

MICHEL BRIENZO

**Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de  
xilo-oligossacarídeos**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração: Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Dra. Adriane M. F. Milagres

Lorena - SP  
2010

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.

### **Catálogo na Publicação**

Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”

Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Brienzo, Michel

Extração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos / Michel Brienzo ; orientadora Adriane M. F. Milagres. – Lorena: 2010.

134 pág. : fig.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Xilo-oligossacarídeos 2. Hemicelulose 3. *Thermoascus aurantiacus* 4. Hidrólise enzimática 5. Bioconversão 6. Endo- $\beta$ -1,4-xilanase. I. Título

547.458 - CDU

*Dedico esse trabalho:*

*A minha esposa Águeda;*

*A minha avó Amélia;*

*Aos meus pais Diogo e Aparecida;*

*Aos meus irmãos Gilmar, Gislaine e Ricardo;*

*A minha sobrinha Rayssa*

*Pelo carinho e incentivo*



## AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que agradeço:

A prof. Adriane pela oportunidade, orientação, confiança e ensinamentos, os quais foram muito além desse trabalho. O seu interesse pela pesquisa, dedicação e comprometimento fez com que esses anos de trabalho passassem de forma harmoniosa e prazerosa.

Aos professores André Ferraz, George Rocha e Walter Carvalho pelos ensinamentos, observações, comentários e sugestões, as quais contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço também pela irrestrita disponibilidade para conversar e discutir problemas.

A todos os professores do Departamento de Biotecnologia que contribuíram através das disciplinas para o ensino e desenvolvimento intelectual e científico.

A todos os funcionários do Departamento de Biotecnologia e do Programa de Pós-Graduação, principalmente aos técnicos Djalma, Fabrício, Cibele, Jussara, José Carlos e Bárbara, que de forma direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos Celso, Daniela B., Daniela C., Débora, Fernanda, Germano, Hévila, Jéssica, Joseana, Luiz Carlos, Márcio, Paula, Ricardo, Robson, Sérgio, Valdeir, Victor e todos os colegas pela amizade e convívio. Em especial gostaria de agradecer as alunas de iniciação científica Andressa e Thaianne, que além da amizade contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos, que de longe acompanham minha vida, Aline, Claudia, Dorival, Manoela, Noeli, Fabrício, Peterson, Rose e Stivens e, também ao Sérgio, Celina e Érick.

A FAPESP pelo financiamento do projeto.



## RESUMO

BRIENZO, M. **Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos.** 2010. 137p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo – Lorena, 2010.

Hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar foi hidrolisada por enzimas de *Thermoascus aurantiacus*, *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* para obtenção de xilo-oligossacarídeos (XOs). A hemicelulose foi extraída com hidróxido de sódio na presença de antraquinona, sulfito de sódio ou peróxido de hidrogênio. O uso de antraquinona ou sulfito aumentou o rendimento de extração, porém a hemicelulose apresentou baixa solubilidade em água, propriedade inadequada para a hidrólise enzimática. A extração da hemicelulose com peróxido de hidrogênio em meio alcalino foi otimizada através de um planejamento fatorial completo  $2^4$  variando-se a concentração de  $H_2O_2$  de 2 a 6% (m/v), tempo de reação de 4 a 16 h, temperatura de 20 a 60°C e presença ou não de 0,5% de sulfato de magnésio. No ponto central o rendimento de extração de hemicelulose foi de 94,5% com remoção de mais que 88% da lignina. Um rendimento de 86% de hemicelulose com baixo teor de lignina (5,9%) foi obtido em 6% de peróxido de hidrogênio por 4h a 20°C. Nessa condição a hemicelulose apresentou massa molar de 21.000 g/mol, composição aproximada de 81% xilose, 4% de arabinose, 4% de glicose e 3% de ácidos urônicos, alta solubilidade em água (90 % em massa) e coloração amarelo claro. As enzimas usadas na hidrólise dessa hemicelulose foram produzidas pelo cultivo dos fungos em meio sólido contendo farelo de trigo. Em todos os extratos foi observada baixa atividade de endoglucanase e  $\beta$ -xilosidase e elevadas atividades de endo- $\beta$ -1,4-xilanase. A máxima atividade de xilanase foi produzida por *T. aurantiacus* (1500 U/g), enquanto *A. niger* produziu 500 U/g e *T. reesei* 240 U/g, em 5 dias de cultivo. O perfil de produção de XOs com enzimas de *T. aurantiacus* e *T. reesei* foi semelhante, o principal produto foi xilobiose, seguido por xilose, xilotriose, xilotetraose e xilopentaose, sendo esses XOs de cadeia linear. A hidrólise da hemicelulose com enzimas de *A. niger* produziu exclusivamente xilose, consequência da presença de elevada atividade de  $\beta$ -xilosidase. A velocidade de conversão da hemicelulose em XOs com as enzimas de *T. reesei* foi maior no início da reação (6 h), diminuindo a partir de 24 h, período em que inicia a produção de xilose. A influência da concentração de substrato e carga de xilanase na conversão da hemicelulose em XOs foi avaliada através de um planejamento experimental  $2^2$  com face centrada. A condição otimizada da hidrólise (2,6% substrato e 60 U/g de endo- $\beta$ -1,4-xilanase) com o extrato de *T. aurantiacus* resultou em 42% de conversão em XOs. A otimização da hidrólise da hemicelulose com o extrato de *T. reesei* resultou em uma conversão máxima de 20%, com ótimo de 3,8 % de substrato e 87,5 U/g de endo- $\beta$ -1,4-xilanase. A eficiência da hidrólise com enzimas de *T. aurantiacus* foi maior que a obtida com alguns extratos comerciais testados neste trabalho. Além disso, apresentaram capacidade de degradar hemiceluloses de diferentes fontes: bétula e semente de aveia, com composições variadas. Diferenças na composição de açúcares e teor de lignina não interferiram na ação dessas enzimas. A hidrólise enzimática mostrou-se mais apropriada para a produção de XOs do que a auto-hidrólise, que gerou predominantemente xilose e houve formação de furfural. Apesar do curto tempo de reação, a produção de XOs foi menor e há necessidade de purificação para obtenção de um produto final com características desejáveis.

**Palavras-chave:** Xilo-oligossacarídeos. Hemicelulose. *Thermoascus aurantiacus*. Hidrólise enzimática. Bioconversão. Endo- $\beta$ -1,4-xilanase.

## ABSTRACT

BRIENZO, M. Extraction of hemicellulose from sugarcane bagasse for xylooligosaccharides production. 2010. 137p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo – Lorena, 2010.

Hemicellulose extracted from sugarcane bagasse was hydrolyzed by enzymes from *Thermoascus aurantiacus*, *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* to cause the degradation of xylan to xylooligosaccharides (XOs). Hemicellulose was extracted with hydrogen peroxide in the presence of antraquinone, sodium sulphite or hydrogen peroxide. Hemicelluloses extracted with antraquinone or sulphite presented low solubility in water, which is not appropriated to enzymatic hydrolysis. To maximize the hemicellulose yields several extraction conditions were examined applying the  $2^4$  factorial design:  $H_2O_2$  concentration from 2 to 6% (w/v), reaction time from 4 to 16 h, temperature from 20 to 60°C, and magnesium sulfate absence or presence (0.5%, w/v). This approach allowed selection of conditions for the extraction of low and high lignin content hemicellulose. At midpoint the yield of hemicellulose was 94.5% with more than 88% of lignin removed. Hemicellulose in 86% yield with low lignin content (5.9%) was obtained with 6%  $H_2O_2$  treatment for 4 h and 20°C. This hemicellulose is much lighter in color than samples obtained at the midpoint condition and was found suitable for subsequent enzymatic hydrolysis. The molecular weight of hemicellulose was 21,000 g/mol with composition of approximately 81% xylose, 4% arabinose, 4% glucose and 3% uronic acids, high water solubility (90 %). Enzymes for hemicellulose hydrolysis were produced by the fungi on wheat bran. Cellulases and hemicellulases were present in all extracts especially the endo- $\beta$ -1,4-xylanase. The profile of production of XOs obtained on hydrolysis with enzymes from *T. aurantiacus* and *T. reesei* was similar, with the main product xylobiose, followed by xylose, xylotriose, xyloetraose and xylopentaose, and these XOs showed linear chain. The hydrolysis of hemicellulose with enzymes of *A. niger* produced exclusively xylose, a consequence of  $\beta$ -xylosidase content. The rate of conversion of hemicellulose in XOs with enzymes of *T. reesei* was higher at the beginning of the reaction (6 h), decreasing from 24 h, when starts the production of xylose. The influence of substrate concentration and loading of xylanase in conversion of hemicellulose to XOs was evaluated by an  $2^2$  full factorial design with centered face. Optimization of hydrolysis (2.6% substrate and 60 U/g endo- $\beta$ -1,4-xylanase) with the extract of *T. aurantiacus* resulted in 42 % conversion XOs. The optimization with the extract of *T. reesei* resulted in a conversion of hemicellulose up to 20%, with optimal substrate 3.8% and 87.5 U/g endo- $\beta$ -1,4-xylanase. The efficiency of hydrolysis by enzymes from *T. aurantiacus* was superior to commercial extracts, and showed ability to degrade hemicelluloses of different compositions (birchwood and oat spelt). The structural differences, such as branches and lignin content did not affect the action of these enzymes. The differences in the efficiency and extent of enzymatic hydrolysis by enzymes of these fungi might have occurred in function of differences in physicochemical properties and specific activity. The enzymatic hydrolysis was more appropriate for production of XOs than autohydrolysis, which generated predominantly xylose and formation of furfural. Despite of short reaction time, the production of XOs was low and purification is needed in order to obtain a final product with desirable characteristics.

**Keywords:** Xylooligosaccharides. Hemicellulose. *Thermoascus aurantiacus*. Enzymatic hydrolysis. Bioconversion. Endo- $\beta$ -1,4-xylanase.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da celulose (FENGEL; WEGENER, 1984).....	20
Figura 2. Estrutura dos monossacarídeos da hemicelulose (FENGEL; WEGENER, 1984)....	21
Figura 3. A - Estrutura esquemática de hemicelulose (ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2004), B- estrutura representativa de L-arabino-(4-O-metil-D-glucurono)-D-xilana: 1- Xilopirranose; 2- L-arabinofuranose; 3- ácido 4-O-metil-glucurônico; 4- grupo acetil (McDOUGALL et al., 1993). .....	23
Figura 4. Álcoois precursores da lignina (FENGEL; WEGENER, 1984). .....	24
Figura 5. Estruturas propostas para as diferentes ligações entre lignina e carboidratos (adaptado: WATANABE, 2003). .....	25
Figura 6. Sequência de reações de degradação de lignina em meio alcalino (XIANG; LEE, 2000). .....	31
Figura 7. Mecanismo oxidativo de clivagem de carboidratos por radicais hidroxilas (GUAY et al., 2001). .....	32
Figura 8. Mecanismo proposto para formação de celobiose por radicais hidroxilas a partir de metil- $\beta$ -celobiose (GUAY et al., 2001). .....	32
Figura 9. <i>Thermoascus aurantiacus</i> ATCC 204492. (A) Crescimento em água-malte; (B) Hifas e esporos; (C) Ascósporos; (D) Liberação dos esporos por rompimento do ascósporo. (ampliação de 400 vezes).....	37
Figura 10. Representação esquemática dos procedimentos utilizados para separação dos constituintes principais do bagaço de cana-de-açúcar e extração alcalina da hemicelulose. ....	53
Figura 11. Superfície de resposta mostrando o efeito do peróxido de hidrogênio ( $x_2$ ) e tempo de reação ( $x_3$ ) no rendimento de hemicelulose. ....	70
Figura 12. Superfície de resposta descrita pelo modelo linear para o teor de lignina residual na hemicelulose em função das variáveis significativas. ....	72
Figura 13. Aspecto visual das hemiceluloses obtidas dos experimentos relativos ao planejamento $2^4$ completo.....	74
Figura 14. Espectro de FT-IR das hemiceluloses obtida por extração com $H_2O_2$ em meio alcalino (Os números 1, 3, 12, 16 e 17 são referentes aos experimentos do planejamento experimental $2^4$ completo). ....	76
Figura 15. Análise dos componentes principais do espectro de FT-IR da hemicelulose obtida com $H_2O_2$ em meio alcalino (Os números 1, 3, 12, 16 e 17 são referentes aos experimentos do planejamento completo $2^4$ ).....	77
Figura 16. Valores de contrastes entre PC1 e PC2 do espectro de FT-IR das amostras de hemicelulose extraídas com peróxido de hidrogênio em meio alcalino. ....	77
Figura 17: pH final do meio de cultivo de <i>A. niger</i> , <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. reesei</i> .....	79
Figura 18. Produção de xilanase por <i>A. niger</i> , <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. reesei</i> em meio sólido com farelo de trigo (75 % umidade). ....	80
Figura 19. Produção de endoglucanase por <i>A. niger</i> e <i>T. aurantiacus</i> em meio sólido com farelo de trigo (75 % umidade). ....	81
Figura 20. Produção de $\beta$ -xilosidase por <i>A. niger</i> e <i>T. aurantiacus</i> em meio sólido com farelo de trigo (75 % umidade). ....	82
Figura 21. Atividades enzimáticas de <i>T. aurantiacus</i> detectadas no meio com xilose (■), xilobiose (□) e HXSB. Atividade enzimática detectada nos cultivos: xilanase (■), $\beta$ -xilosidase (■), endo-glucanase (■), $\beta$ -glucosidase (■), arabinofuranosidase (■).....	84
Figura 22. Efeito do pH na atividade de xilanase de <i>A. niger</i> , <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. reesei</i> cultivados em farelo de trigo. ....	85

Figura 23. Efeito da temperatura na atividade de xilanase de <i>A. niger</i> , <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. reesei</i> cultivados em farelo de trigo. ....	86
Figura 24. Estabilidade térmica a 50 e 60°C da xilanase de <i>T. aurantiacus</i> cultivado em farelo de trigo. ....	87
Figura 25. Estabilidade térmica a 70°C da xilanase de <i>T. aurantiacus</i> cultivado em farelo de trigo. ....	88
Figura 26. Estabilidade térmica a 40 e 50°C da xilanase de <i>A. niger</i> cultivado em farelo de trigo. ....	88
Figura 27. Estabilidade térmica a 40 e 50°C da xilanase de <i>T. reesei</i> cultivado em farelo de trigo. ....	89
Figura 28. Conversão da hemicelulose do bagaço de cana em xilose durante a hidrólise com extrato enzimático de <i>T. aurantiacus</i> em diferentes concentrações de substrato e enzima. ....	94
Figura 29. Conversão da hemicelulose do bagaço de cana em xilose durante a hidrólise com extrato enzimático de <i>T. reesei</i> em diferentes concentrações de substrato e enzima...	95
Figura 30. Conversão da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar em xilobiose pelas enzimas de <i>T. aurantiacus</i> .....	96
Figura 31. Conversão total durante hidrólise da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar com enzimas de <i>T. aurantiacus</i> .....	97
Figura 32. (A) Superfície de resposta; (B) Gráfico de contorno descrito pelo modelo que representa a conversão de hemicelulose em XOs, obtido pela hidrólise com enzimas de <i>T. aurantiacus</i> . ....	99
Figura 33. Conversão da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar em xilobiose pelas enzimas de <i>T. reesei</i> . ....	101
Figura 34. Conversão total durante a hidrólise da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar com enzimas de <i>T. reesei</i> . ....	102
Figura 35. (A) Superfície de resposta; (B) Gráfico de contorno descrito pelo modelo que representa a conversão de hemicelulose (2 – 5 %) em XOs, obtido pela hidrólise com extrato de <i>T. reesei</i> (60 – 100 U/g). ....	105
Figura 36. Espectro de infravermelho das amostras de hemicelulose de bagaço e dos resíduos sólidos obtidos após hidrólise com enzimas de <i>T. aurantiacus</i> (60 U/g de xilanase, 2 % de hemicelulose por 96 h) e <i>T. reesei</i> (80 U/g de xilanase, 3,5% de hemicelulose por 6 h). ....	107
Figura 37: Cromatografia em camada delgada dos produtos da hidrólise de hemiceluloses de bagaço, bétula e semente de aveia por extrato de <i>T. aurantiacus</i> após 96 h de reação. (1: padrões, 2: xilana do bagaço + 10 U/g endo-xilanase; 3: xilana do bagaço + 30 U/g endo-xilanase; 4: xilana bétula + 10 U/g endo-xilanase; 5: xilana bétula + 30 U/g; 6: xilana de semente de aveia + 10U/g endo-xilanase; 7: xilana de semente de aveia + 30 U/g endo-xilanase; 8: xilana do bagaço; 9: xilana bétula; 10: xilana de semente de aveia). ....	111
Figura 38: Cromatografia em camada delgada dos produtos da hidrólise da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar com enzimas de <i>T. aurantiacus</i> . (1: padrões; 2: ácido aldourônico; 3: hidrolisado com 3 h de reação; 4: 6 h; 5: 48 h; 6: 96 h; 7: extrato enzimático; 8: hemicelulose do bagaço). ....	112
Figura 39. Cromatografia em camada delgada dos produtos da hidrólise de xilooligosacarídeos (Amostra) obtidos da ação da xilanase de <i>T. aurantiacus</i> sobre a hemicelulose do bagaço. (1: padrões; 2: aldotetraurônico; 3: Amostra + endo-xilanase da família 5 (EX5); 4: Amostra + EX10; 5: Amostra + EX11; 6: Amostra + EX5 β - xilosidase; 7: Amostra + EX10 + β-xilosidase; 8: Amostra + EX11 + β-xilosidase; 9: Amostra + β-xilosidase; 10: β-xilosidase). ....	112

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

