



ENZITEC 2016
XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática
Universidade de Caxias do Sul – UCS
17 à 20 de Julho de 2016

Produção de Oligossacarídeos sintetizados a partir de Enzimas, Aplicações e Efeitos Benéficos para a Saúde Humana

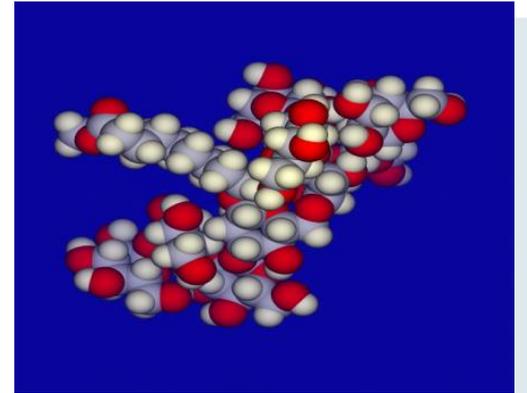


Profa. Dra. Rosana Goldbeck
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA
Laboratório de Engenharia Metabólica e Bioprocessos – LEMeB



Caxias-RS, 19 de Julho de 2016

Tópicos Abordados



- ✓ ***Oligossacarídeos***
- ✓ ***Propriedades Prebióticas***
- ✓ ***Prebiótico X Probiótico X Simbiótico***
- ✓ ***Benefícios dos Prebióticos e Probióticos***
- ✓ ***Síntese de Oligos (FOS, GOS, XOS) → via enzimática***
- ✓ ***Efeito Misturas Enzimáticas → Hidrólise Bagaço → XOS***

OLIGOSSACARÍDEOS:

- ✓ São carboidratos não convencionais, não digeríveis encontrados naturalmente em muitos alimentos como frutas, vegetais, leite e mel, e podem ser sintetizados por enzimas produzidas por várias espécies de micro-organismos, dentre eles, fungos, leveduras e bactérias.



OLIGOSSACARÍDEOS:

- ✓ São utilizados como Ingredientes Funcionais de alimentos, pois apresentam Propriedades Prebióticas:
 - estimulam a microbiota intestinal
 - contribuem p/ melhoramento da fisiologia do organismo humano



Prebióticos

Fator Bifidogênico

Saúde e
Bem-estar

Melhorar o Funcionamento do Intestino

- ✓ Apresentam grande potencial para melhorar a qualidade de muitos produtos alimentícios, além de serem empregados como adoçantes (baixa caloria) e estabilizantes (alto peso molecular → ↑ viscosidade).

OLIGOSSACARÍDEOS = PREBIÓTICOS

Ingredientes alimentares não digeríveis



Resistentes a digestão, absorção e adsorção (estômago / intestino delgado)



Fermentados somente no intestino grosso (bifidobactérias)



Estimulam seletivamente o desenvolvimento de microflora benéfica



Inibem a atividade de bactérias prejudiciais a saúde



Benefícios para a Saúde (↓ Riscos câncer de cólon)



Prebióticos X Probióticos



Prebióticos

Probióticos



Simbióticos

Prebióticos



Nutrientes que afetam benéficamente o organismo, estimulando seletivamente o crescimento de um número limitado de bactérias probióticas do trato intestinal, beneficiando a saúde.

Características de um Prebiótico:

- ✓ Ingrediente alimentar não digestível
 - ✓ Não hidrolisados nem absorvidos no intestino delgado
 - ✓ No intestino grosso são fonte de carbono para bactérias bífidas
- FATORES BIFIDOGÊNICOS

Probióticos



Micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos a saúde do indivíduo (Fuller, 1989 e Guarner, 2000).

Critérios para Seleção de Probióticos:

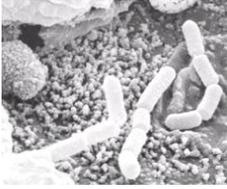
IV) o produto deverá conter número elevado de micro-organismos ($>10^7$ UFC/mL): resistir condições de processamento

Probióticos

I) resistência ao suco gástrico e à bile

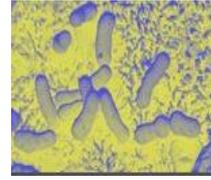
II) resistência à lisozima

III) capacidade de aderência à mucosa



Lactobacilos

- ✓ **Atuam no intestino delgado**
- ✓ Bastonetes, gram (+) não esporulados
- ✓ Fermentam lactose, homofermentativos: Ac. Láctico
- ✓ Sobrevivência pH 3,0 - 8,0 (6,3-6,6)
- ✓ Temperatura ótima 37 °C
- ✓ **Anaeróbios facultativos, Microaerofílicos**



Bifidobactérias

- ✓ **Atuam no intestino grosso - cólon**
80 % flora de crianças
- ✓ Bastonetes, gram(+), não esporuladas
- ✓ Fermentam lactose, heterofermentativos: Ac. Láctico e Ac. Acético
- ✓ Sobrevivência pH 5,1 - 8,0 (6,5-7,0)
- ✓ Temperatura ótima 37- 43 °C
- ✓ **Anaeróbios**

SIMBIÓTICOS



Probióticos + Prebióticos



São alimentos funcionais que em geral devem conter um componente prebiótico que favoreça o efeito do probiótico associado

Exemplos de Alimentos Simbióticos:

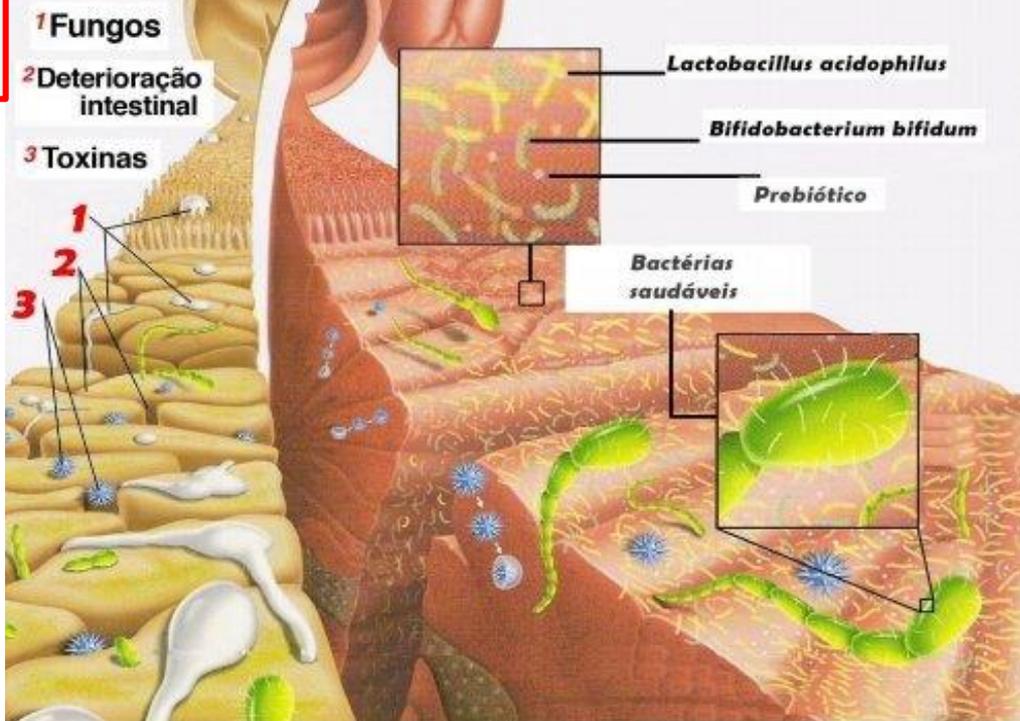
- ✓ Bifidobactérias com galacto-oligossacarídeos
- ✓ Bifidobactérias com fruto-oligossacarídeos
- ✓ Lactobacilos + Bifidobactéria + fruto-oligossacarídeos



Saúde do Intestino



Você é ...
O que vc
COME!!!



Alimentação
X
Microflora
Intestinal
X
Obesidade

Trato Intestinal



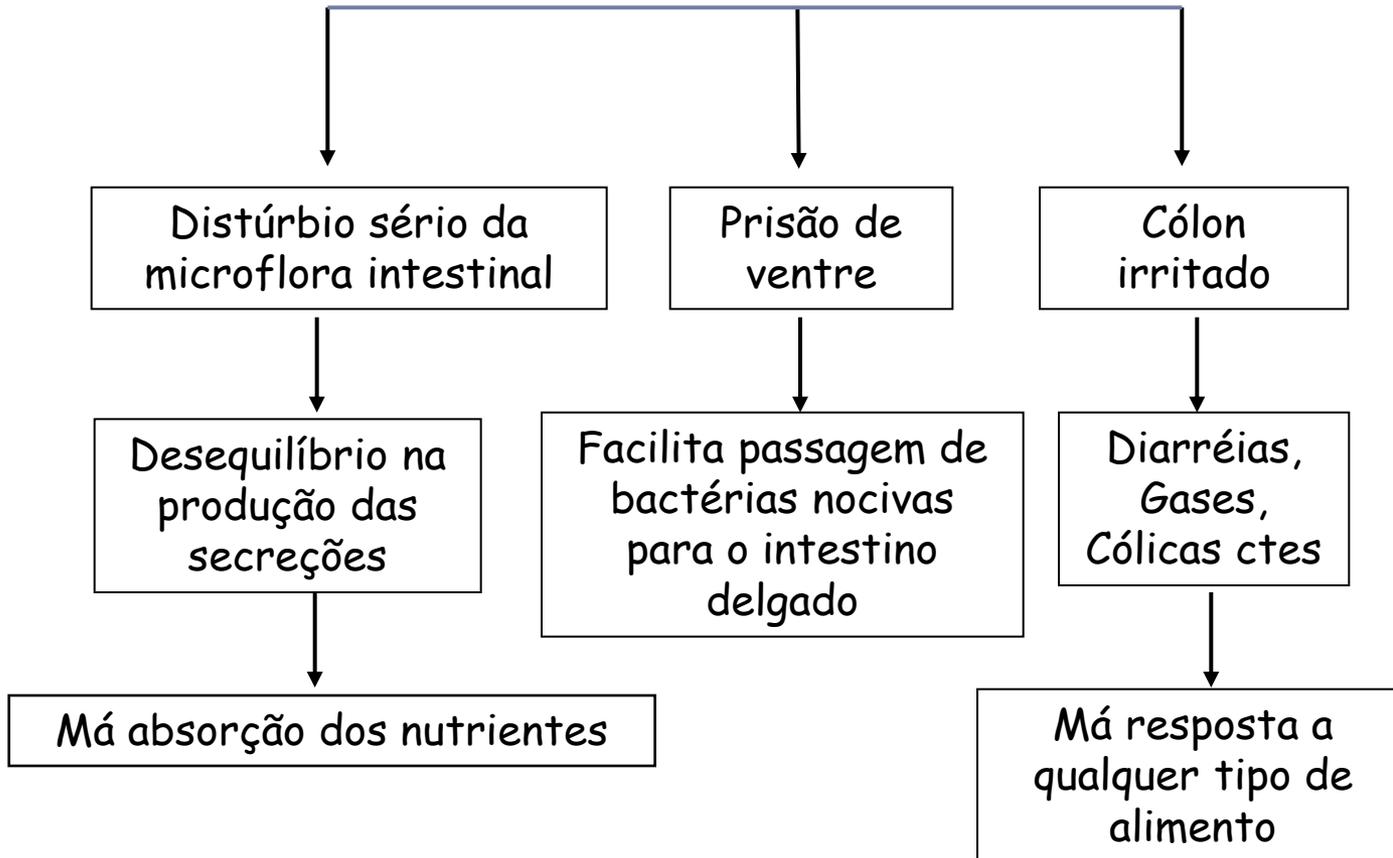
**100 trilhões de bactérias
mais de 400 espécies diferentes,
Natureza saprófita e patogênica,
vivem num delicado equilíbrio**

Problemas que afetam este equilíbrio:

- **Dieta alimentar (alimentos ricos em carboidratos, e gorduras)**
- **Uso excessivo de Remédios (Antibióticos, Anti-inflamatórios)**
- **Tabagismos e consumo de álcool**
- **Estresse**

DISBIOSE INTESTINAL: **desequilíbrio microflora trato intestinal**

DISBIOSE INTESTINAL

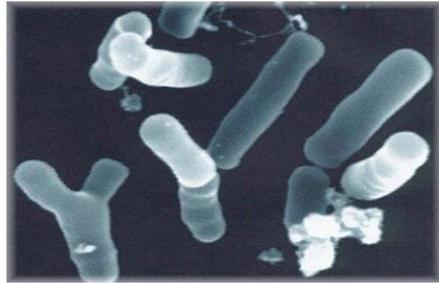


Sensação de Mal-Estar, Desconforto, Depressão

Resistentes a antibióticos

**Clostridium difficile* manda ao cérebro uma substância que inibe a síntese de serotonina

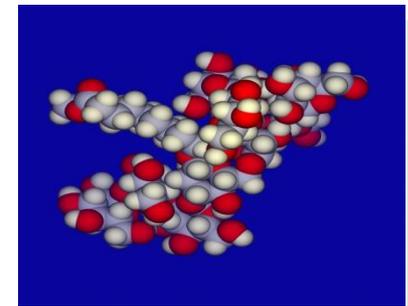
Benefícios dos Probióticos e Prebióticos



Benefícios dos Probióticos

- ✓ Apresenta efeito funcional benéfico no organismo, equilibrando a flora intestinal
- ✓ Inibe a presença de bactérias intestinais indesejáveis (patogênicos)
- ✓ Estimula o sistema imunológico
- ✓ Reduz de doenças infecciosas (diarréia)
- ✓ Potencial de degradação de substância carcinogênicas
- ✓ Apresenta efeitos nutricionais, ajuda na digestão da lactose
- ✓ Ajuda na diminuição do colesterol sanguíneo

- ✓ Fonte de carbono de baixa caloria
- ✓ Alimento para as bactérias bífidas
- ✓ Manutenção da microbiota intestina
- ✓ Aumento da absorção de minerais (Ca+)
- ✓ Diminuição do risco de câncer de cólon
- ✓ Melhoram trânsito intestinal (efeito fibra)

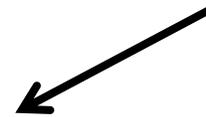


Benefícios dos Prebióticos

Importância de uma Microflora Equilibrada



Benefícios dos Próbióticos e Prébióticos

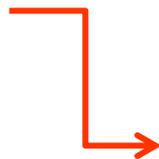


Oligossacarídeos

O que são Oligossacarídeos?

Qual sua estrutura?

Como são produzidos?

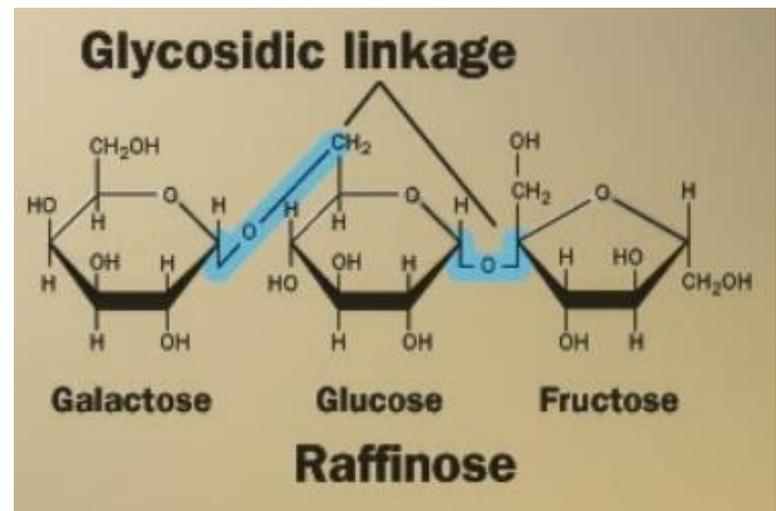
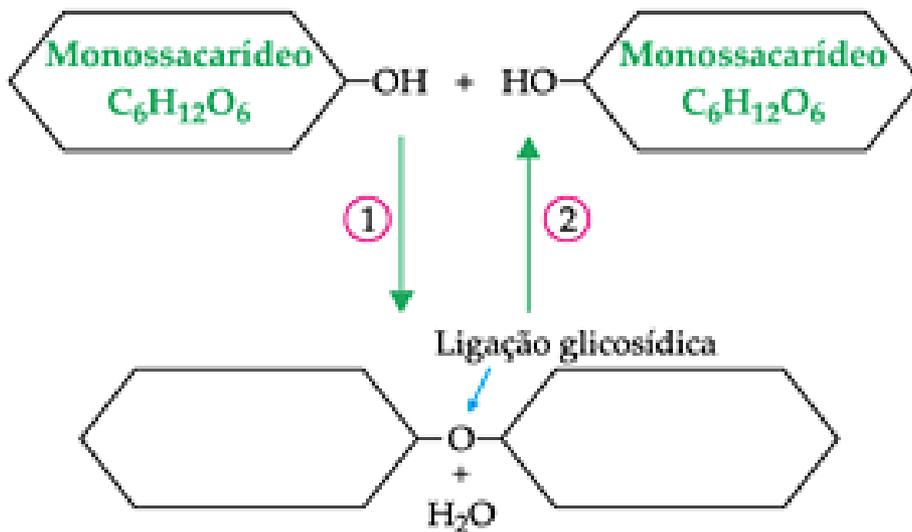


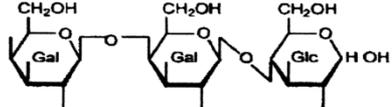
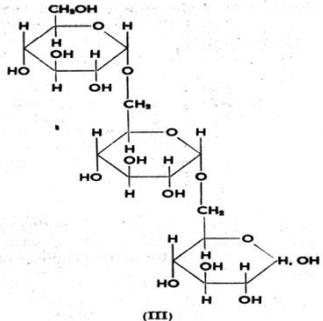
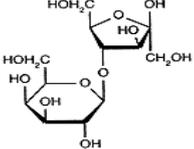
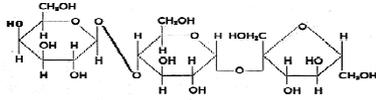
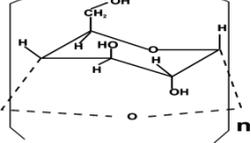
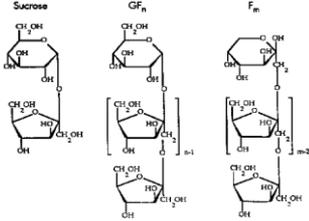
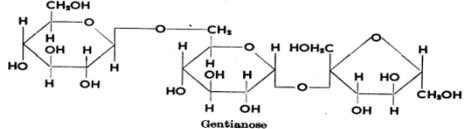
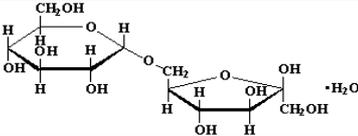
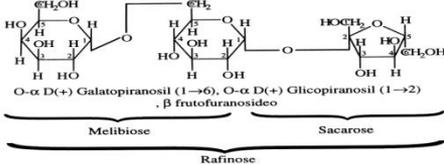
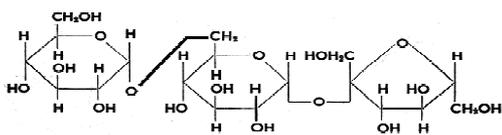
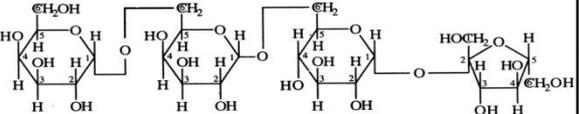
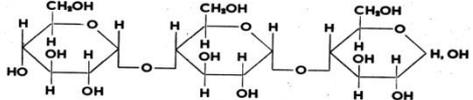
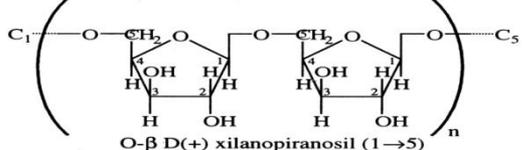
Via Enzimática



OLIGOSSACARÍDEOS:

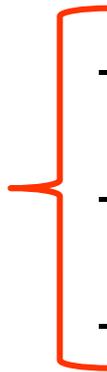
Os oligossacarídeos são compostos formados pela união de 2 até aproximadamente 10 unidades de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas.



OLIGOSSACARÍDEO	ESTRUTURA QUÍMICA		
Galacto - oligossacarídeos		Isomalto - oligossacarídeos	
Lactulose			(III)
Lactosacarose		Ciclodextrinas	
Fruto - oligossacarídeos		Gentio - oligossacarídeos	 <p><i>O-β-D-Glucopyranosyl-(1→6)-O-α-D-glucopyranosyl-(1→2) β-D-fructofuranoside</i> <i>O-β-D-Fructofuranosyl-(2→1)-O-α-D-glucopyranosyl-(6→1) β-D-glucopyranoside</i></p>
Palatinose (isomaltulose) oligossacarídeos		Oligossacarídeos da soja:	 <p><i>O-α D(+)-Galatipiranosil (1→6), O-α D(+)-Glicopiranosil (1→2) β frutofuranosídeo</i></p>
Glucosil - sacarose		Rafinose	 <p><i>O-α D(+)-Galatipiranosil (1→6), O-α D(+)-Galatipiranosil (1→6), O-α D(+)-Glicopiranosil (1→2) frutofuranosídeo.</i></p>
Malto - oligossacarídeos	 <p><i>O-α-D-Glucopyranosyl-(1→4)-O-α-D-glucopyranosyl-(1→4)-D-glucopyranose</i></p>	Xilo - oligossacarídeos	 <p><i>O-β D(+)-xilanopiranosil (1→5)</i></p>

OLIGOSSACARÍDEOS:

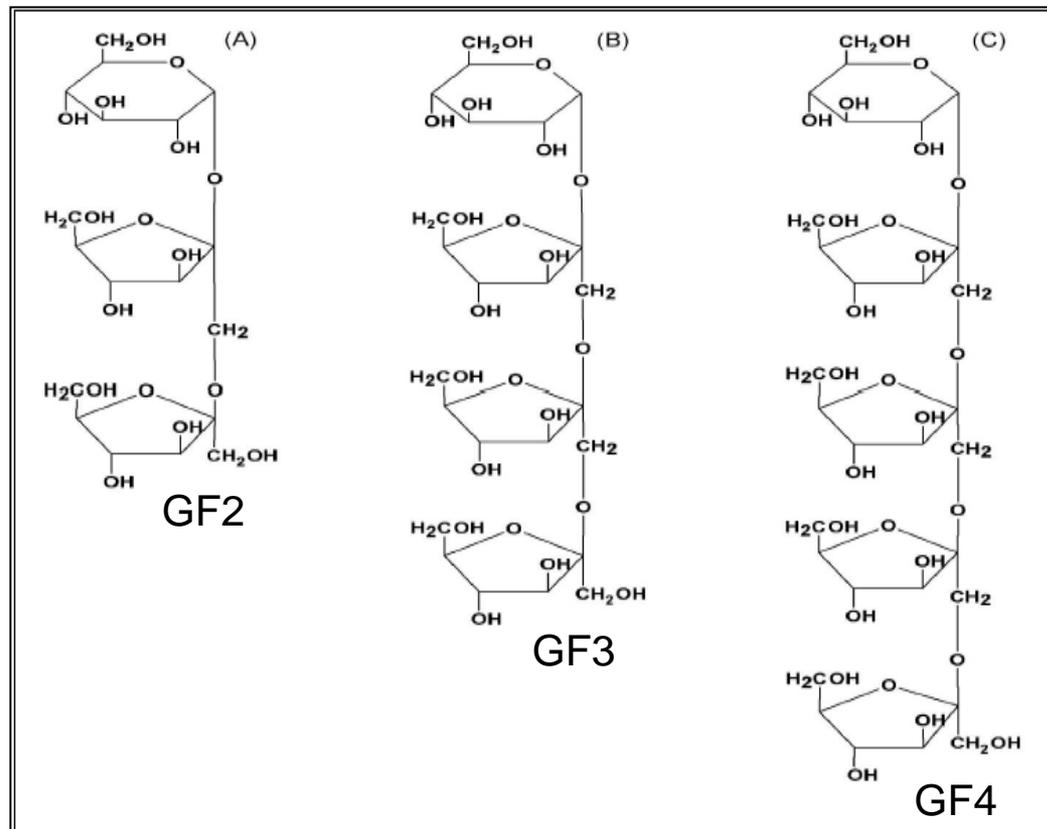
Dentre os oligos destacam-se:

- 
- Fruto-oligossacarídeos (FOS)
 - Galacto-oligossacarídeos (GOS)
 - Xilo-oligossacarídeos (XOS)

Atualmente a produção de XOS a partir de resíduos agroindustriais é um mercado que vem ganhado destaque, visto o baixo custo e a grande disponibilidade de biomassa vegetal (Biomassa Lignocelulósica).

FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS):

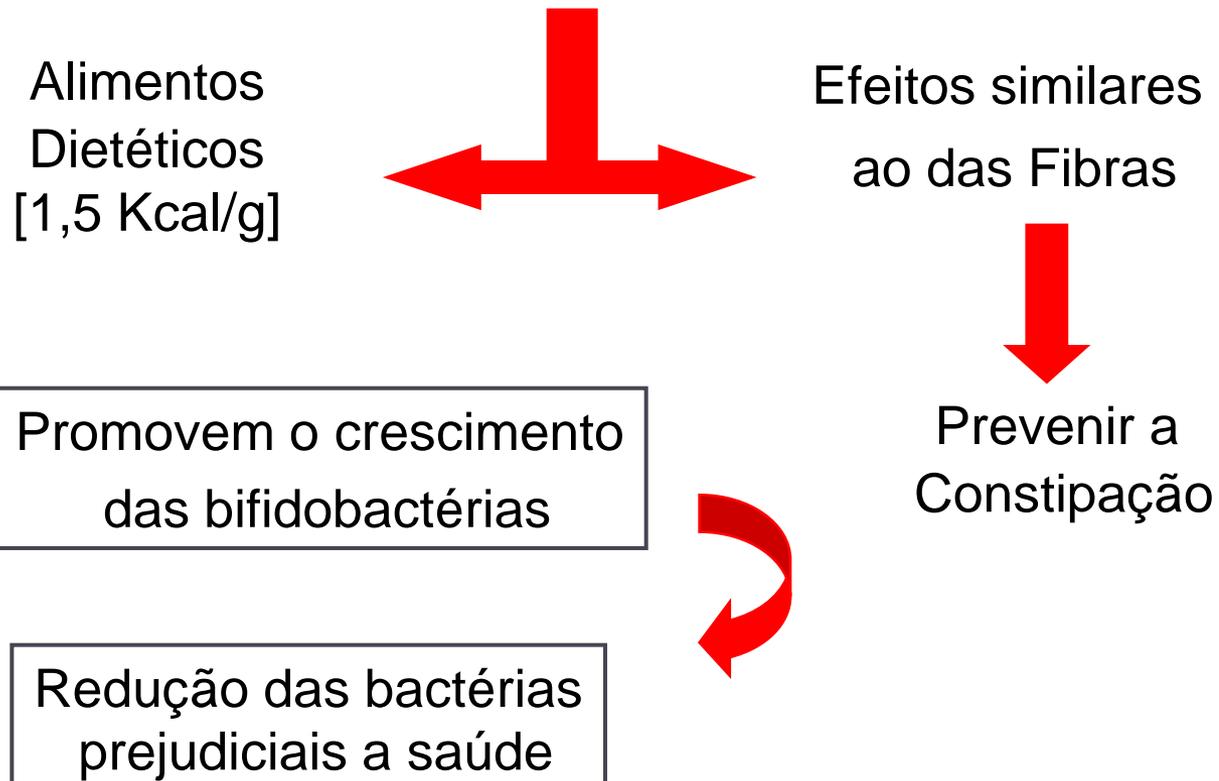
Fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos compostos por “n” grupos frutossil ligados em cadeia na posição β -2,1 possuindo uma glicose terminal. Os FOS mais conhecidos são: GF2 (1-kestose), GF3 (nistose) e GF4 (1F- β -frutofuranosil-nistose).



Fonte: PASSOS; PARK (2003).

FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

NÃO SÃO METABOLISADOS PELO ORGANISMO HUMANO

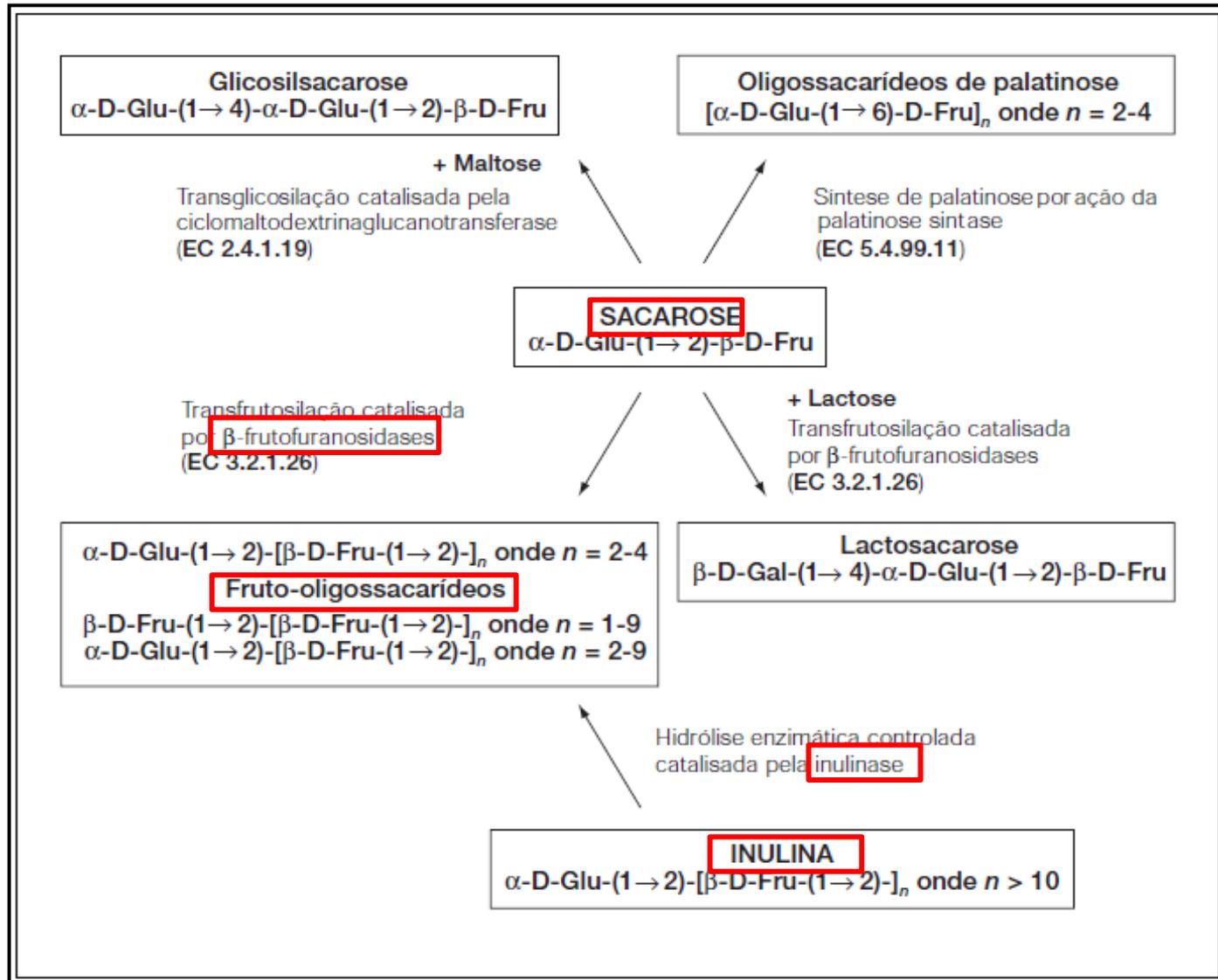


Concentração e Consumo de FOS em Alimentos

Alimento	Umidade	Consumo diário de alimento (g/kg/dia)		FOS em peso seco (%)	Consumo diário médio de FOS em peso úmido	
		Peso seco	Peso úmido		g/kg/dia	mg/dia
Banana	76	0.224	0.933	0.30	$2.80 \cdot 10^{-3}$	164.95
Cevada	11	0.057	0.064	0.15	$9.66 \cdot 10^{-5}$	5.69
Alho	61	0.001	0.002	0.60	$1.17 \cdot 10^{-5}$	0.69
Mel	17	0.015	0.018	0.75	$1.38 \cdot 10^{-4}$	8.11
Cebola	89	0.002	0.018	0.23	$4.00 \cdot 10^{-5}$	2.36
Arroz	11	0.004	0.005	0.50	$2.26 \cdot 10^{-5}$	1.33
Açúcar mascavo	2	0.011	0.011	0.30	$3.22 \cdot 10^{-5}$	1.90
Tomate	93	0.492	7.029	0.15	$1.05 \cdot 10^{-2}$	620.99

*No Japão estabeleceu como consumo diário aceitável cerca de 0,8g/kg/dia.

Síntese de Fruto-oligossacarídeos



Formação de oligossacarídeos a partir da sacarose e inulina (Glu=glicose; Gal=galactose; Fru=frutose)
(Adaptado de CRITTENDEN; PLAYNE, 1996).

SYNTHESIS OF FRUCTOOLIGOSACCHARIDES USING EXTRACELLULAR ENZYMES FROM *RHODOTORULA SP*

SAARTJE HERNALSTEENS¹ and FRANCISCO MAUGERI

Appl Microbiol Biotechnol (2008) 79:589–596

DOI 10.1007/s00253-008-1470-x

BIOTECHNOLOGICALLY RELEVANT ENZYMES AND PROTEINS

Purification and characterisation of a fructosyltransferase from *Rhodotorula sp.*

Saartje Hernalsteens · Francisco Maugeri

Current Chemical Biology, 2012, 6, 42-52

Optimization of fructooligosaccharides synthesis by immobilized fructosyltransferase

Elizama Aguiar-Oliveira*¹, Maria Isabel Rodrigues¹ and Francisco Maugeri¹

¹University of Campinas (UNICAMP), Faculty of Food Engineering (FEA), Dept. of Food Eng. (DEA), Lab. of Bioprocess Eng. (LEB), R. Monteiro Lobato, 80, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Distrito de Barão Geraldo, Postal Code: 13083-862, Campinas, São Paulo, Brazil

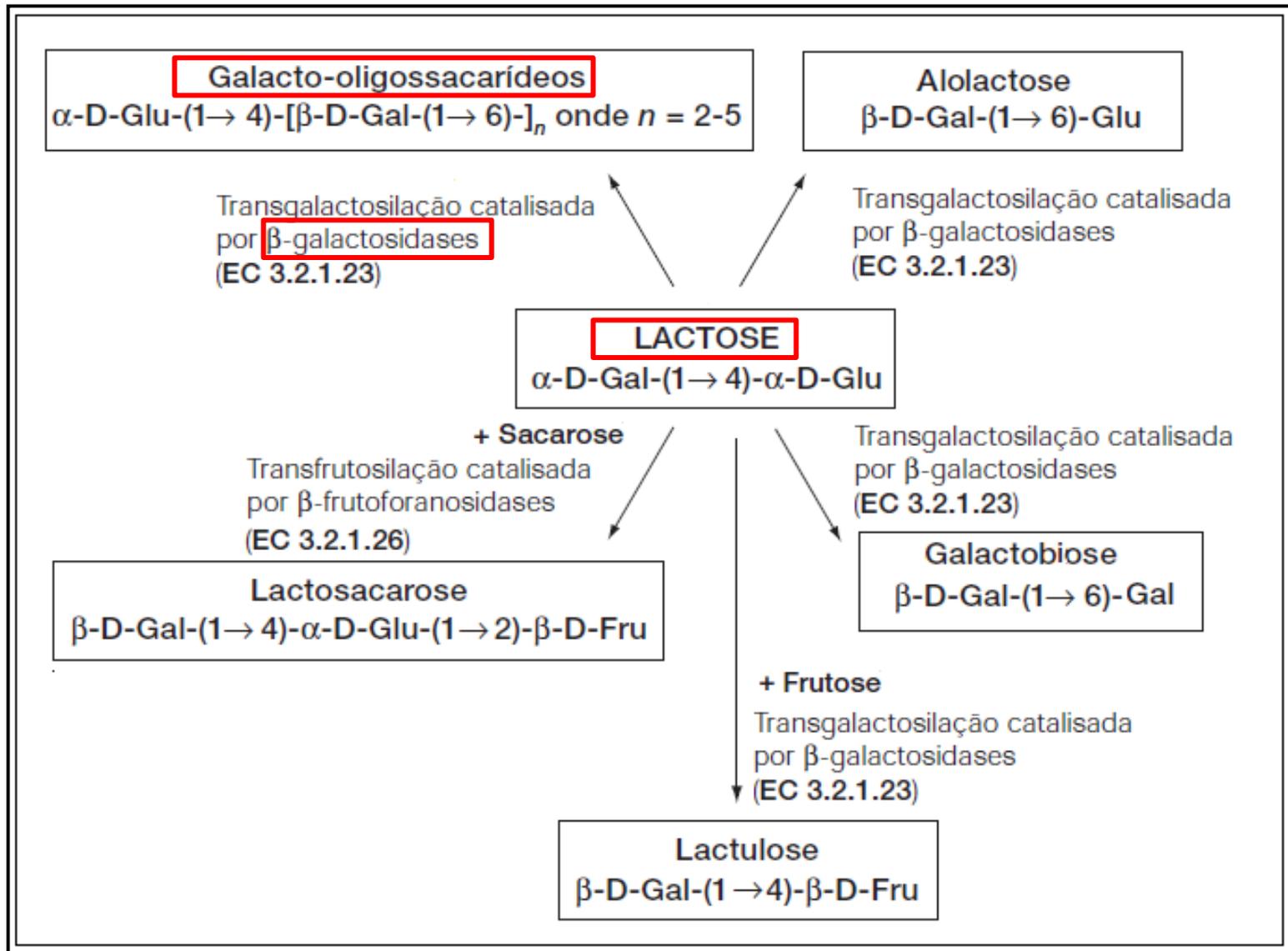
GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS (GOS):

- ✓ Os GOS são componentes naturais do leite humano, bem como de alguns alimentos, incluindo cebola, alho, banana, soja e chicória, e podem ser produzidos a partir da lactose pela reação de transgalactosilação da enzima β -galactosidase.
- ✓ O sítio ativo da β -galactosidase possui habilidade similar tanto para hidrolisar a lactose, formando galactose e glicose, quanto para transgalactosilar a galactose, formando os GOS (MAHONEY, 1998).

Síntese de GOS em substratos lácteos
resulta em produtos com menor
teor de lactose → Intolerantes a Lactose



Síntese de Galacto-oligossacarídeos



Formação de oligossacarídeos a partir da lactose (Glu=glicose; Gal=galactose; Fru=frutose) (Adaptado de CRITTENDEN; PLAYNE, 1996).

International Journal of Food Engineering

Volume 6, Issue 6

2010

Article 4

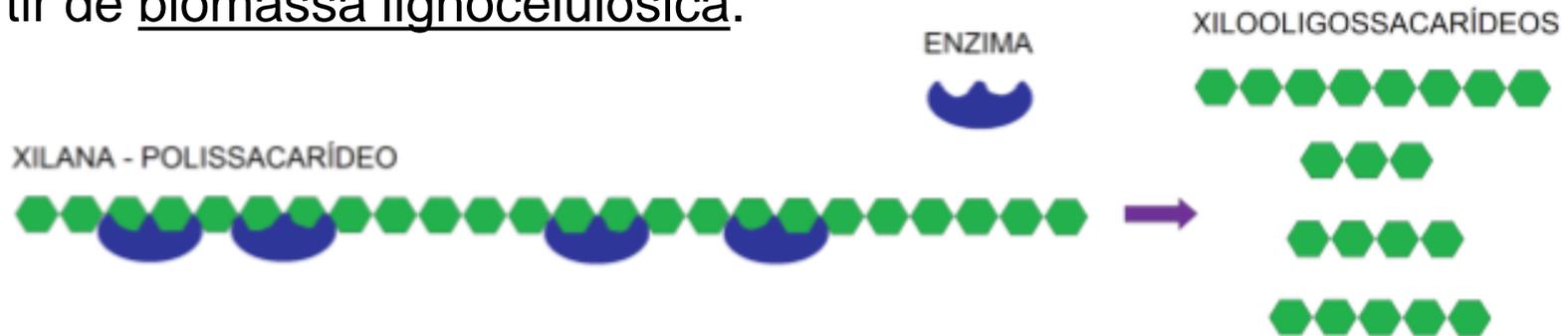
Galacto-oligosaccharides Production Using Permeabilized Cells of *Kluyveromyces marxianus*

Ana Paula Manera, Fátima Aparecida de Almeida Costa, Maria Isabel Rodrigues,
Susana Juliano Kalil, and Francisco Maugeri Filho

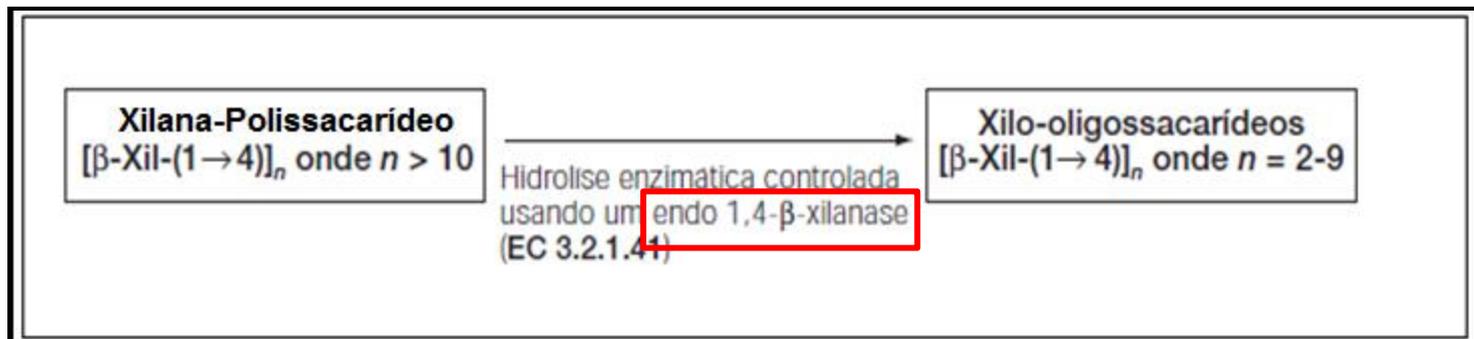
¹Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n, 13083-862, Campinas, São Paulo, Brasil. ²Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: maugeri@fea.unicamp.br

XILO-OLIGOSSACARÍDEOS (XOS):

Os xilo-oligossacarídeos apresentam um grande potencial prebiótico e são um dos poucos produtos nutracêuticos que podem ser produzidos a partir de biomassa lignocelulósica.



Despolimerização: (Físico, Químico ou Enzimático)



Formação de oligossacarídeos a partir da xilana (Xil=xilose)
(Adaptado de CRITTENDEN; PLAYNE, 1996).

Efeito de Misturas Enzimáticas na Hidrólise do Bagaço de Cana-de-Açúcar e Produção de Xilo-oligossacarídeos (XOS)

Misturas Enzimáticas:

GH11 – Endo-1,4- β -xilanase
GH10 – Endo-1,4- β -xilanase
GH54 - α -L-arabinofuranosidase
GH51 - α -L-arabinofuranosidase
GH43 - β -xilosidase
CE1 - Feruloil esterase

Biomassa lignocelulósica:

Bagaço In natura (RAW)
Bagaço Pré-tratado (PASB)
Bagaço Pré-tratado (PACH)

- Plackett-Burman (12 experimentos + 3 pontos centrais);
- Condições Experimentais: 50°C/ pH 5,0 / 24horas/ 1000rpm;
- Quantificação em HPAEC-PAD: Xilose e XOS liberados.

Clonagem, Expressão e Purificação das Enzimas

Expressas em *A. nidulans* (pEXPYR)

GH11 - Endo-1,4- β -xilanase (*Penicillium funiculosum*)

GH54 - α -L-arabinofuranosidase (*Aspergillus niger*)

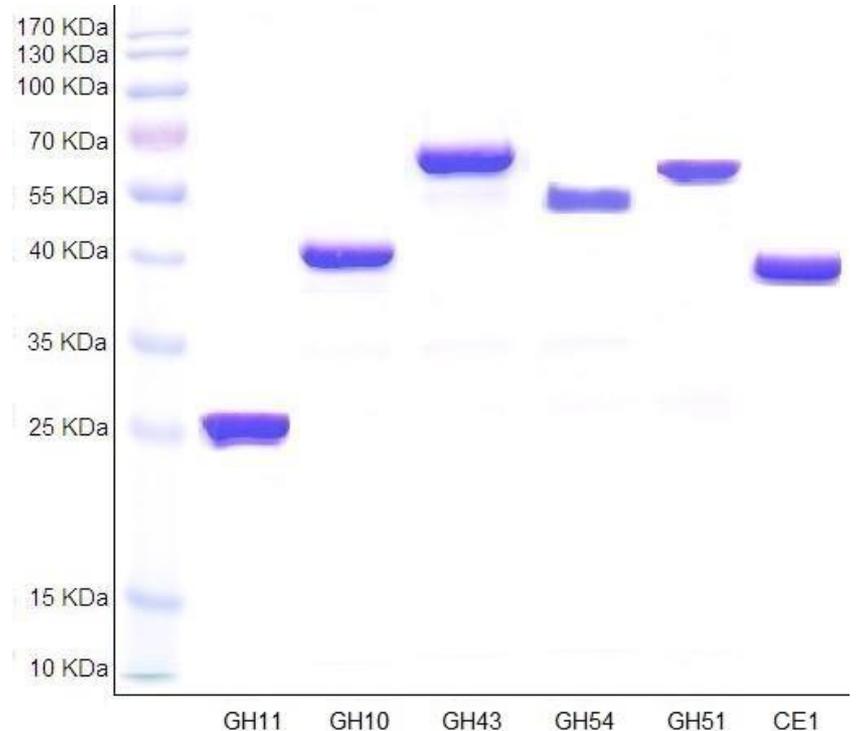
Expressas em *E. coli* (pET28a)

GH10 - Endo-1,4- β -xilanase (Metagenômica do solo)

GH51 - α -L-arabinofuranosidase (*Bacillus subtilis*)

GH43 - β -xilosidase (*Bacillus subtilis*)

CE1 - Feruloil esterase (*Clostridium thermocellum*)



Purificação: Cromatografia de Afinidade + Cromatografia de Exclusão Molecular

Caracterização da Biomassa Lignocelulósica

Tabela 1 Composição das biomassas lignocelulósicas empregadas

Composição	RAW	PASB	PACH
Celulose	44,2±0,32	48,0±0,28	60,6±0,45
Hemicelulose	25,7±0,25	19,9±0,15	35,7±0,23
Lignina	23,4±0,17	28,8±0,14	2,1±0,09
Cinzas	6,7±0,25	3,3±0,21	1,6±0,10



Planejamentos Experimentais – Plackett Burman



Tabela 2 Matriz de planejamento experimental Plackett Burman (PB12 + 3 pontos centrais) realizado para a hidrólise enzimática do bagaço de cana “in natura” (RAW)

Ensaio	Var1 GH10	Var2 GH11	Var3 GH43	Var4 G51	Var5 GH54	Var6 CE1	Conversão Hemicelulose (%)	XOS (mg/L)
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	0,58	--
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	1,10	19,75
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	1,25	--
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	0,76	--
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	2,12	--
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	4,93	21,08
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	0,84	--
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	0,39	--
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	0,65	---
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	0,84	--
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	5,83	22,58
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,00	--
13	0	0	0	0	0	0	2,86	14,11
14	0	0	0	0	0	0	2,83	11,29
15	0	0	0	0	0	0	2,84	11,29

Onde: Nível (-1) corresponde a ausência de enzima (0%); Nível (+1) corresponde a presença de enzima (100%) e o Nível (0) corresponde a 50% da concentração de enzima (pontos centrais). Concentração de Enzima: 0.8 mg_{GH10}/g_{substrate}, 0.4mg_{GH11}/g_{substrate}, 1.2 mg_{GH43}/g_{substrate}, 1.2 mg_{GH51}/g_{substrate}, 1.2 mg_{GH54}/g_{substrate} and 1.5 mg_{CE1}/g_{substrate}.

Tabela 3 Matriz de planejamento experimental Plackett Burman (PB12 + 3 pontos centrais) realizado para a hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico (PASB)

Ensaio	Var1 GH10	Var2 GH11	Var3 GH43	Var4 G51	Var5 GH54	Var6 CE1	Conversão Hemicelulose (%)	XOS (mg/L)
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	0,75	34,83
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	5,16	14,11
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	13,91	39,51
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	4,24	46,12
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	13,92	39,51
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	17,52	36,69
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	16,73	74,52
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	3,89	23,72
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	4,33	27,86
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	3,85	19,75
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	21,36	94,27
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,00	11,29
13	0	0	0	0	0	0	17,88	50,23
14	0	0	0	0	0	0	18,23	53,62
15	0	0	0	0	0	0	18,00	50,80

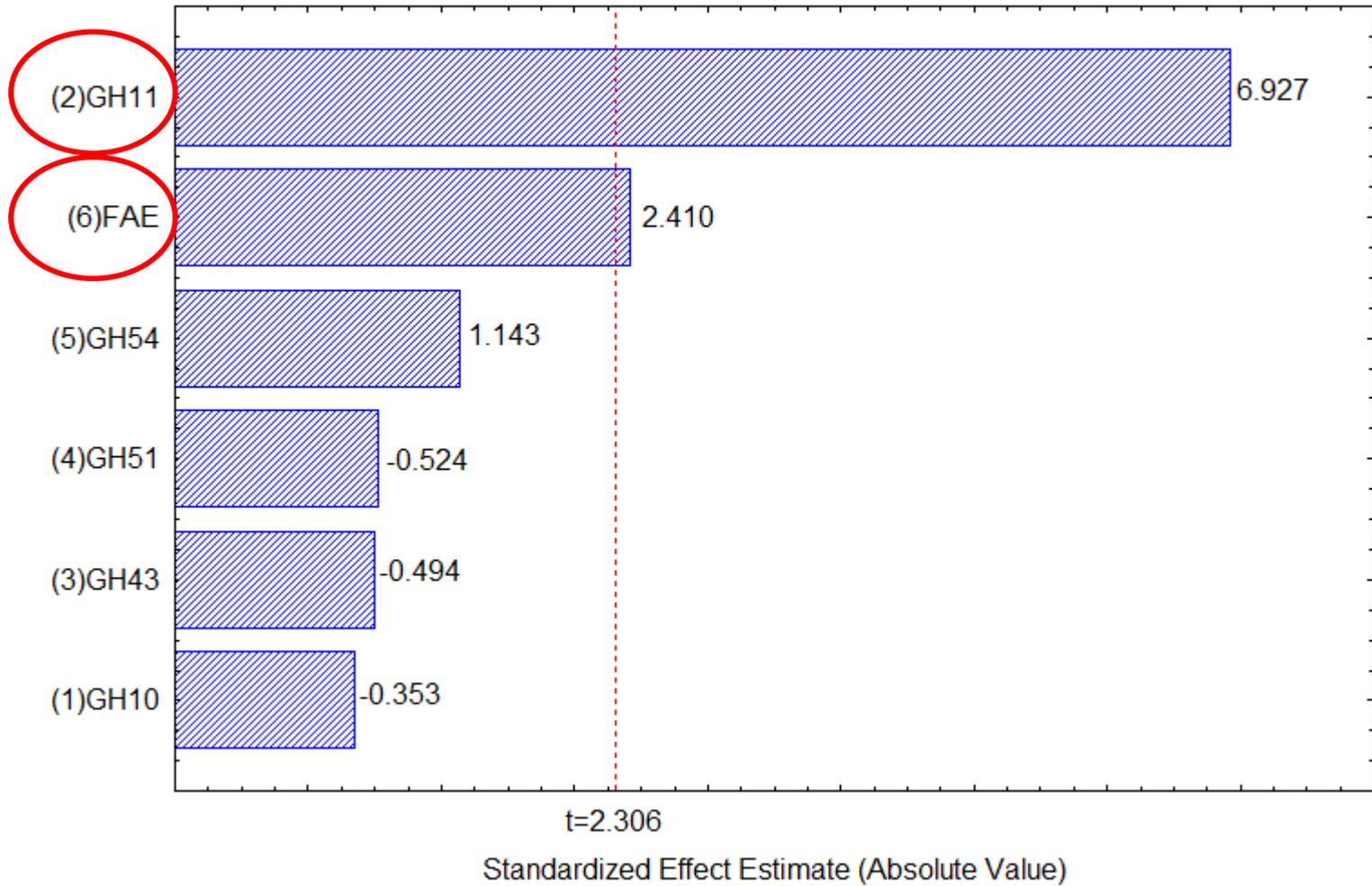
Onde: Nível (-1) corresponde a ausência de enzima (0%); Nível (+1) corresponde a presença de enzima (100%) e o Nível (0) corresponde a 50% da concentração de enzima (pontos centrais). Concentração de Enzima: $0.8 \text{ mg}_{\text{GH10}}/\text{g}_{\text{substrate}}$, $0.4 \text{ mg}_{\text{GH11}}/\text{g}_{\text{substrate}}$, $1.2 \text{ mg}_{\text{GH43}}/\text{g}_{\text{substrate}}$, $1.2 \text{ mg}_{\text{GH51}}/\text{g}_{\text{substrate}}$, $1.2 \text{ mg}_{\text{GH54}}/\text{g}_{\text{substrate}}$ and $1.5 \text{ mg}_{\text{CE1}}/\text{g}_{\text{substrate}}$.

Tabela 4 Matriz de planejamento experimental Plackett Burman (PB12 + 3 pontos centrais) realizado para a hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado c/ ac. acético e peróxido H⁺ (PACH)

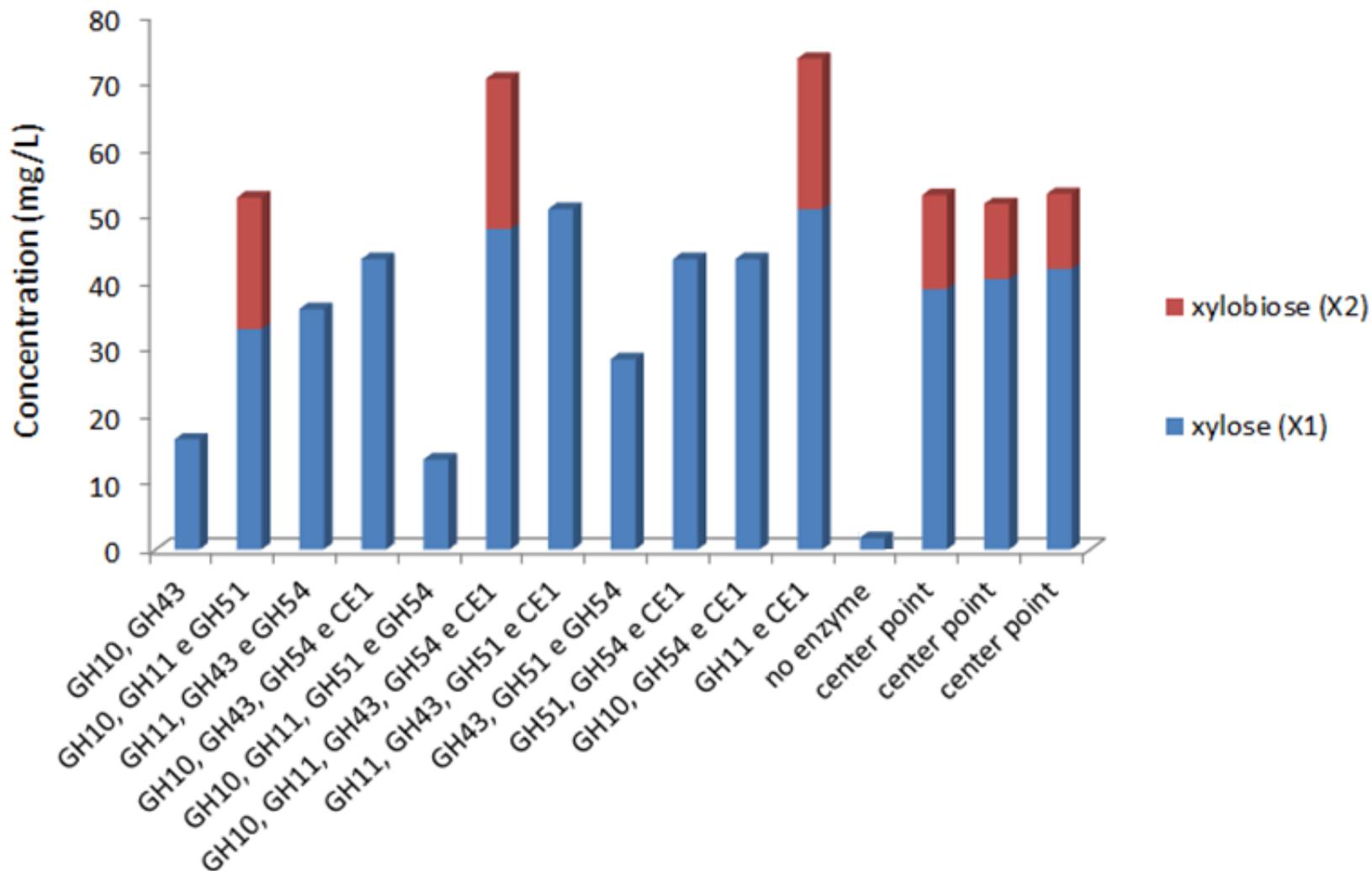
Ensaio	Var1 GH10	Var2 GH11	Var3 GH43	Var4 G51	Var5 GH54	Var6 CE1	Conversão Hemicelulose (%)	XOS (mg/L)
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	2,78	184,63
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	42,54	1388,73
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	41,89	1486,15
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	9,53	338,03
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	37,32	1256,37
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	45,37	1264,87
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	47,77	1566,81
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	4,19	197,26
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	42,40	355,37
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	41,86	589,13
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	55,35	1652,51
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,00	41,64
13	0	0	0	0	0	0	48,51	1297,64
14	0	0	0	0	0	0	48,65	1302,41
15	0	0	0	0	0	0	48,45	1247,61

Onde: Nível (-1) corresponde a ausência de enzima (0%); Nível (+1) corresponde a presença de enzima (100%) e o Nível (0) corresponde a 50% da concentração de enzima (pontos centrais). Concentração de Enzima: 0.8 mg_{GH10}/g_{substrate}, 0.4mg_{GH11}/g_{substrate}, 1.2 mg_{GH43}/g_{substrate}, 1.2 mg_{GH51}/g_{substrate}, 1.2 mg_{GH54}/g_{substrate} and 1.5 mg_{CE1}/g_{substrate}.

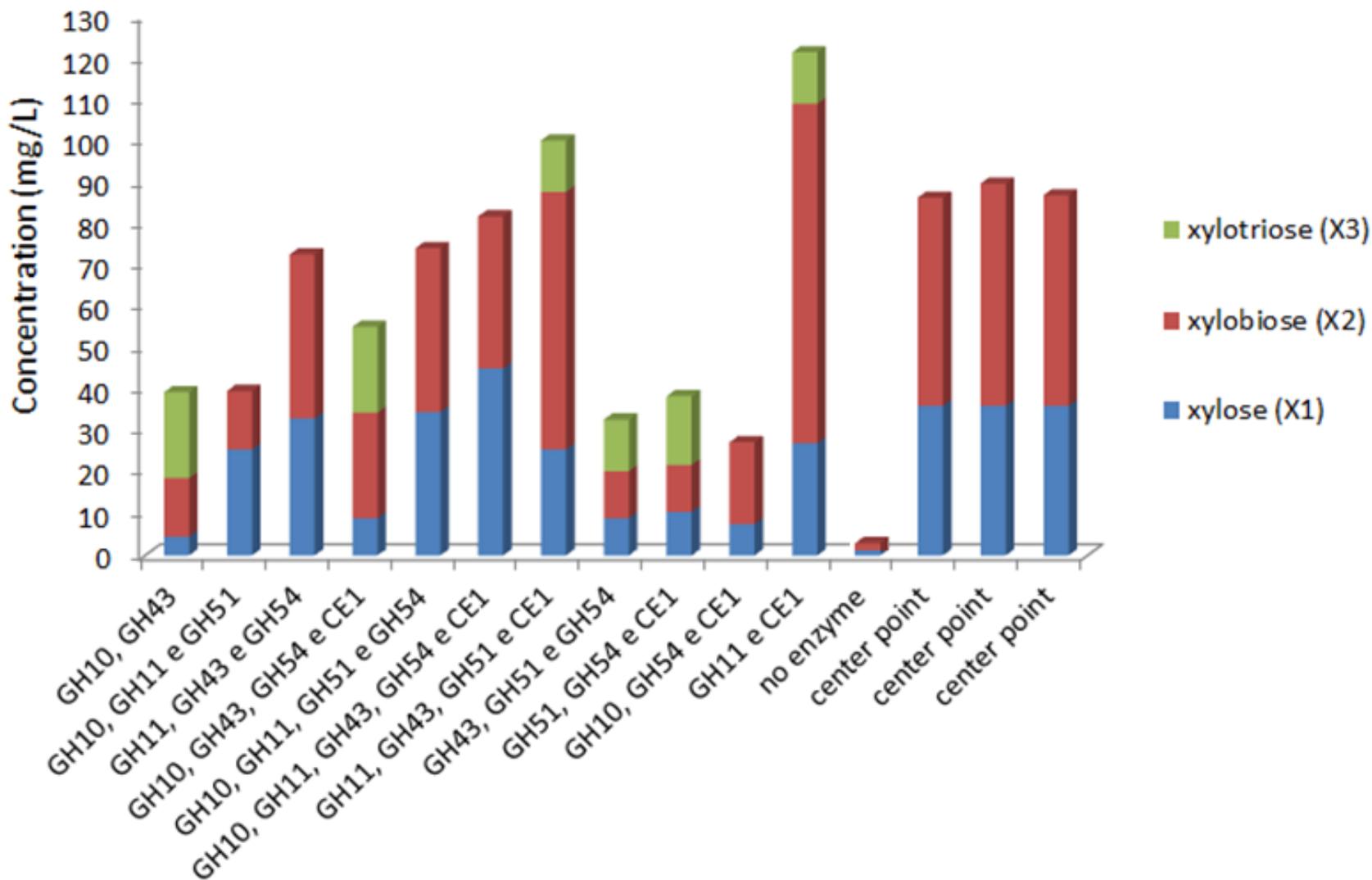
Pareto Chart of Standardized Effects
6 Factor Screening Design



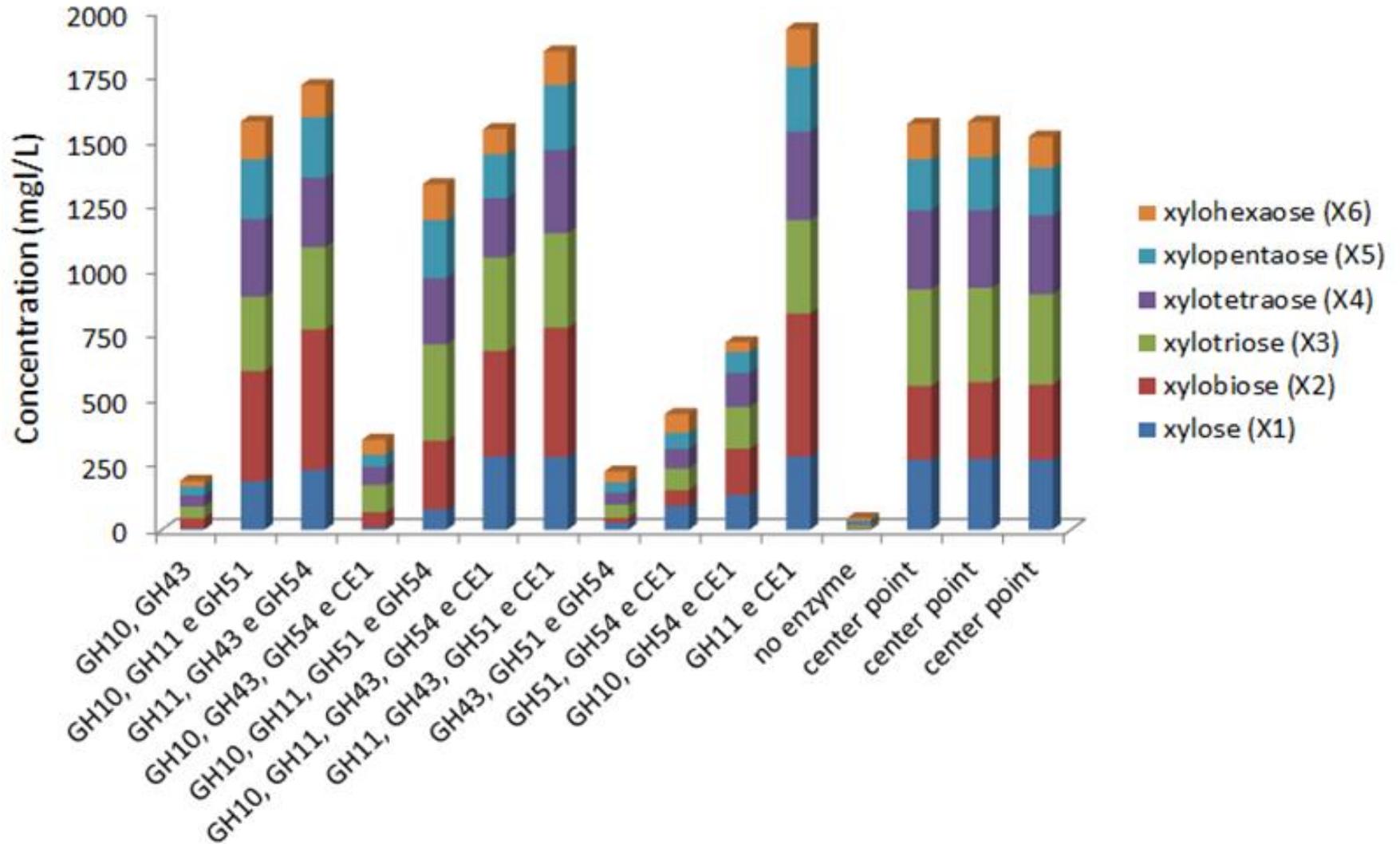
Concentração de X1 e XOS liberada na hidrólise do Bagaço In Natura (RAW)



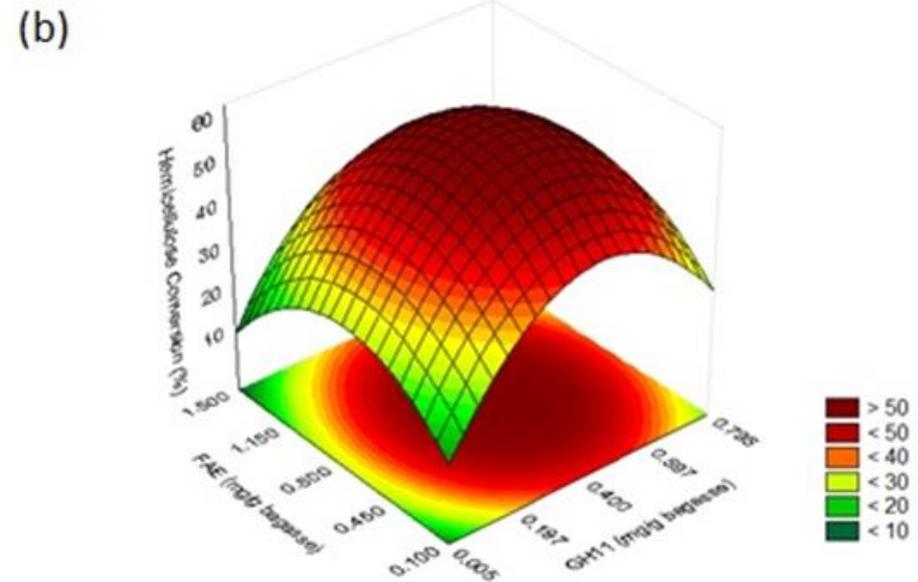
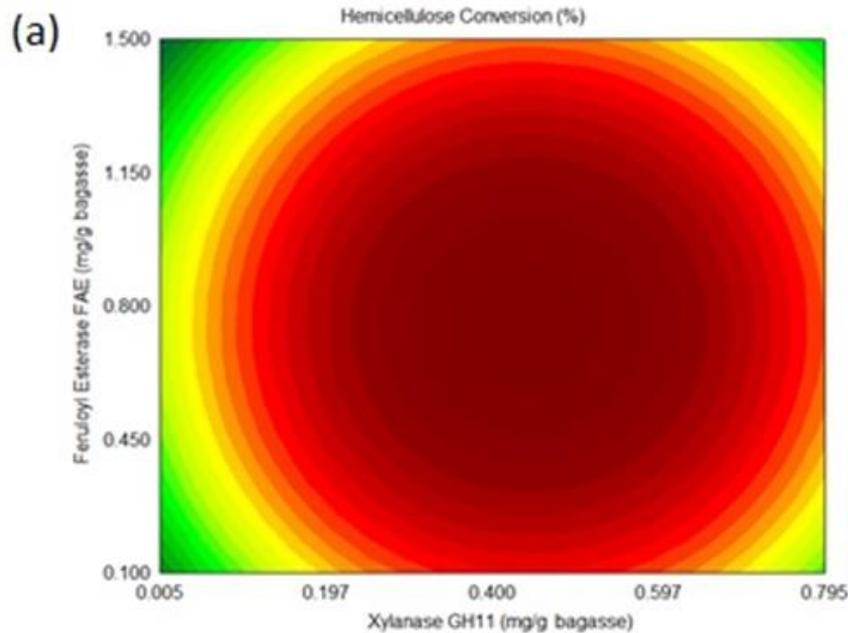
Concentração de X1 e XOS liberada na hidrólise do Bagaço Pré-Tratado (PASB)



Concentração de X1 e XOS liberada na hidrólise do Bagaço Pré-Tratado (PACH)

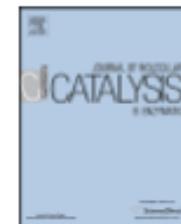


Planejamento Experimental Completo 2²



65% Conversão da hemicelulose → 1/2 da Carga Enzimática (GH11 e CE1)

Produção ~2000 mg/L XOS



Effect of hemicellulolytic enzymes to improve sugarcane bagasse saccharification and xylooligosaccharides production



Rosana Goldbeck^{a,b}, Thiago A. Gonçalves^{a,c}, André R.L. Damásio^{a,c}, Lívia B. Brenelli^{a,c},
Lúcia D. Wolf^a, Douglas A.A. Paixão^{a,c}, George J.M. Rocha^a, Fabio M. Squina^{a,*}

^a Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, Brazil

^b Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

^c Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2016

Received in revised form 27 May 2016

Accepted 30 May 2016

Available online 1 June 2016

Keywords:

Hemicellulases

Enzyme mixtures

Sugarcane bagasse

Xylooligosaccharides

ABSTRACT

Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass is limited by economic considerations arising from enzyme production costs and specific activities. The effect of six hemicellulases on raw sugarcane bagasse and two types of pretreated sugarcane bagasse was investigated using experimental designs. Our strategy was successful for developing more efficient and less expensive enzymatic mixture, and also revealed that hemicellulase mixtures with multiple activities could be less effective than expected. In this study, only two hemicellulases, the endo-1,4-xylanases (GH11) from *Penicillium funiculosum* (XynC11/CAC15487) and the feruloyl esterase (CE1) from *Clostridium thermocellum* (CtFAE/ATCC27405), effectively broke-down hemicellulose from pretreated sugarcane bagasse (up to 65%), along with the production of xylooligosaccharides (XOS). Our results also demonstrated that GH11 and CE1 can improve biomass saccharification by cellulases. Treatment with these two enzymes followed by a commercial cellulase cocktail (Accellerase®1500) increased saccharification of pretreated lignocellulose by 24%. Collectively, our data contributes to the rational design of more efficient and less expensive enzyme mixtures, targeting the viable production of bioethanol and other biorefinery products.

Conclusões

- ✓ Os nossos resultados demonstram que entre as três amostras de bagaço de cana de açúcar empregue, a maior conversão de hemicelulose foi obtido para **PACH (~ 55%)**;
- ✓ Neste substrato, a **baixa concentração de lignina**, potencialmente facilitou o acesso das enzimas, favorecendo maior interação enzima-substrato, resultando em maior **produção de xilo-oligossacarídeos**;
- ✓ Entre 6 enzimas testadas, apenas **GH11 e CE1** tiveram efeito significativo ($p \leq 0,05$) tanto para a conversão da hemicelulose como p/produção de XOS;
- ✓ Otimizar através Planejamento $2^2 \rightarrow$ **1/2 carga enzimática** \rightarrow 65% conversão;
- ✓ Coletivamente, os nossos dados demonstraram a viabilidade de desenvolver **mistura enzimática otimizada e menos onerosas** visando a produção não só de bioetanol mas sim, de outros produtos de biorrefinaria (**XOS \rightarrow prebióticos \rightarrow industriais alimentícias**).



Outras Linhas de Pesquisa

- ✓ Bioprospecção e Caracterização de Enzimas com potencial aplicação industrial;
- ✓ Expressão Heteróloga de Proteínas (Celulases);
- ✓ Sacarificação e Fermentação Simultânea da Biomassa Lignocelulósica;
- ✓ Engenharia Evolutiva de linhagens de *S. cerevisiae*.



Agradecimentos



LEMeb-FEA/UNICAMP





Muito Obrigada!

goldbeck@unicamp.br