especificamente, no meio 1 em xilana, apareceu uma banda com massa de 38,2 kDa, que não foi identificada nas outras condições de cultivo. Os géis da figura 11 não apresentaram uma resolução muito nítida das bandas proteicas, o que foi atribuído aos componentes do meio de cultivo 1, que não foram completamente consumidos pelo *B. pumilus*. Desta forma, mesmo padronizando a concentração de proteínas aplicadas nos géis, uma parte delas pode ter saído do gel, principalmente peptonas que foram parcialmente hidrolisadas pela bactéria durante o seu crescimento.

Não foi feita uma análise de secretoma mais detalhada desta bactéria mesmo assim procurou-se atribuir a algumas das bandas do gel uma função, baseada na descrição das proteínas secretadas por *B. pumilus* Jo2 em meio mínimo (HANDTKE et al., 2014). A correspondência se baseou na identidade de massa molar das bandas dos géis.

Em seu trabalho Handke et al (2014) identificaram uma proteína de 63 kDa, relacionada ao metabolismo de coenzimas; uma proteína de 53kDa responsável pela estabilidade osmótica da célula, e em 52 kDa uma proteína degradadora de pectinas. A proteína com massa de 35 kDa, foi identificada como uma partícula sinal de reconhecimento (SRP, *signal recognition particle*), encarregada de manter sua pré-proteína alvo sem dobrar (estrutura terciária não ativa) e transportá-la até seu receptor de união de membrana.

Figura 10- Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) dos sobrenadantes de cultivo de *B. pumilus* em diferentes substratos, utilizando o meio 1, no pH 8,5 e no pH 9,5 (MANDELS; STENBERG, 1976). Padrões (P), substratos: Xilana (1 e 6), bagaço (2 e 7), bagaço deslignificado (3 e 8), farelo de trigo (4 e 9) e glicose (5). Gel corado com nitrato de prata.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 11- Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) dos sobrenadantes de cultivo de *B. pumilus* em diferentes substratos, utilizando o meio 2 no pH 8,5 e no pH 9,5 (NAGAR et al., 2012). Padrões (P), substratos: Xilana (1 e 8), bagaço (2 e 9), bagaço deslignificado (3 e 10), farelo de trigo (4 e 11), bagaço pré-tratado e lavado (5 e 12), xilo-oligômeros (6 e 13) e glicose (7 e 14). Gel corado com nitrato de prata.

Fonte: Arquivo pessoal.

As proteínas ativas na cadeia transportadora de elétrons, relacionado a síntese de ATP apresentaram massas na faixa de 45kDa (HANDTKE et al., 2014). Foi descrita uma poli- γ -glutamato de 44 kDa, comumente presente em todos os microrganismos da classe Bacilli, em especial as do gênero *Bacillus*. Esta proteína auxilia o microrganismo em ambientes adversos (CANDELA; FOUET, 2006; HANDTKE et al., 2014). Também foi encontrada uma proteína com massa de 41 kDa, uma L-asparaginase, que está relacionada ao metabolismo de peptídeos (HANDTKE et al., 2014).

Foi encontrada um endoglucanase de 27 kDa e uma proteína com massa de 26 kDa com a função de catalisar ligações dissulfeto presentes em outras proteínas; a proteína de 23 kDa, está relacionada ao metabolismo de lipídeos e as bandas de massas molares 20 kDa, 21 kDa e 22 kDa foram descritas como peptídeo sinais de clivagem (HANDTKE et al., 2014).

Para verificar a massa da xilanase presente no extrato enzimático bruto, foi realizado um gel de atividade (zimograma), acrescentado 0,1% xilana de *oat spelt* durante o preparo do gel de SDS-PAGE. Como controle, foi feita uma corrida ao mesmo tempo e na mesma cuba eletroforética de um gel SDS-PAGE sem xilana (Figura 12). Foram aplicadas nos géis apenas as amostras dos cultivos em xilana de *oat spelts* e no farelo de trigo, nos meios 1 e 2. Após a corrida, o gel para zimograma foi incubado em tampão fosfato pH 8,0 com Triton X-100 por 1 hora, onde o SDS foi removido e as proteínas renaturadas. Em seguida, o gel foi incubado no pH e temperatura de atividade da xilanase de *B. pumilus* e em seguida foi aplicado uma solução de vermelho congo e posteriormente, lavado com solução de NaCl, no intuito de remover xilanas que foram degradadas enzimaticamente durante a incubação. Esse efeito pode ser visualizado pela coloração do gel com vermelho congo, que apresenta afinidade pelas cadeias longas de polissacarídeos (BRECCIA et al, 1995). Em alguns locais apareceu uma mancha transparente, atribuída à degradação enzimática da xilana. Na figura 12 A, pode-se observar uma mancha mais clara nas quatro amostras analisadas no gel de atividade. A degradação ocorreu no mesmo local para as diferentes amostras, mostrando que a xilanase presente no extrato enzimático está sendo produzida nos meios diferentes e em diferentes substratos. Esta mancha correspondeu à banda de aproximadamente 23 kDa no gel de SDS (figura 12 B).

Figura 12- Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) dos sobrenadantes de cultivo de *B. pumilus* em diferentes substratos, utilizando o meio 1 (MANDELS; STENBERG, 1976) (1 e 3) e o meio 2 (NAGAR et al.,2012) (2 e 4), cultivados com os substratos: xilana (1 e 2) e farelo de trigo (3 e 4). Foi utilizado um marcador de massa molar como padrão (P). Gel revelado com vermelho congo (Zimograma) (A) e corado com nitrato de prata (B). A banda transparente no zimograma corresponde a xilanase. No gel corado com nitrato de prata a banda mais intensa com massa molar 23 kDa, deve corresponder a xilanase.

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com o banco de dados de enzimas ativas em carboidratos CAZY, as cepas de *Bacillus pumilus* que tem o genoma descrito apresentam xilanases que pertencem às famílias glicosil hidrolases (GH) 10, 11 e 30. As GHs 10 e 30 apresentam massas molares aproximada de 47 KDa, enquanto a GH 11 apresenta uma massa molar de aproximadamente 25 kDa (CAZY). Em ambos os meios e substratos de cultivo, foi verificada a presença de uma proteína com a massa entre 22-23 kDa, e esta proteína é uma xilanase, confirmada ao se realizar o zimograma. Ao analisar as GH11 no CAZY e com auxílio do programa de bioinformática EXPAZY, foi verificado uma cepa de *Bacillus pumilus* que apresenta uma xilanase com a massa de 23,3 kDa. Em outras espécies de *Bacillus*, também é reportado xilanases com a massa de 23 kDa.

5.2 Caracterização da xilanase de *Bacillus pumilus*

5.2.1 Efeito da temperatura e do pH

Para a utilização da enzima, é necessária sua caracterização em relação ao pH e temperatura. O extrato enzimático obtido do cultivo de *B. pumilus* em meio 1, em pH 8,5 e na presença de farelo de trigo foi avaliado quanto às atividades de xilanase em função da temperatura de reação (30-70 °C) e do pH (entre 5 e 10) (Figura 13). A ação da xilanase em função da temperatura indicou níveis elevados de atividade entre 40-55 °C e reteve mais de 50% da atividade entre 30 °C e 65 °C demonstrando serem as xilanases de *B. pumilus* ativas em ampla faixa de temperatura (Figura 13 A). As atividades diminuíram em temperaturas maiores que 60 °C, até que a 80 °C a atividade foi próxima de zero (0,7 U/mL) (Figura 13 A). Estes dados concordam com aqueles obtidos para xilanase deste microrganismo que apresentou temperatura ótima de 55 °C, apresentado por Duarte et al. (2003). Outros trabalhos com xilanases purificadas de *Bacillus* spp. apresentam a temperatura ótima da enzima na faixa de 40-50 °C (MITTAL; NAGAR; GUPTA, 2013; MENON et al., 2010; POORNA, 2011; SUBRAMANIYAN, 2012).

As maiores atividades de xilanases foram obtidas em pH entre 7-8. Em pH 9 e 10 a atividade reduziu em 20% e 50%, respectivamente (Figura 13 B). Uma xilanase purificada de *Bacillus pumilus* GESF-1, também apresentou pH ótimo de 8. A faixa de atuação em pH 7-8 é adequada para a utilização das xilanases em substratos advindos de processos alcalinos de polpação, como nos processos Kraft e sulfito alcalino (FENGEL; WEGENER, 1989). É possível a aplicação do tratamento enzimático diretamente nas polpas evitando etapas de ajuste de pH (MAMO; HATTI-KAUL; MATTIASSON, 2016). Outra vantagem é que pH alcalinos auxiliam na extração das xilanas, uma vez que estas são mais solúveis nesta condição (MENON et al., 2010).

Figura 13- Determinação da temperatura (A) e pH (B) ótimos da xilanase de *B. pumilus* no cultivo em meio 1 com farelo de trigo (pH8,5). Para a determinação do pH ótimo a temperatura utilizada foi de 50°C (23) e para a determinação da temperatura ótima o pH utilizado foi 8.

Fonte: Arquivo pessoal.

O extrato enzimático de *B. pumilus* foi avaliado quanto à estabilidade da xilanase em função do pH (entre 6 e 9) e da temperatura de reação (40-60 °C) (Figura 14). A estabilidade da xilanase em relação à temperatura mostrou que a 40 °C a atividade se manteve em 47% até uma hora e meia de reação. Nas temperaturas mais elevadas, a estabilidade após 10 minutos foi na faixa de 30% e 10% a 50°C e 60 °C, respectivamente. Estes dados mostram que as xilanases são pouco estáveis nessas temperaturas, o que corrobora com dados obtidos

utilizando *Bacillus pumilus* (YASINOK et al., 2010). Este estudo também mostra que a enzima tem uma estabilidade maior a 40 °C que a 60 °C, com a atividade residual de 76% e 2% após 45 minutos de reação, respectivamente. Outros estudos também mostram a estabilidade em temperaturas mais baixas (30-50 °C) em cepas de *Bacillus* spp. (MITTAL; NAGAR; GUPTA, 2013; SUBRAMANIYAN, 2012).

Figura 14- Estabilidade em temperatura (A) e pH (B) da xilanase de *B. pumilus* cultivada em farelo de trigo (pH8,5). Para a determinação do pH ótimo a temperatura utilizada foi de 50°C (23) e para a determinação da temperatura ótima o pH utilizado foi 8.

Fonte: Arquivo pessoal.

O pH não influenciou a estabilidade da enzima. Estudos utilizando *Bacillus* sp. (SV-34S) e *Bacillus pumilus* mostram uma alta estabilidade em pH 6-8, após 15 e 30 minutos, da fração de xilanase purificada (MITTAL; NAGAR; GUPTA, 2013; SUBRAMANIYAN, 2012). Desta forma, a purificação da proteína pode contribuir para a estabilidade da enzima, ou até mesmo o tipo de tampão distinto do utilizado nos estudos.

5.2.2 Modo de ação do extrato enzimático de *Bacillus pumilus*

O extrato enzimático de *B. pumilus* foi utilizado para hidrolisar as xilanas comerciais de *oat spelts*, *birchwood* e a xilana de *beechwood* e comparar o modo de ação em tempos curtos e longos (figura 15). A xilana de *oat spelts* é uma arabinoxilana e as xilanas de *birchwood* e *beechwood* são glucuronoxilanas, a segunda com um maior grau de ramificação. Com as xilanas de *birchwood* e de *oat spelts* foram realizadas hidrólises, retirando alíquotas em tempos curtos (figura 15 A). No início da reação (0 a 30 min), a liberação de açúcares redutores foi igual para as duas xilanas, e após o tempo de 30 minutos, ocorreu uma maior liberação de açúcar da xilana de *birchwood* (4,26 g/L) que de *oat spelts* (3,04 g/L). Depois deste tempo a liberação de açúcares redutores das duas xilanas foi muito similar, alcançando os valores de 6,48 e 5,83 g/L para xilana de *birchwood* e *oat spelts*, respectivamente.

Uma hidrólise em tempos mais longos foi feita com a xilana de *oat spelts*, porém neste ensaio a xilana de *birchwood* foi substituída pela xilana de *beechwood* (figura 15 B). Esta troca de substrato precisou ser feita porque durante o ensaio a xilana de *birchwood* estava se solubilizando muito no pH 8. Depois de 2 h de reação não estava sendo mais possível distinguir os valores de absorbância dos ensaios de hidrólise enzimática da xilana e do seu controle (branco do substrato).

Pode-se observar que nas primeiras duas horas, a hidrólise das xilanas foi similar, como ocorreu no ensaio anterior (Figura 15 A) e a partir de 6 horas, os açúcares redutores foram mais expressivos na xilana de *beechwood* que na xilana de *oat spelts*.

Figura 15- Cinética de liberação de açúcares redutores (DNS) a partir das xilanas comerciais de *birchwood*, *beechwood* e de *oat spelts* e com o extrato enzimático de *B. pumilus*, em tempos curtos (A) e longos (B).

Fonte: Arquivo pessoal.

Também foi realizada a determinação da composição de xilose e arabinose presentes nas amostras coletadas nos diferentes tempos de hidrólise da xilana de *oat spelts* (Tabela 4). A xilana de *oat spelts* tem em sua composição 8,5 xiloses para 1 resíduo de arabinose. A composição das xilanas de *birchwood* e *beechwood* não foi determinada, porque o ácido glucurônico das amostras não pode ser analisado neste trabalho. Como pode se observar, a relação xilose:arabinose da xilana de *oat spelts* diminui após duas horas de reação (7,3), indicando que os produtos da hidrólise solúveis no meio de reação devem constituir-se de xilo-oligômeros ramificados com arabinose. Entre 2 e 6 h, a relação xilose: arabinose aumentou um pouco (9,2), possivelmente pela continuidade da reação de hidrólise enzimática nos oligômeros presentes no sobrenadante. Depois de 24 h de reação a relação xilose: arabinose varia pouco no sobrenadante. Verificou-se a presença de xilana até o final da hidrólise, que não foi mais hidrolisada pela xilanase. Esse resultado sugere a formação de inibidores durante a reação de hidrólise da xilana, ou a limitação estrutural no substrato para a xilanase atuar.

Tabela 4- Composição açúcar total da fração líquida (por pós hidrólise) após a hidrólise de xilana de *oat spelts*, em tempos longos.

Tempo (horas)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xil/Ara	Extração (%)
0	0	0	0	0
2	10,8 ± 0,3	1,5 ± 0,1	7,3	24,6
6	11,1 ± 1,7	1,2 ± 0,1	9,2	24,6
24	11,6 ± 1,9	1,5 ± 0,3	7,6	26,2
48	12,8 ± 1,8	1,6 ± 0,2	8,2	28,8
72	14,2 ± 1,4	1,7 ± 0,1	8,3	31,8
96	14,4 ± 1,6	1,8 ± 0,1	8,0	32,0

Fonte: Arquivo pessoal.

A cromatografia em camada fina (TLC) dos produtos de hidrólise de cada uma das xilanas não mostrou diferenças no perfil de produção de xilo-oligômeros (XOS) no tempo de reação (figura 16). Os principais produtos da xilana de *beechwood* foram XOS com graus de polimerização maior que 3. Xilobiose (X2), xilotriose (X3) e xilotetraose (X4) foram identificados por meio da coincidência com o fator de retenção (Rf) dos padrões. A hidrólise da xilana de *oat spelts* produziu XOS com Rf entre os padrões X3 e X4, provavelmente de arabinoxilotriose (AraX3) e maior que X4, provavelmente de arabinoxilotetraose (AraX4).

Outros trabalhos utilizando xilanas comerciais com xilanases de *Bacillus* spp., mostram a presença de XOS com grau de polimerização de X2 a X4 (KALLEL et al., 2015; KAMBLE; JADHAV; 2012). A obtenção de XOS geralmente é realizada enzimaticamente, por ser mais seletiva e ao mesmo tempo não produzir compostos indesejáveis (ÁLVAREZ et al., 2017; CARVALHO et al., 2013).

O grau de polimerização dos xilo-oligossacarídeos em geral varia de 2 a 20 (CARVALHO et al., 2013; MÄKELÄINEN et al., 2010; VÁZQUES et al., 2000;), porém não foi possível a detecção de muitos destes porque a cromatografia em camada fina (TLC) apresenta limitações para detecção de XOS com grau de polimerização maior que 6. Em ambas as amostras de xilana nos diferentes tempos de reação, foram visualizadas manchas na TLC que não saíram da origem. Este resultado indica a presença de xilanas e XOS maiores do que foi possível separar e detectar por TLC.

Figura 16- Cromatografia em camada fina (TLC) dos produtos da cinética de hidrólise enzimática de xilana de *beechwood* e da xilana de *oat spelts* com o extrato de *B. pumilus*. C- controle da reação sem enzima; A- açúcares liberados na reação enzimática. Foi aplicada uma amostra com a mistura de padrões: xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4).

Fonte: Arquivo pessoal.

No intuito de determinar o perfil dos produtos de hidrólise da xilana de *oat spelts*, o sobrenadante da reação enzimática por 96 horas foi analisado em uma coluna de exclusão molecular, com faixa de separação entre 2.500 a 40.000 g/ mol (Bio-Gel P30) (figura 17). Um pico com alta massa (34.150 g/mol) foi eluído da coluna, mas as maiores concentrações dos açúcares corresponderam a xilanas com massas entre 18.958 a 2.940 g/mol.

Figura 17- Perfil cromatográfico da xilana *oat spelts* 1% preparada em tampão pH 8 e do sobrenadante, obtido após a hidrólise da xilana com a xilanase de *B. pumilus*, pH 8, 50 °C e 96 h, em Bio-Gel P30.

Fonte: Arquivo pessoal.

Após a hidrólise enzimática da xilana de *oat spelts* por 96 horas o sobrenadante foi separado da fração sólida (sólido 1) por centrifugação. Ao sobrenadante foi adicionado etanol obtendo-se um precipitado (sólido 2). O sólido 2 apresentou xilanas menores que o sólido 1, como pode ser visto pelo perfil dos açúcares dos controles (figura 18). Ambos os sólidos foram hidrolisados pelo extrato enzimático de *B. pumilus* e também por uma xilanase GH 10 comercial de *Thermotoga maritima*. A xilana hidrolisada com o extrato de *B. pumilus* produziu XOS com maior grau de polimerização do que pela reação das xilanas com a xilanase de *T. maritima*. Esta é mais uma evidência que a xilanase produzida por *B. pumilus* seja da família GH11.

Figura 18- Cromatografia em camada fina (TLC) dos produtos de hidrólise da xilana de *oat spelts* com a xilanase de *B. pumilus* (XBp), pela xilanase comercial de *Thermotoga maritima* (XTm) e controle da reação (sem enzima). Foi aplicada uma amostra com a mistura de padrões: xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4) e xilopentaose (X5).

Fonte: Arquivo pessoal.

Os hidrolisados enzimáticos contendo XOS de diferentes tamanhos foram monomerizados por reação em meio ácido (SLUITER et al., 2008). As concentrações de xilose e arabinose foram maiores para os sólidos (1 e 2) que foram hidrolisados com o extrato enzimático de *B. pumilus* (tabela 5). Com esta análise também foi possível concluir que a xilanase de *B. pumilus* teve ação em ambos os sólidos, ou seja, a xilanase conseguiu hidrolisar um pouco mais da fração insolúvel da xilana de *oat spelts* (sólido 1) e também nos XOS que foram precipitados (sólido 2). Estes resultados sugerem que após as 96 h de hidrólise enzimática tenham sido produzidos inibidores da reação, como os próprios XOS, que diminuem a atividade de xilanase e por consequência a formação dos produtos. Quando o sobrenadante foi removido e mais enzima foi adicionada, a hidrólise continuou a acontecer. O mesmo pode ter acontecido com a hidrólise do sólido 2. Neste caso os inibidores podem não ter precipitado, por serem pequenos, e desta forma a enzima atuou no sólido 2.

Tabela 5- Composição das frações da xilana de oat spelts hidrolisadas pelo extrato enzimático de *B. pumilus* (XBp) e por xilanase comercial de *Thermotoga maritima* (GH10) (XTm).

		Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xil/Ara
Sólido 1	XTm	12,41	1,73	7,2
	XBp	11,64	1,87	6,2
Sólido 2	XTm	5,87	0,77	7,6
	XBp	5,40	0,57	9,5

Fonte: Arquivo pessoal.

Em síntese, pode-se distinguir a produção de um extrato enzimático por *B. pumilus* com atividade elevada de xilanase e ausência de outras enzimas relacionadas à degradação da biomassa lignocelulósica. Desta forma, a caracterização da xilanase foi realizada no extrato bruto e uma única banda de proteína de 23 KDa correspondeu à enzima. A hidrólise de xilanas produziu XOS com graus de polimerização entre X2 e X5, evidenciando que a enzima pertence à família GH11. O pH ótimo de ação em um meio reacional com a faixa de pH 7-8 e de temperatura entre 40-55 °C, é desejável para a sequência deste trabalho, em que será testada a atuação desta enzima em um bagaço pré-tratado QTM na presença de um licor sulfito alcalino.

5.3 Extração enzimática da xilana do bagaço de cana-de-açúcar

5.3.1 Composição química dos bagaços pré-tratados

O bagaço de cana-de-açúcar foi submetido a pré-tratamentos, com o intuito de diminuir a lignina e aumentar a acessibilidade da xilanase de *B. pumilus* à hemicelulose residual. Inicialmente, foi realizada a deslignificação seletiva do bagaço com clorito em meio ácido por 2 e 4 h de reação (tabela 6). A seletividade do clorito está relacionada à sua baixa reatividade com hidroxilas alcoólicas, abundantes na celulose e hemiceluloses. Os dados de composição química dos bagaços pré-tratados mostram que a remoção de lignina do bagaço foi significativa em ambos os tempos de tratamentos, corroborando com estudos anteriores (SIQUEIRA et al., 2011; 2013). Entretanto, o clorito em meio ácido pode reagir com carboidratos em alguma extensão. Os bagaços pré-tratados apresentaram um rendimento de sólidos de 85,74 e 87,86 % em 2 e 4 horas de reação, respectivamente. A extração da celulose

e hemicelulose quando este pré-tratamento foi realizado por 2 horas foi praticamente nula, sendo que após 4 horas de tratamento uma parte da hemicelulose (10 %) foi extraída.

Esse processo apresenta o grande inconveniente da formação de compostos organoclorados, especialmente dioxinas e furanos, de toxidez elevada (ERIKSSON, 1990). Legislações ambientais mais severas têm levado à busca de processos alternativos de pré-tratamento. Sendo assim, o pré-tratamento sulfito alcalino, desenvolvido e utilizado amplamente na indústria de polpa, foi avaliado para a deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço pré-tratado pelo processo sulfito alcalino tem apresentado bons resultados em termos de sacarificação (MENDES et al., 2011; 2013). Mais recentemente, sequências com diferentes concentrações de reagentes têm sido desenvolvidas e mostram que a seletividade na degradação de lignina e a eficiência da sacarificação enzimática podem ser melhoradas em função das condições usadas (LAURITO-FRIEND et al., 2015).

No presente estudo, o bagaço foi pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM) com diferentes concentrações de sulfito e álcali: 2,5% de sulfito e 1,25% de álcali, 5% de sulfito e 2,5% de álcali e 10% de sulfito e 5% de álcali, conforme descrito por Laurito Friend et al. (2015). Como pode ser observado na tabela 5, o rendimento do pré-tratamento QTM do bagaço que foi lavado extensivamente foi de 73,9 %, corroborando com outros trabalhos, que apresentaram um rendimento acima de 70% após filtração e lavagem do material com água (LAURITO-FRIEND et al., 2015; MENDES et al., 2011). A lavagem do material pré-tratado retira parte dos lignosulfonatos e carboidratos redepositado na superfície do material. Quanto aos carboidratos, a hemicelulose apresentou uma maior solubilização que a celulose, mesmo assim em relação a outros pré-tratamentos verifica-se uma baixa remoção dos carboidratos (LAURITO-FRIEND et al., 2015; MENDES et al., 2011).

O grande volume de água utilizado para lavar o bagaço depois do pré-tratamento visando remover os reagentes e deixar a polpa com o pH 7 e o descarte dessas águas residuais contendo licor sulfito alcalino constituem um problema ambiental e econômico para a utilização deste pré-tratamento. Neste estudo propôs-se retirar a etapa de lavagem do bagaço pré-tratado e utilizar apenas o volume de água necessário para deixar o bagaço com a consistência de 2%, necessária para proceder a etapa de refi

Tabela 6- Caracterização química dos bagaços in natura e dos bagaços pré-tratados.

Pré-tratamento (g/100g bagaço)	Amostras	Rendimento (g/100g de bagaço)	Composição de bagaço (g/100g em base polpa)			Composição de bagaço (g/100g de bagaço original)		
			Lignina	Hemicelulose	Celulose	Lignina	Hemicelulose	Celulose
	In natura	100	22,02±0,25	28,54±0,57	38,29±0,18	22,02	28,54	38,29
Deslignificação seletiva	Clorito ácido (2 h)	85,74	11,50±0,35	32,22±0,12	43,09±0,58	9,86	27,63	36,95
	Clorito ácido (4 h)	87,86	6,18±0,38	29,19±0,89	44,49±0,91	5,43	25,65	39,09
Químio-termomecânico (Lavado extensivamente)	10% Na ₂ SO ₃ /5% NaOH	73,9	12,6±0,2	25,8±0,2	47,3±0,5	9,31	19,07	34,95
Químio-termomecânico (Pouco lavado)	2,5% Na ₂ SO ₃ /1,25% NaOH	86,76	20,81±0,44	25,65±0,35	39,35±0,12	18,05	22,5	34,14
	5% Na ₂ SO ₃ /2,5% NaOH	84,12	18,06±0,63	26,47±1,06	43,81±1,84	15,19	22,22	36,86
	10% Na ₂ SO ₃ /5% NaOH	81,84	13,78±0,38	28,68±0,55	45,53±0,62	11,28	23,47	37,25

Fonte: Arquivo pessoal.

Nos bagaços pré-tratados QTM, com as diferentes cargas de reagentes e pouco lavado, verificou-se uma remoção de lignina proporcional ao aumento na carga de reagentes e consequentemente os materiais pré-tratados foram enriquecidos em celulose e hemicelulose (Tabela 6). Foram determinados rendimentos acima de 80% em todas as amostras não lavadas, corroborando o resultado de Silva (2016), que reportou um rendimento de 88,6% no bagaço pré-tratado e pouco lavado na carga de 10% de sulfito e 5% de álcali. Nos tratamentos do bagaço pré-tratado com a maior carga de sulfito/álcali o teor de hemicelulose foi 28,68 %, sendo esta fração composta por 23,10% de xilose, 2,18% de arabinose e 3,4% de compostos não identificados.

A composição dos bagaços pré-tratados influencia grandemente a extração de xilana (SILVA, 2016). Isto pode ser facilmente compreendido quando são consideradas as diferenças nas composições químicas, especialmente no que diz respeito à lignina.

5.3.2 Influencia do tipo de extrato enzimático e da carga de xilanase

As condições em que o extrato enzimático foi produzido e as cargas enzimáticas podem influenciar a extração enzimática das xilanas do bagaço pré-tratado. Considerando que as xilanases tenham mais acesso as xilanas do bagaço pré-tratado com a maior quantidade de reagentes (10% de sulfito e 5% de álcali), este substrato foi utilizado para avaliar a performance de diferentes extratos enzimáticos produzidos por *B. pumilus* no meio 2 na presença de xilana *oat spelts*, farelo de trigo, bagaço ou bagaço deslignificado (resultados de atividade de xilanase e proteínas apresentados nas Figuras 8 B e 9 B). Foram utilizadas as cargas de xilanase correspondente a 5 e 20 U/g bagaço.

Como pode ser observada na tabela 7, a extração de xilana do bagaço pré-tratado foi mais eficiente quando se utilizou os extratos enzimáticos produzidos em xilana (*oat spelts*) e em farelo de trigo, com a máxima extração de 17,1 e 16,7 %, respectivamente. A diferença de extração entre ambos os substratos é pequena, reforçando que é mais viável a produção das enzimas com o farelo de trigo. A relação xilose/ arabinose foi de 4,2 a 5,9; demonstrando a extração de uma xilana com alto grau de ramificação se comparada à xilana no material de partida (10,6). A composição de xilose e arabinose pode ser relacionada com a solubilidade da xilana extraída, sendo que as xilanas com maior grau de substituição com arabinose são geralmente mais solúveis em água (COURTIN; DELCOUR, 2002; KOEGELENBERG; CHIMPHANGO, 2017).

Tabela 7- Rendimento da extração enzimática da xilana do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM) com 10%Na₂SO₃/5% NaOH com a xilanase de *B. pumilus* produzida em diferentes substratos no meio 2 (NAGAR et al., 2010).

Indutores	Carga de enzimas (U/g bagaço)	Rendimento de xilana (%)	Composição da xilana (g/L)		Xil/Ara (m/m)
			Xilose	Arabinose	
Xilana	5	14,3 ±1,4	1,87	0,45	4,2
	20	17,1 ±1,1	2,25	0,48	4,7
Farelo de trigo	5	14,4 ±0,1	1,86	0,38	4,9
	20	16,7 ±0,6	2,17	0,45	4,8
Bagaço	5	10,1 ±1,6	1,30	0,24	5,4
	20	14,9 ±0,4	1,93	0,33	5,9
Bagaço deslignificado	5	12,3 ±0,1	1,59	0,36	4,5
	20	15,1 ±1,0	1,96	0,40	4,9

Fonte: Arquivo pessoal.

A carga enzimática pode influenciar os produtos da extração, gerando xilanas com massas molares diferentes e este comportamento pode ser verificado através da análise por cromatografia em camada fina dos produtos de hidrólise da xilana. Porém, os resultados do presente estudo mostraram-se independentes do tipo de extrato enzimático e da carga, foram identificadas manchas na TLC correspondentes a X3 e X4 (Figura 19). Também apareceram manchas na origem da aplicação das amostras, provavelmente de xilanas com alta massa molar. Outros XOS migraram na TLC desde a origem até o padrão X4 que não foram identificados por falta de padrões. Desta forma, é possível inferir que o modo de ação da xilanase não foi alterado pela condição de cultivo do *B. pumilus* ou pela carga enzimática.

Figura 19- Cromatografia em camada fina (TLC) dos produtos da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM) com 10%Na₂SO₃/5% NaOH com a xilanase de *B. pumilus* produzida em diferentes substratos, preparados no meio 2 (NAGAR et al., 2010) C- controle da reação sem enzima; xilana de *oat spelts* (X), farelo de trigo (FT), bagaço deslignificado (BD) e bagaço de cana- de- açúcar (B) nas cargas de 5 e 20 U/g bagaço. Foi aplicada uma mistura de padrões: xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4).

Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.3 Influência do tipo de pré-tratamento e da carga de xilanase

Os bagaços pré-tratados QTM com diferentes cargas de reagentes e, portanto, com diferentes composições químicas, foram utilizados para comparar o rendimento de extração enzimática da xilana. Para este ensaio utilizou-se o extrato enzimático de *B. pumilus* obtido cultivando-o no meio 1 em farelo de trigo, pH de cultivo de 8,5. No experimento anterior (item 5.3.2) havia sido avaliado o extrato produzido no meio 2. Entretanto observou-se que nesta condição as xilanases perderam muito da atividade durante o armazenamento a 18 °C. Os dados obtidos mostraram uma redução de 87% da atividade (220 U/mL para 28 U/mL) após 1 mês de armazenamento do meio 2. A mesma avaliação de estabilidade foi feita com o extrato produzido no meio 1 e a atividade de xilanase se manteve constante no primeiro mês de armazenamento. Em seis meses de armazenamento a -18 °C a atividade reduziu em 15% (38 U/mL para 32 U/mL). Desta forma, os experimentos seguintes também foram

realizados com o extrato de cultivo de *B. pumilus* no meio 1 com farelo de trigo (pH de cultivo 8,5).

Os resultados da Tabela 8 mostram que entre os bagaços pré-tratados QTM em baixas quantidades de reagentes (2,5% de sulfito/ 1,25% de álcali e 5% de sulfito/2,5% de álcali), não ocorrem diferenças no rendimento de extração da xilana. A extração nestes materiais foi de 4 para 4,2 no bagaço pré-tratado com 2,5% de sulfito e 1,25% de álcali, e de 5,5 para 6,5 no bagaço pré-tratado com 5% de sulfito e 2,5% de álcali. Por sua vez, o bagaço pré-tratado com 10% de sulfito e 5% de álcali, com o menor teor de lignina residual, apresentou melhor resultado que os bagaços tratados com baixa carga de reagentes. Nesse caso, a carga enzimática influenciou positivamente o rendimento de xilana extraída. Quando se utilizou uma carga enzimática de 20 U/g, obteve-se um rendimento de xilana de 18,5%. Aumentando-se a carga de xilanase para 100 U/g e 200 U/g de bagaço, observou-se uma maior extração de xilana, 25,9% e 31,8%, respectivamente. Porém, a medida que se aumenta a carga de enzima esta não apresenta uma eficiência proporcional, visto que se aumentando em 10 vezes a carga enzimática ocorre uma alteração mínima no rendimento de extração de xilana (1,2 vezes).

Tabela 8- Rendimento da extração enzimática da xilana do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM), obtido após 24h de reação com a xilanase de *B. pumilus* produzida em farelo de trigo no meio 1, a 5% de consistência.

Pré-tratamentos quimiotermomecânicos do bagaço (Na ₂ SO ₃ /NaOH)	Carga de enzimas (U/g bagaço)	Rendimento de xilana (%)	Composição da xilana (g/L)		Xil/Ara (m/m)
			Xilose	Arabinose	
2,5% /1,25%	5	4,0±0,1	0,45	0,07	6,3
	10	4,2±0,3	0,48	0,08	6,3
	20	4,2±0,2	0,47	0,08	6,1
5% /2,5%	5	5,5±0,7	0,62	0,10	6,5
	10	6,6±0,5	0,79	0,10	7,6
	20	6,5±0,2	0,76	0,10	7,3
10% /5%	5	14,2±0,6	1,87	0,41	4,6
	10	16,1±0,6	2,11	0,45	4,7
	20	18,5±0,3	2,40	0,47	5,1
	100	25,9 ± 0,7	3,39	0,65	5,2
	200	31,8 ± 0,1	4,18	0,88	4,7

Fonte: Arquivo pessoal.

A extração de arabinose se mostrou associada à extração de xilana, pois o extrato não possui atividade de arabinofuranosidase, consequentemente se observa um aumento na extração deste grupo pendente quando aumenta a extração da xilana. No entanto, o grau de substituição das xilanas extraídas desde os bagaços pré-tratados com as diferentes quantidades de sulfito alcalino se mostrou diferente. O grau de substituição está representado na tabela 7 pela relação xil/ara, tendo valores médios de 6, 7 e 5 para os bagaços pré-tratados com a menor, intermediária e maior quantidade de reagentes, respectivamente. Estes resultados mostram que xilanas mais ramificadas foram extraídas desde o substrato pré-tratado com a maior quantidade de reagentes (10% de sulfito e 5% de álcali). Esta característica é importante uma vez que as ramificações na xilana facilitam a sua solubilidade no meio aquoso, por conseguinte a sua extração e recuperação (EBRINGEROVÁ, 2006). Em relação à extração de celulose dos bagaços pré-tratados pela reação com xilanase (20 U/g de bagaço), foram observadas remoções de 0,6%; 1,0% e 1,5% para os substratos pré-tratados com a menor, a intermediária e a maior quantidade de reagentes (sulfito alcalino), respectivamente, corroborando a baixa atividade de enzimas celulolíticas detectadas no extrato enzimático bruto de *B. pumilus*.

Assim como no bagaço pré-tratado com sulfito alcalino, no bagaço deslignificado com clorito ácido também foi observado que a maior carga de enzima e a maior carga de reagentes auxiliaram a extração de xilana (Tabela 9). O maior rendimento de extração foi obtido utilizando o bagaço pré-tratado com clorito ácido por 4 horas, com a carga enzimática de 100 U/g de bagaço (Tabela 9). Cerca de 50% da xilana foi extraída nesta condição, resultado atribuído ao menor conteúdo de lignina desta amostra. A xilana extraída apresentou-se pouco ramificada, entre 7,8 e 8,9, que pode ser atribuído a perda de resíduos de arabinose, durante a deslignificação com clorito (FORD, 1985).

Trabalhos utilizando materiais lignocelulósicos relatam a importância de um pré-tratamento para o acesso das enzimas à xilana (BRIENZO; CARVALHO; MILAGRES, 2010; JAYAPAL et al., 2013; REDDY; KRISHNAN, 2016). Reddy e Krishnan (2016) realizaram a extração de xilana com o extrato bruto de *Bacillus subtilis*, em um bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com amônia, obtendo um rendimento máximo de extração de 22,2%. A extração foi feita utilizando uma carga enzimática de 40U de xilanase e 4,3U de arabinofuranosidase, com a consistência de 6%. Tanto o presente trabalho quanto o trabalho de Reddy e Krishnan (2016) mostram a possibilidade da utilização de um extrato enzimático para a extração de xilana em bagaço de cana, com uma porcentagem de extração semelhante em ambos os trabalhos.

Tabela 9- Rendimento da extração enzimática da xilana do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com clorito em meio ácido, obtido após 24h de reação com a xilanase de *B. pumilus* produzida em farelo de trigo no meio 1 (MANDELS & STENBERG, 1976), a 5% de consistência

Bagaço Deslignificado	Xilanase (U/g bagaço)	Extração de xilana (%)	Composição da xilana (g/L)		Xil/Ara (m/m)
			Xilose	Arabinose	
Clorito ácido	20	22,2 ± 0,6	3,17	0,36	8,9
/2 horas	100	30,7 ± 1,2	4,39	0,56	7,9
Clorito ácido	20	42,5 ± 0,5	5,42	0,62	8,7
/4 horas	100	49,3 ± 1,5	6,28	0,80	7,8

Fonte: Arquivo pessoal.

Ao comparar ambos os tratamentos utilizados no bagaço de cana-de-açúcar para a diminuição do teor da lignina, podemos observar uma clara relação entre a extração de xilana e a lignina removida (Figura 20). Quanto menor o conteúdo de lignina no bagaço pré-tratado, maior foi a extração enzimática, sugerindo que a lignina no material pré-tratado reduz o acesso da enzima à hemicelulose, e consequentemente, a sua extração. Este fenômeno tem sido descrito na literatura em experimentos de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos (MENDES et al., 2011; VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIKARI, 2010). A correlação ($R^2 = 0,947$) indica que a lignina é o principal fator limitante da extração de hemicelulose nos materiais testados (Figura 20). Porém, a literatura sugere que a lignina não é o único impedimento à extração de xilana. Hu, Arantes e Saddler (2011) reportam que a despolimerização da celulose por a ação das celulasas dentro das fibras poderia expor cadeias de hemicelulose que estão naturalmente pressas dentro ou entre as microfibrilas de celulose; sugerindo que além do efeito negativo da lignina na extração da xilana a própria estrutura do material afeta o acesso enzimático aos carboidratos.

Figura 20- Correlação entre a extração da xilana e a lignina removida após pré-tratamento.

Fonte: Arquivo pessoal.

A análise dos produtos de hidrólise do bagaço de cana pré-tratado QTM revelou a presença de X3, X4 e de XOS com tamanhos maiores. As manchas na TLC foram mais nítidas na reação feita no bagaço pré-tratado na maior carga de reagente (10% de sulfito e 5% de álcali) e de enzima (20 U/g bagaço) (Figura 21). Também pode ser observada a presença de xilana no ponto de aplicação da amostra, evidenciando uma fração de xilana maior. Já no bagaço deslignificado com clorito ácido, podemos observar a presença de X2, X3, X4 e XOS com tamanhos maiores.

Outros autores relatam a extração X2 e X3 a partir da hidrólise com o extrato bruto de *Aspergillus fumigatus* de uma arabinoxilana isolada de bagaço de cana-de-açúcar. Quando um extrato do cultivo de *Trichoderma reesei* foi aplicado na arabinoxilana foi observada a produção de xilose (FIGUEIREDO et al., 2017). Jayapal et al. (2013), também verificaram a produção de X2 e X3 com xilanase comercial de *Trichoderma viridae*, a partir de uma xilana de bagaço de cana extraída de forma alcalina. Investigando o tempo de reação na extração de xilana do bagaço Jayapal et al. (2013) observaram o aparecimento de xilose. A utilização das enzimas de *Bacillus* para extração e xilanas é vantajosa, pois produzem XOS com maiores graus de polimerização e sem a presença de xilose. Este comportamento pode ser verificado no trabalho realizado por Reddy e Krishnan (2016) utilizando um extrato

bruto de *B. subtilis*. Em seu trabalho, mostrou a presença de X2 a X4, sendo que estas podem ser substituídas por arabinose, ou não. Estes XOS produzidos a partir do bagaço se mostram capazes de sustentar o crescimento de bifidobactérias, bem como a produção de ácidos graxos de cadeias curtas, que são benéficos para a saúde humana (REDDY; KRISHNAN, 2016).

Figura 21- Cromatografia em camada fina (TLC) dos produtos da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM) com $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$ ou com clorito ácido (2 e 4 h) com xilanase de *B. pumilus*. C- controle da reação sem enzima; e com 5 UI/g, 10 UI/g e 20 UI/g de xilanase. Foi aplicada uma mistura de padrões: xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4).

Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.4 Influencia da temperatura

A temperatura de extração enzimática da xilana do bagaço pré-tratado QTM a 10% $\text{Na}_2\text{SO}_3/5\%$ NaOH foi avaliada entre 30 e 70°C (Figura 22). O bagaço pré-tratado foi escolhido a partir das extrações anteriores, onde a carga de 10% $\text{Na}_2\text{SO}_3/5\%$ NaOH apresentou uma maior extração da xilana pelo meio 1 cultivado com farelo de trigo. O

aumento da temperatura até 50 °C não influenciou o rendimento de xilana, porém acima desta ocorreu a redução da extração. Esses resultados estão provavelmente relacionados com a temperatura ótima de atuação da xilanase de *B. pumilus* e à sua estabilidade térmica. Por outro lado, a manutenção de rendimentos de extração de xilana em uma ampla faixa de temperaturas, 30 a 50 °C, garante uma grande versatilidade da enzima para a extração de xilana, sendo um resultado promissor em relação a possíveis aplicações deste extrato enzimático. A relação xil/ara se manteve na faixa de 4-5, sugerindo que a temperatura não afeta o padrão de corte da enzima.

Figura 22- Rendimento de extração de xilana do bagaço pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM) a 10% Na₂SO₃/5% NaOH pelas xilanases de *B. pumilus* (20 U/g de bagaço), em diferentes temperaturas, por 24 horas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Jayapal et al (2013) verificaram que a temperatura ideal de hidrólise enzimática a partir de uma xilana extraída de bagaço, foi de 45,7 °C. Reddy e Krishnan (2016) utilizaram a temperatura de 50°C para a extração da xilana de um bagaço de cana pré-tratado com o extrato bruto de *B. subtilis*. Outro trabalho de produção de XOS a partir de um bagaço pré-

tratado foi realizada com uma xilanase recombinante de *B. subtilis* na temperatura de 50 °C (BRAGATTO; SEGATO; SQUINA, 2013). Não só estes, mas outros estudos utilizam a temperatura de hidrólise na faixa de 50 °C, já que no protocolo de atividade enzimática de xilanase é realizado nesta temperatura (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992), garantindo que a carga enzimática no começo da reação seja a mesma que foi determinada.

O perfil de xilo-oligômeros produzidos após a hidrólise do bagaço de cana pré-tratado QTM em diferentes temperaturas foi similar, indicando que não há alteração no padrão de corte da xilanase de *B. pumilus* (Figura 23 A). Este resultado sugere a presença de uma única forma de xilanase no extrato enzimático. Em todas as condições testadas os xilo-oligômeros detectados foram maiores que X3 e alguns deles migraram entre os padrões, devido a presença de ramificações.

Figura 23- TLC Cromatografia em camada fina (TLC) dos produtos da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM) com 10%Na₂SO₃/5% NaOH incubadas em diferentes temperaturas de reação (A) e dos produtos da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado QTM com 10%Na₂SO₃/5% NaOH pouco lavado e lavado extensivamente.(B) Ambas as reações utilizaram a xilanase de *B. pumilus* (20 U/g) C- controle da reação sem enzima A- amostras Foi aplicada uma mistura de padrões: xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4).

Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.5 Influência da lavagem do bagaço

O pré-tratamento QTM do bagaço de cana-de-açúcar com 10% Na₂SO₃ e 5% de NaOH remove cerca de 50% da lignina e 30% da hemicelulose e ainda deixa uma boa parte

da lignina residual do bagaço sulfonada (MENDES et al., 2011). Este resultado é alcançado lavando-se extensivamente o bagaço após o pré-tratamento, até o pH neutro (7). Reduzindo o volume de água, observou-se um aumento na retenção de xilana na no bagaço pré-tratado (Tabela 5). No intuito de avaliar o efeito da lavagem do substrato na extração de xilana, ambos os bagaços pré-tratados, lavado extensivamente e pouco lavado, foram extraídos enzimaticamente com a xilanase de *B. pumilus* (20 U/g bagaço). Os rendimentos de extração da xilana do bagaço pré-tratado lavado extensivamente e pouco lavado foram de 25,7% e 18,5%, respectivamente (figura 24). O mesmo comportamento foi observado para a extração de resíduos arabinose (50,4% e 40,4% respectivamente).

Figura 24- Rendimento de extração de xilana dos bagaços pré-tratados quimiotermomecanicamente (QTM) a 10% Na_2SO_3 /5%NaOH (pouco lavado e lavado exaustivamente) pelas xilanases de *B. pumilus* (20 U/g de bagaço).

Fonte: Arquivo pessoal.

A lavagem pode estar removendo material eventualmente redepositado durante o pré-tratamento, que pode provocar a inibição das enzimas, explicando a melhora da extração no material lavado. Durante o pré-tratamento, parte da lignina é extraída na forma de compostos

fenólicos e estes podem ter um efeito inibitório sobre a enzima (BERLIN et al., 2006; GONZÁLES-BAUTISTA et al., 2017; MOREIRA; FERREIRA FILHO, 2016; XIMENES et al., 2010). No entanto, este aumento no rendimento de extração deve ser estudado quanto a sua viabilidade, devido ao grande volume de água usado na etapa de lavagem. Outros autores relataram que além da lavagem ser um gasto, dilui a hemicelulose solúvel, sendo necessário à sua recuperação na água de lavagem, bem como a concentração para o seu aproveitamento (LIU; ZHU, 2010).

Mesmo tendo sido observado um maior rendimento de xilana no bagaço que foi lavado extensivamente, o perfil dos XOS foi similar ao obtido para o bagaço pouco lavado (Figura 23 B).

5.3.6 Influência de outros compostos

Estudos recentes têm apontado alternativas para o melhor aproveitamento da biomassa pré-tratada sem a necessidade da lavagem, permitindo a redução significativa nas dosagens enzimáticas para a extração (LIU; ZHU, 2010; WANG; LAN; ZHU, 2013). Estes autores investigaram a possibilidade de reutilização de licor sulfito, rico em lignosulfonatos, obtidos do pré-tratamento quimiomecânico de madeira para aumentar a sacarificação da celulose. Esses estudos mostraram que o lignosulfonato atua como um surfactante, auxiliando na sacarificação do lignocelulósicos pelo bloqueio da ligação lignina-celulase (WANG; LAN; ZHU, 2013; ZHOU et al., 2013).

Para avaliar este efeito na extração de xilana, os experimentos foram realizados com o efluente do pré-tratamento de bagaço com 10% de sulfito e 5% de álcali, que apresentou 1,4 g/L de glicose, 3,2 g/L de xilose, 0,8 g/L de arabinose; 4,3 g/L acetato e 11,1 g/L de compostos fenólicos, a partir de análise dos açúcares monoméricos por HPLC (item 4.16.1). Foi utilizado o meio 1 cultivado com farelo de trigo para a extração da xilana

Inicialmente foi feito um ensaio de hidrólise de xilana *oat spelts* na presença de do licor do pré-tratamento sulfito alcalino. Foram testadas diferentes concentrações do licor: 0,11; 0,28; 0,55; 1 e 5 g/L junto com o extrato enzimático de *B. pumilus* (figura 25). Após 30 minutos de reação, a atividade relativa da enzima se manteve em 70% na maior concentração de licor (5 g/L), sendo mais expressiva que as outras concentrações de licores testadas até 2 horas de reação, onde a atividade da enzima se manteve em 49,4%. Porém, após 4 horas de reação, a atividade relativa da enzima diminuiu para 6%, e manteve neste

patamar até 6 horas de reação. Até uma hora de reação, observou-se um aumento na atividade de xilanase em todas as concentrações de licores, sendo que em todos os tempos de reação, a adição de 5 g/L de licor se mostrou eficiente na estabilidade enzimática. Wang, Lan e Zhu (2013), relataram que a utilização de lignosulfonato em baixas concentrações (0,2 g/L) na reação de hidrólise enzimática da celulose diminuiu a conversão de celulose, porém, o aumento da dosagem de lignosulfonatos (0,3-1 g/L) influenciou positivamente a conversão de celulose, atribuindo este efeito à ação surfactante não iônico do lignosulfonato.

Figura 25- Estabilidade da xilanase de *B. pumilus* na presença de diferentes concentrações de licor sulfito alcalino, recuperado do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM) com 10%Na₂SO₃/5% NaOH, pouco lavado.

Fonte: Arquivo pessoal.

Considerando que o melhor resultado de hidrólise enzimática de xilana em tempos curtos foi obtido com 5g/L de licor, esta mesma concentração foi avaliada durante a extração de xilana do bagaço de cana pré-tratado QTM com 10% de sulfito e 5% de álcali. Os ensaios foram feitos com o bagaço QTM pouco lavado e lavado extensivamente, com a carga enzimática de 20 U/g de substrato. Como pode ser observado na figura 26, a adição de licor não influenciou o rendimento de extração de xilana do bagaço pouco lavado, sendo que na

presença ou ausência de licor os rendimentos foram de 14,9% e 14,7%, respectivamente. No bagaço pré-tratado e lavado extensivamente, a adição do licor diminuiu a extração da xilana, de 20% para 12,2%. Nos controles, em que o bagaço foi incubado em licor ou em tampão, em ambos os casos o licor não teve ação sobre a extração do material.

Figura 26- Rendimento de extração de xilana do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM) com 10%Na₂SO₃/5% NaOH, com xilanase de *B. pumilus* (20U/g) e na presença de licor sulfito alcalino (5g/L).

Fonte: Arquivo pessoal.

O aumento esperado no rendimento de xilana em função da adição do licor sulfito alcalino não apresentou um resultado positivo. É importante considerar que além dos lignosulfonatos, há outros compostos no licor que podem ter afetado negativamente a ação da xilanase de *B. pumilus*. Estudos mostram a influência dos compostos fenólicos presentes no licor após o pré-tratamento do material, bem como seus componentes em separados. Kaya, Heitmann e Joyce (2000), observaram que o coquetel de xilanase comercial (Igarazyme-40S) aumentou sua atividade em 20% ao ser adicionado 0,06% de lignina, e o aumento de 140% quando adicionado 5% de licor negro, que é um dos produtos da fabricação de polpa kraft. Este efeito foi atribuído a uma modificação estrutural da enzima pela interação com a lignina. Os autores explicaram que se interação entre lignina-xilanase

formar um composto solúvel, provavelmente se tem o aumento da hidrólise da xilana solúvel, porém, se esta interação deixar a xilanase insolúvel, tem-se a diminuição da hidrólise da xilana (KAYA; HEITMANN; JOYCE, 2000). Outro estudo utilizando duas xilanases produzidas a partir de *Aspergillus terreus*, Xyl T1 foi totalmente inibida na presença de compostos fenólicos, enquanto a Xyl T2 se apresentou mais resistência (MOREIRA et al., 2013). Estas xilanases apresentam diferenças estruturais e funcionais, principalmente pela presença de triptofano no sítio ativo (MOREIRA et al., 2015).

A atividade da xilanase de *B. pumilus* foi avaliada na presença de outros compostos: Inicialmente, foi realizada uma hidrólise da xilana de *oat spelts* com os componentes MgSO_4 (1mmol/g de substrato), KCl (1mmol/g de substrato), Tween 80 (15 mg/g de substrato), PEG (4000 Da) (15 mg/g de substrato) e albumina bovina (10 mg/g de substrato), adicionados individualmente. Como pode ser observado na figura 27, o sulfato de magnésio (MgSO_4), Tween 80 e PEG influenciaram positivamente a hidrólise da xilana de *oat spelt*. Um estudo utilizando um extrato bruto de *Aspergillus niger*, mostrou que dentre as enzimas produzidas pelo fungo, a xilanase foi inibida pela adição de íons metálicos (VASCONCELLOS et al., 2016). Outros estudos mostram que adição de Mg^{2+} aumenta a atividade de uma das xilanases produzidas por *B. pumilus* (POORNA, 2011) e a adição de Mg^{2+} e de Tween 80, aumentam a atividade da xilanase de *B. licheniformis* em 50 e 56%, respectivamente (ZAFAR et al., 2016). Assim como no presente trabalho, a adição de PEG também aumentou a atividade de xilanase do extrato bruto de *Cellulomonas flavigena* PR-22 (GONZÁLES-BAUTISTA et al., 2017). Por outro lado, Liu e Zhu (2010) observaram que a adição de MgSO_4 , cloreto de cálcio (CaCl_2) e BSA não mostraram diferenças na hidrólise de celulose por uma celulase purificada, apenas na presença de Tween 80 observou-se uma hidrólise mais elevada que o controle.

Figura 27- Açúcares redutores produzidos pela hidrólise de xilana de *oat spelts* com a xilanase de *B. pumilus* (20U/g) na presença dos compostos de xilana. MgSO₄ e KCl (1mmol/g xilana); Tween 80 e PEG (4000 Da) (15 mg/g xilana), albumina bovina (10 mg/g xilana).

Fonte: Arquivo pessoal.

Ao verificar que os vários compostos avaliados não apresentaram um efeito negativo na hidrólise enzimática, este teste foi repetido adicionando os compostos MgSO₄ (1mmol/g de substrato), KCl (1mmol/g de substrato), Tween 80 (15 mg/g de substrato), PEG (4000 Da) (15 mg/g de substrato) e albumina bovina (10 mg/g de substrato) individualmente no bagaço pré-tratado QTM na maior carga de reagentes (10% sulfito e 5% de álcali) pouco lavado. Como pode ser observado na figura 28, a adição destes compostos não mostrou uma influência positiva no rendimento de xilana. O único componente que auxiliou a extração enzimática de xilana foi o sulfato de magnésio (MgSO₄). Liu e Zhu (2010) observaram que ao se utilizar um substrato lignocelulósico não lavado, observou que a adição de MgSO₄ também auxiliou na hidrólise da celulase neste material, bem como a adição de CaCl₂ e CaSO₄. A adição de íons metálicos, principalmente Ca²⁺ e Mg²⁺ elimina a adsorção improdutiva da enzima através da formação de um complexo íon-lignina. (LIU; ZHU; FU,

2010; LIU; ZHU, 2010) e este mesmo efeito pode estar acontecendo com a xilanase de *B. pumilus*.

Figura 28- Efeito de vários compostos no rendimento de extração de xilana do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM) com 10%Na₂SO₃/5% NaOH. A extração foi feita com xilanase de *B. pumilus* (20U/g) na presença de: MgSO₄ e KCl (1mmol/g xilana); Tween 80 e PEG (4000 Da) (15 mg/g xilana), albumina bovina (BSA) (10 mg/g xilana).

Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.7 Extração alcalina a frio

Com o intuito de aumentar o rendimento de extração de xilana do bagaço pré-tratado QTM, com 10%Na₂SO₃/5% NaOH, após a extração enzimática foi realizado uma segunda etapa de extração com NaOH (CCE - extração alcalina a frio). A influência da dosagem de NaOH foi avaliada e verificou-se que o aumento na concentração de NaOH favoreceu a extração de xilana (Figura 29). Como controle, foram realizadas extrações da xilana do bagaço pré-tratado utilizando apenas NaOH nas mesmas concentrações descritas anteriormente.

A máxima extração de xilana foi obtida usando 70% m/m de NaOH, atingindo valores de 24,9% e 43,0% para o controle e para a combinação de enzima e subsequente extração com álcali, respectivamente. Quando comparadas as duas condições, se observa que para atingir a porcentagem de extração alcançada somente pela enzima (18,1%) é necessário aproximadamente 40% de NaOH (17,3%). Por outro lado, a extração de xilana com o extrato bruto de *B. pumilus* e na sequência 20% m/m de NaOH foi possível atingir o rendimento de xilana igual ao obtido usando 70% m/m de NaOH. Tais resultados evidenciam que o extrato bruto de *B. pumilus* permite recuperar xilana com baixo consumo de álcali.

Figura 29- Efeito da concentração de NaOH sobre a extração alcalina a frio (CCE) no bagaço pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM) com 10%Na₂SO₃/5% NaOH e a combinação de extração enzimática e subsequente extração alcalina com xilanase de *B. pumilus* (20 U/g).

Fonte: Arquivo pessoal

Como pode ser observado na figura 29, o aumento da carga de NaOH auxilia na extração de xilana nas duas condições testadas. O álcali promove o inchamento das microfibrilas de celulose (DONER; HICKS, 1997), diminuindo a interação das xilanas com os outros componentes da parede celular, favorecendo a sua extração. Segundo os resultados apresentados por Jayapal et al., (2013) para diferentes tipos de polpas o aumento na concentração de álcali também promoveu um aumento na extração de xilana. Entretanto,

maiores concentrações de álcali colaboraram para a diminuição da seletividade do processo. Um estudo utilizando a polpa kraft não branqueada, sobre as mesmas condições de extração do presente trabalho, verificou que com 50% de NaOH foi possível a extração de 48% da xilana presente na polpa (GOMES et al., 2015). Este resultado se mostra superior ao do presente estudo, onde se utilizando a mesma carga de NaOH, a extração apenas com NaOH foi de 21%, porém, a extração aumenta para 35,4% se combinado com a hidrólise enzimática

As massas molares das xilanas extraídas por xilanase/20% NaOH (m/m) e apenas com 70% NaOH foram determinadas por cromatografia de exclusão de tamanho em coluna utilizando as resinas Bio-Gel P2 e Bio-Gel P30, que apresentam a faixa de separação de moléculas entre 800-1800 g/mol e 2.500-40.000 g/mol, respectivamente. As xilanas obtidas isoladas por métodos alcalinos são maiores e por isso podem ser separadas na Bio-Gel P30, enquanto as xilanas extraídas enzimaticamente apresentam uma menor massa molar, dentro do limite de fracionamento da Bio-Gel P2 (figura 30). Segundo os resultados apresentados por Gomes, Chimpango e Görgens (2015), o tamanho das xilanas extraídas de bagaço de cana-de-açúcar por um processo alcalino foi de 35.620 Da. Usando o mesmo método de extração, Silva (2016) obteve uma xilana com uma massa um pouco menor (24.300 Da), a partir do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado QTM com 10%Na₂SO₃/5% NaOH. Investigando a extração enzimática da xilana, com uma xilanase comercial, foram isoladas duas frações de xilana com massas molares de 3700 g/mol e 800 g/mol (SILVA, 2016).

O perfil de eluição cromatográfico da xilanas na coluna Bio-Gel P30 mostrou uma dispersão de massas molares entre 2.500 e 40.000 Da, determinadas através da análise de açúcares totais e leitura em espectrofotômetro a 490 nm. As amostras eluídas da coluna também foram analisadas na região do ultravioleta (280 nm), para identificar proteínas e de lignina presentes nas amostras de xilana. A figura 30 A mostra o perfil das xilanas extraídas do bagaço pré-tratado QTM, somente com a xilanase de *B. pumilus*. Três picos foram eluídos desta coluna com massas molares correspondentes a 35.000 g/mol, 12.000 g/mol e um pico maior e mais disperso na faixa entre 1.000 e 4.000 g/mol. Um pico com alta absorção a 280 nm foi eluído junto com a fração de maior massa molar da xilana, que foi atribuído à xilanase usada na extração. O pico menor com absorção a 280 nm refere-se provavelmente a contaminação da xilana com lignina, conforme relatado por outros autores (HENRIKSSON, 2007; TUNC; LAWOKO; VAN HEININGEN 2010). O perfil da xilana extraída com xilanase/20% NaOH (m/m) revelou picos com massas correspondentes a 32.389, 19.651, 14.561, 7.985, 5.923, 3.594 e 2.943 g/mol (figura 30 B).

Figura 30- Perfil de distribuição em massas molares das xilanas obtidas pela hidrólise enzimática (A e D), combinação de hidrólise enzimática e subsequente extração alcalina a frio (B e E), e extração alcalina a frio (C e F). As xilanas obtidas foram analisadas por cromatografia de exclusão molécula em Bio-Gel P30 (A, B e C) e Bio-Gel P2 (D, E e F).

Fonte: Arquivo pessoal

Por outro lado, a xilana extraída com 70% NaOH eluiu em um único pico com massa molar aproximada de 35.000 g/mol, porém foram detectados dois picos de absorbância a 280 nm (Figura 30 C). Como não foi utilizada enzima neste ensaio, os picos são provavelmente produtos da lignina do bagaço pré-tratado. Na extração alcalina de xilanas a frio, Carvalho et al., (2016) mostraram que o aumento na concentração de álcali influencia positivamente a extração de xilana, porém também ocorre uma maior extração de lignina, assim o efeito observado no ganho de rendimento de xilana costuma ser pouco significativo.

As três amostras de xilana foram aplicadas na coluna Bio-Gel P2, e a comparação das figuras 30D-F mostra que houve separação de diferentes picos de açúcares apenas nas xilanas que foram extraídas enzimaticamente (Figura 30 D).

5.4 Sacarificação enzimática de bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados quimiotermomecanicamente (QTM)

Amostras dos bagaços pré-tratados QTM que tiveram parte das xilanas extraídas com xilanase; com xilanase/20% NaOH; xilanase/70% NaOH e 70% NaOH foram hidrolisadas com a enzima comercial Cellic CTec2. Como controle, foi feita a hidrólise do bagaço pré-tratado nas mesmas condições do ensaio.

A composição química das amostras dos bagaços foi determinada (Tabela 10). Os rendimentos dos processos foram diminuindo conforme os materiais foram submetidos a tratamentos sequenciais com enzima e ou NaOH, sendo que o menor rendimento (55,3%) foi obtido para a amostra do tratamento com xilanase/70% NaOH. Este processo diminuiu a hemicelulose presente no material, passando de 28,68% para 15%. Este tratamento não agiu na celulose, como pode ser constatado pelo enriquecimento de celulose nesta amostra de bagaço. Estes dados estão de acordo com o que foi reportado por Silva (2016), utilizando o bagaço pré-tratado (10% Na₂SO₃/5% NaOH) e hidrolisado com uma xilanase comercial. A autora verificou a diminuição da hemicelulose presente no material, passando de 28,2 % para 26,2%.

Tabela 10- Composição química dos bagaços de cana-de-açúcar obtidas após diferentes etapas de tratamento.

Bagaço de Cana-de-açúcar	Rendimento	Composição do bagaço (g/100g em base polpa)			Composição do bagaço (g/100g em base bagaço)		
		Lignina	Hemicelulose	Celulose	Lignina	Hemicelulose	Celulose
<i>In natura</i>	100	22,02±0,25	28,54±0,57	38,29±0,18	22,02	28,54	38,29
Pré-tratado (10% Na ₂ SO ₃ / 5% NaOH)	81,84	13,78±0,38	28,68±0,55	45,53±0,62	11,28	23,47	37,25
Pré-tratado com xilanase	75,41	14,78±1,70	20,35±0,21	57,92±2,72	11,15	15,35	43,68
Pré-tratado/xilanase/Extração com 20% NaOH	62,26	14,46±0,64	20,04±2,01	52,71±1,89	9,00	12,48	32,82
Pré-tratado/xilanase/Extração com 70% NaOH	55,33	12,00±0,33	15,40±1,05	57,21±2,92	6,64	8,52	31,65
Pré-tratado/Extração com 70% NaOH	65,84	11,64±0,86	17,08±1,96	56,81±0,83	7,66	11,25	37,40

Fonte: Arquivo pessoal.

No bagaço pré-tratado com xilanase/20% de NaOH foi observado que uma parte de todos os componentes foi removida e a extração foi mais evidente no processo com xilanase/70% de NaOH. A amostra de bagaço que foi extraída apenas com 70 % de NaOH, solubilizou parte da lignina e da hemicelulose, enquanto que a celulose foi preservada. Gomes et al., (2015), observaram uma alta extração de xilana ao realizar a extração alcalina a frio de uma polpa kraft não branqueada, sendo que a porcentagem de xilana residual diminuiu de 15,6% para 5,9%.

A hidrólise enzimática das amostras de bagaço foi realizada com 10 FPU/g de substrato, com Cellic CTec2 que contém celulases, xilanase e enzimas oxidativas auxiliares para a completa hidrólise dos polissacarídeos do bagaço. Este coquetel enzimático em comparação a outros comercializados é capaz de realizar a conversão da celulose em menores tempos de reação, pois durante a hidrólise não se verifica inibição das celulases pelo produto final (RAMOS et al., 2015).

As cinéticas da hidrólise enzimática dos bagaços estão apresentadas nas figuras 31 e 32. Verifica-se na figura 31A que a liberação de glicose ao final de 24 h variou de 20g/L para 28 g/L em decorrência das diferenças nos substratos. Os procedimentos utilizados neste trabalho para extração de xilana, com xilanase e ou diferentes dosagens de NaOH resultaram em maior liberação de glicose. Considerando que a hemicelulose dificulta o acesso da celulose, a sua extração é favorável para o processo de sacarificação (CHANDRA et al., 2007). Os melhores resultados de liberação de glicose e de conversão da celulose foram obtidos no bagaço que foi submetido ao tratamento com xilanase/NaOH 70% e NaOH 70% (Figura 31 A). Esse resultado é um ganho do ponto de vista da fermentação dos açúcares.

Até 24 horas de conversão de glucana, todas as amostras de bagaço apresentaram uma taxa de conversão acima dos 78 % e após 72 horas alcançaram 100% de conversão. Por outro lado, a velocidade inicial de conversão da celulose da amostra controle (pré-tratada com 10% Na₂SO₃/5% NaOH) foi inferior à das amostras que tiveram parte das xilanas pré-extraída com xilanase e/ou NaOH (Figura 31 B). Após a extração alcalina, ocorreu a extração da hemicelulose que se encontra ligada à lignina, facilitando assim a conversão da celulose. A extração apenas da xilana com o extrato enzimático apresenta valores inferiores de conversão, porém a combinação da extração da xilanase com outro tratamento para aumentar a extração da xilanase, auxilia na conversão da biomassa, diminuindo o tempo de reação. Carvalho et al. (2016), observou que após a extração a frio da palha de cana-de-açúcar e do bagaço de cana-de-açúcar, este apresentou melhores valores de rendimento e volume de etanol produzido em relação ao material não tratado.

Figura 31- Concentração de glicose no hidrolisado, expressa como glicose (A) e conversão de glucana (B) do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM) (linha tracejada) e após a extração de xilana pela combinação de xilanase e NaOH (linhas contínuas).

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 32- Concentração de xilose no hidrolisado, expressa como xilana (A) e conversão de xilose (B) do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM) (linha tracejada) e após a extração de xilana pela combinação de xilanase e NaOH (linhas continuas).

Fonte: Arquivo pessoal

A liberação de xilose das amostras de bagaço foi similar no início da reação de hidrólise com a Cellic Ctec2, mas no decorrer da cinética observou-se um aumento da xilose na amostra com maior concentração de xilana (pré-extraída com xilanase) (figura 32A). A conversão de xilana das amostras tratadas com NaOH 70% foi muito semelhante ao obtido com as amostras tratadas com NaOH 20%, combinadas ou não com xilanase e em 72 h de

hidrólise o valor de conversão da xilana foi 100%. A menor conversão de xilana foi observada no ensaio com o bagaço pré-tratado com sulfito/álcali (controle). Neste caso a máxima conversão de xilose foi de 81,3% (Figura 32 B).

A remoção parcial da hemicelulose, por ação enzimática, extração a frio ou a combinação das técnicas, auxilia no melhor aproveitamento da hemicelulose, bem como na etapa posterior de fermentação. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada na produção de etanol através de um material lignocelulósicos, esta não apresenta eficiência na conversão de açúcares com 5 carbonos, como xilose e arabinose, que são provenientes da hemicelulose (BAEYENS et al., 2015). Além disso, a hemicelulose dificulta o acesso da celulose, sendo que a sua remoção é favorável para o processo de sacarificação (CHANDRA et al., 2007).

6 CONCLUSÕES

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

- *B. pumilus* induz atividades mais altas de xilanases em meio enriquecido com fontes de nitrogênio e vitaminas, porém as xilanases produzidas desta forma apresentaram uma menor estabilidade à temperatura de congelamento durante a estocagem por tempos longos.
- Nos cultivos de *B. pumilus* não foram detectadas atividade de outras enzimas que atuam na hemicelulose e celulose, evidenciando o potencial do uso do extrato enzimático como fonte de xilanase.
- A xilanase correspondeu a uma massa de 23 kDa em gel de eletroforese, com um pH ótimo na faixa de 7-8 e temperatura ótima entre 40-55 °C e se apresentou mais estável a 40 °C no pH 8,0.
- A hidrólise de xilanas comerciais com a xilanase de *B. pumilus* produziu xilo-oligossacarídeos. Este resultado associado a informação da massa molar e pH de atuação sugerem sua classificação na família GH11 das glicosil hidrolases.
- A xilanase foi capaz de atuar no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimiotermomecanicamente (QTM), evidenciando que uma maior a carga de enzimas e menor o conteúdo de lignina presente no material, favorece a extração de xilana.
- A lavagem extensiva do bagaço pré-tratado QTM auxiliou a ação da xilanase.
- A utilização de aditivos para aumentar o rendimento de xilana não foram promissoras. A reutilização do licor do pré-tratamento QTM do bagaço e outros compostos não auxiliaram a extração de xilana do bagaço, apenas o MgSO₄ apresentou um pequeno efeito positivo na extração de xilana.
- A extração alcalina a frio foi uma etapa considerada positiva na extração da xilana, e contribuiu para a hidrólise enzimática da celulose residual. Desta forma, a extração da xilana pelo extrato enzimático é vantajosa, pois tem-se a diminuição do tempo de conversão glucana para etapas subsequentes.

Enfim, *B. pumilus* foi capaz de produzir atividades expressivas de xilanases e esta foi aplicada em um bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, extraíndo parte da hemicelulose em forma de XOS e deixando um material residual rico em celulose, favorecendo a sacarificação do material.

REFERÊNCIAS

- AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Value addition to corncob: Production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 991–995, 2009.
- ÁLVAREZ, C. et al. Optimized use of hemicellulose within a biorefinery for processing high value-added xylooligosaccharides. **Industrial Crops and Products**, v. 99, p. 41–48, 2017.
- AROLA, S. et al. The role of hemicellulose in nanofibrillated cellulose networks. **Soft Matter**, v. 9, n. 4, p. 1319–1326, 2013.
- BAEYENS, J. et al. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 47, p. 60–88, 2015.
- BATTAN, B.; SHARMA, J.; KUHAD, R. C. High-level xylanase production by alkaliphilic *Bacillus pumilus* ASH under solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1281–1287, 2006.
- BATTAN, B. et al. Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 6–7, p. 733–739, 2007.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.
- BELANCIC, A. et al. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. **Journal of Biotechnology**, v. 41, p. 71–79, 1995.
- BENKO, Z. et al. Heat extraction of corn fiber hemicellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137–140, n. 1–12, p. 253–265, 2007.
- BERLIN, A. et al. Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 2, p. 198–209, 2006.
- BIAN, J. et al. Structural features and antioxidant activity of xylooligosaccharides enzymatically produced from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 236–241, 2013.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 11, p. 286–290, 1985.
- BIELY, P. et al. Endo-P - 1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, p. 151–166, 1997.
- BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, 2016.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAGATTO, J.; SEGATO, F.; SQUINA, F. M. Production of xylooligosaccharides (XOS) from delignified sugarcane bagasse by peroxide-HAc process using recombinant xylanase from *Bacillus subtilis*. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 123–129, 2013.

BOONCHUAY, P. et al. Purification, characterization, and molecular cloning of the xylanase from *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 and its application to xylooligosaccharide production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 129, p. 61–68, 2016.

BRECCIA, J. D. et al. Detection of endo-xylanase activities in electrophoretic gels with congo red staining. **Biotechnology Techniques**, v. 9, n. 2, p. 145–148, 1995.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 2, p. 199-204, 2009.

BRIENZO, M.; CARVALHO, W. MILAGRES, A. M. F Xylooligosaccharides Production from Alkali-Pretreated Sugarcane Bagasse Using Xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 1195-1205, 2010

BROWNING, B.L. **Methods of wood chemistry**. Wiley: New York , 1967.

BUCKERIDGE, M. S.; SOUZA, A. P. De. Breaking the “Glycomic Code ” of cell wall polysaccharides may improve second-generation bioenergy production from biomass. **BioEnergy Research**, v. 7, n. 4, p. 1065-1073, 2014.

CANDELA, T.; FOUET, A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1091–1098, 2006.

CANO-RAMÍREZ, C. et al. One-step zymogram method for the simultaneous detection of cellulase/xylanase activity and molecular weight estimation of the enzyme. **Electrophoresis**, v. 38, n. 3–4, p. 447–451, 2017.

CARVALHO, A. F. A. et al. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, p. 75-85, 2013.

CARVALHO, A. F. A. et al. Screening of xylanolytic *Aspergillus fumigatus* for prebiotic xylooligosaccharide production using Bagasse. **Food technology and biotechnology**, v. 53, n. 4, p. 428, 2015.

CARVALHO, D. M. et al. Assessment of alkaline pretreatment for the production of bioethanol from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 932–941, 2016.

CAZY. Disponível em: <http://www.cazy.org/> Acesso em 10 ago. 2017.

CHAKDAR, H. et al. Bacterial xylanases: biology to biotechnology. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1-15, 2016.

CHANDEL, A. K. et al. V. Sugarcane bagasse and leaves: Foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 11–20, 2011.

CHANDRA, R. P. et al. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? **Advances in Biochemical Engineering: Biofuels**. Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 67-93.

CHRISTOPHER, L. Adding value prior to pulping: bioproducts from hemicellulose. **Global Perspectives on Sustainable Forest Management**, p. 225–246, 2012.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p.3-23, 2005.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Cana-de-açúcar**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_12_27_16_30_01_boletim_cana_portugues_-3o_lev_-_16-17.pdf. Acesso em 15 ago. 2017.

COURTIN, C. M.; DELCOUR, J. A. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. **Journal of Cereal Science**, v. 35, n. 3, p. 225–243, 2002.

DECELLE, B.; TSANG, A.; STORMS, R. K. Cloning, functional expression and characterization of three *Phanerochaete chrysosporium* endo-1,4-beta-xylanases. **Current genetics**, v. 46, n. 3, p. 166–175, 2004.

DEL RIO, J. C. et al. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 322–338, 2015.

DONER, L. W.; HICKS, K. B. Isolation of hemicellulose from corn fiber by alkaline hydrogen peroxide extraction. **Cereal Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 176-181, 1997.

DUARTE, M. C. T. et al. Production and purification of alkaline xylanases. **Bioresource Technology**, v. 68, n. 1, p. 49-53, 1999.

DUARTE, M. C. T. et al. Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 90-94, 2000.

DUARTE, M. C. T. et al. Xylan-hydrolyzing enzyme system from *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 and its effects on *Eucalyptus grandis* kraft pulp for pulp bleaching improvement. **Bioresource Technology**, v. 88, n. 1, p. 9-15, 2003.

EBRINGEROVÁ, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1: Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n.9, p. 542–556, 2000.

EBRINGEROVÁ, A. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. **Macromolecular Symposia**, v. 232, n. 333, p. 1–12, 2006.

ERIKSSON, K. E. L. Biotechnology in the pulp and paper industry. **Wood Science and Technology**, v. 24, n. 1, p. 79-101, 1990.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERRAZ, A. et al. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 3, p. 201–212, 2000.

FIGUEIREDO, F. C. et al. Chemical input reduction in the arabinoxylan and lignocellulose alkaline extraction and xylooligosaccharides production. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 164–170, 2017.

GEETHA, K.; GUNASEKARAN, P. Optimization of nutrient medium containing agricultural waste for xylanase production by *Bacillus pumilus* B20. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 5, p. 882–889, 2010.

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

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GOMES, K. R.; CHIMPHANGO, A. F. A.; GÖRGENS, J. F. Modifying solubility of polymeric xylan extracted from *Eucalyptus grandis* and sugarcane bagasse by suitable side chain removing enzymes. **Carbohydrate polymers**, v. 131, p. 177-185, 2015.

GOMES, V. J. et al. Influência do conteúdo de xilanas na branqueabilidade, propriedades higroscópicas, físico-mecânicas e óptica de polpas branqueadas de eucalipto. **Química Nova**, v. 38, p. 221-226, 2015.

GONZÁLEZ-BAUTISTA, E. et al. Phenolic compounds inhibit cellulase and xylanase activities of *Cellulomonas flavigena* PR-22 during saccharification of sugarcane bagasse. **Fuel**, v. 196, p. 32–35, 2017.

GUERRA, A. et al. Polymerization of lignin fragments contained in a model effluent by polyphenoloxidases and horseradish peroxidase/hydrogen peroxide system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 5–6, p. 315–323, 2000.

GULLÓN, P. et al. Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks by probiotic bacteria. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7482-7487, 2008.

HANDTKE, S. et al. Cell physiology of the biotechnological relevant bacterium *Bacillus pumilus*-An omics-based approach. **Journal of Biotechnology**, v. 192, p. 204–214, 2014.

HENRIKSSON, G. et al.. Lignin-carbohydrate network in wood and pulps: A determinant for reactivity. **Holzforschung**, v. 61, n. 6, p. 668–674, 2007.

HENRIKSSON, G.; LENNHOLM, H. Cellulose and Carbohydrate Chemistry. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Wood Chemistry and Biotechnology**. Berlin: De Gruyter, v.1. cap. 4, p. 72-99, 2009.

HENRIKSSON, G. Lignin. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Wood Chemistry and Biotechnology**, Berlin: De Gruyter, 2009. cap. 6, p. 121-145.

HIGUCHI, T. Look back over the studies of lignin biochemistry. **Journal of Wood Science**, v. 52, n. 1, p. 2–8, 2006.

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.

HUA, D. et al. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a newly isolated *Bacillus pumilus* strain: Identification of major metabolites. **Journal of Biotechnology**, v. 130, n. 4, p. 463–470, 2007.

HUA, D. L. et al. Rapid Transformation of Ferulic Acid to 4-Vinyl Guaiacol by *Bacillus pumilus* S-1. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 615, 2013.

JAYAPAL, N. et al. Value addition to sugarcane bagasse: xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 14–24, 2013.

JOO, G. J. et al. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 487–491, 2004.

KALLEL, F. et al. Biological Activities of Xylooligosaccharides Generated from Garlic Straw Xylan by Purified Xylanase from *Bacillus mojavensis* UEB-FK. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 2, p. 950–964, 2014.

KAMBLE, R. D.; JADHAV, A. R. Isolation, purification, and characterization of xylanase produced by a new species of *Bacillus* in solid state fermentation. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

KAPOOR, M.; KUHAD, R. C. Immobilization of xylanase from *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in production of xylo-oligosaccharides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142, n. 2, p. 125–138, 2007.

KAPOOR, M.; NAIR, L. M.; KUHAD, R. C. Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 88–97, 2008.

KAYA, F.; HEITMANN, J. A.; JOYCE, T. W. Influence of lignin and its degradation products on enzymatic hydrolysis of xylan. **Journal of Biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 241–247, 2000.

KIM, H. K. et al. Expression and characterization of Ca^{2+} -independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1583, n. 2, p. 205–212, 2002.

KOCH, G. et al. Topochemical investigations on delignification of *Picea abies* [L.] Karst. during alkaline sulfite (asa) and bisulfite pulping by scanning UV microspectrophotometry. **Holzforschung**, v. 57, n. 6, p. 611–618, 2003.

KOEGELENBERG, D.; CHIMPHANGO, A. F. A. Effects of wheat-bran arabinoxylan as partial flour replacer on bread properties. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1606–1613, 2017.

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.

KORONA, B.; KORONA, D.; BIELECKI, S. Efficient expression and secretion of two co-produced xylanases from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* directed by their native signal peptides and the *Saccharomyces cerevisiae* α -mating factor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 683–689, 2006.

KUMAR, L. et al. Modulation of xylanase production from alkaliphilic *Bacillus pumilus* VLK-1 through process optimization and temperature shift operation. **3 Biotech**, v. 4, n. 4, p. 345–356, 2014.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411–456, 1999.

KÜPPERS, T. et al. Developing a new production host from a blueprint: *Bacillus pumilus* as an industrial enzyme producer. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 46, 2014.

LEE, T. H.; LIM, P. O.; LEE, Y. E. Cloning, characterization, and expression of xylanase A gene from *Paenibacillus* sp. DG-22 in *Escherichia coli*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 29–36, 2007.

LIU, H.; ZHU, J. Y. Eliminating inhibition of enzymatic hydrolysis by lignosulfonate in unwashed sulfite-pretreated aspen using metal salts. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 9120–9127, 2010.

LIU, H.; ZHU, J. Y.; FU, S. Y. Effects of lignin-metal complexation on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7233–7238, 2010.

LIU, Y. Y. et al. Reinforced alkali-pretreatment for enhancing enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Fuel Processing Technology**, v. 143, p. 1–6, 2016.

LAURITO-FRIEND, D. F. et al. Sugarcane hybrids with original low lignin contents and high field productivity are useful to reach high glucose yields from bagasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 75, p. 65–74, 2015.

MÄKELÄINEN, H. et al. Xylo-oligosaccharides enhance the growth of bifidobacteria and *Bifidobacterium lactis* in a simulated colon model. **Beneficial Microbes**, v. 1, n. 1, p. 81–91, 2010.

MAMO, G.; HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. A thermostable alkaline active endo- β -1-4-xylanase from *Bacillus halodurans* S7: Purification and characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 7, p. 1492–1498, 2006.

MANDAL, A. S. et al. Regulation of xylanase biosynthesis in *Bacillus cereus* BSA1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 5, p. 1052–1060, 2012.

MANDELLI, F. et al. Simultaneous production of xylooligosaccharides and antioxidant compounds from sugarcane bagasse via enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 770–775, 2014.

MANDELS, N.; STENBERG, D. Recent advances in cellulase technology. **Journal of Fermentation Technology**, v. 54, n. 4, p. 267–286, 1976.

MARTÍNEZ, P. M. et al. Importance of acid or alkali concentration on the removal of xylan and lignin for enzymatic cellulose hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 88–96, 2015.

MASARIN, F. et al. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 55, 2011.

MENDES, F. M. et al. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and two experimental samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology progress**, v. 27, n. 2, p. 395–401, 2011.

MENDES, F. M. et al. Enzymatic digestion of alkaline-sulfite pretreated sugar cane bagasse and its correlation with the chemical and structural changes occurring during the pretreatment step. **Biotechnology progress**, v. 29, n. 4, p. 890–895, 2013.

MENON, G. et al. Isolation, purification, and characterization of haloalkaline xylanase from a marine *Bacillus pumilus* strain, GESF-1. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 6, p. 998–1005, 2010.

MILAGRES, A. M. F. et al. Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1387–1391, 2004.

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

MITTAL, A.; NAGAR, S.; GUPTA, V. K. Production and purification of high levels of cellulase-free bacterial xylanase by *Bacillus* sp. SV-34S using agro-residue. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1157–1167, 2013.

MOREIRA, L. R. S. et al. Two β -xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 46–52, 2013.

MOREIRA, L. R. S. et al. Xylan-degrading enzymes from *Aspergillus terreus*: Physicochemical features and functional studies on hydrolysis of cellulose pulp. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 700–708, 2015.

MOREIRA, L. R. S.; FERREIRA FILHO, E. X. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5205–5214, 2016.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

MUGUET, M. C. S.; PEDRAZZI, C.; COLODETTE, J. L. Xylan deposition onto eucalypt pulp fibers during oxygen delignification. **Holzforschung**, v. 65, n. 4, p. 605–612, 2011.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate polymers**, v. 68, n. 3, p. 587–597, 2007.

NAKAMURA, M. et al. Molecular cloning, nucleotide sequence and characteristics of a xylanase gene (xyn A) from *Ruminococcus albus* 7. **Animal Science Journal**, n. May, p. 347–352, 2002.

NAGAR, S. et al. Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 71–83, 2010.

NAGAR, S.; MITTAL, A.; KUMAR, D.; GUPTA, V. K. Production of alkali tolerant cellulase free xylanase in high levels by *Bacillus pumilus* SV-205. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 2, p. 414–420, 2012.

NOGUEIRA, L. A. et al. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. **Rio de Janeiro: BNDES/CGEE**, 2008.

NOVACANA. Disponível em: <https://www.novacana.com/estudos/biorrefinaria-futuro-para-o-completo-aproveitamento-da-biomassa-de-cana-241013/> . Acesso em 12 set 2017.

OGASAWARA, W. et al. Cloning, functional expression and promoter analysis of xylanase III gene from *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 5, p. 995–1003, 2006.

OLIVEIRA, P. L. et al. Use of *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 and *Paenibacillus* sp. CBMAI 868 for colour removal from paper mill effluent. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 354–357, 2009.

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.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, 2000.

PARADIS, F. W. et al. The xynC gene from *Fibrobacter succinogenes* S85 codes for a xylanase with two similar catalytic domains. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 23, p. 7666–7672, 1993.

PENG, F. et al. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6305–6317, 2009.

PENG, F. et al. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 879–903, 2012.

PERSSON, T. et al. Fractionation of wheat and barley straw to access high-molecular-mass hemicelluloses prior to ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3906–3913, 2009.

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.

POORNA, C. A.; PREMA, P. Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 485–490, 2007.

POORNA, C. A. Optimization and Application to Produce Gluco-oligosaccharides from *Bacillus pumilus* and their potential for hydrolysis of polysaccharides. **Fermentation Technology**, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2011.

PRADE, R. A. Xylanases: from Biology to BioTechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, n. 1, p. 101–132, 1996.

PUCHART, V.; BIELY, P. Simultaneous production of endo- β -1,4-xylanase and branched xylooligosaccharides by *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Biotechnology**, v. 137, n. 1–4, p. 34–43, 2008.

RAMOS, L. P. et al. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 195–202, 2015.

REDDY, S. S.; KRISHNAN, C. Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude β -xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their bifidogenic function. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 237–245, 2016.

RHEE, M. S. et al. Engineering the xylan utilization system in *Bacillus subtilis* for production of acidic xylooligosaccharides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 917–927, 2014.

RÉMOND, C. et al. Combination of ammonia and xylanase pretreatments: Impact on enzymatic xylan and cellulose recovery from wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6712–6717, 2010.

RENNIE, E. A.; SCHELLER, H. V. Xylan biosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 100–107, 2014.

ROBINSON, T. P.; WIMPENNY, J. W. T.; EARNSHAW, R. G. pH gradients through colonies. **Journal of General Microbiology**, n. 137, p. 2885–2889, 1991.

ROOS, A.A. et al. Protein release from galactoglucomannan hydrogels: influence of substitutions and enzymatic hydrolysis by α -mannanase. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 8, p. 2104–2110, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. **Cold Spring Harbor Protocols**, n. 23, 2006.

SANGEETHA, R.; GEETHA, A.; ARULPANDI, I. Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent Introduction. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 1–8, 2008.

SANGHI, A. et al. Optimization of xylanase production using inexpensive agro-residues by alkalophilic *Bacillus subtilis* ASH in solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 633–640, 2008.

SHULAMI, S. et al. The Glucuronic Acid Utilization Gene Cluster from *Bacillus stearothermophilus* T-6. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 12, p. 3695–3704, 1999.

SHULAMI, S. et al. A two-component system regulates the expression of an ABC transporter for xylo-oligosaccharides in *Geobacillus stearothermophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 874–884, 2007.

SHULAMI, S. et al. Multiple regulatory mechanisms control the expression of the *Geobacillus stearothermophilus* gene for extracellular xylanase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 37, p. 25957–25975, 2014.

SILVA, D. S. G. **Isolamento de xilanas do bagaço de cana-de-açúcar integrado à hidrólise enzimática da celulose residual**. 2016, 100p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

SIQUEIRA, G. et al. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 7, 2011.

SIQUEIRA, G. et al. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. **Applied Energy**, v. 102, p. 399–402, 2013.

SLUITER, A. et al. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples Laboratory Analytical Procedure (LAP) **Laboratory Analytical Procedure (LAP)** National Renewable Energy Laboratory. Technical Report, 14p., 2008.

SPEIGHT, J.G. **The biofuels handbook**. Royal Society of Chemistry, 2011.

SUBRAMANIYAN, S. Isolation, purification and characterisation of low molecular weight xylanase from *Bacillus pumilus* SSP-34. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 7, p. 1831–1842, 2012.

SUN, R.; FANG, J. M.; TOMKINSON, J. Characterization and esterification of hemicelluloses from rye straw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1247–1252, 2000.

SUN, J. X. et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 195–204, 2004.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 39–67, 1997.

TAN, L.U.L.; MAYERS, P.; SADDLE, J.N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 689-692, 1987.

TANAKA, H. et al. Purification and properties of family-10 endo-1,4- β -xylanase from *Penicillium citrinum* and structural organization of encoding gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n. 4, p. 367–374, 2008.

TANAKA, M. et al. Purification and properties of cellulases from *Eupencillium javanicum*: studies on the re-utilization of cellulosic resources (VII). **Journal of fermentation technology**, v. 59, n. 3, p. 177-183, 1981.

TARAYRE, C. et al. Isolation and cultivation of a xylanolytic *Bacillus subtilis* extracted from the gut of the termite *Reticulitermes santonensis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 1, p. 225–245, 2013.

TEPLITSKY, A. et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of an intracellular xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 56, n. Pt 2, p. 181–184, 2000.

TUNC, M. S.; LAWOKO, M.; VAN HEININGEN, A. R. P. Understanding the limitations of removal of hemicelluloses during autohydrolysis of a mixture of southern hardwoods. **BioResources**, v. 5, n. 1, p. 356-371, 2010.

VANHOLME, R. et al. Lignin Biosynthesis and Structure. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 895–905, 2010.

VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3, p. 185-193, 2010.

VASCONCELLOS, V. M. et al. Addition of metal ions to a (hemi) cellulolytic enzymatic cocktail produced in-house improves its activity, thermostability, and efficiency in the saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **New Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 331–337, 2016.

VÁZQUEZ, M. J.; ALONSO, J. L.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Xylooligosaccharides : manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 11, p. 387–393, 2000.

VERMA, D.; ANAND, A.; SATYANARAYANA, T. Thermostable and alkalistable endoxylanase of the extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1: Cloning, expression, characteristics and its applicability in generating xylooligosaccharides and fermentable sugars. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 1, p. 119–130, 2013.

WAN, M. Y. et al. Substrate specificity and thermostability of the dehairing alkaline protease from *Bacillus pumilus*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 159, n. 2, p. 394–403, 2009.

WANG, S. et al. Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism : A state-of-the-art review. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 62, p. 33–86, 2017.

WANG, Z. J.; LAN, T. Q.; ZHU, J. Y. Lignosulfonate and elevated pH can enhance enzymatic saccharification of lignocelluloses. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 9, p. 1–10, 2013.

WESTBYE, P.; SVANBERG, C.; GATENHOLM, P. The effect of molecular composition of xylan extracted from birch on its assembly onto bleached softwood kraft pulp. **Holzforschung**, v. 60, n. 2, p. 143–148, 2006.

WEMHOFF, S.; MEINHARDT, F. Generation of biologically contained, readily transformable, and genetically manageable mutants of the biotechnologically important *Bacillus pumilus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 17, p. 7805–7819, 2013.

XIMENES, E. et al. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3, p. 170-176, 2010.

XUE, J. L. et al. A biotechnological process efficiently co-produces two high value-added products, glucose and xylooligosaccharides, from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 130–138, 2016.

YASINOK, A. E. et al. Xylanase from a soil isolate *Bacillus pumilus*: Gene isolation, enzyme production, purification, characterization and one-step separation by aqueous-two-phase system. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 9, p. 1641–1652, 2010.

ZAFAR, A. et al. Cloning, Expression, and Purification of Xylanase Gene from *Bacillus licheniformis* for use in Saccharification of Plant Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 294–311, 2016.

ZHOU, H. et al. Lignosulfonate to enhance enzymatic saccharification of lignocelluloses: Role of molecular weight and substrate lignin. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 25, p. 8464–8470, 2013.

ZU-SHAN, C.; PASZNER, L. Salt Catalyzed Wood Bonding with Hemicellulose. **Holzforschung**, v. 42, n. 1, p. 11–20, 1988.