UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Purificação, caracterização bioquímica e potencial de aplicação
biotecnológica de uma xilanase halotolerante e termoestável de
*Colletotrichum graminicola***

Sibeli De Carli

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: Química.

RIBEIRÃO PRETO - SP
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Purificação, caracterização bioquímica e potencial de aplicação
biotecnológica de uma xilanase halotolerante e termoestável de
*Colletotrichum graminicola***

Sibeli De Carli

Orientadora: Profa. Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: Química.

RIBEIRÃO PRETO - SP
2016

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.

Carli, Sibeli

Purificação, caracterização bioquímica e potencial de aplicação biotecnológica de uma xilanase halotolerante e termoestável de *Colletotrichum graminicola*. Ribeirão Preto, 2016.

139 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química.

Orientadora: Furriel, Rosa dos Prazeres Melo.

1. *Colletotrichum graminicola*. 2. Endo-xilanase.
3. Halotolerante. 4. Termoestabilidade. 5. Sacarificação da hemicelulose. 6. Etanol lignocelulósico.

Folha de Aprovação

Sibeli De Carli

**Purificação, caracterização bioquímica e potencial de aplicação biotecnológica
de uma xilanase halotolerante e termoestável de *Colletotrichum graminicola***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: Química.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof/a. Dr/a. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Prof/a. Dr/a. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Prof/a. Dr/a. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Aos meus pais, Irineu e Acileide, e meus irmãos, Cynthia e Danilo, que são um grande exemplo de vida e sempre me forneceram apoio incondicional, incentivo, carinho e amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que se faz presente em todos os momentos da minha vida e zelando por mim em cada passo, amparando-me e guiando-me nos momentos difíceis e acima de tudo por tornar real mais este sonho.

Aos meus pais, razões da minha existência, que sempre me deram apoio e suporte durante todos estes anos de estudo. Só tenho a dizer que cada gota de suor que derramaram está simbolicamente representada neste trabalho. Sempre serei grata por tudo. Amo vocês!

À Prof^a. Dr^a. Rosa dos Prazeres Melo Furriel pela orientação, carinho, paciência e ensinamentos passados nestes dois anos. É uma grande mulher e que admiro imensamente.

Ao Prof. Dr. João Atílio Jorge por compartilhar um pouco do seu enorme conhecimento e sempre disposto a conversar e discutir problemas e dificuldades encontradas durante a realização deste trabalho.

Aos amigos de laboratório, Luana, Dani, Ana Lúcia e Zé, pelas conversas descontraídas, sempre dispostos a ajudar e ensinar. São pessoas muito queridas e serão sempre guardadas com um carinho especial. Foi simplesmente excepcional conviver com vocês. Muito obrigada por tudo!

Ao técnico Eduardo José Crevelin e ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes pelas análises de espectrometria de massas de carboidratos e por todo auxílio prestado.

Ao Prof. Dr. José Cesar Rosa pela ajuda nos experimentos de sequenciamento da enzima.

À todos os professores do Departamento de Química que contribuíram por meio das disciplinas para o ensinamento e desenvolvimento intelectual e científico.

Agradeço também aos meus irmãos, Cynthia e Danilo, sempre tão companheiros, atenciosos e compreensivos.

Ao Júnior, pela sua compreensão, seu carinho e por completar minha vida com amor e felicidade.

À minha avó, tios e primos, pelos animados almoços de família e pelo grande exemplo de união.

Aos funcionários da FFCLRP, em especial os funcionários do departamento de Química.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

À FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Enfim, meu muito obrigado a todas as pessoas que de alguma forma participaram e ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho e do ser humano que o assina.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota” .

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A viabilidade econômica da produção de etanol de segunda geração (2G) depende do desenvolvimento de tecnologias eficientes e baratas para a hidrólise da biomassa lignocelulósica. Em particular, o grande consumo de água nas plantas de processamento de biomassa pode inviabilizar o processo. As xilanases são enzimas chave na hidrólise enzimática da xilana para a produção de etanol 2G e atualmente é grande o interesse na identificação de xilanases tolerantes a altas concentrações salinas, bem como aos subprodutos de etapas de pré-tratamento da biomassa, o que permitiria reduzir o volume de água empregado em etapas de lavagem e/ou a substituição da água doce pela água do mar. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram a purificação e caracterização bioquímica e cinética de uma endo-xilanase halotolerante e termoestável produzida por uma linhagem de *C. graminicola* isolada da floresta Amazônica (Brasil). A enzima pura (Excg1) apresentou massa molecular aparente de $20,0 \pm 2,4$ kDa em SDS-PAGE e $17,3 \pm 1,9$ kDa por filtração em gel, sugerindo que a enzima nativa é monomérica. O teor de carboidratos totais de Excg1 foi de $97,0 \pm 3,7$ % (m/m) e o seu ponto isoelétrico correspondeu a $9,200 \pm 0,018$. A enzima manteve cerca de 85% da atividade controle na presença de NaCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Em ausência e presença de NaCl em concentração $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ a temperatura e o pH ótimos de atividade de Excg1 foram 65°C e $5,5$, respectivamente, enquanto na presença de NaCl $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$ o pH ótimo foi alterado para $6,0$. Excg1 mostrou-se bastante termoestável a 50°C , com tempo de meia-vida de 48 h na ausência do substrato. Já na presença de NaCl $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$ a termoestabilidade foi substancialmente maior, com atividade residual de 75% após o mesmo intervalo de tempo. Excg1 apresentou excelente estabilidade na faixa de pH de $3,0$ - $10,0$ na ausência de sal, mantendo-se também completamente estável entre pH $4,0$ e $10,0$ na presença de NaCl em concentração $0,5$ e $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Os parâmetros cinéticos determinados para a hidrólise de xilana *Beechwood* por Excg1 na ausência de NaCl foram $V_{\max} = 481,3 \pm 34,0 \text{ U.mg}^{-1}$ e $K_M = 3,7 \pm 0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$, resultando em eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) de $36,9 \text{ mL.s}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. Parâmetros muito similares foram determinados na presença de NaCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, porém em presença do sal em concentração $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ocorreu diminuição da afinidade aparente pelo substrato e redução da velocidade máxima, resultando em eficiência catalítica 2,3 vezes menor. Já a hidrólise de xilana *Birchwood* em ausência de sal ocorreu com constante de afinidade aparente similar e eficiência catalítica cerca de 18% maior, se comparada à hidrólise de xilana *Beechwood* na mesma condição. Excg1 foi tolerante a K^+ , Na^+ , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} e Sr^{2+} em concentração 10 mmol.L^{-1} , além de Cu^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} e Fe^{3+} em concentração 1 mmol.L^{-1} . Além disso, Excg1 foi tolerante a diferentes solventes orgânicos e a acetato. A análise dos produtos de hidrólise de xilana *Beechwood* por Excg1 revelou que os produtos principais formados foram xilobiose e xilotriose com uma ramificação de ácido 4-O-metilglucurônico. A presença de NaCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ não afetou este padrão de hidrólise e a enzima mostrou também boa tolerância aos produtos de hidrólise. Em conjunto, as propriedades de Excg1 sugeriram bom potencial de aplicação na sacarificação da biomassa lignocelulósica, particularmente em condições de salinidade elevada e/ou em presença de resíduos de etapas de pré-tratamento, o que é potencialmente interessante para viabilizar economicamente processos de produção de etanol 2G.

Palavras chaves: *Colletotrichum graminicola*, endo-xilanase, halotolerância, termostabilidade, sacarificação da hemicelulose, etanol lignocelulósico.

ABSTRACT

The economic viability of the production of second-generation (2G) ethanol depends on the development of efficient and inexpensive technologies for the hydrolysis of lignocellulosic biomass. In particular, the large consumption of water in the biomass processing plants can make the process unfeasible. The xylanases are key enzymes in the enzymatic hydrolysis of xylan aiming the production of 2G ethanol and there is currently great interest in identifying xylanases tolerant to high salt concentrations and to the byproducts from biomass pretreatment steps, allowing the reduction of the volume of water used in washing steps and/or the replacement of fresh water by sea water. In this context, the objectives of this work were the purification and the biochemical and kinetic characterization of a salt-tolerant and thermostable endoxylanase produced by a strain of *C. graminicola* isolated from the Amazon forest (Brazil). The pure enzyme (Excg1) showed apparent molecular mass of 20.0 ± 2.4 kDa by SDS-PAGE and 17.3 ± 1.9 kDa by gel filtration, suggesting that the native enzyme is monomeric. The total carbohydrate content of Excg1 was $97.0 \pm 3.7\%$ (m/m) and its isoelectric point corresponded to 9.200 ± 0.018 . The enzyme retained approximately 85% of control activity in the presence of 0.5 mol.L^{-1} NaCl. In the absence and presence of NaCl at 0.5 mol.L^{-1} concentration, the optimum reaction temperature and pH of Excg1 were 65°C and 5.5, respectively, while in the presence of 2.5 mol.L^{-1} NaCl the optimum pH was altered to 6.0. Excg1 was highly thermostable at 50°C , with a half-life of 48 h in the absence of substrate. In the presence of 2.5 mol.L^{-1} NaCl the thermal stability was greatly increased, and a residual activity of 75% was determined after 48 h at 50°C . Excg1 showed excellent stability in the pH range from 3.0 to 10.0 in the absence of salt, and was likewise completely stable at pH 4.0-10.0 in the presence of NaCl at the concentrations 0.5 mol.L^{-1} and 2.5 mol.L^{-1} . The kinetic parameters for the hydrolysis of Beechwood xylan by Excg1 in the absence of salt were $V_{\max} = 481.3 \pm 34.0 \text{ U.mg}^{-1}$ and $K_M = 3.7 \pm 0.3 \text{ mg.mL}^{-1}$, with a catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) of $36.9 \text{ mL.s}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. Similar parameters were determined in the presence of 0.5 mol.L^{-1} NaCl, while in the presence of a higher salt concentration (2.5 mol.L^{-1}) decreases in the apparent affinity for the substrate and in the maximum velocity were observed, resulting in a catalytic efficiency 2.3 fold lower. In comparison with Beechwood xylan, the hydrolysis of Birchwood xylan in the absence of salt occurred with similar apparent affinity and catalytic efficiency about 18% greater. Excg1 was tolerant to 10 mmol.L^{-1} K^+ , Na^+ , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} or Sr^{2+} , and also to Cu^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} e Fe^{3+} at 1 mmol.L^{-1} concentration. Furthermore, the enzyme was tolerant to various organic solvents and acetate. The analysis of Beechwood xylan hydrolysis products by Excg1 revealed that the main products were xylobiose and xylotriose with a 4-O-methylglucuronic acid branch. The presence of 0.5 mol.L^{-1} NaCl has not affected the hydrolysis pattern and the enzyme showed good tolerance to the hydrolysis products. Altogether, the properties of Excg1 suggested good potential for the saccharification of lignocellulosic biomass, particularly under high salinity conditions and/or in the presence of residues of pre-treatment steps, which is potentially interesting for the economically viable production of 2G ethanol.

Key words: *Colletotrichum graminicola*, endo-xylanase, halotolerance, thermostability, saccharification of hemicellulose, lignocellulosic ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização estrutural da parede celular vegetal	5
Figura 2. Estrutura química geral das xilanas.....	8
Figura 3. Estrutura da xilana e pontos de ação das enzimas do complexo xilanolítico.....	10
Figura 4. Mecanismo de reação das xilanases das famílias GH10 e 11	12
Figura 5. Perfil cromatográfico da xilanase de <i>C. graminicola</i> em Phenyl-sepharose CL-4B	41
Figura 6. Perfil cromatográfico da xilanase de <i>C. graminicola</i> em DEAE-Fractogel	42
Figura 7. Análise de Excg1 por PAGE (linha a) e SDS-PAGE (linhas b e c).....	43
Figura 8. Recobrimento das sequências de aminoácidos dos fragmentos de Excg1 com uma glicosil-hidrolase da família 10 de <i>Colletotrichum graminicola</i> M1.001: GLRG_08914.1.	45
Figura 9. Determinação da massa molecular aparente da forma nativa da Excg1...	46
Figura 10. Focalização isoeletrica de Excg1	53
Figura 11. Efeito da temperatura sobre a atividade xilanásica de Excg1	54
Figura 12. Efeito do pH sobre a atividade xilanásica de Excg1	55
Figura 13. Estabilidade térmica de Excg1 em tempos curtos	57
Figura 14. Estabilidade térmica de Excg1 em tempos longos	58
Figura 15. Estabilidade térmica de Excg1 na presença de substrato	58
Figura 16. Estabilidade ao pH de Excg1	66
Figura 17. Efeito de concentrações de xilana <i>Beechwood</i> sobre a atividade de Excg1	71
Figura 18. Efeito de concentrações de xilana <i>Birchwood</i> sobre a atividade de Excg1	72
Figura 19. Padrão de hidrólise de xilana <i>Beechwood</i> por Excg1.....	77
Figura 20. Espectro ID-MS obtido na hidrólise de xilana <i>Beechwood</i> por Excg1 após 48h de reação.....	79
Figura 21. Espectro MS-MS obtido na fragmentação do pico com m/z de 305 [X2 + Na] ⁺	80

Figura 22. Espectro MS-MS obtido na fragmentação do pico com <i>m/z</i> de 627 [X3+4-O-ME + Na] ⁺	81
Figura 23. Efeito dos produtos de hidrólise sobre a atividade de Excg1	82
Figura 24. Efeito da presença de NaCl sobre a atividade enzimática de Excg1.....	85
Figura 25. Estabilidade de Excg1 à temperatura ambiente em presença de concentrações crescentes de NaCl.....	86
Figura 26. Efeito da presença de NaCl sobre o pH ótimo de reação de Excg1	90
Figura 27. Efeito da presença de NaCl sobre a temperatura ótima de reação de Excg1	91
Figura 28. Efeito da presença de NaCl sobre a estabilidade térmica de Excg1 a 60 °C	92
Figura 29. Efeito da presença de NaCl sobre a estabilidade térmica de Excg1 a 50 °C	93
Figura 30. Efeito da presença de NaCl sobre a estabilidade térmica de Excg1 a 50 °C na presença de substrato	94
Figura 31. Efeito da presença de NaCl sobre a estabilidade ao pH de Excg1	96
Figura 32. Efeito de concentrações crescentes de xilana <i>Beechwood</i> sobre a atividade de Excg1	97
Figura 33. Efeito de NaCl sobre o padrão de hidrólise de xilana <i>Beechwood</i> por Excg1	101
Figura 34. Tolerância de Excg1 a diferentes solventes e ao acetato	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito de diferentes processos de pré-tratamento sobre a composição e estrutura dos materiais lignocelulósicos	15
Tabela 2: Composição média estimada da água do mar.....	20
Tabela 3: Purificação de Excg1	42
Tabela 4: Propriedades moleculares e bioquímicas de xilanases produzidas por fungos mesófilos endofíticos	47
Tabela 5: Propriedades bioquímicas de xilanases produzidas por fungos mesófilos endofíticos	60
Tabela 6: Efeito de íons e aditivos sobre a atividade da Excg1	68
Tabela 7: Especificidade de substrato de Excg1	70
Tabela 8: Parâmetros cinéticos para hidrólise de diferentes xilanas por Excg1	72
Tabela 9: Parâmetros cinéticos de diferentes xilanases produzidas por fungos mesófilos	74
Tabela 10: Parâmetros cinéticos para hidrólise de xilana <i>Beechwood</i> por Excg1	98
Tabela 11: Parâmetros cinéticos para hidrólise de xilana <i>Beechwood</i> por xilanases halotolerantes.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA: Soro albumina bovina
CCD: Cromatografia em camada delgada
CMC: Carboximetilcelulose
DEAE: Dietilaminoetil
DNS: Ácido dinitrosalicílico
EDTA: Ácido etileno diamintetraacético
FES: Fermentação em estado sólido
GP: Grau de polimerização
Lis: Líquidos iônicos
PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida
PDA: *Potato Dextrose Agar*
pl: Ponto Isoelétrico
pNP-Xil: *p*-nitrofenil- β -D-xilanopiranosídeo
SDS: Dodecil sulfato de sódio
TCA: Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Consumo de energia e o meio ambiente	2
1.2. Biomassa lignocelulósica	4
1.3. Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica: o complexo xilanolítico.....	8
1.4. Xilanases.....	11
1.5. Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica	13
1.6. A produção de etanol 2G e o consumo de água	17
1.7. Microrganismo de estudo: <i>Colletotrichum graminicola</i>	20
2. Objetivos	22
3. Material e Métodos	24
3.1. Organismo.....	25
3.2. Manutenção das linhagens	26
3.3. Crescimento de <i>C. graminicola</i>	26
3.4. Obtenção do extrato bruto de <i>C. graminicola</i> rico em xilanases	26
3.5. Ensaio enzimáticos	27
3.5.1. Determinação da atividade xilanase	27
3.5.2. Determinação da atividade da enzima purificada sobre outros substratos	28
3.6. Dosagens de proteína.....	29
3.7. Purificação de uma xilanase majoritária produzida por <i>C. graminicola</i>	29
3.8. Análises eletroforéticas e focalização isoelétrica	30
3.9. Análise da sequência de aminoácidos de Excg1 por espectrometria de massas.....	30
3.10. Determinação da massa molecular de Excg1	31
3.11. Dosagem de carboidratos totais.....	32
3.12. Caracterização bioquímica e cinética de Excg1	32
3.12.1. Efeito de temperatura e pH sobre a atividade xilanásica de Excg1	32
3.12.2. Estabilidade de Excg1 frente à temperatura, ao pH e à presença de NaCl.....	33
3.12.3. Efeito de sais e outros efetores sobre atividade xilanásica de Excg1	34

3.12.4. Tratamento dos dados cinéticos	35
3.13. Análise dos produtos de hidrólise de xilana <i>Beechwood</i> por ação de Excg1 em diferentes condições de reação	35
3.13.1. Cromatografia em Camada Delgada (CDD) de sílica	36
3.13.2. Espectrometria de massas	37
3.14. Efeito dos produtos de hidrólise sobre a atividade de Excg1	37
4. Resultados e Discussão	39
4.1. Purificação da enzima	40
4.2. Propriedades Moleculares de Excg1	44
4.2.1. Análise de Excg1 purificada por espectrometria de massas.....	44
4.2.2. Massa molecular aparente.....	45
4.2.3. Teor de carboidratos totais e ponto isoelétrico de Excg1	52
4.3. Caracterização bioquímica e cinética de Excg1	54
4.3.1. Efeito de temperatura e pH sobre a atividade xilanásica de Excg1	54
4.3.2. Estabilidade térmica e ao pH de Excg1	56
4.3.3. Efeito de diferentes sais e outros efetores sobre a atividade xilanásica	67
4.3.4. Especificidade de substrato de Excg1	70
4.3.5. Determinação dos parâmetros cinéticos para a hidrólise de diferentes xilanas	71
4.4. Análise dos produtos de hidrólise de xilana por Excg1	76
4.5. Análise dos produtos de reação por espectrometria de massas.....	78
4.6. Análise do efeito dos produtos finais de hidrólise sobre a atividade de Excg1	82
4.7. Caracterização bioquímica e cinética de Excg1 na presença de NaCl	83
4.7.1. Efeito de concentrações crescentes de NaCl sobre a atividade xilanásica e a estabilidade de Excg1	84
4.7.2. Efeito da presença de NaCl sobre pH e temperatura ótimos de reação de Excg1	88
4.7.3. Efeito da presença de NaCl sobre a estabilidade térmica e ao pH de Excg1	91
4.7.4. Efeito da presença de NaCl sobre os parâmetros cinéticos para a hidrólise de xilana <i>Beechwood</i> por Excg1	96

4.7.5. Efeito da presença de NaCl sobre o padrão de hidrólise de xilana <i>Beechwood</i> por Excg1	100
4.8. Efeito de diferentes solventes orgânicos e acetato sobre a atividade xilanásica de Excg1	101
5. Conclusão	104
6. Referências Bibliográficas	106

Introdução

1. Introdução

1.1. Consumo de energia e o meio ambiente

A relação energia e meio ambiente, particularmente a questão do aquecimento global, devido à emissão dos gases causadores do efeito estufa, está entre as maiores preocupações da sociedade atual. Não há dúvidas de que a energia é a força motriz para o progresso da civilização, e que o consumo de energia *per capita* é um fator limitante para a prosperidade de uma nação. Durante décadas, o consumo de energia no mundo cresceu a passos largos para atender às necessidades da população mundial e à melhoria da qualidade de vida.

No entanto, a dependência global de combustíveis provenientes de fontes de energia não renováveis proporciona grandes prejuízos, tanto econômicos quanto ambientais. O consumo mundial de combustíveis derivados do petróleo, por exemplo, é cerca de 100.000 vezes mais rápido do que sua produção natural (CHAUHAN et al., 2016). De acordo com esta estimativa, a disponibilidade das reservas de combustíveis fósseis acabará em questão de anos (AMARA et al., 2016; CHAUHAN et al., 2016).

Além disso, a poluição atmosférica cresceu assustadoramente nas últimas décadas, em decorrência do consumo desenfreado de combustíveis fósseis. Isso porque o componente principal gerado na sua combustão é o gás carbônico (CO₂), que contribui substancialmente para o aquecimento global (VELEA et al., 2009; HUANG, G. et al., 2016). Do mesmo modo, este gás contribui para outros efeitos negativos sobre o ambiente, como a chuva ácida, e para uma série de problemas relativos à saúde humana (HUANG, G. et al., 2016).

Como alternativa ao uso de combustíveis derivados do petróleo e visando também à diminuição da emissão de poluentes e gases causadores do efeito estufa, atualmente há um grande interesse na utilização de combustíveis provenientes de

fontes de energia renováveis (LIMAYEM e RICKE, 2012; CHOVAU et al., 2013; KENNES et al., 2015; LIGUORI et al., 2016). Nesse sentido, a utilização do chamado “etanol de segunda geração” (etanol 2G) tem despertado grande atenção em nível mundial, devido às numerosas vantagens, tanto econômicas quanto ambientais (BUSSAMRA et al., 2015; SAINI et al., 2015; KENNES et al., 2015). Este biocombustível é obtido principalmente a partir de materiais lignocelulósicos, uma fonte de energia altamente abundante e renovável (KENNES et al., 2015; KUMAR, R. et al., 2016).

Além do crescente interesse mundial na utilização de biocombustíveis, no Brasil o desenvolvimento de tecnologias para a produção de etanol 2G também é estimulado pelos grandes volumes de resíduos agroindustriais gerados anualmente (FARINAS et al., 2008; BUSSAMRA et al., 2015; MORALES et al., 2015). Isso porque o país é o maior exportador e o segundo maior produtor de etanol de primeira geração no mundo, a partir da cana-de-açúcar (MORALES et al., 2015). Dados da safra 2015/2016 apontam para um processamento de cerca de 617,65 milhões de toneladas de cana-de-açúcar somente na região Centro-Sul do país (UNICA, 2016), e estudos indicam que para cada tonelada de cana-de-açúcar processada são gerados cerca de 140 kg de palha e 140 kg de bagaço, em massa seca (PIPPPO et al., 2011; SANTOS et al., 2012). Embora esses resíduos sejam utilizados pelas usinas atualmente para cogeração de energia (PIPPPO et al., 2011), o excedente poderia ser utilizado para a produção de etanol, aumentando substancialmente a produtividade por hectare de cana plantada, contribuindo, assim, para a diminuição da competição pelo uso da terra para a geração de energia e produção de alimentos (GOLDEMBERG et al., 2008; LIGUORI et al., 2016). Paralelamente, outros resíduos agroindústrias como casca e palha de arroz, bagaço de laranja, palha e sabugo de milho, além da palha da soja também são abundantes no país e representam potenciais matérias primas baratas para a produção de etanol de segunda geração (LIGUORI et al., 2013). Em contraste, esses resíduos podem representar grande ameaça ao meio ambiente quando descartados de maneira inadequada (BHATIA et al., 2012). Assim, o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de biocombustíveis pode trazer grandes benefícios, tanto em aspectos econômicos quanto ambientais (BHATIA et al., 2012; IQBAL et

al., 2013; SINGHANIA et al., 2013; COLABARDINI et al., 2014; KENNES et al., 2015).

Embora existam dificuldades técnicas e econômicas para a produção do etanol 2G em escala industrial, ela já é uma realidade no Brasil. Atualmente existem três usinas no país que produzem o biocombustível (UNICA, 2016). A primeira delas foi inaugurada em 2014 pela empresa Granbio Sérgio Godoy, em São Miguel dos Campos - AL. Outras duas foram inauguradas recentemente, no estado de São Paulo: em 2014, a Usina São Manoel, localizada no município de São Manuel; e em 2015, a primeira usina do grupo Raízen produtora de etanol de segunda geração a partir de bagaço de cana, em Piracicaba (UNICA, 2016).

A despeito disso, é necessário o contínuo aperfeiçoamento dos processos de produção de etanol 2G, visando maior competitividade no mercado, o que tem sido limitado, entre outros fatores, pela recalcitrância da biomassa lignocelulósica (KENNES et al., 2015; SUN et al., 2016). Essa resistência, tanto à hidrólise química quanto biológica, está relacionada ao fato de celulose, hemicelulose e lignina formarem uma matriz tridimensional complexa, nas paredes celulares vegetais (GUPTA e VERMA, 2015; DAMM et al., 2016; SUN et al., 2016). De fato, como resultado de processos de adaptação evolutiva, as paredes celulares dos vegetais desenvolveram a importante função de impedir o ataque exercido por microrganismos, constituindo a primeira barreira entre as células e o ambiente (SØRENSEN et al., 2010). Nessa matriz tridimensional complexa, os polissacarídeos, em especial a celulose, estão protegidos da degradação (ZHAO, X. et al., 2012; DIMAROGONA et al., 2013; IQBAL et al., 2013).

1.2. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por lignina, celulose e hemicelulose (Fig. 1), além de pectina, proteínas, ceras e sais minerais (ZHAO, X. et al., 2012; JORDAN et al., 2012 ; WANG, M. et al., 2013; KENNES et al., 2015).

A lignina é um heteropolímero aromático que, associado aos polissacarídeos, confere rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais. É constituída por unidades fenilpropano, sintetizadas a partir de três álcoois *p*-hidróxi-cinâmicos precursores: *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Fig. 1) (BHATIA et al., 2012; ZHAO, X. et al., 2012; IQBAL et al., 2013).

Figura 1. Organização estrutural da parede celular vegetal. Adaptado de Kondo et al. (1996).

A celulose é o principal componente (35 a 50% em massa) da parede celular das plantas. Este polímero é constituído por uma cadeia não ramificada de monômeros de D-glicose unidos entre si por ligações O-glicosídicas do tipo β -1,4 (Fig. 1) (IQBAL et al., 2013; SUN et al., 2016). Sua conformação estendida é a mais estável, devido à configuração β das ligações glicosídicas, originando cadeias longas e retas (GIBSON, 2012; DAMM et al., 2016). Várias cadeias de celulose, paralelas entre si, unem-se por ligações de hidrogênio formando microfibrilas, estruturas supramoleculares cristalinas, de alta resistência tensional e com poucas

regiões amorfas (ZHAO, X. et al., 2012; IQBAL et al., 2013; SUN et al., 2016). A junção de várias microfibrilas originam as fibrilas, redes de microfibrilas embebidas por uma matriz amorfa, constituída por polissacarídeos não celulósicos, em especial as hemiceluloses, além de lignina (ZHAO, X. et al., 2012; PAULY et al., 2013; DAMM et al., 2016).

As hemiceluloses constituem uma classe de heteropolissacarídeos estruturalmente diversos que se associam à celulose principalmente por ligações de hidrogênio, formando também ligações covalentes com a lignina, favorecendo a adesão e coesão das fibras, a manutenção da integridade da parede celular vegetal e a proteção da celulose contra a ação de celulasas (BEG et al., 2001; JORDAN et al., 2012; ZHAO, X. et al., 2012; SHARMA e KUMAR, 2013; DAMM et al., 2016). Este polissacarídeo representa cerca de 20 a 35%, em massa, da parede celular vegetal e apresenta grande variabilidade química e molecular. Sua cadeia principal é composta por pentoses (principalmente D-xilose, L-arabinose) e hexoses (D-manose, D-glicose ou D-galactose) unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 e geralmente possui ramificações (Fig. 1) (DEUTSCHMAN e DEKKER, 2012). As ramificações podem conter ácidos urônicos (ácidos α -D-glucurônico, α -D-4-O-metil-galacturônico e α -D-galacturônico), ácido ferúlico e outros açúcares, como arabinose, galactose, além de α -L-ramnose e α -L-fucose, em pequenas proporções. Além disso, os grupos hidroxila dos monossacarídeos podem ser parcialmente substituídos por grupos acetil (DEUTSCHMAN e DEKKER, 2012; SUN et al., 2016). As cadeias principais apresentam grau de polimerização (~70 a 200), grau de substituição, tipo e distribuição de substituintes altamente variáveis, dependendo do tecido celular, do estágio de desenvolvimento e da espécie vegetal (ZHAO, X. et al., 2012; PAULY et al., 2013; SUN et al., 2016).

As xilanas são a principal forma de hemicelulose encontrada na parede celular vegetal, representando cerca de 5 a 15% da biomassa da madeira de folhosas, e até cerca de 50% dos tecidos de monocotiledôneas, gramíneas e cereais (COLLINS et al., 2005; DEUTSCHMAN e DEKKER, 2012; DAMM et al., 2016). A cadeia principal é constituída por resíduos de xilose e sua estrutura química varia desde um homopolímero linear até um heteropolissacarídeo altamente ramificado (Fig. 2). As ramificações, que contêm usualmente arabinose, ácido glucurônico ou metilglucurônico, determinam em grande parte as propriedades da xilana, tais como

solubilidade, conformação e reatividade (PAULY et al., 2013; GORSHKOVA et al., 2013; JURUTU e WU, 2013; SHARMA e KUMAR, 2013; SUN et al., 2016).

Com relação à estrutura e aos grupos substituintes mais comuns, as xilanas podem ser classificadas como: homoxilanas lineares, arabinoxilanas, glucuronoxilanas, glucuronoarabinoxilanas e galactoglucoronoarabinoxilanas. As homoxilanas são formadas unicamente por resíduos de D-xilose, não são ramificadas e não são comumente encontradas na natureza, sendo isoladas de poucas fontes, como alguns tipos de gramas, algas e talos de tabaco (FILHO, 2004; CORRAL e VILLASEÑOR-ORTEGA, 2006; MOTTA et al., 2013).

Já as xilanas substituídas podem ser classificadas em quatro grandes grupos (POLIZELI et al., 2005; CORRAL e VILLASEÑOR-ORTEGA, 2006; MOTTA et al., 2013):

1. Arabinoxilanas: possuem cadeias laterais formadas apenas por unidades de α -L-arabinofuranosil e são comumente isoladas de cereais, como o trigo;
2. Glucuronoxilanas: possuem o ácido α -D-glucurônico ou o seu derivado, o ácido 4-O-metil-glucurônico, como único substituinte. São encontradas na madeira de folhosas, como a faia (*Beechwood*) e a bétula (*Birchwood*);
3. Glucuronoarabinoxilanas: possuem tanto os ácidos α -D-glucurônico e 4-O-metil-glucurônico, como unidades de α -L-arabinofuranosil como grupos substituintes. São tipicamente encontradas em gimnospermas, como coníferas, além de estarem presentes em gramíneas e cereais.
4. Galactoglucoronoarabinoxilanas: apresentam resíduos de β -D-galactopiranosil na cadeia lateral, além dos grupos já presentes em glucuronoarabinoxilanas. São encontradas em plantas perenes.

Figura 2. Estrutura química geral das xilanas. Adaptado de Collins et al. (2005).

1.3. Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica: o complexo xilanolítico

A hidrólise eficiente da biomassa lignocelulósica é um dos passos essenciais para a produção economicamente viável de etanol 2G. A hidrólise pode ser realizada por métodos químicos ou enzimáticos; entretanto, os métodos enzimáticos são considerados atualmente mais promissores, além de menos agressivos ao meio ambiente (LIGUORI et al., 2013; JONSSON et al., 2013; SINGHVI et al., 2014; KENNES et al., 2015, LIGUORI et al., 2016).

Durante décadas apenas a hidrólise da celulose foi o foco da atenção dos pesquisadores. O consenso atual sugere, entretanto, que a produção de etanol de segunda geração a preços competitivos depende da hidrólise eficiente tanto da celulose como das hemiceluloses, além da fermentação eficiente das pentoses e hexoses liberadas e do aproveitamento da lignina (LIMAYEM e RICKE, 2012; CHOVAU et al., 2013; SINGHVI et al., 2014; RAGAUSKAS et al., 2014; MORALES et al., 2015). Dessa forma, é crescente o interesse na hidrólise enzimática das hemiceluloses (JUTURU e WU, 2012; SHARMA e KUMAR, 2013; MORALES et al., 2015) e da lignina (RICO et al., 2014), bem como no desenvolvimento, por meio de

técnicas de engenharia metabólica, de leveduras capazes de fermentar pentoses e hexoses com bons rendimentos (NIELSEN et al., 2013; COLABARDINI et al., 2014; MORALES et al., 2015).

A hidrólise eficiente e completa da xilana requer um sistema enzimático complexo devido à sua heterogeneidade química e estrutural, uma vez que vários tipos de ligações e unidades monoméricas estão presentes em sua estrutura (MOREIRA e FILHO, 2016; KUMAR, V. et al., 2016). Este sistema enzimático é conhecido como sistema ou complexo xilanolítico (Fig. 3) e suas principais enzimas atuam sinergicamente tanto sobre a cadeia principal quanto sobre as cadeias laterais da xilana (MOREIRA e FILHO, 2016).

As principais enzimas do complexo xilanolítico são a endo- β -1,4-xilanase (1,4 β -1,4-xilana xilohidrolase, EC 3.2.1.8), que catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas internas da cadeia principal liberando xilooligossacarídeos, xilobiose e xilose (MOREIRA e FILHO, 2016; KUMAR, V. et al., 2016) e a β -D-xilosidade (β -D-xilosídeo xilohidrolase, EC 3.2.1.37), que atua sobre os xilooligossacarídeos e a xilobiose, liberando xilose (POLIZELI et al., 2005; SHARMA e KUMAR, 2013; UDAY et al., 2016). Já a remoção dos grupos substituintes é catalisada por diferentes enzimas acessórias, que incluem α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), que remove resíduos de arabinose; α -glucuronidase (EC 3.2.1.139), que libera ácido glucurônico ou metilglucurônico; α -galactosidase (EC 3.2.1.22), que remove resíduos de galactose; acetil xilana esterase (EC 3.1.1.72), que hidrolisa ligações acetil-éster; ácido *p*-cumárico esterase (EC 3.1.1.-) e ácido ferúlico esterase (EC 3.1.1.73), que hidrolisa ligações feruloiléster e *p*-cumaroil-éster, respectivamente (POLIZELI et al., 2005; JUTURU e WU, 2012; SHARMA e KUMAR, 2013; ERGÜN e ÇALIK, 2016).

Figura 3. Estrutura da xilana e pontos de ação das enzimas do complexo xilanolítico. Adaptado de Ergün e Çalik (2016).

As endo-xilanases e β -xilosidases atuam sinergicamente na hidrólise da xilana, e uma boa parte das endo-xilanases conhecidas é inibida pelos produtos finais de reação, xilobiose e xilooligossacarídeos curtos (POLIZELI et al., 2005; KNOB et al., 2010; YANG et al., 2014). Assim, além de catalisar o passo final da hidrólise, as β -xilosidases desempenham um papel importante no alívio da inibição das endo-xilanases pelos produtos, possibilitando uma maior eficiência do processo como um todo. Um forte sinergismo também é observado entre as endo-xilanases e as enzimas acessórias. Considerando, por exemplo, a presença de ramificações de arabinose, estas podem dificultar a ação das endo-xilanases sobre a cadeia principal; entretanto, a remoção dos resíduos de arabinose pelas α -L-arabinofuranosidases facilita o acesso à cadeia principal, potencializando a ação das endo-xilanases (LAGAERT, et al. 2014).

1.4. Xilanases

As endo-xilanases são as principais enzimas do complexo xilanolítico que atuam no processo de despolimerização da xilana (POLIZELI et al., 2005; JUTURU e WU, 2012; SHARMA e KUMAR, 2013; UDAY et al., 2016). A hidrólise do polímero pode ocorrer randomicamente, porém podem existir sítios específicos para hidrólise que dependem da natureza do substrato, como por exemplo, do comprimento da cadeia principal, do grau de ramificação e do número de substituintes (LI et al., 2000; POLIZELI et al., 2005; CHUTANI et al., 2015).

De acordo com o sistema de classificação das glicosil hidrolases (GH), disponível no banco de dados Cazy (Carbohydrate-Active enzymes), as endo-xilanases pertencem principalmente às famílias GH 10 e 11. No entanto, enzimas com atividade xilanásica também foram classificadas nas famílias GH 5, 7, 8 e 43, por apresentarem diferenças em seus domínios catalíticos, nas propriedades físico-químicas, na estrutura, no modo de ação e/ou na especificidade de substrato (DODD e CANN, 2010; MOTTA et al., 2013; UDAY et al., 2016).

As xilanases pertencentes à família GH 10 tem como propriedades principais a massa molecular usualmente maior que 30 kDa e baixo valores de pI, enquanto as enzimas classificadas na família GH 11 apresentam massa molecular abaixo de 30 kDa e altos valores de pI. Entretanto, exceções a esses padrões já foram relatadas (COLLINS et al., 2005; UDAY et al., 2016).

As xilanases das famílias GH 10 e 11 catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas da cadeia principal da xilana com retenção da configuração do carbono anomérico. Dois resíduos de glutamato adequadamente posicionados no sítio ativo estão diretamente envolvidos no mecanismo de catálise, que envolve a formação de um intermediário covalente glicosil-enzima (Fig. 4) (COLLINS et al., 2005; MOREIRA e FILHO, 2016). Um dos resíduos de glutamato, inicialmente protonado, age como catalisador ácido-base, doando H^+ para o substrato, enquanto o outro atua como nucleófilo, atacando o carbono anomérico e levando à clivagem da ligação glicosídica, com saída do grupo de partida e formação do intermediário covalente. No segundo passo, a cadeia lateral do primeiro resíduo de glutamato, que se

encontra desprotonada, atua como acceptor de H^+ , abstraindo um próton de uma molécula de água que ataca o carbono anomérico, liberando o produto final e regenerando a enzima livre.

Figura 4: Mecanismo de reação das xilanases das famílias GH10 e 11. Adaptado de Collins et al. (2005).

Na natureza, uma grande variedade de microrganismos é capaz de produzir endo-xilanases, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos (POLIZELI et al., 2005; KUMAR, V. et al. 2013a; LOMBARD et al. 2014; KUMAR, V. et al., 2016). Além disso, já foram descritas xilanases purificadas de invertebrados como moluscos, gastrópodes e crustáceos (SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997; TURKIEWICZ et al., 2000). No entanto, os fungos filamentosos são conhecidos por produzirem xilanases extracelulares em níveis mais elevados em comparação com leveduras e bactérias, tornando-os atraentes para a produção dessas enzimas em escala industrial (POLIZELI et al., 2005; PAL e KHANUM, 2011; CHAPLA et al., 2013; CHUTANI et al., 2015). Em particular, os gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium*, entre os fungos mesófilos, e o gênero *Thermomyces*, entre os fungos termófilos, são considerados bons produtores de diferentes enzimas eficientes para

a sacarificação da xilana (KNOB e CARMONA, 2010; CHUTANI et al., 2015; KUMAR, V. et al., 2016).

Embora muitas xilanases fúngicas já tenham sido descritas, para cada aplicação pretendida é importante empregar uma enzima que apresente propriedades que favoreçam a sua utilização nas condições desejadas, no que diz respeito a pH e temperatura ótimos de reação, estabilidade ao pH e à temperatura, etc (KUMAR, V. et al., 2016; SUN et al., 2016). Além disso, uma propriedade muito atraente nas endo-xilanases é uma boa tolerância aos produtos de reação (SUN et al., 2016), contribuindo para elevar o rendimento final da sacarificação da xilana. No entanto, esta última propriedade tem sido pouco explorada entre as endo-xilanases já estudadas até o momento.

1.5. Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica

Embora a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica seja o processo mais promissor para a produção de etanol 2G, a recalcitrância da matéria-prima dificulta o acesso e a ação das enzimas hidrolíticas sobre os polissacarídeos da parede celular vegetal. Em função disso, é necessário realizar uma ou mais etapas de pré-tratamento da biomassa, que são fundamentais para aumentar a eficiência do processo de hidrólise (KENNES et al., 2015; KARIMI e TAHERZADEH, 2016; SUN et al., 2016). Os diferentes processos de pré-tratamento têm, então, por objetivo aumentar a área superficial e a porosidade da biomassa, bem como reduzir a cristalinidade da celulose (PORTILLO e SAADEDDIN, 2015; KENNES et al., 2015; KARIMI e TAHERZADEH, 2016; KIM, J. et al., 2016).

Nas últimas décadas, vários processos de pré-tratamento foram desenvolvidos, sendo classificados como físicos, químicos e biológicos (SUN et al., 2016). Cada um dos processos de pré-tratamento tem suas vantagens e desvantagens, e algumas combinações de processos podem não só melhorar a acessibilidade dos polissacarídeos da parede celular à ação das enzimas, mas

também facilitar a recuperação da lignina, por exemplo, para a geração de produtos de alto valor agregado (KENNES et al., 2015; KIM, J. et al., 2016; SUN et al., 2016).

Os principais efeitos de alguns dos processos de pré-tratamento conhecidos sobre a composição química e estrutural dos materiais lignocelulósicos estão resumidos na Tabela 1. Considerando a produção de etanol 2G, os processos mais interessantes são aqueles que removem essencialmente a lignina, preservando a celulose e a hemicelulose (KENNES et al., 2015; SUN et al., 2016).

Tabela 1: Efeito de diferentes processos de pré-tratamento sobre a composição e estrutura dos materiais lignocelulósicos

Método de pré-tratamento	Remoção da lignina	Remoção da hemicelulose	Aumento da área acessível	Diminuição do grau de cristalinidade da celulose	Aumento da porosidade	Geração de inibidores de hidrolases
Alcalino	+++	++	+++	.	+++	-
Ácido	+	+++	+++	.	+	+++
Deslignificação oxidativa	+++	.	.	.	+++	-
<i>Organosolv</i>	+++	-	+++	.	+	-
Líquidos Iônicos	+	-	+++	+++	+++	-
Moagem	.	.	+++	+++	.	+++
Hidrotérmico	+	+++	+	.	+	+++
Explosão a vapor	+++	+++	+++	-	+++	+++
Explosão da fibra com amônia	+	-	+++	+++	+++	-

+++ Efeito alto

+ Efeito médio

- Efeito baixo

. Sem Efeito

Adaptado de SUN et al., 2016.

Assim, dentre os diversos pré-tratamentos desenvolvidos até o momento, os mais apropriados quando se visa à produção de etanol 2G seriam os alcalinos e aqueles que empregam solventes orgânicos (*organosolv*) ou líquidos iônicos (LIs).

Os pré-tratamentos alcalinos brandos envolvem a utilização de reagentes como NaOH, Ca(OH)₂, KOH, Na₂CO₃, CaO e hidróxido de amônio, e são comumente usados para remover a lignina (KENNES et al., 2015; KIM, J. et al., 2016; SUN et al., 2016). No entanto, a celulose e a hemicelulose são degradadas e removidas parcialmente (CHENG et al., 2010; KENNES et al., 2015; KIM, J. et al., 2016). Portanto, caso sejam utilizados pré-tratamentos alcalinos, as condições devem ser criteriosamente otimizadas para maximizar a remoção de lignina e minimizar a hidrólise dos polissacarídeos (CHENG et al., 2010; KIM, J. et al., 2016). A despeito disso, após um pré-tratamento alcalino diferentes subprodutos são formados, os quais podem inibir a ação das enzimas hidrolíticas (KENNES et al., 2015; JÖNSSON e MARTÍN, 2016). Um subproduto típico de pré-tratamento alcalino é o ácido acético, formado a partir dos grupos acetil presentes na hemicelulose (JÖNSSON e MARTÍN, 2016). Outra desvantagem dos processos alcalinos é a necessidade de neutralizar a biomassa pré-tratada, levando ao acúmulo de sais, que também podem causar inibição enzimática no passo subsequente, exigindo a realização de etapas de lavagem (GARCÍA-TORREIRO et al., 2016).

No processo *organosolv*, os solventes orgânicos são utilizados principalmente para extrair a lignina, aumentando o volume e a área superficial das fibras lignocelulósicas e tornando-as mais acessíveis à ação das enzimas hidrolíticas. Muitos solventes orgânicos como etanol, metanol, acetona, ácidos orgânicos, perácidos orgânicos e etilenoglicol, têm sido utilizados com sucesso para pré-tratar diferentes biomassas (ZHAO, X. et al., 2009; ZHANG, K. et al., 2016). Entretanto, a presença de níveis residuais de solventes na biomassa pré-tratada pode inibir fortemente a atividade das enzimas hidrolíticas e, portanto, o solvente deve ser eliminado após o pré-tratamento. Um dos solventes mais empregados atualmente é o etanol, devido à sua baixa toxicidade e principalmente à facilidade de recuperação (SUN et al., 2016), permitindo prevenir a inibição enzimática e reduzir os custos do processo de pré-tratamento (JÖNSSON e MARTÍN, 2016).

Os pré-tratamentos em que se utilizam LIs, sais com ponto de fusão geralmente menor que 100°C e usualmente formados por um ânion inorgânico e um cátion orgânico volumoso, têm sido considerados uma alternativa menos poluente para o processo de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. Além disso, reduzem eficientemente a cristalinidade da celulose, preservam grande parte da hemicelulose e removem parte da lignina sem gerar inibidores das hidrolases, contribuindo, assim, para aumentar o rendimento da sacarificação (QIU et al., 2012; KENNES et al., 2015; SUN et al., 2016). No entanto, os próprios LIs frequentemente inibem as glicosil-hidrolases, o que tem sido atribuído à sua interferência sobre as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas das moléculas das enzimas, bem como à eliminação da camada de hidratação, essencial para a função e estabilidade estrutural das proteínas de uma forma geral (PORTILLO e SAADEDDIN, 2015; ZHANG, L. et al., 2007). Consequentemente, etapas de lavagem após o pré-tratamento com LIs também são requeridas, encarecendo o processo (PORTILLO e SAADEDDIN, 2015).

1.6. A produção de etanol 2G e o consumo de água

Nos últimos anos, o elevado consumo de água nas plantas de processamento de biomassa para produção de etanol 2G (1,9 - 5,9 m³ de água por m³ de biocombustível produzido) tem despertado grande preocupação da comunidade científica (FANG, C. et al., 2015). Dada a escassez de água doce que já ocorre em muitas regiões ao redor do mundo, privilegiando o uso para consumo humano e resultando também em elevação de preços, a operação das biorrefinarias pode tornar-se difícil, ou até insustentável. Em função disso, vem ganhando relevância a possibilidade do uso de recursos hídricos não potáveis, com destaque para a água do mar, na etapa de pré-tratamento da biomassa e também na etapa de sacarificação, substituindo a água doce nos meios de reação empregados nas biorrefinarias. De fato, este parece ser um campo promissor de pesquisa, além de integrar questões sociais, energéticas, econômicas e ambientais (de MARÍA, 2013).

Até o momento, o emprego de água do mar na fase de pré-tratamento da biomassa foi pouco estudado. Entretanto, alguns autores investigaram o efeito da adição de sais sobre a eficiência do pré-tratamento hidrotérmico de diferentes biomassas (LIU, L. et al., 2009; YU et al. 2011). Mais recentemente, Fang, C. et al. (2015) relataram ainda que a eficiência do pré-tratamento hidrotérmico de folhas de tamareira foi maior quando a água doce foi substituída por água do mar, resultando em maior percentual de celulose amorfa e melhor efeito de descristalização da celulose (menor índice de cristalinidade) ao final do processo. Segundo os autores, a ação dos íons seria análoga à dos LIs, ou seja, a penetração de íons no interior das fibras celulósicas teria um efeito perturbador sobre a extensa rede de ligações de hidrogênio intra- e intermoleculares (FANG, C. et al., 2015).

No que diz respeito à etapa de sacarificação, por sua vez, é bem conhecido que diferentes íons, em baixas concentrações, podem inibir ou estimular a atividade de muitas enzimas, entre elas as glicosil-hidrolases (ZANOELO et al., 2004; SOUZA, F. et al., 2010; SILVA, J. et al., 2013; MELEIRO et al., 2014; GAUR et al., 2015). Esse efeito pode estar relacionado à interação dos íons com diferentes sítios de ligação presentes nas moléculas das enzimas, e/ou com certos resíduos de aminoácidos importantes para a catálise, ou ainda com o substrato.

Já em presença de concentrações elevadas de sais, a maioria das enzimas apresenta baixa ou nenhuma atividade catalítica, o que tem sido atribuído ao efeito dos íons sobre a estrutura e a dinâmica da água (KARAN et al., 2012). É bem conhecido que a função biológica e a estrutura de uma proteína são afetadas de maneira crítica pelas suas interações superficiais com as moléculas de água, que tendem a interagir favoravelmente com os grupos polares superficiais, formando, ao contrário, capas ordenadas de moléculas unidas por ligações de hidrogênio ao redor das regiões hidrofóbicas expostas. Em altas concentrações salinas, entretanto, os íons sequestram as moléculas de água, limitando a disponibilidade de moléculas livres para a hidratação da proteína. Além disso, desarranjam as estruturas locais organizadas de moléculas de água, por ruptura de ligações de hidrogênio intermoleculares, e perturbam as interações eletrostáticas entre cadeias laterais de resíduos de aminoácidos carregados. Em conjunto, esses efeitos afetam a estrutura e a função da proteína, sua solubilidade, estabilidade e capacidade de interação

com outras moléculas, incluindo outras proteínas, e até mesmo a interação entre subunidades da mesma proteína (KARAN et al., 2012; FANG, C. et al., 2015).

Além da concentração, a natureza dos íons presentes em solução também é importante no que diz respeito aos efeitos desestabilizantes que exercem sobre a estrutura e a função das proteínas. Em geral, o efeito desestabilizante de um íon pode ser previsto pela sua posição na série de Hofmeister (KARAN et al., 2012; FANG, C. et al., 2015). Embora a concentração salina da água do mar varie amplamente de acordo com a localização geográfica, sua composição é bastante conhecida (Tabela 2) e de acordo com a série de Hofmeister, a maior parte dos íons presentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Br^- , Cl^-) pode exercer efeitos desestabilizantes sobre diferentes enzimas, podendo assim influenciar negativamente a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica (ZHAO, H., 2005; FANG, C. et al., 2015).

Além dos meios reacionais, outro fator que contribui grandemente para elevar o consumo de água nas biorrefinarias é a necessidade de etapas de lavagem antes da sacarificação da biomassa, visando à remoção de resíduos (tais como altas concentrações de sais, solventes e LIs residuais) e subprodutos de diferentes processos de pré-tratamento (SUN et al., 2016). Em função disso, é crescente o interesse na identificação de glicosil hidrolases, entre elas xilanases, tolerantes a esses resíduos e subprodutos.

Tabela 2: Composição média estimada da água do mar

Componente	Concentração na água do mar (g.L⁻¹)
NaCl	27,133
MgCl ₂	2,504
MgSO ₄	3,382
CaCl ₂	1,17
KCl	0,74
NaHCO ₃	0,21
NaBr	0,08
Total de sal	35,22
Água remanescente	964,78

Adaptado de de María (2013).

1.7. Microrganismo de estudo: *Colletotrichum graminicola*

Como já citado, os fungos filamentosos são reconhecidamente excelentes produtores de xilanases e outras enzimas lignocelulolíticas (POLIZELI et al., 2005; PAL e KHANUM, 2011; CHAPLA et al., 2013; CHUTANI et al., 2015). Entre estes, os fungos decompositores de materiais lignocelulósicos são os principais microrganismos utilizados industrialmente para a produção de enzimas lignocelulolíticas com interesse biotecnológico, e os sistemas lignocelulolíticos de diferentes espécies fúngicas têm sido muito estudados (BALDRIAN e GABRIEL, 2003).

Os fungos do gênero *Colletotrichum*, pertencentes ao filo Ascomycota, são fungos mesófilos, endofíticos, fitopatogênicos e apresentam um ciclo de vida hemibiotrófico, ou seja, se hospedam durante uma fase da vida em tecidos vivos e durante outra, em tecidos mortos da planta (PEREIRA et al., 1993; TANG et al., 2006; LUDWIG et al., 2014). O alojamento dos fungos do gênero *Colletotrichum* nos tecidos vegetais parece estar relacionado à sua capacidade em produzir enzimas

extracelulares, que podem degradar os componentes da parede celular das plantas (ACOSTA-RODRIGUES et al., 2005; GAN et al., 2012). Além disso, foi demonstrada a existência de genes nesses microrganismos que codificam para diversas hidrolases (KING et al., 2011; O'CONNELL et al., 2012; GAN et al., 2012).

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Colletotrichum* são considerados modelos experimentais para o estudo dos mecanismos moleculares dos processos de infecção, resistência do hospedeiro, transdução de sinais e interações planta-patógeno (O'CONNELL et al., 2012; ACOSTA-RODRIGUES et al., 2005). Até o momento, dentre as enzimas produzidas por diferentes espécies de *Colletotrichum* as mais estudadas foram as pectinases e poligalacturonases, responsáveis pelo ataque à pectina presente em folhas e frutos das plantas hospedeiras (HEBERT et al., 2004) e as quitinases, que atuam na degradação da quitina presente nas paredes celulares de fungos e insetos (SOUZA, R. et al., 2003). No entanto, o potencial dos fungos deste gênero para produzir enzimas com interesse biotecnológico foi pouco explorado até o momento.

Recentemente, as condições de cultivo para a produção de xilanases extracelulares, por fermentação em estado sólido (FES) por uma linhagem de *C. graminicola* em troncos em decomposição da floresta Amazônica (Brasil) foram otimizadas empregando a metodologia de superfície de resposta (ZIMBARDI et al., 2013). Este microrganismo mostrou-se excelente produtor de xilanases termoestáveis em meio simples constituído de farelo de trigo, sabugo de milho e sulfato de amônio. Além disso, o extrato bruto do cultivo de *C. graminicola* mostrou bom potencial para a hidrólise de palha de cana de açúcar, sem pré-tratamento (ZIMBARDI et al., 2013).

Objetivos

2. Objetivos

Os objetivos principais deste trabalho foram:

1. Purificação de uma endo-xilanase produzida por *Colletotrichum graminicola* quando cultivado sob FES em condições otimizadas para a produção de xilanases;
2. Caracterização bioquímica e cinética da endo-xilanase purificada;
3. Avaliação do potencial de aplicação biotecnológica da enzima purificada, com ênfase nas suas propriedades de tolerância aos produtos de reação, bem como à presença de sais e solventes orgânicos.

Material e Métodos

3. Material e métodos

3.1. Organismo

A linhagem de *C. graminicola* utilizada neste trabalho foi isolada a partir de ascocarpos crescidos em troncos em decomposição da floresta Amazônica, Brasil. Pedacos pequenos (0,5 cm x 0,5 cm) foram assepticamente removidos do interior do asco, lavados rapidamente com hipoclorito de sódio a 10% (v/v) e enxaguados quatro vezes com água destilada esterilizada. Após este procedimento, os pedacos foram transferidos para meio PDA (*Potato Dextrose Agar*, Oxoid, UK) suplementado com extrato de malte 1% (v/v) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e antibióticos bacterianos (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de antibióticos de Fort Dodge (Brasil), contendo uma mistura de benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, sulfato de diidroestreptomicina, benzilpenicilina de potássio e sulfato de estreptomicina). Após incubação durante 10-15 dias a 25 °C, o micélio foi transferido para um novo meio sólido contendo antibióticos bacterianos. Este procedimento foi repetido até que as culturas de *C. graminicola* estivessem livres de bactérias. A identificação foi realizada utilizando características morfológicas e microscópicas como descrito por Ryvar den (1991) e Teixeira, A. (1995). A linhagem está depositada na coleção de fungos do laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, sob a coordenação do prof. Dr. João Atílio Jorge, que a cedeu gentilmente para a realização deste trabalho.

3.2. Manutenção das linhagens

A linhagem de *C. graminicola* foi mantida por repiques periódicos em meio sólido inclinado de PDA previamente autoclavado a 127 °C e 1,5 atm por 20 minutos. As culturas foram incubadas por 8 dias a 25 °C e após esse período armazenadas a 4 °C por no máximo 30 dias.

3.3. Crescimento de *C. graminicola*

Colletotrichum graminicola foi cultivado por FES em condições otimizadas para a produção de xilanases, como descrito por Zimbardi et al. (2013). O meio de cultivo foi constituído por 5 g de farelo de trigo suplementado com sabugo de milho 1% (m/m) e sulfato de amônio 0,1% (m/m) e a cultura foi incubada por 8 dias a 25 °C, em condições de umidade inicial do meio de 2 mL de água por grama de farelo seco.

3.4. Obtenção do extrato bruto de *C. graminicola* rico em xilanases

Após o cultivo, acrescentou-se 25 mL de água deionizada gelada ao meio de cultura, o qual foi homogeneizado levemente com um bastão de vidro, em banho de gelo. A suspensão foi filtrada em peneira de nylon e, posteriormente, centrifugada por 20 minutos a 10.000 x *g* a 4 °C. O sobrenadante obtido (extrato bruto) foi mantido a 4 °C para experimentos futuros, sem perda apreciável de atividade enzimática por até 30 dias.

3.5. Ensaios enzimáticos

Em todos os ensaios foram incluídos controles visando à avaliação da hidrólise espontânea dos substratos testados, nas condições empregadas. As condições experimentais (tempos de reação e unidades de atividade enzimática) empregadas em todos os ensaios foram ajustadas para garantir a estimativa de velocidades iniciais (resposta linear de formação do produto em função do tempo de reação).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de produto por minuto. A atividade específica foi definida como a relação entre o número de unidades de atividade por miligrama de proteína total presente no meio de reação ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$). Os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicata e cada experimento foi repetido utilizando três diferentes preparações enzimáticas ($n=3$).

3.5.1. Determinação da atividade xilanásica

A atividade xilanásica foi rotineiramente determinada quantificando-se os açúcares redutores liberados, empregando-se o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) segundo Miller (1959). O substrato utilizado foi xilana *Beechwood* (Sigma-Aldrich Chem. Co., Missouri, EUA) em concentração 1% (m/v), em um volume final de reação de 600 μL . A menos que indicado diferentemente, as condições de ensaio foram 65 °C e tampão McIlvaine (McILVAINE, 1921), pH 5,5. As reações foram iniciadas pela adição de 100 μL da enzima devidamente diluída ao meio reacional e interrompidas após intervalos de tempo convenientes pela adição de 600 μL do reagente DNS. As misturas obtidas foram então centrifugadas por 5 minutos a 5.000 $\times g$ e alíquotas de 400 μL dos sobrenadantes foram aquecidas em banho fervente

por 5 minutos. Após resfriamento, cada uma delas foi diluída com 2,0 mL de água destilada e o produto formado foi dosado espectrofotometricamente em 540 nm. A concentração de açúcares redutores presente em cada mistura reacional foi estimada a partir de uma curva padrão de xilose.

Nos experimentos realizados para determinação dos parâmetros cinéticos para a hidrólise de xilana pela endo-xilanase purificada as reações foram realizadas nas mesmas condições descritas acima, porém empregando concentrações crescentes de substrato (0,07 a 40 mg.mL⁻¹). Os meios reacionais foram mantidos sob agitação magnética constante durante todo o período da reação, devido à baixa solubilidade do substrato em água.

A atividade xilanásica também foi estimada, nas mesmas condições descritas acima, em presença de NaCl em concentrações finais na faixa de 0,5 a 3,0 mol.L⁻¹.

3.5.2. Determinação da atividade da enzima purificada sobre outros substratos

A atividade hidrolítica sobre diferentes substratos poliméricos, como celulose microcristalina (Avicel®, Fluka Chemical Co., Seelze, Germany), carboximetilcelulose (CMC) de alta e baixa viscosidade (Sigma-Aldrich Chem, Co) e xilana *Birchwood*, em concentração final 1% (m/v), foi determinada quantificando-se os açúcares redutores liberados pelo método do DNS, como descrito acima.

A atividade hidrolítica sobre o substrato sintético *p*-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (*p*NP-xil, Sigma-Aldrich Chem. Co.) foi determinada quantificando-se a liberação do íon *p*-nitrofenolato ($\epsilon_{410\text{nm}, \text{pH } 12} = 17.500 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$). As condições padrão de ensaio foram 65 °C e tampão McIlvaine, pH 5,5, contendo o substrato em concentração final 2 mmol.L⁻¹ em um volume de reação de 600 µL. A reação foi iniciada pela adição de 100 µL da enzima convenientemente diluída ao meio reacional e interrompida pela adição de 1 mL de tetraborato de sódio saturado, em intervalos de tempo adequados.

3.6. Dosagens de proteína

As dosagens de proteínas foram realizadas empregando o método de Read e Northcote (1981), utilizando-se soroalbumina bovina (BSA, Sigma-Aldrich Chem. Co.) como padrão. Todas as dosagens foram realizadas em duplicata.

3.7. Purificação de uma xilanase majoritária produzida por *C. graminicola*

O extrato bruto do cultivo de *C. graminicola* foi ajustado para uma concentração final de NaCl de $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ e aplicado em uma coluna de Phenyl-sepharose CL-4B (10,0 x 1,0 cm) equilibrada e eluída em tampão acetato de sódio $10,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 5,0, contendo NaCl $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ (tampão A). A coluna foi lavada com tampão A até não ser mais detectada eluição de proteínas ($A_{280\text{nm}}$) e/ou atividade xilanásica. As frações com maior atividade foram reunidas e concentradas em um concentrador a vácuo (*Concentrator Plus/Vacufuge® plus*, Eppendorf, New York, EUA). A amostra concentrada foi dessalificada em coluna de Sephadex G-25 (35,0 x 2,0 cm) equilibrada e eluída com tampão Tris $10,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, ajustado para pH 9,0 com ácido acético (tampão B). A eficiência da dessalificação foi avaliada pela ausência de cloreto na amostra proteica, testada pela adição de AgNO_3 5 mmol.L^{-1} às frações eluídas da coluna. As frações apresentando maior atividade xilanásica foram reunidas e aplicadas numa coluna de DEAE-Fractogel (10,0 x 2,0 cm) equilibrada e eluída em tampão B. Após lavagem exaustiva com tampão B até não ser mais detectada eluição de proteínas ($A_{280\text{nm}}$) e/ou atividade xilanásica, as frações com maior atividade foram reunidas, aliquotadas e armazenadas em geladeira, a 4°C . Este procedimento de purificação foi repetido cinco vezes utilizando cinco diferentes extratos de cultura de *C. graminicola*, resultando em cinco preparações diferentes de enzima pura (Excg1).

3.8. Análises eletroforéticas e focalização isoelétrica

Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE) para proteínas básicas foi realizada como descrito por Reisfeld et al. (1962) em géis em placa, empregando concentração de acrilamida de 7%. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada em géis em placa em concentração de acrilamida de 10%, conforme descrito por Laemmli (1970). As bandas de proteína foram reveladas com nitrato de prata (BLUM et al., 1987).

A focalização isoelétrica de Excg1 (cerca de 40 µg) foi realizada em géis de poliacrilamida cilíndricos (6 x 13 cm), a 6% de acrilamida, contendo 5% (v/v) de solução de Pharmalyte (pH 8-10), segundo O'Farrell et al. (1977). Após a corrida (500 V, 5 horas), um gel contendo a amostra foi corado com Coomassie Blue para visualização da banda proteica. Para a determinação do gradiente de pH, uma duplicata do gel, submetida às mesmas condições, foi fatiada em frações de 0,5 cm, sendo cada fatia tratada por uma noite com 2,5 mL de KCl 25 mmol.L⁻¹ para extração dos anfólitos. A seguir, o pH de cada fração foi determinado.

3.9. Análise da sequência de aminoácidos de Excg1 por espectrometria de massas

A análise da sequência de aminoácidos de Excg1 foi realizada conforme descrito por Souza, F. et al., (2010), em colaboração com o Prof. Dr. Jose Cesar Rosa (Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos do Centro de Química de Proteínas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo). Brevemente, a enzima purificada foi submetida a digestão utilizando 0,5 µg de tripsina modificada (Promega Co., Madison, EUA), por

um período de 18 horas de incubação a 37 °C. Os peptídeos obtidos foram dessalinizados empregando uma microcoluna de resina POROS R2 (PerSeptive Biosystems, Framingham, EUA), previamente equilibrada com ácido fórmico 0,2%. A seguir, a coluna foi eluída com uma solução de 60% de metanol e 5% de ácido fórmico e o volume da amostra foi reduzido para 2 µL. A amostra concentrada foi misturada à matriz (ácido 4-hidroxicinâmico 10 mg.mL⁻¹) na proporção 1:1 (peptídeos:matriz) e a mistura foi aplicada no amostrador (*plate*) para análise por espectrometria de massa (MS).

As análises por espectrometria de massas (MS-MALDI) foram realizadas no espectrômetro de massas Axima Performance MALDI-TOF/TOF (Shimadzu-Kratos, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). O perfil de massas dos peptídeos tripticos (“MS-fingerprint”) foi obtido, e as sequências desses peptídeos foram deduzidas com base no padrão de fragmentação dos íons *b* e *y* de alguns peptídeos selecionados em experimentos de dissociação induzida por colisão de alta energia (do inglês, *high-energy collision-induced dissociation* – CID-MS/MS). Os espectros de CID foram submetidos diretamente a análise comparativa com o banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando o algoritmo MASCOT (<http://matrixscience.com>).

A comparação dos peptídeos sequenciados com o banco de dados contendo o genoma de *C. graminicola* foi realizada com auxílio da ferramenta *Blastp*, disponível na plataforma NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.10. Determinação da massa molecular de Excg1

A massa molecular aparente de Excg1 foi estimada por SDS-PAGE, como descrito no item 3.8, empregando mistura padrão de proteínas pré-coradas de massas moleculares entre 6 e 204 kDa (BioRad, Califórnia, EUA).

A massa molecular aparente da enzima purificada na forma nativa foi estimada por filtração em gel em HPLC, utilizando uma coluna Bio-Sil SEC 400 (7,8

x 300 mm) (Bio-Rad). A coluna foi equilibrada e eluída com tampão fosfato 100 mmol.L⁻¹, pH 6,8, contendo NaCl 150,0 mmol.L⁻¹ e azida de sódio 10,0 mmol.L⁻¹, com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Frações de 1,0 mL foram coletadas e analisadas para atividade xilanásica. O volume morto da coluna ("void") foi determinado usando Blue Dextran (Sigma-Aldrich Chem. Co.) e as seguintes proteínas foram utilizadas para a calibração da coluna: gama globulina (bovina) (158 kDa, Bio-Rad), BSA (67 kDa), ovalbumina (44 kDa, Bio-Rad) e mioglobina equina (17 kDa, Bio-Rad).

3.11. Dosagem de carboidratos totais

O teor de carboidratos de Excg1 foi estimado empregando-se o método descrito por Dubois et al. (1956). Alíquotas da enzima pura (cerca de 1,3 µg) foram diluídas para 1,0 mL com água destilada e adicionadas de 25 µL de fenol 80%, seguidos por 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi deixada em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Após este intervalo, foi determinada a sua absorbância em 490 nm. O mesmo procedimento foi realizado empregando soluções padrão de glicose de diferentes concentrações.

3.12. Caracterização bioquímica e cinética de Excg1

3.12.1. Efeito de temperatura e pH sobre a atividade xilanásica de Excg1

A temperatura ótima de reação de Excg1 foi determinada em tampão McIlvaine, pH 5,5, na faixa de temperatura de 50 a 85 °C, empregando como

substrato xilana *Beechwood* em concentração final 1% (m/v). O pH ótimo de reação foi determinado a 65 °C, em tampão McIlvaine ajustado para pH na faixa entre 3,0 e 8,0, empregando xilana *Beechwood* em concentração final 1% (m/v) como substrato. As dosagens de atividade foram realizadas como descrito no item 3.5.1.

O efeito do NaCl sobre a temperatura e o pH ótimos de reação de Excg1 foi avaliado nas mesmas condições, porém em presença de concentrações finais de NaCl de 0,5 e 2,5 mol.L⁻¹ no meio reacional.

3.12.2. Estabilidade de Excg1 frente à temperatura, ao pH e à presença de NaCl

A estabilidade térmica de Excg1 foi avaliada incubando alíquotas da enzima, diluídas adequadamente em água, em diferentes temperaturas (50 a 65 °C), na ausência de substrato. Após intervalos de tempo convenientes, alíquotas foram retiradas, mantidas em banho de gelo por 1 minuto e sua atividade residual foi determinada a 65 °C como descrito no item 3.5.1.

A estabilidade térmica de Excg1 na presença de substrato também foi avaliada. Para isso, alíquotas da enzima diluídas adequadamente foram incubadas a 45 e 50 °C na presença de xilana *Beechwood* em concentração final 1% (m/v), em tampão McIlvaine, pH 5,5. Após intervalos de tempo convenientes, alíquotas foram retiradas, mantidas em banho de gelo por 1 minuto e sua atividade residual foi determinada a 65 °C como descrito no item 3.5.1. Como controles, alíquotas da enzima foram retiradas nos mesmos intervalos de tempo das alíquotas teste, inativadas em banho fervente por 5 minutos e mantidas em banho de gelo por 1 minuto, e então foram adicionadas ao meio reacional para dosagem dos açúcares redutores liberados durante o período de incubação a 45 ou 50 °C.

A estabilidade de Excg1 em diferentes pH foi avaliada por diluição de alíquotas da enzima em tampão McIlvaine, na faixa de pH de 3,0-8,0, ou tampão glicil-glicina, na faixa de pH de 8,0-10,0, na ausência de substrato. Após incubação a

4 °C por 24 horas, a atividade xilanásica residual foi determinada conforme descrito no item 3.5.1.

O efeito do NaCl sobre a estabilidade térmica de Excg1 a 50 e 60 °C (em presença e ausência de substrato), bem como sobre a estabilidade da enzima ao pH, foi avaliado como descrito acima, exceto pelo fato de que as incubações da enzima foram realizadas em presença de concentrações finais do sal de 0,5 e 2,5 mol.L⁻¹. A estabilidade de Excg1 à temperatura ambiente por 48 horas, na presença de NaCl (0,5 e 2,5 mol.L⁻¹) e na ausência de substrato, também foi avaliada. Em todos os casos, a atividade xilanásica residual foi determinada conforme descrito no item 3.5.1, na ausência de NaCl.

3.12.3. Efeito de sais e outros efetores sobre a atividade xilanásica de Excg1

O efeito de diferentes sais (Pb(NO₃)₂, CuSO₄, HgCl₂, AlCl₃, NiCl₂, ZnCl₂, MnCl₂, MgCl₂, CoCl₂, CaCl₂, Cr(NO₃)₃, KCl, NaCl, SrCl₂, FeCl₃ e AgNO₃), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Sigma-Aldrich Chem. Co.) e β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich Chem. Co.), sobre a atividade de Excg1 foi avaliado nas mesmas condições descritas no item 3.5.1. Os diferentes efetores foram adicionados ao meio reacional nas concentrações finais de 1 e 10 mmol.L⁻¹.

O efeito de diferentes solventes orgânicos (etanol, metanol, butanol, propanol, glicerol, tolueno, acetona) e de acetato de sódio sobre a atividade xilanásica de Excg1 também foi avaliado nas condições descritas no item 3.5.1, porém os experimentos foram conduzidos a 50 °C. Os diferentes solventes foram adicionados ao meio reacional para uma concentração final de 5% (v/v); acetato de sódio foi adicionado nas concentrações finais de 50 e 200 mmol.L⁻¹.

3.12.4. Tratamento dos dados cinéticos

Os parâmetros cinéticos $V_{\max}$ (velocidade máxima), K_M (constante de Michaelis–Menten), $K_{0,5}$ (constante de dissociação aparente) e n_H (coeficiente de Hill) para a hidrólise de xilana *Beechwood* e *Birchwood* por Excg1 foram calculados empregando o programa SigrafW, que ajusta os dados experimentais à equação de Hill por regressão não-linear (LEONE et al., 2005). Todos os experimentos cinéticos foram repetidos três vezes, empregando preparações diferentes da enzima pura. Cada medida de atividade foi realizada em duplicata. Os parâmetros cinéticos foram apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores calculados para as três repetições ($n=3$).

3.13. Análise dos produtos de hidrólise de xilana *Beechwood* por ação de Excg1 em diferentes condições de reação

Os produtos de hidrólise foram analisados por duas metodologias: cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica (item 3.13.1) e espectrometria de massas (item 3.13.2).

Para as análises por CCD, as reações enzimáticas foram realizadas em tubos plásticos cônicos, com tampa, contendo tampão McIlvaine, pH 5,5, xilana *Beechwood* a 1% (m/v) e 5 U de Excg1 (volume final 1,0 mL). Em alguns experimentos, o meio reacional continha ainda NaCl em concentração final 0,5 mol.L⁻¹. Os tubos foram incubados a 50 °C sob agitação de 180 rpm em incubadora refrigerada e após cada intervalo de tempo de reação desejado um tubo foi retirado da incubadora e a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 20% (m/v) para precipitação de proteínas e carboidratos de

cadeia longa. Após 30 minutos de repouso, as misturas de reação foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 x g, preservando-se o sobrenadante.

Para caracterizar os produtos de hidrólise por espectrometria de massas, as reações foram realizadas em tampão acetato de amônio 50 mmol.L⁻¹, pH 5,5, contendo xilana *Beechwood* em concentração 1% (m/v) e 5 U da enzima, em um volume final de 1,0 mL. A mistura foi incubada a 50 °C sob agitação de 180 rpm, como descrito acima, e após 48 horas as reações foram interrompidas por aquecimento em banho fervente por 5 minutos, seguido de centrifugação por 10 minutos a 10.000 x g, preservando-se o sobrenadante.

3.13.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de Sílica

A análise por CCD foi realizada em placas de sílica gel Kieselgel 60 (Merck – Darmstadt, Alemanha) de 10 x 20 cm, segundo a metodologia descrita por Fontana et al. (1988). Após o preparo das reações, alíquotas de 5 µL dos sobrenadantes obtidos foram aplicadas em uma placa, que foi submetida a duas corridas utilizando como fase móvel acetato de etila/ácido acético/ácido fórmico/água (9:3:1:4, v/v/v/v). Após cada corrida, a placa foi seca ao ar e após a segunda corrida, borrifada com solução reveladora contendo 0,4% (m/v) de orcinol em uma mistura de H₂SO₄ concentrado e etanol (1:9, v/v). Depois de seca, a placa foi mantida a 100 °C em estufa até o aparecimento de manchas avermelhadas nítidas. Como padrão foram utilizados 2 µL de uma mistura constituída de xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentaose (X5) e xilohexaose (X6), cada um em concentração final de 1% (m/v).

3.13.2. Espectrometria de massas

Os sobrenadantes das misturas reacionais foram submetidos à análise via inserção direta (ID-MS) sem o uso de coluna cromatográfica, usando um sistema ACQUITY UPLC H-Class acoplado ao espectrômetro de massas quadrupolo tandem Xevo® TQ-S (Waters Corporation, Milford, MS, USA), equipado com uma fonte de ionização *Z-spray* operando em modo positivo. Um volume de 5 µL de cada amostra foi injetado e a fase móvel usada para eluição dos compostos consistiu de ácido fórmico 0,1% (v/v) como sistema A e acetonitrila + 0.1% (v/v) de ácido fórmico como sistema B. A taxa de fluxo foi de 0,1 mL.min⁻¹. Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização *Z-spray* foram: voltagem do capilar= 3,2 kV, voltagem do cone= 40 V, temperatura da fonte *Z-spray*= 150 °C, temperatura de dessolvatação do gás N₂= 250 °C, fluxo do gás de dessolvatação= 600 L.h⁻¹. A faixa de massas usada no modo de análise *Full-scan* foi de 100 a 1000 unidades de massa (u). Os experimentos de espectrometria de massas em tandem (MS/MS) foram realizados por dissociação dos íons moleculares induzida por colisão (do inglês, *Collision-induced dissociation* - CID) usando argônio como gás de colisão para o íon precursor de interesse ([M + Na]⁺). A energia de colisão variou de 10 a 50 eV. A aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o software MassLynx V4.1.

3.14. Efeito dos produtos de hidrólise sobre a atividade de Excg1

Os produtos de hidrólise da xilana foram preparados como descrito no item 3.13 para preparação das amostras a serem analisadas por CCD, empregando um período de 48 horas de reação, exceto pelo fato de que a reação foi interrompida por aquecimento em banho fervente por 5 minutos, seguido de centrifugação por 10 minutos a 10.000 x g, preservando-se o sobrenadante, que foi denominado S48.

Após a obtenção dos produtos de hidrólise, tubos plásticos cônicos com tampa contendo tampão McIlvaine, pH 5,5, xilana *Beechwood* a 1% (m/v), sobrenadante S48 e uma nova carga enzimática de 5 U de Excg1, em um volume final de 1,0 mL, foram preparados. As misturas foram incubadas a 50 °C sob agitação de 180 rpm em incubadora refrigerada e cada tubo foi retirado após um intervalo de tempo conveniente, sendo as reações interrompidas pela adição de 1,0 mL de TCA a 20% (m/v). Após permanecerem em repouso por 30 minutos, as misturas de reação foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 x *g* e 5 µL de cada sobrenadante foram aplicados em uma placa de sílica para análise dos produtos finais por CCD, como descrito no item 3.13.1.

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Purificação da enzima

A purificação da enzima foi realizada com sucesso empregando apenas dois passos cromatográficos. O primeiro deles consistiu de uma cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl-sepharose CL-4B. A enzima de interesse não interagiu com a resina mesmo na presença de NaCl $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$, sendo eluída na fase de lavagem da coluna (Fig. 5); entretanto, esta etapa foi essencial, uma vez que grande parte dos contaminantes foram eliminados, resultando em uma purificação de cerca de 1,5 vezes, com rendimento de 70 % (Tabela 3). Um gradiente linear decrescente de NaCl ($1,0 - 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$) foi aplicado à coluna, porém não resultou na eluição de nenhum outro pico com atividade xilanásica (não mostrado).

Figura 5. Perfil cromatográfico da xilanase de *C. graminicola* em Phenyl-sepharose CL-4B.

A coluna (10,0 x 1,0 cm) foi equilibrada em tampão acetato de sódio 10 mmol.L⁻¹, pH 5,0, contendo NaCl 1 mol.L⁻¹ e lavada com o mesmo tampão até eluição completa de proteínas que não interagiram com a resina. Frações de 1,0 mL foram coletadas com fluxo de 100 mL.h⁻¹ e analisadas para atividade xilanásica (■) e absorbância em 280 nm (○). As frações com maior atividade (setas) foram reunidas e concentradas.

A próxima etapa constituiu na dessalificação da amostra eluída da coluna de Phenyl-Sepharose, após ser concentrada, em coluna de filtração em gel de Sephadex G-25. Embora tenha havido perda de parte da atividade enzimática, com rendimento de 54% (Tabela 3), este passo foi importante, pois diálises para remoção do sal mostraram-se inviáveis, resultando em grande perda de atividade, possivelmente devido à interação entre a enzima de interesse e as membranas de diálise. Adicionalmente, tentativas de remoção de sal por ultrafiltração também se mostraram infrutíferas, uma vez que houve grande perda de atividade mesmo utilizando membranas de poliétersulfona com corte de 5 kDa.

A seguir, a amostra foi submetida a cromatografia de troca aniônica em coluna de DEAE-Fractogel. Novamente, a enzima de interesse não interagiu com a resina (Fig. 6), sendo purificada neste passo. Ao final do procedimento, a enzima foi purificada 5 vezes, com rendimento de 34%, atingindo uma atividade específica de

$276 \pm 18,4 \text{ U.mg}^{-1}$. Um resumo das etapas de purificação está apresentado na Tabela 3.

Figura 6. Perfil cromatográfico da xilanase de *C. graminicola* em DEAE-Fractogel.

A coluna (10,0 x 2,0 cm) foi equilibrada e eluída com tampão Tris 10 mmol.L⁻¹, pH 9,0, com fluxo de 6 mL.min⁻¹. Frações de 1,0 mL foram coletadas e analisadas para atividade xilanásica (■) e absorbância em 280 nm (○). As frações com maior atividade (setas) foram reunidas, aliqüotadas e mantidas a 4°C.

Tabela 3: Purificação de Excg1

Etapa	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)	Rendimento (%)	Fator de Purificação
Extrato bruto	811,7	14,6	55,6	100	1,0
Phenyl-sepharose	572,3	6,8	84,2	70	1,5
Sephadex G-25	441,6	5,6	78,9	54	1,4
DEAE-Fractogel	276,0	1,0	276,0	34	5,0

A atividade xilanásica foi estimada a 65 °C, em tampão McIlvaine, pH 5,5, utilizando xilana *Beechwood* 1% (m/v) como substrato.

A homogeneidade da enzima purificada foi confirmada pela presença de uma única banda proteica após análise em PAGE (Fig. 7, linha a) e SDS-PAGE (Fig. 7, linha b). A enzima purificada (Excg1) foi armazenada em tampão Tris 10 mmol.L⁻¹, pH 9,0, a 4 °C, e não apresentou perda significativa de atividade nestas condições por até 6 meses.

Figura 7. Análise de Excg1 por PAGE (linha a) e SDS-PAGE (linhas b e c).

Linhas a e b: 5,0 µg de proteína por linha; linha c: marcador de massa molecular pré-corado. As bandas proteicas foram reveladas com nitrato de prata.

4.2. Propriedades Moleculares de Excg1

4.2.1. Análise de Excg1 purificada por espectrometria de massas

Excg1 foi caracterizada por espectrometria de massas após hidrólise com tripsina. Três peptídeos foram detectados nos espectros de MALDI-TOF-MS, correspondendo a: m/z 1762,8 (LYINDYNLDSATYAK); m/z 2157,0 (IYAWDVVNEIFNEDGSMR) e m/z 2265.1 (GHTTVWHSQPSWVSSITDK).

A análise das massas dos peptídeos (“peptide mass fingerprint”), bem como suas sequências de aminoácidos, obtidas por CID-MS/MS de alta energia, demonstraram que Excg1 apresenta similaridade com uma glicosil-hidrolase da família 10 de *Colletotrichum graminicola* M1.001: GLRG_08914.1 (NCBI Reference Sequence: XP_008097790.1). Os peptídeos identificados apresentaram 77,4% de similaridade e recobriram 12,42% da sequência da proteína identificada no banco de dados (Fig. 8), permitindo classificar Excg1 como um membro da família GH 10. Até o momento não há relatos na literatura de xilanases purificadas de *C. graminicola* pertencentes à família GH 10.

Tentativas de clonagem de Excg1 utilizando oligonucleotídeos degenerados desenhados com base na sequência de aminoácidos dos peptídeos identificados por espectrometria de massas já foram realizadas, porém sem sucesso até o momento. Entretanto, novas tentativas serão realizadas, visando o conhecimento da sequência completa de aminoácidos de Excg1 e uma análise mais rigorosa de sua similaridade com a enzima identificada acima.

```

MKFSMSLVCLLAPITVLAAPLEGGLEQRQAAQSVDRLIKAKGKKYFGTCSNQ
GRLTSGKNAAIINADFGQLTPENSMKWDQIQPNNGQFNWAGADYLVNFAQQ
NGKLVRGHTLVWHSQLASYVQNIRDKATLTKTIQDHISAVVGRYKGKIYAW
DVVNEIFDESGNLRSSVFSQVLGEDFVGIAFRAARAADPNAKLYINDYNLDQ
ASYAKTQAMARKVKQWIGQGIPIDGIGSQAHLQANQGGNALGALQTLAGSG
VKEVAITELDIVGASSNDYSAVTRACLQVPQCVGITVWGVDRPDPSWRAQNNP
LLFDANWNPKAAYNAVVSALQ*

```

Figura 8. Recobrimento das sequências de aminoácidos dos fragmentos de Excg1 com uma glicosil-hidrolase da família 10 de *Colletotrichum graminicola* M1.001: GLRG_08914.1.

Os aminoácidos dos peptídeos sequenciados que foram idênticos aos da sequência molde estão evidenciados em negrito e sublinhados.

4.2.2. Massa molecular aparente

Para determinar a massa molecular aparente de Excg1 foram empregadas duas técnicas: SDS-PAGE, que permite determinar esta propriedade para a proteína desnaturada, e filtração em gel, que permite a estimativa da massa molecular aparente da proteína na sua forma nativa.

A análise de Excg1 por filtração em gel revelou uma massa molecular aparente de cerca de $17,3 \pm 1,9$ kDa (Fig. 9), coerente com aquela estimada por SDS-PAGE (Fig. 7, linha b), que correspondeu a aproximadamente $20 \pm 2,4$ kDa. Esses resultados sugerem que a enzima nativa seja monomérica. Similarmente, a maioria das xilanases conhecidas produzidas por fungos mesófilos endofíticos são monoméricas, com massas moleculares na faixa de 8 – 45 kDa, como pode ser verificado a partir dos dados compilados na Tabela 4.

Em particular, Knob e colaboradores (2013) descreveram uma xilanase purificada do extrato bruto de *Penicillium glabrum* com massa molecular de 18,4 kDa, muito próxima à descrita neste trabalho, e que também apresenta uma única subunidade proteica. De modo semelhante, xilanases produzida por *Aspergillus sydowii* SBS 45 (NAIR et al., 2008), *Aspergillus fumigatus* R1 (DESHMUKH et al., 2016) e *Aspergillus terreus* (MOREIRA et al., 2013) apresentando massas moleculares de 20,1, 24,5 e 23,6 kDa, respectivamente, foram relatadas.

Segundo alguns autores, xilanases de baixa massa molecular, como Excg1, podem apresentar propriedades muito atraentes para aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos, uma vez que seriam capazes de penetrar com maior facilidade na matriz lignocelulósica, aumentando a eficiência da hidrólise (ROLLIN et al., 2011; MENG e RAGAUSKAS, 2014; KARIMI e TAHERZADEH, 2016).

Figura 9. Determinação da massa molecular aparente da forma nativa da Excg1.

Uma amostra de Excg1 (cerca de 20 µg) foi aplicada em uma coluna Bio-Sil SEC 400, equilibrada e eluída com tampão fosfato 100 mmol.L⁻¹, pH 6,8, contendo NaCl 150 mmol.L⁻¹ e azida de sódio 10 mmol.L⁻¹, com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Os padrões de massa molecular utilizados foram: gama-globulina (158 kDa), soroalbumina bovina (67 kDa), ovalbumina (44 kDa) e mioglobulina (17 kDa).

Tabela 4: Propriedades moleculares e bioquímicas de xilanases produzidas por fungos mesófilos endofíticos

Fungo / Enzima	MM (kDa)	Forma nativa	Glicosilação (%)	Atividade ótima		Referência
				pH	Temperatura (°C)	
<i>Colletotrichum graminicola</i> / Excg1	20,0 ^a 17,3 ^b	Monomérica	97,0 ± 3,7	5,5	65	Neste trabalho
<i>Aspergillus fumigatus</i> R1 / -	25,0 ^a 24,5 ^b	-	-	5,0	50	DESHMUKH et al., 2016
<i>Thielaviopsis basicola</i> MTCC1467 / -	32,0 ^a	-	-	5,5	60	GOLUGURI et al., 2016
<i>Trichoderma inhamatum</i> / Xyl 1	19,0 ^a 14,0 ^b	-	79,0	5,0 - 5,5	50	SILVA, L. et al., 2015
<i>Trichoderma inhamatum</i> / Xyl 2	21,0 ^a 14,6 ^b	-	62,0	5,5	50	
<i>Aspergillus oryzae</i> HML366 / XynH1	33,7 ^a	-	-	6,0	65	HE et al., 2015
<i>Penicillium rolsii</i> c3-2(1) IBRL / -	35,0 ^a	-	-	5,0	50	CHANG et al., 2015
<i>Aspergillus ochraceus</i> / Xyl 1	28,0 ^a	-	-	6,0	60	MICHELIN et al., 2014
<i>Aspergillus ochraceus</i> / Xyl 2	25,0 ^a	-	67,0	6,0	60	
<i>Aspergillus ochraceus</i> / Xyl 3	32,0 ^a	-	20,0	3,5 - 8,0	60	
<i>Penicillium glabrum</i> / -	18,4 ^a 21,3 ^b	Monomérica	-	3,0	60	KNOB et al., 2013

Tabela 4: Propriedades moleculares e bioquímicas de xilanases produzidas por fungos mesófilos endofíticos (continuação)

Fungo / Enzima	MM (kDa)	Forma nativa	Glicosilação (%)	Atividade ótima		Referência
				pH	Temperatura (°C)	
<i>Aspergillus terreus</i> / Xyl T1	24,3 ^a	-	-	6,0	50	MOREIRA et al., 2013
<i>Aspergillus terreus</i> / Xyl T2	23,6 ^a	-	-	5,0	45	
<i>Aspergillus foetidus</i> MTCC 4898 / -	29,9 ^a	-	-	5,3	50	CHAPLA et al., 2013
<i>Penicillium occitanis</i> Pol6 / PoXyn2	30,0 ^a	-	0,07	3,0	65	DRISS et al., 2012
<i>Fusarium graminearum</i> / Xyl 1	41,0 ^a	-	-	6,0	45	DONG et al., 2012
<i>Fusarium graminearum</i> / Xyl 2	17,0 ^a	-	-	6,0	50	
<i>Aspergillus terreus</i> / -	23,0 ^a	-	33	4,5	55	SORGATTO et al., 2012
<i>Aspergillus niger</i> US368 / XAn11	26,0 ^a	Monomérica	-	5,0	55	HMIDA-SAYARI et al., 2012
<i>Aspergillus niger</i> DFR-5 / -	32,0 ^{a,b}	Monomérica	-	5,0	40	PAL e KHANUM, 2011
<i>Aspergillus fumigatus</i> MA28 / -	14,4	-	-	8,0	50	BAJAJ e ABBASS, 2011
<i>Chaetomium</i> sp. CQ31 / -	25,1 ^a 22,0 ^b	Monomérica	-	7,5	65	JIANG et al., 2010

Tabela 4: Propriedades moleculares e bioquímicas de xilanases produzidas por fungos mesófilos endofíticos (continuação)

Fungo / Enzima	MM (kDa)	Forma nativa	Glicosilação (%)	Atividade ótima		Referência
				pH	Temperatura (°C)	
<i>Penicillium sclerotiorum</i> / Xylanase I	23,9 ^a 23,8 ^b	Monomérica	14,8	2,5	50	KNOB e CARMONA, 2010
<i>Penicillium sclerotiorum</i> / Xylanase II	33,1 ^a 30,8 ^b	Monomérica	65,1	4,5	55	
<i>Aspergillus japonicus</i> / -	25,1 ^a	-	-	5,0	60	WAKIYAMA et al., 2010
<i>Aspergillus awamori</i> 2B.361 U2/1 / PXII-1	32,0 ^a	Monomérica	-	5,0 - 5,5	50 – 60	TEIXEIRA, R. et al., 2010
<i>Trichoderma</i> sp. K9301 / EX1	30,1 ^a	-	-	5,5	70	CHEN, L. et al., 2009
<i>Trichoderma</i> sp. K9301 / EX2	20,1 ^a	-	-	5,0	55	
<i>Aspergillus niger</i> B03 / Xln-1	30,0 ^a 34,0 ^b	Monomérica	74,1	6,0	60	DOBREV et al., 2009
<i>Aspergillus sydowii</i> SBS 45 / Xyl 1	20,1 ^a	-	40,6	10,0	50	NAIR et al., 2008
<i>Aspergillus sydowii</i> SBS 45 / Xyl 2	43,0 ^a	-	53,7	10,0	50	
<i>Penicillium citrinum</i> FERM P-15944 / -	31,6 ^a	-	-	6,0	50	WAKIYAMA et al., 2008
<i>Aspergillus ficuum</i> AF-98 / -	35,0 ^a	Monomérica	-	5,0	45	FENGXIA et al., 2008

Tabela 4: Propriedades moleculares e bioquímicas de xilanases produzidas por fungos mesófilos endofíticos (continuação)

Fungo / Enzima	MM (kDa)	Forma nativa	Glicosilação (%)	Atividade ótima		Referência
				pH	Temperatura (°C)	
<i>Aspergillus carneus</i> M34 / -	18,8	-	-	6,0	50	FANG, H. et al., 2008
<i>Penicillium citrinum</i> MTCC 6489 / -	25,0 ^a 22,0 ^b	Monomérica	-	8,5	50	DUTTA et al., 2007
<i>Aspergillus niger</i> IBT-90 / Xylanase K II	-	-	-	5,5	50	ROMANOWSKA et al., 2006
<i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 20524 / -	39,0 ^a	-	-	6,0	70	TANAKA et al., 2006
<i>Aspergillus fumigatus</i> MKU1 / XylF1	43,0	-	-	7,0	70	THIAGARAJAN et al., 2006
<i>Aspergillus versicolor</i> / Xylanase II	32,0 ^a	Monomérica	14,1	6,0 - 7,0	55	CARMONA et al., 2005
<i>Penicillium citrinum</i> FERM P-15944 / -	20,0 ^a	Monomérica	-	5,0	55	TANAKA et al., 2005
<i>Aspergillus giganteus</i> CCT 3232 / xylanase I	21,0 ^a	-	55,7	6,0 - 6,5	50	FIALHO e CARMONA, 2004
<i>Aspergillus giganteus</i> CCT 3232 / xylanase II	24,0 ^a	-	61,6	6,0	50	
<i>Penicillium brasilianum</i> IBT 20888 / XYL	31,0	Monomérica	-	-	-	JØRGENSEN et al., 2003
<i>Penicillium</i> sp. AHT-1 / -	21,0	Monomérica	-	6,0	50	RAHMAN et al., 2003

Tabela 4: Propriedades moleculares e bioquímicas de xilanases produzidas por fungos mesófilos endofíticos (final)

Fungo / Enzima	MM (kDa)	Forma nativa	Glicosilação (%)	Atividade ótima		Referência
				pH	Temperatura (°C)	
<i>Penicillium capsulatum</i> CMI 291669 / -	22,0 ^a	Monomérica	Não glicosilada	3,8	48	RYAN et al., 2003
<i>Penicillium funiculosum</i> IMI-134756 / -	48,0 ^a	-	-	-	-	ALCOCER et al., 2003
<i>Penicillium funiculosum</i> IMI-134756 / -	15,0 ^a	-	-	-	-	
<i>Aspergillus niger</i> Z1 / -	36,0 ^a	-	-	7,5	60	CORAL et al., 2002
<i>Fusarium proliferatum</i> NRRL 26517 / -	22,4 ^a 25,0 ^b	Monomérica	-	5,0 - 5,5	55	SAHA, 2002
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanigenum</i> (ATCC 20524) / -	24,0 ^a	-	-	2,0	50	OHTA et al., 2001
<i>Penicillium</i> sp. 40 / Xyn A	25,0 ^a	Monomérica	-	2,0	50	KIMURA et al., 2000

^a Determinado por SDS-PAGE^b Determinado por filtração em gel

- Dado não apresentado

4.2.3. Teor de carboidratos e ponto isoelétrico de Excg1

O teor de carboidratos totais de Excg1 correspondeu a $97 \pm 3,7$ % (m/m), revelando que se trata de uma proteína altamente glicosilada. Muitas das xilanases de fungos mesofílicos endofíticos conhecidas são glicoproteínas, conforme mostrado na Tabela 4. Em particular, várias delas apresentam conteúdo de carboidratos acima de 60% (m/m), tais como a xilanase 2 de *Aspergillus ochraceus* (MICHELIN et al., 2014), as xilanases 1 e 2 de *Trichoderma inhamatum* (SILVA, L. et al., 2015), a xilanase II de *Penicillium sclerotiorum* (KNOB e CARMONA, 2010), a xilanase 1 de *Aspergillus niger* B03 (DOBREV et al., 2009) e a xilanase II de *Aspergillus giganteus* CCT 3232 (FIALHO e CARMONA, 2004). Em contraste, outras enzimas de microrganismos do mesmo grupo apresentam baixo conteúdo ou ausência de carboidratos (RYAN et al., 2003; CARMONA et al., 2005; DRISS et al., 2010).

A glicosilação proteica parece ter um papel importante em uma série de eventos como, por exemplo, auxiliar no dobramento do polipeptídeo recém-sintetizado e promover a manutenção da sua estrutura tridimensional, conferir resistência a proteases, além de conferir estabilidade a enzimas extracelulares contra condições agressivas (EICHLER, 2001). Neste último caso, acredita-se que os carboidratos agiriam, possivelmente, protegendo regiões mais lábeis, tais como alças ou o sítio ativo. Entretanto, a glicosilação não parece estar diretamente relacionada à estabilidade térmica de uma proteína, e atualmente é conhecido que o efeito da glicosilação sobre a estabilidade térmica de uma enzima é altamente variável. De fato, algumas enzimas podem apresentar aumento da estabilidade térmica quando são deglicosiladas ou quando expressas como proteínas heterólogas com um teor de carboidratos inferior (BROWN et al., 2007; SKROPETA, 2009; FONSECA-MALDONADO et al., 2013).

O ponto isoelétrico (pI) determinado para Excg1 foi de $9,2 \pm 0,018$ (Fig. 10). Observou-se uma banda relativamente larga, entre pH 8,8 e 9,4, o que pode estar relacionado, experimentalmente, à faixa estreita de pH avaliada (pH 8,0 a 10,0) num gel de comprimento considerável (11,5 cm). Entretanto, um perfil mais espalhado de focalização é uma característica típica das glicoproteínas, atribuída às diferenças de

glicosilação existentes na população de moléculas de uma mesma proteína (ZHOU, Q. et al., 2004). De fato, a glicosilação proteica é um processo complexo, e em geral as glicoproteínas apresentam macro e micro heterogeneidades, em termos de padrões de glicosilação. A macro heterogeneidade está relacionada à variabilidade de locais de glicosilação e ao número de carboidratos ligados às moléculas individuais da proteína, enquanto a micro heterogeneidade diz respeito às variações estruturais ou tipos de carboidratos ligados a cada molécula proteica (ZHANG, K. et al., 2016). Em função disso, as moléculas de uma mesma proteína podem apresentar heterogeneidade de cargas superficiais, relacionada à presença de carboidratos carregados (McGREGOR et al., 1980), o que influencia a sua focalização isoelétrica. Considerando estes aspectos, pode-se supor que o elevado conteúdo de carboidratos de Excg1 influenciou o perfil da focalização isoelétrica.

Figura 10. Focalização isoelétrica de Excg1.

A focalização isoelétrica de Excg1 foi realizada utilizando solução de Pharmalyte pH 8,0 a 10,0, conforme descrito em Material e Métodos.

4.3. Caracterização bioquímica e cinética de Excg1

4.3.1. Efeito de temperatura e pH sobre a atividade xilanásica de Excg1

O efeito da temperatura sobre a atividade xilanásica de Excg1 é mostrado na figura 11. Observou-se um aumento gradual da atividade acima de 50 °C, atingindo um máximo de $314,6 \pm 22,4 \text{ U.mg}^{-1}$ a 65 °C. Uma queda abrupta ocorreu acima dessa temperatura, entretanto, com diminuição de cerca de 26% a 75 °C e chegando a 13% da atividade máxima a 85 °C. Por outro lado, a 50 °C a enzima apresentou mais de 60% da atividade máxima.

Figura 11. Efeito da temperatura sobre a atividade xilanásica de Excg1.

A atividade foi determinada em diferentes temperaturas, em tampão McIlvaine, pH 5,5, empregando xilana *Beechwood* 1% (m/v) como substrato, conforme descrito em Material e Métodos.

A figura 12 mostra o efeito do pH do meio reacional sobre a atividade de Excg1. Um platô de atividade máxima foi observado na faixa de pH de 4,5 a 6,0. Acima de pH 6,0 ocorreu diminuição gradual da atividade, atingindo cerca de 75% da atividade máxima em pH 6,5 e ausência de atividade em pH 8,0. Já em valores de pH abaixo de 4,0, ocorreu uma queda abrupta da atividade, atingindo 9% da atividade máxima em pH 3,5.

Figura 12. Efeito do pH sobre a atividade xilanásica de Excg1.

A atividade foi determinada a 65 °C, em tampão McIlvaine ajustado para diferentes valores de pH, empregando xilana *Beechwood* 1% (m/v) como substrato, conforme descrito em Material e Métodos. A atividade máxima (pH 5,5) correspondeu a $338 \pm 26,3$ U.mg⁻¹.

A temperatura e o pH ótimos de atividade das xilanases de fungos mesófilos, em geral, encontram-se na faixa de 40-65 °C e 4,0-6,5, respectivamente, como fica evidenciado na Tabela 4. Similarmente ao observado para Excg1, xilanases purificadas de *Chaetomium* sp. CQ31 (JIANG et al., 2010), *Aspergillus oryzae* HML366 (HE et al., 2015) e *Penicillium occitanis* Pol6 (DRISS et al., 2012) também apresentaram temperatura ótima de reação de 65 °C. Poucas enzimas de fungos mesofílicos endofíticos apresentaram temperatura ótima superior, como aquelas produzidas por *Trichoderma* sp. K9301 (CHEN, L. et al., 2009), *Aureobasidium*

pullulans ATCC20524 (TANAKA et al., 2006) e *A. fumigatus* MKU1 (THIAGARAJAN et al., 2006), com temperatura ótima de 70°C.

Quanto ao pH ótimo de reação, valores muito próximos ao observado para Excg1 foram descritos para muitas xilanases purificadas de fungos mesófilos endofíticos (Tabela 4). Entretanto, algumas enzimas com pH ótimo alcalino foram descritas (CORAL et al., 2002; DUTTA et al., 2007; JIANG et al., 2010; BAJAJ e ABBASS, 2011), bem como enzimas com valores extremos de pH ótimo de reação, como pH 10,0 (NAIR et al., 2008) e pH 2,0 (KIMURA et al., 2000; OHTA et al., 2001).

Uma alta temperatura ótima de reação é uma característica interessante de Excg1, considerando que esta enzima é produzida por um fungo mesófilo. Além disso, esta propriedade pode ser importante para uma eventual aplicação em processos nos quais elevadas temperaturas sejam requeridas.

Considerando ainda os processos de sacarificação de resíduos lignocelulósicos, usualmente conduzidos em pH 4,5 a 5,0 e temperaturas entre 45 e 50 °C, Excg1 apresenta características interessantes no que diz respeito ao pH, uma vez que atua com atividade máxima entre pH 4,5 e 6,0. Entretanto, a enzima mantém apenas cerca de 60% da atividade máxima a 50°C.

4.3.2. Estabilidade térmica e ao pH de Excg1

A estabilidade térmica da enzima na ausência de substrato é mostrada nas figuras 13 e 14. Excg1 mostrou-se estável por 120 minutos a 50 °C, apresentando também uma atividade residual de cerca de 90% a 55 °C, após o mesmo intervalo de tempo (Fig. 13). Tempos de meia vida de cerca de 90 minutos e 25 minutos foram estimados a 60 e 65 °C, respectivamente, ocorrendo inativação total após 40 minutos a 65 °C. A estabilidade de Excg1 por tempos prolongados de incubação a 45 e 50 °C também foi avaliada (Fig. 14). A enzima apresentou uma atividade residual de cerca de 84% após 48 horas de incubação a 45 °C e um tempo de meia

vida de cerca de 48 horas a 50 °C. Já na presença de substrato, a enzima manteve-se totalmente estável a 45 e 50 °C por no mínimo 96 horas (Fig. 15).

Estudos de estabilidade térmica das xilanases produzidas por outros fungos mesófilos endofíticos revelaram que estas enzimas são comumente estáveis na faixa de 35 a 55 °C, com poucas exceções apresentando boa estabilidade em temperaturas até 65 °C (Tabela 5). Assim, Excg1 está entre as xilanases mais termoestáveis produzidas por microrganismos deste grupo. Já o efeito termoestabilizante do substrato sobre a atividade enzimática, observado para Excg1, é um fenômeno comum a muitas outras enzimas, atribuído essencialmente ao ajuste induzido e às inúmeras ligações fracas que se formam entre a enzima e o substrato.

Figura 13. Estabilidade térmica de Excg1 em tempos curtos.

A enzima purificada foi diluída convenientemente em água e incubada a (○) 50 °C; (▲) 55 °C; (▽) 60 °C; (■) 65 °C por intervalos de tempo convenientes. A atividade residual foi determinada a 65 °C em tampão McIlvaine, pH 5,5, contendo xilana *Beechwood* 1% (m/v). O controle (100%) correspondeu a $309 \pm 23 \text{ U.mg}^{-1}$.

Figura 14. Estabilidade térmica de Excg1 em tempos longos.

Excg1 foi diluída convenientemente em água e incubada a (■) 45 °C e (◆) 50 °C por intervalos de tempo convenientes. A atividade residual foi determinada a 65 °C em tampão McIlvaine, pH 5,5, contendo xilana *Beechwood* 1% (m/v). O controle (100%) correspondeu a $315 \pm 19 \text{ U.mg}^{-1}$.

Figura 15. Estabilidade térmica de Excg1 na presença de substrato.

A enzima purificada, diluída convenientemente, foi incubada na presença de xilana *Beechwood* em concentração final 1% (m/v), em tampão McIlvaine, pH 5,5, a (■) 45 °C e (◆) 50 °C por intervalos de tempo convenientes. A atividade residual foi determinada a 65 °C em tampão McIlvaine, pH 5,5, contendo xilana *Beechwood* 1% (m/v). O controle (100%) correspondeu a $290 \pm 12 \text{ U.mg}^{-1}$.

Enzimas termoestáveis possuem uma série de vantagens para aplicação em processos industriais. Considerando a hidrólise da lignocelulose, o uso de enzimas termoestáveis evita a reposição enzimática durante o processo, diminuindo a quantidade de enzima necessária para a sacarificação (VIKARI et al., 2007; ZHANG, J. et al., 2011; BHALLA et al., 2013). Nesse sentido, a excelente termoestabilidade de Excg1, especialmente na presença do substrato, a 45 e 50 °C, temperaturas em que os processos de sacarificação da biomassa são usualmente conduzidos, representa uma característica particularmente interessante.

Outros aspectos positivos relacionados à utilização industrial de enzimas termoestáveis dizem respeito à diminuição dos riscos de contaminação microbiana em temperaturas elevadas, aumentando a produtividade (BHALLA et al., 2013), e à possibilidade de armazenamento e transporte das enzimas à temperatura ambiente, sem inativação. Estas vantagens são muito importantes, uma vez que grande parte dos custos dos processos de hidrólise da biomassa está associada aos gastos com enzimas. Assim, a utilização de enzimas termotáveis contribui para a viabilidade econômica do processo (HAKI e RAKSHIT, 2003).

Tabela 5: Propriedades bioquímicas de xilanases produzidas por fungos mesófilos endofíticos

Fungo / Enzima	Estabilidade Térmica	Estabilidade ao pH	Efeito de Íons		Referência
			Inibição	Estimulação	
<i>Colletotrichum graminicola</i> / Excg1	T _{1/2} de 90 min a 60°C T _{1/2} de 25 min a 65°C;	3,0 – 10,0	HgCl ₂ , CuSO ₄ , Cr(NO ₃) ₃ , FeCl ₃	SrCl ₂ , β-mercapto.	Neste trabalho
<i>Aspergillus fumigatus</i> R1 / -	60 °C por 30 min (40%)	8,0 – 9,0	-	-	DESHMUKH et al., 2016
<i>Thielaviopsis basicola</i> MTCC1467 / -	30 °C por 5 h (~ 90%) 60 °C por 1 h (~ 90%)	7,0 – 9,0	Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , EDTA, SDS	Mn ²⁺ , K ⁺	GOLUGURI et al., 2016
<i>Trichoderma inhamatum</i> / Xyl 1	40°C por 4,5 h (71%) T _{1/2} de 4 min a 50 °C	4,5 – 6,5	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , SDS	Co ²⁺ , Mg ²⁺ , DTT	SILVA, L. et al, 2015
<i>Trichoderma inhamatum</i> / Xyl 2	40°C por 4,5 h (77,5%) T _{1/2} de 18 min a 50 °C	4,0 – 8,0	Hg ²⁺ , Ba ²⁺ , Ca ²⁺ , Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Mg ²⁺ , Pb ²⁺ , SDS	Mn ²⁺ , DTT	
<i>Aspergillus oryzae</i> HML366 / XynH1	70 °C por 60 min (88%) 80 °C por 60 min (75%) 90 °C por 60 min (36 %)	4,0 – 10,0	Ba ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , Li ⁺ , Cu ²⁺ , Ag ⁺ , Co ²⁺ , Hg ²⁺	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Ca ²⁺ , K ⁺	HE et al, 2015
<i>Penicillium rolfssii</i> c3-2(1) IBRL / -	Estável a 50°C por 4 h 55 °C por 2 h (83%)	5,0 – 7,0	-	-	CHANG et al, 2015

Tabela 5: Propriedades bioquímicas de xilanases produzidas por fungos mesófilos endofíticos

(continuação)

Fungo / Enzima	Estabilidade Térmica	Estabilidade ao pH	Efeito de Íons		Referência
			Inibição	Estimulação	
<i>Aspergillus ochraceus</i> / Xyl 1	Estável a 50 °C por 30 min T _{1/2} de 20 min a 55 °C	3,0 – 8,0	Hg ²⁺	Co ²⁺ , Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , β-mercpto.	MICHELIN et al, 2014
<i>Aspergillus ochraceus</i> / Xyl 2	Estável a 50 e 55 °C por 1 h T _{1/2} de 25 min a 60 °C	4,0 – 8,0	EDTA	Co ²⁺ , Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , β-mercpto.	
<i>Aspergillus ochraceus</i> / Xyl 3	Estável a 50 e 55 °C por 1 h 60 °C por 1 h (60 %)	3,0 – 8,0	Hg ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , EDTA	β-mercpto.	
<i>Penicillium glabrum</i> / -	50 °C por 60 min (70%) T _{1/2} de 15 min a 60°C T _{1/2} de 32 min a 55°C	2,5 – 5,0	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺	Mn ²⁺ , Ca ²⁺ β-mercpto., DTT, Co ²⁺ , Ba ²⁺	KNOB et al, 2013
<i>Aspergillus foetidus</i> MTCC 4898 / -	40°C por 3 h (90%) T _{1/2} de 52,3 min a 50 °C	4,0 – 6,0	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Mn ²⁺ , Ag ⁺ , EDTA, SDS, β-mercpto.	K ⁺ , Na ⁺	CHAPLA et al, 2013
<i>Aspergillus terreus</i> / Xyl T1	T _{1/2} de 2 h a 50 °C	4,0 – 7,5	Hg ²⁺ , K	Mn ²⁺	MOREIRA et al, 2013
<i>Aspergillus terreus</i> / Xyl T2	T _{1/2} de 3,5 h a 50 °C	< 50% 4,0 – 7,0	Ag ⁺ , Fe ²⁺ , Hg ²⁺ , K	Mn ²⁺	

Tabela 5: Propriedades bioquímicas de xilanases produzidas por fungos mesófilos endofíticos

(continuação)

Fungo / Enzima	Estabilidade Térmica	Estabilidade ao pH	Efeito de Íons		Referência
			Inibição	Estimulação	
<i>Fusarium graminearum</i> / Xylanase 1	35 °C por 60 min (25-30%) 55 °C por 60 min (30-35%)	5,5 – 8,5	-	-	DONG et al, 2012
<i>Fusarium graminearum</i> / Xylanase 2	Estável a 35 °C por 1 h 55 °C por 60 min (40%)	5,5 – 8,5	-	-	
<i>Penicillium occitanis</i> Pol6 / PoXyn2	60 °C por 4 h (97%) 70 °C por 4 h (90%)	-	Mn ²⁺	Ca ²⁺	DRISS et al., 2012
<i>Aspergillus terreus</i> / -	T _{1/2} de 55 min a 45 °C T _{1/2} de 35 min a 50 °C	-	Ag ⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Hg ⁺ , Zn ²⁺	K ⁺ , Mn ²⁺	SORGATTO et al., 2012
<i>Aspergillus niger</i> US368 / XAn11	T _{1/2} de 120 min a 55 °C T _{1/2} de 30 min a 60 °C	3,0 – 9,0	Ag ⁺ , Hg ⁺ , Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺	Tween 80, Triton X-100	HMIDA-SAYARI et al., 2012
<i>Aspergillus niger</i> DFR-5 / -	T _{1/2} de 462 min a 45 °C T _{1/2} de 92,4 min a 70 °C	4,0 – 6,5	-	-	PAL e KHANUM, 2011
<i>Aspergillus fumigatus</i> MA28 / -	60 °C por 30 min (75%) 70 °C por 30 min (68%)	8,0 (88%) 9,0 (56%) 10,0 (29%) por 30 min	SDS, EDTA, Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Zn ²⁺ , NH ₄ ⁺	Fe ²⁺	BAJAJ e ABBASS, 2011

Tabela 5: Propriedades bioquímicas de xilanases produzidas por fungos mesófilos endofíticos

(continuação)

Fungo / Enzima	Estabilidade Térmica	Estabilidade ao pH	Efeito de Íons		Referência
			Inibição	Estimulação	
<i>Chaetomium</i> sp. CQ31 / -	T _{1/2} de 437,3 min a 55 °C T _{1/2} de 49,6 min a 60 °C T _{1/2} de 14,9 min a 65 °C	4,5 – 11,0	Hg ²⁺ , Ag ⁺	Co ²⁺	JIANG et al, 2010
<i>Penicillium sclerotiorum</i> / Xylanase I	T _{1/2} de 40 min a 50 °C	2,5 – 4,5	Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Hg ²⁺ , SDS, EDTA	Ca ²⁺ , NH ₄ ⁺ , DTT, β-mercapto.	KNOB e CARMONA, 2010
<i>Penicillium sclerotiorum</i> / Xylanase II	T _{1/2} de 90 min a 50 °C	3,0 – 4,5	Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , NH ₄ ⁺ , Hg ²⁺ , Co ²⁺ , SDS, EDTA	Mn ²⁺ , Ca ²⁺ , DTT, β-mercapto.	
<i>Trichoderma</i> sp. K9301 / EX1	50 °C por 48 h (75%) T _{1/2} de 48 h a 60 °C	4,0 – 9,0 por 1h (80%)	-	-	CHEN, L. et al., 2009
<i>Trichoderma</i> sp. K9301 / EX2	T _{1/2} de 30 h a 50 °C	4,0 – 9,0 por 1h (50%)	-	-	
<i>Aspergillus niger</i> B03 / Xln-1	40 °C por 120 min pH 7,0 (80%)	-	Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Ag ⁺ , Pb ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , Li ²⁺	Mn ²⁺	DOBREV et al., 2009
<i>Aspergillus ficuum</i> AF-98 / -	-	-	Fe ²⁺ , Mn ²⁺ , Pb ²⁺ , Hg ²⁺	Cu ²⁺	FENGXIA et al., 2008

Tabela 5: Propriedades bioquímicas de xilanases produzidas por fungos mesófilos endofíticos

(continuação)

Fungo / Enzima	Estabilidade Térmica	Estabilidade ao pH	Efeito de Íons		Referência
			Inibição	Estimulação	
<i>Aspergillus carneus</i> M34 / -	T _{1/2} de >60 min a 50 °C T _{1/2} de 7,5 min a 55 °C T _{1/2} de 4,5 min a 60 °C	7,0 – 9,0 por 1h	-	-	FANG, H. et al., 2008
<i>Aspergillus sydowii</i> SBS 45 / Xyl 1	40 °C por 4 h (93,11%)	4 – 11 por 1 h	Co ²⁺ , Hg ²⁺ , Pb ²⁺ , Ni ²⁺ , EDTA	β-mercapto., DTT	NAIR et al, 2008
<i>Aspergillus sydowii</i> SBS 45 / Xyl 2	40 °C por 4 h (94,16%)	5 – 11 por 1 h	Fe ³⁺ , Hg ²⁺ , Pb ²⁺ , Ni ²⁺ , EDTA	β-mercapto., DTT	
<i>Penicillium citrinum</i> / -	50 °C por 4 h (65%)	4,0 – 10,0	Hg ²⁺ , Mn ²⁺	NaCl, ureia, SDS	DUTTA et al., 2007
<i>Aspergillus niger</i> IBT-90 / K II	Estável de 4 – 50 °C	5,0 – 9,0	Hg ²⁺ , Fe ³⁺ , Ag ⁺	DTT	ROMANOWSKA et al., 2006
<i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 20524 / XylF1	Estável de 30 – 70 °C	3,0 – 9,0	Hg ²⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺	DTT	THIAGARAJAN et al., 2006
<i>Aspergillus versicolor</i> / Xylanase II	T _{1/2} de 1,7 min a 60 °C	~ 50% 7,5 – 9,0	NH ₄ , Hg ²⁺ , Ca ²⁺ , Ba ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , SDS, EDTA, Pb ²⁺	Mn ²⁺ , DTT	CARMONA et al, 2005

Tabela 5: Propriedades bioquímicas de xilanases produzidas por fungos mesófilos endofíticos (final)

Fungo / Enzima	Estabilidade Térmica	Estabilidade ao pH	Efeito de Íons		Referência
			Inibição	Estimulação	
<i>Penicillium citrinum</i> FERM P-15944 / -	-	2,0 – 10,0	Co ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Cd ²⁺ ,	-	TANAKA et al., 2005
<i>Aspergillus giganteus</i> / Xylanase I	T _{1/2} de 22,5 min a 50 °C T _{1/2} de 1,5 min a 60 °C	-	Pb ²⁺ , Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , SDS	DTT	FIALHO e CARMONA, 2004
<i>Aspergillus giganteus</i> / Xylanase II	T _{1/2} de 17,5 min a 60 °C T _{1/2} de 1,5 min a 60 °C	-	Pb ²⁺ , Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , SDS	DTT	
<i>Penicillium capsulatum</i> / XynC	T _{1/2} de 25 h a 50 °C	-	Zn ²⁺ , Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Ca ²⁺ , Ba ²⁺ , Mn ²⁺ , Mo ²⁺ , Fe ³⁺	-	RYAN et al., 2003
<i>Fusarium proliferatum</i> NRRL 26517 / -	Estável a 55 °C	5,0 – 7,5	Mn ²⁺ , DTT	-	SAHA et al., 2002
<i>Penicillium</i> sp.40 / XynA	Estável a 30 °C por 10 min	2,0 – 5,0	Mn ²⁺ , Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺	-	KIMURA et al., 2000

- Dado não apresentado

Excg1 mostrou-se extremamente estável entre pH 3,0 e 10,0 (Fig. 16). Estudos de estabilidade ao pH de outras xilanases de fungos mesófilos endofíticos revelaram que estas enzimas são comumente estáveis em faixas estreitas de pH, com poucas exceções (Tabela 5). Similarmente ao observado para Excg1, xilanases purificadas de *A. oryzae* HML366 (HE et al., 2015), *A. ochraceus* (MICHELIN et al, 2014), *A. niger* US368 (HMIDA-SAYARI et al., 2012), *Chaetomium* sp. CQ31 (JIANG et al, 2010), *Trichoderma* sp. K9301 (CHEN, L. et al., 2009), *Penicillium citrinum* (DUTTA et al., 2007) e *P. citrinum* FERM P-15944 (TANAKA et al., 2005) também apresentaram estabilidade numa ampla faixa de pH.

A tolerância a uma ampla faixa de pH é uma propriedade interessante de Excg1 para sua aplicação biotecnológica, uma vez que, em algumas etapas de diferentes processos industriais as enzimas podem ser expostas a valores de pH muito diferentes do seu pH ótimo de reação, podendo ser inativadas.

Figura 16. Estabilidade ao pH de Excg1.

A enzima purificada foi incubada em tampão Mcllvaine (pH 3,0 a 8,0) ou tampão glicil-glicina (pH 8,0 a 10,0) por 24 horas a 4 °C. A atividade residual foi determinada a 65 °C em tampão Mcllvaine, pH 5,5, contendo xilana *Beechwood* 1% (m/v). O controle (100%) correspondeu a $312 \pm 27 \text{ U.mg}^{-1}$.

4.3.3. Efeito de diferentes sais e outros efetores sobre a atividade xilanásica

O efeito de diferentes sais e outros efetores sobre a atividade xilanásica da enzima purificada está apresentado na Tabela 6. A enzima mostrou-se tolerante à presença de K^+ , Na^+ , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} e Sr^{2+} em ambas as concentrações testadas. Em contraste, íons Cu^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} e Ag^+ praticamente não tiveram efeito sobre a atividade na concentração mais baixa, porém tiveram forte efeito inibitório (56-100%) em concentração 10 mmol.L⁻¹. Além disso, a enzima mostrou-se altamente sensível a Hg^{2+} , com atividade residual de apenas 5% em presença deste íon em concentração 1 mmol.L⁻¹. O EDTA apresentou pequeno efeito inibitório sobre a atividade enzimática, sugerindo que não se trata de uma metaloenzima. Em contrapartida, β -mercaptoetanol estimulou a atividade de Excg1 em 95 e 214%, nas concentrações de 1 mmol.L⁻¹ e 10 mmol.L⁻¹, respectivamente.

Tabela 6: Efeito de íons e aditivos sobre a atividade da Excg1

Substância	Atividade residual (%)	Atividade residual (%)
	1 mmol.L ⁻¹	10 mmol.L ⁻¹
Controle	100 ± 2	100,0 ± 2
Pb(NO ₃) ₂	110 ± 3	79 ± 11
CuSO ₄	100 ± 2	15,6 ± 0,8
HgCl ₂	5,1 ± 0,3	0
AlCl ₃	112 ± 4	0
NiCl ₂	99 ± 2	110 ± 2
ZnCl ₂	107 ± 2	113 ± 1
MnCl ₂	104 ± 2	85 ± 1
MgCl ₂	104 ± 2	116 ± 2
CoCl ₂	95 ± 1	117 ± 2
CaCl ₂	83 ± 1	85 ± 1
Cr(NO ₃) ₃	106 ± 2	2,04 ± 0,01
KCl	102 ± 2	112 ± 2
NaCl	101 ± 2	109 ± 2
SrCl ₂	130 ± 2	105 ± 2
FeCl ₃	100 ± 2	44,5 ± 0,3
AgNO ₃	89 ± 1	ND
EDTA	84 ± 1	82 ± 1
β-mercaptoetanol	195 ± 3	314 ± 9

A atividade foi determinada como descrito em Material e Métodos. A atividade controle (100%), determinada na ausência dos efetores testados, correspondeu a 310 ± 24 U.mg⁻¹. ND: não detectável nas condições de medida.

A Tabela 5 reúne os íons e efetores que afetaram a atividade de xilanases purificadas de diferentes fungos mesófilos endofíticos. A inibição por Hg²⁺ é uma característica comum a muitas destas xilanases, sendo atribuída à presença de grupos SH essenciais para a atividade ou estabilização da estrutura da molécula (BASTAWDE, 1992). Em contraste, a estimulação por β-mercaptoetanol foi observada para poucas xilanases, tais como as produzidas por *A. ochraceus* (MICHELIN et al., 2014), *P. glabrum* (KNOB et al., 2013), *P. sclerotiorum* (KNOB e

CARMONA, 2010) e *A. sydowii* SBS 45 (NAIR et al., 2008). Esta propriedade parece estar relacionada à proteção de grupos tiol dos resíduos de cisteína, impedindo a sua oxidação (KNOB e CARMONA, 2010).

Diferentemente do observado para Excg1, a atividade da xilanase XynH1 de *A. oryzae* HML366 (HE et al., 2015) foi inibida em cerca de 34 e 72%, respectivamente, por Ni^{2+} e Co^{2+} em concentração 10 mmol.L⁻¹. A boa tolerância de Excg1 a Cu^{2+} e Fe^{3+} também contrastou com os resultados relatados para a xilanase Xln-1 de *A. niger* B03 (DOBREV et al., 2009), que foi inibida totalmente na presença de Cu^{2+} e 40% na presença de Fe^{3+} , ambos em concentração 1 mmol.L⁻¹. Similarmente, a atividade de uma xilanase de *A. pullulans* ATCC 20524 (THIAGARAJAN et al., 2006), também foi totalmente inibida na presença Cu^{2+} , Fe^{3+} e Ni^{2+} em concentração 10 mmol.L⁻¹.

Inibição por Pb^{2+} em concentração 10 mmol.L⁻¹ também foi observada para as xilanases de *P. glabrum* (KNOB et al., 2013), *A. niger* B03 (DOBREV et al., 2009), de *Aspergillus versicolor* (CARMONA et al., 2005) e *A. giganteus* (FIALHO e CARMONA et al., 2004), as quais exibiram atividades residuais entre 10 e 44%.

Assim, de uma maneira geral Excg1 demonstrou ser bastante tolerante à presença de diferentes íons metálicos no meio reacional, o que é uma característica interessante para aplicações industriais, uma vez que diferentes matérias primas podem estar contaminadas por íons. Podemos citar como exemplo resíduos de papel, como jornais e revistas, que apresentam íons Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{2+} provenientes nas tintas de impressão e que são matéria prima interessante para a obtenção de açúcares fermentáveis, visando à produção de etanol (KIM, S. et al., 2006; KUHAD et al., 2010; WANG, L. et al., 2012).

4.3.4. Especificidade de substrato de Excg1

A especificidade de substrato da enzima purificada foi determinada empregando diferentes substratos poliméricos e o substrato sintético *p*NP-xil (Tabela 7). A enzima mostrou alta especificidade para a clivagem de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 entre resíduos de xilose, não sendo hidrolisados substratos poliméricos que apresentavam monômeros de glicose ligados entre si por ligações glicosídicas em configuração β , como CMC e Avicel. Propriedades similares foram descritas para outras xilanases fúngicas (SAHA, 2002; RYAN et al., 2003; KNOB e CARMONA, 2010; MCPHILLIPS et al., 2014). Estes resultados sugerem que Excg1 é uma endo-xilanase livre de atividade celulásica. Além disso, Excg1 hidrolisou *p*NP-xil, sugerindo que apresenta pequena atividade exo-xilanásica (JURUTU e WU, 2014).

Tabela 7: Especificidade de substrato de Excg1

Substrato	Atividade (%)
<i>Beechwood</i>	100 $\pm$ 3
<i>Birchwood</i>	98 $\pm$ 1
Avicel	ND
CMC baixa viscosidade	ND
CMC alta viscosidade	ND
<i>p</i> NP-xil	0,290 $\pm$ 0,001

A atividade foi determinada como descrito em Material e Métodos. As reações foram acompanhadas por até 2 horas, com substratos poliméricos em concentração final de 1% (m/v) e *p*NP-xil em concentração final de 2 mmol.L⁻¹. A atividade controle (100%) correspondeu a 300 $\pm$ 15 U.mg⁻¹.

ND: não detectável nas condições de medida.

4.3.5. Determinação dos parâmetros cinéticos para a hidrólise de diferentes xilanas

O efeito de concentrações crescentes de substrato sobre a atividade de Excg1 foi avaliado para xilana *Beechwood* e xilana *Birchwood*. Em ambos os casos curvas simples de saturação foram observadas (Fig. 17 e 18). Os parâmetros cinéticos determinados para a hidrólise de xilana *Beechwood* foram $V_{\max} = 481,3 \pm 34,0 \text{ U.mg}^{-1}$ e $K_M = 3,7 \pm 0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$, e a estimulação da atividade pelo substrato seguiu cinética Michaeliana. Para a hidrólise de xilana *Birchwood* a atividade máxima atingiu $627,0 \pm 42,0 \text{ U.mg}^{-1}$, com um valor de K_M de $4,1 \pm 0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$; a estimulação também ocorreu segundo cinética Michaeliana (Tabela 8).

Figura 17. Efeito da concentração de xilana *Beechwood* sobre a atividade de Excg1.

A atividade foi determinada a 65°C em tampão McIlvane, pH 5,5, e a reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, conforme descrito em Material e Métodos.

Figura 18. Efeito da concentração de xilana *Birchwood* sobre a atividade de Excg1.

A atividade foi determinada a 65°C em tampão McIlvane, pH 5,5, e a reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, conforme descrito em Material e Métodos.

Tabela 8: Parâmetros cinéticos para hidrólise de diferentes xilanas por Excg1

Substrato	K_M (mg.mL ⁻¹)	V_{max} (U.mg ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mL.s ⁻¹ .mg ⁻¹)	n_H
Xilana <i>Beechwood</i>	3,7 ± 0,3	481,3 ± 34,0	136,4 ± 9,2	36,9 ± 1,5	1,0
Xilana <i>Birchwood</i>	4,1 ± 0,3	627,0 ± 42,0	177,7 ± 11,4	43,3 ± 2,8	1,0

A análise dos parâmetros cinéticos mostrou que Excg1 hidrolisou xilana *Birchwood* com atividade específica cerca de 30% maior que aquela estimada para a hidrólise da xilana *Beechwood*. No entanto, as afinidades aparentes da enzima para os dois substratos foram muito semelhantes, resultando numa eficiência catalítica 18% maior para a hidrólise de xilana *Birchwood*.

Poucos autores caracterizaram a hidrólise de xilana *Beechwood* por xilanases de diferentes fungos (Tabela 9). Uma afinidade aparente similar à determinada neste

estudo foi relatada para uma enzima produzida por *P. glabrum* (KNOB et al., 2013), porém a hidrólise ocorreu com menor $V_{\max}$, resultando numa eficiência catalítica 1,8 vezes menor, se comparada àquela estimada para Excg1. Já uma xilanase purificada de um isolado de *Trichoderma* apresentou afinidade aparente 2 vezes maior pelo substrato porém a hidrólise ocorreu com baixa $V_{\max}$, resultando também numa eficiência catalítica cerca de 1,7 vezes menor que a determinada para Excg1 (ZHOU, P. et al., 2011).

Em contraste, muitos estudos foram realizados empregando xilana *Birchwood* como substrato (Tabela 9). Afinidades aparentes muito similares à encontrada para Excg1 foram estimadas para as xilanases de *T. inhamatum* (SILVA, L. et al., 2015), *A. ochraceus* (MICHELIN et al., 2014) e *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 (CHAPLA et al., 2013), enquanto as demais enzimas estudadas apresentaram valores de K_M na faixa de 1,6 a 11,7 mg.mL⁻¹. Já no que diz respeito a $V_{\max}$, valores 3,1 e 11,6 vezes maiores que os estimados para Excg1 foram determinados para xilanases de *T. inhamatum* (SILVA, L. et al., 2015) e *A. foetidus* MTCC4898 (CHAPLA et al., 2013), resultando em eficiências catalíticas para a hidrólise deste substrato cerca de 2 e 21 vezes maiores, respectivamente.

As diferenças observadas nos parâmetros cinéticos determinados para a hidrólise dos dois substratos por Excg1 podem ser atribuídas a diferenças na estrutura e composição química das xilanas *Beechwood* e *Birchwood*. Embora as cadeias principais das duas xilanas, constituídas por resíduos de xilose unidos por ligações do tipo β -1,4, sejam muito similares (MORAIS et al., 2011), o tipo e distribuição dos grupos substituintes, bem como o grau de substituição da cadeia principal podem ser bastante distintos. Por exemplo, enquanto a xilana *Beechwood* pode apresentar maior percentual de ramificações de ácido glucurônico ou metilglucurônico quando comparada a xilana *Birchwood* (HESPELL e COTTA, 1995; MORAIS et al., 2010). Assim, aparentemente, a distribuição das ramificações e o tipo de substituinte podem interferir no acesso da enzima à cadeia principal de xilose.

Tabela 9: Parâmetros cinéticos de xilanases produzidas por fungos mesófilos

Fungo / Enzima	Xilana <i>Beechwood</i>			Xilana <i>Birchwood</i>			Referência
	$K_{0,5}$ (mg.mL ⁻¹)	$V_{\text{máx}}$ (U.mg ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mL.s ⁻¹ .mg ⁻¹)	$K_{0,5}$ (mg.mL ⁻¹)	$V_{\text{máx}}$ (U.mg ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mL.s ⁻¹ .mg ⁻¹)	
<i>C. graminicola</i> / Excg1	3,7 ± 0,3	481,3 ± 34,0	36,8 ± 1,5	4,1 ± 0,3	627,0 ± 42,0	43,3 ± 2,8	Neste trabalho
<i>Aspergillus fumigatus</i> R1 / -	-	-	-	11,66	87,6	3,1	DESHMUKH et al., 2016
<i>Trichoderma inhamatum</i> / Xyl 1	-	-	-	1,6	462,2	101,1	SILVA, L. et al., 2015
<i>Trichoderma inhamatum</i> / Xyl 2	-	-	-	4,0	1972,7	120,0	
<i>Penicillium rolfssi</i> c3-2(1) IBRL -	-	-	-	5,73	691,6	70,4	CHANG et al., 2015
<i>Aspergillus ochraceus</i> / Xyl 1	-	-	-	2,7	285,8	49,4	MICHELIN et al., 2014
<i>Aspergillus ochraceus</i> / Xyl 2	-	-	-	3,8	107,3	11,8	
<i>Aspergillus ochraceus</i> / Xyl 3	-	-	-	7,6	227,3	16,0	
<i>Penicillium glabrum</i> / -	3,1	194,21	20,9	5,3	212,10	13,3	KNOB et al., 2013
<i>Aspergillus foetidus</i> MTCC4898	-	-	-	4	7288	908,0	CHAPLA et al., 2013

Tabela 9: Parâmetros cinéticos de xilanases produzidas por fungos mesófilos

(final)

Fungo / Enzima	Xilana <i>Beechwood</i>			Xilana <i>Birchwood</i>			Referência
	$K_{0,5}$ (mg.mL ⁻¹)	$V_{\text{máx}}$ (U.mg ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mL.s ⁻¹ .mg ⁻¹)	$K_{0,5}$ (mg.mL ⁻¹)	$V_{\text{máx}}$ (U.mg ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mL.s ⁻¹ .mg ⁻¹)	
<i>Trichoderma</i> sp / -	2,1	135,8	22,1	3,0	134,6	15,3	ZHOU, P. et al., 2011
<i>Aspergillus sydowii</i> SBS 45 / Xyl 1	-	-	-	3,18	1,191	0,1	NAIR et al., 2008
<i>Aspergillus sydowii</i> SBS 45 / Xyl 2	-	-	-	6,51	1,587	0,2	

- Dado não apresentado

4.4. Análise dos produtos de hidrólise de xilana por Excg1

O modo de ação de Excg1 foi investigado usando xilana *Beechwood* como substrato, e os produtos de hidrólise foram analisados por CCD. Em tempos curtos de reação, os produtos de hidrólise foram xilooligossacarídeos de alta massa molecular (grau de polimerização (GP) >5) (dados não mostrados). Após 30 minutos de hidrólise, os principais produtos formados foram xilooligossacarídeos com GP <6, sendo eles X2, X3, uma espécie localizada abaixo da mancha de X3 (sugerindo uma ramificação), X4, uma espécie localizada abaixo da mancha de X4 (correspondendo possivelmente a outro produto ramificado) e vestígios de X5 e X6 (Fig. 19). Já após 1 hora de reação, os principais produtos corresponderam a X2, X3 e à espécie possivelmente ramificada localizada abaixo de X3 (X_n+R). Em tempos maiores (3 a 15 horas) ocorreu progressivamente a hidrólise de X3, com acúmulo de X2 como produto principal e aparecimento de X1 como produto minoritário; X_n+R permaneceu praticamente constante. Desta forma, os principais produtos após 48 horas foram X2, X_n+R e vestígios de X1. Estes resultados sugerem que Excg1 é uma endo-xilanase, uma vez que X2 é o principal produto da reação, e que não é capaz de hidrolisar a cadeia principal próximo ao ponto de ramificação. Além disso, a enzima apresenta pequena atividade exo-xilanásica, à qual se deve a produção de xilose em pequenas percentagens, proveniente da hidrólise de X3.

Segundo Bajpai (2009), as endo-xilanases apresentam alta atividade sobre o polímero de xilana e a taxa de hidrólise tende a diminuir com a diminuição do comprimento da cadeia. Sendo assim, a hidrólise de X3 pela maioria das enzimas conhecidas é desprezível ou limitada. Este comportamento foi relatado, por exemplo, para uma xilanase de *A. carneus*, que produziu X2 e X3 a partir de xilana *Beechwood* após 24 horas de hidrólise, sem produção de xilose, indicando que esta enzima é uma típica endo-xilanase (FANG, H. et al., 2008). Em contraste com esses resultados, entretanto, Excg1 mostrou alta eficiência para a hidrólise de X3. Um comportamento semelhante foi descrito por Chen, L. et al. (2009) para uma xilanase de *Trichoderma* sp. K9301 atuando também sobre xilana *Beechwood*.

Figura 19. Padrão de hidrólise de xilana *Beechwood* por Excg1.

As reações foram realizadas a 50 °C em tampão McIlvaine, pH 5,5, contendo xilana *Beechwood* 1% (m/v), empregando 5U de Excg1, conforme descrito em Material e Métodos. Padrões: X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5: xilopentaose; X6: xilohexaose.

4.5. Análise dos produtos de reação por espectrometria de massas

Os principais produtos de hidrólise de xilana *Beechwood* por ação de Excg1 presentes no sobrenadante do meio reacional após 48 horas de reação foram identificados por espectrometria de massas, empregando o método de inserção direta (Fig. 20). Os principais sinais obtidos foram aqueles com m/z de 122, 305, 627. O sinal de m/z 122 foi atribuído ao tampão Tris, no qual a enzima foi armazenada. Já os demais valores de m/z foram atribuídos, com base em dados da literatura, a X2 (m/z 305 $[X2 + Na]^+$) e X3 com uma ramificação de ácido 4-O-metilglucorônico (X3+4-O-ME) (m/z 627 $[X3+4-O-ME + Na]^+$) (REIS et al., 2005; BRASSEUR et al., 2014; CHEN, M. et al., 2015; YUAN et al., 2015). A partir destes resultados, propôs-se então que o produto ramificado X_n+R , correspondente à mancha abaixo do padrão de X3 nas análises por CCD, seria X3+4-O-ME.

Para confirmar a composição dos produtos foi realizada uma análise de MS/MS. A fragmentação dos picos com m/z de 305 $[X2 + Na]^+$ e 627 $[X3+4-O-ME + Na]^+$ é mostrada nas figuras 21 e 22, respectivamente. Os picos referentes à fragmentação do íon com m/z de 305 $[X2 + Na]^+$ (Fig. 21) indicam a presença de X1 (m/z de 173/174 $[X1 + Na]^+$), proveniente da fragmentação de X2. Já na figura 22, os picos provenientes da fragmentação do íon com m/z de 627 $[X3+4-O-ME + Na]^+$ indicam a presença de X3 (m/z de 437 $[X3 + Na]^+$). A diferença de massa entre os picos com m/z de 437 $[X3 + Na]^+$ e 627 $[X3+4-O-ME + Na]^+$, fornece exatamente a massa da ramificação de ácido 4-O-metilglucorônico (190), sem uma molécula de água, a qual é perdida na formação de uma ligação glicosídica entre o substituinte e a cadeia principal da xilana.

Figura 20. Espectro ID-MS obtido na hidrólise de xilana *Beechwood* por Excg1 após 48 horas de reação.

Figura 21. Espectro MS-MS obtido na fragmentação do pico com m/z de 305 [$X_2 + Na$]⁺.

Figura 22. Espectro MS-MS obtido na fragmentação do pico com m/z de 627 [X3+4-O-ME + Na]⁺.

4.6. Análise do efeito dos produtos finais de hidrólise sobre a atividade de Excg1

O efeito dos principais produtos de reação formados após 48 horas de reação (X2, X3+4-O-ME e vestígios de X1) sobre a hidrólise de xilana *Beechwood* por Excg1 foi avaliado por CCD, como mostrado na figura 23.

Figura 23. Efeito dos produtos de hidrólise sobre a atividade de Excg1.

As reações foram realizadas a 50 °C em tampão McIlvaine, pH 5,5, contendo xilana *Beechwood* 1% (m/v) e sobrenadante S48, empregando 5U de Excg1, conforme descrito em Material e Métodos. Padrões: X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5: xilopentaose; X6: xilohexaose.

A presença dos produtos não inibiu a atividade de Excg1 (Fig. 23) e o perfil de hidrólise obtido foi muito semelhante àquele obtido na sua ausência (Fig. 19). Em contraste, uma xilanase purificada de *Bacillus firmus* K-1 (JOMMUENGBOUT et al., 2009) foi fortemente inibida pelos principais produtos finais de reação, X2 e X3, uma característica comum à maioria das xilanases conhecidas (SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997; POLIZELI et al., 2005; GUERFALI et al., 2008; YAN et al., 2008).

Xilanases eficientes são consideradas componentes essenciais dos coquetéis enzimáticos empregados para a sacarificação da biomassa, pois facilitam o acesso das celulasas ao polímero de celulose e possibilitam bons rendimentos em açúcares fermentáveis, derivados da celulose e da xilana, com o emprego de menores cargas enzimáticas (QING et al., 2010; GAO et al., 2011; HU et al., 2011; KUMAR, A. et al., 2012). O uso de xilanases tolerantes aos produtos, como Excg1, pode levar a uma diminuição ainda maior da carga enzimática necessária para obter bons rendimentos de hidrólise, uma vez que a enzima permanece ativa mesmo em fases mais avançadas do processo, em que pode haver acúmulo dos produtos. Dessa forma, a tolerância de Excg1 aos produtos finais de reação a qualifica como uma enzima com bom potencial de aplicação em processos de hidrólise de materiais lignocelulósicos, podendo contribuir para aumentar viabilidade econômica dos processos de produção de etanol 2G (MOHANRAM et al., 2013; DEBEIRE et al., 2014; BUSSAMRA et al., 2015; MACHADO et al., 2015).

4.7. Caracterização bioquímica e cinética de Excg1 na presença de NaCl

Visando uma possível utilização de Excg1 em processos de sacarificação da biomassa lignocelulósica envolvendo o uso sustentável da água do mar em substituição a água doce, ou ainda em processos nos quais a biomassa pré-tratada apresente altas concentrações de sais, as propriedades bioquímicas e cinéticas da enzima foram também investigadas na presença de NaCl.

4.7.1. Efeito de concentrações crescentes de NaCl sobre a atividade xilanásica e a estabilidade de Excg1

O efeito de concentrações crescentes de NaCl sobre a atividade xilanásica de Excg1 é mostrado na figura 24. Observou-se uma diminuição gradual da atividade com o aumento da concentração de sal, atingindo cerca de 50% da atividade controle (ausência de sal) em $3,0 \text{ mol.L}^{-1}$. Entretanto, numa concentração de NaCl de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, próxima daquela encontrada usualmente na água do mar ($0,46 \text{ mol.L}^{-1}$, de MARÍA, 2013) a enzima manteve cerca de 85% da atividade controle.

Até o momento, nenhuma xilanase fúngica tolerante a altas concentrações salinas (halotolerante) foi descrita. Contudo, esta característica tem sido explorada em xilanases bacterianas. Os resultados observados para Excg1 foram muito semelhantes àqueles descritos para a xilanase halotolerante de *Planococcus* sp. (HUANG, X. et al., 2015), que mantém cerca de 60% da atividade controle na presença de NaCl $3,0 \text{ mol.L}^{-1}$. Em contraste, uma xilanase de *Bacillus* sp. SN5 manteve 75% da atividade controle em presença da mesma concentração de sal (BAI et al., 2012).

Poucos estudos foram realizados até o momento no que diz respeito à tolerância de diferentes xilanases ao NaCl em concentração $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Entretanto, resultados semelhantes aos observados para Excg1 foram descritos para xilanases de *Planococcus* sp. (HUANG, X. et al., 2015) e *Glaciecola mesophila* KMM241 (GUO et al., 2013), que mantiveram aproximadamente 90 e 85%, respectivamente, da atividade controle nessa condição. Em contraste, a xilanase produzida por *Bacillus* sp. SN5 apresentou uma atividade 25% maior que o controle, na presença da mesma concentração de sal (BAI et al., 2012).

Figura 24. Efeito da concentração de NaCl sobre a atividade enzimática de Excg1.

A atividade foi determinada a 65 °C em tampão McIlvaine, pH 5,5, contendo xilana *Beechwood* 1% (m/v) e NaCl em concentrações crescentes, conforme descrito em Material e Métodos. O controle (100%) correspondeu a 315 ± 21 U.mg⁻¹.

Excg1 mostrou-se totalmente estável quando incubada à temperatura ambiente por 48 horas em todas as concentrações de NaCl testadas (0,5 - 2,5 mol.L⁻¹), (Fig. 25). Um comportamento similar foi descrito para as xilanases purificadas de *Bacillus subtilis* (KHANDEPARKER et al., 2011) e *Bacillus haludorans* (KUMAR, V. et al., 2013b; PRAKASH et al., 2012).

Figura 25. Estabilidade de Excg1 à temperatura ambiente em presença de concentrações crescentes de NaCl.

A enzima purificada foi incubada à temperatura ambiente por 48 horas em soluções aquosas de NaCl de concentração crescente. A atividade residual foi determinada a 65 °C em tampão McIlvaine, pH 5,5, contendo xilana *Beechwood* 1% (m/v), conforme descrito em Material e Métodos. O controle (enzima incubada em ausência de NaCl) correspondeu a 300 ± 19 U.mg⁻¹.

A interação com a água é crucial para a manutenção da estrutura nativa, da atividade biológica e da solubilidade das proteínas, e em altas concentrações salinas a maioria das enzimas conhecidas é inativa (KARAN et al., 2012; FANG, C. et al., 2015). Acredita-se que isso se deva essencialmente ao sequestro das moléculas de água pelos íons, limitando as moléculas livres disponíveis para hidratação da enzima. Somado a isso, os íons promovem um desarranjo das capas organizadas de moléculas de água no entorno das regiões hidrofóbicas da superfície proteica, bem como perturbações das interações eletrostáticas entre grupos carregados adjacentes (KARAN et al., 2012; FANG, C. et al., 2015).

Ao contrário da maioria das enzimas, aquelas que mostram halotolerância são capazes de competir com os íons em altas concentrações pelas moléculas de água, preservando sua atividade e estrutura. Acredita-se que essa capacidade esteja relacionada a um maior conteúdo de resíduos de aminoácidos carregados na sua

superfície, em especial resíduos ácidos. De fato, uma propriedade geral das enzimas halofílicas conhecidas é a predominância de resíduos ácidos em relação aos básicos, com predominância de glutamato sobre aspartato, o que se atribui ao fato do glutamato ser o aminoácido com maior capacidade de ligação de água. Aparentemente, os aminoácidos ácidos na superfície das proteínas halofílicas ligam-se a cátions hidratados, formando uma capa de hidratação que preserva sua estrutura e atividade e previne a agregação e precipitação. Similarmente, entre os aminoácidos básicos há predominância de arginina sobre lisina, uma vez que a cadeia lateral da arginina é mais hidrofílica, contribuindo para manter a estrutura nativa da enzima. Outra característica típica das proteínas halofílicas é, ainda, um baixo teor de aminoácidos hidrofóbicos com cadeias laterais volumosas na sua superfície, se comparadas às enzimas não halofílicas, o que facilita a hidratação da molécula (revisto por Karan et al., 2012).

Devido ao seu alto conteúdo de aminoácidos ácidos, as proteínas halofílicas/halotolerantes geralmente apresentam ponto isoelétrico bastante ácido (XU et al., 2016). Em contraste, a despeito de sua halotolerância, Excg1 apresentou um *pI* bastante alcalino ($9,2 \pm 0,018$), o que sugere um conteúdo elevado de resíduos de aminoácidos básicos. Embora interessante, este resultado deve, entretanto, ser considerado com cautela, dado o alto teor de carboidratos determinado para Excg1. De fato, um estudo mais detalhado deve ser realizado, com a determinação do *pI* para a enzima deglicosilada ou mesmo a determinação de sua sequência completa de aminoácidos.

O conjunto dos resultados mostrados até aqui sugeriu que Excg1 seria uma enzima halotolerante, com bom potencial de aplicação em processos biotecnológicos conduzidos em presença de altas concentrações salinas ou mesmo naqueles em que se pretenda substituir a água doce por água do mar, no intuito de reduzir o consumo de água e os custos. Portanto, tornou-se relevante investigar a influência de altas concentrações de NaCl sobre as propriedades bioquímicas e cinéticas de Excg1, apresentada a seguir.

As concentrações de NaCl escolhidas para realizar a caracterização bioquímica e cinética de Excg1 foram 0,5 e 2,5 mol.L⁻¹. A primeira delas foi escolhida por ser próxima da concentração deste sal na água do mar. Já a segunda é uma

condição extrema de salinidade, na qual, entretanto, a enzima manteve cerca de 60% da sua atividade.

4.7.2. Efeito da presença de NaCl sobre pH e temperatura ótimos de reação de Excg1

O efeito de NaCl em concentração 0,5 e 2,5 mol.L⁻¹ sobre o pH ótimo de reação de Excg1 é mostrado na figura 26. Em comparação com o perfil obtido na ausência de sal, em que um platô de atividade máxima entre pH 4,5 e 6,0 foi evidenciado, em presença de NaCl 0,5 mol.L⁻¹ observou-se um perfil mais estreito, com um valor de pH ótimo bem definido de 5,5. Além disso, em valores de pH menores que 5,5 a atividade enzimática decaiu mais abruptamente na presença do sal, atingindo valores cerca de 25 e 80% menores que o máximo em pH 4,5 e 4,0, respectivamente. Acima de pH 5,5, em contraste, a atividade diminuiu gradualmente de maneira muito similar à observada na ausência de sal.

Já na presença de NaCl em concentração 2,5 mol.L⁻¹, a atividade máxima foi observada em pH 6,0. Abaixo deste valor a atividade diminuiu abruptamente, atingindo 55 e 6% do valor máximo em pH 5,0 e 4,5, respectivamente. Acima do pH ótimo, entretanto, a atividade xilanásica decresceu gradualmente até atingir 45% da máxima em pH 8,0. Nesta faixa, valores percentualmente maiores que aqueles determinados na ausência de sal foram obtidos.

As alterações nos perfis de pH ótimo em resposta à presença de NaCl podem ser tentativamente atribuídas a mudanças nos valores dos pKas das cadeias laterais dos resíduos de glutamato catalíticos, possivelmente provocadas por alterações no seu microambiente devidas a mudanças conformacionais da molécula da enzima resultantes da ação do sal. De fato, considerando o perfil observado em presença de NaCl 0,5 mol.L⁻¹ observa-se que a enzima só apresenta níveis consideráveis de atividade a partir de pH 4,5, enquanto na ausência de sal isso ocorre a partir de pH 4,0. Essa alteração é consistente com um aumento do pKa do grupo carboxílico do

resíduo de glutamato que atua como nucleófilo, que deve necessariamente estar desprotonado para que a catálise ocorra. Essa tendência aparentemente se acentua em presença de NaCl 2,5 mol.L⁻¹, condição em que níveis consideráveis de atividade são observado somente a partir de pH 5,0-5,5, com deslocamento do pH ótimo. Além disso, nesta condição de salinidade extrema o pKa do grupo carboxílico do resíduo de glutamato que atua como doador de prótons também deve ter sido deslocado para valores maiores, uma vez que para agir cataliticamente este grupo deve estar protonado. Dessa forma, o aumento do pKa deste grupo justificaria a preservação de níveis percentuais mais altos de atividade em pHs mais alcalinos.

A maioria das xilanases halotolerantes bacterianas conhecidas apresentam pH ótimo de reação na faixa alcalina (pH 7,0-12). Entretanto, algumas enzimas já estudadas apresentaram pH ótimo próximo do observado para Excg1, como as xilanases produzidas por *Massilia* sp. RBM26 (XU et al., 2016), *B. subtilis* (KHANDEPARKER et al., 2011) e *Bacillus* sp. (ZHOU, J. et al., 2014). O pH ótimo de reação de 5,5 apresentado por Excg1 na presença de NaCl 0,5 mol.L⁻¹ é uma característica muito interessante para sua possível aplicação em processos de sacarificação de biomassa realizados empregando água do mar.

Figura 26. Efeito da presença de NaCl sobre o pH ótimo de reação de Excg1.

A atividade foi determinada a 65 °C, em tampão Mcllvaine ajustado para diferentes valores de pH contendo xilana *Beechwood* 1% (m/v), na ausência (○) e presença de NaCl 0,5 mol.L⁻¹ (●) e 2,5 mol.L⁻¹ (Δ), conforme descrito em Material e Métodos. Os controles (100%) corresponderam a 290 ± 19 U.mg⁻¹ na ausência de NaCl e 247 ± 13 U.mg⁻¹ e 172 ± 9 U.mg⁻¹ na presença de 0,5 e 2,5 mol.L⁻¹ de NaCl, respectivamente.

O efeito da presença de NaCl em concentrações 0,5 mol.L⁻¹ e 2,5 mol.L⁻¹ sobre a temperatura ótima de reação de Excg1 é mostrado na figura 27. Nas duas concentrações de sal testadas os perfis de variação da atividade em função da temperatura foram muito semelhantes ao observado na ausência de sal, ocorrendo aumento gradual da atividade acima de 50 °C até atingir um máximo a 65 °C, com diminuição da atividade acima desta temperatura.

Similarmente ao observado para Excg1, temperaturas ótimas de reação elevadas (60-70°C) foram relatadas para outras xilanases halotolerantes (KHANDEPARKER et al., 2011; PRAKASH et al., 2012; KUMAR, V. et al., 2013b; KUMAR e SATYANARAYANA, 2014; ZHOU, J. et al., 2014; HUANG, X. et al., 2015). Entretanto, algumas enzimas halotolerantes com máxima atividade na faixa de 35-45°C também foram descritas (WANG, C. et al., 2010; BAI et al., 2012; GUO et al., 2013; XU et al., 2016).

Figura 27. Efeito da presença de NaCl sobre a temperatura ótima de reação de Excg1.

A atividade foi determinada em diferentes temperaturas em tampão McIlvaine, pH 5,5, contendo xilana *Beechwood* 1% (m/v) na ausência (○) e presença de NaCl 0,5 mol.L⁻¹ (●) e 2,5 mol.L⁻¹ (Δ), conforme descrito em Material e Métodos. Os controles (100%) corresponderam a 302 ± 20 U.mg⁻¹ na ausência de NaCl e 252 ± 15 U.mg⁻¹ e 186 ± 11 U.mg⁻¹ na presença de 0,5 e 2,5 mol.L⁻¹ de NaCl, respectivamente.

4.7.3. Efeito da presença de NaCl sobre a estabilidade térmica e ao pH de Excg1

O efeito da presença de NaCl sobre a estabilidade térmica de Excg1 a 60 °C é mostrado na figura 28. Quando incubada em presença do sal em concentração 2,5 mol.L⁻¹ a enzima apresentou um tempo de meia vida (90 minutos) levemente maior que o estimado na sua ausência (85 minutos), sugerindo um leve efeito estabilizante do sal. Em contraste, em presença de NaCl 0,5 mol.L⁻¹ a estabilidade da enzima diminuiu substancialmente: nesta condição o tempo de meia vida foi de apenas 50 minutos.

Figura 28. Efeito da presença de NaCl sobre a estabilidade térmica de Excgc1 a 60 °C.

A enzima purificada foi diluída convenientemente em água e incubada a 60 °C na ausência (○) e na presença de NaCl 0,5 mol.L⁻¹ (●) e 2,5 mol.L⁻¹ (Δ). A atividade residual foi determinada a 65 °C em tampão Mcllvaine, pH 5,5, contendo xilana *Beechwood* 1% (m/v) na ausência de NaCl, conforme descrito em Material e Métodos. O controle (100%) correspondeu a 294 ± 19 U.mg⁻¹. A linha horizontal tracejada indica 50% de atividade residual.

O efeito de NaCl sobre a termoestabilidade de Excgc1 a 50 °C também foi avaliado (Fig. 29). Tal como observado a 60 °C, em concentração 2,5 mol.L⁻¹ o NaCl teve efeito estabilizante sobre a atividade da enzima. Este efeito, discreto nas primeiras horas de incubação, tornou-se bastante evidente após 24 horas, acentuando-se até 48 horas, período após o qual a enzima apresentou atividade residual de 75%, bastante superior àquela observada na ausência de sal, de cerca de 50%. Já na concentração de 0,5 mol.L⁻¹, o sal teve efeito desestabilizante sobre Excgc1 nas primeiras horas de incubação a 50°C (Fig. 29), similarmente ao observado a 60 °C (Fig. 28). Entretanto, este efeito foi bem menos pronunciado na temperatura mais baixa, e em tempos de incubação maiores a estabilidade da enzima mostrou-se similar à observada em ausência de sal.

Figura 29. Efeito da presença de NaCl sobre a estabilidade térmica de Excg1 a 50 °C.

Excg1 foi diluída convenientemente em água e incubada a 50 °C na ausência (○) e na presença de NaCl 0,5 mol.L⁻¹ (●) e 2,5 mol.L⁻¹ (Δ). A atividade residual foi determinada a 65 °C em tampão Mcllvaine, pH 5,5, contendo xilana *Beechwood* 1% (m/v) na ausência de NaCl, conforme descrito em Material e Métodos. O controle (100%) correspondeu a 305 ± 21 U.mg⁻¹.

Contrastando com os resultados mostrados na figura 29, a estabilidade térmica de Excg1 a 50 °C na presença do substrato não foi afetada pela presença de NaCl, tanto em concentração 0,5 mol.L⁻¹ quanto 2,5 mol.L⁻¹ (Fig. 30). Este resultado indica que a presença do substrato exerce um efeito estabilizante potente sobre a atividade da enzima, muito superior ao proporcionado pelo sal na concentração mais elevada.

O conjunto de resultados relacionados ao efeito de concentrações elevadas de sal sobre a estabilidade térmica de Excg1 confirma o bom potencial de aplicação desta enzima em processos biotecnológicos conduzidos em altas salinidades ou empregando água do mar.

Similarmente ao observado para Excg1, uma xilanase halofílica de *Zunongwangia profunda* também apresentou maior estabilidade térmica a 40 e 45 °C em presença de concentrações elevadas de NaCl (3,0 mol.L⁻¹), comparando-se à

condição de ausência de sal (LIU, X. et al., 2014). Um aumento da termoestabilidade a 45 e 50 °C na presença de sal ($2,5 \text{ mol.L}^{-1}$) também foi descrito para uma β -glucosidase halotolerante recombinante de *Bacillus* sp. SJ-10 (LEE et al., 2015).

Embora o aumento da termoestabilidade de uma enzima em presença de concentrações elevadas de sal seja uma característica desejável para a sua aplicação biotecnológica, os mecanismos físico-químicos subjacentes a este efeito ainda não são bem compreendidos. Entretanto, um dos fatores que parece contribuir para esta maior termoestabilidade é a ocorrência de mudanças conformacionais da molécula proteica em resposta à elevação da temperatura, resultando em conformações ativas estabilizadas pela presença do sal, que poderia atuar minimizando a repulsão entre grupos carregados próximos e/ou reforçando interações hidrofóbicas (LEE et al., 2015).

Figura 30. Efeito da presença de NaCl sobre a estabilidade térmica de Excg1 a 50 °C na presença de substrato

A enzima purificada, diluída convenientemente, foi incubada a 50 °C na presença de xilana *Beechwood* em concentração final 1% (m/v), em tampão McIlvaine, pH 5,5, na ausência (○) e na presença de NaCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ (●) e $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$ (Δ). A atividade residual foi determinada a 65 °C em tampão McIlvaine, pH 5,5, contendo xilana *Beechwood* 1% (m/v) na ausência de NaCl, conforme descrito em Material e Métodos. O controle (100%) correspondeu a $295 \pm 19 \text{ U.mg}^{-1}$.

A presença de NaCl teve pequeno efeito sobre o perfil de estabilidade ao pH de Excg1 (Fig. 31), uma vez que em ambas as concentrações do sal testadas ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$) a estabilidade da enzima foi prejudicada apenas na faixa de pH de 3,0 a 3,5, quando comparada àquela observada na ausência de sal.

Várias evidências mostram que em presença de concentrações elevadas de sal ocorrem mudanças nos valores dos pKas dos grupos ionizáveis das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da superfície da proteína, devido ao processo de dessolvatação. Aparentemente essas mudanças ocorrem no sentido de favorecer as formas neutras destes grupos, uma vez que a dessolvatação de grupos carregados é energeticamente mais desfavorável. Assim, tende a ocorrer o aumento dos valores de pKa dos grupos carboxila dos aminoácidos ácidos, bem como a diminuição dos valores de pKa dos grupamentos ionizáveis dos aminoácidos básicos (ELCOCK e MCCAMMON, 1998). Assim, a desestabilização de Excg1 na faixa de pH de 3,0 a 3,5 pode ser atribuída a um aumento nos valores de pKa de cadeias laterais de resíduos ácidos, levando à ruptura de interações iônicas importantes para a estabilidade da enzima.

A excelente estabilidade de Excg1 nesta ampla faixa de pH, tanto em presença quanto em ausência de concentrações elevadas de sal, é uma característica muito interessante desta enzima, no que diz respeito a uma possível aplicação biotecnológica. Em contraste com os nossos resultados, a maioria das xilanases halotolerantes já estudadas apresentou estabilidade em faixas estreitas de pH, mais frequentemente na região alcalina (BAI et al., 2012; PRAKASH et al., 2012; KUMAR, V. et al., 2013b; KUMAR e SATYANARAYANA, 2014).

Figura 31. Efeito da presença de NaCl sobre a estabilidade ao pH de Excg1.

A enzima purificada foi incubada em tampão Mcllvaine (pH 3,0 a 8,0) ou tampão glicil-glicina (pH 8,0 a 10,0) por 24 horas a 4 °C, na ausência (○) e presença de NaCl 0,5 mol.L⁻¹ (●) e 2,5 mol.L⁻¹ (△). A atividade residual foi determinada a 65 °C em tampão Mcllvaine, pH 5,5, contendo xilana *Beechwood* 1% (m/v), na ausência de sal. O controle (100%) correspondeu a 294 ± 19 U.mg⁻¹.

4.7.4. Efeito da presença de NaCl sobre os parâmetros cinéticos para a hidrólise de xilana *Beechwood* por Excg1

O efeito de concentrações crescentes de xilana *Beechwood* sobre a atividade de Excg1 na presença de NaCl em concentrações finais de 0,5 e 2,5 mol.L⁻¹ está apresentado na figura 32. Em ambos os casos, foram observadas curvas simples de saturação.

Na ausência de NaCl a estimulação da atividade pelo substrato seguiu cinética Michaeliana e os parâmetros cinéticos determinados foram $K_M = 3,7 \pm 0,3$ mg.mL⁻¹ e $V_{max} = 481,3 \pm 34,0$ U.mg⁻¹, resultando numa eficiência catalítica de $36,9 \pm 1,5$ mL.s⁻¹.mg⁻¹. Já na presença de NaCl em concentração 0,5 mol.L⁻¹, os parâmetros cinéticos determinados foram próximos daqueles encontrados na

ausência de sal, com velocidade máxima de $400,0 \pm 27,0 \text{ U.mg}^{-1}$, $K_{0,5} = 3,0 \pm 0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $k_{\text{cat}}/K_M = 37,8 \pm 1,3 \text{ mL.s}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. No entanto, a estimulação ocorreu com cooperatividade positiva ($n_H = 1,6$). Cooperatividade positiva ($n_H = 1,4$) também foi observada na presença de NaCl $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$, com velocidade máxima de $318,0 \pm 30,2 \text{ U.mg}^{-1}$ e $K_{0,5}$ de $5,6 \pm 0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, resultando em eficiência catalítica de $16,1 \pm 0,8 \text{ mL.s}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. Um resumo dos parâmetros cinéticos obtidos para a hidrólise de xilana *Beechwood* por Excg1 na presença e na ausência de NaCl está apresentado na Tabela 10.

Figura 32. Efeito de concentrações crescentes de xilana *Beechwood* sobre a atividade de Excg1.

A atividade foi determinada a 65°C em tampão McIlvane, pH 5,5, contendo concentrações crescentes de xilana *Beechwood*, na ausência (○) e na presença de NaCl em concentração $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ (●) e $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$ (Δ) conforme descrito em Material e Métodos.

Tabela 10: Parâmetros cinéticos para hidrólise de xilana *Beechwood* por Excg1.

[NaCl] (mol.L ⁻¹)	K _{0,5} (mg.mL ⁻¹)	V _{max} (U.mg ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M (mL.s ⁻¹ .mg ⁻¹)	n _H
0	3,7 ± 0,3	481,3 ± 34,0	136,3 ± 9,2	36,9 ± 1,5	1,0
0,5	3,0 ± 0,3	400,0 ± 27,0	113,3 ± 7,8	37,8 ± 1,3	1,6
2,5	5,6 ± 0,5	318,0 ± 30,2	90,1 ± 6,4	16,1 ± 0,8	1,4

A análise dos parâmetros cinéticos mostrou que na presença de NaCl em concentração 0,5 mol.L⁻¹ a afinidade aparente de Excg1 pelo substrato foi levemente maior que na ausência do sal, embora a hidrólise tenha ocorrido com V_{max} levemente menor. Dessa forma, a eficiência catalítica para a hidrólise de xilana *Beechwood* pela enzima foi muito semelhante nas duas condições. Em contraste, na presença de NaCl em concentração 2,5 mol.L⁻¹, a afinidade aparente da enzima pelo substrato foi cerca de 2 vezes menor que a determinada em ausência de sal, e a hidrólise ocorreu com velocidade máxima 1,5 vezes menor. Em função disso, a eficiência catalítica determinada foi cerca de 2,3 vezes menor que aquela observada na ausência do sal.

As diferenças marcantes observadas nos parâmetros cinéticos determinados para a hidrólise de xilana *Beechwood* por Excg1 em presença de NaCl na concentração mais elevada podem ser atribuídas a mudanças conformacionais da molécula de enzima, possivelmente dificultando a interação enzima-substrato (diminuição da afinidade aparente) e o posicionamento mais adequado dos grupos essenciais para a catálise (diminuição de V_{max}).

Poucos autores caracterizaram a hidrólise de xilana *Beechwood* por xilanases halotolerantes (Tabela 11). Na ausência de sal, as xilanases de *Massilia* sp. (XU et al., 2016) e *Bacillus* sp (ZHOU, J. et al., 2014) apresentaram valores de K_{0,5} 2,6 e 1,6 vezes maiores, respectivamente, se comparados ao estimado para Excg1. Além da menor afinidade aparente pelo substrato, a hidrólise ocorreu também com baixa V_{max}, o que levou a baixas eficiências catalíticas (cerca de 7 e 3,2 vezes menores, respectivamente, que a determinada para Excg1).

Uma afinidade aparente pela xilana cerca de 1,5 vezes menor que a determinada para Excg1 foi relatada também para a xilanase de *G. mesophila* (GUO et al., 2013). Entretanto, a hidrólise ocorreu com $V_{\max}$ semelhante e eficiência catalítica 2,8 vezes maior, em comparação aos valores estimados para Excg1.

Diferentemente, as enzimas de *Planococcus* sp. (HUANG, X. et al., 2015) e *Bacillus* sp. (BAI et al., 2012) apresentaram afinidades aparentes para a xilana cerca de 3 e 6 vezes maiores, respectivamente, que Excg1, com valores de $V_{\max}$ da mesma ordem de grandeza, resultando em eficiências catalíticas cerca de 6,2 e 3,6 vezes maiores, respectivamente, que a estimada para Excg1. Apesar disso, é importante destacar que os processos de hidrólise de biomassa lignocelulósica são conduzidos em altas cargas de sólido, com o objetivo de diminuir os custos operacionais. Dessa forma, uma boa velocidade de hidrólise é um parâmetro mais relevante que uma alta afinidade aparente pela xilana quando se considera o emprego bem sucedido de uma xilanase halotolerante neste processo.

Finalmente, apenas um relato foi encontrado na literatura, até o momento, no que diz respeito à determinação dos parâmetros cinéticos para a hidrólise de xilana *Beechwood* por uma xilanase halotolerante em presença de NaCl. Nesse trabalho, resultados muito diferentes dos obtidos para Excg1 foram encontrados para uma xilanase halofílica purificada de *Z. profunda*, que apresentou afinidade aparente pelo substrato e k_{cat} 2,6 e 4,4 vezes maiores, respectivamente, na presença do sal em concentração 3,0 mol.L⁻¹ que na sua ausência (LIU, X. et al., 2014).

Tabela 11: Parâmetros cinéticos para a hidrólise de xilana *Beechwood* por xilanases halotolerantes

Organismo / Enzima	$K_{0,5}$ (mg.mL ⁻¹)	$V_{máx}$ (U.mg ⁻¹)	k_{cat}/k_M (mL.s ⁻¹ .mg ⁻¹)	Referência
<i>C. graminicola</i> / Excg1	3,7 ± 0,3	481,3 ± 34	36,9 ± 1,5	Neste trabalho
<i>Massilia</i> sp. RBM26 / XynRBM26	9,49	65,79	5,2	XU et al., 2016
<i>Planococcus</i> sp. / rXynSL4	1,15	362,74	227,6	HUANG, X. et al., 2015
<i>Bacillus</i> sp. / rXynAHJ14	5,6	84,8	11,4	ZHOU, J. et al., 2014
<i>Glaciecola mesófila</i> / XynB	5,82	380	103,4	GUO et al., 2013
<i>Bacillus</i> sp. / Xyn10A	0,6	105	131,3	BAI et al., 2012

4.7.5. Efeito da presença de NaCl sobre o padrão de hidrólise de xilana *Beechwood* por Excg1

O efeito de NaCl em concentração 0,5 mol.L⁻¹ sobre o padrão de hidrólise de xilana *Beechwood* por Excg1 foi avaliado por CCD, como mostrado na figura 33. O perfil de hidrólise obtido na presença do sal foi muito semelhante àquele obtido na sua ausência (Fig. 19), confirmando o potencial de aplicação de Excg1 em processos biotecnológicos conduzidos em condições de salinidade mais elevada.

Figura 33. Efeito de NaCl sobre o padrão de hidrólise de xilana *Beechwood* por Excg1.

As reações foram realizadas a 50 °C em tampão McIlvaine, pH 5,5, contendo xilana *Beechwood* 1% (m/v) e NaCl 0,5 mol.L⁻¹, empregando 5U de Excg1, conforme descrito em Material e Métodos. Padrões: X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5: xilopentaose; X6: xilohexaose.

4.8. Efeito de diferentes solventes orgânicos e acetato sobre a atividade xilanásica de Excg1

Assim como as enzimas halotolerantes tem recebido grande atenção por seu potencial de aplicação em processos biotecnológicos conduzidos em condições de salinidade mais elevada, enzimas lignocelulolíticas tolerantes à presença de

solventes orgânicos residuais têm despertado interesse devido às vantagens associadas à sua utilização na sacarificação de biomassa lignocelulósica pré-tratada com solventes orgânicos sem a necessidade de etapas de lavagem (DOUKYU e OGINO, 2010). Similarmente, a tolerância dessas enzimas a subprodutos oriundos dos processos de pré-tratamento também é uma propriedade interessante a ser explorada.

Nesse contexto, foi avaliado o efeito de diferentes solventes empregados em processos de tratamento da biomassa (etanol, metanol, butanol, propanol, glicerol, tolueno e acetona), em concentração final 5% (v/v), sobre a atividade xilanásica de Excg1 a 50 °C (Fig. 34). O efeito de acetato, um subproduto de processos de pré-tratamento alcalino, também foi avaliado, nas concentrações finais de 50 e 200 mmol.L⁻¹.

A enzima mostrou-se tolerante à presença de acetato no meio reacional, nas duas concentrações testadas. A presença de propanol e tolueno também não teve nenhum efeito sobre o desempenho catalítico de Excg1. Já glicerol, metanol, etanol e butanol inibiram levemente a atividade enzimática, na faixa de 10 a 30%. Além disso, a enzima mostrou leve estimulação (cerca de 20 %) por acetona.

Poucos estudos foram realizados até o momento no que diz respeito à tolerância de xilanases fúngicas a solventes orgânicos. Uma xilanase purificada de *A. awamori* VTCC-F312 (DO et al., 2012) foi levemente inibida (14 a 37%) na presença de diferentes solventes orgânicos, como etanol, butanol, metanol, propanol e acetona, em concentração final 30% (v/v). Já a xilanase de *A. niger* (HMIDA-SAYARI et al., 2012) se mostrou estável na presença de 1% (v/v) de etanol, butanol, metanol, propanol, glicerol e acetona por 1 hora de incubação à 40 °C.

Diversas tecnologias são utilizadas para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica a fim de solubilizar a lignina. Excg1 mostrou-se tolerante à presença de metanol, etanol, glicerol, propanol, butanol, tolueno e acetona, que são solventes comuns em pré-tratamentos *organosolv* (ZHAO, X. et al., 2009; HMIDA-SAYARI et al., 2012). Além disso, Excg1 foi tolerante à presença de acetato, gerado pela desacetilação de acetilxilananas durante pré-tratamentos alcalinos e atingindo concentrações da ordem de 25 a 200 mmol.L⁻¹ (FERNANDEZ-SANDOVAL et al., 2012; MARTINEZ et al., 2001; MILLS et al., 2009).

A redução da atividade de Excg1 na presença dos solventes orgânicos polares testados, como metanol, etanol, butanol e glicerol, embora pouco pronunciada, pode ser atribuída a um mecanismo similar ao descrito para o efeito de NaCl sobre a capa de hidratação ao redor das regiões hidrofóbicas da superfície proteica (KARAN et al., 2012). Já em presença de solventes menos polares, como tolueno, acetona e propanol, a camada de hidratação na superfície da proteína tende a permanecer intacta (KARAN et al., 2012), o que é coerente com a ausência de efeito destes compostos sobre a atividade de Excg1.

Estes resultados mostram que Excg1 tem propriedades interessantes para utilização em processos de sacarificação de biomassa pré-tratada empregando processo *organosolv* ou tratamento alcalino.

Figura 34. Tolerância de Excg1 a diferentes solventes e ao acetato.

A atividade enzimática foi determinada a 50 °C em tampão McIlvaine, pH 5,5, contendo xilana *Beechwood* 1% (m/v) e os compostos indicados na figura, nas concentrações informadas. A atividade controle (100%) foi determinada na ausência dos compostos testados e correspondeu a $302 \pm 22 \text{ U.mg}^{-1}$.

Conclusão

5. Conclusão

✓ A estratégia padronizada para a purificação de uma xilanase produzida por *C. graminicola* por FES em meio simples e barato mostrou-se eficiente, caracterizando-se pela rapidez, pequeno número de passos e bom rendimento.

✓ A enzima purificada (Excg1) é monomérica, apresenta baixa massa molecular (cerca de 20 kDa) e *pI* elevado (9,2).

✓ Excg1 apresentou propriedades interessantes para aplicações biotecnológicas em geral, como boa termoestabilidade e excelente tolerância a uma ampla faixa de pH.

✓ O pH ótimo na faixa de 4,5 a 6,0, além da boa tolerância a diferentes íons metálicos e aos produtos de hidrólise (xilose, xilobiose e xilotriose com uma ramificação de ácido 4-O-metilglucorônico) tornam Excg1 particularmente atraente para compor coquetéis enzimáticos para a hidrólise de biomassa lignocelulósica.

✓ A atividade de Excg1 mostrou-se tolerante a concentrações elevadas de NaCl e ocorreu aumento da termoestabilidade da enzima em presença de alta concentração do sal (2,5 mol.L⁻¹).

✓ Na presença de NaCl em concentração 0,5 mol.L⁻¹ (concentração média deste sal na água do mar), os parâmetros cinéticos e o padrão de hidrólise de xilana *Beechwood* por Excg1 não foram alterados.

✓ Excg1 também se mostrou tolerante a acetato e níveis residuais de solventes orgânicos.

✓ As propriedades de Excg1 em presença de altas concentrações de NaCl sugerem bom potencial de aplicação em processos biotecnológicos conduzidos em salinidades elevadas, como aqueles em que se pretenda substituir água doce por água do mar. A tolerância a solventes e acetato tornam a enzima potencialmente atraente também para aplicação em processos de sacarificação de biomassa pré-tratada, reduzindo gastos relativos a etapas de lavagem.

Referências

6. Referências

- ACOSTA-RODRIGUES, I.; PIÑÓN-ESCOBEDO, C.; ZAVALA-PÁRAMO, M. A. G.; LÓPEZ-ROMERO, E.; CANO-CAMACHO, H. Degradation of cellulose by the bean-pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Production of extracellular cellulolytic enzymes by cellulose induction. **Antonie. Van. Leeuwenhoek.**, 87, 301-310, 2005.
- AMARA, A. B.; DAUPHIN, R.; BABIKER, H.; VIOLLET, Y.; CHANG, J.; JEULAND, N.; AMER, A. Revisiting diesel fuel formulation from Petroleum light and middle refinery streams based on optimized engine behavior. **Fuel**, 174, 63–75, 2016.
- ALCOCER, M. J. C.; FURNISS, C. S. M.; KROON, P. A.; CAMPBELL, M.; ARCHER, D. B. Comparison of modular and non-modular xylanases as carrier proteins for the efficient secretion of heterologous proteins from *Penicillium funiculosum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 60, 726–732, 2003.
- BAJAJ, B. K.; ABBASS, M. Studies on an alkali-thermostable xylanase from *Aspergillus fumigatus* MA28. **3 Biotech**, 1, 161–171, 2011.
- BAJPAI, P. “Xylanases” in: Schaechter, M. (ed.), Encyclopedia of Microbiology (Third Edition), **Academic Press**. Oxford, 600-612, 2009.
- BAI, W.; XUE, Y.; ZHOU, C.; MA, Y. Cloning, expression and characterization of a novel salt-tolerant xylanase from *Bacillus* sp. SN5. **Biotechnol. Lett.**, 34, 2093–2099, 2012.
- BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in presence of cadmium. **FEMS Microbiol. Lett.**, 220, 235-240, 2003.
- BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanase and their mode of action. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 8, 353-368, 1992.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 56, 326–338, 2001.
- BHALLA, A.; BANSAL, N.; KUMAR, S.; BISCHOFF, K. M.; SANI, R. K. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. **Bioresour. Technol.**, 128, 751–759, 2013.
- BHATIA, L.; JOHRI, S.; AHMAD, R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. **AMB Express**, 2, 65, 2012.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8, 93-99, 1987.

- BRASSEUR, C.; BAUWENS, J.; TARAYRE, C.; MATTÉOTTI, C.; THONART, P.; DESTAIN, J.; FRANCIS, F.; HAUBRUGE, E.; PORTETELLE, D.; VANDENBOL, M.; FOCANT, J. F.; PAUW, E. MALDI-TOF MS analysis of cellodextrins and xylo-oligosaccharides produced by hindgut homogenates of *Reticulitermes santonensis*. **Molecules**, 19, 4578-4594, 2014.
- BROWN, R. J.; MILLER, G. C.; GRIFFON, N.; LONG, C. J.; RADER, D. J. Glycosylation of endothelial lipase at asparagine-116 reduces activity and hydrolysis of native lipoproteins in vitro and in vivo. **J. Lipid. Res.**, 48, 1132–1139, 2007.
- BORNSCHEUER, U.; BUCHHOLZ, K.; SEIBEL, J. Enzymatic degradation of (ligno)cellulose. **Angew. Chem. Int. Ed.**, 53, 10876 – 10893, 2014.
- BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; COSTA, A. C. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresour. Technol.**, 187, 173–181, 2015.
- CARMONA, E. C.; FIALHO, M. B.; BUCHGNANI E. B.; COELHO, G. D.; BROCHETO-BRAGA, M. R.; JORGE, J. A. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Process. Biochem.**, 40, 359-364, 2005.
- CHANG, K. L.; ARAI, T.; IBRAHIM, D.; PRAWITWONG, P.; LAN, D.; MURATA, Y.; MORI, Y.; KOSUGI, A. Purification and characterization of a xylanase from the newly isolated *Penicillium rolsii* c3-2(1) IBRL. **BioResources.**, 10, 1627-1643, 2015.
- CHAPLA, D.; DHOLAKIYA, S.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. Characterization of purified fungal endoxylanase and its application for production of value added food ingredient from agroresidues. **Food Bioprod. Process.**, 91, 682–692, 2013.
- CHAUHAN, B. S.; SINGH, R. K.; CHO, H. M.; LIM, H. C. Practice of diesel fuel blends using alternative fuels: A review. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, 59, 1358–1368, 2016.
- CHEN, L. L.; ZHANG, M.; ZHANG, D. H.; CHEN, X. L.; SUN, C. Y.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Purification and enzymatic characterization of two β -endoxylanases from *Trichoderma* sp. K9301 and their actions in xylooligosaccharide production. **Bioresour. Technol.**, 100, 5230–5236, 2009.
- CHEN, M. H.; RAJAN, K.; CARRIER, D. J.; SINGH, V. Separation of xylose oligomers from autohydrolyzed *Miscanthus giganteus* using centrifugal partition chromatography. **Food Bioprod. Process.**, 95, 125–132, 2015.
- CHENG, Y. S.; ZHENG, Y.; YU, C. W.; DOOLEY, T. M.; JENKINS, B. M.; VANDERGHEYNST, J. S. Evaluation of high solids alkaline pretreatment of rice straw. **Appl. Biochem, Biotechnol.**, 162, 1768 – 1784, 2010.
- CHOVAU, S.; DEGRAUWE, D.; VAN DER BRUGGEN, B. Critical analysis of techno-economic estimates for the production cost of lignocellulosic bio-ethanol. **Renew Sust. Energ. Rev.**, 26, 307–321, 2013.

- CHUTANI, P. E.; SHARMA, K. K. Biochemical evaluation of xylanases from various filamentous fungi and their application for the deinking of ozone treated newspaper pulp. **Carbohydr. Polym.**, 127, 54–63, 2015.
- COLABARDINI, A. C.; RIES, L. N. A.; BROWN, N. A.; REIS, T. F.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M. H. S.; MENINO, J. F.; RODRIGUES, F.; GOLDMAN, G. H. Functional characterization of a xylose transporter in *Aspergillus nidulans*. **Biotechnol. Biofuels**, 7, 46, 2014.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.**, 29, 3-23, 2005.
- CORAL, G.; ARIKAN, B.; ÜNALDI, M. N.; GÜVENMEZ, H. K. Some properties of thermostable xylanase from an *Aspergillus niger* strain. **Ann. Microbiol.**, 52, 299-306, 2002.
- CORRAL, O. L.; VILLASEÑOR-ORTEGA, F. Xylanases. In: Advances in Agricultural and Food Biotechnology, **Research Signpost**. India, 305-322, 2006.
- DAMM, T.; COMMANDEUR, U.; FISCHER, R.; USADEL, B.; KLOSEA, H. Improving the utilization of lignocellulosic biomass by polysaccharide modification. **Process Biochem.**, 51, 288–296, 2016.
- DEBEIRE, P.; DELALANDE, F.; HABRYLO, O.; JELTSCH, J. M.; DORSSELAER, A. V.; PHALIP, V. Enzymatic cocktails produced by *Fusarium graminearum* under submerged fermentation using different lignocellulosic biomasses. **FEMS Microbiol. Lett.**, 355, 116–123, 2014.
- de MARÍA, P. D. On the use of seawater as reaction media for large-scale applications in biorefineries. **Chem. Cat. Chem.**, 00, 1–7, 2013.
- DESHMUKH, R. A.; JAGTAP, S.; MANDAL, M. K.; MANDAL, S. K. Purification, biochemical characterization and structural modelling of alkali-stable β -1,4-xylan xylanohydrolase from *Aspergillus fumigatus* R1 isolated from soil. **BMC Biotechnol.**, 16, 11, 2016.
- DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R. F.H. From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research. **Biotechnol. Adv.**, 30, 1627-1640, 2012.
- DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 97, 8455–8465, 2013.
- DO, T. T.; QUYEN, D. T.; DAM, T. H. Purification and characterization of an acid-stable and organic solvent-tolerant xylanase from *Aspergillus awamori* VTCC-F312. **ScienceAsia**, 38, 157–165, 2012.
- DOBREV, G.; ZHEKOVA, B.; DELCHEVA, G.; KOLEVA, L.; TZIPORKOV, N.; PISHTIYSKI, I. Purification and characterization of endoxylanase XIn-1 from *Aspergillus niger* B03. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 25, 2095–2102, 2009.

- DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, 1, 2–17, 2010.
- DONG, X.; MEINHARDT, S. W.; SCHWARZ, P. B. Isolation and characterization of two endoxylanases from *Fusarium graminearum*. **J. Agric. Food Chem.**, 60, 2538–2545, 2012.
- DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent tolerant enzymes. **Biochem. Eng. J.**, 48, 270–282, 2010.
- DRISS, D.; BHIRI, F.; SIELA, M.; GHORBEL, R.; CHAABOUNI, S. E. Purification and properties of a thermostable xylanase GH 11 from *Penicillium occitanis* Pol6. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 168, 851–863, 2012.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, 28, 350–6, 1956.
- DUTTA, T.; SENGUPTA, R.; SAHOO, R.; SINHA RAY, S.; BHATTACHARJEE, A.; GOSH, S. A novel cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citrinum*: production, purification and characterization. **Lett. Appl. Microbiol.**, 44, 206–211, 2007.
- EICHLER, J. Biotechnological uses of archaeal extremoenzymes. **Biotechnol. Adv.**, 19, 261–278, 2001.
- ELCOCK, A. H.; MCCAMMON, J. A. Electrostatic contributions to the stability of halophilic proteins. **J. Mol. Biol.**, 280, 731–748, 1998.
- ERGÜN, B. G.; ÇALIK, P. Lignocellulose degrading extremozymes produced by *Pichia pastoris*: current status and future prospects. **Bioprocess. Biosyst. Eng.**, 39, 1–36, 2016.
- FANG, C.; THOMSEN, M. H.; BRUDECKI, G. P.; CYBULSKA, I.; FRANKAR, C. G.; BASTIDAS-OYANEDEL, J. R.; SCHMIDT, J. E. Seawater as alternative to freshwater in pretreatment of date palm residues for bioethanol production in coastal and/or arid areas. **Chem. Sus. Chem.**, 8, 3823 – 3831, 2015.
- FANG, H. Y.; CHANG, S. M.; LAN, C. H.; FANG, T. J. Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. **Process. Biochem.**, 43, 49–55, 2008.
- FARINAS, C. S.; LEMO, V.; ZÚÑIGA, U. F. R.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. **Boletim Pesquisa Desenvolvimento/Embrapa**, 22, 1–16, 2008.
- FENGXIA, L.; MEI, L.; ZHAOXIN, L.; XIAOMEI, B.; HAIZHEN, Z.; YI, W. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. **Bioresour. Technol.**, 99, 5938–5941, 2008.

- FERNANDEZ-SANDOVAL, M. T.; HUERTA-BERISTAIN, G.; TRUJILLO-MARTINEZ, B.; BUSTOS, P.; GONZALEZ, V.; BOLIVAR, F.; GOSSET, G.; MARTINEZ, A. Laboratory metabolic evolution improves acetate tolerance and growth on acetate of ethanologenic *Escherichia coli* under non-aerated conditions in glucose-mineral medium. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 96, 1291–1300, 2012.
- FIALHO, M. B.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Aspergillus giganteus*. **Folia Microbiol.**, 49, 13–18, 2004.
- FILHO, E. X. F. Xilanases. In: SAID, S., PIETRO, R. Enzimas como Agentes Biotecnológicos. Ribeirão Preto: **Legis Summa Ltda**, 1, 137-148, 2004.
- FONSECA-MALDONADO, R.; VIEIRA, D. S.; ALPONTI, J. S.; BONNEIL, E.; THIBAUT, P.; WARD, R. J. Engineering the pattern of protein glycosylation modulates the thermostability of a GH11 xylanase. **J. Biol. Chem.**, 288, 25522-25534, 2013.
- FONTANA, J. D.; GEBARA, M.; BLUMEL, M.; SCHNEIDER, H.; MACKENZIE, C. R.; JOHNSON, K. G. α -4-O-methyl-Dglucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods Enzymol.**, 160, 560-571, 1988.
- GAN, P.; IKEDA, K.; IRIEDA, H.; NARUSAKA, M.; O'CONNELL, R. J.; NARUSAKA, Y.; TAKANO, Y.; KUBO, Y.; SHIRASU, K. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. **New Phytol.**, 197, 1236–1249, 2012.
- GAO, D.; UPPUGUNDLA, N.; CHUNDAWAT, S.P.; YU, X.; HERMANSON, S.; GOWDA, K.; BRUMM, P.; MEAD, D.; BALAN, V.; DALE, B.E. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. **Biotechnol. Biofuels.**, 4, 1–11, 2011.
- GARCÍA-TORREIRO, M.; PALLÍN, M. A.; LÓPEZ-ABELAIRAS, M.; LU-CHAU, T. A.; LEMA, J. M. Alkali treatment of fungal pretreated wheat straw for bioethanol production. **Bioethanol**, 2, 32 – 43, 2016.
- GAUR, R.; TIWARI, S.; RAI, P.; SRIVASTAVA, V. Isolation, production, and characterization of thermotolerant xylanase from solvent tolerant *Bacillus vallismortis* RSPP-15. **Int. J. Polym. Sci.**, 2015.
- GIBSON, L. J. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. **J. R. Soc. Interface**, 9, 2749–2766, 2012.
- GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energ Policy**, 36, 2086-2097, 2008.
- GOLUGURI, B. R.; THULLURI, C.; ADDEPALLY, U.; SHETTY, P. R. Novel alkali-thermostable xylanase from *Thielaviopsis basicola* (MTCC1467): Purification and kinetic characterization. **Int. J. Biol. Macromol.**, 82, 823–829, 2016.

- GORSHKOVA, T. A.; KOZLOVA, L. V.; MIKSHINA, P. V. Spatial structure of plant cell wall polysaccharides and its functional significance. **Biochem.-Moscow**, 78, 836-853, 2013.
- GUERFALI, M.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. *Talaromyces thermophiles* β -D-xylosidase: purification, characterization and xylobiose synthesis. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 150, 267–279, 2008.
- GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, 41, 550 – 567, 2015.
- GUO, B.; LI, P.; YUE, Y. S.; ZHAO, H. L.; DONG, S.; SONG, X. Y.; SUN, C. Y.; ZHANG, W. X.; CHEN, X. L.; ZHANG, X. Y.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Gene cloning, expression and characterization of a novel xylanase from the marine bacterium, *Glaciecola mesophila* KMM241. **Mar. Drugs**, 11, 1173-1187, 2013.
- HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresour. Technol.**, 89, 17–34, 2003.
- HE, H.; QIN, Y.; LI, N.; CHEN, G.; LIANG, Z. Purification and characterization of a thermostable hypothetical xylanase from *Aspergillus oryzae* HML366. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 175, 3148–3161, 2015.
- HEBERT, P. D.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS, C. M. Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biol.**, 2, e312, 2004.
- HESPELL, R. B.; COTTA, M. A. Degradation and utilization by *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c of xylans with different chemical and physical properties. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61, 3042–3050, 1995.
- HMIDA-SAYARI, A.; TAKTEK, S.; ELGHARBI, F.; BEJAR, S. Biochemical characterization, cloning and molecular modeling of a detergent and organic solvent-stable family 11 xylanase from the newly isolated *Aspergillus niger* US368 strain. **Process Biochem.**, 47, 1839–1847, 2012.
- HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J.N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: Is it an additive or synergistic effect? **Biotechnol. Biofuels.**, 4, 2–13, 2011.
- HUANG, G.; CHEN, F.; KUANG, Y.; HE, H.; QIN, A. Current techniques of growing algae using flue gas from exhaust gas industry: a review. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 178, 1220–1238, 2016.
- HUANG, X.; LIN, J.; YE, X.; WANG, G. molecular characterization of a thermophilic and salt- and alkaline-tolerant xylanase from *Planococcus* sp. SL4, a strain isolated from the sediment of a soda lake. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 25, 662–671, 2015.
- IQBAL, H. M.N.; KYAZZE, G.; KESHAVARZ, T. Advances in valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: An overview. **Bioresources**, 8, 3157-3176, 2013.

- JIANG, Z.; CONG, Q.; YAN, Q.; KUMAR, N.; DU, X. Characterisation of a thermostable xylanase from *Chaetomium* sp. and its application in Chinese steamed bread. **Food Chem.**, 120, 457–462, 2010.
- JOMMUENGBOUT, P.; PINITGLANG, S.; KYU, K. L.; RATANAKHANOKCHAI, K. Substrate-binding site of family 11 xylanase from *Bacillus firmus* K-1 by molecular docking. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 73, 833-839, 2009.
- JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresour. Technol.**, 199, 103 – 112, 2016.
- JONSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnol. Biofuels**, 6, 16, 2013.
- JORDAN, D. B.; BOWMAN, M. J.; BRAKER, J. D.; DIEN, B. S.; HECTOR, R. E.; LEE, C. C.; MERTENS, J. A.; WAGSCHAL, K. Plant cell walls to ethanol. **Biochem. J.**, 442, 241–252, 2012.
- JØRGENSEN, H.; ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F.; OLSSON, L. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme Microb. Technol.**, 32, 851–861, 2003.
- JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial Exo-xylanases: A Mini Review. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 174, 81–92, 2014.
- JUTURU, V.; WU, J. C. Insight into microbial hemicellulases other than xylanases: a review. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 88, 353-363, 2013.
- JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. **Biotechnol. Adv.**, 30, 1219-27, 2012.
- KARAN, R.; CAPES, M. D.; DASSARMA, S. Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. **Aquat. Biosyst.**, 8, 2012.
- KARIMI, K.; TAHERZADEH, M. J. A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility. **Bioresour. Technol.**, 203, 348 – 356, 2016.
- KENNES, D.; ABUBACKAR, H. N.; DIAZ, M.; VEIGA, M. C.; KENNES, C. Bioethanol production from biomass: carbohydrate vs syngas fermentation. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 91, 304–317, 2016.
- KHANDEPARKER, R.; VERMA, P.; DEOBAGKAR, D. A novel halotolerant xylanase from marine isolate *Bacillus subtilis* cho40: gene cloning and sequencing. **N. Biotechnol.**, 28, 2011.
- KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, 199, 42 – 48, 2016.

- KIM, S. D.; KIM, H. J.; KIM, C. J. Enhancement of the enzymatic digestibility of waste newspaper using tween. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 129–132, 486–495, 2006.
- KIMURA, T.; ITO, J.; KAWANO, A.; MAKINA, T.; KONDO, H.; KARITA, S.; SAKKA, K.; OHMIYA, K. Purification, characterization and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium* sp.40. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 64, 1230-1237, 2000.
- KING, B. C. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. **Biotechnol. Biofuels.**, 4, 4, 2011.
- KNOB, A.; BEITEL, S. M.; FORTKAMP, D.; TERRASAN, C. R. F.; ALMEIDA, A. F. Production, purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate. **Biomed. Res. Int.**, 2013, 1-8, 2013.
- KNOB, A.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: a novel acidophilic xylanase. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 162, 429-443, 2010.
- KONDO, T.; NOJIRI, M. Application of region selective substituted methylcelluloses to characterize the reaction mechanism of cellulose. **Macromolecules**, 29: 239-2395, 1996.
- KUHAD, R. C.; MEHTA, G.; GUPTA, R.; SHARMA, K. K. Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulose improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass Bioenerg.**, 34, 1189-1194, 2010.
- KUMAR, A.; GUPTA, R.; SHRIVASTAVA, B.; KHASA, Y.P.; KUHAD, R.C. Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. **J. Mol. Catal. B Enzym.**, 74, 170–177, 2012.
- KUMAR, R.; TABATABAEI, M.; KARIMI, K.; HORVÁTH, I. S. Recent updates on lignocellulosic biomass derived ethanol - A review. **Biofuels Res. J.**, 9, 347-356, 2016.
- KUMAR, V.; MARÍN-NAVARRO, J.; SHUKLA, P. Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: trends, applications and further perspectives. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 32, 34, 2016.
- KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. Production of thermo-alkali-stable xylanase by a novel polyextremophilic *Bacillus halodurans* TSEV1 in cane molasses medium and its applicability in making whole wheat bread. **Bioprocess Biosyst Eng.**, 37, 1043–1053, 2014.
- KUMAR, V.; VERMA, D.; ARCHANA, A.; SATYANARAYANA, T. Thermostable bacterial xylanases. In: Satyanarayana T, Littlechild J, Kawarabayasi Y (eds) Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology, **Springer**. New York, 813–857, 2013a.

- KUMAR, V.; SYAL, P.; SATYANARAYANA, T. Highly thermo–halo–alkali-stable b-1,4-endoxylanase from a novel polyextremophilic strain of *Bacillus halodurans*. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, 36, 555–565, 2013b.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680-685, 1970.
- LAGAERT, S.; POLLET, A.; COURTIN, C. M.; VOLCKAERT, G. β -Xylosidases and α -L-arabinofuranosidases: accessory enzymes for arabinoxylan degradation. **Biotechnol. Adv.**, 32, 316–332, 2014.
- LEE, J. M.; KIM, Y. R.; KIM, J. K.; JEONG, G. T.; HA, J. C.; KONG, I. S. Characterization of salt-tolerant b-glucosidase with increased thermostability under high salinity conditions from *Bacillus* sp. SJ-10 isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, 38, 1335–1346, 2015.
- LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; FURRIEL, R. P. M.; BORIN, I. A. SigrafW: an easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochem. Mol. Biol. Educ.**, 33, 399-403, 2005.
- LI, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J. S.; ERIKSSON KARL-ERIK, L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme Microb. Technol.**, 27, 89–94, 2000.
- LIGUORI, R.; VENTORINO, V.; PEPE, O.; FARACO, V. Bioreactors for lignocellulose conversion into fermentable sugars for production of high added value products. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 100, 597–611, 2016.
- LIGUORI, R.; AMORE, A.; FARACO, V. Waste valorization by biotechnological conversion into added value products. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 97, 6129-6147, 2013.
- LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Prog. Energy Combust. Sci.**, 38, 449-467, 2012.
- LIU, X.; HUANG, Z.; ZHANG, X.; SHAO, Z.; LIU, Z. Cloning, expression and characterization of a novel cold-active and halophilic xylanase from *Zunongwangia profunda*. **Extremophiles**, 18, 441–450, 2014.
- LIU, L.; SUN, J.; CAI, C.; WANG, S.; PEI, H.; ZHANG, J. Corn stover pretreatment by inorganic salts and its effects on hemicellulose and cellulose degradation. **Bioresour. Technol.**, 100, 5865–5871, 2009.
- LOMBARD, V.; RAMULU, G. H.; DRULA, E.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy). **Nucleic Acids Res.**, 42, D490-D495, 2014.

- LUDWIG, N.; LÖHRER, M.; HEMPEL, M.; MATHEA, S.; SCHLIEBNER, I.; MENZEL, M.; KIESOW, A.; SCHAFFRATH, U.; DEISING, H. B.; HORBACH, R. Melanin is not required for turgor generation but enhances cell-wall rigidity in appressoria of the corn pathogen *Colletotrichum graminicola*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, 27, 315–327, 2014.
- MACHADO, C. B.; CITADINI, A. P.; GOLDBECK, R.; LIMA, E. A.; FIGUEIREDO, F. L.; SILVA, T. M.; HOFFMAM, Z. B.; SOUSA, A. S.; SQUINA, F. M.; POLIZELI, M. L. T. M.; RULLER, R.; WARD, R. J. Increased biomass saccharification by supplementation of a commercial enzyme cocktail with endo-arabinanase from *Bacillus licheniformis*. **Biotechnol. Lett.**, 37, 1455–1462, 2015.
- MARTINEZ, A.; RODRÍGUEZ, M. E.; WELLS, M. L.; YORK, S. W.; PRESTON, J. F.; INGRAM, L. O. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. **Biotechnol. Prog.**, 17, 287–293, 2001.
- MCGREGOR, J. L.; CLEMETSON, K. J.; JAMES, E.; LUSCHER, E. F.; DECHAVANNE, M. Characterization of human blood platelet membrane proteins and glycoproteins by their isoelectric point (pI) and apparent molecular weight using two-dimensional electrophoresis and surface-labelling techniques. **BBA Biomemb.**, 599, 473 - 483, 1980.
- MCILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **J. Biol. Chem.**, 49, 183-186, 1921.
- MCPHILLIPS, K.; WATERS, D. M.; PARLET, C.; WALSH, D. J.; ARENDT, E. K.; MURRAY, P. G. Purification and characterisation of a β -1,4-xylanase from *Remersonia thermophila* CBS 540.69 and its application in bread making. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 172, 1747–1762, 2014.
- MELEIRO, L. P.; ZIMBARDI, A. L. R. L.; SOUZA, F. H. M.; MASUI, D. C.; SILVA, T. M.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. A novel β -glucosidase from *Humicola insolens* with high potential for untreated waste paper conversion to sugars. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 173, 391–408, 2014.
- MENG, X.; RAGAUSKAS, A. J. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 27, 150–158, 2014.
- MICHELIN, M.; SILVA, T. M.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and biochemical properties of multiple xylanases from *Aspergillus ochraceus* tolerant to Hg^{2+} ion and a wide range of pH. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 174, 206–220, 2014.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.**, 31, 426-428, 1959.
- MILLS, T. Y.; SANDOVAL, N. R.; GILL, R. T. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. **Biotechnol. Biofuels**, 2, 26–35, 2009.

- MOHANRAM, S.; AMAT, D.; CHOUDHARY, J.; ARORA, A.; NAIN, L. Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. **Sustain. Chem. Process.**, 1, 2013.
- MORAÏS, S.; BARAKA, Y.; HADAR, Y.; WILSON, D. B.; SHOHAM, Y.; LAMED, R.; BAYER, E. A. Assembly of xylanases into designer cellulosomes promotes efficient hydrolysis of the xylan component of a natural recalcitrant cellulosic substrate. **Mbio.** 2, 2011.
- MORAÏS S.; BARAKA, Y.; CASPI, J.; HADAR, Y.; LAMED, R.; SHOHAM, Y.; WILSON, D. B.; BAYER, E. A. Contribution of a xylan-binding module to the degradation of a complex cellulosic substrate by designer cellulosomes. **Appl. Environ. Microbiol.**, 76, 3787–3796, 2010.
- MORALES, M.; QUINTERO, J.; CONEJEROS, R.; AROCA, G. Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Environmental impacts and energy balance. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, 42, 1349–1361, 2015.
- MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 100, 5205–5214, 2016.
- MOREIRA, L. R. S.; CAMPOS, M. C.; SIQUEIRA, P. H. V. M.; SILVA, L. P.; RICART, C. A. O.; MARTINS, P. A.; QUEIROZ, R. M. L.; FILHO, E. X. F. Two b-xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genet. Biol.**, 60, 46-52, 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: Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization, **InTech**. 251-275, 2013.
- NAIR, S. G.; SINDHU, R.; SHASHIDHAR, S. Purification and biochemical characterization of two xylanases from *Aspergillus sydowii* SBS 45. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 149, 229–243, 2008.
- NIELSEN, J.; LARSSON, C.; VAN MARIS, A.; PRONK, J. Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 24, 398–404, 2013.
- O'CONNELL, R. J.; THON, M. R.; HACQUARD, S.; AMYOTTE, S. G.; KLEEMANN, J.; TORRES, M. F.; DAMM, U.; BUIATE, E. A.; EPSTEIN, L.; ALKAN, N.; ALTMÜLLER, J.; ALVARADO-BALDERRAMA, L.; BAUSER, C. A.; BECKER, C.; BIRREN, B. W.; CHEN, Z.; CHOI, J.; CROUCH, A. A.; DUVICK, J. P.; FARMAN, M. A.; GAN, P.; HEIMAN, HENRISSAT, B.; HOWARD, R.; KABBAGE, M.; KOCH, C.; KRACHER, B.; KUBO, Y.; D LAW, A.; LEBRUN, M.; LEE, Y.; MIYARA, I.; MOORE, N.; NEUMANN, U.; NORDSTRÖM, K.; PANACCIONE, D.; RALPH, P.; PLACE, M.; PROCTOR, R. H.; PRUSKY, D.; RECH, G.; REINHARDT, R.; ROLLINS, J. A.; ROUNSLEY, S.; SCHARDL, C. L.; SCHWARTZ, D. C.; SHENOY, N.; SHIRASU, K.; SIKHAKOLLI, U. R.; STÜBER, K.; SUKNO, S. A.; SWEIGARD, J. A.; TAKANO, Y.; TAKAHARA, H.; TRAIL, F.; DOES, H.; M, L. VOLL, WILL, I.; YOUNG, S.; ZENG, Q.

- ZHANG, J.; ZHOU, S.; DICKMAN, M. B.; SCHULZE-LEFERT, P.; THEMAAT, E. V. L.; MA, L.; YOUNG, L. J. V. S.; ZENG, Q.; JINGZE ZHANG, J.; ZHOU, S.; DICKMAN, M. B.; LEFERT, P. S.; THEMAAT, E. V. L. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genet.**, 44, 1060-1067, 2012.
- O'FARRELL, P. Z.; GOODMAN, H. M.; O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. **Cell**, 12, 1133-1142, 1977.
- OHTA, K.; MORIYAMA, S.; TANAKA, H.; SHIGE, T.; AKIMOTO, H. Purification and characterization of an acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* and sequence analysis of the encoding gene. **J. Biosci. Bioeng.**, 92, 262-270, 2001.
- PAL, A.; KHANUM, F. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: Individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. **Process. Biochem.**, 46, 879–887, 2011.
- PAULY, M.; GILLE, S.; LIU, L.; MANSOORI, N.; SOUZA, A.; SCHULTINK, A.; XIONG, G. Hemicellulose biosynthesis. **Planta**, 238, 627–642, 2013.
- PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of stylosanthes a *Æ*rst report. **Mycologia**, 85, 362-364, 1993.
- PIPPO, W. A.; LUENGO, C. A.; ALBERTERIS, L. A. M.; GARZONE, P.; CORNACCHIA, G. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: Current situation and environmental aspects. **Waste Biomass Valor.**, 2, 1–16, 2011.
- POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCEI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 67, 577-591, 2005.
- PORTILLO, M. C., SAADEDDIN, A. Recent trends in ionic liquid (IL) tolerant enzymes and microorganisms for biomass conversion. **Crit. Rev. Biotechnol.**, 35, 294–301, 2015.
- PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S. K.; PRAKASH, B.; RUBUL, M.; SREERAMULU, K. Production of alkaliphilic, halotolerant, thermostable cellulose free xylanase by *Bacillus halodurans* PPKS-2 using agro waste: single step purification and characterization. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 28, 183–192, 2012.
- QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C.E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresour. Technol.**, 101, 9624–9630, 2010.
- QIU, Z., AITA, G. M., WALKER, M. S. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse. **Bioresour. Technol.**, 117, 251–256, 2012.

- RAGAUSKAS, A. J.; BECKHAM, G. T.; BIDDY, M. J.; CHANDRA, R.; CHEN, F.; DAVIS, M. F.; DAVISON, B. H.; DIXON, R. A.; GILNA, P.; KELLER, M.; LANGAN, P.; NASKAR, A. K.; SADDLER, J. N.; TSCHAPLINSKI, T. J.; TUSKAN, G. A.; WYMAN, C. E. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. **Science**, 344, 1246843, 2014.
- RAHMAN, A. K. M. S.; SUGITANI, N.; HATSU, M.; TAKAMIZAWA, K. A role of xylanase, α -L-arabinofuranosidase, and xylosidase in xylan degradation. **Can. J. Microbiol.**, 49, 58-64, 2003.
- READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H. Minimization of variation in the response to different protein of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. **Anal. Biochem.**, 116, 53-64, 1981.
- REIS, A.; PINTO, P.; EVTUGUIN, D. V.; NETO, C. P.; DOMINGUES, P.; FERRER-CORREIA, A. J.; DOMINGUES, M. R. M. Electrospray tandem mass spectrometry of underivatized acetylated xylo-oligosaccharides. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, 19, 3589–3599, 2005.
- REISFELD, R. A.; LEWIS, U. J.; WILLIAMS, D. E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. **Nature**. 195, 281-3, 1962.
- RICO, A.; RENCORET, J.; DEL RÍO, J. C.; MARTÍNEZ, A. T.; GUTIÉRREZ, A. Pretreatment with laccase and a phenolic mediator degrades lignin and enhances saccharification of Eucalyptus feedstock. **Biotechnol. Biofuels**, 7, 6, 2014.
- ROLLIN, J. A.; ZHU, Z.; SATHITSUKSANO, N.; ZHANG, Y. H. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: a comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia. **Biotechnol. Bioeng.**, 108, 22-30, 2011.
- ROMANOWSKA, I.; POLAK, J.; BIELECKI, S. Isolation and properties of *Aspergillus niger* IBT-90 xylanase for bakery. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 69, 665–671, 2006.
- RYAN, S. E.; NOLAN, K.; THOMPSON, R.; GUBITZ, G. M.; SAVAGE, A. V.; TUOHY, M. G. Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. **Enzyme Microb. Technol.**, 33, 775-785, 2003.
- RYVARDEN, L. Genera of Polypores: Nomenclature and Taxonomy. **Synopsis Fungorum**. Fungi Flora A/S, Oslo, Norway. 5, 1-363, 1991.
- SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, 5, 337-353, 2015.
- SAHA, B. C. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Process Biochem.**, 37, 1279–1284, 2002.

- SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova**, 35, 1004-1010, 2012.
- SHARMA, M.; KUMAR, A. Xylanases: an overview. **Br. Biotechnol. J.**, 3, 1-28, 2013.
- SILVA, L. A. O.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. **Electron. J. Biotechnol.**, 18, 307–313, 2015.
- SILVA, J. C. R.; GUIMARÃES, L. H. S.; SALGADO, J. C. S.; FURRIEL, R. P. M.; POLIZELI, M. L. T. M.; ROSA, C. R.; JORGE, J. A. Purification and biochemical characterization of glucose–cellobiose-tolerant cellulases from *Scytalidium thermophilum*. **Folia Microbiol.**, 58, 561-568, 2013.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SUKUMARAN, R. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Biores. Technol.**, 127, 500–507, 2013.
- SINGHVI, M. S.; CHAUDHARI, S.; GOKHALE, D. V. Lignocellulose processing: a current challenge. **RSC Adv.**, 4, 8271–8277, 2014.
- SKROPETA, D. The effect of individual N-glycans on enzyme activity. **Bioorg. Med. Chem.**, 17, 2645–2653, 2009.
- SØRENSEN, I.; DOMOZYCH, D.; WILLATS, W. G. T. How have plant cell walls evolved? **Plant Physiol.**, 154, 366-372, 2010.
- SORGATTO, M.; GUIMARÃES, N. C. A.; ZANOELO, F. F.; MARQUES, M. R.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; GIANNESI, G. G. Purification and characterization of an extracellular xylanase produced by the endophytic fungus, *Aspergillus terreus*, grown in submerged fermentation. **Afr. J. Biotechnol.**, 11, 8076-8084, 2012.
- SOUZA, F. H. M.; NASCIMENTO, C. V.; ROSA, J. C.; MASUI, D. C.; LEONE, F. A.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated b-glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. **Process Biochem.**, 45, 272–278, 2010.
- SOUZA, R. F.; GOMES, R. C.; COELHO, R. R. R.; ALVIANO, C. S.; SOARES, R. M. A. Purification and characterization of an endochitinase produced by *Colletotrichum gloeosporioides*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 222, 45-50, 2003.
- SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresour. Technol.**, 199, 49–58, 2016.
- SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.**, 17, 39-67, 1997.

- TANAKA, H.; MUGURUMA, M.; OHTA, K. Purification and properties of a family-10 xylanase from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 and characterization of the encoding gene. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 70, 202–211, 2006.
- TANAKA, H.; NAKAMURA, T.; HAYASHI, S.; OHTA, K. Purification and properties of an extracellular endo-1,4- β -xylanase from *Penicillium citrinum* and characterization of the encoding gene. **J. Biosci. Bioeng.**, 100, 623–630, 2005.
- TANG, W.; COUGHLAN, S.; CRANE, E.; BEATTY, M.; DUVICK, J. The application of laser microdissection to in planta gene expression profiling of the maize anthracnose stalk rot fungus *Colletotrichum graminicola*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, 19, 1240–1250, 2006.
- TEIXEIRA, A. R. Método para estudo das hifas do basidiocarpo de fungos poliporáceos. **Manual n° 6**. São Paulo, Instituto de Botânica, 1995.
- TEIXEIRA, R. S. S.; SIQUEIRA, F. G.; SOUZA, M. V.; FILHO, E. X. F.; BOM, E. P. S. Purification and characterization studies of a thermostable β -xylanase from *Aspergillus awamori*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 37, 1041–1051, 2010.
- THIAGARAJAN, S.; JEYA, M.; GUNASEKARAN, P. Purification and characterization of an endoxylanase from solid-state culture of alkalitolerant *Aspergillus fumigatus* MKU1. **Indian J. Biotechnol.**, 5, 351–35, 2006.
- TURKIEWICZ, M.; KALINOWSKA, H.; SKA, M. Z.; BIELECKI, S. Purification and characterization of two endo-1,4-b-xylanases from Antarctic krill, *Euphausia superba* Dana. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, 127, 325–335, 2000.
- UDAY, U. S. P.; CHOUDHURY, P.; BANDYOPADHYAY, T. K.; BHUNIA, B. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **Int. J. Biol. Macromol.**, 82, 1041–1054, 2016.
- ÚNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. <http://www.unica.com.br>. Acesso em 01 de fevereiro de 2016.
- VELEA, S.; DRAGOS, N.; SERBAN, S.; ILIE, L.; STALPEANU, D.; NICOARA, A.; STEPAN, E. Biological sequestration of carbon dioxide from thermal power plant emissions, by absorption in microalgal culture media. **Rom. Biotech. Lett.**, 14, 4485–4500, 2009.
- VIIKARI, L.; ALAPURANEN, M.; PURANEN, T.; VEHEMAANPERA, J.; SIILKA-AHO, M. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, 108, 121–145, 2007.
- WAKIYAMA, M.; YOSHIHARA, K.; HAYASHI, S.; OHTA, K. An extracellular endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus japonicus*: Purification, properties, and characterization of the encoding gene. **J. Biosci. Bioeng.**, 109, 227–229, 2010.

- WAKIYAMA, M.; TANAKA, H.; YOSHIHARA, K.; HAYASHI, S.; OHTA, K. Purification and properties of family-10 endo-1,4- β -xylanase from *Penicillium citrinum* and structural organization of encoding gene. **J. Biosci. Bioeng.**, 105, 367–374, 2008.
- WANG, C. Y.; CHAN, H.; LIN, H. T.; SHYU, Y. T. Production, purification and characterisation of a novel halostable xylanase from *Bacillus* sp. NTU-06. **Ann. Appl. Biol.**, 187–197, 2010.
- WANG, L.; TEMPLER, R.; MURPHY, R. J. High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. **Appl. Energy.**, 99, 23–31, 2012.
- WANG, M.; LIU, K.; DAI, L.; ZHANG, J.; FANG, X. The structural and biochemical basis for cellulose biodegradation. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 88, 491–500, 2013.
- XU, B.; DAI, L.; LI, J.; DENG, M.; MIAO, H.; ZHOU, J.; MU, Y.; WU, Q.; TANG, X.; YANG, Y.; DING, J.; HAN, N.; HUANG, Z. Molecular and biochemical characterization of a novel xylanase from *Massilia* sp. RBM26 isolated from the feces of *Rhinopithecus bieti*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 26, 9–19, 2016.
- YAN, Q. J.; WANG, L.; JIANG, Z. Q.; YANG, S. Q.; ZHU, H. F.; LI, L. T. A xylose-tolerant β -xylosidase from *Paecilomyces thermophila*: Characterization and its co-action with the endogenous xylanase. **Bioresour. Technol.**, 99, 5402–5410, 2008.
- YANG, X.; SHI, P.; HUANG, H.; LUO, H.; WANG, Y.; ZHANG, W.; YAO, B. Two xylose-tolerant GH43 bifunctional β -xylosidase/ α -arabinosidases and one GH11 xylanase from *Humicola insolens* and their synergy in the degradation of xylan. **Food Chem.**, 148, 381–387, 2014.
- YU, Q.; ZHUANG, X.; YUAN, Z.; QI, W.; WANG, Q.; TAN, W. The effect of metal salts on the decomposition of sweet sorghum bagasse in flow-through liquid hot water. **Bioresour. Technol.**, 102, 3445–3450, 2011.
- YUAN, L.; SCANLON, M. G.; ESKIN, N. A. M.; THIYAM-HOLLANDER, U.; AACHARY, A. A. Effect of pretreatments and endo-1,4- β -xylanase hydrolysis of canola meal and mustard bran for production of oligosaccharides. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 175, 194–208, 2015.
- ZANOELO, F. F.; POLIZELI, M. L.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant beta-D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 4, 170–176, 2004.
- ZHANG, J.; SIIKA-AHO, M.; PURANEN, T.; TANG, M.; TENKANEN, M.; VIKARI, L. Thermostable recombinant xylanases from *Nonomuraea flexuosa* and *Thermoascus aurantiacus* show distinct properties in the hydrolysis of xylans and pretreated wheat straw. **Biotechnol. Biofuels.**, 4, 12, 2011.
- ZHANG, K.; PEI, Z.; WANG, D. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. **Bioresour. Technol.**, 199, 21 – 33, 2016.

- ZHANG, L.; WANG, L.; KAO, Y. T.; QIU, W.; YANG, Y.; OKOBIAH, O.; ZHONG, D. Mapping hydration dynamics around a protein surface. **PNAS**, 104, 18461–18466, 2007.
- ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels Bioprod. Bioref.**, 6, 465–482, 2012.
- ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D., Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 82, 815–827, 2009.
- ZHAO, H. Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. **J. Mol. Catal. B**, 37, 16–25, 2005.
- ZHOU, J.; WU, Q.; ZHANG, R.; MO, M.; TANG, X.; LI, J.; XU, B.; DING, J.; LU, Q.; HUANG, Z. A thermo-halo-tolerant and proteinase-resistant endoxylanase from *Bacillus* sp. HJ14. **Folia Microbiol.**, 59, 423–431, 2014.
- ZHOU, P.; ZHU, H.; YAN, Q.; KATROLIA, P.; JIANG, Z. Purification and properties of a psychrotrophic *Trichoderma* sp. xylanase and its gene sequence. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 164, 944–956, 2011.
- ZHOU, Q.; PARK, S. H.; BOUCHER, S.; HIGGINS, E.; LEE, K.; EDMUNDS, T. N-linked oligosaccharide analysis of glycoprotein bands from isoelectric focusing gels. **Anal. Biochem.**, 335, 10–16, 2004.
- ZIMBARDI, A. L. R. L.; SEHN, C.; MELEIRO, L. P.; SOUZA, F. H. M.; MASUI, D. C.; NOZAWA, M. S. F.; GUIMARÃES, L. H. S.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. Optimization of β -glucosidase, β -xylosidase and xylanase production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification. **Int. J. Mol. Sci.**, 14, 2875-2902, 2013.