UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ISABELLA KAROLINE RIBEIRO DIAS

The study of xylanase effects as an auxiliary enzyme on the production of cellulose nanocrystals through enzymatic hydrolysis with endoglucanase

Lorena

2017

ISABELLA KAROLINE RIBEIRO DIAS

The study of xylanase effects as an auxiliary enzyme on the production of cellulose nanocrystals through enzymatic hydrolysis with endoglucanase

Dissertation presented to the Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo to obtain the title of Master of Sciences of the Graduate Program in Industrial Biotechnology in the area of concentration of Biomass Conversion.

Advisor : Prof. Dr. Valdeir Arantes.

Original Version

LORENA

2017

ISABELLA KAROLINE RIBEIRO DIAS

O estudo dos efeitos da xilanase como uma enzima auxiliar na produção de celulose nanocristalina através da hidrólise enzimática com endoglucanase

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Conversão de Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. Valdeir Arantes.

Versão Original

LORENA
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)

Dias, Isabella Karoline Ribeiro

O estudo dos efeitos da xilanase como uma enzima auxiliar na produção de celulose nanocristalina através da hidrólise enzimática com endoglucanase / Isabella Karoline Ribeiro Dias; orientador Valdeir Arantes - Versão Original. - Lorena, 2017.
74 p.

Dissertação (Mestrado 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
Orientador: Valdeir Arantes

1. Hidrólise enzimática. 2. Endoglucanase. 3. Xilanase. 4. Celulose nanocristalina. I. Título. II. Arantes, Valdeir, orient.

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I thank God for all the opportunities and for giving me the strength to face all the challenges that have brought me here.

To my mother Isabel, who always battled hard, doing more than it was possible to her so that I could follow the path I chose.

To my father Airton and my brother Lucas who always protected and supported me.

To my supervisor Prof. Dr. Valdeir Arantes for giving us the opportunity to learn a lot in every meeting and in every conversation. It is a great pride and satisfaction to be with the "Senhor". For all your commitment, patience (lots of patience), dedication and availability, even on holidays. Thank you very much!

To Prof. Adriane for all the support and for making her laboratory available to me for a long time.

To Prof. Dr. Ferraz for the support and also for making his laboratory available.

To Prof. Dr. Segato for his constant teachings and support.

To the teachers of the postgraduate degree in Industrial Biotechnology for their teachings, which contributed to my formation in the master's degree.

To the friends of the Laboratory BBioPro (Barbara, Lisa, Gabriela, Eduarda, Renan and Wilian) and to the friends in the Laboratory of Microbiology and Biochemistry (Daniele, Maiara and Felipe) for the companionship, wisdom, conversations and laughter. Special thanks to Dr. Germano for all the teachings, protection and support, both technical and emotional.

To the laboratory technicians.

To CAPES for financial support.

To EEL-USP for the opportunity to carry out this work.

RESUMO

DIAS, I. K. R. **Estudo dos efeitos da xilanase como uma enzima auxiliar na produção de celulose nanocristalina por hidrólise enzimática com endoglucanase**. 2017. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

Celulose nanocristalina (CNC) é um material de grande ascensão e desenvolvimento no mercado, com um número cada vez maior de aplicações em diversos setores industriais. Contudo, suas aplicações dependem fortemente das propriedades químicas, físicas e ópticas inerentes da CNC, bem como a capacidade de subsequente modificação química. A produção de CNC por via enzimática é um processo controlado e ambientalmente correto que permite obter as CNCs com propriedades desejáveis, porém o processo ainda é pouco estudado. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi aumentar a seletividade da endoglucanase para as regiões amorfas e produzir CNC com alta cristalinidade e alto grau de pureza (baixo teor de hemicelulose). Para isso, foi investigado, pela primeira vez, os efeitos de um preparo enzimático rico em xilanase (Cellic HTec2 ®) para auxiliar na produção de CNC por hidrólise enzimática a partir de polpa kraft de eucalipto branqueada (BEKP). Surpreendentemente, combinações de enzimas com cargas mais elevadas de xilanase em relação a de endoglucanase, mostrou ter um maior potencial para produção de CNC, uma vez que esta foi a única condição que levou ao isolamento de nanopartículas. Essas nanopartículas apresentaram tamanho médio de 420-720nm, índice de cristalinidade entre 65-70%, suas suspensões aquosas permaneceram estáveis por um período maior do que 48h, e apresentaram termoestabilidade muito superior a CNCs obtidas pelo método tradicional de hidrólise com H₂SO₄. A combinação com carga de xilanase 3 e 7 vezes maior do que a de endoglucanase mostrou ser uma combinação ideal para produção de CNCs. Apesar da xilanase utilizada neste trabalho ter solubilizado mais 70% da xilana de BEKP, o teor de xilana encontrado nas CNCs mantiveram alto (13-15%) e não houve correlação com a composição química o resíduo de BEKP após a hidrólise enzimática.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática. Endoglucanase. Xilanase. Celulose nanocristalina.

ABSTRACT

DIAS, I. K. R. **The study of xylanase effects as an auxiliary enzyme on the production of cellulose nanocrystals through enzymatic hydrolysis with endoglucanase.** 2017. 74p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

Cellulose nanocrystal (CNC) is a high-value, emerging nanomaterial with an increasing number of applications in various industrial sectors. However, its applications depend heavily on the inherent chemical, physical and optical properties as well as its suitability for subsequent chemical modification. The enzymatic production of CNC is a controlled and ecofriendly process that allows to obtain CNC with improved properties, but the process is still poorly studied. In this context, the objective of this work was to increase the selectivity of an endoglucanase to the amorphous regions of cellulose and to produce CNC with high crystallinity and purity (low hemicellulose content). We investigated, for the first time, the ability of an endoxylanase enriched enzyme preparation (Cellic HTec2®) to aid in the production of CNC by enzymatic hydrolysis from a bleached eucalyptus kraft pulp (BEKP). Interestingly, it was found that combinations of enzymes with xylanase load higher than endoglucanase resulted in greater potential for CNC production, since this was the only condition that led to the isolation of nanoparticles. These nanoparticles showed an average particle size of 420-720nm, crystallinity index between 65-70%, and their aqueous suspension could remain stable for a period longer than 48h. The enzymatically produced CNCs showed much higher thermostability than the CNC obtained by the traditional hydrolysis with H₂SO₄. The combination of xylanase loading 3 and 7 times greater than endoglucanase was shown to be an ideal combination for CNC production. Although the xylanase employed in this work solubilized more than 70% of the xylan in BEKP, the content of xylan found in CNC produced remained high (13-15%) and did not correlated with the chemical composition of the enzymatic hydrolysis cellulosic residue.

Keywords: Enzymatic hydrolysis. Endoglucanase. Xylanase. Cellulose nanocrystal.