**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

PAULO RICARDO HEINEN

**Estudo das propriedades físico-químicas e funcionais de uma
endo-1,4- β -xilanase de *Aspergillus tamarii* Kita e a sua aplicação
na produção de xilooligossacarídeos**

Ribeirão Preto – São Paulo

2017

PAULO RICARDO HEINEN

**Estudo das propriedades físico-químicas e funcionais de uma
endo-1,4- β -xilanase de *Aspergillus tamarii* Kita e a sua aplicação
na produção de xilooligossacarídeos**

Versão Corrigida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes T. M. Polizeli

Ribeirão Preto – São Paulo

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

FICHA CATALOGRÁFICA

Heinen, Paulo Ricardo

Estudo das propriedades físico-químicas e funcionais de uma endo-1,4- β -xilanase de *Aspergillus tamarii* Kita e a sua aplicação na produção de xilooligossacarídeos. Ribeirão Preto - São Paulo, 2017.

107 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientadora: Polizeli, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes.

1. *Aspergillus tamarii* kita. 2. Endo-1,4- β -xilanase. 3. Imobilização. 4. Purificação. 5. Análise estrutural. 6. Caracterização bioquímica.

HEINEN, P. R. **Estudo das propriedades físico-químicas e funcionais de uma endo-1,4- β -xilanase de *Aspergillus tamaraii* Kita e a sua aplicação na produção de xilooligossacarídeos.** 2017. 107 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2017.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- 1) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- 2) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo: 406838/2013-5);
- 3) Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo: 2010/52322-3);
- 4) Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA (FMRP/USP);
- 5) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP;
- 6) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com:

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT): NBR 6023, NBR 6024, NBR 6027, NBR 6028, NBR 10520, NBR 12225 e NBR 14724.

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso Parte I (ABNT)/Sistema Integrado de Bibliotecas da USP; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora... [et al.]. -- 3. ed. rev. ampl. -- São Paulo: SIBiUSP, 2016. 100 p.: il. -- (Cadernos de Estudos; 9).

Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paulo Heinen e Teresinha Heinen, pelo amor, educação e dedicação despendida em todas as etapas da minha formação moral.

Ao meu irmão, Diogo Maurílio Heinen, com quem muito aprendi e permaneço aprendendo.

À minha querida orientadora, professora Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli, por ter aberto as portas do seu laboratório e acreditado no meu trabalho. Obrigado pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela amizade e, sobretudo, por ser essa pessoa tão carinhosa e amável.

À professora Dra. Marina Kimiko Kadowaki pela amizade e toda atenção dispensada a minha formação científica. Obrigado!

À professora e amiga Dra. Clarice Aoki Osaku por ter me apresentado o universo da pesquisa, assim como pelo seu apoio e incentivo no correr dos anos.

Ao professor Dr. João Atílio Jorge pelas colaborações, críticas, ensinamentos e, principalmente, por sua cordial amizade.

Ao professor Dr. Richard John Ward pelas recorrentes assistências oferecidas durante o desenvolvimento deste projeto.

À professora Dra. Carem Gledes Vargas Rechia e à farmacêutica Ieda Maria Razaboni Prado pela colaboração com os ensaios em cromatografia líquida de alta eficiência.

Ao professor Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes e à Dra. Anelize Bauermeister pelo auxílio na realização dos experimentos com o espectrômetro de massas.

Aos amigos Carla Lieko Della Torre, Josana Maria Messias, José Carlos Salgado, Karoline Maria Vieira Nogueira, Maicon Henrique Vieira, Marita Gimenez Pereira e Vanessa Cristina Arfelli pelo simples fato de existirem na minha vida. Faltam palavras para expressar o tamanho da minha gratidão por todo respeito e afeto demonstrado ao longo de todos esses anos de amizade. Eu amo todos vocês!

Aos amigos e colegas de laboratório, minha segunda família, pela oportunidade de adquirir novos conhecimentos, pelos momentos de confraternização e, sobretudo, pela afetuosidade. Meus sinceros agradecimentos a Ana Silvia de Almeida Scarcella, Ana Claudia

Vici, Aline Moraes Polizeli, Carla Cristina Villela Desagiacomo, Eliano dos Anjos Moreira, Enrico Spiropulos, Jorge Henrique Almeida Betini, José Carlos Salgado, Juliana da Conceição Infante de Marco, Luciana Ziotti, Lummy Maria Oliveira Monteiro, Malena Martinez Pérez, Marita Gimenez Pereira, Maysa Parente, Michele Michelin, Monica Stropa Ferreira Nozawa, Otávio de Almeida, Paula Zaghetto de Almeida, Rosymar Coutinho de Lucas, Thaís Alves, Thiago Machado Pasin, Tony Márcio da Silva, Vanessa Elisa Pinheiro e Vanessa Sato.

Aos amigos Mariana Cereia, Maurício de Oliveira e Ricardo Fernandes Alarcon pelo apoio técnico e amizade durante esses quatro anos de convivência.

À Maria Ivone Campos Fonseca, secretária do programa de pós-graduação em Bioquímica, por sempre ter sido tão paciente, solícita e amiga.

Aos docentes e demais integrantes do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que a conclusão deste projeto se tornasse possível.

Muito obrigado!

RESUMO

HEINEN, Paulo Ricardo. **Estudo das propriedades físico-químicas e funcionais de uma endo-1,4- β -xilanase de *Aspergillus tamarit* Kita e a sua aplicação na produção de xilooligossacarídeos**. 2017. 107 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2017.

As endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8) formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvido na degradação da xilana, visto que catalisam a hidrólise aleatória de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 no interior da sua cadeia principal, produzindo xilooligossacarídeos de diferentes tamanhos. Na natureza, essas enzimas estão intimamente relacionadas ao fornecimento de energia para o desenvolvimento dos organismos que as produzem. Em geral, as xilanases são isoladas preferencialmente de bactérias e fungos, e têm demonstrado grande potencial na produção de pães, ração animal, alimentos, bebidas, xilitol e bioetanol. O presente trabalho propôs o isolamento de uma nova endo-1,4- β -xilanase por meio de técnicas de produção e purificação acessíveis que pudessem viabilizar economicamente a integração desse biocatalisador aos processos industriais. O fungo *Aspergillus tamarit* Kita, oriundo de uma amostra de solo da Mata Atlântica, mostrou-se um bom produtor de xilanases em meio de cultura Adams suplementado com bagaço de cevada, um subproduto das indústrias cervejeiras. Após a otimização do processo de fermentação submersa, o extrato enzimático exibiu duas xilanases em gel de atividade para proteínas nativas, identificadas por espectrometria de massas como glicosil hidrolases pertencentes às famílias 10 e 11. A sacarificação enzimática de três resíduos agroindustriais, com base em um delineamento experimental de misturas, demonstrou que a combinação ternária desses componentes, em iguais proporções, possui considerável relevância para a produção de açúcares fermentáveis, tais como glicose e xilose. Em ensaios de imobilização, a xilanase GH11 foi satisfatoriamente estabilizada em matrizes de caráter iônico e covalente. A imobilização por ligação covalente multipontual em glioxil-agarose elevou a temperatura ótima de atividade de 60 para 65 °C e ofertou um considerável ganho de termoestabilidade ao derivado, que apresentou meia vida de 60 minutos a 80 °C. Além disso, a estabilização da enzima nesse suporte permitiu a produção dos seguintes xilooligossacarídeos: xilobiose, xilotriose, xilotetraose e xilopentaose. A purificação da xilanase GH11 foi realizada por meio de uma única etapa cromatográfica de troca catiônica, com rendimento final de 36,72% e um fator de purificação de 7,43 vezes. A massa molecular da enzima foi estimada em 19,5 kDa. Ademais, a sua estrutura tridimensional foi predita por modelagem comparativa, exibindo como modelo final uma arquitetura do tipo β -jelly roll, comum às xilanases da família 11. Em ensaios de caracterização, a xilanase apresentou melhor atividade em pH 5,5 e manteve atividade residual superior a 80% na faixa de pH compreendida entre 4,0 e 9,0, durante 24 horas. Em relação à temperatura, a sua atividade ótima foi observada a 60 °C, contudo, a sua termoestabilidade foi mais expressiva a 50 °C, restando cerca de 70% da sua atividade inicial por 480 minutos. Para a xilana *beechwood*, os valores de velocidade máxima e constante de dissociação aparente foram iguais a 1.330,20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ e 8,13 mg/mL , respectivamente.

Na concentração de 5 mM, os metais pesados Co^{2+} , Hg^+ , Pb^{2+} e Zn^{2+} apresentaram um ponderável efeito de inibição sobre a xilanase GH11, enquanto que os íons Ba^{2+} e Ni^{2+} , assim como os compostos β -mercaptoetanol e DTT, exibiram um aumento superior a 20% em sua atividade. Por fim, a análise em tempo real da atividade xilanásica revelou que o substrato xilopentaose corresponde ao menor xilooligossacarídeo capaz de ser eficientemente hidrolisado. Sendo assim, a nova endo-xilanase GH11 isolada do fungo *A. tamarii* Kita exibe uma série de propriedades físico-químicas favoráveis a sua aplicabilidade em escala industrial.

Palavras-chave: *Aspergillus tamarii* kita; Endo-1,4- β -xilanase; Imobilização; Purificação; Análise estrutural; Caracterização bioquímica.

ABSTRACT

HEINEN, Paulo Ricardo. **Study of the physical-chemical and functional properties of an endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus tamarii* Kita and its application in the production of xylooligosaccharides.** 2017. 107 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2017.

The endo-1,4- β -xylanases (EC 3.2.1.8) form the largest group of hydrolytic enzymes involved in the degradation of xylan, since they catalyze the random hydrolysis of β -1,4 glycosidic bonds within the main chain of this polysaccharide, producing xylooligosaccharides of different sizes. In nature, these enzymes are closely related to supplying energy for the development of the organisms that produce them. In general, xylanases are preferentially isolated from bacteria and fungi, which show great potential in industries as brewing, animal feed, food, beverage, xylitol and bioethanol. The present work proposed the isolation of a new endo-1,4- β -xylanase by available techniques of production and purification that can economically make feasible the integration of this biocatalyst to industrial processes. The fungus *Aspergillus tamarii* Kita, obtained from a soil sample of the Atlantic Forest, showed to be a good xylanase producer in Adams culture medium supplemented with barley bagasse, a byproduct of breweries. After the optimization of the submerged fermentation process, the crude enzymatic extract exhibited two xylanases in activity gel for native proteins, identified by mass spectrometry as glycosyl hydrolases belonging to families 10 and 11. The enzymatic saccharification of three agroindustrial residues, based on an experimental mixture design, showed that the ternary combination of these components, in equal proportions, has considerable relevance for the production of fermentable sugars, such as glucose and xylose. The xylanase GH11 was satisfactorily stabilized on matrices of ionic and covalent character in immobilization assays. Covalent multipoint immobilization on glyoxyl agarose raised its optimum temperature of activity from 60 to 65 °C and offered a considerable gain in thermostability to the derivative, which presented a half-life of 60 minutes at 80 °C. In addition, enzyme stabilization on this support allowed the production of the following xylooligosaccharides: xylobiose, xylotriose, xylotetraose and xylopentaose. Xylanase GH11 purification was carried out by means of a single cation exchange chromatographic step, with final yield of 36.72% and purification factor of 7.43 times. The molecular mass of this xylanase was estimated as 19.5 kDa. Moreover, its three-dimensional structure was predicted by comparative modeling, exhibiting a β -jelly roll type folding as a final model, common to xylanases of family 11. In characterization tests, xylanase presented better activity at pH 5.5 and was considerably stable in the pH range of 4.0 to 9.0. Regarding temperature, its optimum activity was observed at 60 °C, however, its thermostability was more expressive at 50 °C, retaining about 70% of its initial activity for 480 minutes. In the presence of beechwood xylan, the values of maximum velocity and the constant of apparent dissociation were 1,330.20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ and 8.13 mg/mL, respectively. At concentrations of 5 mM, the heavy metals Co^{2+} , Hg^{+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} showed an inhibition effect on the xylanase, whereas Ba^{2+} and Ni^{2+} ions, as well as β -mercaptoethanol and DTT, exhibited an increase of more than 20% in

their activity. Finally, the real-time analysis of xylanase activity revealed that the xylopentose substrate corresponds to the lowest xylooligosaccharide capable of being hydrolyzed. Thus, the new endo-xylanase GH11 isolated from the fungus *A. tamarii* Kita exhibits a series of physicochemical properties favorable to its applicability on an industrial scale.

Keywords: *Aspergillus tamarii* kita; Endo-1,4- β -xylanase; Immobilization; Purification; Structural analysis; Biochemical characterization.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
2.1 Hemicelulose	26
2.2 Xilana	27
2.3 Sistema xilanolítico	29
2.4 Classificação e modo de ação das xilanases	31
2.5 Produção	33
2.6 Propriedades bioquímicas	35
2.7 Purificação	37
2.8 Aplicações biotecnológicas	37
2.8.1 Indústria de papel e celulose	38
2.8.2 Indústria de alimentos	39
2.8.3 Indústria farmacêutica	39
2.8.4 Alimentação animal	40
2.8.5 Produção de bioetanol	40
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Isolamento, manutenção e identificação da linhagem fúngica	44
4.2 Condições de cultivo para a produção enzimática	44
4.3 Substratos lignocelulósicos	45
4.4 Delineamento composto central rotacional do tipo 2^3	45
4.5 Ensaio enzimáticos	46
4.6 Dosagem de proteínas	47
4.7 Eletroforese em condições não desnaturantes para proteínas nativas ácidas	47
4.8 Identificação das proteínas de interesse por espectrometria de massas	48
4.9 Ensaio de sacarificação enzimática utilizando um delineamento experimental de misturas	48
4.10 Análise dos produtos de sacarificação enzimática por CLAE	49
4.11 Imobilização iônica da xilanase em carboximetil-celulose (CM-celulose)	49
4.12 Dessorção da xilanase imobilizada em CM-celulose	49
4.13 SDS-PAGE para análise do perfil de proteínas imobilizadas em CM-celulose	50
4.14 Zimograma da xilanase desorvida	50
4.15 Imobilização covalente da xilanase em brometo de cianogênio (CNBr-agarose)	51

4.16 Imobilização covalente da xilanase em glioxil-agarose	51
4.17 Ensaio enzimáticos para caracterização bioquímica dos derivados.....	52
4.18 Determinação dos parâmetros de imobilização	52
4.19 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade dos derivados covalentes.....	52
4.20 Estabilidade dos derivados covalentes frente a diferentes valores de pH e temperatura	53
4.21 Estabilidade operacional dos derivados	53
4.22 Ensaio de hidrólise com o derivado glioxil-agarose	53
4.23 Purificação da xilanase GH11 em coluna cromatográfica de troca iônica	54
4.24 Análise de pureza da xilanase purificada	54
4.25 Ensaio enzimáticos para caracterização bioquímica da xilanase purificada.....	54
4.26 Determinação do ponto isoelétrico.....	55
4.27 Dicroísmo circular.....	55
4.28 Modelagem molecular.....	56
4.29 Atividade e estabilidade da xilanase frente a diferentes valores de pH e temperatura.....	56
4.30 Parâmetros cinéticos da xilanase purificada.....	56
4.31 Determinação do modo de ação da xilanase com base em seus produtos de hidrólise	57
4.32 Análise em tempo real da hidrólise enzimática de xilooligossacarídeos	57
4.33 Efeito de diferentes compostos sobre a atividade xilanásica.....	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
Parte 1	60
5.1 Otimização do processo de fermentação submersa para a produção de xilanases	61
5.2 Zimograma para xilanases.....	64
5.3 Determinação das enzimas presentes no extrato enzimático de <i>A. tamarii</i> Kita.....	65
5.4 Sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais	66
5.5 Análise dos modelos de regressão.....	67
5.6 Representações gráficas do delineamento de misturas.....	68
Parte 2	71
5.7 Imobilização iônica	72
5.8 Imobilizações covalentes da endo-xilanase.....	75
5.9 Propriedades bioquímicas da xilanase imobilizada.....	76
5.10 Reutilização dos derivados	78
5.11 Análise dos produtos de hidrólise	79
Parte 3	81
5.12 Purificação, massa molecular e ponto isoelétrico	82
5.13 Análise estrutural.....	84
5.14 Atividade e estabilidade da xilanase frente a diferentes valores de pH e temperatura.....	85
5.15 Parâmetros cinéticos.....	87

5.16 Análise dos produtos de hidrólise por CCD e CLAE.....	87
5.17 Análise em tempo real da hidrólise enzimática de xilooligossacarídeos	89
5.18 Efeito de diferentes compostos sobre a atividade xilanásica.....	90
6 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS	95

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura da biomassa lignocelulósica e suas frações poliméricas: celulose, hemicelulose e lignina.....	26
FIGURA 2: Representação estrutural de glucuronoxilanas e glucuronoarabinoxilanas	28
FIGURA 3: Representação hipotética da xilana e os seus respectivos pontos de clivagem	31
FIGURA 4: Modelo hipotético do mecanismo catalítico de duplo deslocamento	32
FIGURA 5: Redução do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) por açúcares redutores	47
FIGURA 6: Superfície de resposta que relaciona a atividade xilanásica em função do volume de meio Adams e da concentração de bagaço de cevada	63
FIGURA 7: Superfície de resposta que relaciona a atividade xilanásica em função do tempo de cultivo e da concentração de bagaço de cevada	63
FIGURA 8: Superfície de resposta que relaciona a atividade xilanásica em função do tempo de cultivo e do volume de meio Adams	64
FIGURA 9: Perfil proteico e zimograma do extrato enzimático bruto de <i>A. tamarit</i> Kita em PAGE para proteínas nativas ácidas.	65
FIGURA 10: Curvas de nível representando a produção de xilose após 48 horas de sacarificação enzimática	69
FIGURA 11: Curvas de nível representando a produção de glicose após 48 horas de sacarificação enzimática	70
FIGURA 12: Curvas de nível representando a produção de açúcares redutores totais após 48 horas de sacarificação enzimática.....	70
FIGURA 13: Imobilização do extrato enzimático em CM-celulose	72
FIGURA 14: Análise da força de interação eletrostática entre a enzima e o suporte iônico	73
FIGURA 15: Efeito do pH sobre a dessorção da xilanase imobilizada em CM-celulose	73
FIGURA 16: SDS-PAGE dos processos de imobilização e dessorção da xilanase	74
FIGURA 17: Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições não desnaturantes e zimograma da xilanase dessorvida.....	74
FIGURA 18: Efeito do pH sobre a atividade dos derivados covalentes	76
FIGURA 19: Ensaio de estabilidade ao pH.....	76
FIGURA 20: Influência da temperatura sobre a atividade dos derivados covalentes	77
FIGURA 21: Ensaio de termoestabilidade com os derivados covalentes	78
FIGURA 22: Concentração de xilooligossacarídeos liberadores durante o ensaio de hidrólise da xilana <i>beechwood</i>	79
FIGURA 23: SDS-PAGE da xilanase GH11 após a sua purificação.....	83
FIGURA 24: Perfil bidimensional da xilanase purificada	83

FIGURA 25: Espectro de dicroísmo circular na região do UV distante	84
FIGURA 26: Representação tridimensional da xilanase GH11 de <i>A. tamaritii</i> Kita	85
FIGURA 27: Atividade e estabilidade da xilanase frente a diferentes valores de pH.....	86
FIGURA 28: Atividade e estabilidade da xilanase frente a diferentes valores de temperatura	86
FIGURA 29: Análise dos produtos de hidrólise enzimática por cromatografia em camada delgada	88
FIGURA 30: Análise em tempo real da hidrólise de xilooligossacarídeos.....	89
FIGURA 31: Análise do ensaio controle para o substrato xilopentose	90

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Características físico-químicas de xilanases fúngicas	36
TABELA 2: Condições experimentais do delineamento composto central rotacional	61
TABELA 3: ANOVA do modelo de regressão polinomial	62
TABELA 4: Enzimas presentes no extrato enzimático de <i>A. tamarii</i> Kita	66
TABELA 5: Planejamento de misturas para otimizar a produção de açúcares fermentáveis em ensaios de sacarificação enzimática de 48 horas	67
TABELA 6: Parâmetros estatísticos dos modelos de regressão selecionados	68
TABELA 7: Resumo das técnicas de imobilização	75
TABELA 8: Capacidade de reuso dos derivados	79
TABELA 9: Análise quantitativa dos xilooligossacarídeos liberados durante a hidrólise enzimática da xilana <i>beechwood</i>	80
TABELA 10: Sumário do processo de purificação	82
TABELA 11: Parâmetros cinéticos da xilanase purificada	87
TABELA 12: Análise dos produtos de hidrólise enzimática por CLAE	88
TABELA 13: Efeito de diferentes compostos sobre a atividade xilanásica	91

LISTA DE SIGLAS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
CAZy	<i>Carbohydrate-Active Enzymes</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD	Dicroísmo circular
CE	Carboidrato esterase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Centímetro
CNBr	Brometo de cianogênio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DTT	Ditiotreitol
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Grama
g	Aceleração da gravidade
GH	Glicosil Hidrolase
Glu	Glutamato
h	Hora
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
$K_{0,5}$	Constante de dissociação aparente
K_{cat}	Constante catalítica
kDa	Kilodalton
K_m	Constante de Michaelis-Menten
kV	Kilovolt
L/h	Litro por hora

m/z	Massa por carga
m/v	Massa por volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mm	Milímetro
µmol	Micromol
mA	Miliampére
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico
mg	Miligrama
mg/L	Miligrama por litro
min	Minuto
mL	Mililitro
mmol/L	Milimol por litro
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
MS/MS	Espectrometria de massas <i>in tandem</i>
nd	Não detectado
n _H	Coeficiente de Hill
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoeletrico
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto
U	Unidade de atividade enzimática
U/mg	Unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína
U/mL	Unidade de atividade enzimática por mililitro
UV	Radiação ultravioleta
V	Volt

v/v	Volume por volume
$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima
X1	Xilose
X2	Xilobiose
X3	Xilotriose
X4	Xilotetraose
X5	Xilopentaose

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A xilana é o componente majoritário das hemiceluloses e a sua completa degradação ocorre pela ação de glicosil hidrolases (GH) e carboidrato esterases (CE), que hidrolisam ligações glicosídicas e ligações ésteres, respectivamente. As endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8) formam o principal grupo de enzimas envolvido na degradação da xilana, visto que catalisam a bioconversão desse polissacarídeo em xilooligossacarídeos de diferentes tamanhos (POLIZELI et al., 2005; ÁLVAREZ-CERVANTES et al., 2016). Na natureza, essas enzimas estão intimamente relacionadas ao fornecimento de energia para o desenvolvimento dos organismos que as produzem, como fungos e bactérias (BAJPAI, 2009). Hodiernamente, as xilanases possuem grande potencial biotecnológico, sobretudo na produção de alimentos, bebidas, xilitol, ração animal e bioetanol (POLIZELI et al., 2005).

Compatibilizar o desenvolvimento econômico com a preservação do meio ambiente tem sido o principal objetivo das novas abordagens industriais, muitas delas mediante o uso da biocatálise. Em vista disso, atualmente existem distintas xilanases comercialmente disponíveis. De modo geral, a produção de enzimas é influenciada por diversos fatores, incluindo a taxa de crescimento do microrganismo, a demanda de substrato e a composição do meio de cultivo. Fatores físicos como pH e temperatura também exercem relevante efeito sobre a produção enzimática. Nesse contexto, os obstáculos técnicos e econômicos inerentes à produção de xilanases devem ser superados para viabilizar as suas subseqüentes aplicações. Ademais, a purificação e a caracterização dessas enzimas também podem revelar informações elementares no que tange a sua aplicabilidade (KNOB, 2009).

O presente trabalho está estruturado da seguinte forma: (1) Introdução; (2) Fundamentação teórica; (3) Objetivos; (4) Material e métodos; (5) Resultados e discussão; (6) Considerações finais.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Hemicelulose

Schulze, em 1891, introduziu o termo "hemicelulose" para caracterizar uma substância de natureza semelhante à celulose e que poderia ser facilmente extraída de plantas por meio de soluções alcalinas. A hemicelulose não designa um composto químico definido, mas uma classe de componentes poliméricos formados por unidades de pentose, hexose e ácido urônico. Dentre tais componentes, a xilana é o polissacarídeo hemicelulósico mais comum. Na célula vegetal, a hemicelulose compõe a matriz da parede celular (Figura 1), favorecendo a adesão e a coesão dos polímeros essenciais à sua integridade mediante diferentes interações físico-químicas (POLIZELI, 2009).

FIGURA 1: Estrutura da biomassa lignocelulósica e suas frações poliméricas: celulose, hemicelulose e lignina.

Fonte: Adaptado de Rubin (2008).

As hemiceluloses são usualmente classificadas com base em suas unidades monoméricas. Dentre as quais, os monossacarídeos mais frequentes são: D-xilose, D-glicose, D-manose, D-galactose e L-arabinose. Em razão disso, as hemiceluloses compreendem uma grande diversidade de heteropolímeros, como as xilanas, xiloglucanas, glucomananas, galactoglucomananas e arabinogalactanas. Os padrões de ramificação também são copiosos, modelados na maior parte das vezes por resíduos de α -D-glucuronosil, 4-O-metil- α -D-glucuronosil, α -D-galacturonosil, α -L-arabinofuranosil, O-acetil, feruloil e p -cumaroil (POLIZELI et al., 2005; VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011). Além disso, a composição das hemiceluloses é altamente dependente da espécie e do estágio de desenvolvimento da planta. As glucuronoarabinoxilanas, por exemplo, são extraídas em maior proporção a partir da cevada, aveia, arroz, centeio, sorgo e trigo (IZYDORCZYK; BILIADERIS, 1995). Por conseguinte, a sua hidrólise enzimática produz as seguintes unidades monoméricas: ácido glucurônico, arabinose e, sobretudo, xilose (POLIZELI, 2009).

2.2 Xilana

A xilana é o polissacarídeo hemicelulósico mais comum na parede celular das plantas e encontra-se em maior quantidade nas madeiras de angiospermas (15-30%) e em menor abundância em gimnospermas (7-12%) (HALTRICH et al., 1996). A maior parte das xilanas ocorre na natureza como heteropolissacarídeos. Em geral, as suas estruturas compreendem uma cadeia principal homopolimérica constituída por monômeros de xilose unidos sequencialmente por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. Essa cadeia pode apresentar diversos padrões de ramificação. A título de exemplo, podem ser mencionadas as substituições regulares de α -L-arabinofuranosídeo sobre a cadeia das arabinoxilanas (POLIZELI, 2009; BURLACU; CORNEA; ISRAEL-ROMING, 2016).

As xilanas mais comumente isoladas de plantas lenhosas correspondem às glucuronoxilanas e glucuronoarabinoxilanas (Figura 2). As glucuronoxilanas são majoritárias em angiospermas, como na madeira de bétula (*birchwood*) e na madeira de faia (*beechwood*), sendo compostas por 150-200 resíduos de xilose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, onde cada décimo resíduo de xilose, em média, carrega uma unidade de 4-O-metil-D-glucuronopiranosil ligado à sua posição C-2 por uma ligação glicosídica do tipo α -1,2. Ademais, as glucuronoxilanas provenientes de madeiras duras (*hardwood*) possuem relativa solubilidade em água decorrente da sua elevada taxa de substituição (70-80%) (COUGHLAN;

HAZLEWOOD, 1993). Dentre as suas substituições, a acetilação é a mais comum, ocorrendo preferencialmente na posição C-3 dos resíduos de xilose. A xilana *birchwood*, por exemplo, contém mais de 1 mol de ácido acético para cada 2 mols de resíduos de xilose. Contudo, as substituições por grupos O-acetil são facilmente removidas por soluções alcalinas (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

As gimnospermas, por sua vez, são plantas compostas principalmente por glucuronoarabinoxilanas. Nessas xilanas, cerca de 12% dos seus resíduos de xilose possuem uma unidade de L-arabinose ligada a sua posição C-3 por uma ligação glicosídica do tipo α -1,3 (PULS, 1997; WONG; TAN; SADDLER, 1988). Procedentes de madeiras macias (*softwood*), as glucuronoarabinoxilanas exibem um grau de polimerização que varia de 70 a 130 resíduos de xilose (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997). Além disso, do mesmo modo que em glucuronoxilanas, as unidades de 4-O-metil-D-glucuronopiranosil são preferencialmente ligadas à posição C-2 dos resíduos de xilose.

FIGURA 2: Representação estrutural de glucuronoxilanas (A) e glucuronoarabinoxilanas (B).

Símbolo: X - xilose, A - arabinose, GA - ácido glucurônico, MGA - ácido α -4-O-metil-glucurônico.

Fonte: Adaptado de Deutschmann e Dekker (2012).

De acordo com Bajpai (2009), a diversidade estrutural das xilanas está principalmente relacionada com a sua localização subcelular e o estágio de desenvolvimento do vegetal. Em alguns tecidos de angiospermas, tais como em cereais e gramíneas, a fração de xilana pode representar até 50% da sua massa (EBRINGEROVÁ, 2005). Em geral, as xilanas estão presentes na parede celular secundária dos tecidos que possuem função estrutural, mas também podem ocorrer em menor extensão na parede primária das células em crescimento (BAJPAI, 2009).

As xilanas são intercaladas e covalentemente ligadas em vários pontos de sobreposição das bainhas de lignina, interpondo as fibras de celulose por pontes de hidrogênio. Essa disposição estrutural é essencial para frear a ação de celulasas e, por meio disso, assegurar a integridade da celulose *in situ* (BIELY, 1985; UFFEN, 1997). Por esse motivo, os procedimentos de pré-tratamento frequentemente têm por finalidade a remoção parcial ou total do conteúdo de lignina e hemicelulose. Os pré-tratamentos descritos na literatura são classificados em: físicos (trituração mecânica e extrusão), químicos (ácidos, alcalinos, organosolv e líquidos iônicos), físico-químicos (explosão a vapor, explosão com amônia e água quente) e biológicos (enzimas microbianas). Além disso, os pré-tratamentos muitas vezes são utilizados de maneira simultânea com o propósito de alcançar melhores resultados e minimizar as desvantagens inerentes ao uso individual de cada procedimento (MOOD et al., 2013; POLIZELI et al., 2016a).

2.3 Sistema xilanolítico

Devido a sua heterogeneidade estrutural, a completa hidrólise da xilana requer a atividade de diversas enzimas, as quais atuam cooperativamente para converter a xilana em unidades monoméricas. O sistema xilanolítico inclui as (i) glicosil hidrolases, que hidrolisam as ligações glicosídicas, e as (ii) carboidrato esterases, que clivam as ligações éster entre os resíduos fenólicos e as unidades de xilose que compõem a cadeia principal da xilana (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; DESPRES et al., 2016).

As endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8) são as principais enzimas do sistema xilanolítico, dado que catalisam a bioconversão da xilana em xilooligossacarídeos de diferentes tamanhos a partir da hidrólise aleatória de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 no interior da sua cadeia principal. De modo geral, as endo-1,4- β -xilanases não hidrolisam unidades de xilobiose, pois a atividade catalítica dessas enzimas tende a diminuir com a redução da cadeia polimérica dos seus substratos (POLIZELI et al., 2005; NACKE et al., 2012). Em razão disso, o perfil de xilooligossacarídeos liberados será determinado pelo modo de ação de cada xilanase (BAJPAI, 2009). As β -xilosidases (EC 3.2.1.37), por sua vez, atuam em cooperação com as endo-1,4- β -xilanases, liberando unidades de xilose a partir das extremidades não redutoras dos xilooligossacarídeos. Contudo, algumas β -xilosidases podem passar a ter atividade de transxilosilação diante de elevadas concentrações de xilobiose e xilose, levando a síntese de β -xilósídeos (KURAKAKE et al., 2005).

As α -arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) são glicosil hidrolases que removem os resíduos de L-arabinofuranosil ligados às posições C-2 e/ou C-3 dos resíduos de xilose (POLIZELI et al., 2005; BURLACU; CORNEA; ISRAEL-ROMING, 2016). A remoção desses substituintes não só contribui para a despolimerização da xilana como também favorece o acesso das endo-1,4- β -xilanases (SUN et al., 2012). Além disso, a hidrólise de determinadas xilanas pode requerer a ação de α -glucuronidases (EC 3.2.1.139), enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações glicosídicas do tipo α -1,2 que unem os resíduos laterais de α -D-glucuronosil e/ou 4-O-metil- α -D-glucuronosil às unidades de xilose (POLIZELI et al., 2005; GÍRIO; FONSECA; CARVALHEIRO, 2010).

As esterases, dentro desse contexto, realizam a remoção dos demais substituintes do complexo estrutural da xilana. As acetil xilana esterases (E.C. 3.1.1.72) clivam as ligações éster que unem os grupos O-acetil aos resíduos de xilose da cadeia principal da xilana (POLIZELI et al., 2005), enquanto que as feruloil esterases (EC 3.1.1.73) e as ácido p-cumárico esterases (EC 3.1.1.-) hidrolisam as ligações éster que unem os grupos feruloil e p-cumaroil aos resíduos laterais de L-arabinose, respectivamente (SEGATO et al., 2014; BURLACU; CORNEA; ISRAEL-ROMING, 2016).

A figura abaixo apresenta a estrutura da xilana e as respectivas enzimas responsáveis pela sua despolimerização.

FIGURA 3: Representação hipotética da xilana e os seus respectivos pontos de clivagem.

A figura foi preparada utilizando o programa ChemSketch versão 12.0.

2.4 Classificação e modo de ação das xilanases

As endo-1,4-β-xilanases são regularmente classificadas com base nos seguintes critérios: massa molecular, ponto isoelétrico, mecanismo de ação e similaridade estrutural (COLLINS et al., 2005; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013). De acordo com o banco de dados CAZy, as endo-1,4-β-xilanases são classificadas junto às famílias 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 e 62 das glicosil hidrolases.

As xilanases pertencentes às famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43 contêm domínios catalíticos verdadeiramente distintos com atividade xilanásica, enquanto que as enzimas pertencentes às famílias 16, 51 e 62 são tidas como bifuncionais, contendo dois domínios catalíticos. As demais xilanases são agrupadas nas famílias 9, 12, 26, 30 e 44 por possuírem apenas uma atividade xilanásica residual (COLLINS et al., 2005; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013). Entretanto, a maior parte das xilanases conhecidas atualmente pertence às famílias 10 e 11, que correspondem às antigas famílias F e G, respectivamente (WANG et al., 2014).

As enzimas relativas às famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43 diferem entre si quanto ao mecanismo de ação, especificidade ao substrato, padrão estrutural e propriedades físico-

químicas (TAIBI et al., 2012). De modo similar, as xilanases das famílias 5, 7, 10 e 11 catalisam a hidrólise da xilana com o envolvimento de um par de resíduos de glutamato adequadamente posicionados em seus sítios catalíticos, sugerindo um mecanismo de duplo deslocamento, em que um intermediário covalente glicosil-enzima é formado e hidrolisado através de um estado de transição do tipo íon oxocarbênio (carbocátion positivamente carregado). Dois grupos carboxila estão envolvidos na formação do intermediário, um deles atua como um ácido protonando o substrato, enquanto que o segundo executa um ataque nucleofílico durante a formação do intermediário α -glicosil-enzima (inversão da configuração β para α). No segundo passo, o grupo carboxilato passa a funcionar como uma base geral, subtraindo um próton de uma molécula de água que, em seguida, realiza um ataque nucleofílico sobre o carbono anomérico. A segunda substituição, na qual o carbono anomérico passa novamente por um estado de transição, dá origem a um produto com a configuração β (inversão da configuração de α para β) (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013; ÁLVAREZ-CERVANTES et al., 2016). Portanto, ao final da catálise ocorre a retenção da configuração β no centro anomérico dos produtos de hidrólise (Figura 4).

FIGURA 4: Modelo hipotético do mecanismo catalítico de duplo deslocamento.

A figura foi preparada utilizando o programa ChemSketch versão 12.0.

As xilanases da família 11 possuem massa molecular usualmente menor que 20 kDa, altos valores de pI e uma arquitetura estrutural denominada de β -jelly roll composta por uma

α -hélice e duas folhas- β antiparalelas esculpindo a fenda catalítica, enquanto que as xilanases GH10 possuem massa molecular superior a 30 kDa, baixos valores de pI e uma conformação tridimensional em forma de barril $(\beta/\alpha)_8$, contendo oito α -hélices e oito folhas- β alternadas paralelamente (COLLINS et al., 2005; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013; ÁLVAREZ-CERVANTES et al., 2016).

Segundo Collins et al. (2005), a família 10 é formada por endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8), endo-1,3- β -xilanases (EC 3.2.1.32) e celobiohidrolases (EC 3.2.1.91). As xilanases agrupadas nessa família possuem menor especificidade à xilana, posto que as xilanases GH10 também apresentam atividade catalítica sobre substratos de outra natureza (COLLINS et al., 2005; CHENG et al., 2009; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013). Ademais, as xilanases GH10 possuem fendas catalíticas mais rasas, de tal forma que são mais ativas sobre os xilooligossacarídeos de baixo grau de polimerização (BIELY; VRSANSKÁ; TENKANEN, 1997; ÁLVAREZ-CERVANTES et al., 2016).

A família 11 é formada apenas por endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8). Essas xilanases também são denominadas de xilanases “verdadeiras”, pois atuam exclusivamente sobre polímeros de xilose. Em contraste com as demais glicosil hidrolases, as xilanases GH11 exibem alta seletividade, elevada eficiência catalítica, baixo valor de massa molecular e distintos valores ótimos de pH e temperatura (SHRINIVAS et al., 2010; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013). Em geral, as endo-xilanases GH11 são mais ativas sobre os xilooligossacarídeos de cadeia longa, visto que possuem uma fenda catalítica mais longa e profunda (BIELY; VRSANSKÁ; TENKANEN, 1997; SHRINIVAS et al., 2010; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

2.5 Produção

As xilanases são produzidas por vários organismos, tais como fungos, bactérias, leveduras, protozoários, caracóis, crustáceos e insetos (BRENNAN et al., 2004; DEVILLARD et al., 1999; SUDA; BUCKERIDGE; GIORGINI, 2003; SUZUKI; YOSHIDA; ASHIDA, 1991). Do ponto de vista industrial, os fungos filamentosos são mais interessantes devido ao fato de secretarem as xilanases para o meio. Além disso, os níveis de xilanase provenientes de culturas fúngicas são mais elevados em relação aos níveis dos demais microrganismos (HALTRICH et al., 1996).

Conforme Motta, Andrade e Santana (2013), aproximadamente 90% das xilanases comercializadas são produzidas por fermentação submersa. A produção de enzimas nessa condição é priorizada em relação à fermentação em estado sólido por permitir um controle mais rigoroso sobre as suas variáveis, bem como por conceber extratos enzimáticos com maior grau de pureza. Contudo, a qualidade do substrato indutor também deve ser considerada durante a seleção do método de produção mais apropriado ao nível de produção desejado. De modo geral, o uso da xilana pura tem sido limitado à produção seletiva de xilanases, já que outros substratos hemicelulósicos de baixo custo têm apresentado rendimentos similares (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

Ademais, a otimização das variáveis experimentais normalmente é realizada por meio de procedimentos que avaliam o efeito de uma única variável por vez (univariado), mantendo os outros fatores em nível constante. Porém, esses procedimentos são demorados e impróprios para avaliar os efeitos provenientes das interações entre as variáveis do processo em estudo. Tais desvantagens conduzem a uma otimização ineficiente por subestimar os níveis ótimos de cada variável experimental, que geralmente são alcançados apenas com o emprego de técnicas de análise multivariada (BRASIL et al., 2007). Dentre os diversos tipos de análise multivariada, o sistema de planejamento fatorial destaca-se por fornecer simultaneamente os efeitos das variáveis e de suas interações sobre a resposta em estudo mediante um número reduzido de ensaios experimentais (PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005).

Os planejamentos fatoriais geralmente são representados por n^k , sendo que “n” representa o número de níveis escolhidos e “k” o número de variáveis independentes. O caso mais simples de planejamento fatorial é aquele em que cada variável k está presente apenas em dois níveis (experimento fatorial 2^k), onde os níveis das variáveis independentes são representados de maneira codificada por -1 e +1. Em adição, replicatas do ponto central costumam ser realizadas para avaliar a influência do erro aleatório sobre a resposta em estudo (NEVES; SCHVARTZMAN; JORDAO, 2002; MONTGOMERY, 2005). Por fim, existe a possibilidade de ajustar um modelo de segunda ordem aos dados experimentais. Em tal situação, pontos axiais ($2k$) são adicionados ao fatorial 2^k de tal forma que se torna possível inferir os níveis que maximizam a resposta (LOPES, 2010; RODRIGUES; IEMMA, 2005).

2.6 Propriedades bioquímicas

A atividade enzimática é influenciada principalmente pelo pH e pela temperatura. As enzimas possuem um pH ótimo no qual a sua atividade catalítica é máxima, visto que as cadeias laterais ionizáveis dos seus aminoácidos podem ter participação tanto nas interações que mantêm a conformação tridimensional da proteína quanto nas interações que formam o complexo enzima-substrato. A temperatura, por sua vez, acelera a velocidade das reações químicas mediante o aumento da energia cinética das moléculas, contudo, o biocatalisador tende a ser desnaturado em temperaturas reacionais superiores ao seu valor de temperatura ótima (NELSON; COX, 2011).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, a maioria das xilanases purificadas a partir de fungos possuem valores de massa molecular compreendidos entre 20 e 40 kDa. Entretanto, algumas enzimas possuem valores bem distintos, como as xilanases produzidas por *Aspergillus caespitosus* e *Aspergillus fumigatus*, que possuem valores de massa molecular de 7,7 e 66 kDa, respectivamente (SANDRIM et al., 2005; THIAGARAJAN; JEYA; GUNASEKARAN, 2006). Além disso, as xilanases fúngicas normalmente são caracterizadas como proteínas monoméricas e apresentam diferentes valores de pI. As xilanases isoladas de *Penicillium funiculosum* e *Thermomyces lanuginosus*, por exemplo, possuem pI ácido, enquanto que as xilanases de *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Scytalidium thermophilum* e *Trichoderma reesei* apresentam pI alcalino (Tabela 1).

A máxima atividade xilanásica usualmente ocorre na faixa de pH compreendida entre 5,0 e 7,0. Contudo, também existem relatos de enzimas com valores extremos de pH, como as xilanases de *Scytalidium acidophilum* e *Penicillium citrinum*, por exemplo, que apresentam melhor desempenho catalítico em pH de 3,2 e 8,5, respectivamente (BELIËN; VAN CAMPENHOUT; VAN ACKER, 2005; DUTTA et al., 2007). Ademais, essas xilanases tendem a ser estáveis em uma extensa faixa de pH (2,0-9,0). Em relação à temperatura, as xilanases isoladas de fungos mesofílicos, em geral, possuem melhor atividade enzimática entre 50 e 60 °C, enquanto que as xilanases termofílicas apresentam melhor desempenho catalítico em temperaturas ainda mais elevadas, como a xilanase de *Talaromyces thermophilus* (Tabela 1).

TABELA 1: Características físico-químicas de xilanases fúngicas.

Fungo	Massa molecular (kDa)	pI	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Substrato	Km (mg/mL)	Família GH	Referência
<i>Aspergillus carneus</i>	18,8	7,7-7,9	6,0	50	Xilana Birchwood	-	11	Fang et al. (2008)
<i>Aspergillus niger</i>	25,0	-	5,5	55	Xilana Birchwood	0,10	11	Yang et al. (2010)
<i>Aspergillus niger</i>	23,0	5,6	5,5	50	Xilana Oat spelt	7,10	11	Levasseur, Asther e Record (2005)
<i>Aspergillus terreus</i>	19,0	9,0	7,0	50	Xilana Birchwood	2,50	11	Kocabas, Kocabas e Bakir (2011)
<i>Fusarium oxysporum</i>	38,0	9,5	7,0	45	Xilana Oat spelt	0,80	10	Christakopoulos et al. (1997)
<i>Fusarium proliferatum</i>	22,4	-	5,0-5,5	55	Xilana Oat spelt	8,40	11	Saha (2002)
<i>Penicillium funiculosum</i>	23,6	3,7	5,0	55	Xilana Birchwood	4,70	11	Furniss et al. (2002)
<i>Penicillium funiculosum</i>	36,0	4,6	4,2-5,2	-	Xilana Birchwood	2,00	10	Furniss, Williamson e Kroon (2005)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	33,0	8,6	7,0	60	Xilana Birchwood	-	10	Belancic et al. (1995)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	23,0	5,9	3,5	50	Xilana Birchwood	-	11	Belancic et al. (1995)
<i>Scytalidium thermophilum</i>	21,0	8,6	6,5	65	Xilana Beechwood	2,40	11	Kocabas, Güder e Özben (2015)
<i>Talaromyces thermophilus</i>	25,0	-	7,0-8,0	75-80	Xilana Birchwood	22,51	11	Maalej et al. (2009)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	23,6	3,8	6,5	70-75	Xilana Birchwood	3,26	11	Lin et al. (1999)
<i>Trichoderma sp</i>	30,1	-	5,5	70	Xilana Beechwood	4,47	10	Chen et al. (2009)
<i>Trichoderma sp</i>	20,1	-	5,0	55	Xilana Beechwood	8,33	11	Chen et al. (2009)
<i>Trichoderma reesei</i>	32,0	9,1	6,0	55	Xilana Birchwood	2,02	10	Xu et al. (1998)

2.7 Purificação

A presença de metabólitos secundários pode impossibilitar o uso de preparações enzimáticas em alguns setores industriais, como nas indústrias farmacêuticas, por exemplo, que requerem enzimas com elevado grau de pureza (KUMAR; SHARMA, 2015; YEGIN, 2017). Os métodos de purificação mais comumente utilizados incluem cromatografias de troca iônica, interação hidrofóbica, afinidade e exclusão molecular (BAJPAI, 2009). Em tese, os esquemas de purificação são empíricos, ou seja, baseados em tentativas e erros, e devem ser elaborados para cada proteína individualmente com base em suas características físico-químicas (CAI et al., 2011).

A purificação de xilanases a partir de uma mistura de proteínas geralmente envolve vários passos, e cada um dos quais pode ser dispendioso e demorado, diminuindo o rendimento final da purificação (JUTURU; WU, 2012). Todavia, atualmente, as técnicas de recombinação gênica têm viabilizado a marcação de proteínas como uma estratégia para direcionar a subsequente purificação. Dentro desse contexto, a expressão de proteínas fusionadas com uma cauda de poli-histidina tem sido preferencialmente utilizada (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). Do ponto de vista econômico, as estratégias de purificação em uma única etapa, capazes de assegurar altos níveis de pureza e diminuir os custos de produção, são fundamentais para ensejar o uso de enzimas em escala industrial (YEGIN, 2017).

2.8 Aplicações biotecnológicas

Nos últimos anos, o interesse por xilanases tem crescido notavelmente em função de sua importância industrial, a exemplo da conversão enzimática de materiais lignocelulósicos em xilooligossacarídeos e açúcares fermentáveis. De modo geral, as xilanases têm se destacado por elevar as taxas de produtividade e reduzir os custos de produção, assim como por tornar os processos industriais mais favoráveis segundo as diretrizes ambientais (DESWAL et al., 2012; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

2.8.1 Indústria de papel e celulose

As xilanases são utilizadas na indústria de papel e celulose como uma etapa de pré-branqueamento, uma vez que a natureza do seu efeito consiste em facilitar a subsequente remoção dos polímeros de lignina por agentes químicos (BAJPAI, 1999). Portanto, as xilanases não atuam diretamente sobre os cromóforos de lignina, e sim sobre a rede de xilana pela qual a lignina é cercada e aprisionada (BAJPAI; ANAND; BAJPAI, 2006).

A aplicação de enzimas no branqueamento da polpa de celulose foi relatada pela primeira vez por Viikari et al. (1986). Nesse estudo, a adição de xilanases ao processo proporcionou uma redução significativa na demanda química de oxigênio. Posteriormente, as investigações foram direcionadas à oxidação da lignina por ligninases, como as lacases, mas essas enzimas apresentaram um efeito limitado no branqueamento da polpa de celulose em virtude de sua atividade ser restrita às subunidades fenólicas (VISWANATH et al., 2014). Contudo, a posterior descoberta do mediador químico 2,2'-azinobis (3-etilbenztiazolina-6-sulfonato) (ABTS) permitiu estender a atividade de lacases para ambas as subunidades da lignina, fenólicas e não fenólicas, aumentando significativamente a sua eficiência (BOURBONNAIS et al., 2000). Atualmente, estima-se que um grande número de usinas norte-americanas, sul-americanas, europeias e japonesas estejam utilizando tanto as xilanases como as ligninases em seus processos de clarificação da polpa de celulose (BAJPAI, 2009).

As empresas diferem em seus processos de branqueamento de acordo com o grau de alvura desejado. Basicamente, os compostos químicos mais comumente utilizados são: hidróxido de sódio (NaOH), sulfeto de sódio (NaH₂S), dióxido de cloro (ClO₂), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), oxigênio (O₂) e ozônio (O₃). As principais variáveis do processo de branqueamento correspondem à concentração dos produtos químicos, intensidade de agitação, temperatura e pH da reação (DE VAAL; SANDROCK, 2007). Diante disso, a seleção de enzimas tolerantes a tais variáveis é imprescindível para consolidar a sua aplicabilidade nesse segmento, que representa um grande avanço ecológico por reduzir significativamente o volume de efluente a ser tratado e os impactos ambientais causados pelo descarte inadequado de resíduos organoclorados (BAJPAI, 2009; GANGWAR; PRAKASH; PRAKASH, 2014).

2.8.2 Indústria de alimentos

Na produção de pães, a aplicação de xilanases sobre a farinha de trigo, que apresenta uma considerável porcentagem de arabinoxilanas, permite a obtenção de uma massa com melhor consistência, textura e volume, além de prolongar a vida de prateleira do produto final (DOBREV et al., 2007; HEINEN et al., 2014). As xilanases também são usualmente utilizadas em combinação com outras enzimas durante a extração e clarificação de sucos e vinhos, aumentando o rendimento e a qualidade do produto (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

Hodiernamente, existe um grande interesse na produção de xilooligossacarídeos e xilose a partir de materiais lignocelulósicos desprezados pelo setor agroindustrial. Os xilooligossacarídeos têm sido preferencialmente utilizados como componentes prebióticos no desenvolvimento de novos alimentos funcionais, pois favorecem o aumento da absorção mineral, induzem o peristaltismo e atuam como substrato regulador da flora intestinal (HEINEN et al., 2017), enquanto que os resíduos de xilose, por sua vez, podem ser convertidos a xilitol, um edulcorante amplamente utilizado em substituição ao açúcar de mesa (sacarose) pelos diabéticos (MEYRIAL et al., 1991; SENA et al., 2016).

2.8.3 Indústria farmacêutica

Os xilooligossacarídeos são oligômeros de açúcar formados por unidades de xilose e estão presentes naturalmente em frutas, vegetais, leite e mel. A sua produção industrial é obtida principalmente a partir da hidrólise de materiais lignocelulósicos por ação de endo-1,4- β -xilanases. Essas biomoléculas, bioativas, possuem estabilidade em ampla faixa de pH e elevada resistência ao calor, características que favorecem a sua viabilidade comercial. Os xilooligossacarídeos podem ser utilizados como antioxidantes na prevenção do estresse oxidativo, anemia, aterosclerose, diabetes, osteoporose e certos tipos de câncer (DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012). Além disso, esses compostos demonstraram ter importante atividade imunomoduladora, antimicrobiana, antialérgica e anti-inflamatória (AACHARY; PRAPULLA, 2011; DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012; KUMAR; PUSHPA; PRABHA, 2012; GUPTA et al., 2016).

2.8.4 Alimentação animal

A alimentação animal é rica em biomassa composta por celulose, hemicelulose e lignina. Contudo, as propriedades viscosas dos materiais lignocelulósicos impedem a sua completa digestão (KALIM et al., 2015). Desta forma, a adição de xilanases às dietas de animais tem assegurado uma melhor digestão desses polímeros (PIRGOZLIEV et al., 2015; YEGIN, 2017). Além da conversão da xilana em açúcares que possam ser mais facilmente assimilados, as xilanases também produzem biomoléculas com ação prebiótica sobre a microbiota intestinal, como xilobiose e xilotriose, que promovem o crescimento seletivo de bactérias benéficas em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente patogênicas (BAJPAI, 2009; KALIM et al., 2015; CHOCT, 2015).

2.8.5 Produção de bioetanol

O constante aumento da temperatura média do planeta tem estimulado uma busca sem precedentes por matrizes energéticas limpas e renováveis (POLIZELI et al., 2016b; UDAY et al., 2016). Dentre as alternativas atualmente disponíveis, o etanol se apresenta como a principal opção ao consumo de combustíveis fósseis (KANIMOZHI; NAGALAKSHMI, 2014). No Brasil, a principal matéria-prima utilizada para a produção desse biocombustível é a cana-de-açúcar. Todavia, a produção do etanol de segunda geração a partir de resíduos agroindustriais tem angariado maior interesse dos pesquisadores que buscam opções mais ecossustentáveis e, sobretudo, que não interfiram na oferta global de alimentos (SARKAR et al., 2012; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

A produção do etanol de segunda geração pode ser dividida em duas etapas principais. A primeira etapa corresponde ao processo de deslignificação do material lignocelulósico e a subsequente hidrólise dos seus polissacarídeos, enquanto que o passo seguinte é marcado pela fermentação dos açúcares provenientes da etapa anterior (POLIZELI et al., 2016b). Dentro desse contexto, os biocatalisadores com atividade celulásica e/ou xilanásica possuem grande importância sobre a despolimerização das macromoléculas de celulose e hemicelulose, principalmente por aumentar o rendimento e, em vista disso, reduzir os custos de produção (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste estudo foi isolar uma nova endo-1,4- β -xilanase a partir do fungo *A. tamarii* Kita, utilizando técnicas de produção e purificação acessíveis que pudessem viabilizar economicamente a integração desse biocatalisador aos processos industriais.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Otimizar as variáveis do processo de fermentação submersa para elevar a produção xilanásica;

3.2.2 Avaliar a bioconversão de resíduos agroindustriais em açúcares fermentáveis mediante ensaios de sacarificação enzimática;

3.2.3 Imobilizar e estabilizar a endo-xilanase em matrizes de caráter covalente;

3.2.4 Analisar o perfil de hidrólise da xilana *beechwood* por ação do derivado glioxil-agarose em elevadas temperaturas;

3.2.5 Purificar a enzima por meio de técnicas cromatográficas de troca iônica e investigar as suas propriedades físico-químicas e estruturais;

3.2.6 Avaliar o potencial da endo-xilanase purificada em produzir xilooligossacarídeos de interesse biotecnológico.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento, manutenção e identificação da linhagem fúngica

O fungo *A. tamaritii* Kita utilizado neste estudo foi previamente isolado de uma amostra de solo do Refúgio Biológico Bela Vista, localizado em Foz do Iguaçu - PR. A cepa foi mantida em tubos de ensaio contendo meio inclinado de ágar batata dextrose (BDA) durante 10 dias, a 28 °C. Após o período de crescimento, as culturas foram refrigeradas e utilizadas por até 30 dias.

A identificação taxonômica do fungo foi estabelecida tanto por análise morfológica, junto a Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco, quanto por biologia molecular. Para a identificação em nível molecular, o DNA genômico da cepa em estudo foi extraído de sua massa micelial de acordo com a metodologia descrita por Raeder e Broda (1985). A região espaçadora transcrita interna (ITS) do gene do RNA ribossomal foi amplificada utilizando um par de iniciadores universais ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi conduzida em termociclador sob as seguintes condições: uma etapa de desnaturação inicial a 95 °C por 60 segundos, seguida de 35 ciclos compostos por uma segunda etapa de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, uma etapa de anelamento a 57 °C por 60 segundos e uma etapa de extensão a 72 °C por 15 minutos. A reação foi finalizada com uma extensão adicional a 72 °C por 5 minutos. Após sequenciamento dos produtos de PCR, as sequências encontradas foram comparadas àquelas depositadas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>), utilizando o programa BLASTn. A sequência compreendida entre ITS1 e ITS4, correspondente a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal de *A. tamaritii* Kita, foi depositada no NCBI com o seguinte número de acesso: KJ995575.1.

4.2 Condições de cultivo para a produção enzimática

Para a produção enzimática, o fungo *A. tamaritii* Kita foi cultivado em meio de cultura Adams (ADAMS, 1990) suplementado com o resíduo bagaço de cevada. Inicialmente, os conídios foram suspensos em água destilada estéril e, em seguida, alíquotas de 1,0 mL dessa suspensão (10^6 conídios/mL) foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo

25 mL de meio líquido. A fermentação por cultura submersa foi realizada em condições estáticas, a 28 °C. Ao final, os extratos enzimáticos foram recuperados por filtração a vácuo em papel filtro qualitativo (Whatman nº 1) e dialisados contra água destilada por aproximadamente 12 horas.

4.3 Substratos lignocelulósicos

O resíduo bagaço de cevada, cedido pela cervejaria Martignoni Bier (Cascavel, PR), foi utilizado tanto para a produção de enzimas quanto em um delineamento experimental de misturas, neste caso, junto aos resíduos de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor, provenientes das usinas Galo Bravo (Ribeirão Preto, SP) e Nardini (Vista Alegre do Alto, SP), respectivamente. Todos os materiais lignocelulósicos foram lavados duas vezes em água deionizada por 5 minutos e, em seguida, mantidos submersos em água deionizada por 16 horas. A secagem foi realizada em estufa a 60 °C. Ao final, os resíduos foram processados em moinho de facas até a redução de suas partículas ao tamanho médio de 5 milímetros.

4.4 Delineamento composto central rotacional do tipo 2³

Um planejamento experimental inteiramente casualizado de análise multivariada foi aplicado para melhorar a produção inicial de xilanases, enquanto que a usual análise univariada, por sua vez, foi utilizada apenas para delimitar a faixa de teste para cada uma das três variáveis em estudo: concentração do resíduo bagaço de cevada (X_1), volume de meio Adams (X_2) e tempo de cultivo (X_3). Os níveis das variáveis independentes foram definidos mediante um delineamento composto central rotacional do tipo 2³ (configuração em estrela), contendo 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 repetições do ponto central, totalizando um delineamento de 17 experimentos. Ao final, uma função polinomial de segunda ordem foi ajustada aos dados experimentais.

A significância geral do modelo de regressão foi determinada pela análise de variância (ANOVA), que segue a distribuição de Fisher. A ideia dessa análise é utilizar o teste *F* para determinar se há rejeição ou não da hipótese nula (H_0). Esse teste verifica se existe uma relação linear entre a resposta (variável dependente) e as variáveis regressoras (variáveis

independentes). Quando se rejeita H_0 , ou seja, aceita-se H_1 , conclui-se que os tratamentos possuem efeitos diferentes sobre a variável dependente. A qualidade do ajuste da regressão, por sua vez, foi estimada através do coeficiente de determinação (R^2) (HASSAÏNE et al., 2014). Nas representações gráficas, a escala qualitativa de cores (verde-amarelo-vermelho) representa o intervalo entre os piores e os melhores valores para cada variável independente, sendo demarcados por uma coloração equivalente caso apresentem efeitos similares sobre a resposta analisada (CEGLIE et al., 2015).

4.5 Ensaios enzimáticos

As atividades de endo-1,4- β -xilanase, endo-1,4- β -glucanase, exo-1,4- β -glucanase, amilase e pectinase foram estimadas através do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), como descrito por Miller (1959). Os substratos utilizados para essas enzimas foram, respectivamente, xilana de faia (*beechwood*; Sigma), carboximetil celulose (Sigma), celulose microcristalina (Avicel; Sigma), amido (Reagen) e pectina (Sigma).

As misturas reacionais continham 50 μ L de extrato enzimático adequadamente diluído e 50 μ L de substrato 1% (m/v) dissolvido em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5. Todas as reações foram realizadas a 50 °C. Após os intervalos de tempo (minutos) adequados a cada enzima, as reações foram interrompidas pela adição de 100 μ L do reagente DNS aos tubos de ensaio. Em seguida, esses tubos foram submetidos à fervura por 10 minutos. Em princípio, os açúcares formados reduzem o reagente DNS no decurso da etapa de fervura, transformando-o em um composto de coloração alaranjada (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico) que pode ser detectado por espectrofotometria a 540 nm (Figura 5). Após resfriamento, as misturas foram diluídas com 1,0 mL de água destilada e, subsequentemente, alíquotas de 100 μ L do volume final foram tomadas para estimar a concentração de açúcares redutores formados durante os ensaios reacionais. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto nas condições do experimento.

FIGURA 5: Redução do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) por açúcares redutores.

As atividades de β -glucosidase, β -xilosidase e α -L-arabinofuranosidase foram determinadas utilizando os substratos *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (Sigma), *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (Sigma) e *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (Sigma), respectivamente, como descrito por Souza et al. (2010). As misturas reacionais continham 100 μ L de extrato enzimático bruto adequadamente diluído, 200 μ L de substrato sintético 0,4% (m/v) e 100 μ L de tampão acetato de sódio 200 mM, pH 5,5. As reações foram realizadas a 50 °C. Após os intervalos de tempo (minutos) adequados a cada enzima, as reações foram interrompidas pela adição de 800 μ L de uma solução saturada de tetraborato de sódio aos tubos de ensaio. A quantidade de *p*-nitrofenol liberada foi detectada por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto nas condições do experimento.

4.6 Dosagem de proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas através do método de Bradford (1976), que utiliza como reagente o corante *Coomassie brilliant blue* G-250. Esse método é baseado na interação entre o corante e as macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos com cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação (ácido), essas interações provocam o deslocamento da forma protonada do *coomassie* para a sua forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm. Para o preparo da curva de calibração, utilizou-se como padrão uma solução de soro albumina bovina (0,1 mg/mL).

4.7 Eletroforese em condições não desnaturantes para proteínas nativas ácidas

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para proteínas nativas ácidas foi realizada conforme a metodologia descrita por Davis (1964). O gel de poliacrilamida 8%

(m/v) foi polimerizado entre placas de vidro com espessura de 1,0 mm. A eletroforese foi desenvolvida em tampão de corrida pH 8,3 (Tris-HCl 25 mmol/L e Glicina 192 mmol/L) sob tensão de 140 V e uma corrente elétrica de 40 mA. Após a conclusão da eletroforese, o gel foi dividido em duas partes: a primeira parte foi revelada com nitrato de prata para determinação do perfil proteico (BLUM; BEIER; GROSS, 1987), enquanto que a segunda parte foi utilizada para o zimograma. O zimograma foi realizado mediante incubação do gel em solução de xilana *beechwood* 0,5% (m/v), pH 5,5. Essa reação foi mantida por 30 minutos a 50 °C. Ao final, o zimograma foi corada com Vermelho Congo 0,2% (m/v) por 10 minutos e, em seguida, descorado com NaCl 2M.

4.8 Identificação das proteínas de interesse por espectrometria de massas

As proteínas extraídas do gel de poliacrilamida foram dissolvidas em solução desnaturante (ureia 8,0 M, Tris-HCl 100 mM, pH 8,5), reduzidas com ditioneitol 5 mM, alquiladas com iodoacetamida 200 mM e, em seguida, submetidas à digestão trípica. Ao final, as amostras digeridas foram acidificadas com ácido fórmico 1% (v/v) e analisadas por espectrometria de massas em MALDI-TOF/TOF (Kratos-Shimadzu, Manchester, UK).

A identificação das proteínas foi realizada com base em seus espectros de MS e MS/MS, os quais foram submetidos à comparação por similaridade em bancos de dados para proteínas não redundantes do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/NCBI), empregando o programa de interface Mascot (Matrix Science Ltd.) para testar a significância estatística das identificações. Os parâmetros de busca foram: enzima tripsina, um sítio de clivagem perdido, oxidação de metionina como modificação variável, tolerância da massa do íon precursor de +/- 1,2 Da e tolerância da massa do fragmento de +/- 0,8 Da.

4.9 Ensaio de sacarificação enzimática utilizando um delineamento experimental de misturas

Um delineamento centróide *simplex* foi utilizado para avaliar o efeito de três diferentes substratos lignocelulósicos em um experimento de sacarificação enzimática. Esse delineamento de misturas foi composto por sete combinações distintas: 3 experimentos com componentes puros, 3 experimentos com misturas binárias e um ponto central com replicatas

para avaliar o erro associado ao modelamento (COSCIONE; ANDRADE; MAY, 2005). Os meios reacionais continham 100 mg de substrato(s) e 10 mL de extrato enzimático tamponado com acetato de sódio 200 mM, pH 5,5. As hidrólises foram conduzidas a 50 °C por 48 horas. As alíquotas coletadas foram fervidas durante 5 minutos e imediatamente congeladas para a subsequente quantificação dos açúcares de interesse. Os modelos matemáticos (linear, quadrático e cúbico especial) mais adequados às respostas em estudo foram selecionados com base na significância de seus parâmetros estatísticos, incluindo o coeficiente de determinação e o valor de *F* da distribuição de Fisher.

4.10 Análise dos produtos de sacarificação enzimática por CLAE

Os produtos de hidrólise foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando uma coluna Supelcogel C611 (7,8 x 300 mm; 60 °C) como matriz de separação. Uma solução de NaOH 0,4 mM foi utilizada como fase móvel em fluxo constante de 0,5 mL/min. Os açúcares eluídos foram monitorados por um detector de índice de refração (modelo R401, Waters) e identificados com base nos seus tempos de retenção.

4.11 Imobilização iônica da xilanase em carboximetil-celulose (CM-celulose)

Previamente ao início do processo de imobilização, 5 g do suporte CM-celulose e 50 mL de extrato enzimático bruto (0,148 mg/mL) foram equilibrados com tampão acetato de sódio 20 mM, pH 4,5. A mistura reacional foi deixada em agitador de rolos por 24 horas, a 4 °C. Para obtenção do derivado CM-celulose, as alíquotas recolhidas (0, 30, 60, 120, 180, 240 e 1440 min) foram centrifugadas durante 3 minutos a 10.000 x *g*. Os ensaios enzimáticos foram realizados com 15 mg desse derivado.

4.12 Dessorção da xilanase imobilizada em CM-celulose

Inicialmente, o derivado CM-celulose (1 g) foi dissolvido em 10 mL de tampão acetato de sódio 20 mM, pH 4,5. Em seguida, a força iônica do sistema foi modificada

mediante um gradiente descontínuo de NaCl (0-3 M). Alíquotas do sobrenadante e da mistura foram recolhidas após cada adição de NaCl ao sistema para os subseqüentes ensaios de monitoramento. Além disso, um experimento controle foi realizado para descartar uma possível interferência do sal sobre a atividade enzimática.

Em adição, uma segunda abordagem de dessorção foi realizada através de um gradiente de pH. Para esse experimento, o derivado foi dissolvido nos seguintes tampões: acetato de sódio (pH 4,5 e 5,0), MES (pH 5,5 e 6,0) e fosfato de sódio (pH 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0), todos a 100 mM. Alíquotas dos sobrenadantes foram recolhidas após a centrifugação (10.000 x g/1 min) das misturas para inferir o perfil de dessorção da xilanase. A fração com a maior atividade enzimática, referente à xilanase dessorvida, foi tomada como 100%.

4.13 SDS-PAGE para análise do perfil de proteínas imobilizadas em CM-celulose

A análise do perfil de proteínas imobilizadas e dessorvidas do suporte CM-celulose foi realizada por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme a metodologia de Laemmli (1970), utilizando um gel de poliacrilamida em gradiente 4-15% (Bio-Rad) como matriz de separação. A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente durante 1 hora, sob tensão de 120 V e uma corrente elétrica de 40 mA. Após a corrida, o gel foi revelado com nitrato de prata (BLUM; BEIER; GROSS, 1987).

4.14 Zimograma da xilanase dessorvida

Uma análise em PAGE para proteínas nativas básicas foi realizada para detecção da xilanase dessorvida do suporte CM-celulose, conforme a metodologia descrita por Reisfeld et al. (1962). O gel de poliacrilamida 8% (m/v) foi polimerizado entre placas de vidro com espessura de 1 mm. A eletroforese foi desenvolvida em tampão de corrida pH 4,5 (constituído de β -alanina e ácido acético glacial 0,35 M) sob tensão de 140 V e uma corrente elétrica de 40 mA. Após o término da eletroforese, o gel foi dividido em duas partes: a primeira parte foi revelada com nitrato de prata para determinar a posição da proteína de interesse (BLUM; BEIER; GROSS, 1987), enquanto que a segunda parte foi destinada ao zimograma. O zimograma foi realizado mediante incubação do gel em solução de xilana *beechwood* 0,5% (m/v), pH 5,5. Essa reação foi mantida por 30 minutos a 50 °C. Ao final, o zimograma foi

corada com Vermelho Congo 0,2% (m/v) por 10 minutos e, em seguida, descorado com NaCl 2M.

4.15 Imobilização covalente da xilanase em brometo de cianogênio (CNBr-agarose)

A imobilização da xilanase sobre o suporte CNBr-agarose foi realizada segundo a metodologia de Mateo et al. (2005). O Suporte foi inicialmente ativado por meio do contato de 2 g de CNBr-agarose com 50 mL de água destilada pH 2,0, durante 1 hora em agitador de rolos. Em seguida, a preparação foi filtrada e lavada com água destilada abundante. Após o processo de ativação do suporte, 20 mL de xilanase pura (0,29 mg), previamente dessorvida do derivado CM-celulose, foram adicionados a 2 g do suporte CNBr-agarose pré-equilibrado com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 8,0. A mistura foi mantida em agitação durante 45 minutos. Após esse período, o derivado foi filtrado e lavado com uma solução de etanolamina 1 M, pH 8,0. Por fim, uma etapa de bloqueio foi realizada com a mesma solução de etanolamina por 12 horas. O derivado CNBr-agarose, obtido mediante ligações de caráter covalente unipontual, foi utilizado como controle nos ensaios enzimáticos por preservar as propriedades físico-químicas da proteína nativa e por simular um ambiente reacional semelhante ao dos demais derivados (PEREIRA et al., 2015). As dosagens enzimáticas foram realizadas com 30 mg desse derivado.

4.16 Imobilização covalente da xilanase em glioxil-agarose

A imobilização covalente multipontual sobre o suporte glioxil-agarose foi realizada de acordo com a metodologia de Guisán et al. (1998). Um volume de 20 mL de xilanase pura (0,29 mg), previamente dessorvida do derivado CM-celulose, foi adicionado a 2 g do suporte glioxil-agarose. O sistema foi equilibrado em tampão bicarbonato de sódio 100 mM, pH 10,3, e mantido em agitação durante 12 horas. A redução das ligações foi realizada pela adição de 20 mg de boroidreto de sódio. Ao final, o derivado foi filtrado e lavado com água destilada abundante. As dosagens enzimáticas foram realizadas com 30 mg desse derivado.

4.17 Ensaios enzimáticos para caracterização bioquímica dos derivados

As dosagens enzimáticas foram realizadas a partir de misturas reacionais contendo 50 µL de xilana *beechwood* 4% (m/v) e 50 µL do respectivo derivado dissolvido em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5. As reações foram incubadas a 60 °C durante 5 minutos. Ao término das reações, 100 µL do reagente DNS foram adicionados aos tubos de ensaio. Seguidamente, esses tubos foram submetidos à fervura por 10 minutos. Após o resfriamento, as misturas foram diluídas com 1,0 mL de água destilada e, em seguida, alíquotas de 100 µL do volume final foram tomadas para estimar o teor de açúcares redutores. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima imobilizada capaz de liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto nas condições do experimento.

4.18 Determinação dos parâmetros de imobilização

O rendimento de imobilização (%) foi calculado com base na diferença entre a quantidade de proteína oferecida e a quantidade de proteína presente no meio reacional após os processos de imobilização, enquanto que a atividade recuperada (%) foi determinada a partir da razão entre a atividade do derivado e a atividade teoricamente imobilizada. A atividade específica, por sua vez, foi definida como a atividade do derivado por miligrama de proteína imobilizada (U/mg).

4.19 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade dos derivados covalentes

O efeito do pH sobre a atividade dos derivados foi determinado mediante ensaios enzimáticos na faixa de pH compreendida entre 3,0 e 9,0. Os tampões utilizados foram: citrato de sódio (pH 3,0, 3,5 e 4,0), acetato de sódio (pH 4,0, 4,5, 5,0 e 5,5), MES (pH 5,5, 6,0 e 6,5), MOPS (pH 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0) e Tris-HCl (pH 8,0, 8,5 e 9,0), todos a 200 mM. Após a determinação do valor de pH ótimo, a influência da temperatura sobre a atividade enzimática foi investigada entre 35 e 80 °C. Os valores da atividade relativa foram calculados em função do valor de maior atividade enzimática, o qual foi tomado como 100%.

4.20 Estabilidade dos derivados covalentes frente a diferentes valores de pH e temperatura

A estabilidade ao pH foi realizada por incubação dos derivados, na ausência de substrato, à temperatura ambiente por 24 horas utilizando a mesma faixa de pH mencionada no item 4.19. Os ensaios de inativação térmica, por sua vez, foram conduzidos por incubação dos derivados na faixa de temperatura compreendida entre 50 a 80 °C. Alíquotas foram retiradas em diferentes tempos para a determinação instantânea da atividade xilanásica residual. Os valores da atividade relativa foram calculados com base nos valores da atividade enzimática inicial (100%).

4.21 Estabilidade operacional dos derivados

A estabilidade operacional dos derivados foi testada por 5 ciclos reacionais consecutivos. As misturas reacionais continham 100 µL de xilana *beechwood* 4% (m/v), 100 mg de derivado e 100 µL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5. As reações foram realizadas em banho seco a 60 °C, durante 5 minutos. Ao final de cada reação, os derivados foram recuperados por centrifugação (4.000 x g/3 min) e reutilizados, enquanto que os seus sobrenadantes foram destinados à quantificação de açúcares redutores totais. Após cada ciclo, os derivados foram lavados com o intuito de remover qualquer fração residual de açúcares.

4.22 Ensaio de hidrólise com o derivado glioxil-agarose

O potencial do derivado glioxil-agarose em catalisar a hidrólise da xilana *beechwood* foi comparado ao potencial catalítico da xilanase nativa. A mistura de reação (5 mL) continha 8 unidades totais de atividade enzimática e 1% de xilana *beechwood* (m/v) tamponada com acetato de sódio 100 mM, pH 5,5. As reações foram realizadas em banho seco sob rotação de 50 rpm, nas temperaturas de 60 e 80 °C. Alíquotas de 500 µL foram retiradas nos seguintes tempos: 0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos. Ademais, ensaios de controle foram realizados em ambas as temperaturas com a intenção de avaliar uma possível interferência térmica sobre a hidrólise do substrato. A relação percentual de cada xilooligossacarídeo identificado foi determinada por CLAE, como descrito no item 4.10.

4.23 Purificação da xilanase GH11 em coluna cromatográfica de troca iônica

O extrato enzimático bruto de *A. tamaritii* Kita foi inicialmente equilibrado em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5. Em seguida, 90 mL desse extrato foi aplicado em uma coluna cromatográfica de troca iônica CM-celulose (10 x 2 cm), previamente equilibrada em igual sistema de tamponamento. A eluição da xilanase de interesse foi concluída após dois passos. Primeiramente, um gradiente linear de NaCl (0-3 M) foi aplicado sobre o sistema. No passo seguinte, o potencial hidrogeniônico da solução salina de 3 M foi alterada para o valor de pH 8,0. A eluição foi realizada sob um fluxo de 2,0 mL/min, sendo coletado um volume de 4 mL por tubo de ensaio. As frações com atividade xilanásica foram reunidas, dialisadas contra água destilada e concentradas através de um dispositivo de ultrafiltração com massa molar de corte de 10 kDa.

4.24 Análise de pureza da xilanase purificada

A pureza da xilanase purificada foi verificada mediante uma eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE), de acordo com a metodologia de Laemmli (1970). Um gel de poliacrilamida em gradiente 4-15% (Bio-Rad) foi utilizado como matriz de separação. As condições de eletroforese foram semelhantes às descritas no item 4.13. Após a eletroforese, o gel foi revelado com nitrato de prata (BLUM; BEIER; GROSS, 1987).

4.25 Ensaios enzimáticos para caracterização bioquímica da xilanase purificada

Os ensaios enzimáticos para caracterização bioquímica da xilanase purificada foram realizados a partir de misturas reacionais contendo 50 µL de xilana *beechwood* 4% (m/v) e 50 µL de xilanase tamponada em acetato de sódio 100 mM, pH 5,5. As reações foram incubadas a 60 °C durante 5 minutos. Ao término das reações, 100 µL do reagente de DNS foram adicionados aos tubos de ensaio. Seguidamente, esses tubos foram submetidos à fervura por 10 minutos. Após o resfriamento, as misturas foram diluídas com 1,0 mL de água destilada. Por fim, alíquotas de 100 µL do volume final foram tomadas para estimar o teor de açúcares redutores. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto nas condições do experimento.

4.26 Determinação do ponto isoelétrico

O ponto isoelétrico da xilanase purificada foi determinado por eletroforese em gel bidimensional. Para a focalização isoelétrica, tiras IPG (GE Healthcare) de 7 cm com gradiente de pH (3,0-10,0) imobilizado em gel de poliacrilamida foram utilizadas. A amostra previamente precipitada com ácido tricloroacético foi ressuspensa em solução de reidratação (DeStreak Rehydration Solution, GE Healthcare) e, seguidamente, aplicada sobre o suporte IPGBox. As tiras IPG, posicionadas sobre a amostra, foram reidratadas passivamente por 14 horas à temperatura ambiente. A isoeletrofocalização ocorreu em quatro etapas: 500 V por 60 minutos, 1.000 V por 60 minutos, 8.000 V por 4 horas e 8.000 V por 6 horas.

Após a primeira dimensão, as tiras foram equilibradas em 20 mL de tampão de equilíbrio pH 8,8 [ureia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v), Tris-HCl 50 mM e traços de azul de bromofenol] contendo 10 mg/mL de DTT. Em seguida, a solução foi descartada e 10 mL de tampão de equilíbrio contendo 250 mg de iodoacetamida foram adicionados às tiras IPG. Após 20 minutos, as tiras foram lavadas com água destilada, submersas por alguns minutos em tampão de corrida e imediatamente submetidas à segunda dimensão. A eletroforese para a separação das proteínas foi realizada em SDS-PAGE 12%, utilizando a metodologia descrita por Laemmli (1970). As imagens do gel foram analisadas no programa ImageMaster™ 2D Platinum v7.0 (GE Healthcare).

4.27 Dicroísmo circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) foi realizada conforme Silva-Lucca et al. (2014). As medidas de CD foram registradas na região de UV distante (190-250 nm), utilizando o espectropolarímetro J-810 (Jasco Corporation, Japão) e uma cubeta retangular de quartzo de 1 mm de caminho óptico. A proteína submetida à análise foi diluída para 0,05 mg/mL em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,5. O espectro final foi obtido após a média de 4 varreduras de 50 nm/min com tempo de resposta de 4 segundos. O resultado foi expresso em elipticidade molar por resíduo $[\theta]$. Para a predição da estrutura secundária, a deconvolução espectral foi realizada por meio do programa BeStSel (MICSONAI et al., 2015).

4.28 Modelagem molecular

O modelo estrutural da xilanase purificada foi obtido por modelagem comparativa através do programa Modeller 9.13 (SALI et al., 1995), utilizando a xilanase GH11 de *Talaromyces funiculosus* como molde (número de acesso PDB: 1TE1) (PAYAN et al., 2004). Para a validação do modelo, a qualidade estereoquímica da proteína modelada foi avaliada pelo programa Procheck (LASKOWSKI; MACARTHUR; THORNTON, 1998), que satisfatoriamente definiu 87,9% dos resíduos em regiões energeticamente mais favoráveis do gráfico de Ramachandran. A imagem da estrutura tridimensional foi gerada no programa PyMOL (<http://www.pymol.org/>).

4.29 Atividade e estabilidade da xilanase purificada frente a diferentes valores de pH e temperatura

A influência do pH sobre a atividade enzimática da xilanase purificada foi determinada mediante ensaios enzimáticos na faixa de pH compreendida entre 3,0 e 9,0. Os tampões utilizados foram os mesmos do item 4.19. Após a determinação do pH ótimo, a influência da temperatura sobre a atividade enzimática foi investigada entre 35 e 80 °C. Os valores da atividade relativa foram calculados em função do valor de maior atividade enzimática, o qual foi tomado como 100%.

A estabilidade ao pH foi realizada por incubação da xilanase purificada, na ausência de substrato, à temperatura ambiente durante 24 horas, como descrito no item 4.20. Os ensaios de inativação térmica, por sua vez, foram realizados por incubação da enzima na faixa de temperatura compreendida entre 40 e 70 °C. Alíquotas foram retiradas em diferentes tempos para a determinação instantânea da atividade xilanásica residual, a qual foi realizada em condições ótimas de atividade. Os valores da atividade relativa foram calculados em relação aos valores iniciais da atividade enzimática (100%).

4.30 Parâmetros cinéticos da xilanase purificada

Os parâmetros cinéticos da xilanase purificada foram determinados com base na hidrólise das xilanas *birchwood*, *beechwood* e *oat spelt* (2-24 mg/mL). As velocidades iniciais

das reações foram mensuradas em condições ótimas de atividade. Os valores de velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$), constante de dissociação aparente ($K_{0,5}$), constante catalítica (K_{cat}) e coeficiente de Hill (n_H) foram calculados por regressão não-linear, utilizando o programa SigrafW (LEONE et al., 2005).

4.31 Determinação do modo de ação da xilanase com base em seus produtos de hidrólise

O modo de ação da xilanase purificada foi determinado por meio da análise dos seus produtos de hidrólise. As misturas reacionais (5 mL) continham 1 unidade total de atividade enzimática e 1% de xilana (m/v) dissolvida em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5. Todas as reações foram realizadas a 60 °C. Alíquotas de 350 μL foram retiradas nos seguintes tempos: 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos; fervidas por 10 minutos e, posteriormente, submetidas às análises cromatográficas. Ademais, experimentos controle foram realizados com a finalidade de investigar uma possível interferência da temperatura sobre a hidrólise do substrato.

Os produtos de hidrólise foram analisados qualitativamente por cromatografia em camada delgada (CCD) e quantitativamente por CLAE. Nas análises por CCD, as placas de sílica foram desenvolvidas em uma cuba de vidro contendo uma solução saturada de n-butanol, etanol e água na proporção de 5:3:2 (v/v/v), respectivamente. A revelação dos açúcares foi realizada pela pulverização das placas com uma mistura de orcinol 0,2% (m/v) em etanol/ H_2SO_4 na proporção de 9:1 (v/v), respectivamente. Depois de secas, as placas foram colocadas em estufa a 100 °C até a visualização do resultado. Em relação às determinações quantitativas, o percentual de cada xilooligossacarídeo foi determinado como descrito no item 4.10.

4.32 Análise em tempo real da hidrólise enzimática de xilooligossacarídeos

As reações foram compostas por misturas de 10 μL de xilanase (0,08 U/mL) e 0,05 μmol de cada respectivo xilooligossacarídeo dissolvido em 490 μL de tampão acetato de amônio 10 mM, pH 5,2. Os xilooligossacarídeos utilizados nos experimentos apresentavam 90% de pureza. Em todos os experimentos ocorreu um atraso médio de 2,5 minutos na coleta

dos dados em função do tempo gasto durante o enchimento da seringa e a transferência capilar.

As misturas reacionais foram submetidas à análise via inserção direta, ou seja, sem o uso de uma coluna cromatográfica, em um sistema ACQUITY UPLC H-Class acoplado ao espectrômetro de massas quadrupolo tandem Xevo® TQ-S (Waters Corporation, Milford, MS, EUA), equipado com uma fonte de ionização *Z-spray* operando em modo positivo. A infusão foi realizada em temperatura ambiente (~20 °C) por meio de uma seringa de 2.500 µL (Hamilton-Bonaduz, Switzerland), em fluxo de 5 µL/min. Os íons monitorados no modo SIM (monitoramento seletivo de íon) foram os seguintes (m/z): 173,1 (xilose; X1), 300,2 (xilobiose; X2), 432,2 (xilotriose; X3), 564,2 (xilotetraose; X4) e 696,2 (xilopentaose; X5). Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização *Z-spray* foram: voltagem do capilar de 3,2 kV, voltagem do cone de 40 V, temperatura da fonte *Z-spray* de 150 °C, temperatura de dessolvatação do gás N₂ de 300 °C e fluxo do gás de dessolvatação de 600 L/h. O processamento dos dados foi realizado pelo programa MassLynx V4.1 (Waters Corp., Milford, MA, USA).

4.33 Efeito de diferentes compostos sobre a atividade xilanásica

Para avaliar o efeito de diferentes compostos sobre a atividade xilanásica, soluções de 100 mM de AlCl₃, BaCl₂, CaCl₂, CoCl₂, CuSO₄, FeCl₃, HgCl, KCl, MgCl₂, NaCl, NiCl₂, Pb(C₂H₃O₂)₂, ZnCl₂, EDTA, DTT, β-mercaptoetanol e iodoacetamida foram utilizadas de modo que se obtivessem misturas reacionais com concentrações finais de 2 e 5 mM. Previamente ao ensaio enzimático, a enzima foi mantida em contato com cada composto, na concentração desejada, durante 30 minutos a 4 °C. Os ensaios enzimáticos foram realizados em condições ótimas de atividade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte 1

Produção de xilanases e a bioconversão de resíduos agroindustriais em açúcares fermentáveis mediante o uso de delineamentos experimentais

5.1 Otimização do processo de fermentação submersa para a produção de xilanases

Os efeitos lineares, quadráticos e de interação entre os fatores bagaço de cevada (X_1), volume de meio Adams (X_2) e tempo de cultivo (X_3) foram investigados em relação à produção de xilanases por meio de um delineamento composto central rotacional do tipo 2^3 . Os valores experimentais e preditos da atividade xilanásica são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2: Condições experimentais do delineamento composto central rotacional.

Tratamento	Variáveis e os seus valores reais (codificados)			Atividade xilanásica (U/mL) ^a	Valor predito (U/mL)
	Bagaço de cevada (g)	Meio Adams (mL)	Tempo de cultivo (h)		
1	0,400 (-1)	9,0 (-1)	91 (-1)	17,647	16,405
2	0,400 (-1)	9,0 (-1)	149 (1)	18,306	18,426
3	0,400 (-1)	21,0 (1)	91 (-1)	18,776	17,448
4	0,400 (-1)	21,0 (1)	149 (1)	19,859	19,469
5	0,850 (1)	9,0 (-1)	91 (-1)	20,000	20,021
6	0,850 (1)	9,0 (-1)	149 (1)	21,365	22,042
7	0,850 (1)	21,0 (1)	91 (-1)	21,788	21,064
8	0,850 (1)	21,0 (1)	149 (1)	23,059	23,085
9	0,625 (0)	15,0 (0)	120 (0)	22,634	23,011
10	0,625 (0)	15,0 (0)	120 (0)	23,302	23,011
11	0,625 (0)	15,0 (0)	120 (0)	23,275	23,011
12	0,250 (-1,68)	15,0 (0)	120 (0)	15,529	16,877
13	1,000 (1,68)	15,0 (0)	120 (0)	23,294	22,952
14	0,625 (0)	5,0 (-1,68)	120 (0)	20,847	20,757
15	0,625 (0)	25,0 (1,68)	120 (0)	21,412	22,508
16	0,625 (0)	15,0 (0)	72 (-1,68)	14,965	16,571
17	0,625 (0)	15,0 (0)	168 (1,68)	20,565	19,965
18 ^b	0,625 (0)	15,0 (0)	120 (0)	22,824	23,011
19 ^b	0,625 (0)	15,0 (0)	120 (0)	23,435	23,011
20 ^b	0,625 (0)	15,0 (0)	120 (0)	23,106	23,011

^a Cada valor representa a média de três dosagens enzimáticas.

^b Tratamentos referentes à validação do modelo.

Seguidamente, a significância estatística do modelo de regressão obtido foi determinada a partir de uma análise de variância que segue a distribuição F de Fisher,

comparando-se os valores de F tabelado (F_{tab}) e F calculado (F_{calc}), sendo este último procedente da razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos. O modelo de regressão selecionado apresentou valor de F_{calc} superior ao valor de F_{tab} (4,72 vezes), assegurando, portanto, que as variações entre os tratamentos foram significativas em relação a variável resposta. Além disso, o modelo não exibiu qualquer indício de falta de ajuste para um nível de significância de 5%.

TABELA 3: ANOVA do modelo de regressão polinomial.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Teste F	
				F_{calc}	F_{tab}
Modelo	98,716	6	16,453	15,19	3,22
Resíduo	10,834	10	1,083		
Falta de ajuste	10,548	8	1,319	9,22	19,37
Erro puro	0,286	2	0,143		
Total	109,550	16			

$R^2 = 0,901$; nível de significância de 5%.

O coeficiente de determinação, R^2 , definido como a medida da qualidade do ajuste da regressão, indica que 90% da variabilidade amostral pode ser explicada pelo modelo. Em relação aos efeitos, apenas os termos lineares e quadráticos foram considerados estatisticamente significativos através de um teste de hipóteses que segue a distribuição t de Student. Diante dessas considerações, o modelo matemático que representa a produção xilanásica foi expresso pela seguinte equação:

$$\text{Atividade xilanásica (U/mL)} = 23,01 + 1,81X_1 - 1,10X_1^2 + 0,52X_2 - 0,49X_2^2 + 1,01X_3 - 1,68X_3^2$$

(Equação 1)

Os gráficos de superfície de resposta, descritos pela equação polinomial de segunda ordem, foram rigorosamente analisados em busca das faixas ótimas para cada variável em estudo (Figuras 6, 7 e 8). Em relação aos valores experimentais, os maiores níveis de xilanase foram obtidos no ponto central, utilizando 0,625 g de bagaço de cevada, 15,0 mL de meio Adams e 120 horas de cultivo (Tabela 2). Contudo, a combinação vinculada ao ponto de

estagnação propõe que a resposta máxima (24,047 U/mL) será alcançada por meio da seguinte condição: 0,728 g de bagaço de cevada, 18,2 mL de meio Adams e 129 horas de cultivo.

FIGURA 6: Superfície de resposta que relaciona a atividade xilanásica em função do volume de meio Adams e da concentração de bagaço de cevada.

FIGURA 7: Superfície de resposta que relaciona a atividade xilanásica em função do tempo de cultivo e da concentração de bagaço de cevada.

FIGURA 8: Superfície de resposta que relaciona a atividade xilanásica em função do tempo de cultivo e do volume de meio Adams.

A validação do modelo experimental foi realizada mediante a adição de outros três tratamentos que seguiram as condições do ponto central (Tabela 2). O experimento de validação exibiu uma produção xilanásica média de 23,122 U/mL ($\pm 0,313$), que é similar ao valor teórico esperado para tal situação (23,011 U/mL). Dada a relevância desse resultado, pode-se inferir que esse modelo de regressão possui excelente capacidade preditiva no que se refere à produção de xilanases pelo fungo *A. tamaritii* Kita.

5.2 Zimograma para xilanases

Um zimograma em gel de poliacrilamida para proteínas nativas ácidas foi realizado para identificar as bandas do extrato enzimático previamente otimizado que possuem atividade xilanásica. Por conseguinte, a análise do zimograma revelou a presença de duas bandas distintas, denominadas, portanto, como xilanases 1 e 2 (Figura 9).

FIGURA 9: (A) Perfil proteico e (B) zimograma do extrato enzimático bruto de *A. tamaritii* Kita em PAGE para proteínas nativas ácidas.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (8%) sob condições não desnaturantes. O perfil proteico foi revelado com nitrato de prata (BLUM; BEIER; GROSS, 1987).

Com o intuito de promover a classificação dessas xilanases, as bandas proteicas equivalentes às posições de atividade xilanásica foram submetidas à análise em MALDI-TOF/TOF. O alinhamento das sequências peptídicas obtidas para as xilanases 1 e 2 (xilanase 1: GQVTSDGGTYNIYTSVR; xilanase 2: DSVFSQVLGEDFVR) estabeleceu que elas compartilham maior similaridade com as xilanases GH11 e GH10, respectivamente. Como consequência de suas características físico-químicas, as xilanases que apresentam massa molecular superior a 30 kDa e valor de pI ácido são classificadas como GH10, ao passo que as xilanases com massa molecular inferior a 20 kDa e valor de pI alcalino, em geral, são classificadas como GH11 (COLLINS et al., 2005; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013). Sendo assim, a limitada mobilidade eletroforética da xilanase 1 em PAGE para proteínas nativas ácidas (Figura 9) pode ser atribuída ao pK_a dos seus grupos R ionizáveis. A título de exemplo, Xiao et al. (2014) também relataram a produção simultânea de endo-xilanases GH10 e GH11 por *Rhizopus oryzae*.

5.3 Determinação das enzimas presentes no extrato enzimático de *A. tamaritii* Kita

O extrato enzimático de *A. tamaritii* Kita apresentou atividades de endo-1,4- β -xilanase, β -xilosidase e α -L-arabinofuranosidase iguais a 23,122 U/mL, 0,025 U/mL e 0,243 U/mL,

respectivamente. De acordo com Oliveira et al. (2014), as enzimas do sistema xilanolítico atuam de forma coordenada durante a conversão da xilana em xilooligossacarídeos, xilose e seus respectivos grupos substituintes (grupos acetil, ácido α -4-O-metil-glucurônico, α -arabinose, ácido p -cumárico e ácido ferúlico), proporcionando, por meio disso, elevadas taxas de hidrólise. Além disso, embora o delineamento experimental exposto no item 5.1 tenha sido direcionado à produção de xilanases, a Tabela 4 mostra que outras enzimas também foram produzidas durante o processo de fermentação submersa.

TABELA 4: Enzimas presentes no extrato enzimático de *A. tamaritii* Kita.

Enzima	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
Amilase	6,500 $\pm$ 0,158	73,034 $\pm$ 1,775
Endo-1,4- β -xilanase	23,122 $\pm$ 0,313	259,360 $\pm$ 3,955
β -xilosidase	0,025 $\pm$ 0,002	0,281 $\pm$ 0,022
α -L-arabinofuranosidase	0,243 $\pm$ 0,012	2,730 $\pm$ 0,135
Endo-1,4- β -glucanase	0,150 $\pm$ 0,014	1,685 $\pm$ 0,158
Exo-1,4- β -glucanase	0,255 $\pm$ 0,015	2,865 $\pm$ 0,169
1,4- β -glucosidase	0,040 $\pm$ 0,003	0,449 $\pm$ 0,034
Pectinase	0,191 $\pm$ 0,017	2,146 $\pm$ 0,191

A atividade amilásica de 6,5 U/mL foi a segunda maior atividade enzimática detectada no extrato bruto de *A. tamaritii* kita. As amilases são enzimas hidrolíticas que catalisam a bioconversão do polissacarídeo amido em açúcares menores e, por essa razão, apresentam grande importância no processamento de alimentos (DE SOUZA; MAGALHÃES, 2010; SUNDARRAM; MURTHY, 2014). Distintamente, as atividades enzimáticas de endo-1,4- β -glucanase, exo-1,4- β -glucanase e 1,4- β -glucosidase não foram tão expressivas. Em vista disso, esse extrato enzimático, rico em xilanases e livre de celulasas, pode representar uma importante ferramenta enzimática para obtenção de celulose, uma vez que a ausência de celulasas irá assegurar uma maior integridade final às microfibrilas desse polímero (SINDHU et al., 2006; DE SILVA et al., 2015).

5.4 Sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais

Um planejamento experimental de misturas do tipo centróide *simplex*, composto de 9 ensaios, foi utilizado para avaliar a produção de açúcares fermentáveis a partir da

sacarificação enzimática de três resíduos agroindustriais. Com base nos resultados apresentados na Tabela 5, pode-se verificar que as misturas binárias e ternárias permitiram a obtenção de respostas mais expressivas em relação ao uso individual dos resíduos de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e bagaço de cana-de-açúcar explodido, embora os maiores níveis de xilose (0,368 mg/mL), glicose (0,466 mg/mL) e açúcares redutores totais (2,802 mg/mL) tenham sido detectados com a composição individual do resíduo bagaço de cevada.

TABELA 5: Planejamento de misturas para otimizar a produção de açúcares fermentáveis em ensaios de sacarificação enzimática de 48 horas.

Ensaio	Componentes			Respostas		
	Bagaço de cevada	Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	Bagaço de cana-de-açúcar explodido	Xilose (mg/mL)	Glicose (mg/mL)	Açúcares totais (mg/mL)
1	1	0	0	0,368	0,466	2,802
2	0	1	0	0,129	0,055	0,565
3	0	0	1	0,357	0,072	0,901
4	1/2	1/2	0	0,232	0,242	1,611
5	1/2	0	1/2	0,235	0,134	2,061
6	0	1/2	1/2	0,314	0,097	1,198
7	1/3	1/3	1/3	0,361	0,287	1,817
8	1/3	1/3	1/3	0,369	0,294	1,802
9	1/3	1/3	1/3	0,369	0,288	1,885

5.5 Análise dos modelos de regressão

As análises de variância, os coeficientes de determinação e as equações de regressão dos modelos selecionados estão sumarizados na Tabela 6. Os parâmetros estatísticos denotaram que o modelo cúbico especial foi o mais adequado para as produções de glicose e xilose, enquanto que para a produção de açúcares redutores totais foi designado o modelamento quadrático. De acordo com a distribuição de Fisher, todos os modelos foram significativos e apresentaram valores de R^2 próximos a 1, confirmando, por meio disso, a qualidade de ajuste das regressões aos dados experimentais. Além disso, como não há evidências de falta de ajuste, visto que os valores de F_{tab} para este parâmetro foram superiores

ao de F_{calc} , as regressões escolhidas podem ser empregadas satisfatoriamente para prever o rendimento das respostas.

TABELA 6: Parâmetros estatísticos dos modelos de regressão selecionados.

Resposta	Falta de ajuste		Modelo	R^2	Teste F		Equação
	F_{calc}	F_{tab}			F_{calc}	F_{tab}	
Xilose	8,98	19,00	Cúbico especial	0,996	151,55	6,39	$Y = 0,363A + 0,123B + 0,357C - 0,501AC + 0,295BC + 2,914ABC$
Glicose	15,92	19,00	Cúbico especial	0,998	342,86	6,39	$Y = 0,460A + 0,049B + 0,072C - 0,528AC + 0,146BC + 3,729ABC$
Açúcares redutores totais	5,41	19,00	Quadrático	0,993	136,94	6,39	$Y = 2,789A + 0,552B + 0,884C + 1,175AC + 2,198BC$

Nível de significância previamente estabelecido de 5%.

Conforme exibido na Tabela 6, os modelos matemáticos exibem apenas os coeficientes dos termos que possuem importância sobre as respostas. O coeficiente linear mais relevante para as respostas em estudo pertence ao termo bagaço de cevada (A), seguido em ordem de importância pelos coeficientes dos termos bagaço de cana-de-açúcar explodido (C) e bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (B). Em relação às interações, a interação binária entre os resíduos bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e bagaço de cana-de-açúcar explodido (BC) exibiu o maior efeito positivo sobre a produção de açúcares redutores totais, enquanto que para as produções de glicose e xilose, o coeficiente da mistura ternária (ABC) assumiu essa importância.

5.6 Representações gráficas do delineamento de misturas

As representações gráficas do delineamento de misturas foram projetadas através de curvas de nível (Figuras 10, 11 e 12). Nessas representações, os vértices das superfícies triangulares correspondem à composição unitária de cada resíduo agroindustrial, enquanto que os pontos internos, por sua vez, consistem de misturas, com a restrição de que, para qualquer ponto, a soma dos componentes também seja unitária (NEPOMUCENA; SILVA; CIRILLO, 2013). Ademais, convém ressaltar que as superfícies triangulares exibem apenas uma visão de

caráter bidimensional, onde todos os pontos que têm a mesma resposta se apresentam conectados por meio de linhas de contorno (RAO; BARAL, 2011).

A Figura 10 apresenta uma ampla região gráfica contendo elevada concentração de xilose, incluindo a combinação ternária ao centro do triângulo (1/3, 1/3, 1/3). Além disso, a concentração de xilose liberada pela sacarificação do resíduo bagaço de cana-de-açúcar explodido (Tratamento 3 da Tabela 5) foi superior à concentração obtida com o resíduo bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (Tratamento 2 da Tabela 5), decorrente, possivelmente, do seu menor impedimento estrutural à hidrólise enzimática, uma vez que o pré-tratamento por explosão a vapor remove grande parte do conteúdo de lignina (GAO et al., 2013).

FIGURA 10: Curvas de nível representando a produção de xilose após 48 horas de sacarificação enzimática.

A quantificação de xilose foi realizada por CLAE.

Para as produções de glicose e açúcares redutores totais, as linhas de contorno representando os maiores níveis de produção estão direcionadas ao vértice inferior esquerdo das suas superfícies triangulares (Figuras 11 e 12), correspondente à composição unitária do resíduo bagaço de cevada. A maior produção de glicose com o resíduo de cevada certamente decorre da ação de amilases sobre a porção residual de amido ainda presente nessa biomassa (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006). Em relação aos resíduos de cana-de-açúcar, o menor rendimento de glicose deve-se tanto ao reduzido percentual de polissacarídeos

amiláceos em suas estruturas quanto à baixa atividade celulásica do extrato enzimático de *A. tamarit* Kita.

FIGURA 11: Curvas de nível representando a produção de glicose após 48 horas de sacarificação enzimática.

A quantificação de glicose foi realizada por CLAE.

FIGURA 12: Curvas de nível representando a produção de açúcares redutores totais após 48 horas de sacarificação enzimática.

A quantificação de açúcares redutores foi realizada por DNS (MILLER, 1959).

Parte 2

Imobilização de uma endo-1,4- β -xilanase para a produção de xilooligossacarídeos em elevadas temperaturas

5.7 Imobilização iônica

O extrato enzimático de *A. tamaritii* Kita foi inicialmente submetido à imobilização em CM-celulose. Como exposto pela Figura 13, a atividade xilanásica no sobrenadante sofreu uma redução significativa apenas no decorrer dos primeiros 30 minutos de incubação, sendo equivalente a 54,5% da atividade inicial. A ausência de alterações no perfil de imobilização, a partir desse tempo, sugere que a atividade enzimática ainda detectada no sobrenadante deve ser decorrente da presença de outras isoformas de xilanase que não possuem afinidade por esse suporte.

FIGURA 13: Imobilização do extrato enzimático em CM-celulose.

Símbolo: (■) Suspensão representando tanto o extrato enzimático quanto o derivado formado; (□) sobrenadante representando apenas as proteínas não imobilizadas.

Em ensaio de dessorção, o derivado CM-celulose reteve aproximadamente 80% da sua atividade inicial mesmo após a adição de NaCl 3 M (Figura 14). Embora as enzimas imobilizadas em matrizes de caráter iônico sejam suscetíveis à dessorção com o aumento da força iônica do sistema, a xilanase deste estudo apresentou uma força de interação eletrostática superior à força iônica do sal. Como alternativa, um gradiente de pH foi utilizado com o objetivo de diminuir a sua carga líquida positiva. O resultado deste procedimento, apresentado na Figura 15, mostra que o melhor rendimento de dessorção foi atingido em pH 8,0.

FIGURA 14: Análise da força de interação eletrostática entre a enzima e o suporte iônico.

Símbolo: (□) Sobrenadante representando as macromoléculas de xilanase dessorvidas; (■) derivado CM-celulose. O tempo zero corresponde a xilanase totalmente imobilizada (100%).

FIGURA 15: Efeito do pH sobre a dessorção da xilanase imobilizada em CM-celulose.

Símbolo: (■) Derivado CM-celulose obtido após centrifugação; (□) sobrenadante representando a xilanase dessorvida. Os valores de maior atividade verificados tanto para o derivado quanto para o sobrenadante foram tomados como 100%.

Portanto, a imobilização do extrato enzimático sobre o suporte CM-celulose não só permitiu a separação de diferentes isoformas como também se mostrou uma eficiente etapa de purificação, visto que apenas uma banda foi visualizada em SDS-PAGE após a etapa de dessorção (Figura 16, raia 5). A maior parte das proteínas do extrato bruto não estabeleceu interação com a matriz catiônica, mantendo-se juntas ao sobrenadante (Figura 16, raia 3). Em relação às proteínas imobilizadas, a xilanase em estudo (19,5 kDa) migrou conjuntamente com outras poucas proteínas, contudo, todas com maior massa molecular (Figura 16, raia 4).

Em adição, a identidade da proteína desorvida foi confirmada pela técnica de zimograma (Figura 17).

FIGURA 16: SDS-PAGE dos processos de imobilização e desorção da xilanase.

Raias: (1) Padrões de massa molecular; (2) extrato enzimático bruto - 10 µg; (3) sobrenadante do processo de imobilização - 8 µg; (4) proteínas de uma amostra de 100 mg de derivado CM-celulose; (5) xilanase desorvida em pH 8,0 - 2 µg.

FIGURA 17: Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições não desnaturantes e zimograma da xilanase desorvida.

O perfil proteico foi revelado com o nitrato de prata (BLUM; BEIER; GROSS, 1987).

Com o intuito de determinar com maior precisão os parâmetros do processo de imobilização, a xilanase desorvida foi novamente submetida à imobilização em CM-celulose.

Essa etapa se fez necessária devido à impossibilidade de comparar as atividades xilanásicas obtidas antes e após o processo de imobilização, dada a presença de diferentes isoformas de xilanase no extrato enzimático inicialmente submetido à imobilização. O rendimento de imobilização em relação a 0,29 mg de proteína e 2 g de matriz CM-celulose foi de 80,0%, enquanto que a quantidade de proteínas recuperada após a etapa de dessorção foi igual a 80,7% desse percentual (Tabela 7). Ademais, o derivado CM-celulose apresentou um considerável aumento de atividade, exibindo por esse motivo um fator de ativação de 5,1 vezes. Segundo Rodrigues et al. (2013), esse aumento de atividade pode estar relacionado a uma melhor exposição do sítio catalítico em função da distorção estrutural que a enzima sofre ao interagir com o suporte. Entretanto, a desvantagem da imobilização em CM-celulose, estabelecida por interações eletrostáticas, deve-se à fragilidade do sistema quando este é exposto a variações de pH e temperatura (CONTESINI et al., 2013).

TABELA 7: Resumo das técnicas de imobilização.

Derivado	Atividade específica (U/mg)	Rendimento de imobilização (%)	Atividade recuperada (%)	Fator de hiperativação
Enzima pura	591,90	-	-	-
CM-celulose	3.781,48	80,0	511,1	5,1
CNBr-agarose	701,68	86,8	102,9	1,0
Glioxil-agarose	1.945,75	71,7	235,7	2,4

5.8 Imobilizações covalentes da endo-xilanase

Após o processo de dessorção, a xilanase foi submetida a processos de imobilização por ligação covalente unipontual e multipontual. A imobilização covalente unipontual foi realizada para a obtenção de um derivado controle capaz de preservar as propriedades físico-químicas inerentes à enzima em sua forma livre. O rendimento da imobilização unipontual em CNBr-agarose foi igual a 86,8%, enquanto que a imobilização da xilanase por ligação covalente multipontual, em glioxil-agarose, teve rendimento de 71,7% e um fator de ativação de 2,4 vezes (Tabela 7). Esse resultado possui grande expressividade se comparado ao processo de imobilização da xilanase NS 50014 em glioxil-agarose, que reteve apenas 66,8% de sua atividade enzimática inicial (MANRICH et al., 2010).

5.9 Propriedades bioquímicas da xilanase imobilizada

A atividade enzimática máxima de ambos os derivados obtidos por ligação covalente, CNBr-agarose e glioxil-agarose, foi observada em pH 5,5 (Figura 18A-B). Similarmente, esses derivados também apresentaram ampla faixa de estabilidade ao pH para o período de 24 horas. A atividade relativa do derivado CNBr-agarose foi superior a 90% para o intervalo de pH compreendido entre 5,0 e 8,0, enquanto que o derivado glioxil-agarose apresentou atividade relativa superior a 90% para uma faixa de pH um pouco mais extensa, entre 4,0 e 9,0 (Figura 19).

FIGURA 18: Efeito do pH sobre a atividade dos derivados covalentes.

(A) Derivado CNBr-agarose e (B) derivado glioxil-agarose.

Símbolo: (□) Citrato de sódio; (■) Acetato de sódio; (Δ) MES; (▼) MOPS; (◇) Tris-HCl.

FIGURA 19: Ensaio de estabilidade ao pH.

Símbolo: (□) Derivado CNBr-agarose; (■) derivado glioxil-agarose. Representação do tempo de 24 horas.

No estudo do efeito da temperatura, os derivados CNBr-agarose e glioxil-agarose apresentaram maior atividade enzimática a 60 e 65 °C, respectivamente (Figura 20). Esse deslocamento no valor de temperatura ótima também foi reportado para as xilanases de *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride* (PAL; KHANUM, 2011; CHEN et al., 2010; MADAKBAS et al., 2013). Conforme Ortega et al. (2009), essa alteração é resultado da estabilização estrutural adquirida pela enzima após a formação de múltiplas interações com o suporte glioxil-agarose. Além disso, o derivado glioxil-agarose também exibiu menor redução em seus valores de atividade quando submetido a temperaturas mais elevadas, como a 80 °C, onde atingiu 80% do seu valor máximo de atividade enzimática (Figura 20).

FIGURA 20: Influência da temperatura sobre a atividade dos derivados covalentes. Símbolo: (□) Derivado CNBr-agarose; (■) derivado glioxil-agarose.

Em ensaios de termoestabilidade, ambos derivados mantiveram semelhantes desempenhos a 50 °C (Figura 21A). No entanto, o derivado CNBr-agarose apresentou notável perda de estabilidade a 60 °C, posto que a atividade relativa do derivado glioxil-agarose manteve-se superior a 60% durante 8 horas de incubação, enquanto que o derivado CNBr-agarose atingiu sua meia vida com apenas 25 minutos (Figura 21B). A inativação do derivado glioxil-agarose foi mais evidente a 70 e 80 °C, com valores de meia vida iguais a 96 e 60 minutos, respectivamente (Figura 21C-D). Esse aumento na termoestabilidade da xilanase, mediante o processo de imobilização multipontual, também provém do aumento de sua estabilização estrutural junto ao suporte, tornando-a por meio disso mais tolerante à inativação térmica (SANTOS et al., 2015; MARTINEK et al., 1977; OBREGÓN et al., 2015; BARBOSA et al., 2015).

FIGURA 21: Ensaio de termoestabilidade com os derivados covalentes.

(A) 50 °C; (B) 60 °C; (C) 70 °C; (D) 80 °C.

Símbolo: (□) Derivado CNBr-agarose; (■) derivado glioxil-agarose.

5.10 Reutilização dos derivados

As técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas tanto para fornecer estabilidade às enzimas como para facilitar a sua recuperação e reutilização. Diante disso, o desempenho catalítico dos derivados obtidos foi avaliado durante sucessivos ciclos de reuso. O derivado glioxil-agarose apresentou o melhor perfil de reuso, mantendo cerca de 80% da sua atividade inicial ao final do quinto ciclo reacional (Tabela 8). Pal e Khanum (2011) relataram um perfil de reuso similar para uma endo-xilanase imobilizada em esferas de alginato-glutaraldeído. Embora menos eficientes, os demais derivados, CM-celulose e CNBr-agarose, também exibiram uma relativa estabilidade operacional durante os primeiros ciclos de reuso. A diminuição gradual da atividade após cada ciclo é inevitável e ocorre em consequência da desnaturação ou ruptura do complexo enzima-suporte (CHEN; ZOU; HONG, 2015).

TABELA 8: Capacidade de reuso dos derivados.

Nº de reuso	Atividade relativa (%)		
	Derivado CM-celulose	Derivado CNBr-agarose	Derivado glioxil-agarose
1	100,0 ± 0,6	100,0 ± 0,6	100,0 ± 0,3
2	91,2 ± 0,8	87,7 ± 0,2	95,9 ± 0,4
3	66,0 ± 1,4	58,5 ± 2,4	92,8 ± 0,8
4	42,8 ± 2,2	50,8 ± 1,5	85,2 ± 0,8
5	29,5 ± 2,4	31,3 ± 1,6	82,0 ± 0,7

5.11 Análise dos produtos de hidrólise

O derivado glioxil-agarose e a xilanase livre não exibiram diferenças quantitativas entre os seus perfis de hidrólise a 60 °C (Figura 22A). Esse resultado difere do esperado, pois a meia vida da xilanase livre em ensaio de termoestabilidade sob a mesma temperatura foi inferior a 25 minutos. Segundo Roberge et al. (1998), esse resultado ocorre em função da proteção térmica oferecida pelos substratos poliméricos aos seus respectivos ligantes. Entretanto, esse fenômeno se tornou menos evidente no ensaio de hidrólise a 80 °C, visto que a xilanase livre apresentou-se funcional apenas durante os primeiros 30 minutos, enquanto que o derivado glioxil-agarose manteve-se ativo durante todo o experimento de 4 horas (Figura 22B).

A Tabela 9 apresenta a relação percentual de cada xilooligossacarídeo identificado durante o ensaio de hidrólise a 80 °C. A reação de hidrólise com o derivado glioxil-agarose produziu os seguintes xilooligossacarídeos: xilobiose, xilotriose, xilotetraose e xilopentaose. Além disso, a soma das concentrações de xilotriose e xilotetraose correspondeu a 69,1% da totalidade dos xilooligossacarídeos detectados no tempo de 4 horas. A xilanase livre, por sua vez, não liberou xilobiose, e o percentual de xilopentaose se manteve superior aos percentuais de xilotriose e xilotetraose na maior parte das análises (Tabela 9). Os resultados alcançados com o derivado glioxil-agarose são muito instigantes, posto que reações em temperaturas elevadas costumam ser requeridas para melhorar a dissolução dos substratos e reduzir os riscos de contaminação (KNOB; TERRASAN; CARMONA, 2010).

TABELA 9: Análise quantitativa dos xilooligossacarídeos liberados durante a hidrólise enzimática da xilana *beechwood*.

	Tempo de reação	Concentração (mg/mL) e conteúdo percentual				
		Xilose	Xilobiose	Xilotriose	Xilotetraose	Xilopentaose
Xilanase livre						
	0,5 h	nd	nd	0,434 (18,8%)	0,699 (30,3%)	1,174 (50,9%)
	1,0 h	nd	nd	0,567 (23,0%)	0,834 (33,8%)	1,066 (43,2%)
	2,0 h	nd	nd	0,572 (21,5%)	0,654 (24,6%)	1,433 (53,9%)
	4,0 h	nd	nd	0,427 (15,0%)	1,237 (43,4%)	1,186 (41,6%)
Derivado glioxil-agarose						
	0,5 h	nd	0,543 (13.3%)	1,957 (47,7%)	1,243 (30,3%)	0,357 (8,7%)
	1,0 h	nd	0,994 (18.9%)	2,433 (46,3%)	1,381 (26,3%)	0,447 (8,5%)
	2,0 h	nd	0,777 (9.8%)	3,212 (40,5%)	2,522 (31,8%)	1,426 (17,9%)
	4,0 h	nd	1,090 (11.0%)	3,952 (39,7%)	2,923 (29,4%)	1,981 (19,9%)

nd: não detectado.

Parte 3

Xilanase GH11 de *Aspergillus tamarii* Kita: purificação e análise em tempo real de sua atividade enzimática sobre xilooligossacarídeos

5.12 Purificação, massa molecular e ponto isoelétrico

A xilanase GH11 produzida em fermentação submersa foi purificada até a sua aparente homogeneidade através da cromatografia de troca iônica CM-celulose. A primeira tentativa de eluição foi realizada mediante a aplicação de um gradiente linear de NaCl (0-3 M) dissolvido em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5. Entretanto, a enzima permaneceu ligada à resina. Na tentativa seguinte, a resistência à eluição foi satisfatoriamente reduzida com a mudança do valor de pH da solução salina para 8,0.

Os dados do processo de purificação estão sumarizados na Tabela 10. A purificação da xilanase apresentou rendimento final de 36,72% e um fator de purificação de 7,43 vezes. De modo similar, Sanghi et al. (2010) também purificaram uma endo-xilanase a partir de um único passo cromatográfico, obtendo um rendimento final de 43,05%.

TABELA 10: Sumário do processo de purificação.

Etapa de purificação	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação (vezes)	Rendimento (%)
Extrato enzimático	2.185,73	13,36	163,60	1,00	100,00
CM-celulose	802,49	0,66	1.215,89	7,43	36,72

A fração contendo a xilanase eluída exibiu um perfil homogêneo em SDS-PAGE. Ademais, a sua massa molecular aparente foi estimada em 19,5 kDa (Figura 23). A eletroforese bidimensional, por sua vez, revelou que a xilanase purificada possui um pI alcalino de 8,5 (Figura 24). Endo-xilanases com propriedades semelhantes, ou seja, baixo valor de massa molecular e ponto isoelétrico alcalino, também foram isoladas de microrganismos como *Aspergillus terreus*, *Scytalidium thermophilum* e *Trichoderma reesei* (TENKANEN; PULS; POUTANEN, 1992; KOCABAS; KOCABAS; BAKIR, 2011; KOCABAS; GÜDER; ÖZBEN, 2015).

FIGURA 23: SDS-PAGE da xilanase GH11 após a sua purificação.

Raias: (1) Marcadores de massa molecular; (2) xilanase purificada.

FIGURA 24: Perfil bidimensional da xilanase purificada.

A proteína foi inicialmente focalizada em uma tira de gel com gradiente de pH imobilizado e posteriormente separada por SDS-PAGE (12%). A seta indica a posição da xilanase.

Seguidamente, a banda visualizada em SDS-PAGE foi excisada do gel e digerida com tripsina para a sua subsequente análise em MALDI-TOF/TOF. Todos os íons b e y provenientes da fragmentação do peptídeo massa/carga 1.818,60 foram utilizados na identificação da sequência GQVTSDGGTYNIYTSVR (Mascot score 67), que corresponde em sua totalidade ao segmento 148-164 da xilanase GH11 de *Aspergillus oryzae* RIB40 (KIMURA et al., 2000).

5.13 Análise estrutural

O espectro de dicroísmo circular da xilanase purificada está exposto na Figura 25. A normalização dos dados permitiu a discriminação de dois picos majoritários, um positivo em 198 nm e outro negativo em 218 nm. Além disso, a deconvolução desse espectro também revelou que a xilanase apresenta 47% de folhas- β em sua estrutura. De modo similar, a xilanase GH11 de *Talaromyces funiculosus* contém 51% de folhas- β e 5% de α -hélices (PAYAN et al., 2004).

FIGURA 25: Espectro de dicroísmo circular na região do UV distante.

A linha sólida indica o espectro da xilanase enquanto que a linha tracejada indica o espectro ajustado pelo servidor online BeStSel. Os espectros foram coletados a partir de uma amostra de concentração proteica igual a 0,05 mg/mL, utilizando cubetas de caminho óptico de 1 mm.

A predição estrutural da xilanase purificada foi realizada por modelagem comparativa, utilizando como base a estrutura da xilanase de *T. funiculosus* (PAYAN et al., 2004). O modelo construído exibiu uma arquitetura do tipo β -jelly roll, contendo uma α -hélice e duas folhas- β antiparalelas esculpindo a fenda catalítica (Figura 26). As folhas- β mimetizam os dedos e a palma de uma mão direita parcialmente fechada, enquanto que o acesso à fenda catalítica é regulado pelos movimentos de uma dobra- β , semelhante aos movimentos de um polegar (PAES et al., 2007; RIBEIRO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016). A análise estrutural ainda revelou a presença de um par de resíduos glutamato (Glu109 e Glu200) adequadamente

posicionados no sítio catalítico, por meio dos quais as xilanases GH11 comumente catalisam a hidrólise da xilana (COLLINS et al., 2005; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

FIGURA 26: Representação tridimensional da xilanase GH11 de *A. tamarii* Kita.

Os resíduos catalíticos Glu109 e Glu200 são indicados pela representação em barra. A imagem foi gerada no software PyMol (DELANO; LAM, 2005).

5.14 Atividade e estabilidade da xilanase frente a diferentes valores de pH e temperatura

A xilanase apresentou atividade enzimática máxima em pH 5,5 (Figura 27A) e manteve atividade residual superior a 80% na faixa de pH compreendida entre 4,0 e 9,0, durante 24 horas (Figura 27B). De modo semelhante, a xilanase XylA de *Aspergillus kawachii* também apresentou atividade máxima em pH 5,5 e ampla faixa de estabilidade ao pH (3,0-10,0) (ITO et al., 1992).

FIGURA 27: (A) Atividade e (B) estabilidade da xilanase frente a diferentes valores de pH.

Legenda: (□) Citrato de sódio; (■) Acetato de sódio; (Δ) MES; (▼) MOPS; (◇) Tris-HCl.

Em relação à temperatura, o melhor desempenho catalítico da enzima foi verificado a 60 °C (Figura 28A). Entretanto, a sua termoestabilidade se mostrou ponderável apenas para as temperaturas de 40 e 50 °C. Em temperaturas mais elevadas, os valores de meia vida da enzima foram inferiores a 30 minutos (Figura 28B). Similarmente, a xilanase purificada de *Trichoderma* sp. K9301 também apresentou considerável termoestabilidade a 50 °C e rápida perda de estabilidade a 60 °C (CHEN et al., 2009).

FIGURA 28: (A) Atividade e (B) estabilidade da xilanase frente a diferentes valores de temperatura.

Os ensaios de termoestabilidade foram realizados a 40 °C (□), 50 °C (■), 60 °C (○) e 70 °C (●), na ausência de substrato.

5.15 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos da xilanase GH11 são exibidos na Tabela 11. A maior eficiência catalítica dessa enzima foi observada sobre a xilana *beechwood*, segundo a relação $K_{cat}/K_{0,5}$. Com esse substrato, os valores de $K_{0,5}$ e $V_{m\acute{a}x}$ foram iguais a 8,13 mg/mL e 1.330,20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, respectivamente. Isto posto, convém destacar que desempenhos análogos ao apresentado também foram reportados para as xilanases de *Penicillium glabrum* e *Penicillium rolfsii* (KNOB et al, 2013; LEE et al, 2015).

TABELA 11: Parâmetros cinéticos da xilanase purificada.

Substrato	Parâmetros cinéticos				
	n_H	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	$K_{0,5}$ (mg/mL)	K_{cat} (1/s)	$K_{cat}/K_{0,5}$ (mL/mg/s)
Xilana <i>Beechwood</i>	2.14	1.330,20	8,13	432,33	53,18
Xilana <i>Birchwood</i>	1.93	1.255,95	7,94	408,20	51,41
Xilana <i>Oat spelt</i>	1.87	1.178,56	7,59	383,05	50,47

Além disso, a xilanase apresentou um comportamento cooperativo, não Michaeliano, confirmado pelo coeficiente de Hill (n_H) maior que 1 (Tabela 11). Embora sejam monoméricas, as xilanases GH11 possuem sítios secundários de ligação a xilana (LUDWICZEK et al., 2007; VANDERMARLIERE et al., 2008; CUYVERS et al., 2011). Tais sítios possuem as seguintes funções: ancorar a enzima ao substrato, servir como uma extensão ao sítio catalítico e modular a atividade xilanásica mediante a redução de $K_{0,5}$ (LUDWICZEK et al., 2007).

5.16 Análise dos produtos de hidrólise por CCD e CLAE

A xilanase teve o seu modo de ação determinado por meio da análise dos seus produtos de hidrólise em CCD. Os perfis de hidrólise obtidos sugerem uma atividade típica de endo-enzima, visto que apenas xilooligossacarídeos foram visualizados, sem qualquer evidência de xilose (Figura 29) (SILVA; TERRASAN; CARMONA, 2015).

FIGURA 29: Análise dos produtos de hidrólise enzimática por cromatografia em camada delgada.

(A) Xilana *Beechwood*; (B) xilana *Birchwood*; (C) xilana *Oat spelt*.

Raias: (1) padrões de xilose e xilobiose - 1 µg; (2) controle sem a xilanase; (3-9) tempos de reação correspondentes a 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos, respectivamente.

Em adição, análises em CLAE foram realizadas com a finalidade de quantificar os xilooligossacarídeos liberados durante os ensaios de hidrólise. De modo geral, houve um aumento progressivo nas concentrações de xilobiose (X2) e xilotriose (X3), enquanto que as concentrações de xilotetraose (X4) exibiram mínimas variações (Tabela 12). Dentre os substratos testados, a maior concentração final de xilooligossacarídeos foi obtida pela hidrólise da xilana *beechwood*. Similarmente, a xilanase produzida por *Penicillium rolsii* também se mostrou mais ativa sobre esse substrato (LEE et al, 2015). Segundo van Gool et al. (2013), o melhor desempenho catalítico sobre a xilana *beechwood* é justificado pelo padrão de distribuição dos seus substituintes 4-O-metil- α -D-glucuronosil, que a torna ligeiramente mais solúvel em relação às demais xilanas.

TABELA 12: Análise dos produtos de hidrólise enzimática por CLAE.

Tempo (minutos)	Xilana <i>Beechwood</i>			Xilana <i>Birchwood</i>			Xilana <i>Oat spelt</i>		
	X2 ^a	X3 ^a	X4 ^a	X2 ^a	X3 ^a	X4 ^a	X2 ^a	X3 ^a	X4 ^a
5	0,079	0,329	0,168	0,098	0,403	0,198	0,091	0,251	0,164
10	0,155	0,390	0,157	0,190	0,546	0,221	0,151	0,348	0,181
20	0,244	0,565	0,176	0,241	0,554	0,203	0,264	0,447	0,219
40	0,353	0,661	0,168	0,253	0,546	0,159	0,269	0,461	0,189
60	0,378	0,676	0,154	0,342	0,667	0,159	0,289	0,477	0,193

^a Xilooligossacarídeos em mg/mL.

Xilobiose (X2); xilotriose (X3); xilotetraose (X4).

5.17 Análise em tempo real da hidrólise enzimática de xilooligosacarídeos

A competência da endo-xilanase purificada em hidrolisar xilooligosacarídeos foi monitorada em tempo real por infusão direta do meio reacional em espectrômetro de massas. Dentre os xilooligosacarídeos testados, apenas o substrato xilopentaose foi eficientemente hidrolisado, liberando xilobiose e xilotriose como produtos (Figura 30A). A presença invariável de xilotetraose nesse ensaio também foi verificada em seu respectivo controle (Figura 31), sugerindo, por meio disso, que o substrato xilopentaose apresenta um pequeno teor de impurezas. O substrato xilotetraose, por sua vez, chegou a ser ligeiramente clivado em xilobiose e xilotriose (Figura 30B), contudo, não o suficiente para inferir que a enzima em estudo possui especificidade por esse xilooligosacarídeo, visto que todos os ensaios continham concentrações reacionais idênticas. Todavia, vale ressaltar que, recentemente, duas xilanases GH11 de *Penicillium oxalicum* GZ-2 mostraram-se hábeis em catalisar a completa conversão do substrato xilotetraose em xilobiose e xilotriose (LIAO et al., 2015).

FIGURA 30: Análise em tempo real da hidrólise de xilooligosacarídeos. Substratos: (A) xilopentaose-X5, (B) xilotetraose-X4, (C) xilotriose-X3 e (D) xilobiose-X2.

FIGURA 31: Análise do ensaio controle para o substrato xilopentaose.

Legenda: (X5) Xilopentaose; (X4) xilotetraose; (X3) xilotriose; (X2) xilobiose.

Portanto, levando-se em conta que a taxa de hidrólise da xilana diminui com a redução do seu grau de polimerização, pode-se julgar que o substrato xilopentaose é o menor xilooligossacarídeo capaz de ser hidrolisado pela endo-xilanase GH11 de *A. tamaritii* Kita. Ademais, esse resultado coincide com os dados expostos pela Tabela 12, uma vez que não houve a detecção de xilopentaose entre os xilooligossacarídeos liberados e acumulados durante a hidrólise das xilanas *beechwood*, *birchwood* e *oat spelt*.

5.18 Efeito de diferentes compostos sobre a atividade xilanásica

A adição de EDTA ao meio reacional não interferiu de forma significativa na atividade enzimática da endo-xilanase purificada, indicando, portanto, que essa enzima não pertence à classe das metaloenzimas (YANG et al., 2010). Na concentração de 5 mM, os metais pesados Co^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} apresentaram um ponderável efeito de inibição sobre a xilanase, enquanto que os íons Ba^{2+} e Ni^{2+} , assim como os compostos β -mercaptoetanol e DTT, exibiram um aumento superior a 20% em sua atividade (Tabela 13). De acordo com Sandrim et al. (2005), a ativação de xilanases por agentes redutores (β -mercaptoetanol e DTT) sugere uma relação de dependência entre a sua atividade e a forma reduzida dos seus resíduos catalíticos de cisteína. Entretanto, a ausência de interferência do composto iodoacetamida, reagente sulfidrílico alquilante, sobre a atividade da endo-xilanase GH11 de *A. tamaritii* Kita

indica que os seus grupos tióis (R-SH) não possuem importância catalítica (TEIXEIRA et al., 2010). Sob outra perspectiva, a ativação de xilanases por agentes redutores também pode emanar do próprio caráter nucleofílico desses compostos, dado que no mecanismo catalítico de duplo deslocamento tanto a formação quanto a hidrólise do intermediário covalente glicosil-enzima ocorre por meio de ataques nucleofílicos. Sendo assim, deve-se cogitar a possibilidade de tais compostos nucleofílicos atuarem junto aos resíduos catalíticos da enzima durante a etapa de deglicosilação, elevando a taxa de libertação dos produtos de hidrólise.

Tabela 13: Efeito de diferentes compostos sobre a atividade xilanásica.

Composto	Atividade residual (%)	
	2 mM	5 mM
Controle	100,0	100,0
AlCl ₃	107,8 ± 0,5	112,5 ± 0,2
BaCl ₂	107,4 ± 0,5	124,1 ± 1,0
CaCl ₂	99,8 ± 0,4	106,1 ± 0,9
CoCl ₂	78,4 ± 0,4	68,2 ± 0,5
CuSO ₄	94,7 ± 0,1	82,7 ± 0,6
FeCl ₃	55,5 ± 1,3	42,9 ± 0,6
HgCl	41,5 ± 1,6	16,3 ± 1,0
KCl	106,8 ± 1,0	117,5 ± 1,4
MgCl ₂	105,6 ± 0,8	109,1 ± 0,4
NaCl	103,5 ± 0,1	117,4 ± 1,1
NiCl ₂	116,1 ± 0,7	122,5 ± 1,4
Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	76,2 ± 1,3	57,9 ± 1,2
ZnCl ₂	92,6 ± 0,7	60,4 ± 1,1
EDTA	94,5 ± 0,1	93,6 ± 0,3
β-mercaptoetanol	128,0 ± 0,3	145,5 ± 0,8
DTT	110,5 ± 0,4	125,9 ± 0,3
Iodoacetamida	99,7 ± 0,5	98,9 ± 0,4

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- ✓ *Aspergillus tamarii* Kita se mostrou um bom produtor de xilanases em meio de cultura Adams suplementado com o resíduo bagaço de cevada. O seu extrato enzimático exibiu duas xilanases em gel de atividade para proteínas nativas, as quais por espectrometria de massas foram identificadas como glicosil hidrolases pertencentes às famílias 10 e 11.
- ✓ O modelo de regressão obtido através de um delineamento composto central rotacional apresentou excelente capacidade preditiva para a produção xilanásica.
- ✓ A sacarificação enzimática de três resíduos agroindustriais, mediante um delineamento de misturas, demonstrou que as combinações desses componentes possuem importante relevância para a produção de açúcares fermentáveis, tais como glicose e xilose.
- ✓ A xilanase GH11 foi satisfatoriamente estabilizada em glioxil-agarose, apresentando como resultado um deslocamento de 5 graus em sua temperatura ótima de atividade e um considerável ganho de termoestabilidade a 80 °C.
- ✓ A purificação da xilanase GH11 foi realizada por meio de uma única etapa cromatográfica, com rendimento final de 36,72% e um fator de purificação de 7,43 vezes. A sua estrutura tridimensional foi predita por modelagem comparativa, exibindo como modelo final um enovelamento do tipo β -jelly roll, comum às xilanases da família 11.
- ✓ A xilanase purificada apresentou melhor atividade em pH 5,5 e foi consideravelmente estável na faixa de pH compreendida entre 4,0 e 9,0. Em relação à temperatura, a sua atividade ótima foi observada a 60 °C, contudo, a sua termoestabilidade foi mais expressiva a 50 °C, restando cerca de 70% da sua atividade inicial por 480 minutos.
- ✓ Com a xilana *beechwood*, os valores de velocidade máxima e constante de dissociação aparente foram iguais a 1.330,20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ e 8,13 mg/mL , respectivamente.

- ✓ A análise em tempo real da atividade xilanásica sobre diferentes xilooligossacarídeos revelou que o substrato xilopentaose corresponde ao menor xilooligossacarídeo capaz de ser eficientemente hidrolisado.
- ✓ Na concentração de 5 mM, os íons metálicos Ba^{2+} e Ni^{2+} , assim como os compostos β -mercaptoetanol e DTT, apresentaram um ponderável efeito de ativação sobre a enzima.
- ✓ Portanto, a nova endo-xilanase GH11 isolada de *A. tamarii* Kita exibe uma série de propriedades físico-químicas favoráveis a sua aplicabilidade em escala industrial.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Xylooligosachharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and application. **Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 1-15, 2011.
- ADAMS, P. R. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. **Mycopathologia**, v. 112, p. 35-37, 1990.
- ÁLVAREZ-CERVANTES, J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; MERCADO-FLORES, Y.; et al. Phylogenetic analysis of β -xylanase SRXL1 of *Sporisorium reilianum* and its relationship with families (GH10 and GH11) of Ascomycetes and Basidiomycetes. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-9, 2016.
- BAJPAI, P. Application of enzymes in the pulp and paper industry. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 147-157, 1999.
- BAJPAI, P.; ANAND, A.; BAJPAI, P. K. Bleaching with lignin-oxidizing enzymes. **Biotechnology Annual Review**, v. 12, p. 349-78, 2006.
- BAJPAI, P. Xylanases. In: SCHAECHTER, M.; LEDERBERG, J. (Ed.). **Encyclopedia of Microbiology**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, p. 600-612, 2009.
- BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; et al. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 435-456, 2015.
- BELANCIC, A.; SCARPA, J.; PEIRANO, A.; et al. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. **Journal of Biotechnology**, v. 41, p. 71-79, 1995.
- BELIËN, T.; VAN CAMPENHOUT, S.; VAN ACKER, M.; et al. Cloning and characterization of two endoxylanases from the cereal phytopathogen *Fusarium graminearum* and their inhibition profile against endoxylanase inhibitors from wheat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 327, p. 407-414, 2005.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, p. 286-290, 1985.
- BIELY, P.; VRSANSKÁ, M.; TENKANEN, M.; et al. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v. 57 p. 151-166, 1997.
- BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, p. 1260-1274, 2016.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BOURBONNAIS, R.; ROCHEFORT, D.; PAICE, M. G.; et al. Transition metal complexes: a new class of laccase mediators for pulp bleaching. **Tappi Journal**, v. 83, p. 68-76, 2000.

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

BRASIL, J. L.; VAGHETTI, J. C. P.; SANTOS JR, B. R. A.; et al. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de bio sorção de Cu(II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como bio sorvente. **Química Nova**, v. 30, p. 548-553, 2007.

BRENNAN, Y.; CALLEN, W. N.; CHRISTOFFERSEN, L.; et al. Unusual microbial xylanases from insect guts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3609-3617, 2004.

BURLACU, A.; CORNEA, C. P.; ISRAEL-ROMING, F. Microbial xylanase: a review. **Scientific Bulletin Biotechnology: Series F**, v. 20, p. 335-342, 2016.

CAI, Y.; LIU, S.; LIAO, X.; et al. Purification and partial characterization of antifreeze proteins from leaves of *Ligustrum lucidum* Ait. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 98-102, 2011.

CEGLIE, F. G.; BUSTAMANTE, M. A.; AMARA, M. B.; et al. The challenge of peat substitution in organic seedling production: optimization of growing media formulation through mixture design and response surface analysis. **PLoS ONE**, v. 10, p. 1-14, 2015.

CHEN, L. L.; ZHANG, M.; ZHANG, D. H.; et al. Purification and enzymatic characterization of two β -endoxylanases from *Trichoderma* sp. K9301 and their actions in xylooligosaccharide production. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5230-5236, 2009.

CHEN, H.; LIU, L.; LV, S.; et al. Immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on chitosan using dialdehyde starch as a coupling agent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 24-32, 2010.

CHEN, L.; ZOU, M.; HONG, F. F. Evaluation of fungal laccase immobilized on natural nanostructured bacterial cellulose. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-10, 2015.

CHENG, H. L.; TSAI, C. Y.; CHEN, H. J.; et al. The identification, purification, and characterization of STXF10 expressed in *Streptomyces thermonitrificans* NTU-88. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 681-689, 2009.

CHOCT, M. Feed non-starch polysaccharides for monogastric animals: classification and function. **Animal Production Science**, v. 55, p. 1360-1366, 2015.

CHRISTAKOPOULOS, P.; NERINCKX, W.; KEKOS, D.; et al. The alkaline xylanase III from *Fusarium oxysporum* F3 belongs to family F/10. **Carbohydrate Research**, v. 302, p. 191-195, 1997.

COSCIONE, A. R.; ANDRADE, J. C.; MAY, G. M. O modelamento estatístico de misturas: experimento tutorial usando voltametria de redissolução anódica. **Química Nova**, v. 28, p. 1116-1122, 2005.

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

CONTESINI, F. J.; FIGUEIRA, J. A.; KAWAGUTI, H. Y.; et al. Review: Potential applications of carbohydrases immobilization in the food industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 1335-1369, 2013.

COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. β -1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 17, p. 259-289, 1993.

CUYVERS, S.; DORNEZ, E.; REZAEI, M. N.; et al. Secondary substrate binding strongly affects activity and binding affinity of *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* GH11 xylanases. **FEBS Journal**, v. 278, p. 1098-1111, 2011.

DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 121, p. 404-427, 1964.

OLIVEIRA, M. M. Q.; GRIGOREVSKI-LIMA, A. L. G.; FRANCO-CIRIGLIANO, M. N.; et al. *Trichoderma atroviride* 102C1 mutant: A high endoxylanase producer for assisting lignocellulosic material degradation. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 6, p. 236-241, 2014.

DE SILVA, R.; VONGSANGA, K.; WANG, X.; et al. Cellulose regeneration in ionic liquids: factors controlling the degree of polymerization. **Cellulose**, v. 22, p. 2845-2849, 2015.

DE SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in industry – A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 850-861, 2010.

DE VAAL, P.; SANDROCK, C. Control of a batch pulp digester using a simplified mechanistic model to predict degree of polymerisation. **Computers and Chemical Engineering**, v. 31, p. 1222-1230, 2007.

DELANO, W. L.; LAM, J. W. PyMOL: A communications tool for computational models. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 230, p. U1371-U1372, 2005.

DESPRES, J.; FORANO, E.; LEPERCQ, P.; et al. Unraveling the pectinolytic function of *Bacteroides xylanisolvens* using a RNA-seq approach and mutagenesis. **BMC Genomics**, v. 17, p. 1-14, 2016.

DESWAL, D.; SHARMA, A.; GUPTA, R.; et al. Application of lignocellulolytic enzymes produced under solid state cultivation conditions. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 249-254, 2012.

DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R. F. H. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1627-1640, 2012.

DEVILLARD, E.; NEWBOLD, C. J.; SCOTT, K. P.; et al. A xylanase produced by the rumen anaerobic protozoan *Polyplastron multivesiculatum* shows close sequence similarity to family 11 xylanases from gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 191, p. 145-52, 1999.

DOBREV, G. T.; PISHTIYSKI, I. G.; STANCHEV, V. S.; et al. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2671-2678, 2007.

DUTTA, T.; SENGUPTA, R.; SAHOO, R.; et al. A novel cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citrinum*: production, purification and characterization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 206-211, 2007.

EBRINGEROVÁ, A. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. **Macromolecular Symposia**, v. 232, p. 1-12, 2005.

FANG, H. Y.; CHANG, S. M.; LAN, C. H.; et al. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 49-55, 2008.

FURNISS, C. S.; BELSHAW, N. J.; ALCOCER, M. J.; et al. A family 11 xylanase from *Penicillium funiculosum* is strongly inhibited by three wheat xylanase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1598, p. 24-29, 2002.

FURNISS, C. S.; WILLIAMSON, G.; KROON, P. A. The substrate specificity and susceptibility to wheat inhibitor proteins of *Penicillium funiculosum* xylanases from a commercial enzyme preparation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 574-582, 2005.

GANGWAR, A. K.; PRAKASH, N. T.; PRAKASH, R. Applicability of microbial xylanases in paper pulp bleaching: a review. **Bioresources**, v. 9, p. 3733-3754, 2014.

GAO, Y.; XU, J.; ZHANG, Y.; et al. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 396-400, 2013.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GUISÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 375-382, 1988.

GUPTA, P. K., AGRAWAL, P., HEGDE, P. et al. Xylooligosaccharide - A valuable material from waste to taste: a review. **Journal of Environmental Research and Development**, v. 10, p. 555-563, 2016.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; et al. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 137-161, 1996.

HASSAÏNE, O.; ZADI-KARAM, H.; KARAM, N. E. Statistical optimization of lactic acid production by *Lactococcus lactis* strain, using the central composite experimental design. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 4259-4267, 2014.

HEINEN, P. R.; HENN, C.; PERALTA, R. M.; et al. Xylanase from *Fusarium heterosporum*: properties and influence of thiol compounds on xylanase activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 1047-1055, 2014.

HEINEN, P. R.; PEREIRA, M. G.; RECHIA, C. G. V.; et al. Immobilized *endo*-xylanase of *Aspergillus tamaritii* Kita: an interesting biological tool for production of xylooligosaccharides at high temperatures. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 145-152, 2017.

ITO, K.; OGASAWARA, H.; SUGIMOTO, T.; et al. Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachii*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, p. 547-550, 1992.

IZYDORCZYK, M. S.; BILIADERIS, C. G. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, p. 33-48, 1995.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1219-1227, 2012.

KALIM, B.; BOHRINGER, N.; ALI, N.; et al. Xylanases - from microbial origin to industrial application. **British Biotechnology Journal**, v. 7, p. 1-20, 2015.

KANIMOZHI, K.; NAGALAKSHMI, P. K. Xylanase production from *Aspergillus niger* by solid state fermentation using agricultural waste as substrate. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, p. 437-446, 2014.

KIMURA, T.; SUZUKI, H.; FURUHASHI, H.; et al. Molecular cloning, overexpression, and purification of a major xylanase from *Aspergillus oryzae*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 2734-2738, 2000.

KNOB, A. **Complexo xilanolítico de *Penicillium sclerotiorum*: Produção, purificação e caracterização de xilanases e β -xilosidases**, 2009. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro - SP.

KNOB, A.; BEITEL, S. M.; FORTKAMP, D.; et al. Production, purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

KNOB, A.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 389-407, 2010.

KOCABAS, A.; KOCABAS, D. S.; BAKIR, U. B. One-step purification and characterization of a low molecular weight xylanase from *Aspergillus terreus* NRRL 1960. **Journal of Applied Biological Sciences**, v. 5, p. 61-65, 2011.

KOCABAS, D. S.; GÜDER, S.; ÖZBEN, N. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 66-75, 2015.

KUMAR, G. P.; PUSHPA, A.; PRABHA, H. A review on xylooligosaccharides. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, p. 71-74, 2012.

KUMAR, P.; SHARMA, S. M. An overview of purification methods for proteins. **International Journal of Applied Research**, v. 1, p. 450-459, 2015.

KURAKAKE, M.; FUJII, T.; YATA, M.; et al. Characteristics of transxylosylation by beta-xylosidase from *Aspergillus awamori* K4. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, p. 272-279, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; THORNTON, J. M. Validation of protein models derived from experiment. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, p. 631-639, 1998.

LEE, K. C.; ARAI, T.; IBRAHIM, D.; et al. Purification and characterization of a xylanase from the newly isolated *Penicillium rolsii* c3-2(1) IBRL. **Bioresources**, v. 10, p. 1627-1643, 2015.

LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; FURRIEL, R. P. M., et al. SigrafW: An easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 33, p. 399-403, 2005.

LEVASSEUR, A.; ASTHER, M.; RECORD, E. Overproduction and characterization of xylanase B of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 177-183, 2005.

LIAO, H.; ZHENG, H.; LI, S., et al. Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-14, 2015.

LIN, J.; NDLOVU, L. M.; SINGH, S.; et al. Purification and biochemical characteristics of β -D-xylanase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 30, p. 73-79, 1999.

LOPES, F. P. **Otimização da produção de xilanase por levedura silvestre**, 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas - SP.

LUDWICZEK, M. L.; HELLER, M.; KANTNER, T.; et al. A secondary xylan-binding site enhances the catalytic activity of a single-domain family 11 glycoside hydrolase. **Journal of Molecular Biology**, v. 373, p. 337-354, 2007.

MAALEJ, I.; BELHAJ, I.; MASMOUDI, N. F.; et al. Highly thermostable xylanase of the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*: purification and characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, p. 200-212, 2009.

MADAKBAS, S.; DANIS, Ö.; DEMIR, S.; et al. Xylanase immobilization on functionalized polyaniline support by covalent attachment. **Starch**, v. 65, p. 146–150, 2013.

MANRICH, A.; KOMESU, A.; ADRIANO, W. S.; et al. Immobilization and stabilization of xylanase by multipoint covalent attachment on agarose and on chitosan supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 455-467, 2010.

MATEO, C.; ABIAN, O.; BERNEDO, M.; et al. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 456-462, 2005.

MARTINEK, K.; KLIBANOV, A. M.; GOLDMACHER, V. S.; et al. The principles of enzyme stabilization. I. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary surface of a polymer support in a multipoint fashion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 485, p. 1-12, 1977.

MEYRIAL, V.; DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; et al. Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*: fermentation behaviour. **Biotechnology Letters**, v. 13, p. 281-286, 1991.

MICSONAI, A.; WIEN, F.; KERNYA, L.; et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, p. E3095-E3103, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 6a ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.

MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. In: CHANDEL, A. K.; DA SILVA, S. S. (Ed.). **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass - Techniques, applications and commercialization**. Croatia: InTech, p. 251-275, 2013.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Review Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**, v. 43, p. 1-14, 2006.

NACKE, H.; ENGELHAUPT, M.; BRADY, S.; et al. Identification and characterization of novel cellulolytic and hemicellulolytic genes and enzymes derived from German grassland soil metagenomes. **Biotechnology Letters**, v. 34, p. 663-675, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5a ed. Porto alegre: Artmed, 2011.

NEPOMUCENA, T. M.; SILVA, A. M. D.; CIRILLO, M. A. Modelos ridge em planejamentos de misturas: uma aplicação na extração da polpa de pequi. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 159-164, 2013.

NEVES, C. F. C., SCHVARTZMAN, M. M. A. M.; JORDAO, E. Variables search technique applied to gas separation. **Química Nova**, v. 25, p. 327-329, 2002.

OBREGÓN, W. D.; CISNEROS, J. S.; CECCACCI, F.; et al. A highly stable biocatalyst obtained from covalent immobilization of a non-commercial cysteine phytoprotease. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques**, v. 5, p. 1-7, 2015.

ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M.; PILAR, M. C.; et al. Neutrase immobilization on alginate-glutaraldehyde beads by covalent attachment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 109-115, 2009.

PAES, G.; TRAN, V.; TAKAHASHI, M.; et al. New insights into the role of the thumb-like loop in GH-11 xylanases. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 20, p. 15-23, 2007.

PAL, A.; KHANUM, F. Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: Characterization of immobilized enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1315-1322, 2011.

PAYAN, F.; LEONE, P.; PORCIERO, S.; et al. The dual nature of the wheat xylanase protein inhibitor XIP-I - Structural basis for the inhibition of family 10 and family 11 xylanases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 36029-36037, 2004.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Why multivariate optimization? **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, p.106-110, 2005.

PEREIRA, M. G.; FACCHINI, F. D. A.; POLIZELI, A. M.; et al. Stabilization of the lipase of *Hypocrea pseudokoningii* by multipoint covalent immobilization after chemical modification and application of the biocatalyst in oil hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 121, p. 82-89, 2015.

PIRGOZLIEV, V.; KARADAS, F.; ROSE, S. P.; et al. Dietary xylanase increases hepatic vitamin E concentration of chickens fed wheat based diet. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 24, p. 80-84, 2015.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67 p. 577-591, 2005.

POLIZELI, M. L. T. M. Properties and commercial applications of xylanases from fungi. In: RAI, M. K. (Ed.). **Mycotechnology: current trends and future prospects**. New Delhi: I.K. International Publisher, p. 82-101, 2009.

POLIZELI, M. L. T. M.; PERALTA, R. M., BRACHT, A., et al. Enzymes prospection from fungi and biomass pretreatment for biorefinery application. In: SILVA, R. N. (Ed.). **Mycology: Current and Future Developments: Fungal Biotechnology for Biofuel Production**. Bentham Science Publishers, p. 57-81, 2016a.

POLIZELI, M. L. T. M.; VICI, A. C.; SCARCELLA, A. S. A.; et al. Enzyme system from *Aspergillus* in current industrial uses and future applications in the production of second-generation ethanol. In: GUPTA, V. K. (Ed.). **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Aspergillus system properties and applications**. Elsevier, p. 127-140, 2016b.

PULS, J. Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. **Macromolecular Symposia**, v. 120, p. 183-196, 1997.

RAO, P. V.; BARAL, S. S. Experimental design of mixture for the anaerobic co-digestion of sewage sludge. **Chemical Engineering Journal**, v. 172, p. 977-986, 2011.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, p. 17-20, 1985.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. Microbial enzyme production using lignocellulosic food industry wastes as feedstock: a review. **Bioengineering**, v. 3, p. 1-22, 2016.

REISFELD, R. A.; LEWIS, U. J.; WILLIAMS, D. E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. **Nature**, v. 195, p. 281-283, 1962.

RIBEIRO, L. F.; NICHOLS, N.; TULLMAN, J.; et al. Insertion of a xylanase in xylose binding protein results in a xylose-stimulated xylanase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 1-15, 2015.

RIBEIRO, L. F.; TULLMAN, J.; NICHOLS, N.; et al. A xylose-stimulated xylanase-xylose binding protein chimera created by random nonhomologous recombination. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 1-12, 2016.

ROBERGE, M.; SHARECK, F.; MOROSOLI, R.; et al. Site-directed mutagenesis study of a conserved residue in family 10 glycanases: histidine 86 of xylanase A from *Streptomyces lividans*. **Protein Engineering**, v. 11, p. 399-404, 1998.

RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6290-6307, 2013.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. p. 95-326.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, p. 841-845, 2008.

SAHA, B. C. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1279-1284, 2002.

SALI, A.; POTTERTON, L.; YUAN, F.; et al. Evaluation of comparative protein modeling by MODELER. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 23, p. 318-326, 1995.

SANDRIM, V. C.; RIZZATTI, A. C. S.; TERENCE, H. F.; et al. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1823-1828, 2005.

SANGHI, A.; GARG, N.; GUPTA, V. K.; et al. One-step purification and characterization of cellulase-free xylanase produced by alkalophilic *Bacillus subtilis* ASH. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 467-476, 2010.

SANTOS, J. C. S. D.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; et al. Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, p. 2413-2432, 2015.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27, 2012.

SCHULZE, E. Information regarding chemical composition of plant cell membrane. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 24, p. 2277-2287, 1891.

SEGATO, F.; DAMASIO, A. R. L.; DE LUCAS, R. C.; et al. Genomics review of holocellulose deconstruction by Aspergilli. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, p. 588-613, 2014.

SENA, L. M. F.; MORAIS, C. G.; LOPES, M. R.; et al. D-Xylose fermentation, xylitol production and xylanase activities by seven new species of *Sugiyamaella*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, p. 53-67, 2016.

SHRINIVAS, D.; SAVITHA, G.; RAVIRANJAN, K.; et al. A highly thermostable alkaline cellulase-free xylanase from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB 99 suitable for paper and pulp industry: purification and characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 2049-2057, 2010.

SILVA, L. A. O.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 307-313, 2015.

SILVA-LUCCA, R. A.; ANDRADE, S. S.; FERREIRA, R. S.; et al. Unfolding studies of the cysteine protease baupain, a papain-like enzyme from leaves of *Bauhinia forficata*: effect of pH, guanidine hydrochloride and temperature. **Molecules**, v. 19, p. 233-246, 2014.

SINDHU, I.; CHHIBBER, S.; CAPALASH, N.; et al. Production of cellulase-free xylanase from *Bacillus megaterium* by solid state fermentation for biobleaching of pulp. **Current Microbiology**, v. 53, p. 167-172, 2006.

SOUZA, F. H. M.; NASCIMENTO, C. V.; ROSA, J. C.; et al. Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 272–278, 2010.

SUDA, C. N. K.; BUCKERIDGE, M. S.; GIORGINI, J. F. Cell wall hydrolases in the seeds of *Euphorbia heterophylla* L. during germination and early seedling development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 135-143, 2003.

SUN, J.; WEN, F.; SI, T.; et al. Direct conversion of xylan to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains displaying an engineered minihemicellulosome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 3837-3845, 2012.

SUNDARRAM, A.; MURTHY, T. P. K. α -Amylase Production and Applications: A Review. **Journal of Applied and Environmental Microbiology**, v. 2, p. 166-175, 2014.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, p. 39-67, 1997.

SUZUKI, M.; YOSHIDA, K.; ASHIDA, K. Purification and characterization of xylanase from the mid-gut gland of the apple snail (*Pomacea canaliculata*). **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, p. 693-700, 1991.

TAIBI, Z.; SAOUDI, B.; BOUDELAA, M.; et al. Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. strain Cpt20 isolated from poultry compost. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 663-679, 2012.

TEIXEIRA, R. S. S.; SIQUEIRA, F. G.; DE SOUZA, M. V.; et al. Purification and characterization studies of a thermostable β -xylanase from *Aspergillus awamori*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1041-1051, 2010.

TENKANEN, M.; PULS, J.; POUTANEN, K. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 566-574, 1992.

THIAGARAJAN, S.; JEYA, M.; GUNASEKARAN, P. Purification and characterization of a high molecular weight endoxylanase from the solid-state culture of an alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* MKU1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 487-492, 2006.

UDAY, U. S. P.; CHOUDHURY, P.; BANDOPADHYAY, T. K.; et al. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 1041-1054, 2016.

UFFEN, R. L. Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 1-16, 1997.

VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1477-1492, 2011.

VAN GOOL, M. P.; VAN MUISWINKEL, G. C. J; HINZ, S. W. A.; et al. Two novel GH11 *endo*-xylanases from *Myceliophthora thermophila* C1 act differently toward soluble and insoluble xylans. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, p. 25-32, 2013.

VANDERMARLIERE, E.; BOURGOIS, T. M.; ROMBOUTS, S.; et al. Crystallographic analysis shows substrate binding at the -3 to +1 active-site subsites and at the surface of glycoside hydrolase family 11 *endo*-1,4-beta-xylanases. **Biochemical Journal**, v. 410, p. 71-79, 2008.

VIKARI, L.; RANUA, M.; KANTELINEN, A.; et al. Bleaching with enzymes. In: **Proceedings of 3rd International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry**. Stockholm: STFI, 1986. p. 67-69.

VISWANATH, B.; RAJESH, B.; JANARDHAN, A.; et al. Fungal laccases and their applications in bioremediation. **Enzyme Research**, v. 2014, p. 1-21, 2014.

WANG, J.; TAN, Z.; WU, M.; et al. Improving the thermostability of a mesophilic family 10 xylanase, AuXyn10A, from *Aspergillus usamii* by in silico design. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 1217-1225, 2014.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, p. 315-322, 1990.

WONG, K. K.; TAN, L. U.; SADDLER, J. N. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiology Reviews**, v. 52, p. 305-317, 1988.

XIAO, Z.; GROSSE, S.; BERGERON, H.; et al. Cloning and characterization of the first GH10 and GH11 xylanases from *Rhizopus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 8211-8222, 2014.

XU, J.; TAKAKUWA, N.; NOGAWA, M.; et al. A third xylanase from *Trichoderma reesei* PC-3-7. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 718-724, 1998.

YANG, Y.; ZHANG, W.; HUANG, J.; et al. Purification and characterization of an extracellular xylanase from *Aspergillus niger* C3486. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 2249-2256, 2010.

YEGIN, S. Single-step purification and characterization of an extreme halophilic, ethanol tolerant and acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1 with application potential in the food industry. **Food Chemistry**, v. 221, p. 67-75, 2017.