UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ *CAMPUS* DE CASCAVEL CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AMANDA ALVES

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA BETA-XILOSIDASE II DE Caulobacter crescentus VISANDO A DEGRADAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

> Orientadora: Prof^a Dr^a Rita de Cássia Garcia Simão Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Maller

AMANDA ALVES

Caracterização bioquímica da Beta-Xilosidase II de *Caulobacter crescentus* visando a degradação da biomassa lignocelulósica para aplicações biotecnológicas.

> Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rita de Cássia Garcia Simão Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Maller

> CASCAVEL- PR 2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A477c	Alves, Amanda Caracterização bioquímica da Beta-Xilosidase II de <i>Caulobacter</i> <i>crescentus</i> visando a degradação da biomassa lignocelulósica para aplicações biotecnológicas./ Amanda Alves. — Cascavel, 2015. 118 p.
	Orientadora: Prof ^a . Dr ^a . Rita de Cássia Garcia Simão Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Maller
	Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2015 Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas
	1. Inibidores de fermentação. 2. Fermentação e sacarificação simultânea (SSF). 3. Etanol de segunda geração. 4. Hidrólise enzimática. I. Simão, Rita de Cássia Garcia. II. Maller, Alexandre. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.
	CDD 21.ed. 615.329 CIP – NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA BETA-XILOSIDASE II DE Caulobacter crescentus VISANDO A DEGRADAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.

Dissertação orientada pela Prof^a Dr^a Rita de Cássia Garcia Simão e coorientada pelo docente Prof. Dr Alexandre Maller, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, no dia 07 de dezembro de 2015, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, linha de pesquisa em Prospecção de micro-organismos e substâncias bioativas com aplicações em saúde, e, aprovada pela seguinte banca examinadora:

Prof^a Dr^a Rita de Cássia Garcia Simão Centro de Ciências Médicas Farmacêuticas, UNIOESTE – Cascavel, PR Orientadora

> Prof^a Dr^a Roberta Paulert Universidade Federal do Paraná, *campus* de Palotina Banca – Membro externo

Prof^ª Dr^ª Marina Kimiko Kadowaki Centro de Ciências Médicas Farmacêuticas, UNIOESTE – Cascavel, PR Banca – Membro interno

> CASCAVEL – PR 2015

AMANDA ALVES BIOGRAFIA RESUMIDA

Amanda Alves, natural de Iretama, Paraná, Brasil, nascida no dia 28 de fevereiro de 1989, formou-se em Farmácia na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *campus* de Cascavel em dezembro de 2013. Ingressou no programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas na UNIOESTE, *campus* de Cascavel, PR, do Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas no ano de 2014. Desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha de pesquisa **Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações em saúde,** orientada pela Prof^a Dr^a Rita de Cássia Garcia Simão e co-orientada pelo docente Prof. Dr Alexandre Maller.

Dedico este trabalho às pessoas que lutam diariamente ao meu lado, transmitindo fé, amor, alegria, determinação, paciência, e coragem, tornando os meus dias mais felizes e bonitos. Aos meus pais, **Milton** e **Matilde** e às minhas irmãs **Alyne** e **Tamiris**, e ao meu noivo **Malcon**, por tanto amor, carinho e apoio a mim dedicados. Sem vocês eu não seria nada!

AGRADECIMENTOS

A **Deus** que me proporcionou saúde, força e sabedoria para vencer mais esta etapa tão sonhada de minha vida;

Aos meus pais, **Milton** e **Matilde**, pelo amor, carinho, incentivo, por oferecer todas as condições necessárias para que eu finalizasse este estudo, e por fazerem de mim a pessoa que sou hoje. Agradeço também às minhas irmãs **Tamiris** e **Alyne**, e meu cunhado **Walter**, pelo companheirismo, apoio e suporte em todos os momentos. E também a pequena **Isabela**, minha sobrinha amada, que sempre nos proporciona seu sorriso tão lindo e seu carinho tão sincero, fazendo com que os dias sejam mais leves;

Ao meu noivo **Malcon**, agradeço pelo amor, incentivo e principalmente pela paciência durante todos esses anos, por caminhar junto comigo, por me ajudar e me fazer tão feliz;

A minha amiga, e irmã do coração, **Monique Picolotto**, por estar sempre ao meu lado, por me acompanhar desde o tempo de faculdade, e por me dar o privilégio de tê-la como amiga, um dos maiores presentes que o curso de Farmácia me trouxe.

A minha orientadora, Profa. Dra. **Rita de Cássia Garcia Simão**, pela orientação, pelos ensinamentos em pesquisa, pela confiança e entusiasmo durante todo o trabalho, por ser um exemplo de cientista, capaz, dinâmica e sempre disposta a ajudar;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. **Alexandre Maller**, pela supervisão, apoio e ensinamentos;

A **Juliana Moço Corrêa** por todo ensinamento, toda ajuda, e por ser a pessoa que é, que está sempre disposta a ajudar a todos, que, sobretudo, tem um coração enorme, sem a qual esse trabalho teria sido muito mais difícil de executar;

Aos docentes Dra. Marina Kimiko Kadowaki, Dr. José Luis da Conceição Silva, Dr. Rinaldo Ferreira Gandra, Dra. Rose de Lucca, Dra. Sandra L. Balbo e Dra.

Maria Lúcia Bonfleur pelas contribuições e disponibilização de seus laboratórios, equipamentos, reagentes e sugestões durante o desenvolvimento da pesquisa;

Às professoras Dra. **Roberta Paulert e** Dra. **Marina Kimiko Kadowaki** por disponibilizarem tempo e por terem colaborado de forma tão significativa em minha banca de qualificação;

A professora Dra. Luciane Sene pela contribuição com as enzimas comerciais que foram importantes neste trabalho;

A **todos os colegas do grupo de Bioquímica**, agradeço pela disposição em tornar o nosso local de trabalho um ambiente amigável e por serem tão colaborativos;

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná e a todos os professores que colaboraram, em criar o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, PCF, que tive a oportunidade de cursar e onde pude me aperfeiçoar;

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pelo auxílio financeiro através da bolsa de estudos;

A **Fundação Araucária** por financiar parcialmente a Profa. Dra. Rita de C. G. Simão através de bolsa de produtividade em pesquisa (processo 630/2014);

Finalmente, aos **servidores técnicos** e **administrativos** da UNIOESTE - Cascavel e a **todos**, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO GERAL

ALVES, A. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA BETA-XILOSIDASE II DE *Caulobacter crescentus* VISANDO A DEGRADAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS. Cascavel: UNIOESTE, 2015. 118fls. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Biomassas lignocelulósicas constituem a matéria-prima mais abundante e promissora como recurso natural e renovável. Esses materiais vegetais são polímeros de carboidratos complexos compostos basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, que estão unidos entre si por ligações covalentes e podem ser convertidos em produtos de valor agregado, como os biocombustíveis. A degradação dos materiais lignocelulósicos é feita a partir de enzimas produzidas principalmente por micro-organismos como fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Para obter etanol a partir de resíduos agroindustriais, baseando-se na hidrólise enzimática, são necessárias, basicamente, quatro etapas: produção de enzimas, pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação. O pré-tratamento é o processo que irá dissociar o complexo lignina-celulose, reduzir o grau de cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais, através do aumento da área superficial da biomassa. No entanto, o pré-tratamento pode gerar produtos inibidores, que incluem compostos fenólicos e outros aromáticos, ácidos alifáticos, aldeídos, furanos, íons inorgânicos. A fermentação e sacarificação simultânea é uma estratégia importante para a produção de etanol celulósico ou de segunda geração, onde a hidrólise enzimática da celulose e a fermentação são desenvolvidas simultaneamente no mesmo reator, com o intuito de obter etanol em altas taxas e diminuir a formação de compostos inibidores. A hidrólise enzimática necessita, primeiramente, que a biomassa lignocelulósica seja pré-tratada para aumentar o acesso ao ataque enzimático, para que posteriormente a celulose seja quebrada pela ação de celulases. As xilanases compreendem o grupo de enzimas responsáveis pela hidrólise do xilano, principal constituinte da hemicelulose. As principais enzimas envolvidas nesse processo são β -1,4-endoxilanase e a β -Dxilosidase. Endoxilanases clivam as ligações glicosídicas da cadeia principal do xilano liberando xilo-oligossacarídeos, que são utilizados pelas β-xilosidases para liberar xilose. A alfaproteobactéria Caulobacter crescentus é não patogênica, Gram negativa, encontrada principalmente em ambientes aguáticos e em muitos tipos de solos. Essa bactéria apresenta cerca de sete genes envolvidos diretamente na degradação do xilano, sendo que cinco deles codificam para β-xilosidases. Até o momento, existem apenas três trabalhos sobre a β-xilosidase II de C. crescentus. A primeira caracterização da enzima mostrou que esta é capaz de hidrolisar substratos como xilobiose, xilotriose e xilopentose, cujo pH ótimo é 6 e temperatura ótima é 55°C, embora seja mais estável em 50°C, o que demonstra uma modesta termotolerância, indicando ser suficientemente resistente para diferentes aplicações biotecnológicas. A estabilidade e a possibilidade de reutilização de enzimas são de fundamental importância, pois refletem significativamente no custo do produto final, e uma forma de conseguir isso é com a imobilização de enzimas, que consiste no confinamento da mesma em uma matriz ou suporte, que podem ser polímeros inertes ou materiais inorgânicos, de modo que sua atividade catalítica figue retida e a enzima possa ser usada repetidamente e continuamente. No presente trabalho, verificou-se que a β-xilosidase II (CcXynB2) de *Caulobacter crescentus* aumentou 62% da sua atividade em 5 mM de KCI provavelmente em consequência de um papel positivo dos íons K+. CcXynB2 foi avaliada frente a diferentes compostos descritos como inibidores do processo de hidrólise e fermentação da biomassa lignocelulósica e mostrou-se 61% mais tolerante a incubação com etanol (200 mM) a 37 C por 48 h do que na ausência do álcool. As atividades específicas da CcXynB2 foram avaliadas na presença de 10 mM fenol ou ácido galacturônico, 100 mM de hidroximetilfurfural ou ácido ferúlico, 1 mM de ácido acético, 200 mM de arabinose, glicose ou xilose, e verificou-se que foram iguais (100%) ou muito superiores aos valores obtidos na ausência total destes compostos após 48 h. Quando os inibidores foram usados em associação, a CcXynB2 reteve 67% da sua atividade inicial após 48 h de ensaio a 37°C. A hidrólise enzimática da hemicelulose de sabugo de milho foi conduzida com CcXynB2 isoladamente ou em sinergismo com xilanase e βglicosidase comerciais, as quais foram mais eficientes em sacarificar a hemicelulose entre 37-50°C. A imobilização da CcXynB2 em resina de fase móvel levou a um efeito protetor da atividade específica, que ocorreu de forma paralela à diminuição de temperatura (60 a -20°C). Os dados apresentados aqui indicam que a CcXynB2 é promissora e possui potencial para atuar em processos de sacarificação e fermentação simultânea para produção de etanol celulósico. Segundo nosso conhecimento, é a primeira vez que resultados similares são relatados na literatura positivamente, fornecendo informações fundamentais para aprimorar o uso da βxilosidase II de Caulobacter crescentus.

Palavras-chave: Inibidores da Fermentação, Fermentação e Sacarificação Simultânea (SSF), Etanol de Segunda Geração, Hidrólise Enzimática

GENERAL ABSTRACT

ALVES, A. BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF BETA-XYLOSIDASE II FROM *Caulobacter crescentus* CONCENTRATES ON LIGNOCELLULOSIC BIOMASS DEGRADATION FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS. Cascavel: UNIOESTE, 2015. 118fls. Dissertation Project (Master in Pharmaceutical Sciences) -Centre of Medical and Pharmaceutical Sciences at the State University of Western Paraná.

Lignocellulosic biomass are the raw material most abundant and promising as a natural and renewable resource. These plant materials are complex carbohydrate polymer composed mainly of cellulose, hemicellulose and lignin, which are linked by covalent bonds and can be transformed into value-added products, such as biofuels. The degradation of lignocellulosic material is made mainly from enzymes produced by microorganisms such as filamentous fungi, yeast and bacteria. Ethanol production from agricultural residues, based on the enzymatic hydrolysis, it takes basically four stages: production of enzymes, pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation. Pretreatment is a work that will break the lignin cellulose complex, reducing the degree of crystallinity of the cellulose and increase the porosity of the material, by increasing the surface area of the biomass. However, pre-treatment products can generate inhibitors which include phenolic and other aromatic, aliphatic acids, furans. aldehydes. inorganic ions. The fermentation and simultaneous saccharification is an important approach for producing cellulosic or ethanol of second generation, where the enzymatic hydrolysis of cellulose and fermentation are simultaneously carried out in the same reactor, in order to obtain ethanol at a high rate and decrease formation of inhibitor compounds. Enzymatic hydrolysis requires, first, that the lignocellulosic biomass is pretreated to increase access to enzymatic attack, so that later the cellulose is broken down by cellulase action. Xylanases include the group of enzymes responsible for the hydrolysis of xylan, the major constituent of hemicellulose. The key enzymes involved in this process are β -1,4endoxylanase and β-D-xylosidase. Endoxylanase cleave glycosidic linkages of the main chain of xylan releasing xylo-oligosaccharides, which are used by β -xylosidase to produce monomers of xylose. The alfaproteobacteria Caulobacter crescentus is non pathogenic, Gram negative, mainly found in aquatic environments and on many types of soils. This bacterium has about seven genes directly associated with xylan degradation and five of them encoding β-xylosidases. To date, there are only three studies on the β -xylosidase II from C. crescentus. The first characterization of this enzyme showed that it is capable of hydrolyzing substrates such as xylobiose, xylotriose and xilopentose whose optimum pH is 6 and optimum temperature is 55°C. although it is stable at 50°C, which shows a thermotolerance, indicating strong enough to be used in different biotechnological applications. The stability and reusability of enzymes are of fundamental importance, since they reflect significantly on the cost of the final product, and one way to achieve this is with the immobilization of enzymes, consisting of confinement thereof in a matrix or support, which can be inert polymers or inorganic materials, so that its catalytic activity is retained and the enzyme can be used repeatedly and continuously. In the present report, it was found that the β-xylosidase II (CcXynB2) of Caulobacter crescentus increased by 62% of its activity in 5 mM KCI probably as a consequence of a positive role of K+ ions.

CCxynB2 was measured against various compounds described as inhibitors of hydrolysis and fermentation of lignocellulosic biomass and showed 61% more tolerant incubation with ethanol (200 mM) at 37 °C for 48 h in the absence of alcohol. The specific activities of CcXynB2 were evaluated in the presence of 10mM phenol or galacturonic acid, 100 mM hydroxymethylfurfural or ferulic acid, 1 mM acetic acid, 200 mM arabinose, glucose or xylose and it was found that were equal (100%) or much higher than the values obtained in the total absence of these compounds after 48 h. When the inhibitors were used in combination, the CcXynB2 retained 67% of its initial activity after testing at 37°C during 48 h. The enzymatic hydrolysis of hemicellulose from corncob was conducted with CcXynB2 alone or in synergism with xylanase and commercial β-glycosidase, which were more efficient in performed the saccharification of hemicellulose from 37-50 °C. The immobilized CcXynB2 in mobile phase resin led to a protective effect of specific activity, which was proportionally parallel to decreased temperatures (60 to -20°C). The data presented here indicate that CcXynB2 is promising and has potential to work in simultaneous saccharification and fermentation processes for cellulosic ethanol production. To our knowledge, is the first time that similar results are reported in the literature to bacterial βxylosidases. Thus, this work contribute positively by providing essential information to improve the use of β -xylosidase II of Caulobacter crescentus.

Keywords: Fermentation Inhibitors, Simultaneous Saccharification and Fermentation, Second Generation Ethanol, Enzymatic Hidrolysis

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	vi
GENERAL ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	xii
LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	xiii
LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO	xiv
LISTA DE TABELAS DO ARTIGO	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Biomassa lignocelulósica	5
3.1.1 Celulose	7
3.1.2 Hemicelulose	8
3.1.3 Lignina	9
3.2 Processos para a produção de etanol	10
3.2.1 Produção de enzimas	10
3.2.2 Pré-tratamento	10
3.2.2.1 Tipos de pré-tratamento	12
3.2.2.2 Formação de inibidores	12
3.2.2.3 Efeito dos inibidores	14
3.2.2.4 Estratégias para conter problemas da inibição	15
3.2.3 Hidrólise da biomassa lignocelulósica	16
3.2.3.1 Hidrólise química	16
3.2.3.1.1 Hidrólise com ácido concentrado	16
3.2.3.1.2 Hidrólise com ácido diluído	17
3.2.3.2 Hidrólise enzimática	17
3.2.3.2.1 Hidrólise enzimática da celulose	17
3.2.3.2.2 Hidrólise enzimática da hemicelulose	18
3.2.3.2.3. Aplicações biotecnológicas das celulases e hemicelulases	21
3.2.4 Fermentação alcoólica	21
3.2.4.1 Estratégias de fermentação	22
3.2.4.1.1 Hidrólise e fermentação em separado (SHF)	22

3.2.4.1.2 Sacarificação e fermentação simultânea (SSF)	23
3.2.4.2 Produção de bioetanol	24
3.2.4.2.1 Etanol de primeira geração	24
3.2.4.2.2 Etanol de segunda geração	24
3.3 Caulobacter crescentus	25
3.3.1 Beta-xilosidase II de Caulobacter crescentus	27
3.4 Imobilização de enzimas	28
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
5 ARTIGO ORIGINAL	42
6 CONCLUSÕES GERAIS	76
ANEXOS	77

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1	Modelo da parede celular elucidando o complexo lignocelulolítico .	6		
Figura 2	Processamento termoquímico e bioquímico da biomassa lignocelulósica em vários produtos tecnológicos de valor agregado	6		
Figura 3	Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular			
Figura 4	Estrutura lignocelulósica antes e após o pré-tratamento	12		
Figura 5	Formação de compostos inibitórios durante o processo de fermentação	14		
Figura 6	Estrutura química do xilano	20		
Figura 7	Esquema mostrando a coordenação funcional das enzimas de degradação da hemicelulose (principalmente xilano)	20		
Figura 8	Visão geral da fermentação alcoólica	22		
Figura 9	Ciclo celular de Caulobacter crescentus	27		
Figura 10	Esquema das três técnicas mais comuns de imobilização	29		

LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1	Diferenças entre celulose e hemicelulose	9
Tabela 2	Produção de etanol celulósico	11
Tabela 3	Métodos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos	13

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Fig. 1	Etapas de purificação da CcXynB2	65
Fig. 2	Influência de diferentes concentrações de KCI na atividade enzimática da CcXynB2	66
Fig. 3	Efeito do etanol, fenol e hidroximetilfurfural na atividade da $\beta\text{-xilosidase II}$	67
Fig. 4	Efeito da arabinose, glicose, xilose e pectina na atividade da CcXynB2	68
Fig. 5	Efeito dos ácidos acético, fórmico, cumárico e ferúlico na atividade da CcXynB2	69
Fig. 6	Efeito de vários compostos combinados na atividade da CcXynB2	70
Fig. 7	Dosagem de açúcar redutor e atividade da β-xilosidase II após hidrólise enzimática	71
Fig. 8	Estabilidade térmica da β-xilosidase II imobilizada e não imobilizada	72
Fig. 9	Estabilidade da CcXynB2 imobilizada após 30 dias de congelamento	73

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1	Efeito de íons e diferentes compostos na atividade enzimática da CcXynB2	74
Tabela 2	Efeito do KCI nos parâmetros cinéticos da CcXynB2 a 55°C	75

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos vem se observando um crescente interesse na hidrólise da celulose e hemicelulose, na tentativa de desenvolver um processo de baixo custo para utilizar resíduos lignocelulósicos como matéria prima para a produção de produtos de valor agregado, como o bioetanol (ADSUL et al., 2011; NIGAM e SINGH, 2011; SINDHU et al., 2011).

Para se obter etanol a partir de biomassa lignocelulósica, baseando-se na hidrólise enzimática, são necessárias, basicamente, quatro etapas: produção de enzimas, pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação (JANG et al., 2012).

O pré-tratamento é o processo para preparar os materiais lignocelulósicos para a hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose a fim de gerar açúcares fermentáveis (McMILLAN, 1994). Nessa etapa são formados alguns compostos inibidores, como hidroximetilfurfural, compostos fenólicos e ácidos fracos. A geração desses produtos depende fortemente da matéria-prima utilizada e do método escolhido de pré-tratamento (JÖNSSON et al., 2013).

Antes da fermentação, os polímeros de carboidratos dos materiais lignocelulósicos precisam ser convertidos a açúcares simples através de um processo chamado hidrólise enzimática, que é uma hidrólise catalisada por enzimas, que necessita, primeiramente, que a biomassa lignocelulósica seja pré-tratada para aumentar o acesso ao ataque enzimático, para que posteriormente as enzimas consigam quebrar a celulose e a hemicelulose (YANG et al., 2011). O tratamento enzimático é considerado o método mais promissor para uma hidrólise eficiente, pois esse processo acontece em condições brandas e gera altos rendimentos (HARRIS e DEBOLT, 2010; GAO et al., 2011; HU et al., 2011).

Com a finalidade de superar alguns dos problemas da hidrólise e fermentação separadas, foi desenvolvida a fermentação e sacarificação simultânea (SSF), onde açúcares liberados na hidrólise são diretamente consumidos pelo micro-organismo presente, aumentando a taxa de sacarificação e os rendimentos do produto de interesse. No entanto, além da resistência a inibidores já citada, a enzima a ser utilizada nesse processo também necessita ser tolerante a temperatura de fermentação (FERREIRA et al., 2010; WANG et al., 2013).

O xilano é um heteropolissacarídeo formado por cadeias homopoliméricas com unidades de D-xilopiranose unidas por ligações β-1,4 (SAHA e BOTHAST, 2009).

Devido à sua heterogeneidade e complexidade, o xilano necessita de uma grande variedade de enzimas que atuam cooperativamente para a sua completa hidrólise (GIRIO et al., 2010; SHARMA e ARORA, 2010). O sistema enzimático responsável pela degradação total das hemiceluloses é composto principalmente por xilanases (EC 3.2.1.8), e as principais envolvidas nesse processo são β -1,4-endoxilanase e a β -D-xilosidase (EC 3.2.1.37) (GIRIO et al., 2010; NAWEL et al., 2011).

As endoxilanases são as principais enzimas envolvidas na degradação do xilano. Elas são responsáveis por clivar as ligações glicosídicas da cadeia principal do xilano, resultando na diminuição do grau de polimerização do substrato a partir da liberação de xilo-oligossacarídeos (GIRIO et al., 2010; NAGAR et al., 2011). As β-xilosidases são glicosídeo hidrolases que catalisam a liberação de unidades de xilose a partir de xilo-oligossacarídeos e xilobiose da extremidade não redutora. Na maioria dos organismos, essa enzima não é capaz de hidrolisar o xilano sozinha e possui maior afinidade por xilobiose (WENGER et al., 2010).

O estudo biotecnológico de hemicelulases teve início na década de 80, em aplicações na indústria de alimentos. Posteriormente, essas enzimas começaram a ser utilizadas na indústria têxtil e de papel e celulose (WONG e SADDLER, 1992). Atualmente as xilanases e β-xilosidases apresentam inúmeras aplicações e potencial biotecnológico para diversas indústrias e setores, como na produção de biocombustíveis, em cervejarias, bebidas, ração animal (HOWARD et al., 2003). E é em função destas aplicações industriais que a demanda por enzimas mais estáveis e com propriedades cinéticas que garantam maior eficiência catalítica, vem crescendo continuamente nos últimos anos (GODFREY e WEST, 1996; SHAHZADI et al., 2014).

Uma forma de se obter hemicelulases para aplicações biotecnológicas, seria a partir da utilização de técnicas de biologia molecular, empregando micro-organismos como a *Caulobacter crescentus,* que é uma alfa-proteobactéria Gram negativa, capaz de viver em ambientes oligotróficos e apresenta um ciclo celular caracterizado por divisão celular assimétrica dando origem a duas células filhas morfológica e funcionalmente distintas, uma célula móvel e a célula talo. Esse micro-organismo, apesar de pouco explorado para a produção de enzimas de interesse biotecnológico, possui a capacidade de sintetizar um conjunto de enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal, tendo sete genes relacionados diretamente com a degradação do xilano, sendo que dois genes codificam endoxilanases e cinco codificam para β-xilosidases (NIERMAN et al., 2001; MARKS et al., 2010). Até o

momento apenas o gene *xynA1* (GRACIANO et al., 2015) que codifica uma das endoxilanases do grupo 10 das glico-hidrolases (GH10) e três genes para β -xilosidases, *xynB1* (GRACIANO et al., 2012), *xynB2* (CORRÊA et al., 2012; SANTOS et al., 2012; CORRÊA et al., 2014) e *xynB5* foram caracterizados (JUSTO et al., 2015) em *C. crescentus*.

As enzimas são notáveis descobertas no campo da biotecnologia e a manutenção de sua estabilidade estrutural durante qualquer reação bioquímica é um dos desafios dos pesquisadores, pois em alguns processos, sua reutilização é de fundamental importância. Uma estratégia para melhorar os rendimentos e diminuir os custos de produção do etanol, seria utilizar enzimas imobilizadas que são mais estáveis e podem operar em altas taxas de eficiência e produtividade (IVANOVA et al., 2011).

A caracterização bioquímica de enzimas envolvidas na degradação de polissacarídeos pode fornecer informações fundamentais para aprimorar o uso das mesmas e contribuir positivamente para possíveis aplicações da enzima em processos de fermentação e sacarificação simultânea, visando à produção de etanol celulósico ou, até mesmo, para compor coquetéis enzimáticos envolvidos com a degradação da biomassa em processos industriais diversos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

 Caracterizar bioquimicamente a β-xilosidase II purificada de Caulobacter crescentus, objetivando aplicações biotecnológicas como a produção de etanol celulósico.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o comportamento da enzima na presença de compostos que possam atuar como cofatores enzimáticos ou inibidores de processos fermentativos;
- Determinar a melhor concentração de KCI capaz de estimular a enzima, e comparar os parâmetros cinéticos na presença do KCI;
- Verificar a capacidade da β-xilosidase em hidrolisar hemicelulose de sabugo de milho pré-tratada em diferentes condições experimentais;
- Analisar o efeito da imobilização da β-xilosidase II na atividade da enzima.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomassa lignocelulósica

Mundialmente grandes quantidades de resíduos agrícolas são produzidos, sendo que a maioria é queimado e apenas uma pequena quantidade é utilizada para fabricação de produtos de alto valor. Através de tratamentos termoquímicos ou bioquímicos, três tipos de energia como os combustíveis líquidos, gasosos e a eletricidade, podem ser produzidos a partir da biomassa lignocelulósica (Figura 2) (MENON e RAO, 2012).

Materiais lignocelulósicos constituem a matéria-prima mais abundante e promissora como recurso natural e renovável essencial para o funcionamento das sociedades industriais modernas (PÉREZ et al., 2002; ANWAR et al., 2014). Essa biomassa inclui resíduos agrícolas como palhas, caules, hastes, bagaços, cascas e farelos, madeiras decíduas e coníferas, resíduos da indústria de polpa e papel, resíduos de plantas herbáceas, entre outros, que podem ser utilizados como substrato de baixo custo para verificar atividades de indução de diversas enzimas como amilases (EC 3.2.2.1), xilanases e proteases (EC 3.4.21.X) (DODD e CANN, 2009). Esses materiais vegetais são polímeros complexos de carboidratos compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, que estão unidos entre si por ligações covalentes (Figura 1) e podem ser convertidos em produtos de valor agregado, como os biocombustíveis (CASTRO e PEREIRA, 2010; BALAT, 2011; ASGHER et al., 2013, IQBAL et al., 2013,).

O processo de conversão da biomassa envolve cinco etapas principais: 1escolha dos resíduos adequados; 2-pré-tratamento eficaz; 3-produção de enzimas sacarolíticas, como celulases e hemicelulases, juntamente com as enzimas acessórias; 4-fermentação de hexoses e pentoses e 5-processamento. Para realizar um pré-tratamento adequado é necessário compreender a estrutura complexa da lignocelulose, que é constituída por um conjunto de macromoléculas orgânicas, composto principalmente por celuloses, hemicelulose e ligninas (KNAUF e MONIRUZZAMAN, 2004).



Figura 1 Modelo da parede celular elucidando o complexo lignocelulolítico (STICKLEN, 2008).



Figura 2 Processamento termoquímico e bioquímico da biomassa lignocelulósica em vários produtos tecnológicos de valor agregado (MENON e RAO, 2012).

3.1.1 Celulose

A celulose é o maior componente estrutural da parede celular das plantas, é uma molécula simples de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$, formada por anéis de β -D-glicopiranose, unidos por ligações glicosídicas do tipo β -D-1,4, que resultam em longas cadeias paralelas, insolúveis em água (OGEDA e PETRI, 2010; MENON e RAO, 2012). A junção de duas moléculas de glicose forma o dissacarídeo celobiose, que é a unidade repetitiva desse polímero natural (Figura 3).



Figura 3 Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular (FENGEL e WEGENER, 1989).

Cadeias de glicose são unidas por forças de Van der Waals e por ligações de hidrogênio na estrutura cristalina da celulose, chamada de fibrila elementar, que consiste em aproximadamente 40 cadeias de glicana. A junção dessas fibrilas elementares dá a formação das microfibrilas (COSGROVE, 2005).

Existem regiões dentro das microfibrilas que apresentam uma ordem elevada, as regiões cristalinas, assim como regiões menos organizadas denominadas regiões amorfas. Na região cristalina, a fibra tem maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação, já na região amorfa, a fibra apresenta maior grau de flexibilidade. As moléculas individuais de microfibrilas de celulose cristalina são tão bem empacotadas que não só enzimas, mas mesmo pequenas moléculas como a água, não conseguem entrar na estrutura complexa (ARANTES e SADDLER, 2010).

A celulose existe em sete estruturas polimorfas de cristal, designadas como celulose $I\alpha$, $I\beta$, II, III_I, III_I, IV_I e IV_{II}. As formas mais abundantes na natureza são a celulose $I\alpha$ e $I\beta$. I α é meta-estável, e, assim, mais reativo do que $I\beta$. A coexistência de dois polimorfos da celulose nativa pode implicar que a parte do polimorfo $I\alpha$, dentro da microfibrila, seja mais propenso ao ataque enzimático (YAMAMOTO e HORII, 1994).

3.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo renovável mais abundante na natureza. Encontra-se presente em todas as camadas da parede celular das plantas, mas concentra-se, principalmente, nas camadas primária e secundária, ligada à celulose e à lignina, conferindo rigidez e promovendo a integração da rede celulose-hemicelulose-lignina (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; CASTRO e PEREIRA, 2010).

Os constituintes mais predominantes da hemicelulose são os polímeros ou heteropolímeros formados de galactose, manose, xilose e arabinose, as xiloglicanas (compostas de moléculas de glicose unidas por ligações β -1,4 e ramificações de xilose em ligações α -1,6) e o xilano (heteropolissacarídeo composto por ligações β -1,4 de resíduos de D-xilanopiranosil com ramificações arabinosil e/ou acetil), sendo que o xilano é o principal polissacarídeo componente das hemiceluloses (GRAY, et al., 2003; GIRIO, et al., 2010).

A hemicelulose difere da celulose principalmente pela sua constituição, pois é formada por unidades de pentoses (xilano) ou unidades alternadas de manoses e glicoses ou de galactoses, além de possuir cadeias laterais de ácido acético, ácido hexurônico e deoxihexoses que são responsáveis por sua solubilidade em água e álcalis (OGEDA e PETRI, 2010).

Até o momento, a maioria dos estudos sobre hemicelulases, tem como foco a hidrólise do xilano, que é o principal constituinte da hemicelulose (SAHA e BOTHAST, 2009). O xilano é um heteropolissacarídeo formado por cadeias homopoliméricas com unidades de D-xilopiranose unidas por ligações β -1,4 e possui uma estrutura ramificada, onde o C2 pode ser regularmente substituído por uma unidade de ácido α -4-*O*-metilglucurônico ou por α -L-arabinofuranose nas posições C2 ou C3. Além da D-xilose, L-arabinose e ácido D-glucurônico ou éter 4-*O*-metil, o xilano pode conter os ácidos acético, ferúlico e *p*-cumárico substituindo o C5 nas cadeias de α -L-arabinofuranose. A frequência desses compostos e a composição do xilano dependem da fonte vegetal a que pertence o xilano (HEREDIA et al., 1995; SAHA e BOTHAST, 2009).

Diferente da celulose, hemiceluloses são totalmente amorfas e, portanto, menos resistentes ao ataque de agentes químicos. Sua presença junto à celulose resulta em propriedades importantes para as fibras, pois contribui para o intumescimento, a mobilidade interna e o aumento da flexibilidade (COSGROVE, 2005).

Na tabela 1 estão resumidas as principais características da hemicelulose e da celulose. É de fundamental importância compreender estas características para que estratégias de aproveitamento da biomassa lignocelulósica como matéria-prima sejam definidas para a produção de enzimas ou outras substâncias.

 Tabela 1
 Diferenças entre celulose e hemicelulose.

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

3.1.3 Lignina

A lignina é um dos biopolímeros mais abundantes na biosfera, sendo, depois da celulose, a substância orgânica polimérica mais abundante nas plantas. É uma macromolécula de alto peso molecular e de estrutura irregular, apresentando conformação amorfa e estruturas globulares, formada por redes tridimensionais compostas por unidades interligadas de fenilpropano. Presente principalmente na lamela média e na parede secundária, sendo mais hidrofóbica que a celulose e a hemicelulose, tem como função fornecer suporte estrutural à parede das plantas, conferindo às mesmas, maior rigidez e resistência aos ataques microbianos (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; BRODEUR et al., 2011; SARKAR et al., 2012).

A lignificação da parede celular não é um processo controlado individualmente para cada célula, sendo a lignina o último polímero a ser depositado na parede celular, surgindo inicialmente nos cantos das células após a deposição da celulose na parede secundária, que ocorre depois do término do processo de alongamento das células e quando começa o espessamento da parede secundária. Sua deposição prossegue pela lamela média, parede primária e continua na parede secundária até a formação da parede terciária (COSGROVE, 2005).

A interação entre celulose, hemicelulose e lignina é o que determina a ultraestrutura da parede celular dos materiais lignocelulósicos.

3.2 Processos para a produção de etanol

Para se obter etanol a partir de biomassa lignocelulósica, baseando-se na hidrólise enzimática, são necessárias, basicamente, quatro etapas: 1-produção de enzimas, 2-pré-tratamento, 3-hidrólise enzimática e 4-fermentação (JANG et al., 2012).

3.2.1 Produção de enzimas

A degradação dos materiais lignocelulósicos é feita a partir de enzimas produzidas, principalmente, por micro-organismos como fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Apesar da diminuição dos custos das enzimas nos últimos 20 anos, sua obtenção representa 50% do custo global do processo de geração de açúcares através da hidrólise enzimática, assim, influencia fortemente o valor final de produção do etanol (WYMAN, 2001; CHENG e TIMILSINA, 2011; LENNARTSSON et al., 2014).

Vários estudos estão sendo realizados com o objetivo de tentar melhorar esse aspecto, a fim de descobrir novas configurações para obtenção do etanol que consiga integrar as etapas da produção enzimática, sacarificação e fermentação (BAEYENS et al., 2015). Na tabela 2 são apresentados resultados de estudos sobre produção de etanol de segunda geração que vem sendo realizados nos últimos 5 anos.

3.2.2 Pré-tratamento

O pré-tratamento é o processo para preparar os materiais lignocelulósicos para as hidrólises enzimáticas da celulose e hemicelulose a fim de gerar açúcares fermentáveis e sua eficiência é reconhecida há muito tempo (McMILLAN, 1994). Os principais objetivos desse processo são: 1- a dissociação do complexo lignina-

celulose, 2- redução do grau de cristalinidade da celulose e 3- aumento da porosidade dos materiais, através do aumento da área superficial da biomassa. O pré-tratamento também deve satisfazer os seguintes requisitos: 1- preservar as pentoses maximizando os rendimentos de forma a melhorar a formação de açúcares ou a capacidade de formação posterior por hidrólise enzimática, 2- evitar a formação de compostos inibidores para os processos de fermentação e hidrólise subsequentes, e 3- ser viável economicamente (SUN e CHENG, 2002; CHENG e TIMILSINA, 2011). Tecnologias de pré-tratamento tem sido amplamente estudadas, incluindo processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos. Atualmente, as principais pesquisas estão voltadas para tecnologias de pré-tratamento que envolvem processos físico-químicos (BALAT, 2011). A figura 4 retrata a quebra da estrutura lignocelulósica após o pré-tratamento.

Objetivos	Principais resultados	Referência
Sistema de simbiose industrial ideal para melhorar a produção de bioetanol.	Redução dos custos de logística e aumento de produção.	GONELA e ZHANG, 2014
Aumento da sacarificação da palha de trigo pré-tratada biologicamente para produção de etanol.	Aumento da produção de açúcar a partir de 33 a 54% e redução da quantidade da mistura enzimática em 40%.	LÓPEZ- ABELAIRAS et al., 2013
Tecnologias de pré-tratamento para um processo de produção eficiente de bioetanol baseado na hidrólise enzimática.	A química e a termoquímica são as mais efetivas para aplicações industriais.	ALVIRA, et al., 2010
Estado e barreiras das tecnologias avançadas para produção de biocombustíveis.	Elevados custos dos pré- tratamentos, das enzimas utilizadas na hidrólise e portanto impacta no valor final na conversão de açúcares de pentose a etanol.	CHENG e TIMILSINA, 2011
Avaliação das combinações entre o pré-tratamento e a conversão das configurações para a produção de bioetanol.	A combinação do pré-tratamento ácido, hidrólise enzimática e co- fermentação apresenta o potencial mais econômico. Entretanto, a hidrólise enzimática da celulose é a abordagem energeticamente mais eficiente.	CONDE- MEJÍA, et al., 2013

Tabela 2 Produção de etanol celulósico.



Figura 4 Estrutura lignocelulósica antes e após o pré-tratamento (BALAT, 2011).

3.2.2.1 Tipos de pré-tratamento

A eficiência dos pré-tratamentos tem sido baseada no rendimento da hidrólise após esta etapa. Embora, ao longo dos últimos anos muitos métodos já tenham sido estudados, ainda é de extrema importância o desenvolvimento de alternativas tecnológicas eficientes em termos de custo e competitividade econômica. A tabela 3 resume algumas técnicas de pré-tratamento

3.2.2.2 Formação de inibidores

Substâncias que podem agir como inibidores dos micro-organismos incluem compostos fenólicos e outros aromáticos, ácidos alifáticos, aldeídos, furanos, íons inorgânicos, e bioálcool ou outros produtos da fermentação como etanol e butanol. A geração de produtos inibidores formados a partir do pré-tratamento, depende fortemente da matéria-prima utilizada e do método escolhido de pré-tratamento (JÖNSSON et al., 2013).

Quando a hemicelulose é degradada, arabinose, xilose, manose, galactose, glicose e ácido acético são liberados. A celulose é hidrolisada à glicose. Em altas temperaturas e pressão, arabinose e xilose são degradas à furfural, similarmente, o hidroximetilfurfural (HMF) é formado a partir da degradação das hexoses. O ácido fórmico é gerado quando o furfural e o HMF são quebrados. E o ácido levulínico é proveniente do HMF. Compostos fenólicos são gerados a partir da decomposição química parcial da lignina (Figura 5) (SEARS et al., 1971; ULBRICHT, et al., 1984; BARDET, et al., 1985).

Tabela 3 Métodos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos

Método	Operação	Princípio	Referências
Físico	Trituração mecânica	Diminuir o tamanho das partículas, para reduzir a cristalinidade da celulose.	MILLET et al., 1976
	Pirólise	Materiais são tratados a temperaturas superiores a 300ºC para decompor a celulose e formar produtos gasosos.	KILZER e BROIDO, 1965
Químico	Hidrólise ácida Hidrólise alcalina	Degrada a lignina e a hemicelulose. Aumenta a hidrólise da celulose através da deslignificação e diminuição do grau de polimerização e cristalinidade.	VIDAL e MOLINIER, 1988 SILVERS e ZACCHI, 1995
	Delignificação oxidativa	Saponificação das pontes intermoleculares das hemiceluloses e aumento da porosidade da partícula. Aumenta a suscetibilidade à hidrólise	TARKOW e FEIST, 1969 AZZAM, 1989
	Solventes orgânicos	enzimática, solubilizando 50% da lignina e hemicelulose. Promove a quebra das pontes internas de lignina e hemicelulose	THRING et al., 1990
Físico- Químico	Explos ăo a vapor (auto- nidrólise)	Degradação da hemicelulose e transformação da lignina devido à alta temperatura. Promove transformação da lignina e pouca degradação da hemicelulose.	GROUS et al., 1986 MES-
	Explos ăo de fibra de amônia (AFEX) Explos ăo com CO ₂	Aumenta taxa de hidrólise pela formação de ácido carbônico.	HARTREE et al., 1988 DALE e MOREIRA, 1982
Biológico	Bolor branco Pleurotus, Pycnoporus, Ischnoderma, Phlebia, etc)	Deslignificação e redução do grau de polimerização da celulose e hemicelulose.	НАТАККА, 1983



Furfural Ácido fórmico Hidroximetilfurfural Ácido levulínico

Figura 5 Formação de compostos inibitórios durante o processo de fermentação (Adaptado de PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

3.2.2.3 Efeito dos inibidores

Compostos orgânicos de baixo peso molecular possuem a capacidade de penetrar nas membranas das células dos organismos, enquanto que inibidores de alto peso molecular podem levar a uma perda considerável de açúcares fermentáveis (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

Acidos fracos inibem o crescimento microbiano e quando dissociados são lipossolúveis e podem difundir pela membrana plasmática. Dois mecanismos foram propostos para explicar o efeito inibitório dos ácidos fracos: desacoplamento intracelular e acúmulo intracelular de ânion. Segundo a teoria do desacoplamento, a queda no pH intracelular, resultante do fluxo de ácidos fracos, é neutralizada pela ação da Próton ATPase da membrana plasmática, que bombeia prótons para fora da célula em detrimento da hidrólise do ATP. Adicionalmente, mais ATP deve ser gerado a fim de manter o pH intracelular, e com isso a capacidade de bombeamento de prótons da célula acaba se esgotando, o que resulta na depleção do conteúdo de ATP, dissipação da força motriz de prótons e acidificação do citoplasma. De acordo com a teoria do acúmulo intracelular de ânion, a forma aniônica do ácido é capturada pela célula e o ácido não dissociado irá difundir para dentro da célula até que o equilíbrio seja atingido. Uma vez que a concentração de equilíbrio do ácido não dissociado está em função do pH, a extensão intracelular do acúmulo do ânion será uma função do gradiente de pH através da membrana plasmática. Esse acúmulo de ânion intracelular pode ocasionar uma acidose na célula, pela diminuição do pH, que pode levar à morte celular (RUSSEL, 1992; IMAI e OTONO, 1995).

Estudos sugerem mecanismos similares de inibição pelo furfural e HMF, de modo que esses compostos podem inibir o crescimento dos micro-organismos e levar à diminuição no rendimento e na produtividade de etanol, com a diferença que a redução do furfural tem sido associada ao cofator NADH, e a redução do HMF está ligada ao consumo de NADPH (PALMQVIST et al., 1999; WAHLBOM e HAHN-HÄGERDAL, 2002).

Os efeitos de compostos fenólicos e outros compostos aromáticos que podem inibir o crescimento microbiano e o rendimento do produto final são muito variáveis e podem estar relacionados com grupos funcionais específicos. Em muitos casos, o mecanismo de toxicidade ainda não foi elucidado. Um possível mecanismo é que os fenóis interferem na membrana celular influenciando sua função e mudando a proporção de proteínas e lipídios (ANDO et al., 1986; LARSSON et al., 2000).

Além dos compostos acima citados, íons inorgânicos que estão presentes em hidrolisados lignocelulósicos podem resultar em uma alta pressão osmótica, o que também pode levar a efeitos inibitórios (HELLE et al., 2003; WADSKOG e ADLER 2003).

3.2.2.4 Estratégias para conter problemas da inibição

Várias medidas podem ser realizadas a fim de evitar problemas causados pelos inibidores. As concentrações desses compostos, bem como de açúcares em hidrolisados, depende da matéria-prima utilizada e das condições de pré-tratamento e hidrólise escolhidos (LARSSON et al., 1999; GALBE e ZACCHI, 2007). Uma das possibilidades seria a seleção de matérias-primas menos recalcitrantes e o uso de condições brandas de pré-tratamento que possibilitem também um bom rendimento. Outra alternativa seria planejar o processo de fermentação a fim de evitar problemas com a inibição, como, por exemplo, utilizar sacarificação e fermentação simultânea ao invés de processos descontínuos (OLOFFSON et al., 2008). Tendo como alvo o micro-organismo empregado, uma opção inclui a seleção de espécies que apresentem resistência aos inibidores, ou ainda a adaptação desses organismos a um ambiente de

inibição após indução da variação por mutagênese, evolução metabólica, ou ainda contar com o uso da engenharia genética para obter micro-organismos resistentes (ALRIKSSON et al., 2010; HASUNUMA et al., 2011).

3.2.3 Hidrólise da biomassa lignocelulósica

Os polímeros de carboidratos dos materiais lignocelulósicos precisam ser convertidos a açúcares simples antes da fermentação, através de um processo chamado hidrólise. Existem basicamente duas técnicas principais para obtenção de açúcares fermentescíveis: hidrólise química (com ácido concentrado ou diluído) e hidrólise enzimática (com coquetéis enzimáticos) (TAHERZADEH e KARIMI, 2007a; OLOFSSON et al., 2008).

3.2.3.1 Hidrólise química

Envolve a exposição dos materiais lignocelulósicos a um agente químico por um período de tempo e uma temperatura específica, que leva a formação de monômeros de carboidratos a partir dos polímeros de celulose e hemicelulose. Nesse tipo de hidrólise, o pré-tratamento e a hidrólise propriamente dita, podem acontecer em um único passo. Existem dois tipos de processos de hidrólise ácida: com ácido concentrado e com ácido diluído (TAHERZADEH e KARIMI, 2007a).

3.2.3.1.1 Hidrólise com ácido concentrado

Neste processo ocorre uma rápida e completa conversão da celulose à glicose e da hemicelulose às pentoses com pouca degradação. A concentração do ácido utilizado deve ser na faixa de 10 a 30%. Esse processo é mais econômico do que o processo que utiliza ácido diluído, no entanto, a corrosão, os problemas ambientais e o alto custo do ácido consumido são barreiras importantes para o sucesso econômico desse tipo de hidrólise (DEMIRBAS, 2008; YU et al., 2008).

3.2.3.1.2 Hidrólise com ácido diluído

Esse tipo de hidrólise ocorre em duas fases para aproveitar as diferenças entre a hemicelulose e a celulose. A primeira etapa é realizada a uma temperatura baixa para maximizar o rendimento a partir da hemicelulose, e na segunda fase, uma temperatura mais elevada é utilizada para aperfeiçoar a hidrólise da celulose. Esse processo acontece sobre alta temperatura e pressão e com uma duração de tempo de segundos ou minutos. Devido às altas temperaturas utilizadas (aproximadamente 200 °C), uma quantidade considerável de açúcares e lignina solúvel é degradada, o que pode levar a uma inibição durante o processo de fermentação. A combinação de ácido com alta temperatura e pressão exige um reator especial, o que pode tornar o processo caro (CLARK e MACKEI, 1984; WYMAN, 1994; LARSSON et al., 1999).

3.2.3.2 Hidrólise enzimática

É uma hidrólise catalisada por enzimas, que necessita, primeiramente, que a biomassa lignocelulósica seja pré-tratada para aumentar o acesso ao ataque enzimático. Em um segundo passo, na hidrólise propriamente dita, a celulose é quebrada pela ação das enzimas celulases (YANG et al., 2011).

Dentre as características da biomassa, a quantidade de lignina, a presença de grupos acetil, o grau de cristalinidade e de polimerização da celulose, o volume da área superficial e o tamanho da partícula, são considerados importantes para a realização de uma hidrólise enzimática de sucesso (ZHAO et al., 2012).

O custo desse processo quando comparado ao da hidrólise ácida, é relativamente baixo, pois usualmente é conduzido em condições brandas de pH e temperatura e não apresenta problemas de corrosão, sendo uma alternativa ecologicamente correta. Contudo, para se conseguir uma alta conversão da celulose, altas concentrações da enzima são necessárias (PAN et al., 2006; KESHWANI e CHENG, 2009).

3.2.3.2.1 Hidrólise enzimática da celulose

A celulose é hidrolisada por um grupo de enzimas chamadas celulases que atuam em sinergia para a liberação de açúcares (CASTRO e PEREIRA, 2010). De

acordo com o local de atuação no substrato celulósico, podemos classificá-las em três grupos: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e β-glicosidases (EC 3.2.1.21) (CAI et al., 1999).

Endoglucanases são as enzimas responsáveis pelo início da hidrólise. Elas atuam de forma aleatória, clivando as ligações β-1,4-glicosídicas de dentro da cadeia de celulose, liberando glicose, celobiose e celodextrinas, deixando extremidades não redutoras para a ação subsequente das exoenzimas. São essas enzimas as responsáveis pela rápida solubilização do polímero celulósico devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (OGEDA e PETRI, 2010; BANO et al., 2013).

Exoglucanases ou também conhecidas como celobiohidrolases, clivam os segmentos nas extremidades redutoras e não redutoras das cadeias expostas pela endoglucanase, gerando a celobiose. Essas enzimas participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, que é um fenômeno que envolve a ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais (LYND et al., 2002).

β-glicosidases possuem a capacidade de hidrolisar a celobiose e os oligossacarídeos solúveis a unidades de glicose. A remoção da celobiose é um passo importante, pois ela auxilia na redução do efeito inibitório da celobiose sobre a endo e a exoglucanase (DUFF e MURRAY, 1996).

O efeito inibitório produzido pelos produtos finais, celobiose e glicose, que podem ser um passo limitante no uso de celulases, pode ser minimizado pelo emprego da fermentação e sacarificação simultânea (SSF), uma estratégia que permite que a hidrólise da celulose e a fermentação dos produtos de hidrólise ocorram ao mesmo tempo, possibilitando um melhor rendimento do produto final (REZAEI, et al., 2008).

3.2.3.2.2 Hidrólise enzimática da hemicelulose

Até o momento, a maioria dos estudos sobre hemicelulases, tem como foco a hidrólise do xilano, que é o principal constituinte da hemicelulose, expondo suas fibras e tornando-as mais acessíveis à celulose (SAHA e BOTHAST, 2009).

O grande interesse na hidrólise enzimática do xilano também é justificado pelas várias possibilidades de aplicações, como por exemplo, na dieta dos ruminantes,
no tratamento de resíduos, na produção de químicos e combustíveis e na fabricação de papel (SILVA, et al., 1999).

A estrutura do xilano varia de cadeias lineares de ligações β-1,4 de polixilose para heteropolissacarídeos altamente ramificados. O prefixo hetero indica a presença de outros açúcares que não a D-xilose. Algumas de suas principais características estruturais encontram-se resumidas na figura 6 (BAJPAÍ, 1997). Devido à sua heterogeneidade e complexidade, o xilano necessita de uma grande variedade de enzimas atuando cooperativamente para sua completa hidrólise. Como mencionado anteriormente, o sistema enzimático responsável pela degradação total das hemiceluloses é composto pela enzima endoxilanase responsável por atacar a cadeia principal de xilano, produzindo oligômeros; pela exoxilanase que age na extremidade redutora gerando xilose e xilobiose e finalmente, pela β-xilosidase que hidrolisa os xilooligoassacarídeos liberando a xilose. A α-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) remove resíduos de L-arabinose nas posições 2 e 3 das unidades de xilose. A α-glucuronidase (EC 3.2.1.139) hidrolisa as ligações α-1,2 entre ácido glucurônico e resíduos de xilose em glucuroxilana, e a acetilxilana esterase (EC 3.2.1.1.72) remove o grupo O-acetil das posições 2 e 3 dos resíduos de xilose da acetil xilano; ácido ferúlico (EC 3.1.1.73) e p-cumárico esterases (EC 3.1.1.X) clivam as ligações éster entre resíduos de arabinose e ácido ferúlico ou ácido p-cumárico, respectivamente (Figura 7) (GIRIO et al., 2010; SHARMA e ARORA, 2010).

Mesmo que o número de enzimas necessárias para a hidrólise do xilano seja muito maior que para a hidrólise da celulose, a acessibilidade ao substrato é mais fácil, pois o xilano não forma estruturas cristalinas recalcitrantes (KESHWANI e CHENG, 2009).

Embora um grande número de enzimas esteja envolvido na degradação do xilano, a β -1,4-endoxilanase e a β -D-xilosidase são consideradas enzimas chaves de todo o processo de degradação da hemicelulose (GIRIO et al., 2010; NAWEL et al., 2011).







Figura 7 Esquema mostrando a coordenação funcional das enzimas de degradação da hemicelulose (principalmente xilano) (DODD e CANN, 2009).

3.2.3.2.3 Aplicações biotecnológicas das celulases e hemicelulases

A utilização de celulases e hemicelulases, em processos industriais, teve início na década de 80, sendo aplicada, primeiramente, como aditivo para ração animal, para aumentar a digestão das rações pelos ruminantes e monogástricos (CHESSON, 1987). Posteriormente, essas enzimas começaram a ser empregadas como insumo na indústria de alimentos para melhorar as propriedades sensoriais dos produtos de panificação (CASTRO e PEREIRA, 2010).

Ainda no setor alimentício, as celulases também foram utilizadas no processamento de bebidas, para promover a clarificação de sucos de frutas e vinhos e manter uma reologia estável do produto final (VORAGEN, 1992). Subsequentemente, as enzimas celulolíticas foram utilizadas em larga escala nas indústrias têxtil, nos processos de bio-polimento (desfibrilação de tecidos como algodão, linho, lã e viscose) e bio-estonagem (amaciamento e desbotamento do brim e jeans); de polpa e papel para modificação das propriedades mecânicas da polpa; e em lavanderias, para aumentar o brilho, a remoção de sujeiras e a maciez dos tecidos (WONG e SADDLER, 1993; GODFREY, 1996; KIRK et al., 2002).

A biotecnologia moderna possibilita a produção industrial de diversas enzimas com atividades específicas para cada área de aplicação, permitindo o desenvolvimento de inúmeras aplicações, como a produção de etanol a partir da celulose (KIRK et al, 2002). É por esse motivo que existe uma tendência mundial para a hidrólise dos materiais lignocelulósicos, buscando açúcares fermentescíveis para obtenção do álcool de segunda geração, em larga escala, como uma alternativa aos combustíveis fósseis (ZHANG et al., 2005).

3.2.4 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica tem início com a glicólise, também conhecida como via de Embden-Meyerhof, onde ocorre a oxidação de uma molécula de glicose para produzir duas moléculas de ácido pirúvico e duas moléculas de ATP. Posteriormente, as duas moléculas de ácido pirúvico são convertidas em duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de CO₂. As duas moléculas de acetaldeído são então reduzidas por duas moléculas de NADH para formar duas moléculas de etanol, o produto final da fermentação (Figura 8) (TORTORA et al., 2012).



Figura 8 Visão geral da fermentação alcoólica (TORTORA et al., 2012).

3.2.4.1 Estratégias de fermentação

Com o intuito de aproveitar as frações polissacarídicas de celulose e hemicelulose das biomassas lignocelulósicas, visando à produção de etanol de segunda geração, existem duas estratégias principais: hidrólise e fermentação em separado (SHF) e sacarificação e fermentação simultânea (SSF).

3.2.4.1.1 Hidrólise e fermentação em separado (SHF)

Na SHF, a hidrólise enzimática é realizada separadamente da fermentação. Os resíduos lignocelulósicos são primeiramente pré-tratados para em seguida serem degradados a açúcares monoméricos pelas celulases e, posteriormente, serem fermentados a etanol. A principal vantagem desse método é que por ele envolver dois processos (hidrólise e fermentação), cada etapa pode ser desenvolvida em suas condições ótimas, pois as celulases se mostram mais eficientes em temperaturas entre 45 e 50°C, enquanto que os micro-organismos fermentadores tem uma temperatura ótima entre 30 a 37°C. Por outro lado, essa técnica possui a desvantagem que os açúcares liberados na hidrólise podem inibir o complexo celulolítico, principalmente, pelo acúmulo de celobiose e glicose, que acaba por conferir uma hidrólise incompleta com baixo rendimento (BALAT, 2011; ERDEi et al., 2012).

3.2.4.1.2 Sacarificação e fermentação simultânea (SSF)

A SSF é uma estratégia importante para a produção de bioetanol, onde a hidrólise enzimática da celulose e a fermentação são desenvolvidas simultaneamente no mesmo reator, com o intuito de obter etanol em altas taxas. Em comparação com a SHF, os produtos finais de inibição produzidos na hidrólise (celobiose e glicose), são progressivamente assimilados pelo micro-organismo fermentador, o que também faz com que baixas quantidades da enzima sejam necessárias. Outras vantagens desse método são: a minimização dos riscos de contaminação pela baixa concentração de açúcar livre, a técnica é menos complexa e apresenta um custo menor, pois menos reatores são necessários, e os rendimentos de hidrólise são maiores, visto que o equilíbrio das reações é deslocado no sentido de formação de mais produto, pelo consumo concomitante de glicose. No entanto, a SSF necessita de condições compatíveis entre a fermentação e a sacarificação, como pH e temperatura similares e concentração ótima de substrato. Para isso, o processo é operado em temperaturas entre 30 a 38°C, que faz com que a celulase esteja abaixo do seu nível operacional ótimo (CHEN E WANG, 2010; ZHANG et al., 2010; KOPPRAM et al., 2013). Em relação a este aspecto, estudos têm sido realizados no sentido de produzir celulases que atuem em valores de pH e temperatura próximos daqueles ótimos para o processo fermentativo (TAHERZADEH e KARIMI, 2007b).

3.2.4.2 Produção de bioetanol

A importância do etanol como combustível limpo aumentou com a escassez prevista das reservas de combustíveis fósseis e aumento da poluição do ar pelas emissões de gás carbônico na atmosfera, responsáveis por causar extensas mudanças climáticas (SUN e CHENG, 2002; SOCCOL, et al., 2010).

As características do etanol possibilitam uma combustão mais limpa que dos outros combustíveis, bem como melhor desempenho dos motores, contribuindo para redução das emissões poluidoras (GOLDEMBERG et al., 2008).

3.2.4.2.1 Etanol de primeira geração

O etanol de primeira geração é feito a partir de açúcares ou do amido das plantas. As usinas de etanol à base de açúcar, no Brasil, utilizam predominantemente a cana de açúcar. O etanol à base de amido é produzido geralmente a partir do milho, mas pode ser produzido também a partir de outros grãos. Esse tipo de etanol é extensamente produzido nos Estados Unidos, seguido de outros países produtores de etanol como China, Canadá, França, Alemanha e Suécia. No mercado mundial, 21 milhões m³ de etanol são produzidos de cana de açúcar e 60 milhões m³ são produzidos a partir do milho e de grãos (SOCCOL, et al., 2010).

3.2.4.2.2 Etanol de segunda geração

O etanol de segunda geração utiliza diferentes tipos de materiais lignocelulósicos como substrato. Atualmente, quantidades insignificantes de bioetanol de segunda geração são produzidas ao redor do mundo em escala industrial. No momento, uma empresa localizada na Noruega se declara ser o maior produtor desse tipo de combustível, com uma produção anual de 20.000 m³ (RODSRUD et al., 2012).

A baixa produção de etanol de segunda geração pode ser explicada pela técnica, que ainda é limitada, pelos desafios econômicos, pela recalcitrância da biomassa, que necessita de severos pré-tratamentos que podem resultar na formação de inibidores, ocasionando problemas durante a fermentação, além do desafio com a produção de enzimas eficientes, capazes de hidrolisar a celulose por um custo competitivo (CHENG e TIMILSINA, 2011; GEDDES et al., 2011; VIIKARI et al., 2012).

Tanto para a produção de etanol de primeira geração, a partir da cana de açúcar, quanto de segunda geração, a partir de biomassas de composição lignocelulósica, a via fermentativa é a mais importante para a obtenção do álcool etílico no Brasil (PEREIRA Jr. et al., 2008).

O micro-organismo mais utilizado na fermentação alcoólica é a levedura *Saccharomyces cerevisae*, em virtude da sua capacidade de assimilar com facilidade a glicose da cana ou a celulose de biomassas residuais (SÁNCHEZ e CORDONA, 2008). Existe também o etanol produzido a partir de bactérias, dentre elas a mais promissora é a *Zymomonas mobilis*, que possui alta eficiência energética, possibilitando um alto rendimento de etanol. Contudo, ela possui a desvantagem de na fermentação formar polissacarídeos, que elevam a viscosidade do meio de fermentação, e geram sorbitol, um produto proveniente da redução da frutose que diminui a eficiência da conversão de sacarose a etanol (LEE e HUANG, 2000).

3.3 Caulobacter crescentus

Caulobacter crescentus é uma alfaproteobactéria não patogênica, Gram negativa, encontrada principalmente em ambientes aquáticos e em muitos tipos de solos. Esse micro-organismo pode ser encontrado em ambientes com pH próximo à neutralidade e pobres de nutrientes, onde participa na reciclagem das fontes de carbono devido à decomposição desses elementos em baixas concentrações (JUSTO et al., 2015).

Essa alfa-proteobactéria representa um excelente modelo de estudo para a diferenciação celular, pois apresenta células filhas diferenciadas estruturalmente, morfologicamente e em nível de regulação, sendo uma de forma livre flagelada e outra imóvel pedunculada (McADAMS e SHAPIRO, 2009; RANDICH E BRUN, 2015).

O ciclo de vida de *C. crescentus* (Figura 9) tem início com a célula móvel que possui um único flagelo polar, fímbrias e tem capacidade quimiotática. Nessa fase do ciclo, o cromossomo encontra-se condensado, não sendo capaz de se replicar. Em resposta a sinais extracelulares, a célula móvel perde o flagelo e as fímbrias, o cromossomo descondensa-se e um talo começa a se formar. Esse talo consiste no prolongamento da membrana e da parede celular no mesmo polo da célula onde se encontrava o flagelo. A célula talo inicia a duplicação do DNA e aumenta de tamanho. Aproximadamente na porção de 2/3 do ciclo, um novo flagelo é montado no polo

oposto e esta célula, agora assimétrica, denominada célula pré-divisional, origina duas células, morfologicamente distintas com programas de expressão gênica característicos. A duração do ciclo celular é de aproximadamente 3 horas na temperatura de 30°C em meio definido (McADAMS e SHAPIRO, 2009).

O genoma de *C. crescentus* foi completamente sequenciado por MARKS et al., recentemente, em 2010, e é composto por 4.016.942 pares de bases dispostos em um único cromossomo circular abrangendo 3.767 genes. Essas informações estão depositadas no banco de genomas do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI), referindo-se à *C. crescentus* cepa NA1000.

A análise do genoma revelou ainda que *C. crescentus* apresenta pelo menos sete genes envolvidos diretamente na degradação do xilano (principal constituinte da hemicelulose da parede celular vegetal), onde quatro deles codificam para enzimas endoxilanases e cinco para β -xilosidases, além de outros genes que codificam para celulases e polissacarídeo deacetilases. Três genes que codificam para β -xilosidases (*xynB1*, *xynB2* e *xynB5*), um gene que codifica para endoxilanase (*xynA1*) já foram estudados previamente (CORRÊA et al., 2012; GRACIANO et al., 2012; CORRÊA et al., 2014; GRACIANO et al., 2015; JUSTO et al., 2015).

A caracterização de genes envolvidos com a utilização de carboidratos, que estão associados com a regulação de sua expressão, pode fornecer informações fundamentais sobre a interação e adaptação de bactérias com o seu ambiente. Apesar de seu papel fisiológico importante, pouco se sabe sobre a organização e a regulação de sistemas de enzimas responsáveis pela utilização de polissacarídeos da parede celular vegetal envolvendo *C. crescentus* (CORRÊA et al., 2014).

Deste modo, constata-se que *C. crescentus* é uma bactéria interessante para a exploração biotecnológica porque contém várias enzimas envolvidas no metabolismo da lignocelulose (MARKS et al., 2010).



Figura 9 Ciclo celular de *C. crescentus*. Ao longo do seu ciclo celular, *C. crescentus* exibe quatro modos de crescimento: alongamento lateral (célula talo e célula móvel), síntese do talo (célula talo), alongamento medial (célula talo) e a formação de septos (RANDICH e BRUN, 2015).

3.3.1 Beta-xilosidase II de Caulobacter crescentus

Como mencionado anteriormente, β -xilosidases são enzimas responsáveis por catalisar a remoção de resíduos de β -xilosil das extremidades não redutoras de xilooligossacarídeos e xilobiose. Essas enzimas são encontradas em diferentes famílias de glicosídeo hidrolases (GH), 1, 3, 30, 39, 43, 51, 52, 54, 116 e 120 de acordo com a classificação no sistema CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes Database – Lombard et al., 2014), um recurso com conhecimento especializado em enzimas que constroem e degradam o complexo de carboidratos e glicoconjugados (CANTAREL et al., 2009).

Até o momento, existem apenas três trabalhos sobre a β -xilosidase II de *C. crescentus*, que mostraram que a enzima é capaz de hidrolisar substratos como xilobiose, xilotriose e xilopentose, cujo pH ótimo é de 6,0 e sua temperatura ótima é de 55°C, embora seja mais estável em 50°C, o que demonstra uma modesta termotolerância, indicando ser suficientemente resistente para certas aplicações biotecnológicas. Além disso, essa enzima apresentou uma parcial inativação na presença de alguns sais, bem como exibiu um aumento em sua atividade quando incubada na presença de KCI. Os testes realizados com resíduos agroindustriais sugeriram que essa enzima pode ser utilizada na pré-degradação das fibras de hemicelulose, liberando açúcares de cinco carbonos que podem ser utilizados nos

processos de fermentação (CORRÊA et al., 2012; SANTOS et al., 2012; CORRÊA et al., 2014).

3.4 Imobilização de enzimas

As enzimas são notáveis descobertas no campo da biotecnologia e a manutenção de sua estabilidade estrutural durante qualquer reação bioquímica é um dos desafios dos pesquisadores, pois em alguns processos, sua reutilização é de fundamental importância, uma vez que reflete significativamente no custo do produto final.

A imobilização de enzimas é o confinamento da mesma em uma matriz ou suporte, que podem ser polímeros inertes ou materiais inorgânicos, de modo que sua atividade catalítica fique retida e a enzima possa ser usada repetidamente e continuamente. Além de ser acessível, uma matriz ideal deve abranger características como: inércia, força física, estabilidade, regenerabilidade, capacidade de aumentar a especificidade/atividade enzimática, reduzir a inibição do produto e a contaminação microbiana (DATTA et al., 2013).

Essa técnica tem provado ser bastante valiosa, porque viabiliza o uso de operações econômicas contínuas, possibilita automação, torna capaz a recuperação de produtos com maior grau de pureza, além de ajudar a prevenir a contaminação do substrato com enzima/proteína, ou outros compostos, e diminuir os custos de purificação (BARTHA-VÁRI et al., 2015).

Existem vários métodos para imobilizar enzimas, sendo que três são mais comuns: adsorção, aprisionamento e a ligação cruzada ou ligação covalente a um suporte, como é mostrado na figura 10 (SPAHN e MINTEER, 2008).

O método de adsorção nada mais é do que a enzima sendo fisicamente adsorvida sobre o material de suporte, geralmente uma matriz polimérica. É uma técnica relativamente simples, mas um pouco problemática, pois permite a lixiviação da enzima durante a reação, levando à contaminação do substrato (TAN et al., 2010).

A técnica de aprisionamento envolve o aprisionamento da enzima em uma estrutura na forma de rede de um material ou em membranas poliméricas. Isso geralmente minimiza a lixiviação da enzima e melhora sua estabilidade, mas frequentemente resulta em limitações de transporte de substrato para o local ativo da enzima. Contudo, esse processo permite adaptar o material de encapsulação de modo a proporcionar um microambiente ótimo para enzima, considerando suas condições de pH e polaridade (ADLERCREUTZ, 2013).

E por fim, as enzimas também podem ser imobilizadas por meio da ligação cruzada de proteínas a um suporte insolúvel, para evitar a perda da enzima na solução de substrato. A outra técnica comum para a ligação a um suporte insolúvel é a ligação covalente da enzima, no entanto, esse tipo de ligação pode diminuir o grau de movimento da enzima, reduzindo, assim, sua atividade (SHARMA e KANWAR, 2014).



Figura 10 Esquema das três técnicas mais comuns de imobilização: (A) adsorção física, (B) aprisionamento e (C) Ligação covalente/cruzada (SPAHN e MINTEER, 2008).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. ADLERCREUTZ, P. Immobilization and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, 42 (15), 6406-6436, 2013.
- 2. ADSUL, M.G., SINGHVI, M.S., GAIKAIWARI, S.A., GOKHALE, D.V. Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 102 (6), 4304–4312, 2011.
- ALRIKSSON, B.; SÁRVÁRI-HORVÁTH, I.; JÖNSSON, L.J. Overexpression of Saccharomyces cerevisiae transcription factor and multidrug resistance genes conveys enhanced resistance to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. Process Biochemistry, 45 (2), 264-271, 2010.
- 4. ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, 101 (13), 4851-4861, 2010.
- 5. ANDO, S.; ARAI, I.; KIYOTO, K.; HANAI, S. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Fermentation Technology, 64 (6), 567-570, 1986.
- 6. ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocelulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, 7 (2), 163-173, 2014.
- ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Acess to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. Biotechnology for Biofuels, 3 (4), 1-11, 2010.
- 8. ASGHER, M.; AHMAD, Z.; IQBAL, H.M.N. Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, 44, 488-495, 2013.
- 9. AZZAM, A.M. Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. Journal of Environmental Science and Health, 24 (4), 421-433, 1989.
- 10. BAEYENS, J.; KANG, Q.; APPELS, L.; DEWIL, R.; LV, Y.; TAN, T. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**, 47, 60-88, 2015.
- 11.BAJPAÍ, P. Microbial Xylanolytic Enzyme System: Properties and Applications. Advances in Applied Microbioly, 43, 141-148, 1997.

- 12. BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Manageent**, 52 (2), 858-875, 2011.
- BANO, S.; QADER, S.A.; AMAN, F.; SYED, M.N.; DURRANI, K. High production of cellulose degrading endo-1,4-glucanase using bagasse as a substrate from *Bacillus subtilis*. Carbohydrate Polymers, 91 (1), 300-304, 2013.
- BARDET, M.; ROBERT, D.R.; LUNDQVIST, K. On the reactions and degradation of the lignin during steam hydrolysis of aspen wood. Svensk Papperstidning, 6, 61-67, 1985.
- 15. BARTHA-VÁRI, J.H.; TOSA, M.I.; IRIMIE, F.D.; WEISER, D.; BOROS, Z.; VÉRTESSY, B.G.; PAIZS, C.; POPPE, L. Immobilization of phenylalanine ammonia-lyase on single-walled carbon nanotubes for stereoselective biotransformations in batch and in continuous-flow modes. ChemCatChem, 7 (7), 1122-1128, 2015.
- 16.BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, v.1, 506p, 2008.
- 17. BRODEUR, G.; YAU, E.; BADAL, K.; COLLIER, J.; RAMACHANDRAN, K.B.; RAMAKRISHNAN, S. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. **Enzyme Research**, 1, 1-17, 2011.
- 18.CAI, Y.J.; CHAPMAN, S.J.; BUSWELL, J.A.; CHANG, S. Production and Distribution of Endoglucanase, Cellobiohydrolase, and β-Glucosidase Components of the Cellulolytic System of *Volvariella volvacea*, the Edible Straw Mushroom. Applied Environmental Microbiology, 65 (2), 553-559, 1999.
- 19. CANTAREL, B.L.; COUTINHO, P.M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, 37, 233-238, 2009.
- 20. CASTRO, A.M.; PEREIRA, N.J. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, 33 (1), 181-188, 2010.
- 21. CHEN, M.L.; WANG, F.S. Optimization of a fed-batch simultaneous saccharification and co-fermentation process from lignocellulose to ethanol. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 49 (12), 5775-5585, 2010.
- 22. CHENG, J.J.; TIMILSINA, G.R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: a review. **Renew Energy**, 36 (12), 3541-3549, 2011.
- 23. CHESSON, A. Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and pultry diets. In: Haresing, W.; Cole, D.J.A. **Recent advances in animal nutrition.** London: Butterworths, p.71-89, 1987.

- 24. CLARK, T.A.; MACKEI, K.L Fermentation inhibitors in wood hydrolisates derived from the softwood *Pinus radiate.* **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 34 (2), 101-110, 1984.
- 25. CONDE-MEJÍA, C.; JIMÉNEZ-GUTIÉRREZ, A.; EL-HALWAGI, M.M. Assessment of combinations between pretreatment and conversion configurations for bioethanol production. **Sustainable Chemistry & Engineering**, 1 (8), 9656-965, 2013.
- 26.CORRÊA, J.M.; GRACIANO, L.; ABRAHÃO, J.; LOTH, E.A.; GANDRA, R.F; KADOWAKI, M.K; HENN, C.; SIMÃO, R.C.G. Expression and characterization of a GH39 β-xylosidase II from *Caulobacter crescentus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 168 (8), 2218-2229, 2012.
- 27.CORRÊA, J.M.; MINGORI, M.R.; GANDRA, R.F.; LOTH, E.A.; SEIXAS, F.A.V.; SIMÃO, R.C.G. Depletion of the *xynB2* upregulates β-xylosidase expression in *C. crescentus*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 172 (2), 1085-1097, 2014.
- 28. COSGROVE, D.J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology,** 6, 850-861, 2005.
- 29. DALE, B.E.; MOREIRA, M.J. A freeze-explosion technique for increasing cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, 12, 31-43, 1982.
- 30. DATTA, S.; CHRISTENA, L.R.; RAJARAM, Y.R.S. Enzyme immobilization: na overview on techniques and support materials. **Biotech**, 3 (1), 1-9, 2013.
- 31. DEMIRBAS, A. The importance of bioethanol and biodiesel from biomass. **Energy Sources B**, 3 (2), 177-185, 2008.
- 32. DODD, D.; CANN, I.O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global Change Biology Bioenergy**, 1 (1), 2-17, 2009.
- 33. DUFF, S.J.B.; MURRAY, W.D. Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: a review. **Bioresources Technology**, 55 (1), 1-33, 1996.
- 34. ERDEI, B.; FRANKÓ, B.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Separate hydrolysis and cofermentation for improved xylose utilization in integrated etanol production from wheat meal and wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, 5 (12), 1-12, 2012.
- 35. FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions.** Berlin: Walter de Gruyter & CO, v.23, 613p, 1989.
- 36. FERREIRA, V., FABER, M.O., MESQUITA, S.S., PEREIRA JR., N. Simultaneous saccharification and fermentation process of different cellulosic substrates using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring the β-glucosidase gene. **Eletronic Journal of Biotechnology**, 13 (2), 1-7, 2010.

- GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology, 108, 41-65, 2007.
- 38. GAO, D., UPPUGUNDLA, N., CHUNDAWAT, S.P., YU, X., HERMANSON, S., GOWDA, K., BRUMM, P., MEAD, D., BALAN, V., DALE, B.E. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. Biotechnology for Biofuels, 4 (5), 1-11, 2011.
- 39. GEDDES, C.C.; NIEVES, I.U.; INGRAM, L.O. Advances in ethanol production. **Current Opinion Biotechnology**, 22 (3), 312-319, 2011.
- 40. GIRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel etanol: A review. **Bioresource Technology**, 101 (13), 4775-4800, 2010.
- 41. GODFREY, T. TEXTILES. IN: GODFREY, T.; WEST, S. Industrial Enzymology, 2. ed. London: Macmillan Press, p.360-371, 1996.
- 42. GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, 36 (6), 2086-2097, 2008.
- 43. GONELA, V.; ZHANG, J. Design of the optimal industrial symbiosis system to improve bioethanol production. Journal of Cleaner Production, 64, 513-534, 2014.
- 44. GRACIANO, L.; CORRÊA, J.M.; GANDRA, R.F.; SEIXAS, F.A.V.; KADOWAKI, M.K.; SAMPAIO, S.C.; SILVA, J.L.C.; OSAKU, C.A.; SIMÃO, R.C.G. The cloning, expression, purification, characterization and modeled structure of *Caulobacter crescentus β*-xylosidase I. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28 (9), 2879-2888, 2012.
- 45. GRACIANO, L.; CORRÊA, J.M.; VIEIRA, F.G.N.; BOSETTO, A.; LOTH, E.A.; KADOWAKI, M.K.; GANDRA, R.F.; SIMÃO, R.C.G. Cloning and expression of the *xynA1* gene encoding a xylanase of the GH10 group in *Caulobacter crescentus*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 175 (8), 3915-3929, 2015.
- 46. GRAY, M.C.; CONVERSE, A.O.; WYMAN, C.E. Suggar monomer and oligomer solubility. Data and predictions for application to biomass hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 105, 179-193, 2003.
- 47. GROUS, W.R.; CONVERSE, A.O.; GRETHLEIN, H.E. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. **Enzyme Microbiology and Technology**, 8 (5), 274-280, 1986.
- 48. HARRIS, D; DEBOLT, S. Synthesis, regulation and utilization of lignocellulosic biomass. **Plant Biotechnology Journal**, 8 (3), 244–262, 2010.

- HASUNUMA, T.; SUNG, K.; SANDA, T.; YOSHIMURA, K.; MATSUDA, F.; KONDO, A. Efficient fermentation of xylose to ethanol at high formic acid concentrations by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology Biotechnology, 90 (3), 997-1004, 2011.
- 50. HATAKKA, A.I. Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymatic saccharification of cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 18 (6), 350-357, 1983.
- 51. HELLE, S.; CAMERON, D.; LAM, J.; WHITE, B.; DUFF, S. Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineered strain of *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbiology Technology**, 33 (6), 786-792, 2003.
- 52. HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomas. **Bioresource Technology**, 100 (1), 10-18, 2009.
- 53. HEREDIA, A.; JIMÉNEZ, A.; GUILLÉN, R. Composition of plant cell walls. Lebensm Unters Forsch, 200 (1), 24-31, 1995.
- 54. HOWARD, R. L., ABOTSI, E., JANSEN-VAN-RENBURG, E. L., HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, *2*, 602–619, 2003.
- 55.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**, 4 (36), 2-13, 2011.
- 56. IMAI, T.; OHONO, T. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, 61 (10), 3604-3608, 1995.
- 57. IQBAL, H.M.N.; KYAZZE, G.; KESHAVARZ, T. Advances in valorization of lignocelullosic materials by bio-technology: an overview. **BioResources**, 8 (2), 3157-3176, 2013.
- 58. IVANOVA, V., PETROVA, P., HRISTOV, J. Application in the etanol fermentation of immobilized yeast cells in matrix of alginate/magnetic nanoparticles, on chitosanmagnetite microparticles and celulose-coated magnetic nanoparticles. International Review of Chemical Engineering, 3 (2) 289-299, 2011.
- 59. JANG, J.S.; CHO, Y.K.; JEONG, G.T.; KIM, S.K. Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. **Bioprocess Biosystems Engineering**, 35 (1-2), 11-18, 2012.

- 60. JÖNSSON, L.J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. Biotechnology for Biofuels, 6 (16), 1-10, 2013.
- 61.JUSTO, P.I.; CORRÊA, J.M.; MALLER, A.; KADOWAKI, M.K.; SILVA, J.L.C.; GANDRA, R.F.; SIMÃO, R.C.G. Analysis of the *xynB5* gene encoding a multifunctional GH3-BgIX β-glucosidase-β-xylosidase-α-arabinosidase member in *Caulobacter crescentus*. Antonie van Leeuwenhoek, 108 (4), 993-1007, 2015.
- 62. KESHWANI, D.R.; CHENG, J.J. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: a review. **Bioresource Technology**, 100 (4), 1515-1523, 2009.
- 63. KILZER, F.J.; BROIDO, A. Speculations on the nature of celulose pyrolysis. **Pyrodynamics**, 2, 151-163, 1965.
- 64. KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, 13 (4), 345-351, 2002.
- 65. KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. International Sugar Journal, 106 (1263), 147-150, 2004.
- 66. KOPPRAM, R.; NIELSEN, F.; ALBERS, E.; LAMBERT, A.; WÄNNSTRÖM, S.; WELIN, L.; ZACCHI, G.; OLSSON, L. Simultaneous saccharification and cofermentation for bioethanol production using corncobs at lab, PDU and demo scales. **Biotechnology for Biofuels**, 6 (2), 1-10, 2013.
- 67. LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G.; NILVEBRANT, N.O. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme Microbiology and Technology**, 24 (3-4), 151-159, 1999.
- 68. LARSSON, S.; QUINTANA-SÁINZ, A.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N.O.; JÖNSSON, L.J. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygenlimited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 84, 617-632, 2000.
- 69. LEE, W.G.; HUANG, C.T. Modeling of ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* ATTC 10988 grown on the media containing glucose and fructose. **Biochemical Engineering Journal**, 4 (3), 217-227, 2000.
- 70. LENNARTSSON, P.R.; ERLANDSSON, P.; TAHERZADEH, M.J. Integration of the first and second generation bioethanol process and the importance of by-products. **Bioresource Technology**, 165, 3-8, 2014.
- 71.LOMBARD, V.; RAMULU, H.G.; DRULA, E.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, 42, 490-495, 2014.

- 72. LÓPEZ-ABELAIRAS, M.; LU-CHAU, T.A.; LEMA, J.M. Enhanced sccharification of biologically pretreated wheat straw for ethanol production. Applied Biochemistry and Biotechnology, 169 (4), 1147-1159, 2013.
- 73. LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66 (3), 506-577, 2002.
- 74. MARKS, M.E.; CASTRO-ROJAS, C.M.; TEILING, C.D.U.L.; KAPATRAL, V.; WALUNAS, T.L.; CROSSON, S. The genetics basis of laboratory adaptation in *Caulobacter crescentus*. **The Journal of Bacteriology**, 192 (14), 3678-3688, 2010.
- 75. McADAMS, H.H.; SHAPIRO, L. System-level design of bacterial cell cycle control. Federation of European Biochemical Societies (FEBS LETT), 583 (24), 3984-3991, 2009.
- 76. McMILLAN, J.D. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, 566, 292-324, 1994.
- 77. MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. Progress in Energy and Combustion Science, 38 (4), 522-550, 2012.
- 78. MES-HARTREE, M.; DALE, B.E.; CRAIG, W.K. Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. Applied Microbiology and Biotechnology, 29 (5), 462-468, 1988.
- 79. MILLET, M.A.; BAKER, A.J.; SCATTER, L.D. Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, 6, 125-153, 1976.
- 80.NAGAR, S.; MITTAL, A.; KUMAR, D.; KUMAR, L.; KUHAD, R.C.; GUPTA, V.K. Hyper production of alkali stable xylanase in lesser duration by *Bacillus pumilus* SV-85S using wheat bran under solid state fermentation. **New Biotechnology**, 28 (6), 581-587, 2011.
- 81. NAWEL, B.; SAID, B.; ESTELLE, C.; HAKIM, H.; DUCHIRON, F. Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. **Process Biochemistry**, 46 (2), 519-525, 2011.
- 82. NIERMAN, W.C.; FELDBLYUM, T.V.; LAUB, M.T.; PAULSEN, I.T.; NELSON, K.E.; EISEN, J.; HEIDELBERG, J.F.; ALLEY, M.R.K.; OHTA, N.; MADDOCK, J.R.; POTOCKA, I.; NELSON, W.C.; NEWTON, A.; STEPHENS, C.; PHADKE, N.D.; ELY, B.; DEBOY, R.T.; DODSON, R.J.; DURKIN, A.S.; GWINN, M.L.; HAFT, D.H.; KOLONAY, J.F.; SMIT, J.; CRAVEN, M.B.; KHOURI, H.; SHETTY, J.; BERRY, K.; UTTERBACK, T.; TRAN, K.; WOLF, A.; VAMATHEVAN, J.; ERMOLAEVA, M.; WHITE, O.; SALZBERG, S.L.; CRAIG-VENTER, J.; SHAPIRO, L.; FRASER, C.M. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98 (7), 4136-4141, 2001.

- 83.NIGAM, P.S., SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, 37 (1), 52–68, 2011.
- 84. OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, 33 (7), 1549-1558, 2010.
- 85. OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. Biotechnology for Biofuels, 1 (7), 1-14, 2008.
- 86. PALMQVIST, E.; ALMEIDA, J.; HAHN-HÄGERDAL, B. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biotechnology and Bioengineering**, 62 (4), 447-454, 1999.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibitors and detoxification. Bioresource Technology, 74 (1), 17-24, 2000a.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource Technology, 74 (1), 25-33, 2000b.
- 89. PAN, X.; GILKES, N.; SADDLER, J.N. Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. **Holzforschung**, 60 (4), 398-401, 2006.
- 90. PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In Series on Biotechnology, Rio de Janeiro: Amiga Digital UFRJ, v.2, 45p, 2008.
- 91. PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTINEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, 5 (2), 53-63, 2002.
- 92. RANDICH, A.M.; BRUN, Y.V. Molecular mechanisms for the evolution of bacterial morphologies and growth modes. **Frotiers in Microbiology**, 6 (580), 1-13, 2015.
- 93. REZAEI, F.; RICHARD. T.L.; LOGAN, B.E. Enzymatic hydrolysis of cellulose coupled with electricity generation in a microbial fuel cell. Biotechnology Bioengineering, 101 (6), 1163-1169, 2008.
- 94. RODSRUD, G.; LERSCH, M.; SJÖDE, A. History and future of world's most advanced biorefinery in operation. **Biomass Bioenergy** 46, 46-59, 2012.
- 95. RUSSELL, J.B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, 73 (5), 363-370, 1992.

- 96. SANTOS C.R., POLO C.C., CORRÊA J.M., SIMÃO, R.C.G., SEIXAS, F.A.V., MURAKAMI, M.T. Accessory domain changes acces- sibility and molecular topography of the catalytic interface in monomeric GH39 β-xylosidases. Acta Crystallography section D, (68),1339–1345, 2012.
- 97. SAHA, B.C.; BOTHAST, R.J. Enzymology of Xylan Degradation. In **Biopolymers**, Washington DC: ACS Symposium Series, v.723, 194p, 2009.
- 98. SHAHZADI, T., MEHMOOD, S., IRSHAD, M., ANWAR, Z., AFROZ, A., ZEESHAN, N., RASHID, U., SUGHRA, K. Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. Advances in Bioscience and Biotechnology, *5*, 246–251, 2014.
- 99. SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, 99 (13), 5270-5295, 2008.
- 100. SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, 37 (1), 19-27, 2012.
- SEARS, K.D.; BEELIK, A.; CASEBIER, R.L.; ENGEN, R.J.; HAMILTON, J.K.; HERGERT, H.L. Southern pine prehydrolyzates: characterization of polysaccharides and lignin fragments. Journal of Polymer Science, 36 (1), 425-443, 1971.
- SHARMA, R.K.; ARORA, D. S. Production of Lignocellulolytic Enzymes and Enhancement of In Vitro Digestibility During Solid State Fermentation of Wheat Straw by *Phlebia floridensis*. **Bioresource Technology**, 101 (23), 9248-9253, 2010.
- 103. SHARMA, S.; KANWAR, S.S. Organic solvent tolerant lipases and applications. **The Scientific World Journal**, 1, 1-15, 2014.
- SINDHU, R., KUTTIRAJA, M., BINOD, P., JANU, K.U., SUKUMARAN, R.K., PANDEY, A. Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol production. Bioresource Technology, 102 (23), 10915–10921, 2011.
- 105. SILVA, C.H.C.; PULS, J.; DE SOUSA, M.V.; FILHO, E.X.F. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus fresenius*. **Revista de Microbiologia**, 30 (2), 114–119, 1999.
- SILVERS, M.V.; ZACCHI, G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. Bioresource Technology, 51 (1), 43-52, 1995.

- 107. SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MEDEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRAR, M.A.; BON, E.P.S.; MORAES, L.M.P.; ARAÚJO, J.A.; TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelulloses: Status and perspectives in Brazil. Bioresource Technology, 101 (13), 4820-4825, 2010.
- 108. SPAHN, C.; MINTEER, S. Enzyme immobilization in biotechnology. **Recent Patentes on Engineering**, 2, 195-200, 2008.
- 109. STICKLEN, M.B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic etanol. **Nature Reviews Genetics**, 9 (6), 433-443, 2008.
- 110. SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, 83 (1), 1-11, 2002.
- 111. TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, 2 (3), 472-99, 2007a.
- 112. TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources**, 2 (4), 707-738, 2007b.
- 113. TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, LI.; WANG, F. Biodiesel production with immobilizes lipase: A review. **Biotechnology Advances**, 28 (5), 628-634, 2010.
- TARKOW, H.; FEIST, W.C. A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid ammonia. Cellulases and Their Applications, 95, 197-218, 1969.
- 115. THRING, R.W.; CHORENT, E.; OVEREND, R. Recovery of a solvolytic lignin: effects of spent liquor/acid volume ration, acid concentration and temperature. **Biomass**, 23 (4), 289-305, 1990.
- 116. TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 934p, 2012.
- 117. ULBRICHT, R.J.; SHARON, J.; THOMAS, J. A review of 5hydroxymethylfurfural HMF in parental solutions. **Fundamental and Applied Toxicology**, 4 (5), 843-853, 1984.
- 118. VIDAL, P.F.; MOLINIER, J. Ozonolysis of ligninin improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. **Biomass**, 16 (1), 1-17, 1988.
- 119. VIIKARI, L.; VEHMAANPERÄ, J.; KOIVULA, A. Lignocellulosic ethanol: from science to industry. **Biomass Bioenergy**, 46, 13-24, 2012.
- 120. VORAGEN, A.G.J. Tailor-made enzymes in fruit juice processing. Fruit processing, 7, 98-102, 1992.

- 121. WADSKOG, I.; ADLER, L. Ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* under NaCl stress. **Yeast stress response**,1, 201-239, 2003.
- 122. WAHLBOM, C.F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Furfural, 5-hydroxymethyl furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, 78 (2), 172-178, 2002.
- 123. WAKIYAMA, M.; YOSHIHARA, K.; HAYASHI, S.; OTHA, K. Purification and properties of an extracellular β-xylosidase from *Aspergillus japonicas* and sequence analysis of the encoding gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 106 (4), 398-404, 2008.
- 124. WANG, L., LUO, Z., SHAHBAZI, A. Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) bagasse using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, 42, 280-291, 2013.
- 125. WENGER, J.W.; SCHWARTZ, K.; SHERLOCK, G. Bulk segregant analysis by high-throughput sequencing reveals a novel xylose utilization gene from *Saccharomyces cerevisae*. *PLoS Genetics*, 6 (5), 1-17, 2010.
- 126. WONG, K.K.Y; SADDLER, J.N. Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries. In: Coughlan, M.P., Hazlewood, G.P. Hemicelluloses and Hemicelulases. 1. ed. London: Portland Press, p.122-143, 1993.
- 127. WYMAN, C.E. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics and opportunities. **Bioresource Technology**, 50 (1), 3-16, 1994.
- 128. WYMAN, C.E. Twenty years of trials, tribulations and research progress in bioethanol technology Selected key events along the way. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 91-93, 5-21, 2001.
- 129. YAMAMOTO, H.; HORII, F. In situ crystallization of bacterial cellulose I. Influences of polymeric additives, stirring and temperature on the formation of celluloses Iα and Iβ as revealed by cross polarization/magic angle spinning (CP/MAS) 13 NMR spectrometry. **Cellulose**, 1, 57-66, 1994.
- 130. YANG, B.; DAL, Z.; DING, S.Y.; WYMAN, C.E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, 2 (4), 421-450, 2011.
- YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hotcompressed water and its comparisons with other hydrolysis methods. Energy Fuels, 22 (1), 46-60, 2008.
- 132. ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Cellulose utilization by *Clostridium thermocellum*: bioenergetics and hydrolysis product assimilation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 102 (20), 7321-7325, 2005.

- 133. ZHANG, M.J.; WANG, F.; SU, R.X.; QI, W.; HE, Z.M. Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment. **Bioresource Technology**, 101 (13), 4959-4964, 2010.
- 134. ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, 6 (4), 465-482, 2012.

1 5 ARTIGO ORIGINAL

2	
3	
4	Artigo submetido de acordo com as normas da revista: Applied Microbiology and Biotechnology
5	(ISSN da versão impressa: 0175-7598; ISSN da versão eletrônica: 1432-0614)
6	
7	
8	Título do artigo: A β -Xylosidase II de C. crescentus apresenta tolerância a inibidores de processos
9	fermentativos que envolvem a biomassa lignocelulósica.
10	
11	
12	Manuscript title: C. crescentus β-Xylosidase II displays tolerance to inhibitors of fermentative process
13	involving lignocellulosic biomass.
14	
15	
16	
17	
18	Amanda Alves ¹ , Alexandre Maller ¹ e Rita de Cássia Garcia Simão ^{1*}
19	
20	
21	
22	
23	
24	¹ Laboratório de Bioquímica Molecular, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual
25	do Oeste do Paraná, PR, Brasil
26	
27	
28	
29	* Autor componenter
5U 21	 Autor correspondente. Universidada Estadual da Oasta da Daraná – Cantra da Ciâncias Mádicas a Formacâuticas. Pue
31	Universidade Estaduar do Oeste do Parana – Centro de Ciencias Medicas e Parinaceuticas Rua
32	Universitaria, 2069 - Cascavel, PR, 85814-110, Brasil.
33	e-mail: rita.simao@unioeste.or
34	Fone/Fax: (+55) 45 5220 5292
35 26	
30 27	
20 20	
20	
40	

1 Resumo

Nos últimos anos a demanda por enzimas mais estáveis e com propriedades cinéticas que garantam maior eficiência catalítica, vem crescendo continuamente. Neste trabalho, verificou-se que a β-xilosidase II (CcXynB2) de Caulobacter crescentus aumentou 62% da sua atividade em 5 mM de KCl provavelmente em consequência dos íons K⁺. CcXynB2 foi avaliada frente a diferentes compostos descritos como inibidores do processo de hidrólise e fermentação da biomassa lignocelulósica e mostrou-se 61% mais tolerante ao etanol (200 mM) a 37°C por 48 h. As atividades específicas da CcXynB2 foram avaliadas na presença de fenol, hidroximetilfurfural, ácido ferúlico, ácido acético, ácido cumárico, arabinose, glicose, xilose e pectina, e verificou-se que foram iguais (100%) ou muito superiores aos valores obtidos na ausência total destes compostos após 48 h. Quando os inibidores foram usados em associação, CcXynB2 reteve 67% da sua atividade inicial após 48 h de ensaio a 37°C. A hidrólise enzimática da hemicelulose de sabugo de milho foi conduzida com CcXynB2 isoladamente ou em sinergismo com xilanase e β -glicosidase comerciais, as quais foram eficientes em sacarificar a hemicelulose entre 37-50°C. A imobilização da CcXynB2 em resina de fase móvel levou a um efeito protetor da atividade específica, que ocorreu de forma paralela à diminuição de temperatura (60 a -20 °C). Os dados apresentados aqui indicam que a CcXynB2 é promissora com potencial para atuar em processos de sacarificação e fermentação simultânea para produção de etanol celulósico. Segundo nosso conhecimento, é a primeira vez que resultados similares são relatados na literatura para β -xilosidases bacterianas. Palavras-chave: Fermentação e Sacarificação Simultânea (SSF); Etanol celulósico; Hidrólise Enzimática; Imobilização.

- 1 Abstract

In recent years the demand for enzymes more stable with kinetic properties which guarantee greater catalytic efficiency, has been growing continuously. In this report, was found that β -xylosidase II (CcXynB2) of Caulobacter crescentus increased by 62% of its activity in 5 mM KCl probably as a consequence of K⁺ ions. CCxynB2 was measured against various compounds described as inhibitors of hydrolysis and fermentation of lignocellulosic biomass and showed 61% more tolerant with ethanol (200 mM) at 37 °C for 48 h. The specific activities of CcXynB2 were evaluated in the presence of phenol, hydroxymethylfurfural, ferulic acid, acetic acid, coumaric acid, arabinose, glucose, xylose and pectin, and it was found that were equal (100%) or much higher than the values obtained in the total absence of these compounds after 48 h. When the inhibitors were used in combination, CcXynB2 retained 67% of its initial activity after testing at 37 °C during 48 h. The enzymatic hydrolysis of hemicellulose from corncob was conducted with CcXynB2 alone or in synergism with xylanase and commercial β -glycosidase, which were efficient in performed the saccharification of hemicellulose from 37-50 °C. The immobilized CcXynB2 in mobile phase resin led to a protective effect of specific activity, which was parallel to decreased temperatures (60 to -20 °C). The data presented here indicate that CcXynB2 is promising with potential to act in simultaneous saccharification and fermentation processes for cellulosic ethanol production. To our knowledge, is the first time that similar results are reported in the literature to bacterial β-xylosidases. Keywords: Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF); cellulosic ethanol; Hydrolysis; Immobilization.

1 Introdução

2 O tratamento enzimático é considerado um método vantajoso para a hidrólise da hemicelulose visando 3 a produção de etanol celulósico por inúmeros motivos, é um processo que se otimizado ocorre com eficiência, 4 é conduzido em condições brandas de temperatura e pH e é menos poluente para o ambiente do que processos 5 químicos convencionais, podendo gerar elevados níveis de açúcares fermentáveis (Gao et al. 2011, Hu et al. 6 2011). Contudo, é necessário utilizar enzimas que sejam estáveis e/ou tolerantes a compostos inibitórios que 7 são produzidos e gradualmente liberados durante a reação de hidrólise enzimática para liberação de açúcares 8 fermentescíveis, permitindo, assim, que os micro-organismos envolvidos com o processo de produção de 9 biocombustíveis possam crescer e atuar com eficiência em escala industrial. Na fermentação e sacarificação 10 simultânea (SSF), os açúcares liberados na hidrólise enzimática são diretamente convertidos por microorganismos especializados a seus produtos. Este processo tende a ser conduzido em um único reator, levando 11 a uma maior redução dos custos de investimentos pelas indústrias do setor (Olofsson et al. 2008). As enzimas 12 13 utilizadas necessitam apenas apresentar propriedades compatíveis com a temperatura de fermentação. Em geral, os micro-organismos mais eficientes para a produção do etanol celulósico são mesofílicos e, dessa 14 forma, fermentam carboidratos em temperaturas entre 28-37°C (Ferreira et al. 2010; Wang et al. 2013). 15

Quando a hemicelulose é degradada, são liberados compostos como glicose, arabinose, xilose, manose, 16 17 galactose e também ácido acético. A celulose é hidrolisada à glicose, e em altas temperaturas e pressão, a 18 arabinose e a xilose são convertidas à furfural. O hidroximetilfurfural (HMF) é formado a partir da degradação das hexoses, e o ácido fórmico também pode ser originado quando o furfural e o HMF são 19 20 degradados, além do ácido levulínico proveniente do HMF. Compostos fenólicos adicionais podem ser 21 liberados em consequência da decomposição química parcial da lignina (Palmqvist e Hahn-Hägerdal 2000; Parawira e Tekere 2011; Bensah e Mensah, 2013). Uma vez que os inibidores dos resíduos lignocelulósicos 22 23 hidrolisados são identificados, o processo de fermentação pode ser melhorado de várias formas com a 24 minimização do efeito tóxico destes compostos através da otimização das condições de pré-tratamento e 25 hidrólise (Fu e Mazza 2011; Kim e Han 2012; Ashfaque et al. 2014).

26 O sistema enzimático responsável pela degradação total das hemiceluloses é composto principalmente por xilanases (EC 3.2.1.8), β -xilosidases (EC 3.2.1.37) e outras enzimas acessórias que atuam nas 27 28 ramificações da molécula do xilano. As β-1,4-endoxilanases clivam as ligações glicosídicas da cadeia 29 principal do xilano liberando xilo-oligossacarídeos e xilobiose, que são convertidos a unidades de xilose por 30 ação das β -D-xilosidases (Bosetto et al. 2015). Caulobacter crescentus é uma bactéria Gram negativa, não patogênica, encontrada principalmente em ambientes aquáticos e em muitos tipos de solos. O genoma da cepa 31 32 NA1000 foi completamente sequenciado (Marks et al. 2010) e revelou que a bactéria apresenta pelo menos 7 genes envolvidos diretamente com a degradação do xilano, de forma que dois destes genes codificam para 33 34 xilanases e cinco para β -xilosidases. No presente estudo, objetivou-se caracterizar a β -xilosidase II 35 recombinante (CcXynB2) de C. crescentus pura, na presença de compostos que possam atuar como cofatores 36 enzimáticos ou inibidores de processos fermentativos visando a aplicação da enzima em processos 37 biotecnológicos futuros. Em adição, foi verificada a habilidade da enzima em hidrolisar hemicelulose obtida a 38 partir do sabugo de milho, em associação ou não com outras enzimas comerciais, e avaliar o efeito da 39 imobilização da CcXynB2 quanto a seu desempenho catalítico, comparando-se os dados obtidos com a 40 enzima não imobilizada em diferentes condições.

1 Material e Métodos

2

3 Bactérias e condições de cultivo e crescimento

Neste estudo foi usada a cepa de *Escherichia coli* (DH10B) contendo o plasmídeo pProEX-HTa com
o gene *xynB2* da cepa NA1000 de *C. crescentus* fusionado a uma cauda de histidinas N-terminal. A
construção estava armazenada a -80°C em 50% glicerol. Para manutenção e crescimento da cepa de *E. coli* foi
usado o meio Luria-Bertani (LB) líquido ou semissólido, acrescido de ampicilina (1 mg mL⁻¹), com incubação
a 37°C.

9

10 Purificação da CcXynB2

11 A CcXynB2 foi purificada de acordo com o método descrito em Corrêa et al. (2012), modificado, como exposto a seguir: células de E. coli (DH10B) contendo a construção pProEX-xynB2 foram incubadas a 12 37°C em meio LB contendo ampilicina (1 mg mL⁻¹) em incubador rotativo a 120 rpm. As células cresceram 13 14 até a fase log (D.O.,λ600=0,4-0,6) e foram induzidas por 4 horas com 1 mM de isopropil-β-D-1-15 thiogalactopiranosideo (IPTG) para expressão do gene de beta-xilosidase II de C. crescentus. Uma alíquota de 20 mL das células recombinantes induzidas foi centrifugada por 20 minutos a 4 °C e 5.000 x g e o precipitado 16 foi tratado com 1 mL da solução FastBreakTM Cell Lysis Reagent 1X (Promega®) contendo 10 µL de 17 lisozima 40 mg mL⁻¹ (Sigma), 1 µL da enzima DNAseA (Invitrogen) 122 U µL⁻¹ e 10 µL de um coquetel 18 19 inibidor de proteases (GE Healthcare). A mistura foi incubada por 30 minutos a 25°C em rotação de 80 rpm. 20 As células lisadas foram centrifugadas e o sobrenadante foi transferido para uma coluna pré-empacotada de 21 níquel-Sepharose (Sigma). Foram realizadas três etapas de lavagem com tampão de ligação (20 mM de 22 tampão fosfato (pH 7,4) contendo 500 mM de NaCl e 10 mM de imidazol) antes de realizar a purificação com 23 o tampão de eluição (20 mM de tampão fosfato (pH 7,4) contendo 500 mM de NaCl e 500 mM de imidazol). A proteína recombinante foi então dialisada contra tampão fosfato 20 mM pH 7,4 e mantida a 4°C para ser 24 25 utilizada para as caracterizações bioquímicas futuras.

26

27 Dosagem padrão de CcXynB2 e determinação de proteínas totais

A atividade da enzima CcXynB2 foi determinada pelo ensaio da quantidade de ρ-nitrofenol liberado
do substrato ρ-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (ρNPX) (Sigma) como descrito em Corrêa et al. (2012). Uma
unidade (U) da atividade de β-xilosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de
ρ-nitrofenol por minuto. A concentração de proteínas foi mensurada utilizando o reagente Bradford da BioRad, com soro albumina bovina (BSA) como padrão.

33

34 Efeito de Íons na atividade da CcXynB2 em temperatura de fermentação

O efeito de diferentes íons na atividade da CcXynB2 foi avaliado em uma temperatura comumente
empregada em processos fermentativos (37 °C) para a produção de compostos de interesse biotecnológico,
como por exemplo o etanol celulósico (Viikari et al. 2012). Assim, a enzima foi incubada na presença dos
diferentes compostos descritos, a uma concentração final de 2 mM: (NH₄)₂SO₄, HgCl, MgSO₄, BaCl₂, NH₄Cl,
iodoacetamida, Al₂(SO₄)₃, MnSO₄, FeSO₄, SnCl₂, KCl, NaCl, CaCl₂, CuSO₄, ZnSO₄, EDTA, dithiothreitol
(DTT), β-mercaptoethanol, MgCl₂, EGTA, MgCl₂+EDTA e CaCl₂+EGTA, a 4°C por 15 minutos, seguido da

mensuração da atividade através da incubação da mistura CcXynB2 na presença de cada composto com o
 substrato pNPX por 15 minutos a 37°C.

3

4 Influência da concentração do KCl na atividade da CcXynB2

O comportamento catalítico da enzima foi avaliado em diferentes concentrações de KCl (0, 0.1, 0.5,
1, 2, 3, 4, 5, 7.5 e 10 mM) a fim de definir a melhor concentração do sal para a indução da enzima. Após a
incubação da enzima nas diferentes concentrações de KCl a 4°C, por 15 minutos, foi realizada a mensuração
da atividade enzimática pela incubação da mistura β-xilosidase II + KCl com o substrato pNPX nas condições
de ensaio descritas em Corrêa et al. (2012). A atividade enzimática foi expressa em unidades U mL⁻¹
considerando como controle o resultado obtido para CcXynB2 quando incubada com o substrato na completa
ausência de KCl.

12

13 Influência do KCl na eficiência catalítica da CcXynB2

14 Para averiguação da eficiência catalítica da CcXynB2, foram determinados os parâmetros cinéticos K_m e V_{máx} usando uma escala crescente de concentração final do substrato pNPX (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 15 mM) em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6, incubando-se a mistura de reação na temperatura ótima para 16 17 β -xilosidase II (55°C) por 10 minutos como determinado anteriormente (Corrêa et al., 2012), na ausência e presença de 5 mM de KCl. Os dados cinéticos foram definidos através da elaboração de gráficos duplos 18 19 recíprocos conforme Lineweaver e Burk. A eficiência catalítica foi expressa pela relação de K_{cat} (constante 20 catalítica), calculada com base no peso molecular experimental obtido no gel de SDS-PAGE e o K_m 21 observado para o substrato pNPX em condições ótimas de ensaio.

- 22
- 23

Efeito de Diferentes Compostos na Atividade Enzimática

24 Visando uma possível aplicação biotecnológica, como a produção de etanol celulósico, o efeito de 25 compostos comumente descritos como potencialmente inibidores do processo fermentativo, que são 26 produzidos tanto na etapa de hidrólise da biomassa lignocelulósica quanto no próprio processo de 27 fermentação, foi testado. Os ensaios enzimáticos foram conduzidos incubando-se a enzima pura na presença 28 dos diferentes compostos em concentrações que variaram de 1 a 200 mM (etanol, fenol, hidroximetilfurfural, ácido acético, ácido fórmico, ácido cumárico, ácido ferúlico e pectina). Paralelamente, a CcXynB2 também 29 30 foi submetida ao efeito de diferentes produtos de sacarificação (arabinose, glicose, xilose), utilizando pNPX 31 como substrato, na temperatura de fermentação 37°C, por 48 horas. Posteriormente, foram realizados dois 32 ensaios por 48 horas a 37°C, utilizando todos os compostos combinados (etanol, fenol, hidroximetilfurfural, arabinose, glicose, xilose, pectina, ácido acético, ácido fórmico, ácido cumárico e ácido ferúlico) por 33 34 concentração (1 a 50 mM) e, também, a associação das melhores concentrações de cada composto com a β -35 xilosidase II, sendo: 200 mM de etanol, fenol, hidroximetilfurfural, ácido ferúlico, arabinose, glicose, xilose e pectina, além de ácido acético a 10 mM, ácido cumárico a 30 mM e ácido fórmico a 50 mM. A atividade 36 37 enzimática relativa foi expressa como a porcentagem de atividade enzimática específica (U mg⁻¹) obtida 38 quando comparada com os dados da enzima CcXynB2 submetida às mesmas condições de ensaio (pH, 39 temperatura e tempo de incubação), entretanto, na total ausência dos diferentes compostos inibidores. 40 Também foram realizados controles negativos para cada um dos compostos para avaliar a presença ou não de interferentes que pudessem gerar falsos resultados, a partir da incubação dos vários compostos apenas com o
 substrato ρNPX ou, sem adição de substrato, mas na presença da enzima pura. Todos os ensaios foram
 realizados conforme descrito anteriormente, em duplicata biológica, e as dosagens para os ensaios padrão em
 triplicata experimental.

5

6 Obtenção de hemicelulose de sabugo de milho

7 O pré-tratamento do sabugo de milho foi realizado com o objetivo de extrair a hemicelulose para 8 posteriormente utilizá-la no ensaio de hidrólise enzimática com a CcXynB2 em associação ou não com outras 9 enzimas comerciais. Neste ensaio foi utilizado sabugo de milho colhido no período de safra para obtenção da 10 hemicelulose através do processo de auto-hidrólise do resíduo agroindustrial, como descrito a seguir: cerca de 80 gramas de sabugo de milho seco foram triturados a uma mistura homogênea de resíduo com água em uma 11 relação 10:1 líquido/sólido (mL g⁻¹) usando tubos de vidro específicos para auto-hidrólise. O pré-tratamento 12 13 foi realizado por 1 hora em bloco digestor aquecido a 200°C e após esse período foi resfriado imediatamente 14 em banho de gelo. A fase líquida contendo a hemicelulose foi separada da fração sólida contendo restos do 15 resíduo agroindustrial por filtração. À fração líquida isolada, foram adicionados 3 vezes de volume de etanol (PA), para promover a precipitação da hemicelulose do sabugo de milho. A precipitação ocorreu a 25°C por 16 17 24 horas. O precipitado foi recuperado por filtração e seco em estufa a 37°C por 24 horas. A hemicelulose foi apropriadamente armazenada em tubos novos e estéreis até o momento do uso. Foram usados, no total, 80g de 18 sabugo de milho seco e triturado para auto-hidrólise, dos quais foram obtidos 2,7g de hemicelulose após 19 20 precipitação e secagem.

21

22 Hidrólise Enzimática da Hemicelulose do Sabugo de Milho

23 Para verificar a capacidade da CcXynB2 em degradar a hemicelulose de sabugo de milho, esta foi pré 24 tratada com a enzima β -xilosidase II pura de *C. crescentus* ou em associação com as enzimas comerciais, 25 xilanase e β -glicosidase, em diferentes condições de hidrólise. O experimento foi conduzido em tubos de 26 vidro estéreis, onde a hemicelulose do sabugo de milho foi diluída em água para uma concentração final de 27 1%. Em seguida, foram adicionadas 2 U da CcXynB2 de C. crescentus ou das diferentes enzimas comerciais, 28 de forma isolada ou em associação uma com as outras como descrito a seguir: 1- CcXynB2; 2- β-glicosidase; 3- xilanase; 4- CcXynB2 + β-glicosidase; 5- CcXynB2 + xilanase; 6- β-glicosidase + xilanase e 7- CcXynB2 29 30 + β -glicosidase + xilanase. Os ensaios foram conduzidos nas temperaturas de 37°C e 50°C por 48 horas. Em 31 intervalos de tempos definidos, alíquotas de cada mistura de reação foram coletadas e usadas em ensaios de 32 dosagem enzimática, como descrito anteriormente, seguido da quantificação de açúcar redutor produzido, 33 após ação das enzimas. Para cada tubo foi realizado um controle sem adição de enzimas, onde as mesmas 34 dosagens foram mensuradas e usadas para normalizar os resultados obtidos nos ensaios de hidrólise. Os 35 resultados foram expressos a partir de dados obtidos em dois ensaios experimentais diferentes com triplicatas 36 de dosagens

37

38 Dosagem de Açúcar Redutor

A quantificação de açúcar redutor, após os ensaios de hidrólise, foi realizada pelo método DNS
 (ácido 3,5-dinitro-salicílico) descrito por Miller (1959). A reação ocorreu através da adição de 100 μL da

mistura de reação obtida após hidrólise enzimática, com adição de 100 μ l do reagente DNS. As amostras foram fervidas por 5 minutos, resfriadas a 4°C e a estas adicionados 1 mL de água destilada. A leitura das absorbâncias obtidas foi realizada em espectrofotômetro em λ = 540 nm usando água e DNS como controle nas leituras. A quantificação de açúcares redutores nas diferentes amostras foi estimada de acordo com uma curva padrão de xilose previamente definida e os produtos de hidrólise pela estimativa de açúcar redutor liberado pós-ação enzimática. Os dados foram expressos em μ mol⁻¹mL pela média dos resultados obtidos em dois ensaios independentes com 3 repetições em cada ensaio.

9 Imobilização Enzimática

Com o objetivo de maximizar as possibilidades de emprego da CcXynB2 em ensaios enzimáticos aplicados a processos biotecnológicos no futuro, a enzima foi imobilizada em resina de fase móvel de Ni-Sepharose Excel (GE-Sigma®) após indução da expressão e lise conforme descrito anteriormente nesta seção (item Purificação da β-xilosidase II). A atividade da CcXynB2 imobilizada foi determinada pelo ensaio da quantidade de p-nitrofenol liberado do substrato pNPX como descrito no item Ensaio enzimático e determinação de proteína, após incubação por 5 horas de 2 U da β-xilosidase pura solúvel e pura imobilizada com o seu respectivo substrato pNPX em 37 e 50°C. Em adição, as dosagens enzimáticas foram mensuradas nas mesmas condições após congelamento da enzima pura solúvel e imobilizada a -20°C por um intervalo de tempo de 1 a 30 dias. Os dados foram expressos em porcentagem relativa de atividade enzimática residual obtida usando como controle positivo a enzima pura solúvel e pura imobilizada armazenada a 4°C após a purificação.

- 1 Resultados
- 2

3 Purificação da CcXynB2

A eficiência de indução da expressão da proteína de fusão bem como a qualidade e grau de pureza da
enzima recombinante obtida podem ser visualizadas no gel SDS-PAGE obtido (Fig. 1). Assim como
evidenciado anteriormente por Corrêa et al. (2012) uma considerável massa de proteína recombinante pode
ser visualizada através da análise do gel, que é expressa como uma única banda de aproximadamente 60 kDa.
A enzima CcXynB2 apresentou uma atividade de 2.484 U mL⁻¹ e atividade específica de 76.7 U mg⁻¹.

9

10 Efeito de Íons

A tabela 1 mostra dados comparativos de resultados obtidos para a caracterização da enzima na presença de diferentes compostos nas temperaturas de 37 e 50°C. Embora as atividades tenham sido mensuradas em uma escala extremamente variável de temperatura, com um decremento de 13°C, os resultados mostraram que esta mudança não foi capaz de alterar de maneira significativa os resultados anteriormente obtidos por Corrêa et al. (2012), o que sugere uma estabilidade funcional à CcXynB2 mesmo em temperaturas muito variáveis.

17 Em relação aos aumentos de atividade observados na presença de KCl tanto a 37 como a 50°C, até o momento não foram encontrados trabalhos que justifiquem satisfatoriamente se o efeito potencializador 18 19 obtido na atividade da CcXynB2 é devido ao íon K⁺ ou ao Cl⁻, mas um resultado interessante do presente estudo foi visualizado quando os ensaios enzimáticos foram conduzidos na presença de CaCl₂ e MgCl₂. Estes 20 experimentos foram realizados adicionando-se à mistura de reação o quelante de íons Mg²⁺ EDTA com o 21 MgCl₂, e separadamente EGTA como quelante do íon Ca²⁺ formado por dissociação do CaCl₂, pois ao 22 aprisionar o Mg^{2+} e o Ca^{2+} , o íon Cl^{-} passou a estar em sua forma livre, e seu efeito pôde ser especificamente 23 analisado. Entretanto, o que se observou foi que o Cl⁻ sozinho não foi capaz de levar à inibição ou ativação da 24 25 atividade da CcXynB2 nas duas temperaturas testadas, 37 ou 50°C, o que nos leva a sugerir que 26 provavelmente o efeito positivo provocado na atividade da β -xilosidase II na presença de KCl deve-se ao íon 27 K^+ .

28

29

Influência da concentração do KCl na atividade da CcXynB2

30 A partir da premissa de que o KCl possui um efeito ativador em 32% na atividade da CcXynB2 em 31 condições ótimas de ensaio, ou seja a 50°C (Corrêa et al., 2012), e que a variação deste perfil indutor varia de forma muito acanhada de 32% para 35% a 37°C (Tabela 1), para definir a melhor concentração de KCl capaz 32 33 de exercer um efeito positivo na atividade da CcXynB2, a enzima foi incubada em diferentes concentrações 34 do KCl. A figura 2 mostra os resultados obtidos neste experimento. Nota-se claramente que na concentração de 5 mM o KCl foi mais efetivo em interferir positivamente na atividade da CcXynB2 de modo que esta 35 aumentou cerca de 62%, ou seja, na ausência total de KCl foi igual a 26 U mL⁻¹ e atingiu 42 U ml⁻¹ com a 36 37 adição de 5 mM do sal. Este resultado sugere que o KCl funciona de fato como um potencializador da 38 atividade enzimática até a concentração de 5 mM, uma vez que incrementos do sal em concentrações superiores a esta levaram a uma diminuição progressiva da atividade β-xilosidásica (Fig. 2). 39

40

1 Determinação da constante de especificidade com ou sem KCl

Para averiguar a eficiência catalítica da CcXynB2 na presença de KCl, os parâmetros cinéticos de V_{máx} e K_m foram determinados para a enzima na presença e ausência deste composto, e os dados obtidos foram comparados com os dados anteriormente verificados por Corrêa et al. (2012). Assim, através dos dados cinéticos obtidos, foi possível definir a constante de especificidade (K_{cat}/K_m) para a CcXynB2 na presença de KCl. Embora a atividade enzimática tenha aumentado cerca de 62% na presença de KCl a 5 mM (Fig. 2), a eficiência catalítica da enzima não alterou de forma significativa, ao contrário, foi praticamente equivalente a obtida para a CcXynB2 na ausência de KCl (Tabela 2).

9

10 Efeito de diferentes compostos na atividade específica de CcXynB2

11 O efeito de compostos descritos classicamente como inibidores de enzimas foi sempre avaliado 12 utilizando um controle positivo: a enzima na ausência total do composto inibidor/potencializador, além de 13 dois controles negativos: 1-adição de composto e o substrato pNPX sem adição de enzima; e 2- adição de 14 composto e da enzima, na completa ausência do substrato pNPX. Tais controles negativos foram realizados a 15 fim de garantir que os diferentes compostos usados com substratos sem adição de enzima ou com a adição das 16 enzimas sem a presença de substrato por si só não foram capazes de gerar reações cromogênicas positivas que 17 pudessem ser identificadas durante a leitura das dosagens espectrofotométricas para a mensuração de 18 atividade enzimática e, portanto, por si só não levaram a produção de resultados falsos positivos (dados não 19 mostrados).

A influência de diferentes compostos na atividade da CcXynB2 foi expressa mensurando-se os valores de atividade enzimática específica (U mg⁻¹) relativa (%), considerando-se o valor de atividade específica relativa para a enzima pura sem adição de compostos interferentes como 100% e os demais resultados calculados proporcionalmente acima ou abaixo deste valor de referência, que representaria, deste modo, o controle positivo de todos os experimentos.

25

26 Efeito de Etanol, Fenol e Hidroximetilfurfural (HMF)

27 Foi possível verificar que a adição do etanol, fenol e do HMF (Fig. 3a-c) separadamente não 28 interferiram com a atividade específica relativa da CcXynB2 após 48 horas de incubação. Ao contrário 29 verificou-se uma melhora na atividade da enzima de maneira que foi dependente da concentração de cada 30 composto usado. Por exemplo, com a adição de etanol nas concentrações de 5 a 200 mM após 48 horas de 31 incubação, a atividade da CcXynB2 manteve-se equivalente ou superior a atividade obtida para a enzima na 32 ausência de etanol (Fig. 3a). De forma surpreendente o melhor desempenho da enzima foi verificado nos 33 primeiros 15 min (=0,25 h) de incubação com a máxima concentração de etanol usada (200 mM), quando se 34 verificou que a atividade enzimática foi 121% superior à obtida para o ensaio controle (linha tracejada da 35 Fig.3a) e manteve mais que metade desta atividade, sendo 61% superior ao controle após 48 horas de 36 incubação. Ao contrário, em concentrações de etanol mais baixas como 5 a 10 mM a atividade específica 37 relativa da CcXynB2 manteve-se abaixo dos níveis encontrados para o ensaio controle até 12 h de incubação, 38 embora após este tempo os níveis de atividade mesmo nestas concentrações brandas foram superiores ou 39 equivalentes às mensuradas para o controle entre 12 a 48 horas de incubação.

Quanto ao efeito do fenol foi verificado que a enzima apresentou tolerância apenas em concentrações mais brandas do composto, entre 5 a 10 mM (Fig.3b), enquanto o fenol levou a um aumento na atividade enzimática específica apenas nas primeiras horas de ensaio nas concentrações de 5 e 10 mM, atingindo um máximo de atividade (23% superior ao controle) nos primeiros 15 min (=0.25 h) de ensaio e mantendo equivalente ao perfil de atividade exibido pelo controle positivo após 48 horas de incubação. Já as concentrações de fenol superiores a 50 mM levaram a uma drástica redução na atividade específica em relação aos dados obtidos para o controle positivo, mantendo 85% de atividade da CcXynB2 (Fig. 3b).

Na presença de hidroximetilfurfural, considerado um inibidor da ação de enzimas durante processos
fermentativos para produção de etanol de segunda geração (Girio et al., 2010), verificou-se que a CcXynB2
foi tolerante nas concentrações de 50 e 100 mM, mantendo 100% de sua atividade específica relativa inicial
quando comparada ao ensaio controle após 48 horas de incubação (Fig. 3c). O melhor desempenho catalítico
da β-xilosidase II na maior concentração de hidroximetilfurfural testada ocorreu nos primeiros 15 min de
ensaio.

14

15 Arabinose, Glicose, Xilose e Pectina

Nos ensaios realizados na presença de açúcares e pectina verificou-se que a arabinose (Fig. 4a) exerceu um efeito inibidor significativo em 5, 10, 100 e 200 mM nos primeiros 15 min de incubação, apresentando, apenas, 72% da capacidade enzimática exibida pelo controle na concentração mais elevada de arabinose. No entanto, com o passar do tempo, a enzima parece adquirir tolerância ao composto, normalizando sua atividade até o controle de 100%, ou ainda elevando ainda mais.

A atividade específica relativa da CcXynB2 na presença de glicose e xilose foi superior à obtida para
o ensaio controle, de modo que a CcXynB2 mostrou-se 114% mais tolerante ao efeito da glicose (Fig. 4b) em
50 mM e 67% em 200 mM, e 44% para a xilose (Fig. 4c) em 200 mM após 48 horas.

De maneira também vantajosa para aplicação biotecnológica da enzima, a CcXynB2, quando em contato com a pectina, a enzima reteve 63% de sua atividade inicial nos primeiros 15 min na concentração máxima usada, de 200 mM, e mostrou o melhor desempenho quando a pectina foi adicionada a 10 mM após 48 h de incubação, quando a enzima mostrou um aumento de 141% em relação a atividade mostrada pela enzima no ensaio controle (Fig. 4d). No entanto, há de se destacar que um bom padrão de tolerância foi claramente demonstrado pela CcXynB2 durante as primeiras 24 horas de ensaio nas concentrações de 5 a 50 mM de pectina (Fig. 4d).

31 32

Efeito de diferentes ácidos na atividade da CcXynB2

O efeito de diferentes ácidos sobre a atividade da CcXynB2, foi avaliado em diferentes concentrações, uma vez que a enzima apresenta um perfil diferencial de tolerância a estes ácidos também em concentrações diferentes. Desta forma, os dados mostrados a seguir, referem-se a resultados obtidos após incubações da CcXynB2 a 37°C por um período de 48 h com 1-10 mM de ácido acético (Fig. 5a), 1-50 mM de ácido fórmico (Fig. 5b), 1 a 50 mM de ácido cumárico (Fig. 5c) e 5-200 mM de ácido ferúlico (Fig. 5d).

38 Na presença de ácido acético de 5 a 10 mM a atividade da CcXynB2 decresceu abaixo dos níveis
39 observados para a enzima controle em apenas 30 min de incubação (Fig. 5a). Entretanto a tolerância a ácido
40 acético em baixas concentrações (1mM) foi claramente evidenciada durante as 48 horas de incubação em

1 níveis que chegaram a ser 20% superiores aos verificados para enzima controle, ou seja, na completa ausência 2 de ácido acético. Na presença de ácido fórmico nas concentrações de 5 e 10 mM, a CcXynB2 apresentou uma 3 atividade 50% superior a verificada para a enzima controle durante após 48 h de incubação (Fig. 5b), mas 4 estes níveis caíram drasticamente em relação ao controle, após 1 h de incubação com o ácido fórmico em 5 concentrações mais elevadas (30 a 50 mM) já na primeira hora de contato com a enzima pura. Da mesma 6 forma uma atividade abaixo dos níveis mostrados para a enzima controle foram mensuradas após cerca de 40 7 min de ensaio com 1-10 mM de ácido cumárico. Quando o experimento foi conduzido em concentrações 8 superiores a 30 mM de ácido cumárico ocorreu uma brusca redução da tolerância da CcXynB2 após 1 hora de 9 incubação, de modo que a enzima apresentou menos que 50% da sua atividade enzimática original, sem 10 interferentes (Fig. 5c)

Resultados mais satisfatórios do ponto de vista de tolerância à alta concentração de ácidos podem ser 11 12 visualizados na presença de 5 a 200 mM de ácido ferúlico (Fig. 5d). Quando incubada por até 48 h com o 13 ácido ferúlico em quaisquer das concentrações mencionadas a β -xilosidase II mostrou elevados níveis de atividade específica, próximos ou superiores ao verificado para a enzima sem adição deste ácido. Em fato, a 14 CcXynB2 manteve quase 100% da sua atividade original após 48 horas de incubação com 50 a 200 mM de 15 16 ácido ferúlico. Em tempos de incubação inferiores a 6 horas a tolerância da enzima foi extremamente elevada 17 na presença de ácido ferúlico em concentrações que variaram de 5 a 200 mM. O melhor desempenho 18 considerando-se tempo de incubação e concentração de ácido foi verificado adicionando-se 100 a 200 mM de 19 ácido ferúlico na primeira hora de incubação, sendo a atividade específica relativa da CcXynB2 três vezes 20 superior a verificada para a enzima na ausência do reagente (Fig. 5d)

21

22

Efeito dos Diferentes Compostos Associados

23 Considerando-se que em um processo de fermentação simultânea para produção de etanol celulósico, 24 os diferentes compostos inibidores são produzidos também de maneira concomitante, e podem inibir a 25 atividade de enzimas degradadoras da hemicelulose, foi realizado um ensaio na presença de todos os compostos usados nos testes precedentes (etanol, fenol, hidroximetilfurfural, ácido galacturônico presente na 26 27 pectina, ácido acético, ácido fórmico, ácido cumárico e ácido ferúlico) nas concentrações de 1 a 50 mM, que 28 foi a faixa média de concentração de maior tolerância da CcXynB2 aos diferentes compostos. A enzima 29 manteve 100% da sua atividade específica em concentrações de 1-10 mM (Fig. 6a) após 48 horas. Em 30 concentrações entre 30 a 50 mM dos compostos associados a CcXynB2 mostrou decréscimo na sua atividade 31 enzimática específica já nas primeiras 6 horas de incubação a 37°C, de forma que usando 30 mM dos 32 compostos combinados a enzima, ainda assim, reteve 48% da sua atividade a partir de 6 h (Fig. 6a). Quando 33 os inibidores foram adicionados todos juntos, cada um deles na concentração em que a enzima demonstrou 34 maior desempenho em sua melhor concentração (Fig. 6b), a CcXynB2 reteve cerca 67% da sua atividade 35 inicial após 48 h.

36

37 Hidrólise Enzimática

O desempenho individual da CcXynB2 e em associação com uma ou mais enzimas comerciais
 envolvidas na quebra da hemicelulose, como a xilanase e a β-glicosidase foi averiguada a partir da incubação
 destas enzimas nas temperaturas de 37 e 50°C com a hemicelulose obtida do sabugo de milho como descrito

1 em Materiais e Métodos. Nos intervalos de 6, 12, 24 e 48 h de incubação foi mensurada a quantidade de 2 açúcar redutor liberado pela ação das enzimas. Nos diferentes tempos analisados ficou muito evidente que a 3 ação sinérgica das três enzimas CcXynB2, β -glicosidase e xilanase, foi mais eficiente nas duas temperaturas de incubação (Fig. 7). A combinação de β -glicosidase + xilanase ou β -glicosidase + CcXynB2 foram mais 4 5 eficientes do que a associação de CcXynB2 + xilanase em todos os tempos de hidrólise enzimática. Durante 6 as 48 h de ensaio o uso combinando de CcXynB2 com β -glicosidase foi em média 30% superior ao verificado 7 para a combinação CcXynB2 + xilanase a 37°C (Fig. 7a) ou na temperatura ótima da CcXynB2 a 50°C (Fig. 8 7b).

9 Uma relação claramente paralela entre tempo de incubação e açúcar redutor produzido foi observada 10 para o uso isolado ou combinado das três enzimas, de maneira que quanto maior o tempo de ação das enzimas adicionadas individualmente com a hemicelulose ou de forma combinada, maior foi a quantidade de açúcar 11 redutor formada, exceto para o tempo de 48 horas a 50°C. Este dado sugere que além de apresentar alta 12 13 tolerância e capacidade catalítica na presença de compostos inibidores, a CcXynB2 favorece de maneira 14 eficiente a produção de açúcares redutores que podem ser levados a conversão de compostos com valor comercial, mesmo quando a enzima foi empregada em uma temperatura distante da sua temperatura ótima 15 (Fig. 7a) onde a atividade da enzima em U mL^{-1} foi significativamente inferior, mas permaneceu 16 funcionalmente ativa durante as 48 h de hidrólise da hemicelulose de sabugo de milho (Fig. 7c). 17

18

19 Ensaio com a CcXynB2 Imobilizada

De acordo com os ensaios realizados, a CcXynB2 imobilizada apresentou maior atividade que a
enzima solúvel nas temperaturas testadas (Fig. 8). Entretanto, o melhor desempenho enzimático foi obtido
para a enzima imobilizada na incubação a 50°C, após as 5 h de ensaio.

23 Experimentos prévios de caracterização desta enzima mostraram que ela foi capaz de manter mais 24 que 50% de sua atividade catalítica mesmo após 6 meses de incubação a 4°C (Corrêa et al. 2012), no entanto o mesmo não foi observado para a enzima após congelamento (dados não mostrados). Assim, com o intuito de 25 verificar se a imobilização favoreceria a manutenção da capacidade catalítica da enzima após congelamento a 26 -20°C esta foi mantida durante 30 dias a uma temperatura constante de -20°C e após descongelamento foi 27 28 usada para verificar sua capacidade catalítica. A título de comparação, a enzima solúvel foi também 29 submetida às mesmas condições de ensaio. Neste experimento a enzima imobilizada após 30 dias de 30 congelamento (Fig. 9) foi capaz de manter 39% de sua atividade enzimática específica relativa, enquanto que 31 a não imobilizada foi 3 vezes menos eficiente uma vez que reteve apenas 13%.

- 32
- 33 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 50
- 39
- 40
1 Discussão

2 Proteínas recombinantes produzidas e purificadas a partir de três genes que codificam para β-3 xilosidases, xynB1, xynB2 e xynB5 (Santos et al. 2012; Corrêa et al. 2012; Graciano et al. 2012; Justo et al. 2015; Bosetto et al. 2015) e um gene que codifica para endoxilanase (xynA1) do grupo 10 das glicosil-4 5 hidrolases (GH-10) (Graciano et al. 2015) já foram estudados previamente em C. crescentus. Até o momento, 6 apenas três trabalhos com foco na CcXynB2 de C. crescentus (Corrêa et al. 2012; Santos et al. 2012; Corrêa et 7 al. 2014) foram publicados nos últimos três anos, e em resumo mostraram que a enzima é capaz de atuar 8 como um monômero e não como um tetrâmetro como outras β-xilosidases de outras bactérias que pertencem 9 ao mesmo grupo das GH39 (Santos et al. 2012). Além disto a CcXynB2 apresenta ainda a habilidade de 10 hidrolisar substratos como xilobiose, xilotriose e xilopentose, cujo pH ótimo é igual a 6,0 e temperatura ótima 55°C, embora apresente maior estabilidade a 50°C, o que demonstra uma certa termotolerância, indicando ser 11 suficientemente resistente para certas aplicações biotecnológicas (Santos et al. 2012; Corrêa et al. 2012). Em 12 13 adição, esta enzima exibiu um aumento de 32% em sua atividade enzimática quando incubada na presença de 14 2 mM de KCl. Os experimentos realizados com resíduos agroindustriais sugerem que essa enzima pode ser 15 utilizada na pré-degradação das fibras de hemicelulose, liberando açúcares de cinco carbonos que podem ser utilizados nos processos de fermentação, e que ela não é induzida por xilose e pode também estar associada a 16 uma função regulatória de outras xilosidases em C. crescentus (Corrêa et al. 2012; Santos et al. 2012; Corrêa 17 et al. 2014, Bosetto et al. 2015). 18

A enzima CcXynB2 purificada neste trabalho mostrou um rendimento final de 71 U mg⁻¹, o que permitiu a total caracterização da enzima quanto a diferentes aspectos para uma possível aplicação biotecnológica. Embora tenha se obtido um bom rendimento nesse processo de purificação e uma única banda proteica bem definida de 60 KDa no gel SDS-PAGE (Fig. 1), o procedimento de purificação usado neste trabalho mostrou um rendimento inferior ao verificado por Corrêa et al. (2012) que foi de 215 U mg⁻¹ sugerindo que o uso de resina de Ni-Sepharose de fase móvel é mais vantajoso para a purificação especificamente da CcXynB2 do que Ni-Sepharose de fase sólida.

Quanto ao efeito inibitório da maioria dos compostos testados (Tabela 1), a inibição da CcXynB2
por íons divalentes foi similar à verificada em outras bactérias (Nazmi et al. 2006; Shi et al. 2013; Lee et
al. 2013), o EDTA também inibiu fortemente outras β-xilosidases (Shi et al. 2013; Jain et al. 2014; Wu
et al. 2013), a inibição pelo zinco e uma tolerância maior pelo manganês, tem sido observada em enzimas
bifuncionais como a β-xilosidase/α-arabinofuranosidase (Shi et al. 2013). Yang et al. (2014), também
observaram um efeito negativo da maioria dos íons sobre a β-xilosidase do fungo *Humicola insolens*.

Apesar da CcXynB2 ter mostrado uma clara melhora na atividade enzimática em U ml⁻¹ na presença 32 33 de 5 mM de KCl (Fig. 2), os dados aqui evidenciados mostraram que a eficiência catalítica da enzima não foi alterada de forma significativa (Tabela 2), ao contrário, foram praticamente equivalentes. Em fato, este 34 35 provável cofator positivo que potencializa a atividade enzimática também levou a um aumento proporcional em valores de V_{máx} e K_m para a enzima. É sabido que a determinação da constante de especificidade (K_{cat}/K_m) 36 configura um parâmetro mais confiável para avaliação da capacidade catalítica de uma enzima qualquer do 37 que simplesmente os dados obtidos para a atividade enzimática em U ml⁻¹, e esta premissa é também aplicada 38 e aceitável para β -xilosidases bacterianas (Justo et al. 2015; Bosetto et al., 2015). De qualquer forma, o efeito 39 40 potencializador do KCl na atividade enzimática é indiscutível porque se verifica incrementos na V_{máx} da

reação e K_m quando todos os outros parâmetros de pH, temperatura estão fixados, mas a eficiência catalítica
 para a CcXynB2 não foi afetada com a adição de KCl.

3 Os resultados apresentados para o efeito de íons sugerem que possivelmente K⁺ atue nas suas temperaturas testadas de 37 e 50°C, mas estes dados seriam mais bem explorados e compreendidos com 4 5 estudos cristalográficos conduzidos na presença ou ausência de KCl, a fim de verificar possíveis alterações 6 em níveis estruturais na CcXynB2. Um trabalho valoroso já foi realizado com a CcXynB2 que é um membro 7 da família 39 das glico-hidrolases (GH39) e nos indicaram claramente que esta proteína possivelmente atua 8 como um monômero na célula bacteriana, diferente de GH39-β-xilosidases de outras bactérias que exercem 9 sua atividade catalítica na forma tetramérica (Santos et al. 2012). Entretanto, estes dados cristalográficos não 10 foram obtidos na presença de KCl para que explicações mais consistentes em nível estrutural possam ser sugeridas aqui. A estabilização de algumas enzimas pode ser induzida por íons, que quando utilizados em 11 12 baixas concentrações, podem estabilizar a estrutura terciária da proteína e promover a formação de ligações 13 cruzadas, conferindo a ela uma maior estabilidade com consequente aumento de atividade (Sharma et al. 14 2014).

De maneira relevante para processos fermentativos que envolvem a produção de etanol celulósico, a potencialização da atividade enzimática específica da CcXynB2 foi claramente evidenciada não somente na presença de fenol, mas em elevadas concentrações de HMF e etanol, substâncias fundamentais que tendem a inibir os processos fermentativos que visam a produção de etanol celulósico (Fu e Mazza, 2011; Kim e Han, 2012; Ashfaque et al. 2014).

20 O monossacarídeo arabinose (Fig. 4-A) exerceu um efeito inibidor significativo na atividade 21 CcXynB2 em diferentes concentrações testadas. Como mencionado anteriormente, no genoma de C. 22 crescentus há 5 genes para β -xilosidases (Marks et al. 2010) sendo um deles (xynB5) já caracterizado como 23 tri-funcional para atividade β -glicosidase/ β -xilosidase II e α -arabinofuranosidase (Justo et al. 2015), embora 24 a enzima tenha atividade preponderante de β -glicosidase, assim, é compreensível que a CcXynB2 que atua 25 essencialmente com atividade β -xilosidásicas seja reprimida por um monossacarídeo que não é capaz de 26 metabolizar (Corrêa et al. 2012). Por outro lado, acúcares considerados de fácil metabolização para a maioria 27 dos microrganismos como a glicose (Fig.4b) e a xilose (Fig.4c) e que comumente regulam negativamente a 28 atividade de enzimas degradadoras da hemicelulose, incluindo as β -xilosidases (Bosetto et al., 2015), não 29 levaram a repressão da atividade de CcXynB2, ao contrário a tolerância da enzima pura a estes açúcares foi 30 67% superior ao controle para a glicose e 44% superior ao controle na presença de xilose após 48 horas de 31 incubação na concentração de 200 mM.

Dados prévios do nosso laboratório já tinham de fato demonstrado que glicose e xilose em baixas
 concentrações não regulam negativamente a expressão do gene *xynB2* que codifica a CcXynB2, tanto em
 nível de transcrição como em nível de tradução (Corrêa et al. 2014), mas no presente trabalho demonstramos
 experimentalmente que existe um paralelismo deste comportamento para a atividade específica da enzima
 CcXynB2.

Os dados reportados nas figs. 3-6 são considerados de extrema relevância neste trabalho. De um
 modo geral, a enzima não é somente tolerante à maioria dos compostos testados, mas também mostrou
 potencialização do seu desempenho por aumento significativo da sua atividade específica quando em contato
 com compostos combinados, alguns deles classicamente descritos como compostos inibidores da fermentação

1 como, por exemplo, o etanol e a glicose, relatados em muitos estudos como um fator causal da inibição da 2 atividade de enzimas celulolíticas (Podkaminer et al. 2010), sendo, portanto, o emprego de enzimas tolerantes 3 ao etanol e à glicose e a outros compostos, como a CcXynB2, extremamente relevante para uma eficiente 4 conversão da biomassa lignocelulósica. Assim, a capacidade da CcXynB2 ser aplicada em processos de 5 sacarificação e fermentação simultânea torna-se uma realidade altamente provável, pois irá otimizar em 6 associação com outras enzimas a liberação de açúcares fermentescíveis para aumentar a taxa de produção de 7 químicos e combustíveis a partir de resíduos agroindustriais ou ainda para aplicação em processos 8 enzimáticos de sacarificação de resíduos principalmente aqueles que visam à produção de etanol celulósico.

9 Em concordância com o mencionado acima, os dados obtidos neste trabalho nos ensaios de hidrólise 10 enzimática (Fig.7) indicam experimentalmente que a enzima CcXynB2 pode ser utilizada para degradar as fibras de hemicelulose, como as derivadas do sabugo de milho, liberando os mesmos açúcares que podem ser 11 12 utilizados nos processos de fermentação quantificados por dosagem de açúcar redutor. Vale ressaltar que os 13 benefícios passam ser mais claros quando se utiliza uma combinação de diferentes enzimas que possam atuar 14 de forma sinérgica, pois além da β-xilosidase não ser eficiente para hidrolisar o xilano quando adicionada 15 individualmente, a bioconversão da biomassa lignocelulósica é muito otimizada com a ação combinada de várias das enzimas envolvidas no processo de desconstrução da hemicelulose (Gottschalk et al. 2010; Qing e 16 17 Wyman 2011; Van Dyk e Pletsche, 2012).

Como já demonstrado para outras β-xilosidases de outros micro-organismos (Bosetto et al. 2015), a imobilização da CcXynB2 gerou um efeito protetor da atividade enzimática, sendo que o desempenho da enzima imobilizada foi notavelmente superior (Fig. 8). Embora tenha ficado muito evidente que a CcXynB2 foi igualmente eficiente na forma solúvel ou imobilizada, os resultados apresentados neste trabalho indicam claramente que a termoestabilidade da CcXynB2 foi melhorada pelo processo de imobilização. Além disso, o resultado encontrado para a enzima na temperatura de 37°C na forma solúvel ou imobilizada sugere que a enzima possa ser aplicada em processos fermentativos, nas duas formas, com elevada capacidade catalítica.

25 Em geral, a enzima imobilizada é mais resistente do que a forma livre, quando em contato com 26 diferentes temperaturas e também com agentes desnaturantes (Bosetto et al. 2015). Da mesma forma que 27 empregado em outros trabalhos, a coluna de Níquel-Sepharose foi utilizada nos experimentos aqui conduzidos 28 não somente para a purificação da proteína recombinante, mas também como ferramenta para a imobilização da CcXynB2, embora neste trabalho foi usada a resina de fase móvel para os ensaios de imobilização (Lee et 29 30 al. 2013). A vantagem de utilizar a resina de Níquel-Sepharose, é a sua alta capacidade de ligação para 31 enzimas recombinantes, auxiliando na manutenção da estabilidade e aumento da atividade enzimática (Lee et 32 al. 2013; Lee et al. 2014).

33 Em conclusão, pode-se considerar que CcXynB2 corresponde a uma enzima com elevado potencial 34 para o uso em processos de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) pois, apesar de ter sua atividade 35 ótima em 55°C com maior estabilidade a 50°C (Corrêa et al. 2012), ao ser testada na temperatura de fermentação de 37°C, a enzima apresentou uma excelente atividade específica, e quando em contato com 36 37 produtos potencialmente inibidores que são produzidos tanto no processo de hidrólise quanto na fermentação, 38 a enzima foi bastante tolerante e até apresentou incrementos consideráveis em sua atividade com alguns dos 39 compostos. Os resultados aqui evidenciados forneceram informações fundamentais para aprimorar o uso da 40 CcXynB2 e contribuir para possíveis aplicações da enzima em processos SSF visando à produção de etanol

celulósico ou até mesmo para compor coquetéis enzimáticos envolvidos com a degradação da biomassa em processos industriais diversos, pela sua tolerância a diferentes temperaturas, estabilidade e alta atividade na presença de diferentes inibidores do processo fermentativo e dos produtos da sacarificação, auxiliando, assim, na liberação de açúcares fermentáveis. Segundo nosso conhecimento, é a primeira vez que é relatado na literatura uma β -xilosidase bacteriana resistente a tantos compostos inibitórios em elevadas concentrações. Além de ser muito mais estável quando imobilizada, CcXynB2 também mostrou potencial para aplicação principalmente na bioconversão da hemicelulose quando adicionada a uma mistura de celulases, completando a sacarificação da biomassa lignocelulósica de maneira mais eficiente.

1	Agradecimentos
2	A estudante A. Alves foi financiada pela CAPES/CNPq (bolsa de mestrado acadêmico). R.C.G.
3	Simão foi parcialmente financiada pela Fundação Araucária (Bolsa Produtividade – convênio 630/2014).
4	
5	Conflito de interesses
6	Os autores declaram que não há conflito de interesses.
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	
27	
20	
29	
30	
32	
33	
34	
35	
36	
37	
38	
39	
40	

1 Referências

- 2 Ashfaque M, Solomon S, Pathal N (2014) Optimization of pretreatment and fermentation conditions for
- 3 production of extracellular cellulose complex using sugarcane bagasse. Bioinformatics 10:606-610.
- 4 Bensah EC, Mensah M (2013) Chemical pretreatment methods for the production of cellulosic ethanol:
- 5 technologies and innovations. Int J Chem Eng 1:1-21.
- 6 Bosetto A, Justo PI, Zanardi B, Venzon SS, Graciano L, Santos EL, Simão RCG (2015) Research
- 7 progress concerning fungal and bacterial β-xylosidases. Appl Biochem Biotechnol. doi: 101007/s12010-
- 8 015-1908-4.
- 9 Corrêa JM,, Graciano L, Abrahão J Loth EA, Gandra RF, Kadowaki MK, Henn C, Simão RCG (2012)
- Expression and characterization of a GH39 β-xylosidase II from *Caulobacter crescentus*. Appl Biochem
 Biotechnol 168: 2218-2229.
- 12 Corrêa JM, Mingori MR, Gandra RF, Loth EA, Seixas FAV, Simão RCG (2014) Depletion of the xynB2
- 13 upregulates β -xylosidase expression in *C. crescentus*. Appl Biochem Biotechnol 172: 1085-1097.
- 14 Ferreira V, Faber MO, Mesquita SS, Pereira Jr, N (2010) Simultaneous saccharification and fermentation
- 15 processo f differente cellulosic substrates using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring the β -
- 16 glucosidase gene. Eletronic J Biotechnol 13: 1-7.
- 17 Fu D, Mazza G (2011) Optimization of processing conditions for the pretreatment of wheat straw using
- 18 aqueous ionic liquid. Bioresource Technol 102: 8003-8010.
- 19 Gao D, Uppugundla N, Chundawat SP, Yu X, Hermanson S, Gowda K, Brumm P, Mead D, Balan V,
- 20 Dale BE (2011) Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic
- 21 biomass to monosaccharides. Biotechnol Biofuels 4: 1-11.
- 22 Girio FM, Fonseca C, Carvalheiro F, Duarte LC, Marques S, Bogel-Lukasik R (2010) Hemicelluloses for
- 23 fuel etanol: A review. Bioresource Technol 101: 4775-4800.
- 24 Gottschalk LMF,, Oliveira RA Bom EPS (2010) Cellulases xylanases β-glucosidase and ferulic acid
- esterase produced by Trichoderma and Aspergillus act synergistically in the hydrolysis of sugarcane
- bagasse. Biochem Eng J. 51:72-78.
- 27 Graciano L, Corrêa JM, Gandra RF, Seixas FAV, Kadowaki MK, Sampaio SC, Silva JLC, Osaku CA,
- 28 Simão RCG (2012) The cloning expression purification characterization and modeled structure of
- 29 *Caulobacter crescentus* β -xylosidase I. World J Microbiol Biotechnol 28: 2879-2888.
- 30 Graciano L, Corrêa JM, Vieira FGN, Bosetto A, Loth EA, Kadowaki MK, Gandra RF, Simão RCG
- 31 (2015) Cloning and expression of the xynA1 gene encoding a xylanase of the GH10 group in *Caulobacter*
- 32 *crescentus*. Appl Biochem Biotechnol 175: 3915-3929.
- 33 Hu J, Arantes V, Saddler JN (2011) The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic
- substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: Is it an additive or synergistic effect?Biotechnol Biofuels 4: 2-13.
- 36 Jain I, Kumar V, Satyanarayana T (2014) Applicability of recombinant β-xylosidase from the extremely
- 37 thermophilic bacterium Geobacillus thermodenitrificans in synthesizing alkylxylosides. Bioresource
- 38 Technol 170:462-469.

- 1 Justo PI, Corrêa JM, Maller A, Kadowaki MK, Silva JLC, Gandra RF, Simão RCG (2015) Analysis of
- the xynB5 gene encoding a multifunctional GH3-BglX β-glucosidase-β-xylosidase-α-arabinosidase
 member in *Caulobacter crescentus* Antonie van Leeuwenhoek 108: 993-1007.
- 4 Kim I, Han J-I (2012) Optimization of alkaline pretreatment conditions for enhancing glucose yield of
- 5 rice straw by response surface methodology. Biomass Bioenerg 46: 210-217.
- 6 Lee CC, Braker JD, Grigorescu AA, Wagschal K, Jordan DB (2013) Divalent metal activation of a GH43
- 7 β -xylosidase. Enzyme Microb Tech 52:84-90.
- 8 Lee J-Y, Jeon S-J (2014) Characterization and immobilization on nickel-chelated Sepharose of a
- 9 glutamate decarboxylaseA from *Lactobacillus brevis* BH2 and its application for production of GABA.
- 10 Biosci Biotech Bioch 78:1656-1661.
- 11 Lee S, Ahn J, Kim YG, Jung JK, Lee H, Lee EG (2013) Gammaaminobutyric Acid production using
- immobilized glutamate decarboxylase followed by downstream processing with cation exchangechromatography. Int J Mol Sci 14: 1728–1739.
- 14 Marks ME, Castro-Rojas CM, Teiling CDUL, Kapatral V, Walunas TL, Crosson S (2010) The genetics
- 15 basis of laboratory adaptation in *Caulobacter crescentus*. J Bacteriol 192:3678-3688.
- 16 Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal Chem 31
- 17 (3) 426-428.
- Naik SN, Goud VV, Rout PK, Dalai AK (2011) Production of first and second generation biofuels: A
 comprehensive review. Renew Sustainable Energy Rev 14:578-597.
- 20 Nazmi AR, Reinisch T, Hinz HJ (2006) Ca-binding to Bacillus licheniformis α-amylase (BLA). Arch
- 21 Biochem Biophys 453: 18–25.
- 22 Olofsson K, Bertilsson M, Lidén G (2008) A short review on SSF an interesting process option for
- ethanol production from lignocellulosic feedstocks. Biotechnol Biofuels 1:1-14.
- 24 Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and
- 25 mechanisms of inhibition. Bioresource Technol 74: 25-33.
- 26 Parawira W, Tekere M (2011) Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose
- 27 hydrolysates for ethanol production: review. Crit Rev Biotechnol 31: 20-31.
- 28 Podkaminer KK, Shao X, Hogsett DA, Lynd LR (2010) Enzyme inactivation by ethanol and development
- 29 of kinetic model for thermophilic simultaneous saccharification and fermentation at 50°C with
- 30 Thermoanaerobacterium saccharolyticum ALK2. Biotechnol Bioeng. 108:1268-1278.
- 31 Qing Q, Wyman CE (2011) Supplementation with xylanase and β -xylosidase to reduce xylo-oligomer and
- 32 xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover Biotechnol Biofuels. 4:1-
- **33** 12.
- 34 Santos CR, Polo CC, Corrêa JM, Simão RCG, Seixas FAV, Murakami MT (2012) Accessory domain
- changes accessibility and molecular topography of the catalytic interface in monomeric GH39 β xylosidases. Acta Crystallogr D 68:1339-1345.
- 37 Sharma R, Kocher GS, Bhogal RS, Oberol HS (2014) Cellulolytic and xylanolytic enzymes from
- thermophilic *Aspergillus terreus* RWY. J Basic Microb 54:1367-1377.

1 Shi H, Li X, Gu H, Zhang Y, Huang Y, Wang L, Wang F (2013) Biochemical properties of a novel

62

- 2 thermostable and highly xylose-tolerant β -xylosidase/ α -arabinosidase from *Thermatoga thermarum*.
- 3 Biotechnol Biofuels 6: 1-10.
- 4 Van Dyk JS, Pletschke BI (2012) A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis
- 5 and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes conversion and synergy.
- 6 Biotechnol Adv 30:1458-1480.
- 7 Viikari L, Vehmaanperä J, Koivula A (2012) Lignocellulosic ethanol: from science to industry. Biomass
- 8 Bioenerg 46: 13-24.
- 9 Wang L, Luo Z, Shahbazi A (2013) Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for
- the production of ethanol from sweet sorghum (Sorghum bicolor) bagasse using response surfacemethodology. Ind Crop Prod 42:280-291.
- 12 Wu Q, Li Y, Li Y, Gao S, Wang M, Zhang T Chen J (2013) Identification of a novel fungus
- *Leptosphaerulina chartarum* SJTU59 and characterization of its xylanolytic enzymes. PLoS ONE 8: 1 14.
- 15 Yang X, Shi P, Huang H, Luo H, Wang Y, Zhang W, Yao B (2014) Two xylose-tolerant GH43
- 16 bifunctional β -xylosidase/ α -arabinofuranosidase and one GH11 xylanase from *Humicola insolens* and
- their synergy in the degradation of xylan. Food Chem 148:381–387.
- 18
- 19
- 20

21

22

23

24

25

26 27

- 1 Legendas
- 2

Fig. 1 Etapas de purificação da CcXynB2. SDS-PAGE mostrando os passos de purificação da proteína: (1)

4 Marcador Protein ladder (Promega); (2) Alíquota de 5 μL do precipitado e (3) sobrenadante de células de E.

- 5 coli DH10B contendo a construção pPROeX-hta/xynB2 induzidas com IPTG 1 mM após a lise celular (4-6)
- 6 Alíquotas de 5 μL da proteína recombinante eluída da coluna de Ni-Sepharose com 500 μL de tampão fosfato
 7 de sódio 20 mM contendo imidazol 500 mM em três etapas subsequentes. Apenas as frações 5 e 6 foram
- 8 utilizadas para caracterizações enzimáticas subsequentes.
- 9

Fig. 2 Influência de diferentes concentrações de KCl na atividade enzimática da CcXynB2. A enzima foi
 incubada na ausência e presença de diferentes concentrações de KCl. A atividade enzimática foi expressa em
 unidades enzimáticas por mL (U mL-1). As barras verticais indicam os desvios padrões.

13

Fig. 3 Efeito do etanol, fenol e hidroximetilfurfural na atividade da β-xilosidase II. Atividade enzimática
específica da CcXynB2 quando em contato com diferentes concentrações de etanol (a), fenol (b) e
hidroximetilfurfural (c). Em todos os gráficos é mostrado o controle positivo em linha tracejada, ou seja, a
enzima pura na ausência completa de composto inibidor, apenas incubada ao seu substrato específico ρNPX.
As barras verticais indicam os desvios padrões das médias dos resultados obtidos.

19

Fig. 4 Efeito da arabinose, glicose, xilose e pectina na atividade da CcXynB2. Atividade enzimática
específica da CcXynB2 quando em contato com diferentes concentrações de arabinose (a), glicose (b), xilose
(c) e pectina (d). Em todos os gráficos é mostrado o controle positivo em linha tracejada, ou seja, enzima pura
na ausência completa de composto inibidor/potencializador. As barras verticais indicam os desvios padrões.

24

Fig. 5 Efeito dos ácidos acético, fórmico, cumárico e ferúlico na atividade da CcXynB2. Atividade enzimática
específica da CcXynB2 quando em contato com diferentes concentrações de ácido acético (a), ácido fórmico
(b), ácido cumárico (c) e ácido ferúlico (d). Em todos os gráficos é mostrado o controle positivo em linha
tracejada, ou seja, enzima pura na ausência completa de composto inibidor/potencializador. As barras
verticais indicam os desvios padrões.

30

Fig. 6 Fig. 6 Efeito de vários compostos combinados na atividade da CcXynB2. (a) Atividade enzimática 31 32 específica da CcXynB2 quando em contato os diferentes compostos combinados: etanol, fenol, 33 hidroximetilfurfural, arabinose, glicose, xilose, pectina, ácido acético, ácido fórmico, ácido cumárico e ácido 34 ferúlico nas concentrações de 1 a 50 mM. (b) Atividade enzimática específica relativa da CcXynB2 submetida a incubação com os diferentes compostos, na concentração em que cada um permitiu a detecção da melhor 35 36 atividade enzimática em pré-ensaios. Desta forma, CcxynB2 foi incubada com todos os compostos 37 combinados, sendo etanol, fenol, hidroximetilfurfural, ácido ferúlico, arabinose, glicose, xilose e pectina a 38 200 mM, ácido acético a 10 mM, ácido cumárico a 30 mM e ácido fórmico a 50 mM. Nos dois gráficos é 39 mostrado o controle positivo em linha tracejada, ou seja, a enzima pura na ausência completa de compostos 40 inibidores/potencializadores. As barras verticais indicam os desvios padrões.

1	Fig. 7 Hidrólise enzimática de hemicelulose obtida do sabugo de milho com a β -xilosidase II nas temperaturas
2	de 37°C (a) e 50°C (b), e atividade da CcXynB2 (c) após hidrólise enzimática da hemicelulose do sabugo de
3	milho pré-tratado. As barras verticais indicam os desvios padrões.
4	
5	Fig.8 Estabilidade térmica da β -xilosidase II imobilizada e não imobilizada. A atividade da CcXynB2
6	imobilizada e não imobilizada foi avaliada em duas temperaturas, 37 e 50°C, por 5 h de incubação.
7	
8	Fig. 9 Estabilidade da CcXynB2 imobilizada após 30 dias de congelamento. Análise da atividade da
9	CcXynB2 imobilizada e não imobilizada em 1 e 30 dias após congelamento.
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	
20	
28	
29	
30	
31	
32	
33	
34	
35	
36	
37	
38	
39 40	



Fig. 1 Etapas de purificação da CcXynB2. SDS-PAGE mostrando os passos de purificação da proteína: (1) Marcador Protein ladder (Promega); (2) Alíquota de 5 μ L do precipitado e (3) sobrenadante de células de *E. coli* DH10B contendo a construção pPROeX-hta/*xynB2* induzidas com IPTG 1 mM após a lise celular (4-6) Alíquotas de 5 μ L da proteína recombinante eluída da coluna de Ni-Sepharose com 500 μ L de tampão fosfato de sódio 20 mM contendo imidazol 500 mM em três etapas subsequentes. Apenas as frações 5 e 6 foram utilizadas para caracterizações enzimáticas subsequentes.



Fig. 2 Influência de diferentes concentrações de KCl na atividade enzimática da CcXynB2. A enzima foi incubada na ausência e presença de diferentes concentrações de KCl. A atividade enzimática foi expressa em unidades enzimáticas por mL (U mL⁻¹). As barras verticais indicam os desvios padrões.



Fig. 3 Efeito do etanol, fenol e hidroximetilfurfural na atividade da β -xilosidase II. Atividade enzimática específica da CcXynB2 quando em contato com diferentes concentrações de etanol (a), fenol (b) e hidroximetilfurfural (c). Em todos os gráficos é mostrado o controle positivo em linha tracejada, ou seja, a enzima pura na ausência completa de composto inibidor, apenas incubada ao seu substrato específico ρ NPX. As barras verticais indicam os desvios padrões das médias dos resultados obtidos.



Fig. 4 Efeito da arabinose, glicose, xilose e pectina na atividade da CcXynB2. Atividade enzimática específica da CcXynB2 quando em contato com diferentes concentrações de arabinose (a), glicose (b), xilose (c) e pectina (d). Em todos os gráficos é mostrado o controle positivo em linha tracejada, ou seja, enzima pura na ausência completa de composto inibidor/potencializador. As barras verticais indicam os desvios padrões.



Fig. 5 Efeito dos ácidos acético, fórmico, cumárico e ferúlico na atividade da CcXynB2. Atividade enzimática específica da CcXynB2 quando em contato com diferentes concentrações de ácido acético (a), ácido fórmico (b), ácido cumárico (c) e ácido ferúlico (d). Em todos os gráficos é mostrado o controle positivo em linha tracejada, ou seja, enzima pura na ausência completa de composto inibidor/potencializador. As barras verticais indicam os desvios padrões.



Fig. 6 Efeito de vários compostos combinados na atividade da CcXynB2. (a) Atividade enzimática específica da CcXynB2 quando em contato os diferentes compostos combinados: etanol, fenol, hidroximetilfurfural, arabinose, glicose, xilose, pectina, ácido acético, ácido fórmico, ácido cumárico e ácido ferúlico nas concentrações de 1 a 50 mM. (b) Atividade enzimática específica relativa da CcXynB2 submetida a incubação com os diferentes compostos, na concentração em que cada um permitiu a detecção da melhor atividade enzimática em pré-ensaios. Desta forma, CcxynB2 foi incubada com todos os compostos combinados, sendo etanol, fenol, hidroximetilfurfural, ácido ferúlico, arabinose, glicose, xilose e pectina a 200 mM, ácido acético a 10 mM, ácido cumárico a 30 mM e ácido fórmico a 50 mM. Nos dois gráficos é mostrado o controle positivo em linha tracejada, ou seja, a enzima pura na ausência completa de compostos inibidores/potencializadores. As barras verticais indicam os desvios padrões.



Fig. 7 Hidrólise enzimática de hemicelulose obtida do sabugo de milho com a β xilosidase II nas temperaturas de 37°C (a) e 50°C (b), e atividade da CcXynB2 (c) após hidrólise enzimática da hemicelulose do sabugo de milho pré-tratado. As barras verticais indicam os desvios padrões.





Fig. 8 Estabilidade térmica da β -xilosidase II imobilizada e não imobilizada. A atividade da CcXynB2 imobilizada e não imobilizada foi avaliada em duas temperaturas, 37 e 50°C, por 5 h de incubação.



Fig. 9 Estabilidade da CcXynB2 imobilizada após 30 dias de congelamento. Análise da atividade da CcXynB2 imobilizada e não imobilizada em 1 e 30 dias após congelamento.

	Atividade enzimática relativa (%)			
Substância (2 mM)	50 ºC	37 ºC		
Controle	100±0,10	100±0,01		
$(NH_4)_2SO_4$	63±0,14	71±0,02		
HgCl	48±0,90	39±0,03		
MgSO ₄	24±0,40	16±0,01		
BaCl ₂	26±0,10	20±0,03		
NH₄CI	23±0,30	17±0,03		
lodoacetamida	23±0,20	36±0,04		
CuCl	41±0.30			
$AI_2(SO_4)_3$	36±0,40	57±0,11		
MnSO ₄	77±0,04	74±0,02		
FeSO ₄	47±0,30	65±0,01		
SnCl ₂	44±0,02	41±0,07		
KCI	132±0,19	135±0,01		
NaCl	25±0,20	32±0,01		
CaCl ₂	31±0,70	14±0,02		
CuSO ₄	23±0,03	27±0,01		
ZnSO ₄	47±0,06	48±0,03		
EDTA	23±0,03	19±0,03		
DTT	23±0,03	18±0,01		
β-Mercaptoetanol	65±0,07	52±0,07		
Fonte	Corrêa et al. 2012	Este trabalho		
MgCl ₂	90±0,10	84±0,05		
EGTA	133±0,01	106±0,05		
MgCl ₂ +EDTA	106±0,12	101±0,01		
CaCl ₂ +EGTA	116±0,01	102±0,04		
Fonte	Este trabalho	Este trabalho		

Tabela 1- Efeito de íons e diferentes compostos na atividadeenzimática da CcXynB2.

	β-xilosidase II			
Parâmetros cinéticos	Controle	KCI 5 mM		
Vmax (µmoles min ⁻¹ mg ⁻¹)	402	479		
Km (mM)	9,3	11,3		
Kcat (s ⁻¹)	402	479		
Kcat/Km (mM ⁻¹ s ⁻¹)	43,3	42,4		
Fonte	Corrêa <i>et al</i> . 2012	Este trabalho		

Tabela 2 – Efeito do KCI nos parâmetros cinéticos da CcXynB2 a 55°C.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Em conclusão, pode-se considerar que CcXynB2 corresponde a uma enzima com elevado potencial para o uso em processos sacarificação e fermentação simultânea (SSF) pois, apesar de ter sua atividade ótima em 55°C com maior estabilidade a 50°C, ao ser testada na temperatura de fermentação de 37°C, a enzima apresentou uma excelente atividade específica, e quando em contato com produtos potencialmente inibidores que são produzidos tanto no processo de hidrólise quanto na fermentação, a enzima foi bastante tolerante e até apresentou incrementos consideráveis em sua atividade com alguns dos compostos.

Os resultados aqui evidenciados forneceram informações fundamentais para aprimorar o uso da CcXynB2 e contribuir para possíveis aplicações da enzima em processos SSF visando à produção de etanol celulósico ou até mesmo para compor coquetéis enzimáticos envolvidos com a degradação da biomassa em processos industriais diversos, pela sua tolerância a diferentes temperaturas, estabilidade e alta atividade na presença de diferentes inibidores do processo fermentativo e dos produtos da sacarificação, auxiliando, assim, na liberação de açúcares fermentáveis. Segundo nosso conhecimento, é a primeira vez que é relatado na literatura uma β -xilosidase bacteriana resistente a tantos compostos inibitórios em elevadas concentrações.

Além de ser muito mais estável quando imobilizada, CcXynB2 também mostrou potencial para aplicação principalmente na bioconversão da hemicelulose quando adicionada a uma mistura de celulases, completando a sacarificação da biomassa lignocelulósica de maneira mais eficiente.

Neste trabalho, foi apresentada, também, uma revisão bibliográfica descrevendo todas as etapas envolvidas no processo de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, além de descrever sobre o micro-organismo em estudo, *C. crescentus*, e trazer informações a cerca da imobilização enzimática, uma técnica tão importante empregada atualmente.

<u>ANEXOS</u>

ANEXO I - RESOLUÇÃO Nº 02/2015 PCF-UNIOESTE DE 18 DE SETEMBRO DE 2015 ANEXO II – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

ANEXO I - RESOLUÇÃO Nº 02/2015 PCF-UNIOESTE DE 18 DE SETEMBRO DE 2015





RESOLUÇÃO Nº 02/2015 PCF-UNIOESTE DE 18 DE SETEMBRO DE 2015.

DEFINE NORMAS GERAIS PARA ELABORAÇÃO DE PROJETOS DE QUALIFICAÇÃO, DE DISSERTAÇÕES E DE TESES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE.

O Colegiado do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas da UNIOESTE (PCF-UNIOESTE) deliberou, em reunião ordinária realizada no dia 18 de setembro do ano de 2015 (Ata n° 10/2015-PCF/UNIOESTE) e a Coordenadora do Programa, no uso de suas atribuições estatutárias e regimentais;

RESOLVE:

Art. 1º Aprovar a Resolução n°02/2015 PCF-UNIOESTE e seu anexo, que define as Normas para credenciamento, descredenciamento e permanência de docentes no Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas (PCF-UNIOESTE).

Art. 2º Esta Resolução entra em vigor nesta data.

Cascavel, 18 de setembro de 2015.

Prof^a. Dr^a. Luciana Oliveira de Fariña Coordenadora do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas PCF-UNIOESTE - Portaria nº 1512/2015-GRE

ANEXO I - RESOLUÇÃO Nº 02/2015 PCF-UNIOESTE

NORMAS GERAIS PARA ELABORAÇÃO DE PROJETOS DE QUALIFICAÇÃO, DE DISSERTAÇÕES E DE TESES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE

CAPÍTULO I

DOS PROJETOS DE PESQUISA (QUALIFICAÇÃO)

Art. 1º Os ante-projetos de pesquisa eventualmente necessários para ingresso no Programa não são contemplados nessa Resolução.

Art. 2º Os Projetos de Qualificação caracterizam-se como propostas de Dissertações ou Teses e devem seguir as normas de redação da forma de monografia ou artigo científico, que são apresentadas a seguir:

§1º Elementos pré-textuais:

- 1 Capa: conter nome da UNIOESTE, *Campus*, Centro e do Programa, título, nome completo do candidato, local e data.
- 2 Página de rosto: conter nome completo do candidato, título do projeto de pesquisa referente à dissertação ou tese, texto acadêmico referente ao programa e área de concentração, nome do orientador e co-orientador(es), local e data.
- 3 Biografia resumida
- 4 Título, resumo e palavras-chave
- 5 Título em inglês, abstract e key-words
- 6 Sumário
- 7 Lista de Tabelas
- 8 Lista de Figuras
- 9 Lista de Símbolos e Abreviaturas (facultativa)

§2º - Elementos textuais:

- 1 Introdução
- 2 Objetivos, separados em geral e específicos
- 3 Revisão bibliográfica
- 4 Material e Métodos
- 5 Resultados parciais
- 6 Referências
- 7 Cronograma de Atividades (apresentar as etapas e datas de realização)
- 8 Contribuições esperadas (destacar as principais contribuições científicas, sociais, econômicas, ambientais e de inovação tecnológica do projeto).
- 9 Infra-estrutura necessária (listar os principais equipamentos e material de consumo que serão necessários para o desenvolvimento do projeto).

CAPÍTULO II DA DISSERTAÇÃO E TESE NA FORMA DE MONOGRAFIA

Art. 4º A dissertação ou tese apresentada na forma de monografia deve seguir as normas de redação apresentadas a seguir, sempre com espaçamento simples:

§ 1º Elementos pré-textuais:

1- Capa: conter nome da UNIOESTE, *Campus*, Centro e do Programa, título, nome completo do candidato, local e data.

2- Página de rosto: conter nome completo do candidato, título da dissertação ou tese, texto acadêmico referente ao programa e área de concentração, nome do orientador e co-orientador(es), local e data.

3- Ficha catalográfica/Nomes de revisores: deve ser obtida na biblioteca da UNIOESTE/CASCAVEL e apresentada no verso da página de rosto. Como nota de rodapé nesta página deve

apresentar nomes dos revisores e datas das revisões de português, inglês e de normas de monografias do PCF.

4- Página de aprovação: conter nome completo do candidato, título da dissertação ou tese, texto acadêmico, nome do orientador e nome e assinatura de aprovação de cada membro da banca avaliadora, texto de aprovação, local e data.

5- Biografia resumida: deve conter ano de nascimento, naturalidade, cursos de graduação, pós-graduações e respectivas instituições e anos de conclusão, vínculos empregatícios anteriores e atuais, e outras experiências profissionais e pessoais pertinente à formação.

6- Citações: espaço que o candidato pode citar textos fundamentais à sua formação durante sua jornada no programa. Ressalta-se que os textos devem sempre expressar mensagens positivas e coerentes com um trabalho científico.

7- **Dedicatória**: espaço que o candidato possa dedicar o trabalho às pessoas que realmente contribuíram para sua formação pessoal e profissional.

8- Agradecimentos: sempre apresentar agradecimentos às pessoas e principalmente aos órgãos oficiais de apoio, como CNPq, CAPES, FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA, ITAIPU/PTI, PCF, UNIOESTE e empresas do setor público e privado que contribuíram com o trabalho, entre outros.

9- Título: Título em português com máximo de 20 palavras, incluído antes do resumo.

10- **Resumo e palavras-chave**: no máximo 4000 caracteres. Deve conter introdução, objetivos, metodologia, resultados e conclusões. Não usar diagramas, ilustrações, expoentes e citações bibliográficas. As palavras-chave são citadas logo após o resumo, sendo no mínimo três e no máximo seis, não constantes no título.

11- Título em inglês, abstract e key-words: deve ser versão em inglês, o mais fiel possível ao resumo. O sistema numérico deve ser o inglês, ou seja, a casa decimal dos números deve ser indicada por ponto ao invés de vírgula. A casa de milhar dos números deve ser indicada por vírgula ao invés de ponto. Titulo em inglês com tradução fiel ao título em português, deve vir antes do abstract. Key-words citadas logo após o abstract devem ter tradução fiel das palavras chave em português.

12- Sumário: todos os itens que aparecem após o sumário devem ser citados com respectiva numeração de página, em algarismos arábicos. Anteriormente ao sumário deve ser usada numeração em algarismos romanos.

13- Lista de Tabelas: todas as tabelas citadas no texto e nos anexos devem constar com respectiva numeração de página.

14- Lista de Figuras: todas as figuras citadas no texto e nos anexos devem constar com respectiva numeração de página.

15- Lista de símbolos e abreviaturas: citar todos os símbolos, unidades e abreviaturas no texto e anexo com respectiva descrição. Destaca-se que esse item é facultativo.

§ 2º Elementos textuais:

1- **Introdução**: destacar a relevância, originalidade, aplicabilidade da pesquisa desenvolvida, em no máximo duas páginas. Não devem constar, na introdução, equações, tabelas, figuras nem texto teórico básico sobre determinado assunto. A introdução deve ser escrita, sem citações bibliográficas.

2- Objetivo Geral e Objetivos específicos: claros, concisos e coerentes com o título do trabalho.

3- **Revisão bibliográfica**: deve-se usar, preferencialmente, artigos científicos que tratam especificamente do assunto proposto, oriundos de periódicos com impacto internacional e nacional (indexados no ISI, JCR e Scielo por exemplo). Quando o assunto desenvolvido for incipiente, a revisão pode apresentar textos clássicos oriundos de livros, artigos técnicos, boletins entre outros visando à apresentação e relevância do tema abordado. Assim, recomenda-se que no mínimo 70% da revisão seja oriunda de

periódicos e dentre esses 40% devem ser dos últimos cinco anos. Eliminar ou evitar ao máximo o uso de citações "apud" ou "citado por", ou seja, as citações deverão ser apenas das referências originais. Toda citação de autores no corpo da monografia deve seguir a ABNT.

4- **Material e Métodos**: deve conter informações imprescindíveis que possibilitem a repetição da pesquisa, por outros pesquisadores. Detalhando o local de realização do experimento e principalmente os métodos científicos empregados.

5- **Resultados e Discussão**: Cada resultado deve ser apresentado, interpretado, comparado obrigatoriamente com as informações descritas na revisão, para então o autor apresentar sua "impressão pessoal", justificando respectivo resultado e já indicando possíveis conclusões. Os resultados expressos em tabelas não devem ser novamente apresentados em figuras, ou vice-versa.

6- **Conclusões**: devem ser escritas de forma sucinta, isto é, sem comentários nem explicações adicionais, baseando-se apenas nos resultados apresentados, tendo como referência os objetivos propostos. Destaca-se que as conclusões não são resumo dos resultados encontrados.

7- **Considerações Finais**: Recomenda-se que limitações provocadas por problemas metodológicos deverão ser apresentadas como sugestões para novos trabalhos dentro deste item.

8- **Referências**: as bibliografias citadas no texto deverão ser dispostas, em lista, em ordem alfabética pelo último sobrenome do primeiro autor, seguido das iniciais dos nomes, e em ordem cronológica crescente, e conter todos os autores. Recomenda-se que as referências usadas sejam atuais e retiradas de periódicos de impacto científico (indexados no ISI, JCR e Scielo ou A1, A2 e B1, por exemplo). Também é recomendado usar artigos dos grupos de pesquisa vinculados ao PCF que possam contribuir com o respectivo trabalho. Usar normas atuais da ABNT como normas das referências bibliográficas. Entretanto, deve-se manter os nomes de todos os autores do artigo citado. (Sugere-se uso do mecanismo online de referências http://www.rexlab.ufsc.br:8080/more/#).

9- **Anexos**: devem ser usados apenas quando extremamente necessários. Os anexos devem conter Figuras e Tabelas com numeração própria, e citados no corpo da monografia.

Edição do texto

1. **Texto:** fonte **Arial tamanho 12**. Não deverão existir no texto palavras em negrito nem em itálico, exceto para nomes científicos de espécies vegetais e animais, que deverão ser em itálico. Em equações, tabelas e figuras deve-se usar fonte **Arial Tamanho 10** e não deverão existir itálico e negrito. Para cabeçalho e Rodapé deverá se usar fonte **Arial Tamanho 08**. Evitar parágrafos muito longos, devendo, preferencialmente, ter no máximo 60 palavras. Todas as letras de uma sigla devem ser maiúsculas; já o nome por extenso de uma instituição deve ter maiúscula apenas a primeira letra de cada palavra.

2. **Espaçamentos:** nos títulos e demais textos da capa da dissertação ou tese. Espaço simples no texto da página de rosto que indica a dissertação ou tese como requisito obrigatório. Espaço simples no texto do resumo e palavras-chave; e do abstract e key-words. Para Figuras e Tabelas deve-se usar espaçamento simples. Para as Referências bibliográficas deve-se usar espaço simples, tendo um espaço a mais entre cada referência. Deve-se usar espaço um e meio no restante do texto considerando-se as exceções citadas anteriormente.

3. **Numeração**: a numeração deve ser em fonte Arial tamanho 11 sem pontuação e alinhadas à direita da margem superior da página. Os elementos pré textuais são numerados com algarismos romanos minúsculos (i, ii, iii...) contados a partir da página de aprovação, sendo esta não numerada; sendo apresentados na parte inferior da página e centralizados.

4. Parágrafo: em todo o texto usar 1,25 cm.

5. **Página**: Papel A4, orientação retrato, margens superior, inferior e direita de 2,0 cm e esquerda de 3,00 cm. Posição paisagem pode ser usada quando necessário, porém deve-se manter padrão de continuidade referente às margens e numeração anteriores.

6. **Títulos**: todos os títulos dos itens dos elementos pré-textuais devem ser em letras maiúsculas, em negrito e centralizado. Todos os títulos dos itens dos elementos textuais (dissertação ou tese) devem ser em letras maiúsculas, em negrito e alinhados à esquerda. Os sub-itens dos elementos textuais devem ser alinhados a esquerda, em negrito e somente a primeira letra maiúscula.

7. Notações, citações e grandezas: As grandezas devem ser expressas no SI (Sistema Internacional) e a terminologia científica deve seguir as convenções internacionais de cada área em questão. Nos exemplos seguintes de citações no texto de valores numéricos, o formato correto é o que se encontra ao lado direito da igualdade:

a) 10 horas = 10 h; 32 minutos = 32 min; 5 litros = 5 L; 45 mililitros = 45 mL; litros por segundo = L s-1; graus Celsius = 27 oC; 0,14 m3/min/m = 0,14 m3 min-1 m-1; 100 g de peso/indivíduo = 100 g de peso por indivíduo; 2 toneladas = 2 t; milímetros por dia = mm d-1; $2x3 = 2 \times 3$ (deve ser separado); 45,2 - 61,5 = 45,2-61,5 (deve ser junto).

- b) O símbolo porcentagem (ou percentagem) % é a única unidade que deve estar junto ao número (45%).
- c) Quando no texto existirem valores numéricos seguidos, que possuem a mesma unidade, colocar a unidade somente no último valor (Exemplos: 20 m e 40 m = 20 e 40 m; 56,1%, 82,5% e 90,2% = 56,1, 82,5 e 90,2%).
- Quando pertinente, deixar os valores numéricos no texto, tabelas e figuras com no máximo duas casas decimais.

13. Tabelas, Figuras e Equações (gráficos, mapas, imagens, fotografias, desenhos):

a) As citações no texto e na respectiva legenda de equações, tabelas e figuras deve ter a primeira letra maiúscula e não ter hífen, nem ponto, nem dois pontos, separando do texto da legenda (ex: "Figura 1" ou "Tabela 1" ou "Equação 1"). Os títulos de tabelas devem estar acima da tabela. Os títulos de figuras devem estar abaixo da figura. (ex: Figura 1 Área experimental.)

b) Figuras e Tabelas devem ser inseridas logo abaixo do parágrafo na qual foram citadas pela primeira vez ou na página seguinte. Figuras agrupadas devem possuir indicador de diferenciação caracterizado por letra indicadora de cada sub-figura devendo ser minúscula, posicionada ao lado esquerdo superior da figura. As figuras agrupadas devem deverão possuir uma única legenda, porém devem ser citadas no texto, da seguinte forma: Figura 1a; Figura 1b; Figura 1c. As figuras não devem ter bordadura e suas curvas (no caso de gráficos) deverão ter espessura de 0,5 pt, preferencialmente usar cor preta e tons de cinza, mas sempre possuindo marcadores de legenda diversos. As unidades nos eixos das figuras devem estar entre parêntesis.

c) Na descrição dos parâmetros e variáveis de uma equação deverá haver um traço separando o símbolo de sua descrição. A numeração de uma equação deverá estar entre parêntesis e alinhada à direita: exemplo: Eq. (1). As equações deverão ser citadas no texto conforme os seguintes exemplos: Equação 1; Equações 3 e 4.

CAPÍTULO III DA DISSERTAÇÃO E TESE NO FORMATO MISTO

Art. 5º A dissertação ou tese apresentada no formato misto deve apresentar a revisão bibliográfica ou embasamento teórico e artigos na forma de capítulos, que devem seguir as normas apresentadas a seguir:

Elementos pré-textuais

1- Capa: conter nome da UNIOESTE, *Campus*, Centro e do Programa, título, nome completo do candidato, local e data.

2- Página de rosto: conter nome completo do candidato, título da dissertação ou tese, texto acadêmico referente ao programa e área de concentração, nome do orientador e co-orientador(es), local e data.

3- Ficha catalográfica/Nomes de revisores: deve ser obtida na biblioteca da UNIOESTE/CASCAVEL e apresentada no verso da página de rosto. Como nota de rodapé nesta página deve apresentar nomes dos revisores e datas das revisões de português, inglês e de normas de monografias do PCF.

4- Página de aprovação: conter nome completo do candidato, título da dissertação ou tese, texto acadêmico, nome do orientador e co-orientador(es), texto de aprovação, local e data.

5- **Biografia resumida**: deve conter ano de nascimento, naturalidade, cursos de graduação, pós-graduações e respectivas instituições e anos de conclusão, vínculos empregatícios anteriores e atuais, e outras experiências profissionais e pessoais pertinente à formação.

6- **Citações**: espaço que o candidato pode citar textos fundamentais à sua formação durante sua jornada no programa. Ressalta-se que os textos devem sempre expressar mensagens positivas e coerentes com um trabalho científico.

7- **Dedicatória**: espaço que o candidato possa dedicar o trabalho às pessoas que realmente contribuíram para sua formação pessoal e profissional.

8- Agradecimentos: sempre apresentar agradecimentos às pessoas e principalmente aos órgãos oficiais de apoio, como CNPq, CAPES, FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA, ITAIPU/PTI, PCF, UNIOESTE e empresas do setor público e privado que contribuíram com o trabalho, entre outros.

9- Sumário da dissertação: Cada capítulo deve ser incluído no Sumário. Todos os itens que aparecem após o Sumário devem ser citados com respectiva numeração de página, em algarismos arábicos. O texto da dissertação deve ter numeração de página em forma contínua, incluindo todos os Capítulos. Anteriormente ao Sumário deve ser usada numeração em algarismos romanos. No sumário deve constar ainda o título dos artigos com respectivo título do periódico e sua classificação QUALIS/CAPES nas Ciências Farmacêuticas.

10- Lista de Tabelas: todas as Tabelas citadas no texto completo e nos anexos devem constar com respectiva numeração de página.

11- Lista de Figuras: todas as Figuras citadas no texto e nos anexos devem constar com respectiva numeração de página.

12- Lista de Símbolos e Abreviaturas: citar todos os símbolos, unidades e abreviaturas no texto e anexo com respectiva descrição. Destaca-se que esse item é facultativo.

13- Estruturação do texto da dissertação formato misto: deverá compreender os seguintes

- a) Introdução (Geral) com Justificativa,
- b) Objetivos Gerais e Específicos,
- c) Fundamentação Teórica (Revisão de literatura),
- d) Referências bibliográficas da fundamentação teórica,
- e) Capítulo: Artigo original
- f) Conclusões gerais

itens:

- g) Considerações finais; e
- h) Anexos (se houver).

14.A Fundamentação Teórica deverá apresentar o texto conforme asa recomendações do formato de Monografia citado no Capítulo II.

15.O Artigo ou Artigos que constituirá(ão) o Capítulo deverá(ão) seguir as normas de publicação da Revista Científica escolhida, conforme acordado entre o discente e orientador. Os artigos deverão estar no idioma português, independente do idioma exigido pela Revista escolhida para publicação. As normas da Revista Científica escolhida deverão ser apresentadas como Anexo. Todos os itens do(s) artigo(s) deverão ser incluídos como: Título, Resumo, Palavras-chave, *Abstract, Key-words*, Introdução, Metodologia ou Materiais e/ou Métodos, Resultados e/ou Discussão, Conclusão, conforme exigência de cada Revista.

16.Todas as Referências deverão ser apresentadas em único item Referências Bibliográficas, sendo separadas em subtítulos de acordo com aquelas presentes na Fundamentação Teórica e aquelas por Artigo Científico. As primeiras devem seguir as normas da ABNT e as do artigo deverão seguir as normas exigidas pela Revista Científica.

§ 1º A edição dos textos dos artigos apresentados e dos itens 1 a 5, com exceção das normas referentes ao artigo, que deve seguir a orientação de cada publicação científica, deve seguir as recomendações da edição de texto da Forma de Monografia citadas no Capítulo II. Entretanto, citações, referências, tabelas, figuras e outros pontos específicos do periódico devem ser mantidos a respectiva regra da revista.

CAPÍTULO III FICHA DE AVALIAÇÃO OU "CHECK LIST" DA REVISÃO DE NORMAS DE DISSERTAÇÃO E TESE PARA USO OPCIONAL PELOS DISCENTES, DOCENTES E REVISORES DE NORMAS

Art. 6º Ficha de avaliação ou "check list" apresentada no Anexo II pode ser usada, opcionalmente, entre os discentes, docentes e revisores, na revisão de normas da apresentação final de Dissertação ou Tese.

ANEXO II

FICHA DE AVALIAÇÃO OU "CHECK LIST" DA REVISÃO DE NORMAS DE DISSERTAÇÃO E TESE

1. IDENTIFICAÇÃO:		
Nome do discente:	Título resumido:	
Nome do orientador:	Nome do revisor de normas	

2. ITENS A SEREM ANALISADOS		Discente			Revisor		
	S	N	+-	S	Ν	+-	
1. A Fonte do texto é Arial 12?							
2. A Fonte do corpo das tabelas, das figuras é Arial 10? E dos rodapés é Arial 08?							
3. Os títulos dos itens dos elementos pré-textuais estão em letras maiúsculas, negrito e centralizado?							
4. Todos os títulos dos itens dos elementos textuais estão em letras maiúsculas, negrito e alinhados à esquerda?							
5. Os sub-itens dos elementos textuais estão alinhados a esquerda, em negrito e somente a primeira letra maiúscula?							
6. Os nomes científicos de espécies vegetais e animais estão em itálico?							
7. O espaçamento do texto é 1,25 cm? O espaço duplo foi usado apenas nos títulos e demais textos da capa do projeto de pesquisa?							
8. O espaço simples foi usado no texto de capa, resumo, palavras-chave, abstract e key-words; tabelas, notas de rodapé, notas de fim de texto, títulos e subtítulos com mais de uma linha, legendas de tabelas e figuras; e nas referências, mas tendo um espaço a mais entre as mesmas?							
9. As margens superior, Inferior, direita possuem 2,0cm; e esquerda possui 3,0cm?							
10. Todo parágrafo é iniciado a 1,50cm, a partir da margem esquerda?							
11. A numeração das páginas do texto está em fonte Arial tamanho 11 sem pontuação e alinhadas à direita da margem superior da página.							
12. A numeração das páginas pré-textuais está em algarismos romanos minúsculos (i, ii, iii) contados a partir da página de aprovação, sendo esta não numerada: apresentados na parte inferior da página e centralizados?							
13. Todas as páginas onde há texto, tabela(s) ou figura(s) estão numeradas?							
14. As Figuras e Tabelas estão inseridas logo abaixo do parágrafo na qual foram citadas pela primeira vez ou na página seguinte?							
15. As palavras "Tabela" e "Figura", estão com a inicial em maiúscula, sem hífen, nem ponto, nem dois pontos, separando do texto da legenda (ex: Figura 1 Área experimental.)?							
16. O resumo está em espaço simples, sem parágrafo inicial e escrito em parágrafo único?							
17. O abstract está em inglês, no formato do resumo, acompanhado de key words e com o título da Dissertação/Tese em inglês?							
18. Inexistem palavras coincidentes entre as "Palavras-chave" e o título do projeto de pesquisa?							
*19. Possui todos os elementos pré-textuais (Capa; Página de rosto; Ficha catalográfica/Como nota de rodapé os nomes dos revisores e datas das revisões de português, inglês e de normas de monografias do PCF; Página de aprovação; Biografia resumida; Citações; Dedicatória; Agradecimentos; Título, resumo e palavras- chave; Título em inglês, abstract e key-words; Sumário; Lista de Tabelas; Lista de Figuras; Lista de símbolos e abreviaturas (opcional)).							
*20. Possui todos os elementos textuais (Introdução; Objetivos (não existem específicos); Revisão bibliográfica; Material e Métodos; Resultados e discussão; Conclusões; Considerações finais; Referências; Anexos (opcional)).							
21. As citações de autores no texto estão de acordo com a atual norma da ABNT?							
22. Citação de citação ou "apud" foram evitadas?							

 As Referências estão de acordo com atual norma da ABNT; 	mas mantendo os sobrenomes e iniciais de		
todos os autores (ou seja evitou o uso de "et al." nas referência	s)? Incluiu local de publicação em todas as		
referências?			
**24. Nas referências. 70% são de artigos científicos orjundos de periódicos?			
**25 Nas referências 70% de todos os trabalhos usados são dos	últimos cinco anos?		
3 ASSINATURAS:			
Assingture de disconte:			
ssinatura do orientador: Assinatura do revisor de normas:			

¹ Na avaliação da dissertação/ tese a ficha é um instrumento, estrito e opcional entre o discente e o revisor de normas. Visto que o PCF exige do discente a declaração do revisor de normas atestando que foram cumpridas as normas de elaboração de monografias do PCF.
*Exigido para dissertação e tese. ** Item não exigido pelas normas do PCF, mas devido às atuais revistas científicas da área utilizarem como parâmetro, serve de observação ao discente e orientador.

Normas para publicação no periódico Applied Microbiology and Biotechnology (ISSN: 0175-7598 (Print) 1432-0614 (Online) – Qualis A2 na grande Farmácia Life Sciences - Microbiology | Applied Microbiology and Biotechnology - incl. option to publish open access

🙆 Springer

Springs

www.springer.com

 $Microbiology \quad \text{Home} \ > \ \text{Life Sciences} \ > \ \text{Microbiology}$

SUBDISCIPLINES JOURNALS BOOKS SERIES TEXTBOOKS REFERENCE WORKS



Applied Microbiology and Biotechnology

Editor-in-Chief: Alexander **Steinbüchel** ISSN: 0175-7598 (print version) ISSN: 1432-0614 (electronic version) Journal no. 253



151,50 € Personal Rate e-only

Online subscription, valid for one calendar year Immediate Content Access via SpringerLink 1 Volumes with 24 issues per year Subscription will auto-renew for another year unless duly terminated FAQ & Policy

ABOUT THIS JOURNAL EDITORIAL BOARD ETHICS & DISCLOSURES INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Instructions for Authors

Plagiarism prevention with CrossCheck

Springer is a participant of CrossCheck, a multi-publisher plagiarism detection initiative to screen published and submitted content for originality. CrossCheck consists of two products: a database of scholarly publications (CrossCheck) and a web-based tool (iThenticate) to check an authored work against that database.

This journal uses the plagiarism tool to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts and your manuscript may be screened upon submission for plagiarism against previously published works.

AUTHORSHIP POLICY

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
- Performed research

- Analyzed data
- · Contributed new methods or models
- · Wrote the paper

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s) A concise and informative title The affiliation(s) and address(es) of the author(s) The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- * Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- * Use the automatic page numbering function to number the pages.

- Do not use field functions.
- * Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- " Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

MANUSCRIPT PREPARATION

Please select a concise and informative title (composed of no more than 130 characters).

Preferred length of Original Papers is 6-8 printed pages. The indicated length includes figures, tables and references: one printed page corresponds to approximately 6,500 characters (9,000 characters in the sections "Materials and methods" and "References").

Manuscripts must be written in English and the complete text should be formatted in 1,5 line spacing.

Mini-Reviews on biotechnological products and processes or an apparatus and reactors used for biotechnological processes are welcome. They should provide a short historical outline of the development, extensively review the current state and conclude with an outline of trends and prospects for the future. For biotechnological products the competitiveness of the biotechnological process as compared to chemical processes or to processes, which rely on the isolation of the product from natural sources, should be provided. Applications and cost figures should be provided. Mini-reviews should contain a structural formula or a photograph of the

biotechnological product, an outline of the biosynthetic pathway, a scheme of the apparatus, plant or reactor or a flow scheme of the process. Authors are asked to contact the Editor-in-Chief before submitting a mini-review.

Please arrange your manuscript for Original Papers as follows:

Abstract

Each paper must be preceded by an abstract presenting the most important results and conclusions in no more than 250 words.

Footnotes

Essential footnotes to the text should be numbered consecutively and placed at the bottom of the page to which they refer.

Footnotes on the title page are not given reference symbols. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Introduction

The Introduction should state the purpose of the investigation and give a short review of the pertinent literature (max. one printed page).

Materials and methods

The Materials and methods section should follow the Introduction and should provide enough information to permit repetition of the experimental work.

The microorganisms used in the study and in particular new isolates must be deposited in a publicly accessible culture collection belonging to the WDCM (e.g. DSM, ATCC, NCIMB; see the below Link for a complete list of the WDCM culture collections which are all suitable). The authors must refer to the collection and the strain number in the text to ensure that the strains are available to other scientists. If nucleic acid or amino acid sequences are presented (this includes also optimized sequences of known genes), a GenBank/EMBL accession number for primary nucleotide and/or amino acid sequence data must be included in a separate paragraph at the end of the Materials and methods section. Huge sequencing datasets or raw data must also be deposited, e.g. as a NCBI BioProject (via the Link below).

For studies in proteomics, the minimum information about a proteomics experiment (MIAPE) of the HUPO proteomics standard initiative (see the Link below) and publication guidelines for the analysis and documentation of peptide and protein identifications by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology (at the below Link) must be followed up. One biological replicate will not be acceptable.

For X-ray crystallographic analyses of proteins (enzymes), the authors should obtain each PDB ID to one structure of protein from PDB (The Worldwide Protein Data Bank (wwPDB)) and add it to the manuscript just like as nucleotide accession numbers.

For commercial sources of used materials, the name of the company, town and country should be indicated.

Results

The Results section should describe the outcome of the study. Data should be presented as concisely as possible, if appropriate in the form of tables or figures, although very large tables should be avoided.
Discussion

The Discussion should be an interpretation of the results and their significance with reference to publications of other laboratories.

WDCM culture collections NCBI Bio Project HUPO proteomics standard initiative American Society for Biochemistry and Molecular Biology guidelines

SCIENTIFIC STYLE

All taxa names (species names, genus names, and names of higher categories) should be in italics.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses.

Multi-author papers must be cited in the text with "et al."; first author name is not sufficient; names of two-authors papers must both be given.

Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990). This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996). This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec 1993).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. Eur J Appl Physiol 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. J Mol Med. doi:10.1007/s001090000086

· Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN Website

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote Style

Please note:

All author names should be provided in the references of AMB-manuscripts!

Please do not use an EndNote Style abbreviating long author lists with "et al."!

TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- * Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- * Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- * Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.





Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Wariance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals. Figures should always be cited in text in consecutive numerical order. Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.). If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware) Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements) Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats. Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author. To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Resolution: 16:9 or 4:3 Maximum file size: 25 GB Minimum video duration: 1 sec Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended. If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables. Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4". Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in:

Edanz English editing for scientists

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer 推荐的编辑服务,使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于 审稿人理解文章的内容,通过对学术内容的判断来决定文章的取舍,而不会因为语言问题导致直 接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司,协商编辑事宜。

理文编辑

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている 方には、Edanz社をご紹介しています。サービス内容、料金および申込方法など、日本語によ る詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

エダンズグループジャパン

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및

신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

Edanz Editing Global

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling ("self-plagiarism")).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. "salami-publishing").
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.

Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author. If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest Research involving Human Participants and/or Animals Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- · Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- · Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

READ THIS JOURNAL ON SPRINGERLINK

View Open Access Articles Online First Articles

All volumes & issues

FOR AUTHORS AND EDITORS

2014 Impact Factor 3.337

Aims and Scope

Submit Online

Open Choice - Your Way to Open Access

Instructions for Authors

Author Academy: Training for Authors

SERVICES FOR THE JOURNAL

Contacts

Download Product Flyer

Shipping dates

Order back issues

Bulk Orders

Article Reprints

ALERTS FOR THIS JOURNAL

Get the table of contents of every new issue published in Applied Microbiology and Biotechnology.

Your E-Mail Address

SUBMIT

Please send me information on new Springer publications in Microbiology.

RELATED BOOKS - SERIES - JOURNALS



Journal

AMB Express

Editor» Editor-in-Chief: Alexander Steinbüchel

BACK NEXT

1/10