UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Purificação e caracterização bioquímica de uma ß-xilosidase halotolerante de *Colletotrichum graminicola*

Daniella Romano de Carvalho

Dissertação apresentada a 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

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Purificação e caracterização bioquímica de uma ß-xilosidase halotolerante de *Colletotrichum graminicola*

Daniella Romano de Carvalho

Orientadora: Rosa dos Prazeres Melo Furriel

Dissertação apresentada a 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

2017

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

Carvalho, Daniella Romano

Purificação e caracterização bioquímica de uma ß-xilosidase halotolerante de *Colletotrichum graminicola*. Ribeirão Preto, 2017.

119 p. : il. ; 30 cm

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. β-xilosidase
3. Halotolerância 4.Termoestabilidade
5. Sacarificação da hemicelulose 6. Etanol lignocelulósico

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniella Romano de Carvalho

Purificação e caracterização bioquímica de uma ß-xilosidase halotolerante 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 Donizetti e Magali, pelo amor, dedicação, apoio e incentivo, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Profª. Drª. Rosa dos Prazeres Melo Furriel pela orientação, confiança e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Atílio Jorge pelo conhecimento compartilhado e ajuda durante as dificuldades encontradas no desenvolvimento deste trabalho.

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

Ao Prof. Dr. Arthur Henrique Cavalcanti de Oliveira pela ajuda nos experimentos de focalização isoelétrica.

Aos amigos de laboratório Luana, Sibeli, Zé e Ana Lúcia, pela amizade construída nesses anos, pelos conselhos e auxílio nos experimentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Luiza, minha prima querida, pela amizade, conselhos e apoio neste trabalho.

Ao Douglas por todo carinho, amizade e incentivo neste trabalho.

À Cintya, Angélica e Maria Victória, pela amizade e companheirismo durante estes sete anos de USP.

Aos meus pais, por todo amor, incentivo e suporte durante estes anos de estudo.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

À FAPESP e a CAPES pelo auxílio financeiro.

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.”

(Roberto Shinyashiki)

RESUMO

A fim de garantir a viabilidade econômica da produção de etanol de segunda geração é necessário o desenvolvimento de tecnologias eficientes para a hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos. Além disso, o elevado consumo de água pelas biorrefinarias tem despertado grande atenção para a utilização de recursos hídricos não-potáveis, como a água do mar. Assim, atualmente busca-se por enzimas tolerantes a altas concentrações salinas, bem como aos subprodutos gerados e/ou acumulados nas etapas de pré-tratamento da biomassa. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi a purificação e caracterização cinética e bioquímica de uma ß-xilosidase produzida por uma linhagem do fungo mesófilo *Colletotrichum graminicola*. A enzima purificada (Bxcg) apresentou conteúdo de carboidratos totais de 54% (m/m), ponto isoelétrico de 4,2 e uma massa molecular aparente de cerca de 130 kDa, que foi reduzida para cerca de 92 kDa após deglicosilação. A enzima mostrou boa tolerância a elevadas concentrações de sal e manteve cerca de 90% da atividade controle na presença de NaCl 0,5 mol L^{-1} (concentração média de NaCl na água do mar). A temperatura e pH ótimos de reação foram 65 ºC e 4,5, respectivamente, tanto na ausência quanto na presença de NaCl 0,5 mol L^{-1}. Já na presença de NaCl 2,5 mol L^{-1} o pH ótimo de atividade foi alterado para 5,0. Bxcg permaneceu estável numa ampla faixa pH (4,0 - 7,5) tanto na ausência quanto na presença de sal. A enzima mostrou ótima estabilidade térmica e manteve completamente estável à 50 ºC após 24 horas de incubação. A presença de elevada concentração de NaCl (2,5 mol L^{-1}) resultou num aumento na termoestabilidade da enzima. A atividade enzimática foi tolerante aos íons Ca^{2+}, Sr^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, K^{+} e Na^{+}. Na ausência de sal, Bxcg hidrolisou *p*-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (*p*NP-XIL) com $V_{máx}$ de 348,8 ± 11,5 U mg^{-1}, K_M de 0,52 ± 0,02 mmol L^{-1} e alta eficiência catalítica (k_{cat}/K_M = 1432,7 ± 47,3 L $mmol^{-1}$ s^{-1}). Em presença de sal, a afinidade aparente de Bxcg pelo substrato foi levemente menor e a hidrólise ocorreu com $V_{máx}$ menor, resultando em eficiência catalítica cerca de 1,5 de vezes menor, se comparadas as condição de ausência de sal. A enzima apresentou atividade bifuncional de β-xilosidase/α-L-arabinofuranosidase. Bxcg hidrolisou *p*-nitrofenil-α-L-arabinopiranosídeo com afinidade aparente cerca de 18 vezes menor (K_M = 9,6 ± 0,5 mmol L^{-1}) que a estimada para *p*NP-XIL e a hidrólise do substrato ocorreu com $V_{máx}$ de 148,4 ± 4,4 U mg^{-1} e eficiência catalítica de 33,1 ± 1,6 L $mmol^{-1}$ s^{-1}. A enzima foi fortemente inibida por xilose com K_I de 3,3 mmol L^{-1}. Bxcg foi capaz de hidrolisar xilooligossacarídeos até xilohexaose, inclusive aqueles com ramificação de ácido 4-O-metilglucurônico. Bxcg e uma endo-xilanase purificada do mesmo microrganismo apresentaram um forte efeito sinérgico (3,1 vezes) para hidrólise de xilana *beechwood*. A enzima mostrou-se tolerante aos solventes butanol, glicerol, tolueno e acetona, bem como aos surfactantes Triton X-100, Tween 80 e Tween 20, enquanto que o líquido iônico acetato de 1-etil-3-metilimidazólio inibiu fortemente a atividade enzimática. De uma maneira geral, Bxcg apresenta propriedades atraentes para a aplicação em processos de sacarificação da biomassa lignocelulósica, incluindo aqueles conduzidos em elevada salinidade e/ou em presença de compostos residuais gerados ou acumulados nas etapas de pré-tratamento da biomassa.

Palavras chaves: *Colletotrichum graminicola*, β-xilosidase, halotolerância, termoestabilidade, sacarificação da hemicelulose, etanol lignocelulósico.

ABSTRACT

In order to ensure the economic viability of the production of second-generation ethanol, it is necessary the development of efficient technologies for the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. In addition, the large consumption of water by biorefineries has attracted great attention for the use of non-potable water resources, such as seawater. Therefore, enzymes tolerant to high salt concentrations and the by-products generated and/or accumulated in the biomass pretreatment steps are widely studied. In this context, the objective of this study was the purification and kinetic and biochemical characterization of a β-xylosidase produced by a strain of the mesophilic fungus *Colletotrichum graminicola*. The pure enzyme (Bxcg) showed a total carbohydrate content of 54% (w/w), isoelectric point of 4.2 and an apparent molecular weight of 130 kDa, which was reduced to 92 kDa after deglucosylation. The enzyme showed good tolerance to high salt concentrations and retained aproximately 90% of the control activity in the presence of 0.5 mol L^{-1} NaCl (NaCl concentration in seawater). The optimum reaction temperature and pH were 65 °C and 4.5, respectively, both in the absence and presence of 0.5 mol L^{-1} NaCl. In the presence of 2.5 mol L^{-1} NaCl, the optimum pH was altered to 5.0. Bxcg retained stable over a wide pH range (4.0 - 7.5) both in the absence and presence of salt. The enzyme showed excellent thermal stability and retained completely stable at 50 °C after 24 hours of incubation. The presence of high NaCl concentration (2.5 mol L^{-1}) resulted in an increase in the thermostability of the enzyme. The enzymatic activity was tolerant to Ca^{2+}, Sr^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, K^{+} and Na^{+}. In the absence of salt, Bxcg hydrolyzed *p*-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside (*p*NP-XIL) with V_{max} of 348.8 ± 11.5 U mg^{-1}, K_M of 0.52 ± 0.02 mmol L^{-1} and high catalytic efficiency (k_{cat}/K_M = 1432.7 ± 47.3 L $mmol^{-1}$ s^{-1}). In the presence of salt, the apparent affinity for the substrate was slightly lower and the hydrolysis occurred with smaller V_{max}, resulting in catalytic efficiency 1.5 fold lower, when compared to the salt. The enzyme showed bifunctional β-xylosidase/α-L-arabinofuranosidase activity. Bxcg hydrolyzed *p*-nitrophenyl-α-L-arabinopyranoside with apparent affinity 18-fold lower (K_M = 9.6 ± 0.5 mmol L^{-1}) than that estimated for *p*NP-XIL and substrate hydrolysis occurred with V_{max} of 148.4 ± 4.4 U mg^{-1} and catalytic efficiency of 33.1 ± 1.6 L $mmol^{-1}$ s^{-1}. The enzyme was strongly inhibited by xylose with K_I of 3.3 mmol L^{-1}. Bxcg was able to hydrolyze xylooligosaccharides from xylohexaose, including those with 4-O-methyl-glucuronic acid branch. Bxcg and a pure endo-xylanase from the same microorganism had a strong synergistic effect (3.1 fold) for hydrolysis of xylan beechwood. The enzyme was tolerant to the butanol, glycerol, toluene and acetone solvents, as well as the Triton X-100, Tween 80 and Tween 20 surfactants, whereas the 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ionic liquid strongly inhibited the enzymatic activity. In summary, Bxcg has attractive properties for application in saccharification processes of the lignocellulosic biomass, particularly under high salinity and/or in the presence of residues of biomass pretreatment steps.

Keywords: *Colletotrichum graminicola*, β-xylosidase, halotolerance, thermostability, saccharification of hemicellulose, lignocellulosic etanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização estrutural e os principais componentes da parede celular vegetal.....21

Figura 2. Estrutura química da molécula de xilana. 23

Figura 3. Enzimas envolvidas na degradação da xilana. 25

Figura 4. Mecanismo de retenção da configuração do carbono anomérico. 28

Figura 5. Perfil cromatográfico da atividade ß-xilosidásica de *C. graminicola* em coluna de CM-Celulose. 54

Figura 6. Perfil cromatográfico do pico obtido na cromatografia em CM-Celulose em coluna de DMAE-Fractogel..... 55

Figura 7. Perfil cromatográfico da amostra correspondente ao Pico D-III obtido da cromatografia em DMAE-Fractogel em coluna de Sephacryl S-200..... 56

Figura 8. Eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE) de Bxcg. 57

Figura 9. Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de Bxcg. 58

Figura 10. Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de Bxcg glicosilada e deglicosilada. 59

Figura 11. Eletroforese bidimensional de Bxcg. 61

Figura 12. Recobrimento das sequências de aminoácidos dos fragmentos de Bxcg com uma glicosil-hidrolase da família 3 de *Colletotrichum graminicola* M1.001. 62

Figura 13. Efeito de concentrações crescentes de NaCl sobre a atividade enzimática de Bxcg. 64

Figura 14. Estabilidade de Bxcg à temperatura ambiente em presença de concentrações crescentes de NaCl..... 65

Figura 15. Efeito da temperatura sobre a atividade ß-xilosidásica de Bxcg na ausência e presença de NaCl. 68

Figura 16. Efeito do pH sobre a atividade ß-xilosidásica de Bxcg na ausência e na presença de NaCl. 70

Figura 17. Estabilidade térmica de Bxcg em diferentes temperaturas na ausência e presença de NaCl. 73

Figura 18. Estabilidade térmica de Bxcg a 50 ºC em períodos longos de incubação.... 74

Figura 19. Curvas de inativação térmica de Bxcg na ausência e na presença de NaCl.....76

Figura 20. Gráfico de Arrhenius para a inativação térmica de Bxcg na ausência e na presença de NaCl. 77

Figura 21. Estabilidade ao pH de Bxcg na ausência e presença de NaCl. 79

Figura 22. Efeito de concentrações crescentes de *p*NP-XIL sobre a atividade de Bxcg.....84

Figura 23. Representação de Hanes-Wolf para determinação dos parâmetros cinéticos para hidrolise de *p*NP-α-L-arabinopiranosídeo por Bxcg. 87

Figura 24. Inibição da atividade de Bxcg sobre *p*NP-XIL por xilose. 92

Figura 25. Gráfico de Dixon para a inibição da hidrolítica de Bxcg sobre *p*NP-XIL por xilose..... 93

Figura 26. Efeito de diferentes solventes orgânicos, surfactantes e acetato de sódio sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg. 94

Figura 27. Efeito do líquido iônico [Emim][Ac] sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg. 96

Figura 28. Padrão de hidrólise de xilooligossacarídeos por ação de Bxcg na ausência e na presença de NaCl 99

Figura 29. Hidrólise de xilana *beechwood* por ação conjunta de Bxcg e Excg1 na ausência e na presença de NaCl 101

Figura 30. Hidrólise de xilana *beechwood* por ação conjunta de Exg1 e Bxcg na ausência e na presença de NaCl. 103

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Composição média estimada da água do mar 35

Tabela 2. Purificação de Bxcg 53

Tabela 3. Parâmetros termodinâmicos para a inativação térmica de Bxcg na ausência e presença de NaCl 788

Tabela 4. Especificidade de substrato de Bxcg 82

Tabela 5. Parâmetros cinéticos para a hidrólise de *p*NP-XIL por Bxcg na ausência e presença de NaCl 84

Tabela 6. Parâmetros cinéticos para hidrólise de *p*NP-XIL por outras β-xilosidases fúngicas..... 86

Tabela 7. Efeito de íons e outros efetores sobre a atividade de Bxcg 89

Tabela 8. Efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade de Bxcg 91

Tabela 9. Ação sinérgica de Bxcg e Excg1 na hidrólise de xilana *beechwood* 102

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Avicel: Celulose microcristalina

BSA: Soro albumina bovina

β-XDH: β-xilose desidrogenase

CAZy: *Carbohydrate-Active enzymes*

CCD: Cromatografia em camada delgada

CID: *Collision-induced dissociation*

CM: Carboximetil

CMC: Carboximetilcelulose

DMAE: Dimetilaminoetil

DNS: Ácido dinitrosalicílico

DTT: 1,4-Dithiothreitol

EDTA: Ácido etileno diamintetraacético

[Emim][Ac]: Acetato de 1-etil-3-metilimidazólio

FES: Fermentação em estado sólido

GH: Glicosil-hidrolases

HPLC: *High performance liquid chromatography*

LI: Líquido iônico

MALDI: *Matrix-assisted laser desorption/ionization*

MS: Espectrometria de massas

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

PDA: *Potato Dextrose Agar*

pI: Ponto isoelétrico

PNGase F: *Peptide N-Glycosidase F*

***p*NP-XIL:** *p*-nitrofenil-β-D-xilanopiranosídeo

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TCA: Ácido tricloroacético

TOF: *Time-of-flight*

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

XMR: Xilose mutarotase

X1: Xilose

X2: Xilobiose

X3: Xilotriose

X3-O-MeGlu: Xilotriose com ramificação de ácido 4-O-metil-glucorônico

X4: Xilotetraose

X5: Xilopentaose

X6: Xilohexaose

SUMÁRIO

1. Introdução **18**

2. Revisão bibliográfica **20**

2.1. Biomassa lignocelulósica 20

2.1.1. Celulose 21

2.1.2. Hemiceluloses 22

2.1.3. Lignina 23

2.2. Hidrólise enzimática da hemicelulose e o complexo xilanolítico 24

2.3. β-xilosidases 27

2.4. Pré tratamento da biomassa lignocelulósica 29

2.4.1. Pré-tratamento alcalino 30

2.4.2. Pré-tratamento com líquidos iônicos 31

2.4.3. Pré-tratamento *Organosolv* 32

2.4.4. O uso de surfactantes em diferentes métodos de pré-tratamentos 33

2.5. O consumo de água pelas biorrefinarias na produção do etanol 2G 344

2.6. Enzimas halofílicas e halotolerantes 35

2.7. Organismo de estudo: *Colletotrichum graminicola* 36

3. Objetivos 38

4. Material e métodos 39

4.1. Organismo de estudo 39

4.2. Manutenção da linhagem 39

4.3. Cultivo de *C. graminicola* em estado sólido 40

4.4. Obtenção do extrato bruto do cultivo de *C. graminicola* rico em ß-xilosidases 40

4.5. Ensaios enzimáticos 40

4.5.1. Determinação da atividade ß-xilosidásica 41

4.5.2. Atividade sobre outros substratos 41

4.6. Dosagens de proteína 43

4.7. Purificação de uma ß-xilosidase majoritária de *C. graminicola* 43

4.8. Análise eletroforética 44

4.9. Análise da sequência de aminoácidos de Bxcg por espectrometria de massas .. 44

4.10. Determinação da massa molecular de Bxcg 45

4.11. Determinação do ponto isoelétrico de Bxcg por eletroforese bidimensional 46

4.12. Dosagem de carboidratos totais 46

4.13. Deglicosilação de Bxcg 47

4.14. Caracterização bioquímica e cinética de Bxcg 47

4.14.1. Efeito de NaCl sobre a atividade e estabilidade de Bxcg 47

4.14.2. Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade ß-xilosidásica 48

4.14.3. Estabilidade térmica e ao pH de Bxcg 48

4.14.4. Determinação dos parâmetros termodinâmicos para a inativação térmica de Bxcg.....49

4.14.5. Efeito de sais e outros efetores sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg.....50

4.14.6. Efeito de carboidratos sobre a atividade βxilosidásica de Bxcg 50

4.14.7. Efeito de solventes orgânicos, acetato de sódio e acetato de 1-etil-3-metilimidazólio sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg..... 50

4.14.8. Determinação dos parâmetros cinéticos.....51

4.15. Hidrólise de xilooligossacarídeos por ação de Bxcg 51

4.16. Ação conjunta de Bxcg e Excg1 na hidrólise de xilana *beechwood* 522

5. Resultados e discussão 53

5.1. Purificação de uma ß-xilosidase majoritária de *C. graminicola* 53

5.2. Propriedades moleculares da ß-xilosidase purificada..... 57

5.2.1. Determinação da massa molecular aparente 57

5.2.2. Determinação do teor de carboidratos e da massa molecular aparente da enzima deglicosilada 59

5.2.3. Determinação do ponto isoelétrico de Bxcg 60

5.2.4. Análise de Bxcg por espectrometria de massas 61

5.3. Caracterização bioquímica e cinética de Bxcg 63

5.3.1. Efeito de concentrações crescentes de NaCl sobre a atividade e estabilidade de Bxcg.....63

5.3.2. Efeito da temperatura sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg na ausência e presença de NaCl 67

5.3.3. Efeito do pH sobre a atividade de Bxcg na ausência e presença de NaCl .. 69

5.3.4. Estabilidade térmica de Bxcg na ausência e presença de NaCl 72

5.3.5. Determinação de parâmetros termodinâmicos da inativação térmica de Bxcg.....75

5.3.6. Estabilidade ao pH de Bxcg na ausência e presença de NaCl 79

5.3.7. Especificidade de substrato de Bxcg..... 81

5.3.8. Determinação dos parâmetros cinéticos para a hidrólise de *p*NP-XIL por Bxcg na ausência e presença de NaCl..... 83

5.3.9. Determinação dos parâmetros cinéticos para a hidrólise de *p*NP-α-L-arabinopiranosídeo por Bxcg 87

5.3.10. Efeito de íons metálicos e outros efetores sobre a atividade de Bxcg 88

5.3.11. Efeito de carboidratos sobre a atividade de Bxcg 90

5.3.12. Efeito de concentrações crescentes de xilose sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg 91

5.3.13. Efeito de diferentes solventes orgânicos, surfactantes e acetato de sódio sobre a atividade ß-xilosidásica de Bxcg 93

5.3.14. Efeito do líquido iônico acetato de 1-etil-3-metilimidazólio sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg 96

5.4. Análise dos produtos de hidrólise de xilooligossacarídeos por Bxcg 98

5.5. Ação conjunta de Bxcg e Excg1 na hidrólise de xilana *beechwood* 100

6. Conclusões 105

7. Referências bibliográficas 107

1. Introdução

Atualmente há um grande empenho da comunidade científica no sentido de contribuir para o desenvolvimento de tecnologias que permitam o aproveitamento da biomassa lignocelulósica para a produção de diferentes produtos químicos. Dentre estes, destaca-se o etanol de segunda geração (2G) devido ao interesse de muitos países na substituição dos combustíveis fósseis, cada vez mais caros e escassos, por combustíveis renováveis e menos poluentes (ISIKGOR e BECER, 2015; SINDHU et al., 2016; ELGHARBAWY et al., 2016; CHEN e FU, 2016).

No Brasil, especificamente, o desenvolvimento de tecnologias para a produção de etanol 2G também tem despertado grande interesse devido à grande quantidade de resíduos agroindustriais gerados anualmente no país. O Brasil é o maior exportador e o segundo maior produtor mundial de etanol de primeira geração, obtido a partir da cana-de-açúcar, levando à geração anual de milhões de toneladas de bagaço e palha de cana (BHATIA et al., 2012; ZIMBARDI et al., 2013; MORALES, et al., 2015). Além disso, o aproveitamento desses resíduos para a produção de etanol 2G pode aumentar substancialmente a produtividade por hectare de cana plantada, diminuindo a competição entre as culturas de cana-de-açúcar e de alimentos pelo uso da terra (GOLDEMBERG et al., 2008; LIGUORI et al., 2013). Dessa forma, dado seu baixo custo e abundância, estes resíduos são considerados potenciais matérias primas para a produção de etanol 2G, com a vantagem adicional de que se encontram próximos às usinas, evitando o custo com transporte (ZIMBARDI et al., 2013). Além do bagaço e palha de cana, há outros resíduos agroindústrias abundantes no Brasil que também são potenciais matérias primas baratas para a produção de etanol 2G, tais como casca de arroz, bagaço de laranja, palhas de milho, arroz e soja, etc (LIGUORI et al., 2013). Assim, o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de etanol 2G pode trazer benefícios ambientais e econômicos para o país (BHATIA et al., 2012; COLABARDINI et al., 2014).

Para garantir a viabilidade econômica da produção de etanol 2G é necessário o desenvolvimento de tecnologias eficientes e baratas para a hidrólise de celulose e hemicelulose (em especial a xilana), presentes nos materiais lignocelulósicos. Atualmente, a hidrólise enzimática da biomassa é considerada o método mais promissor e ambientalmente sustentável. Entretanto, devido ao fato de celulose, hemicelulose e

lignina constituírem uma matriz tridimensional complexa nas paredes das células vegetais, os materiais lignocelulósicos são altamente resistente à hidrólise. Assim, devido à recalcitrância da matéria-prima, é necessário realizar uma etapa inicial de pré-tratamento da biomassa, a fim de aumentar a eficiência da hidrólise enzimática.

Nos últimos anos, vários métodos de pré-tratamento foram desenvolvidos, incluindo processos químicos, biológicos, físicos, mecânicos e físico-químicos ou uma combinação destes (ISIKGOR e BECER, 2015; MAURYA et al., 2015; CHEN e FU, 2016). No entanto, diferentes subprodutos ou compostos podem ser formados e/ou acumulados durante estes processos, causando, posteriormente, inibição das enzimas hidrolíticas (JÖNSSON e MARTÍN, 2016; ZHANG et al., 2016). Após o pré-tratamento alcalino, por exemplo, a neutralização da biomassa pré-tratada gera um acúmulo de sais, que podem causar inibição enzimática (GARCÍA-TORREIRO et al., 2016; JÖNSSON e MARTÍN, 2016). No processo *organosolv* e no pré-tratamento com líquidos iônicos (LIs), os níveis residuais dos solventes orgânicos e dos LIs utilizados também podem inibir fortemente a atividade das enzimas hidrolíticas (XU et al., 2015; MARUYA et al., 2015; JÖNSSON e MARTIN, de 2016; ZHANG et al., 2016). Consequentemente, é necessária a realização de etapas de lavagem da biomassa pré-tratada, levando a um grande consumo de água, encarecendo e podendo até mesmo inviabilizar o processo.

Nos últimos anos, acredita-se que uma alternativa viável ao uso de água doce e potável nas biorrefinarias seria o emprego de recursos hídricos não potáveis, como a água do mar, nas etapas de pré-tratamento, lavagem e sacarificação da biomassa (de MARIA, 2013; REN et al., 2016). Em função disso, atualmente é grande o interesse na identificação de enzimas lignocelulolíticas tolerantes a altas concentrações salinas, bem como aos subprodutos gerados e/ou acumulados nas etapas de pré-tratamento da biomassa, reduzindo o volume de água empregado em etapas de lavagem e/ou permitindo a substituição da água doce pela água do mar.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Biomassa lignocelulósica

Os materiais lignocelulósicos são as fontes de carbono renováveis mais abundantes na natureza, e incluem as madeiras de angiospermas e gimnospermas, além de resíduos agroindustriais, tais como bagaço e palha de cana, milho, arroz, etc. (WAHLSTRÖM e SUURNÄKKI, 2015; REDDY, 2015; ELGHARBAWY et al., 2016).

A biomassa lignocelulósica é constituída principalmente pelos polímeros celulose, hemicelulose e lignina (**Fig. 1**), além de pequenas quantidades de pectinas, ceras e extrativos (WANG et al., 2012; ZHAO, X. et al., 2012; da COSTA LOPES et al., 2013; ISIKGOR e BECER, 2015; KIM, J. et al., 2016). Embora a proporção destes polímeros na parede celular das plantas varie em função da espécie vegetal, do estágio de crescimento, do tecido vegetal, da idade de colheita, etc., os materiais lignocelulósicos contém, usualmente cerca de 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose e 10-25% de lignina (ZHAO, X. et al., 2012; BEHERA et al., 2014; MAURYA et al., 2015; SAINI et al., 2015; ISIKGOR e BECER, 2015). Devido à associação íntima destes polímeros na parede celular vegetal, os materiais lignocelulósicos apresentam alta resistência ao ataque químico e biológico, tornando difícil a sua despolimerização (WANG et al., 2012; da COSTA LOPES et al., 2013; KIM, J. et al., 2016).

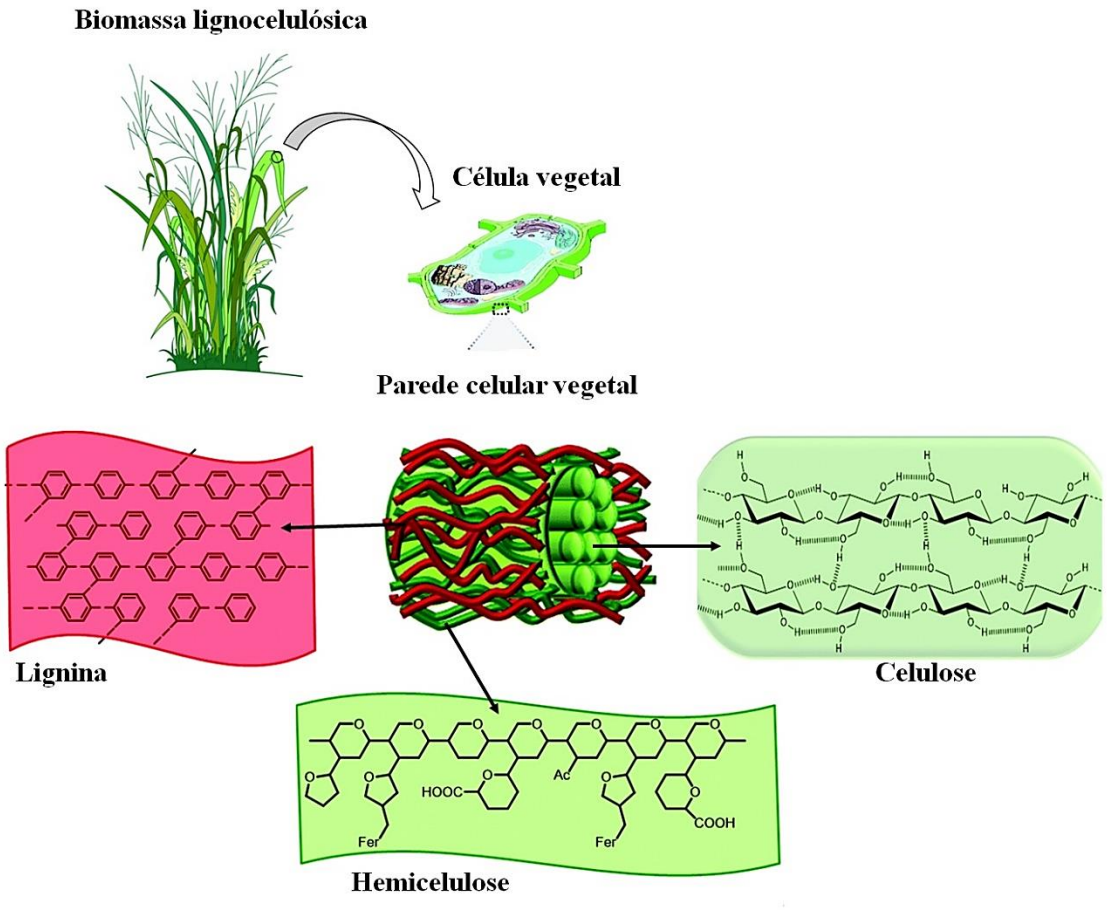


Figura 1. Organização estrutural e os principais componentes da parede celular vegetal.

Adaptado de Isikgor e Becer, 2015.

2.1.1. Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo não ramificado de moléculas de D-glicose unidas por ligações O-glicosídicas do tipo β 1-4 (ZHAO, X et al., 2012; WANG et al., 2012; WAHLSTRÖM e SUURNÄKKI, 2015). Devido à configuração β das ligações glicosídicas, a celulose apresenta uma conformação estendida, originando cadeias longas e retas. O caráter linear nas cadeias de celulose permite que cadeias adjacentes se posicionem próximas umas das outras dando origem a fibras supramoleculares cristalinas de alta resistência tensional (microfibrilas), apresentando poucas regiões amorfas (JORDAN et al., 2012; ZHAO, X. et al., 2012; KIRIKYALI e CONNERTON, 2015). As

microfibrilas, por sua vez, originam as fibrilas, que são embebidas por uma matriz amorfa composta por polissacarídeos não celulósicos (hemicelulose, lignina e pectina) (ZHAO, X. et al., 2012; KIRIKYALI e CONNERTON, 2015). Na parede celular vegetal, as cadeias de celulose são estabilizadas por ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, que ajudam a manter e reforçar sua conformação linear e plana (da COSTA LOPES et al., 2013; SAINI et al., 2014).

2.1.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses são o segundo maior componente da biomassa lignocelulósica e se associa à celulose principalmente por ligações de hidrogênio, além de formar ligações covalentes com a lignina (JORDAN et al., 2012; ISIKGOR e BECER, 2015; SAINI et al., 2015; KIRIKYALI e CONNERTON, 2015). As hemiceluloses são heteropolissacarídeos, geralmente ramificados, constituídos por pentoses (D-xilose e L-arabinose) e/ou hexoses (D-manose, D-glicose e D-galactose) unidas por ligações O-glicosídicas do tipo β 1-4. São classificadas em xilanas, arabinoxilanas, xiloglucanas, glucomananas, galactoglucomananas, arabinogalactanas, de acordo com o açúcar presente em maior quantidade na cadeia principal da molécula (POLIZELI et al., 2005; GÍRIO et al., 2010; ZHAO, X. et al., 2012; ISIKGOR E BECER, 2015; BOSETTO et al., 2016).

Dentre estes diferentes tipos, a xilana é a hemicelulose mais abundante na natureza, representando o polissacarídeo predominante em muitos resíduos agroindustriais, depois da celulose (GÍRIO et al., 2010; KNOB et al., 2010; JORDAN et al., 2012; CHOENGPANYA et al., 2015). A estrutura química da xilana pode variar desde um homopolímero linear até um heteropolissacarídeo altamente ramificado. Sua cadeia principal é constituída por resíduos de D-xilose unidos por ligações O-glicosídicas do tipo β 1-4 (**Fig. 2**). As ramificações podem conter resíduos de L-arabinose e ácido 4-O-metil-glucurônico unidos aos carbonos C2 e/ou C3 dos resíduos de xilose (GÍRIO et al., 2010; LAGAERT et al., 2014; CHOENGPANYA et al., 2015; KIRIKYALI e CONNERTON, 2015). Os grupos hidroxila dos resíduos de xilose também podem ser parcialmente substituídos por grupos acetil. Além disso, os resíduos de arabinose podem ser esterificados a resíduos de ácido ferúlico, que podem formar ligações cruzadas entre

cadeias de xilana adjacentes e com a lignina (DODD e CANN, 2009; LAGAERT et al., 2014; CHOENGPANYA et al., 2015). As diferentes ramificações são responsáveis por determinar em grande parte as propriedades da xilana, tais como solubilidade, conformação e reatividade. No entanto, a proporção das ramificações na cadeia principal das xilanas varia dependendo da espécie vegetal, tecido celular e estágio de desenvolvimento da planta (POLIZELI et al., 2005; JORDAN et al., 2012; IRIKYALI e CONNERTON, 2015).

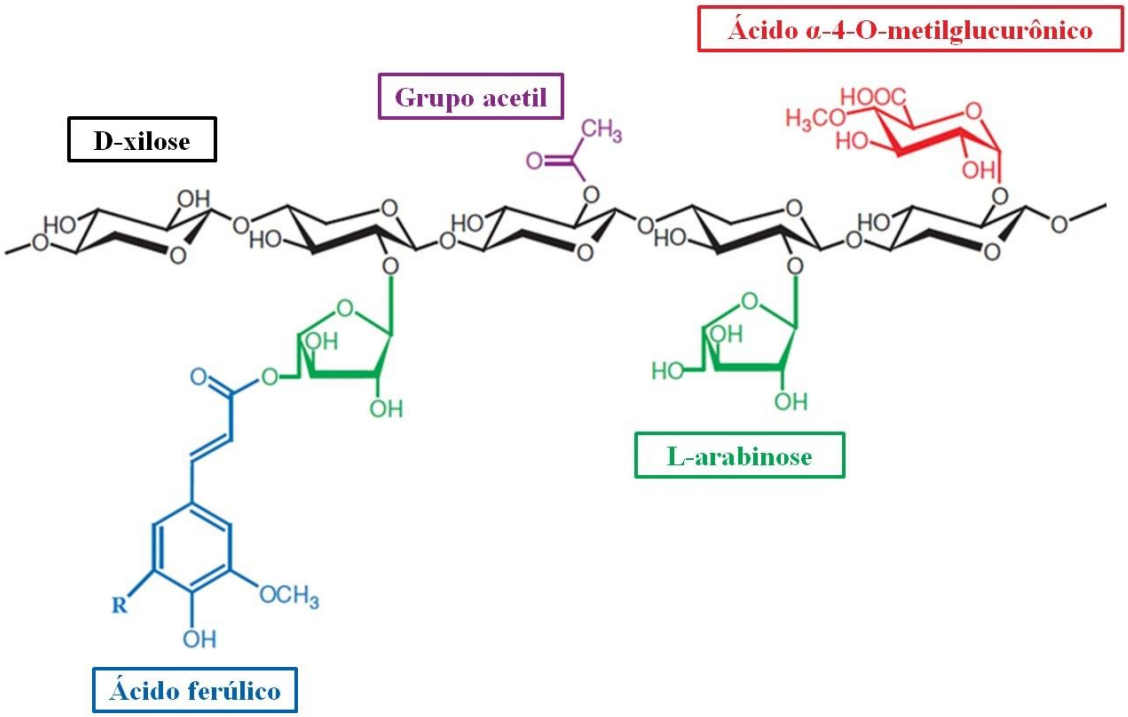


Figura 2. Estrutura química da molécula de xilana.
Adaptado de DODD e CANN, 2009.

2.1.3. Lignina

A lignina é um heteropolímero aromático constituído por unidades fenilpropano sintetizados a partir de três álcoois *p*-hidróxi-cinamílicos precursores: *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (JORDAN et al., 2012; ZHAO, X. et al., 2012; ISIKGOR e

BECER, 2015; SAINI et al., 2015). A lignina é ligada covalentemente aos grupos laterais das hemiceluloses, formando uma matriz complexa que envolve as fibras de celulose (SAINI et al., 2015). A sua estrutura macromolecular aromática confere rigidez à parede celular vegetal, além de proteção contra o ataque de microrganismos (ISIKGOR e BECER, 2015; KIRIKYALI e CONNERTON, 2015).

2.2. Hidrólise enzimática da hemicelulose e o complexo xilanolítico

A hidrólise dos materiais lignocelulósicos pode ser realizada por métodos químicos ou enzimáticos. No entanto, a hidrólise enzimática é considerada atualmente a estratégia mais promissora e ambientalmente sustentável, uma vez que apresenta diversas vantagens, tais como a não geração de efluentes tóxicos e menor formação de subprodutos inibitórios à fermentação (WAHLSTRÖM e SUURNÄKKI, 2015).

Embora a pesquisa sobre a sacarificação da biomassa tenha sido inicialmente focada apenas na hidrólise da celulose, atualmente acredita-se que a viabilidade econômica de um processo de produção de etanol 2G depende da hidrólise eficiente tanto da celulose como da hemicelulose, bem como da fermentação das hexoses e pentoses liberadas. Deste modo, é crescente o interesse no desenvolvimento de processos enzimáticos eficientes para a sacarificação da hemicelulose.

A variedade de ligações e unidades monoméricas, além da presença de diferentes ramificações, contribuem para a complexidade estrutural das hemiceluloses. Deste modo, a hidrólise enzimática da xilana requer um sistema enzimático complexo, chamado de sistema ou complexo xilanolítico (**Fig. 3**), e envolve a ação de várias hidrolases atuando sinergicamente sobre a cadeia principal e as cadeias laterais da molécula (KNOB et al., 2010; KIRIKYALI e CONNERTON, 2015).

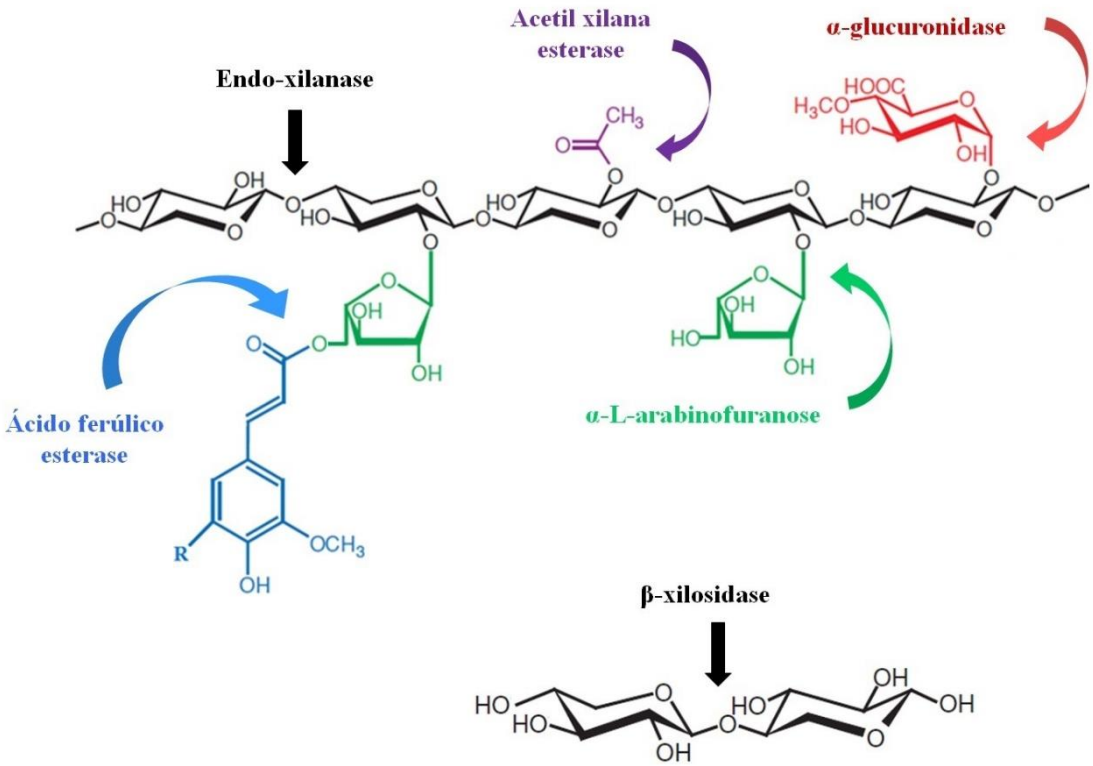


Figura 3. Enzimas envolvidas na degradação da xilana.
Adaptado de DODD e CANN, 2009

As principais enzimas do complexo xilanolítico são a endo β-1,4-xilanase (β-1,4-xilana xilohidrolase, EC 3.2.1.8) e a β-D-xilosidase (β-D-xilosídeo xilohidrolase, EC 3.2.1.37). As xilanases clivam as ligações glicosídicas internas da cadeia principal da xilana, diminuindo o grau de polimerização, liberando xilooligossacarídeos, xilobiose e xilose (KNOB et al., 2010; LAGAERT et al., 2014; KIRIKYALI e CONNERTON, 2015; BOSETTO et al., 2016). A hidrólise do polímero não ocorre ao acaso e depende da natureza do substrato, como por exemplo, do comprimento da cadeia principal, do grau de ramificação e do número de substituintes (POLIZELI et al., 2005). As β-xilosidases, por sua vez, atuam sobre xilobiose e xilooligossacarídeos curtos, liberando xilose (KNOB et al., 2010; LAGAERT et al., 2014; CHOENGPANYA et al., 2015; KIRIKYALI e CONNERTON, 2015; BOSETTO et al., 2016). A maioria das β-xilosidases não hidrolisa xilana, sendo a xilobiose seu melhor substrato. Elas atuam sobre os xilooligossacarídeos a partir da extremidade não redutora e sua afinidade pelos xilooligossacarídeos usualmente é inversamente proporcional ao seu grau de polimerização (POLIZELI et al., 2005; KNOB et al., 2010).

Outras enzimas, chamadas de enzimas acessórias, catalisam a remoção dos grupos laterais e atuam sinergicamente com as xilanases e β-xilosidases para a hidrólise completa da xilana. Este grupo de enzimas acessórias inclui as enzimas: α–glucuronidase (EC 3.2.1.139), que remove as ramificações de ácido 4-O-metil-glucurônico; acetil xilana esterase (EC 3.1.1.6), que libera o grupo acetil; α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), que remove os resíduos de arabinose; ácido ferúlico esterase (EC 3.1.1.-) e ácido *p*-coumárico esterase (EC 3.1.1.), que clivam, respectivamente, as ligações éster entre as cadeias laterais de arabinose e do ácido ferúlico, e entre arabinose e ácido *p*-coumárico (KNOB et al., 2010; JORDAN et al., 2012; HUY et al., 2013; LAGAERT et al., 2014; KIRIKYALI e CONNERTON, 2015; BOSETTO et al., 2016).

As ß-xilosidases desempenham um papel importante na hidrólise da xilana, pois além de catalisarem a liberação de xilose, também hidrolisam xilobiose e xilooligossacarídeos curtos, compostos que inibem a maioria das endo-xilanases e limitam a hidrólise eficiente da xilana (KNOB et al., 2010; MICHELIN et al., 2012; YANG et al., 2014; HUY et al., 2015). Além disso, estudos mais recentes mostraram que xilana e xilooligossacarídeos também são inibidores potentes das celulases, o que prejudica a hidrólise da celulose (QING et al., 2010; QING e WYMAN, 2011; JORDAN et al., 2012; HU et al., 2013). De maneira similar, as enzimas acessórias também possuem um papel importante na sacarificação da xilana, uma vez que a retirada de grupos substituintes da molécula facilita a ação de endo-xilanases sobre a cadeia principal (KNOB et al., 2010). Dessa forma, o efeito sinérgico entre as enzimas xilanolíticas é essencial para uma hidrólise completa e eficiente da xilana. Um efeito sinérgico é observado quando a quantidade de produto formado por duas ou mais enzimas que atuam em conjunto é superior à soma aritmética do produto formado pela ação de cada uma das enzimas individuais (KNOB et al., 2010). Nesse contexto, vários autores relataram um forte efeito sinérgico para a hidrólise de xilanas de diferentes fontes utilizando misturas de endo-xilanases, β-xilosidases e α-L-arabinofuranosidase (SØRENSEN et al., 2003; KNOB et al., 2010; YANG et al., 2014).

2.3. β-xilosidases

De acordo com o sistema de classificação das glicosil hidrolases (GH), disponível no banco de dados CAZy (*Carbohydrate-Active enzymes*), as β-xilosidases pertencem às famílias GH 1, 3, 5, 30, 39, 43, 51, 52, 54, 116 e 120. No entanto, a maioria das β-xilosidases fúngicas descritas é encontrada na família GH 3 (KNOB et al., 2010; YANG et al., 2014; LAGAERT et al., 2014; CHOENGPANYA et al., 2015; KIRIKYALI e CONNERTON, 2015; BOSETTO et al., 2016).

As β-xilosidases, assim como todas as glicosil hidrolases, catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas por meio de dois mecanismos principais: inversão ou retenção da configuração do carbono anomérico (KNOB et al., 2010; LAGAERT et al., 2014). Em ambos os mecanismos, a hidrólise envolve dois resíduos catalíticos (ácidos carboxílicos) que são conservados dentro de cada família: um deles atua como nucleófilo e o outro como um catalisador ácido/base. Com exceção das β-xilosidases da família GH 43, todas as outras β-xilosidases conhecidas atuam pelo mecanismo de retenção (KNOB et al., 2010; LAGAERT et al., 2014; HUY et al., 2015; BOSETTO et al., 2016).

A hidrólise com retenção da configuração do carbono anomérico ocorre em duas etapas, envolvendo a formação de um intermediário glicosil-enzima (**Fig. 4**) (KNOB et al., 2010; LAGAERT et al., 2014; KIRIKYALI e CONNERTON, 2015; CECCHINI et al., 2015). O primeiro passo da reação é chamado de glicosilação. Nesta etapa, um dos resíduos catalíticos atua como ácido, protonando o oxigênio glicosídico. Concomitantemente, o segundo aminoácido catalítico, que atua como nucleófilo, ataca o centro anomérico do substrato, levando à clivagem da ligação e formação do intermediário covalente glicosil-enzima. No segundo passo, chamado de deglicosilação, o primeiro aminoácido, agora atuando como uma base, atrai um próton de uma molécula de água, que ataca o centro anomérico do substrato, liberando o produto final e regenerando a enzima livre (KNOB et al., 2010; CECCHINI et al., 2015).

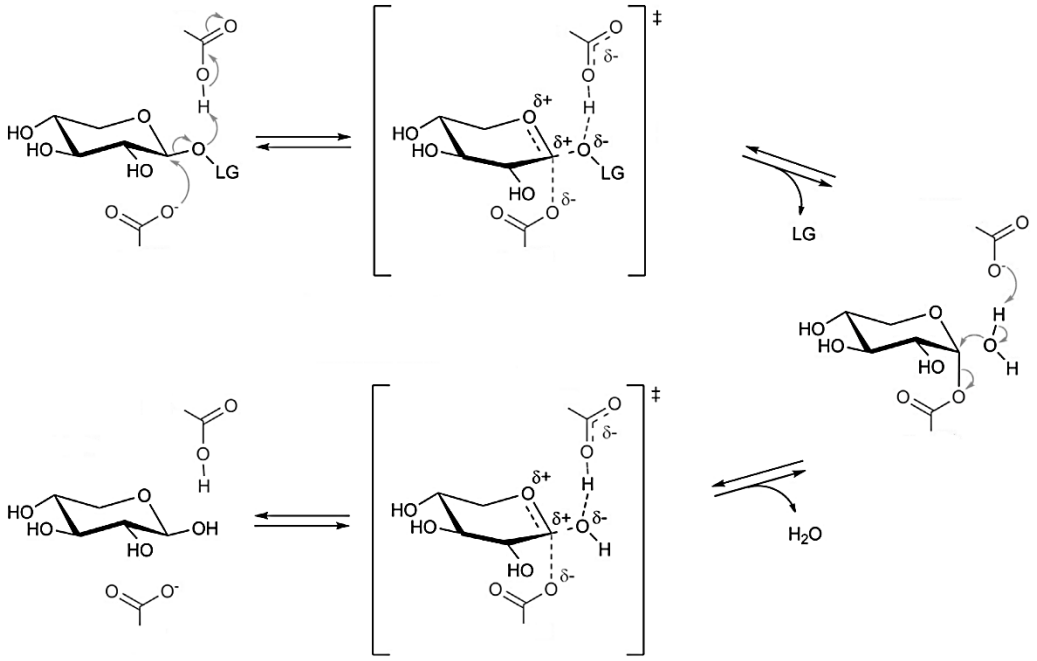


Figura 4. Mecanismo de retenção da configuração do carbono anomérico.
Adaptado de Cecchini et al., 2015.

Curiosamente, algumas β-xilosidases exibem atividade bifuncional de β-xilosidase/α-L-arabinofuranosidase (LAGAERT et al., 2014; KIRIKYALI e CONNERTON, 2015). Acredita-se que essa bifuncionalidade deve-se principalmente à similaridade espacial entre os resíduos de D-xilopiranose e L-arabinofuranose, de tal forma que as ligações glicosídicas e grupos hidroxila destes resíduos podem ser sobrepostos para ocupar posições semelhantes no sítio ativo da enzima (MAI et al., 2000; JORDAN e LI, 2007; HUY et al., 2013; LEE, R. et al., 2003). Assim como as β-xilosidases, as α-L-arabinofuranosidases são enzimas importantes na sacarificação da biomassa lignocelulósica, uma vez que elas são responsáveis por remover as ramificações de resíduos de L-arabinose presentes nas xilanas, facilitando assim a ação das endo-xilanases sobre a cadeia principal. Assim, um efeito sinérgico entre essas enzimas é fundamental para uma hidrólise completa e eficiente da molécula de xilana, e as enzimas bifuncionais apresentam grande potencial para a hidrólises de xilanas substituídas (JORDAN e LI 2007; ZHOU et al., 2012; HUY et al., 2013; LAGAERT et al., 2014).

O interesse nas enzimas xilanolíticas tem aumentado consideravelmente nos últimos anos e, por serem enzimas chaves do complexo xilanolítico, as β-xilosidases apresentam bom potencial de aplicação em processos biotecnológicos. Assim, as

β-xilosidases vem sendo empregadas com sucesso nos setores alimentício e de ração animal, papel e celulose, etc. Além disso, as β-xilosidases são associadas a outras enzimas em coquetéis enzimáticos para a sacarificação de materiais lignocelulósicos, visando à produção de etanol 2G (KNOB et al., 2010; KIRIKYALI e CONNERTON, 2015; BOSETTO et al., 2016).

2.4. Pré tratamento da biomassa lignocelulósica

Como citado anteriormente, devido à associação íntima entre os componentes poliméricos, a biomassa lignocelulósica apresenta um elevado grau de recalcitrância. Na parede celular vegetal a lignina atua como uma barreira física, protegendo a celulose e a hemicelulose da degradação e dificultando a ação efetiva das enzimas hidrolíticas sobre estes polissacarídeos (KIM, H. et al., 2016). Assim, na sua forma natural, os materiais lignocelulósicos são pouco reativos e altamente resistentes à hidrólise, sendo necessária a introdução de uma etapa de pré-tratamento anterior à hidrolise enzimática. De uma maneira geral, o pré-tratamento tem a finalidade de remover ou diminuir o conteúdo de lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a área superficial da biomassa, proporcionando uma melhor acessibilidade da celulose e da hemicelulose a ação das enzimas, de modo que a hidrólise enzimática ocorra com maior eficiência e rendimento (ENGEL et al., 2012; ISIKGOR e BECER, 2015; SAINI et al., 2015; XU et al., 2015; CHANG et al., 2016; KIM, J. et al., 2016; ZHANG et al., 2016; CHEN e FU, 2016).

Diversos métodos de pré-tratamento foram propostos e desenvolvidos nos últimos anos, incluindo processos químicos, biológicos, físicos, mecânicos e físico-químicos ou uma combinação destes (ISIKGOR e BECER, 2015; MAURYA et al., 2015; CHEN e FU, 2016). No entanto, a escolha do método e das condições do pré-tratamento dependem das características das matérias-primas e dos produtos finais desejados (ZHANG et al., 2016).

Idealmente, um pré-tratamento eficaz deve aumentar a eficiência da hidrólise enzimática e simultaneamente evitar a formação de compostos inibitórios (MAURYA et al., 2015; KIM, J. et al., 2016). A maioria dos compostos inibitórios são formados quando a hemicelulose e/ou a lignina são degradadas (JÖNSSON e MARTÍN, 2016; ZHANG et

al., 2016). Dependendo do processo e das condições utilizadas, as pentoses da hemicelulose podem ser degradadas, produzindo ácido acético e furfural. Além disso, também podem ser produzidos compostos fenólicos derivados da degradação da lignina. Todos estes compostos podem inibir os processos de fermentação posteriores, levando a baixos rendimentos na produção de etanol. Dessa forma, é necessário realizar uma etapa de desintoxicação anterior à fermentação, para a retirada dos compostos inibitórios, o que aumenta o custo do processo (GÍRIO et al., 2010; BEHERA et al., 2014; RAJ et al., 2016; JÖNSSON e MARTIN, 2016).

Considerando a hidrólise enzimática eficiente dos materiais lignocelulósicos para a produção de etanol 2G, os tipos de pré-tratamento mais interessantes são aqueles que removem essencialmente a lignina, preservando tanto a celulose quanto a hemicelulose. Nesse contexto, os processos mais apropriados seriam os alcalinos, os *organosolv* e aqueles que empregam LIs.

2.4.1. Pré-tratamento alcalino

No pré-tratamento alcalino são utilizados reagentes alcalinos, tais como hidróxido de sódio, amônio, cálcio e potássio, e o processo é conduzido em condições relativamente suaves (KIM, J. et al., 2016). O pré-tratamento alcalino é utilizado principalmente para a remoção da lignina. Além disso, os reagentes também promovem a remoção dos grupos acetil e das ramificações de ácidos urônicos presentes na hemicelulose, aumentando o acesso das enzimas hidrolíticas aos polímeros de celulose e hemicelulose (MAURYA et al., 2015; KIM, J. et al., 2016; JONSSON e MARTIN, 2016). Entretanto, dependendo das condições utilizadas, a celulose e a hemicelulose podem ser degradadas e removidas parcialmente. Dessa forma, as condições do processo devem ser criteriosamente ajustadas para minimizar a hidrólise dos polissacarídeos.

Após o pré-tratamento alcalino é necessário neutralizar a biomassa, o que leva ao acúmulo de sais que, em concentrações elevadas, podem inibir a ação das enzimas hidrolíticas (GARCÍA-TORREIRO et al., 2016). Além disso, a ação dos reagentes alcalinos sobre as ramificações das hemiceluloses leva à formação de ácido acético, também um potencial inibidor da ação enzimática (JÖNSSON e MARTÍN, 2016). Assim, é necessário realizar etapas de lavagem da biomassa pré-tratada para a retirada de sais

e/ou compostos inibitórios, encarecendo o custo do processo (GARCÍA-TORREIRO et al., 2016).

2.4.2. Pré-tratamento com líquidos iônicos

O pré-tratamento empregando LIs tem recebido grande atenção nos últimos anos devido a capacidade destes compostos em dissolver os componentes dos materiais lignocelulósicos. Os LIs são sais com ponto de fusão menor que 100 ºC e geralmente consistem de um cátion orgânico volumoso e um ânion inorgânico (REDDY et al., 2015; WAHLSTRÖM e SUURNÄKKI, 2015). São utilizados no pré-tratamento da biomassa principalmente para remover a lignina e diminuir a cristalinidade da celulose. Após a dissolução, a celulose e a hemicelulose podem ser recuperadas por precipitação pela adição de um antissolvente, geralmente água, etanol ou acetona (GUPTA e JIANG, 2015; PORTILLO e SAADEDDIN, 2015). No entanto, é necessário otimizar as condições do processo de modo a minimizar a extração da fração hemicelulósica.

Geralmente, os LIs empregados no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica apresentam um cátion imidazólio e ânions cloreto, acetato ou fosfatos (WAHLSTRÖM e SUURNÄKKI, 2015; REDDY et al., 2015). Vários tipos de LIs têm sido sintetizados e testados visando à dissolução eficiente da lignocelulose, incluindo cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio [Bmim][Cl], acetato de 1-etil-3-metilimidazólio [Emim][Ac], cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio [Emim][Cl], cloreto de 1-alil-3-metilimidazólio [Amim][Cl], entre outros (BEHERA et al., 2014; WAHLSTRÖM e SUURNÄKKI, 2015; REDDY et al., 2015; REN et al., 2016). Em particular, o LI [Emim][Ac] é atualmente um dos mais utilizados para o pré-tratamento eficiente de diferentes materiais lignocelulósicos (da COSTA LOPES et al., 2013; CHAWACHART et al., 2014; JIA et al., 2015; REDDY et al., 2015).

A dissolução da lignocelulose por LIs envolve a ruptura das ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares da celulose, diminuindo a sua cristalinidade (BEHERA et al., 2014; KIM, H. et al., 2016). Um dos principais fatores responsáveis pela dissolução é a natureza do ânion do LI, de modo que ânions com alta capacidade de formar ligações de hidrogênio interagem melhor com os grupos hidroxila da celulose e possuem, portanto, uma capacidade superior para dissolver a lignocelulose

(WU et al., 2011; BADGUJAR e BHANAGE, 2015; WAHLSTRÖM e SUURNÄKKI, 2015). O cátion imidazólio também parece influenciar a dissolução, interagindo com a porção hidrofóbica da celulose. Porém, o seu mecanismo de ação ainda não é completamente entendido (GUPTA e JIANG, 2015).

A despeito das possíveis vantagens da sua utilização, níveis residuais de LIs presentes nos materiais pré-tratados podem inibir a atividade das enzimas hidrolíticas e dos microrganismos fermentativos (MARUYA et al., 2015; XU et al., 2015; WAHLSTRÖM e SUURNÄKKI, 2015; JÖNSSON e MARTIN, de 2016). Acredita-se que a inibição enzímatica possa estar relacionada à alta capacidade do ânion do LI em formar ligações de hidrogênio, o qual pode interagir fortemente com as enzimas, levando a alterações na sua conformação nativa (NAUSHAD et al., 2012; PORTILLO e SAADEDDIN, 2015; ZHAO, H. 2016). Além disso, outros fatores como viscosidade, polaridade e efeitos do cátion podem contribuir para a inibição enzimática por LIs (NAUSHAD et al., 2012; ZHAO, H. 2016). Assim, é essencial identificar enzimas lignocelulolíticas que sejam tolerantes a níveis residuais (concentração entre 0,2 – 5 % m/v) de LI na biomassa pré-tratada (LI, H. et al., 2013; CHAWACHART et al., 2014; XU et al, 2015).

2.4.3. Pré-tratamento *Organosolv*

No processo *organosolv* são utilizados solventes orgânicos para extrair a lignina da biomassa lignocelulósica. Vários solventes orgânicos tem sido empregados no pré-tratamento de diferentes biomassas, incluindo etanol, metanol, acetona, etileno glicol e glicerol, entre outros (ZHAO, X. et al., 2009; MAURYA et al., 2015; SUN et al., 2016). Dentre estes, o etanol é o solvente mais utilizado devido ao seu baixo ponto de ebulição, baixa toxicidade, miscibilidade completa com água e facilidade de recuperação (ALVIRA et al., de 2010; SUN et al., 2016; ZHANG et al., 2016). O processo *organosolv* utilizando álcoois promove a clivagem das ligações internas da lignina, bem como a hidrólise das ligações entre a lignina e as ramificações da hemicelulose (ZHANG et al., 2016). Entretanto, dependendo das condições do processo pode ocorrer também a hidrólise das ligações glicosídicas da hemicelulose e, em menor extensão, da celulose (ZHANG et al.,

2016). Deste modo, é importante otimizar as condições do processo para maximizar a remoção da lignina e minimizar a hidrólise dos polissacarídeos.

Após o pré-tratamento, a biomassa pode conter níveis residuais dos solventes orgânicos empregados, que podem inibir fortemente a atividade das enzimas hidrolíticas. Acredita-se que a inibição das enzimas por solventes orgânicos esteja relacionada à polaridade do solvente empregado, uma vez que solventes hidrofílicos possuem maior capacidade de retirar as moléculas de água essenciais para a hidratação da superfície das enzimas, causando sua inativação (SERDAKOWSKI e DORDICK, 2008; DOUKYU e OGINO, 2010; KARAN et al., 2012). Deste modo, etapas de lavagem da biomassa pré-tratada também são requeridas, encarecendo o processo.

2.4.4. O uso de surfactantes em diferentes métodos de pré-tratamentos

Como já citado, a lignina é um dos principais obstáculos para a hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos por impedir a ação efetiva das enzimas hidrolíticas sobre a celulose e a hemicelulose. Além disso, os pré-tratamentos alcalinos e com LIs liberam lignina em solução durante o processo, formando compostos hidrofóbicos que precipitam na superfície da biomassa e impedem a disponibilidade da celulose e da hemicelulose para a hidrólise enzimática (PANDEY e NEGI, 2015; MESQUITA et al., 2015; CHANG et al., 2016; LI, K. et al., 2016).

Neste contexto, vários estudos indicam que a adição de surfactantes durante o pré-tratamento pode reduzir a quantidade de lignina remanescente na biomassa pré-tratada, acelerando a hidrólise e reduzindo a carga enzimática requerida para o processo. Os surfactantes tendem a extrair os compostos hidrofóbicos por meio da formação de emulsões, impedindo a sua precipitação sobre superfície da biomassa (MESQUITA et al., 2015; PANDEY e NEGI, 2015; LI, K. et al., 2016; CHANG et al., 2016). Os surfactantes não-iônicos, tais como Tween 20 e Tween 80, são considerados como os aditivos mais eficientes para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos (MESQUITA et al., 2015). Dessa forma, é importante que as enzimas hidrolíticas sejam tolerantes aos surfactantes utilizados nestes processos.

2.5. O consumo de água pelas biorrefinarias na produção do etanol 2G

Um dos desafios à produção de etanol 2G em larga escala é o elevado consumo de água pelas biorrefinarias: cerca de 1,9 – 5,9 m^3 de água são necessários para a produção de 1 m^3 de biocombustíveis (FANG et al., 2015; REN et al., 2016). Assim, devido aos problemas de escassez de água doce em alguns países, especialmente em regiões áridas, a operação das biorrefinarias pode tornar-se difícil ou até mesmo inviável. Um outro fator que contribui grandemente para elevar o consumo de água nas biorrefinarias é a necessidade das etapas de lavagem da biomassa pré-tratada, a fim de eliminar os resíduos e subprodutos gerados e/ou acumulados durante o pré-tratamento e que podem causar efeitos inibitórios sobre a hidrólise enzimática, bem como sobre a fermentação (REN et al., 2016). Nesse contexto, a utilização da água do mar como uma alternativa à água doce e potável parece uma opção promissora para as biorrefinarias localizadas em regiões costeiras e/ou semi-áridas (FANG et al., 2015; REN et al., 2016).

Recentemente, o uso de água do mar tem atraído grande interesse, tanto na etapa de sacarificação quanto nas etapas de pré-tratamento e lavagem da biomassa (de MARIA, 2013; REN et al., 2016). No entanto, ao se utilizar a água do mar, a grande quantidade de sal presente pode afetar negativamente a atividade das enzimas hidrolíticas (de MARIA, 2013; FANG et al., 2015; REN et al., 2016). Além da concentração de sais, outro fator importante no que diz respeito à inativação enzimática é a natureza dos íons presentes em solução, e embora a concentração salina da água do mar varie de acordo com a localização geográfica, a sua composição é bastante conhecida (**Tabela 1**). De uma maneira geral, o efeito de um íon sobre a estabilidade das enzimas segue a série de Hofmeister e a maioria dos íons que estão presentes na água do mar, tais como Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Br^- e Cl^-, podem exercer efeitos desestabilizantes sobre as enzimas, afetando negativamente a hidrólise enzimática da biomassa (KARAN et al., 2012; FANG et al., 2015). Nesse contexto, enzimas que apresentam boa tolerância a elevadas concentrações salinas surgem como uma opção promissora para a utilização da água do mar pelas biorrefinarias, permitindo a substituição da água doce e potável nas etapas de lavagem e sacarificação da biomassa (REN et al., 2016).

Tabela 1. Composição média estimada da água do mar

Componentes	Concentração (g L^{-1})
NaCl	27,13
$MgCl_2$	2,50
$MgSO_4$	3,38
$CaCl_2$	1,16
KCl	0,74
$NaHCO_3$	0,21
NaBr	0,08
Total de sais	35,22
Água remanescente	964,78

Adaptado de de María (2013).

2.6. Enzimas halofílicas e halotolerantes

Concentrações salinas elevadas podem afetar a solubilidade, a estabilidade, a conformação e a atividade das enzimas (KARAN et al., 2012). Uma das principais razões para a baixa atividade enzimática em condições de salinidade elevada é o efeito que os íons exercem sobre a estrutura da água na camada de hidratação da superfície da enzima. A água desempenha um papel crítico nas funções biológicas das proteínas, mantendo a sua estrutura nativa e evitando a sua agregação. De fato, as moléculas de água tendem a interagir favoravelmente com os grupos polares na superfície da enzima, bem como a se ordenar ao redor dos grupos hidrofóbicos na superfície da proteína (KARAN et al., 2012).

Em concentrações elevadas, os íons sequestram as moléculas de água, limitando as moléculas livres disponíveis para a hidratação da molécula proteica. Além disso, os íons promovem um desarranjo das moléculas de água ao redor das regiões hidrofóbicas da superfície da enzima, bem como provocam perturbação das interações eletrostáticas entre resíduos de aminoácidos carregados adjacentes, levando a agregação e precipitação (KARAN et al., 2012). Assim, a maioria das enzimas não são capazes de competir com os sais pelas moléculas de água e perdem sua estrutura e atividade em condições de alta salinidade. Entretanto, as enzimas halofílicas ou halotolerantes são capazes de competir

com os íons pelas moléculas de água, preservando a sua atividade e estrutura (KARAN et al., 2012). Uma das principais diferenças entre as enzimas halofílicas e não-halofílicas é a predominância de resíduos de aminoácidos ácidos na superfície da enzima, tais como os resíduos de glutamato e aspartato, além de um baixo teor de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Acredita-se que o aumento da carga negativa na superfície proteica é um dos principais fatores que permite à enzima competir com os íons pelas moléculas de água, mantendo a sua capa de hidratação (KARAN et al., 2012).

Normalmente, as enzimas tolerantes a sal são derivadas de microrganismos capazes de viver em ambientes de salinidade extrema. No entanto, em nosso grupo de pesquisa recentemente foi purificada uma endo-xilanase halotolerante produzida pelo fungo *Colletotrichum graminicola*, a qual manteve boa atividade e estabilidade em presença de concentrações elevadas de sal (CARLI, 2016). Por serem estáveis e ativas nessas condições, as enzimas halotolerantes oferecem grandes vantagens para aplicação em processos biotecnológicos conduzidos em condições de alta salinidade, as quais inibem a maioria das enzimas.

2.7. Organismo de estudo: *Colletotrichum graminicola*

Como citado anteriormente, os microrganismos são os principais responsáveis pela degradação da xilana na natureza. Deste modo, diferentes β-xilosidases tem sido obtidas a partir de uma variedades de microrganismos, incluindo fungos e bactérias. Dentre eles, os fungos filamentosos são considerados os melhores produtores de enzimas xilanolíticas e são amplamente utilizados como produtores de β-xilosidases (KNOB et al., 2010; KIRIKYALI e CONNERTON, 2015; POLIZELI et al., 2005; JUTURU e WU, 2012).

Os fungos do gênero *Colletotrichum* são classificados como fungos mesófilos endofíticos, que habitam o interior dos tecidos das plantas em algum estágio da vida (PEREIRA et al., 1993). Acredita-se que a capacidade dos fungos deste gênero de produzir enzimas extracelulares capazes de degradar os componentes da parede celular vegetal esteja vinculada à sua fitopatogenecidade (ACOSTA-RODRIGUES et al., 2005). Além disso, foram identificados em organismos deste gênero vários genes que codificam

para diferentes hidrolases, potencialmente envolvidas na degradação da parede celular vegetal (O'CONNELL et al., 2012; KING et al., 2011). Vários estudos têm sido realizados ainda sobre a interação entre estes fungos e as plantas hospedeiras; e dentre as enzimas mais estudadas merecem destaque as pectinases e poligalacturonases (HEBERT et al., 2004) e as quitinases (SOUZA et al., 2003). No entanto, o potencial dos fungos do gênero *Colletotrichum* para produzir enzimas com interesse biotecnológico foi pouco explorado até o momento.

Recentemente, em nosso grupo de pesquisa, foi otimizada empregando a metodologia de superfície de resposta a produção por fermentação em estado sólido (FES) de β-xilosidases por uma linhagem do fungo mesófilo *C. graminicola* isolada do solo brasileiro (ZIMBARDI et al., 2013; ZIMBARDI, 2014). O microrganismo mostrou-se um bom produtor de β-xilosidases e a máxima produção ocorreu em meio de cultivo barato, constituído majoritariamente de farelo de trigo e água, suplementado com casca de amendoim moída. Além disso, misturas de um extrato bruto do fungo, rico em xilanases, ß-xilosidases e ß-glucosidases, com um extrato bruto de *Trichoderma reesei*, empregado como fonte de celulases, demonstraram excelente potencial para a hidrólise de palha de cana e papelão, sem nenhum pré-tratamento (ZIMBARDI et al., 2013; ZIMBARDI, 2014). Assim, as enzimas produzidas aparentemente reúnem propriedades atraentes para o emprego em coquetéis de celulases e hemicelulases, visando à hidrólise da lignocelulose. Neste trabalho foi purificada e caracterizada uma β-xilosidase majoritária produzida por esta linhagem de *C. graminicola*.

3. Objetivos

Os objetivos principais deste trabalho foram:

I. Purificação de uma β-xilosidase produzida por *Colletotrichum graminicola* quando cultivado por FES em condições otimizadas para a produção de β-xilosidases.

II. Caracterização bioquímica e cinética da β-xilosidase purificada, na ausência e na presença de NaCl em concentrações elevadas.

III. Avaliação do potencial de aplicação biotecnológica da β-xilosidase purificada com ênfase nas suas propriedades de tolerância a concentrações elevadas de NaCl, solventes orgânicos e LIs.

4. Material e métodos

4.1. Organismo de estudo

A linhagem de *C. graminicola* empregada neste trabalho foi isolada a partir de ascocarpos em crescimento em troncos em decomposição, na floresta Amazônica, Brasil. Pedaços pequenos (0,5 cm x 0,5 cm) foram assepticamente removidos do interior do asco, lavados com hipoclorito de sódio 10% e enxaguados quatro vezes com água destilada esterilizada. Em seguida, os pedaços foram transferidos para meio PDA (*Potato Dextrose Agar*, Oxoid, UK) suplementado com extrato de malte 1% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e antibióticos bacterianos (50 μg 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 a 25 ºC durante 10 a 15 dias, o micélio formado foi recolhido e 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 Ryvarden (1991) e Teixeira (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.

4.2. Manutenção da linhagem

A linhagem de *C. graminicola* foi mantida por meio de repiques sucessivos em meio sólido inclinado de PDA 3,9%. Os meios foram previamente autoclavados a 127 °C e 1,5 atm por 20 minutos. Após o repique, as culturas foram incubadas por 10 dias a 25 ºC e, posteriormente, armazenadas a 4 ºC por até 30 dias.

4.3. Cultivo de *C. graminicola* em estado sólido

Colletotrichum graminicola foi cultivado por FES em condições otimizadas para a produção de ß-xilosidases (ZIMBARDI et al., 2013). O meio de cultivo foi constituído por 5 g de farelo de trigo suplementado com 4,7% (m/m) de casca de amendoim moída, com umidade de 2 mL g^{-1} de farelo seco. Os meios foram previamente autoclavados a 127 °C e 1,5 atm por 20 minutos. Para o inóculo foram utilizadas 4 secções de 0,25 cm^2 do micélio do fungo cultivado em meio PDA por frasco de meio de cultura. Os frascos foram incubados por 8 dias a 25 ºC.

4.4. Obtenção do extrato bruto do cultivo de *C. graminicola* rico em ß-xilosidases

Após o cultivo, o meio foi suspenso em 25 mL de água deionizada gelada e homogeneizado levemente com um bastão de vidro, em banho de gelo. A suspensão foi filtrada em peneira de nylon e centrifugada por 20 minutos a 10000 x *g* e 4 ºC. O sobrenadante foi utilizado como extrato bruto rico em ß-xilosidases e mantido a 4 °C para experimentos futuros, sem perda apreciável de atividade enzimática por até 30 dias.

4.5. Ensaios enzimáticos

Em todos os ensaios foram realizados controles a fim de avaliar a hidrólise espontânea dos substratos. As condições experimentais (tempos de reação e unidades enzimáticas) empregadas em todos os ensaios foram ajustadas para garantir a estimativa de velocidades iniciais.

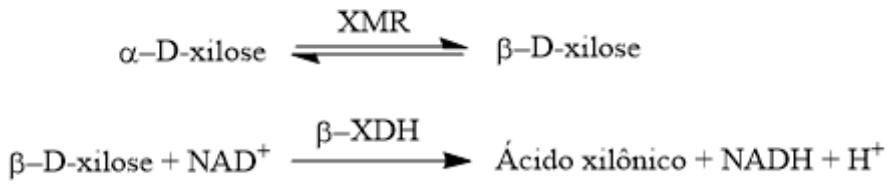
Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de produto por minuto. A atividade específica foi definida como a relação entre o número de unidades e a massa total de proteína (mg). Os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicata (n= 2).

4.5.1. Determinação da atividade ß-xilosidásica

A atividade ß-xilosidásica foi rotineiramente determinada empregando-se como substrato *p*-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (*p*NP-XIL; Sigma Aldrich Chem. Co., Missouri, EUA) quantificando-se a liberação do íon *p*-nitrofenolato ($\varepsilon_{410nm,\ pH\ 12}$= 17500 mol^{-1} L cm^{-1}). As condições padrão dos ensaios foram 65 ºC, tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 4,5, contendo *p*NP-XIL em concentração 5 mmol L^{-1}, num volume final de 0,6 mL. As reações foram iniciadas pela adição de 50 µL de enzima convenientemente diluída ao meio reacional e interrompidas pela adição de 1,0 mL de tetraborato de sódio saturado, em intervalos de tempo adequados.

4.5.2. Atividade sobre outros substratos

A atividade sobre xilobiose (Sigma Aldrich Chem. Co.) em concentração final 5 mmol L^{-1} foi determinada nas mesmas condições descritas no item no item 4.5.1. As reações foram iniciadas pela adição de 50 µL de enzima convenientemente diluída ao meio reacional e interrompidas após intervalos de tempo adequados por aquecimento em banho de água fervente por 5 minutos. A xilose liberada foi estimada a 25 ºC utilizando um sistema acoplado xilose mutarotase/ß-xilose desidrogenase (XMR/β-XDH; kit K-XILOSE; Megazyme Co. Wicklow, Irlanda), empregando xilose como padrão. O produto da reação NADH, proporcional à xilose liberada, foi dosado em 340 nm ($\varepsilon_{340nm,\ pH\ 7,5}$ = 5809,34 mol^{-1} L cm^{-1}).



A atividade hidrolítica sobre os substratos sintéticos *p*-nitrofenil-α-D-xilopiranosídeo, *p*-nitrofenil-ß-D-glucopiranosídeo, *p*-nitrofenil-ß-D-galactopiranosídeo, *o*-nitrofenil-ß-D-galactopiranosídeo, *p*-nitrofenil-ß-D-fucopiranosídeo, *p*-nitrofenil-α-L-arabinofuranosídeo, *p*-nitrofenil-ß-D-manopiranosídeo, *p*-nitrofenil-α-D-manopiranosídeo e *p*-nitrofenil-α-L-arabinopiranosídeo (Sigma Aldrich Chem. Co.), em concentração final 5 mmol L^{-1}, foi determinada nas mesmas condições descritas no item 4.5.1.

A atividade sobre as xilanas *beechwood, birchwood* e *oat spelt* e sobre os substratos poliméricos celulose microcristalina (Avicel ®) e carboximetilcelulose (CMC) de baixa viscosidade (Sigma Aldrich Chem. Co.), em concentração final 1% (m/v), foi determinada nas mesmas condições descritas no item no item 4.5.1. Os açúcares redutores liberados foram dosados empregando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), segundo Miller (1959), utilizando xilose ou glicose como padrão. A reação foi iniciada pela adição de 100 μL de enzima convenientemente diluída ao meio reacional e após intervalos de tempos adequados alíquotas de 200 μL foram retiradas e adicionadas a 200 μL de DNS para interrupção da reação. A mistura foi mantida em banho de água fervente por 5 minutos, resfriada e diluída com 2,0 mL de água destilada. O produto formado foi dosado espectofotométricamente em 540 nm. No caso dos substratos Avicel® e xilanas *beechwood, birchwood* e *oat spelt*, devido à sua solubilidade parcial foi introduzido um passo de centrifugação de 6 minutos a 5.000 x *g* e 4 ºC para a retirada do substrato insolúvel, previamente ao aquecimento em banho fervente.

A atividade sobre celobiose (Sigma Aldrich Chem. Co.), em concentração final 10,0 mmol L^{-1}, foi determinada nas mesmas condições. A reação foi iniciada pela adição de 50 μL de enzima ao meio reacional e, após intervalos de tempos convenientes, interrompida por aquecimento em banho de água fervente por 5 minutos. A glicose liberada foi estimada pelo método da glicose-oxidase (BERGMEYER e BERNT, 1974), utilizando o kit Glicose Liquiform 133-1/500 (Labtest Diagnóstica SA, MG, Brasil) e empregando glicose como padrão. O produto da reação, antipirilquinonimina vermelha, proporcional à glicose liberada, foi dosado em 505 nm.

4.6. Dosagens de proteína

As concentrações de proteína foram determinadas empregando o método descrito por Read e Northcote (1981), utilizando soroalbumina bovina (BSA; Sigma Aldrich Chem. Co.) como padrão. Todas as dosagens foram realizadas em duplicata (*n*= 2).

4.7. Purificação de uma ß-xilosidase majoritária de *C. graminicola*

O extrato bruto do cultivo de *C. graminicola* foi ajustado para pH 5,0 com tampão acetato de sódio 1 mol L^{-1} e aplicado em uma coluna de CM-Celulose (10,0 x 2,0 cm) equilibrada em tampão acetato de sódio 10 mmol L^{-1}, pH 5,0 (tampão A). Após aplicada a amostra, a coluna foi lavada com tampão A, com fluxo de 80 mL h^{-1}, até não ser mais detectada eluição de proteínas (A_{280}). Frações (1,0 mL) foram coletadas e analisadas para A_{280} e atividade ß-xilosidásica. As frações com maior atividade foram reunidas e aplicadas em uma coluna de DMAE-Fractogel (13,0 x 2,0 cm) equilibrada em tampão acetato de sódio 10 mmol L^{-1}, pH 5,5 (tampão B). A coluna foi lavada com tampão B, com fluxo de 75 mL h^{-1}, até não ser mais detectada eluição de proteínas (A_{280}). A seguir, a coluna foi eluída com um gradiente linear de NaCl (0 – 0,5 mol L^{-1}) em tampão B. Frações (1,0 mL) foram coletadas e analisadas para A_{280} e atividades ß-xilosidásica e ß-glucosidásica. As frações com maior atividade ß-xilosidásica foram reunidas e concentradas em concentrador Vivaspin 20 (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) com membrana de polietersulfona com corte de 10 kDa. Em seguida, a amostra concentrada foi aplicada em uma coluna de filtração em gel de Sephacryl S-200 (121,0 x 2,0 cm) equilibrada e eluída com tampão B contendo NaCl 150 mmol L^{-1}, com fluxo de 15 mL h^{-1}. Frações (1,0 mL) foram coletadas e analisadas para A_{280} e atividades ß-xilosidásica e ß-glucosidásica. As frações com maior atividade β-xilosidásica foram reunidas, aliquotadas e armazenadas 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. A ß-xilosidase purificada foi denominada Bxcg.

4.8. Análise eletroforética

Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE) foi realizada em géis em placa, empregando concentração de acrilamida de 7%, conforme descrito por Davis (1964). Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada em géis em placa, empregando concentração de acrilamida de 10%, conforme descrito por Laemmli (1970). As bandas proteicas foram reveladas com Coomassie Brilliant Blue R-250.

A atividade β-xilosidásica no gel, após PAGE, foi determinada empregando a metodologia descrita por de Bruyne e Loontiens (1965). Após a corrida, o gel foi imerso em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 5,0, por 30 minutos a temperatura ambiente. A seguir, a solução foi descartada e o gel foi coberto com um papel-filtro saturado com uma solução constituída de 150 μL de 4-metilumbeliferil-β-D-xilopiranosídeo (Sigma Aldrich Chem. Co.) 1% (m/v) em acetona 50% (v/v) e 5,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 5,0. O gel foi incubado nessas condições por 5 a 15 minutos. A seguir, o papel-filtro foi retirado e a banda de atividade foi visualizada sob luz UV.

4.9. Análise da sequência de aminoácidos de Bxcg por espectrometria de massas

A análise da sequência de aminoácidos de Bxcg foi realizada conforme descrito por Souza et al., (2010), em colaboração com o Prof. Dr. José 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%. Em seguida, a coluna foi eluída com uma solução de metanol 60% e ácido fórmico 5% e o volume da amostra foi reduzido para 2 μL. A amostra concentrada foi misturada à matriz (ácido 4-hidroxicinamico 10 mg mL^{-1}) na proporção 1:1

(peptídeos:matriz) e a mistura foi aplicada no amostrador (*plate*) para análise por espectrometria de massas (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 trípticos ("*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, *highenergy collision-induced dissociation* – CID-MS/MS). Os espectros de CID foram submetidos diretamente a análise comparativa com o banco de dados NCBInr (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).

4.10. Determinação da massa molecular de Bxcg

A massa molecular aparente da enzima purificada foi estimada por SDS-PAGE, conforme descrito no item 4.8, empregando mistura padrão de massas moleculares pré-corada para proteínas entre 6 e 204 kDa.

A massa molecular aparente de Bxcg na forma nativa foi estimada por filtração em gel em HPLC (*High performance liquid chromatography*), utilizando uma coluna Bio-Sil SEC 400 (7,8 x 300 mm; Bio-Rad, Califórnia, EUA). A coluna foi equilibrada e eluída (1,0 mL min^{-1}) com tampão fosfato 100 mmol L^{-1}, pH 6,8, contendo NaCl 150 mmol L^{-1} e azida de sódio 10 mmol L^{-1}. As frações (1,0 mL) foram coletadas e analisadas para atividade ß-xilosidásica. O volume morto da coluna ("*void*") foi determinado usando Blue Dextran e os padrões de massa molecular utilizados foram: gama globulina bovina (158 kDa; Bio-Rad), BSA (67 kDA; Sigma), ovalbumina (44 kDa; Bio-Rad) e mioglobina equina (17 kDa; Bio-Rad).

4.11. Determinação do ponto isoelétrico de Bxcg por eletroforese bidimensional

Alíquota da proteína purificada foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 15% a 4 ºC, centrifugadas a 5.000 x *g* e 4 ºC por 20 minutos, lavados com acetona 100% e novamente centrifugadas nas mesmas condições. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em 0,3 mL de tampão de reidratação contendo uréia 8 mol L^{-1}, 1 mg de ditiotreitol (DTT), CHAPS 2%, azul de bromofenol (traço) e IPG Buffer 2% (pH 3 – 11; GE Healthcare Life Sciences) e aplicados em fitas de 7 cm com variação de pH 3–10, para corrida de 1ª dimensão. A focalização isoelétrica das proteínas foi realizada no IPGPhor System 3 (GE Healthcare Life Sciences) nas seguintes condições: 300 volts/ 30 minutos, gradiente de 1000 volts/ 30 minutos, gradiente de 5000 volts/ 1hora e 20 minutos, 5000 volts/ 25 minutos e 50 volts até a retirada da fita. Em seguida as fitas foram imersas em solução de equilíbrio (Tris 50 mmol L^{-1}, glicerol 30%, uréia 6 mol L^{-1}, dodecil sulfato de sódio (SDS) 2% e azul de bromofenol 1%) adicionada de DTT 10 mg mL^{-1} por 15 minutos e a seguir em solução de equilíbrio adicionada de iodoacetamida 25 mg /mL por 15 minutos. Em seguida, a corrida na segunda dimensão foi realizada por SDS-PAGE a 12% (LAEMMILI, 1970), empregando corrente constante de 25 mA por 2 h. O gel foi corado utilizando Comassie Blue coloidal (NEUHOFF et al., 1988) e após descoloração com solução contendo 30% de etanol e 10% de ácido acético, as bandas proteicas foram identificadas e analisadas.

4.12. Dosagem de carboidratos totais

O teor de carboidratos totais de Bxcg foi estimado empregando o método descrito por Dubois et al. (1956), utilizando manose como padrão. A cada alíquota da enzima pura (cerca de 10 μg) diluída para 1,0 mL com água destilada foram adicionados 25 μL de fenol 80% e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi deixada em repouso por 10 min à temperatura ambiente. Após este intervalo, foi determinada a sua absorbância em 490 nm. As dosagens foram realizadas em triplicata (n= 3).

4.13. Deglicosilação de Bxcg

Bxcg foi deglicosilada utilizando a enzima *Peptide N-Glycosidase F* (PNGase F; Sigma Chemical Co.). Um volume de 35 μL de Bxcg (cerca de 200 μg) foi adicionado a 10 μL de tampão fosfato de sódio 250 mmol L^{-1}, pH 7,5, e 2,5 μL de uma solução contendo SDS 2% (m/v) e β-mercaptoetanol 1 mol L^{-1}. A mistura de reação foi incubada a 100 ºC por 5 minutos. Após resfriamento a temperatura ambiente, foram adicionados à mistura 2,5 μL de Triton X-100 15% (v/v) e 2 μL de PNGase F, incubando-se a 37 ºC por 48 horas. Em seguida, a enzima deglicosilada foi submetida a eletroforese SDS-PAGE a 10%, conforme descrito no item 4.8. Após a corrida, as bandas proteicas foram coradas com nitrato de prata (BLUM et al., 1987).

4.14. Caracterização bioquímica e cinética de Bxcg

4.14.1. Efeito de NaCl sobre a atividade e estabilidade de Bxcg

O efeito de NaCl sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg foi avaliado na faixa de concentração final de 0,5 a 3,0 mol L^{-1}, nas condições descritas no item 4.5.1. A estabilidade de Bxcg à presença de NaCl foi estimada por meio da incubação da enzima à temperatura ambiente por 24 horas em soluções aquosas de NaCl em concentração final na faixa de 0,5 a 3,0 mol L^{-1}. A atividade residual foi determinada conforme descrito no item no item 4.5.1, na ausência de NaCl.

4.14.2. Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade ß-xilosidásica

A temperatura ótima de reação foi determinada em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 4,5, na faixa de temperatura de 50 a 80 °C. O pH ótimo de reação foi determinado a 65 °C, em tampão McIlvaine (MCILVAINE, 1921) ajustado para valores de pH na faixa entre 3,0 a 8,0. As dosagens de atividade foram realizadas empregando *p*NP-XIL como substrato, conforme descrito no item 4.5.1.

O efeito do NaCl sobre a temperatura e o pH ótimos de reação de Bxcg 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.

4.14.3. Estabilidade térmica e ao pH de Bxcg

A termoestabilidade de Bxcg em água foi avaliada por incubação da enzima, adequadamente diluída, em diferentes temperaturas (65 - 75 ºC). Após intervalos de tempo convenientes, alíquotas foram retiradas, mantidas em banho de gelo por 1 minuto e a atividade residual foi determinada a 65 ºC, empregando *p*NP-XIL como substrato, como descrito no item 4.5.1.

A estabilidade de Bxcg em diferentes condições de pH foi estimada por meio da incubação da enzima a 4 ºC por 24 horas em tampão McIlvaine ajustado para valores de pH na faixa entre 3,0 a 8,0. A atividade residual foi determinada em pH 4,5, como descrito acima.

O efeito do NaCl sobre a estabilidade térmica de Bxcg em diferentes temperaturas (65 - 75 ºC), 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 de NaCl de 0,5 e 2,5 mol L^{-1}.

4.14.4. Determinação dos parâmetros termodinâmicos para a inativação térmica de Bxcg

Os parâmetros termodinâmicos para a inativação térmica de Bxcg na ausência e presença de NaCl foram calculados como descrito por Lee, J. et al. (2015).

A constante de inativação térmica de primeira ordem (k_i) foi obtida a partir do gráfico de $ln(A_R/A_0)$ em função do tempo, de acordo a equação de decaimento exponencial de primeira ordem:

$$ln\left(\frac{A_R}{A_0}\right) = k_i\, t \qquad \text{Equação 1}$$

onde A_R é a atividade residual, A_0 é a atividade inicial de Bxcg (controle, 100%) e t é o tempo de incubação.

A energia de ativação (E_d) para o processo de inativação térmica foi estimada a partir do coeficiente angular do gráfico de k_i em função de 1/T, de acordo com a equação de Arrhenius:

$$ln(k_i) = ln(k_0) - \left(\frac{E_d}{RT}\right) \qquad \text{Equação 2}$$

onde k_i é a constante de inativação térmica de primeira ordem, R é a constante dos gases (8,314 J/mol.K^{-1}), T é a temperatura em Kelvin e E_d é a energia de ativação.

Os demais parâmetros termodinâmicos foram calculados usando as seguintes equações:

$$\Delta H = E_d - RT \qquad \text{Equação 3}$$

$$\Delta G = -RTln\left(\frac{k_i\, h}{k_B\, T}\right) \qquad \text{Equação 4}$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \qquad \text{Equação 5}$$

onde h é a constante de Plank, k_B é a constante de Boltzmann, ΔH, ΔG e ΔS são a variação de entalpia, de energia livre e de entropia.

4.14.5. Efeito de sais e outros efetores sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg

O efeito de diferentes sais (KCl, NaCl, $NiCl_2$, $MnCl_2$, $MgCl_2$, $HgCl_2$, $CoCl_2$, $CaCl_2$, $ZnCl_2$, $SrCl_2$, $FeCl_3$, $Pb(NO_3)_2$, $AgNO_3$, $Cr(NO_3)_3$ e $CuSO_4$), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), SDS e β-mercaptoetanol (Sigma Aldrich Chem. Co.) sobre a atividade de Bxcg foi avaliado nas mesmas condições descritas no item 4.5.1. Os diferentes efetores foram adicionados ao meio reacional nas concentrações finais de 1 e 10 mmol L^{-1}.

4.14.6. Efeito de carboidratos sobre a atividade βxilosidásica de Bxcg

O efeito de diferentes carboidratos (glicose, xilose, galactose, maltose, sacarose, manose, frutose e arabinose) sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg também foi avaliado nas condições descritas no item 4.5.1. Os diferentes carboidratos foram adicionados ao meio reacional nas concentrações finais de 10 e 50 mmol L^{-1}.

4.14.7. Efeito de solventes orgânicos, acetato de sódio e acetato de 1-etil-3-metilimidazólio sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg

O efeito de diferentes solventes orgânicos (etanol, metanol, butanol, propanol, glicerol, tolueno e acetona), de acetato de sódio e do líquido iônico acetato de 1-etil-3-metilimidazólio ([Emim][Ac]; Sigma Aldrich Chem. Co.) sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg também foi avaliado nas condições descritas no item 4.5.1, porém os experimentos foram conduzidos a 50 °C. Os diferentes solventes foram adicionados ao meio reacional numa concentração final de 5% (v/v); acetato de sódio foi adicionado nas concentrações finais de 50 e 200 mmol L^{-1} e [Emim][Ac] foi adicionado nas concentrações finais na faixa de 0,2 a 5% (m/v).

4.14.8. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos velocidade máxima ($V_{máx}$), constante de Michaelis-Menten (K_M) ou constante de dissociação aparente ($K_{0,5}$) para a hidrólise de *p*NP-XIL por Bxcg foram calculados por regressão não-linear, empregando o programa SigrafW (LEONE et al., 2005). Os mesmos parâmetros cinéticos para a hidrólise de *p*-nitrofenil-α-L-arabinopiranosídeo foram calculados por regressão linear, a partir tratamento gráfico proposto por Hanes-Wolf, conforme descrito por Segel (1975). A constante de inibição aparente (K_I) da atividade ß-xilosidásica por xilose foi estimada a partir de tratamento gráfico proposto por Dixon, conforme descrito por Segel (1975). Todos os experimentos cinéticos foram repetidos três vezes utilizando diferentes preparações de enzima purificada (*n*= 3) e cada ensaio de atividade foi realizada em duplicata. Os parâmetros cinéticos foram apresentados como a média ± desvio padrão dos valores calculados para os três diferentes experimentos.

4.15. Hidrólise de xilooligossacarídeos por ação de Bxcg

As misturas de reação foram preparadas em tubos plásticos cônicos com tampa, contendo xilooligossacarídeos em tampão acetato de sódio 50 mmol.L^{-1}, pH 5,0, num volume final de 1,0 mL. As reações foram iniciadas pela adição de 1U de Bxcg e as misturas foram incubadas a 50 °C sob agitação de 200 rpm. Após intervalos de tempos desejáveis, alíquotas de 50 µL foram retiradas e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de TCA a 20% (m/v) para precipitação de proteínas e carboidratos de cadeia longa. Após 30 minutos em repouso, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10000 x *g*, preservando-se o sobrenadante.

Os produtos de hidrólise foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica gel Kiesegel 60 de 10 x 20 cm, segundo a metodologia descrita por Fontana et al. (1988). Alíquotas de cerca de 5 µL de cada sobrenadante foram aplicadas em uma placa de sílica, 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). Ao final de cada corrida, a placa foi seca ao ar e após a segunda corrida, borrifada com solução

reveladora contendo orcinol 0,4% (m/v) em uma mistura de ácido sulfúrico concentrado e etanol (1:9, v/v). Depois de seca, a placa foi mantida a 100 ºC em estufa até o aparecimento de manchas avermelhadas nítidas.

A mistura de xilooligossacarídeos utilizada foi obtida por tratamento de xilana *beechwood* com uma xilanase purificada de *C. graminicola* (Excg1; S. Carli, comunicação pessoal). As condições de reação foram xilana *beechwood* 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mmol.L^{-1}, pH 5,0, a 50 °C. As reações foram conduzidas por 15 minutos sob agitação de 200 rpm, empregando uma carga enzimática de 5 U de Excg1.

4.16. Ação conjunta de Bxcg e Excg1 na hidrólise de xilana *beechwood*

As misturas de reação foram preparadas em tubos plásticos cônicos com tampa, contendo xilana *beechwood* 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mmol.L^{-1}, pH 5,0, num volume final de 1,0 mL. As reações foram iniciadas pela adição de 1U de Bxcg ou 5U de Excg1, ou uma mistura das duas enzimas empregando a mesma carga enzimática. As misturas de reação foram incubadas a 50 °C sob agitação de 200 rpm e após intervalos de tempos desejáveis, alíquotas de 100 µL foram retiradas do meio reacional e mantidas em banho fervente por 5 minutos para interromper a reação. Em seguida, alíquotas de 50 µL foram adicionados a 50 µL de TCA a 20% (m/v) para precipitação de proteínas e carboidratos de cadeia longa. Após 30 minutos de repouso as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10000 x *g*, preservando-se o sobrenadante. Os produtos de hidrólise foram cromatografados e revelados conforme descrito no item 4.15. Como padrão foram utilizados 8 µL da mistura de xilooligossacarídeos obtida por tratamento de xilana *beechwood* com a xilanase Excg1, conforme descrito no item 4.15.

A quantidade de xilose liberada pela ação de Bxcg e Excg1 sobre a xilana *beechwood* foi determinada utilizando um sistema acoplado XMR/β-XDH, conforme descrito no item 4.5.2.

O sinergismo entre Bxcg e Excg1 na hidrólise de xilana *beechwood* a xilose foi estimado pela razão entre a concentração de xilose obtida pela ação da mistura de Bxcg + Excg1 e a soma das concentrações obtidas pela ação individual de cada enzima $\left(\frac{[\text{Xilose}]_{\text{mistura}}}{[\text{Xilose}]_{\text{Bxcg}} + [\text{Xilose}]_{\text{Excg1}}}\right)$

5. Resultados e discussão

5.1. Purificação de uma ß-xilosidase majoritária de *C. graminicola*

Uma β-xilosidase majoritária foi purificada a partir do extrato bruto do cultivo de *C. graminicola* por meio de três passos cromatográficos. A primeira etapa consistiu em uma cromatografia de troca iônica em CM-Celulose e um pico de atividade ß-xilosidásica foi evidenciado na etapa de lavagem da coluna, conforme mostrado na **Figura 5**. Um gradiente linear de NaCl (0 - 1 mol L^{-1}) foi aplicado à coluna, porém não resultou na eluição de outros picos de atividade ß-xilosidásica (não mostrado). Essa etapa mostrou-se eficiente como método de partida, resultando numa purificação de 2,1 vezes, com rendimento de 89,6% (**Tabela 2**).

Tabela 2. Purificação de Bxcg

Etapa	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U mg^{-1})	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	835,1	65,5	12,7	100	1
CM-Celulose	748,2	28,4	26,3	89,6	2,1
DMAE-Fractogel	287,7	2,97	97,0	34,4	7,6
Sephacryl S-200	202,3	0,67	301,8	24,2	23,8

O protocolo de purificação foi repetido cinco vezes (*n*= 5). A tabela mostra dados representativos, obtidos num dos procedimentos de purificação.

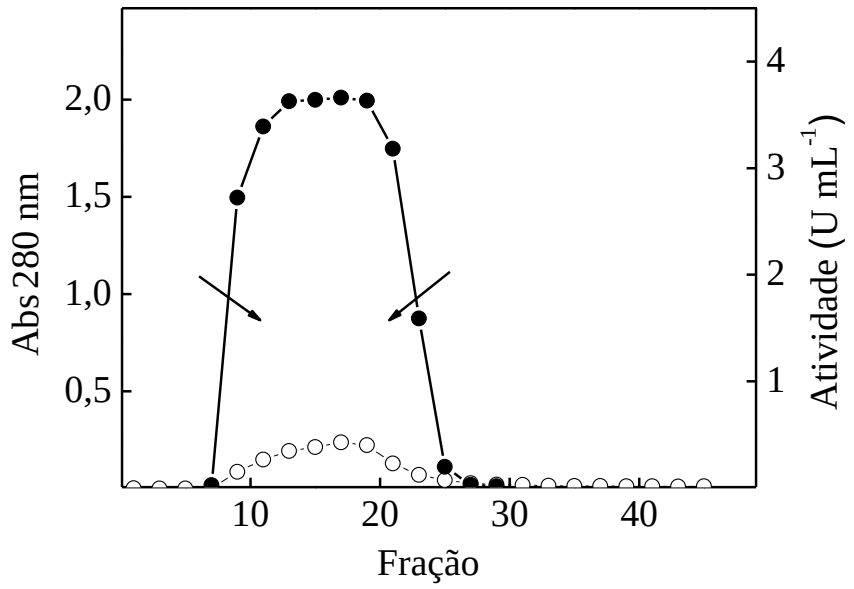


Figura 5. Perfil cromatográfico da atividade ß-xilosidásica de *C. graminicola* em coluna de CM-Celulose.

A coluna (10,0 x 2,0 cm), equilibrada em tampão A, foi lavada com o mesmo tampão até eluição completa de proteínas não ligadas. Frações (1,0 mL) foram coletadas, com um fluxo de 80 mL h^{-1} e analisadas para absorbância em 280 nm (○) e atividade ß-xilosidásica (●). As frações mais ativas (setas) foram reunidas.

O segundo passo consistiu em uma cromatografia de troca iônica em DMAE-Fractogel das amostras contendo maior atividade ß-xilosidásica obtidas após a cromatografia em CM-Celulose. Nessa etapa, um pico de atividade ß-glucosidásica (Pico D-I) foi evidenciado no lavado da coluna. A seguir, um gradiente linear de NaCl (0 – 500 mmol L^{-1}) foi aplicado à coluna e resultou na eluição de um segundo pico de atividade ß-glucosidásica (Pico D-II) e um pico de atividade ß-xilosidásica (Pico D-III), conforme mostrado na **Figura 6.**

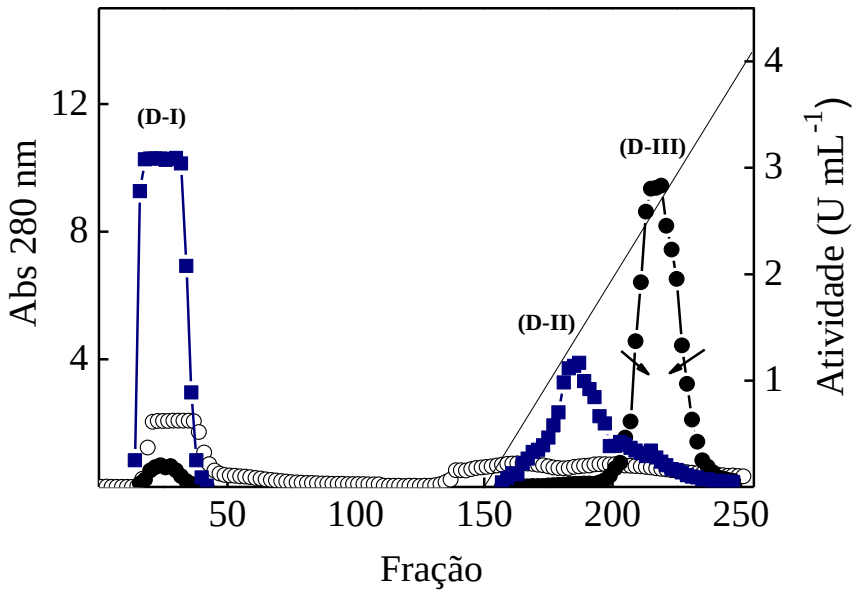


Figura 6. Perfil cromatográfico do pico obtido na cromatografia em CM-Celulose em coluna de DMAE-Fractogel.

A coluna (13,0 x 2,0 cm), equilibrada em tampão B, foi lavada com o mesmo tampão até eluição completa de proteínas não ligadas. A seguir, foi aplicado um gradiente linear de NaCl (0 – 500 mmol L^{-1}) no mesmo tampão. Frações (1,0 mL) foram coletadas, com um fluxo de 75 mL h^{-1} e analisadas para absorbância em 280 nm (○) e atividades ß-xilosidásica (●) e ß-glucosidásica (■). As frações mais ativas correspondentes ao Pico D-III (setas), foram reunidas e concentradas.

No último passo, a amostra correspondente ao Pico D-III obtido após a cromatografia em DMAE-Fractogel foi aplicada em uma coluna de filtração em gel de Sephacryl S-200 e dois picos de atividade foram separados (**Fig. 7**). O primeiro deles apresentou alta atividade ß-xilosidásica e baixa atividade ß-glucosidásica (Pico S-I), enquanto que o segundo pico apresentou maior atividade ß-glucosidásica (Pico S-II). Ao final do procedimento, a ß-xilosidase foi purificada 23,8 vezes, com rendimento de 24,2%, atingindo uma atividade específica de 301,8 U mg^{-1}. Um resumo das etapas de purificação está apresentado na **Tabela 2**.

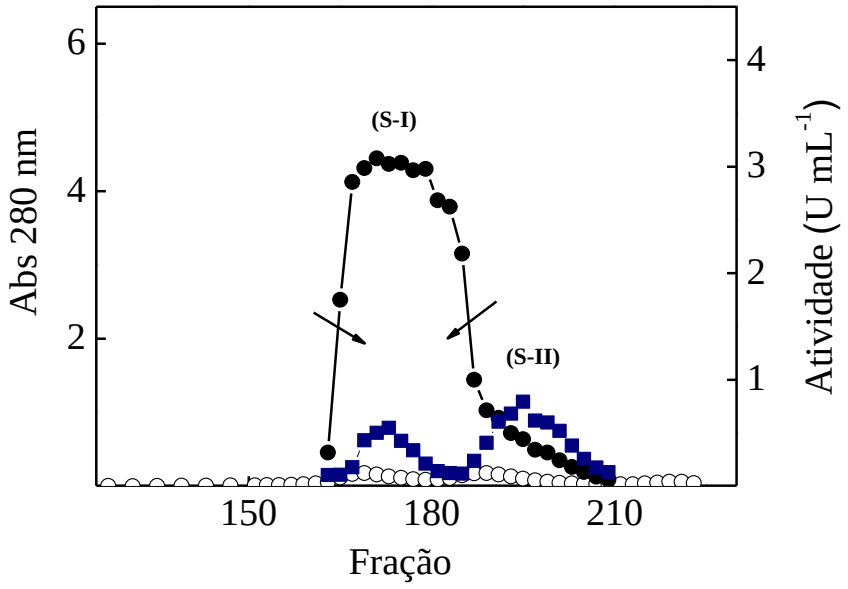


Figura 7. Perfil cromatográfico da amostra correspondente ao Pico D-III obtido da cromatografia em DMAE-Fractogel em coluna de Sephacryl S-200.

A coluna (130,0 x 2,0 cm) foi equilibrada e eluída com tampão B contendo NaCl 150 mmol L^{-1}. Frações (1,0 mL) foram coletadas com um fluxo de 15 mL h^{-1} e analisadas para absorbância em 280 nm (○) e atividades ß-xilosidásica (●) e ß-glucosidásica (■). As frações mais ativas (Pico S-I, setas) foram reunidas, aliquotadas e mantidas a 4° C.

A pureza da preparação enzimática foi confirmada pela presença de uma única banda proteica após análise em PAGE (**Fig. 8, linha A**), coincidente com uma única banda de atividade ß-xilosidásica (**Fig. 8, linha B**). A enzima purificada foi armazenada em água a 4 ºC e não apresentou perda significativa de atividade nestas condições por até 6 meses.

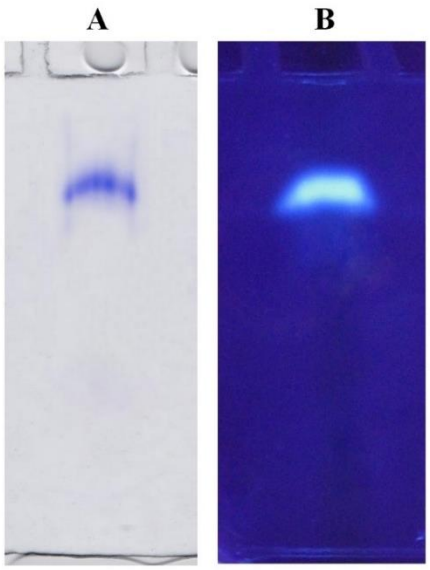


Figura 8. Eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE) de Bxcg.
Uma amostra da enzima purificada foi submetida a PAGE em gel a 7% de acrilamida, conforme descrito em Material e métodos. Linha A: 20 µg de proteína, revelação com Coomassie Brilliant Blue R; linha B: 10 µg de proteína, revelação para atividade ß-xilosidásica, empregando o substrato 4-metilumbeliferil-ß-D-xilopiranosídeo, conforme descrito em Material e métodos.

5.2. Propriedades moleculares da ß-xilosidase purificada

5.2.1. Determinação da massa molecular aparente

A análise de Bxcg por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) revelou uma única banda proteica, correspondente a uma massa molecular aparente de aproximadamente 137 kDa (**Fig. 9, linha A**), confirmando a pureza da preparação

enzimática. A massa molecular aparente de Bxcg na forma nativa, determinada por filtração em gel em HPLC (*High performance liquid chromatography*), correspondeu a 128,6 kDa. Este valor está em boa concordância com o valor estimado por SDS-PAGE, sugerindo que a enzima é monomérica.

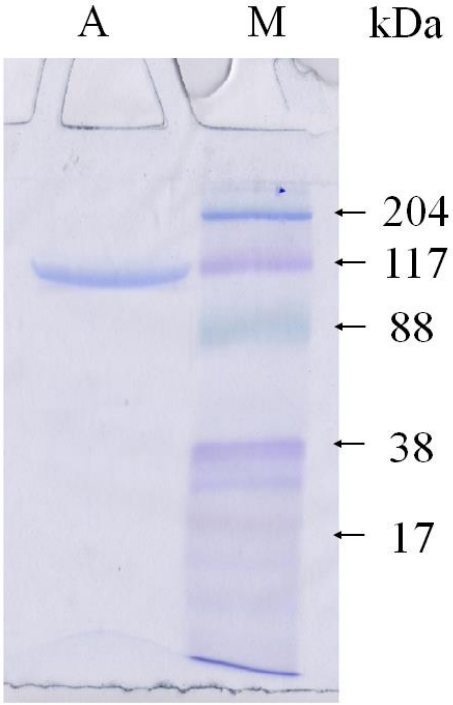


Figura 9. Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de Bxcg.
Uma amostra da enzima purificada foi submetida à SDS-PAGE em gel a 10% de poliacrilamida, conforme descrito em Material e métodos. A banda proteica foi revelada com Coomassie Brilliant Blue R. Linha A: Bxcg, 20 µg de proteína; linha M: marcador de massa molecular pré-corado.

Similarmente a Bxcg, muitas ß-xilosidases fúngicas são monoméricas e possuem massa molecular acima de 100 kDa (LI, Y. et al., 2000; KISS e KISS, 2000; RIZZATTI et al., 2001; WAKIYAMA et al., 2008; MICHELIN, et al., 2012). No entanto, algumas exibem massas moleculares menores como, por exemplo, as β-xilosidases de *Scytalidium thermophilum* (ZANOELO et al., 2004) e *Humicola grisea var. thermoidea* (ALMEIDA et al., 1995) que apresentam massas moleculares de apenas 38 e 43 kDa, respectivamente. Algumas β-xilosidases diméricas também foram descritas, tais como aquelas produzidas por *Penicillium sclerotiurum* (KNOB e CARMONA, 2012) e *Aspergillus nidulans*

(KUMAR e RAMÓN, 1996), com massas moleculares aparentes de 144 e 180 kDa, respectivamente.

5.2.2. Determinação do teor de carboidratos e da massa molecular aparente da enzima deglicosilada

O teor de carboidratos estimado para Bxcg correspondeu a 54 ± 4,1 % (m/m). A análise de Bxcg por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) após deglicosilação revelou uma única banda proteica, correspondente a uma massa molecular aparente de aproximadamente 92 kDa (**Fig. 10, linha B**).

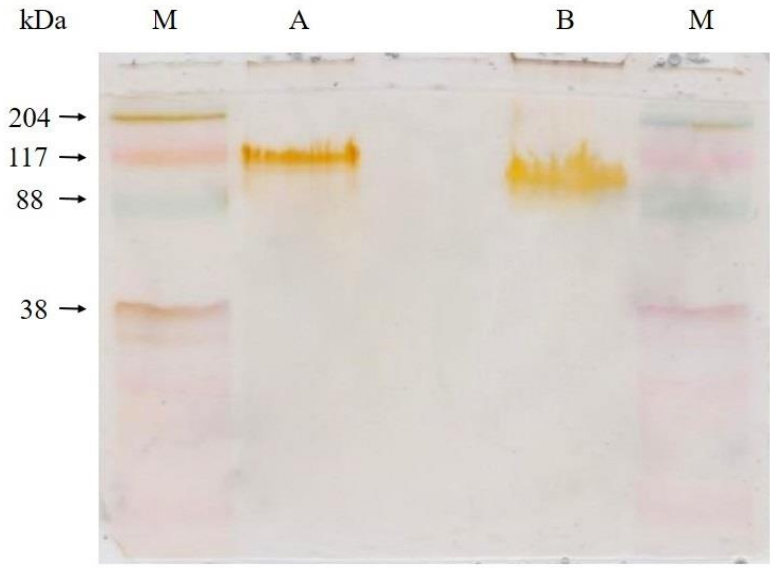


Figura 10. Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de Bxcg glicosilada e deglicosilada.

Amostras de Bxcg glicosilada e deglicosilada foram submetidas SDS-PAGE em gel a 10% de poliacrilamida, conforme descrito em Material e métodos. As bandas proteicas foram reveladas com nitrato de prata. Linha A: 20 µg de proteína glicosilada; B: 20 µg de proteína deglicosilada; linha M: marcador de massa molecular pré-corado.

Similarmente, outras β-xilosidases fúngicas são glicosiladas apresentando conteúdo de carboidratos na faixa entre 40 e 60% (m/m), tais como as enzimas produzidas por *P. sclerotiorum* (KNOB e CARMONA, 2012), *Paecilomyces thermophila* (YAN et al., 2008), *Aspergillus ochraceus* (MICHELIN et al., 2012) e *Aspergillus phoenicis* (RIZZATTI et al., 2001). Em contraste, um valor muito inferior foi estimado para a ß-xilosidase de *S. thermophilum* (ZANOELO et al., 2004), que apresentou conteúdo de carboidratos de apenas 12%.

A glicosilação desempenha um papel fundamental no dobramento de polipeptídeos recém sintetizados e na manutenção da estrutura tridimensional das proteínas, além de conferir estabilidade às enzimas extracelulares contra condições agressivas e fornecer proteção estérica contra o ataque de proteases (SKROPETA, 2009; FONSECA-MALDONADO et al., 2013). Além disso, a glicosilação também pode ter efeito sobre a atividade e estabilidade térmica das enzimas. De uma maneira geral, a glicosilação parece contribuir para a termoestabilidade devido à formação de uma estrutura mais rígida, além de prevenir a agregação proteica em temperaturas elevadas (HONG et al., 2003; SKROPETA, 2009; FONSECA-MALDONADO et al., 2013). No entanto, algumas enzimas podem apresentar aumento da estabilidade térmica quando expressas como proteínas heterólogas com um teor de carboidratos inferior, mostrando que o efeito da glicosilação sobre a termoestabilidade das enzimas pode ser altamente variável (SKROPETA, 2009; FONSECA-MALDONADO et al., 2013).

5.2.3. Determinação do ponto isoelétrico de Bxcg

A eletroforese bidimensional para determinação do ponto isoelétrico (pI) da enzima purificada revelou uma mancha proteica (*spot*), correspondente a um valor de 4,2 (**Fig. 11**). Similarmente a Bxcg, a maioria das β-xilosidases fúngicas apresenta ponto isoelétrico ácido, na faixa entre 4,0 a 5,0, tais como aquelas produzidas por *P. thermophila* (YAN et al., 2008), *Sporotrichum thermophile* (KATAPODIS et al., 2006), *Aspergillus carbonarus* (KISS e KISS, 2000) e *Trichoderma koningii* G-39 (LI, Y. et al., 2000). Em contraste, as β-xilosidases de *S. thermophilum* (ZANOELO et al., 2006) *e Fusarium proliferatum* (SAHA, 2003) apresentaram valores de pI básicos de 7,5 e 7,8, respectivamente.

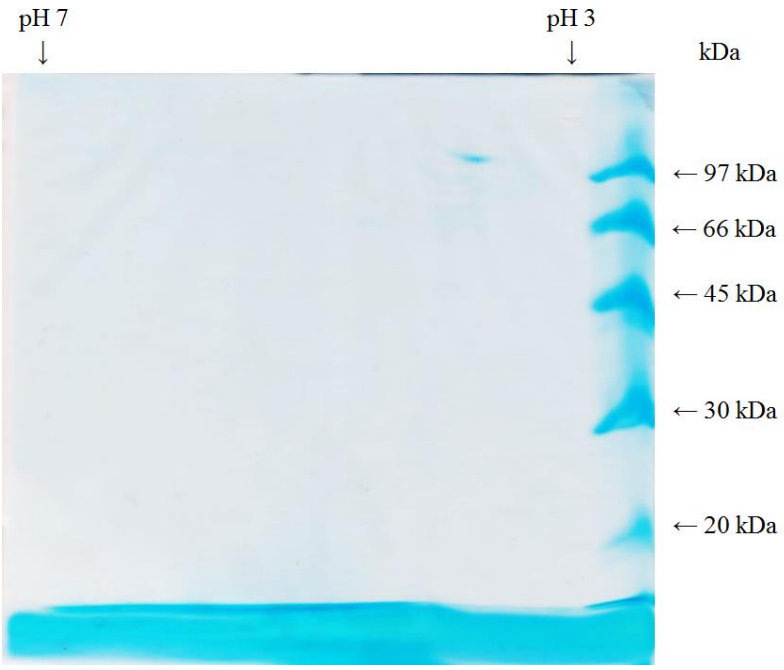


Figura 11. Eletroforese bidimensional de Bxcg.

Uma amostra da enzima purificada foi submetida a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida a 12%, conforme descrito em Material e métodos. A banda proteica foi revelada com Coomassie Brilliant Blue G.

5.2.4. Análise de Bxcg por espectrometria de massas

A enzima purificada foi caracterizada por espectrometria de massas após hidrólise com tripsina. Quatro peptídeos foram detectados nos espectros de MALDI-TOF-MS, correspondendo a: *m/z 1040,6* (AAQEGIVLLK); *m/z* 2366,1 (YVSEVPMTDMGMRPSDKNPGR); *m/z* 1650,8 (SGLDYWTPNINPFK) e *m/z* 1902,8 (HFTGYDMENWNGNFR).

A análise das massas dos peptídeos (*peptide mass fingerprint*), bem como de suas sequências de aminoácidos, obtidas por CID-MS/MS de alta energia, demonstraram que Bxcg apresenta similaridade com uma glicosil-hidrolase da família 3 de *Colletotrichum graminicola* M1.001 (NCBI *Reference Sequence* XP_008096492.1). Os peptídeos identificados apresentaram 73,2% de similaridade e recobriram 4,8% da sequência da proteína identificada no banco de dados (**Fig. 12**), permitindo classificar Bxcg como um

membro da família GH 3. A massa molecular teórica desta ß-xilosidase, que apresenta 767 aminoácidos, corresponde a 92040 Da, enquanto o valor predito para o seu p*I* corresponde a 4,8. Estes dados estão em boa concordância com a massa molecular aparente determinada para Bxcg na sua forma deglicosilada (92 kDa) e com o pI estimado em 4,2. Até o momento não há relatos na literatura de ß-xilosidases purificadas de *C. graminicola* pertencentes à família GH 3.

MKSTWLIVLGAVVSVVTQEEDPESRRQSYPNCVNGTLSVNKVCDRTLSPPERAAALVKALT
VEEKLQNLVSKAQGAPRIGLPAYNWWSEALHGVAYAPGTYFPEGDVEFNSSTSYPMPLLM
AAAFDDELIEQIGAAIGIERAWGNAGWA**GLDYWTPN**V**NPFK**DPRWGRGSETPGEDVLRVK
RYAEYITRGLDGPVPGEQRRVISTCK**H**YA**G**N**D**F**E**D**WNG**TSRHDFDAKITAQDLAEYYLMPF
QQCARDSKVGSIMCAYNAVNGVPSCANEYLLQNILREHWNWTEHNNYVTSDCEAVLDVSA
NHKYAPTNAAGTAICFEAGMDTSCEYTGSSDIPGAWSQGLLKEETVDRALLRLYEGLVRAG
YFDGHEAIYAKLGWKDVNSAEAQSLALQ**AA**V**EGIVLLK**NNGTLPLDLKPSHKVAMIGFWA
DAPDKLQGGYSGRAAHLHTPAYAARQLGLDITLASGPVLQRNNASDNWTAAALEAAEGAD
YILYFGGLDTSAAGETLDRTDLEWPEAQLMLIKKLSALGKPLVVNLLGDQLDDTPLLQLDE
VSSILWANWPGQDGGVAIMKLITGEKSPAGRLPVTQYPSNYTDLI**PMT**S**M**DL**RP**TSQY**PGR**
TYRWYDKPIKRFGFGLHYTTFKAEVGGAFPKTLRIADLVGCGNEHPDTCPAPPLPVSITNTG
NRTSDYVALAYLSGEYGPRPYPIKTLSAYKRLRDVAPGETATVDLAWTLGDIARHDEQGNT
VLYPGEYTITIDEPTLATAAFTLEGEEAVLDKWPAPPS

Figura 12. Recobrimento das sequências de aminoácidos dos fragmentos de Bxcg com uma glicosil-hidrolase da família 3 de *Colletotrichum graminicola* M1.001.
Os aminoácidos dos peptídeos sequenciados que foram idênticos aos da sequência molde estão evidenciados em negrito e sublinhados.

5.3. Caracterização bioquímica e cinética de Bxcg

5.3.1. Efeito de concentrações crescentes de NaCl sobre a atividade e estabilidade de Bxcg

Atualmente, as enzimas halotolerantes vem recebendo grande atenção por seu potencial de aplicação em processos biotecnológicos que possam ser conduzidos em concentrações salinas elevadas. Recentemente, em nosso grupo de pesquisa, foi purificada uma endo-xilanase halotolerante produzida pelo fungo mesofilo *C. graminicola* e a enzima manteve boa atividade e estabilidade em presença de elevadas concentrações de sal (CARLI, 2016). Nesse contexto, foi avaliado o efeito de NaCl sobre a atividade e estabilidade da β-xilosidase purificada.

O efeito de concentrações crescentes de NaCl sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg é mostrado na **Figura 13**. A atividade diminuiu gradualmente com o aumento da concentração de NaCl, atingindo cerca de 63% da atividade controle (na ausência de sal) em 3,0 mol L^{-1}. Entretanto, vale destacar que em presença de NaCl 0,5 mol L^{-1}, concentração próxima daquela encontrada comumente na água do mar (0,46 mol L^{-1}, de MARIA, 2013), a enzima manteve cerca de 90% da atividade controle.

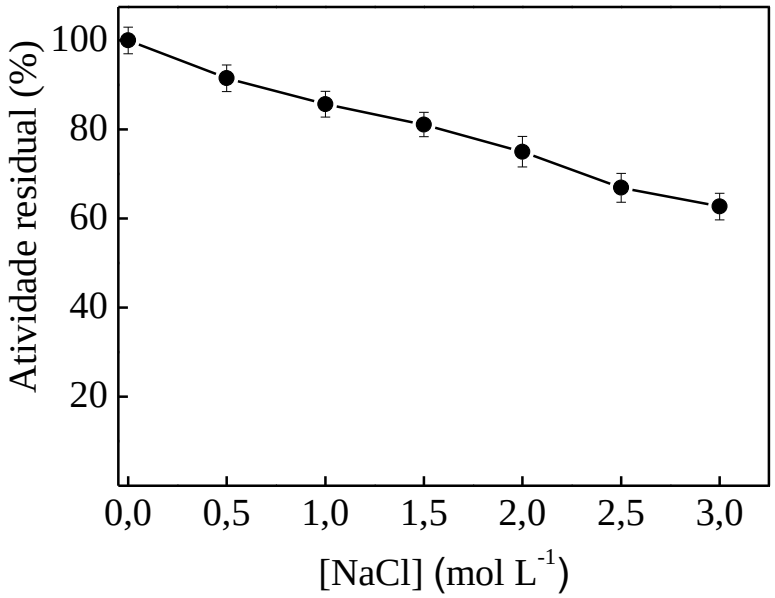


Figura 13. Efeito de concentrações crescentes de NaCl sobre a atividade enzimática de Bxcg.

A atividade foi determinada a 65 °C, em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 4,5, contendo NaCl em concentrações crescentes, empregando *p*NP-XIL como substrato, em presença de, conforme descrito em Material e métodos. A atividade controle (100%) correspondeu a 295,4 ± 8,8 U mg^{-1}.

Similarmente ao observado para Bxcg, duas ß-xilosidases (Xyl1 e Xyl2) produzidas por uma linhagem de *Aspergillus oryzae,* (HASHIMOTO et al., 1999) mantiveram cerca de 60% da atividade controle em presença de NaCl 3,0 mol L^{-1}. Além disso, a atividade da ß-xilosidase Xyl3, produzida pelo mesmo microrganismo, foi estimulada em cerca de 30% na presença da mesma concentração de sal (HASHIMOTO et al., 1999). Até o momento, este foi o único relato encontrado na literatura de ß-xilosidases tolerantes a altas concentrações salinas. No entanto, essa característica tem sido explorada em outras glicosil hidrolases, como xilanases, celulases e ß-glucosidases. Resultados semelhantes aos encontrados para Bxcg foram descritos para uma xilanase de *Planococcus* sp. (HUANG et al., 2015), que manteve cerca de 90% e 60% da atividade controle em presença de NaCl 0,5 e 3,0 mol L^{-1}, respectivamente. De modo similar, a xilanase halotolerante de *C. graminicola* (CARLI, 2016) manteve cerca de 85% da

atividade controle em presença de NaCl 0,5 mol L^{-1}, embora tenha mantido apenas cerca de 50% da atividade controle na presença de NaCl 3 mol L^{-1}.

O efeito de concentrações crescentes de NaCl sobre a estabilidade da enzima purificada é apresentado na **Figura 14**. Bxcg mostrou-se totalmente estável quando incubada à temperatura ambiente por 24 horas na faixa de concentrações testadas, mantendo no mínimo 90% da atividade controle (enzima incubada nas mesmas condições na ausência de NaCl). Um comportamento similar foi descrito para as ß-xilosidases halotolerantes de *A. oryzae* (HASHIMOTO et al., 1999), enquanto a xilanase halotolerante de *C. graminicola* (CARLI, 2016) mostrou-se totalmente estável quando incubada à temperatura ambiente por 48 horas em presença de NaCl em concentrações na faixa de 0,5 a 3 mol L^{-1}.

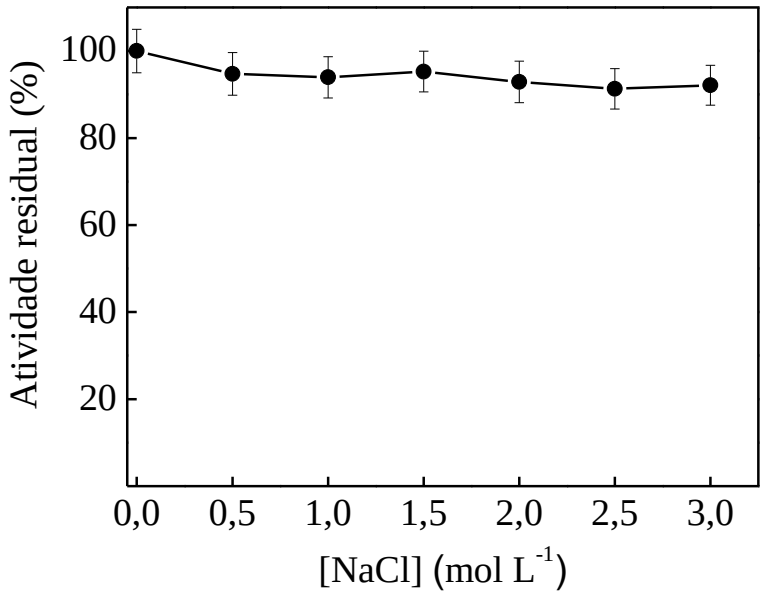


Figura 14. Estabilidade de Bxcg à temperatura ambiente em presença de concentrações crescentes de NaCl.

A enzima foi incubada à temperatura ambiente por 24 horas em soluções aquosas de NaCl em concentrações crescentes. A atividade residual foi determinada a 65 °C, em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 4,5, empregando *p*NP-XIL como substrato, conforme descrito em Material e métodos. A atividade controle (enzima incubada na ausência de NaCl) correspondeu a 290,7 ± 6,7 U mg^{-1}.

Os resultados obtidos sugeriram, portanto, que Bxcg é uma enzima halotolerante. Concentrações salinas elevadas podem afetar negativamente a atividade e a estrutura de uma enzima (KARAN et al., 2012; SINHA e KHARE, 2014). Assim, muitas enzimas apresentam baixa ou nenhuma atividade em condições de extrema salinidade, o que tem sido atribuído ao efeito que os íons exercem sobre a estrutura e dinâmica da água na camada de hidratação da superfície da enzima (KARAN et al., 2012). Em concentrações elevadas, os íons sequestram as moléculas de água, limitando as moléculas livres disponíveis para hidratação da molécula proteica. Consequentemente, promovem um desarranjo das moléculas de água ao redor das regiões hidrofóbicas da superfície da enzima, levando à sua agregação e precipitação. Além disso, os íons também desestabilizam as interações eletrostáticas entre os grupos laterais de resíduos de aminoácidos carregados adjacentes, contribuindo para a inativação enzimática (KARAN et al., 2012; REED et al., 2013; SINHA e KHARE, 2014).

No entanto, as enzimas halotolerantes e halofílicas são capazes de competir com os íons pelas moléculas de água, preservando a sua atividade e estrutura mesmo em concentrações salinas elevadas (KARAN et al., 2012; SINHA e KHARE, 2014). Uma característica típica das enzimas halofílicas é o conteúdo elevado de resíduos de aminoácidos ácidos na sua superfície, principalmente de glutamato, o qual possue uma capacidade de ligação de água superior aos outros resíduos ácidos. Assim, estes resíduos de aminoácidos ligam-se a cátions hidratados, mantendo a capa de hidratação que protege a enzima de agregação (KARAN et al., 2012; REED et al., 2013; SINHA e KHARE, 2014). Além disso, as enzimas halofílicas apresentam baixo teor de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos com cadeias laterais volumosas na sua superfície, se comparadas às enzimas não-halofílicas (KARAN et al., 2012; REED et al., 2013).

Visando explorar a halotolerância de Bxcg foi realizada a caracterização bioquímica da enzima na ausência e na presença de altas concentrações de NaCl. Para isso, foram escolhidas concentrações de NaCl de 0,5 mol L^{-1} (concentração próxima daquela encontrada na água do mar) e 2,5 mol L^{-1} (condição extrema de salinidade).

5.3.2. Efeito da temperatura sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg na ausência e presença de NaCl

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de Bxcg na ausência e presença de NaCl é apresentado na **Figura 15**. A presença de sal não teve efeito sobre o perfil de variação da atividade de Bxcg em função da temperatura. Pode-se observar que tanto na ausência quanto na presença de NaCl (nas concentrações de 0,5 e 2,5 mol L^{-1}), a atividade de Bxcg aumentou gradualmente acima de 50 °C, atingindo um máximo em 70 ºC. Já em temperaturas mais elevadas, a atividade diminuiu abruptamente, até atingir cerca de 14% da atividade máxima a 80 °C. Embora a enzima tenha mostrado um máximo de atividade a 70 °C, nessa temperatura não há uma resposta linear de formação do produto em função do tempo de reação e, portanto, optou-se por caracterizar a enzima purificada a 65 °C.

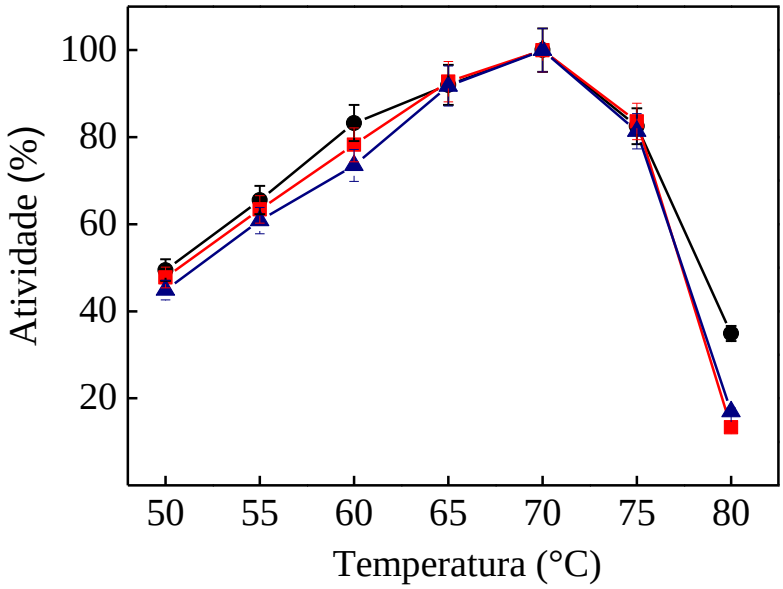


Figura 15. Efeito da temperatura sobre a atividade ß-xilosidásica de Bxcg na ausência e presença de NaCl.

A atividade foi determinada em diferentes temperaturas, em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 4,5, empregando *p*NP-XIL como substrato, na ausência (●) e presença de NaCl em concentração 0,5 mol L^{-1} (■) e 2,5 mol L^{-1} (▲), conforme descrito em Material e métodos. Os controles (100%) corresponderam a 309,8 ± 10,2 U mg^{-1} na ausência de NaCl, e 272,7 ± 9,8 U mg^{-1} e 203,6 ± 10,1 U mg^{-1} na presença de NaCl 0,5 e 2,5 mol.L^{-1}, respectivamente.

Similarmente a Bxcg, muitas das ß-xilosidases de fungos mesófilos já estudadas apresentam temperatura ótima na faixa de 60 a 70 ºC (XIMENES et al., 1996; KISS e KISS, 2000; SAHA, 2003; WAKIYAMA et al., 2008; KNOB e CARMONA, 2012; MICHELIN et al., 2012). Entretanto, Bxcg mostrou uma temperatura ótima mais elevada que aquelas relatadas para várias ß-xilosidases de fungos termófilos, incluindo as β-xilosidases de *Talaromyces thermophile* (GUERFALI et al., 2008), *S. thermophile* (KATAPODIS et al., 2006) e *H. grisea var. termoidea* (ALMEIDA et al., 1995), que apresentam temperatura ótima de 50 ºC.

Em relação às β-xilosidases halotolerantes nenhum relato foi encontrado na literatura, até o momento, no que diz respeito ao efeito de NaCl sobre a temperatura ótima de reação. Entretanto, um comportamento similar ao observado para Bxcg foi descrito

para a xilanase halotolerante de *C. graminicola* (CARLI, 2016) que também não teve sua temperatura ótima de reação alterada pela presença de NaCl em concentrações 0,5 e 2,5 mol L^{-1}. Analogamente, a presença de NaCl 2,5 mol L^{-1} não provocou alterações na temperatura ótima de uma β-glucosidase halofílica de *Bacillus* sp. SJ-10 (LEE, J. et al., 2015).

A temperatura ótima de reação elevada é uma característica interessante de Bxcg visando à sua aplicação em processos industriais nos quais altas temperaturas são requeridas. Por outro lado, na faixa de temperatura em que os processos de sacarificação da biomassa lignocelulósica geralmente são conduzidos (45 a 50 °C), Bxcg apresentou apenas cerca de 50% da atividade máxima.

5.3.3. Efeito do pH sobre a atividade de Bxcg na ausência e presença de NaCl

O efeito do pH sobre a atividade ß-xilosidásica de Bxcg na ausência e presença de NaCl é mostrado na **Figura 16**. Na ausência de sal, a atividade máxima ocorreu na faixa de pH entre 4,0 e 4,5. Uma diminuição gradual da atividade enzimática ocorreu em pH maior que 4,5, atingindo cerca de 68% da atividade máxima em pH 5,5. Já em valores de pH abaixo de 4,0 a atividade diminuiu abruptamente, resultando na perda total da atividade em pH 3,0. Pode-se observar que o perfil de pH ótimo de Bxcg em presença de NaCl 0,5 mol L^{-1} foi muito semelhante ao obtido na ausência de sal, embora a atividade máxima tenha sido observada num valor muito bem definido de pH, igual a 4,5. Em contraste, em concentração mais elevada de sal (2,5 mol L^{-1}) o pH ótimo de reação foi deslocado para 5,0. Abaixo deste pH, a atividade diminuiu abruptamente, atingindo cerca de 6% da máxima em pH 4,0, enquanto acima de pH 5,0 a atividade diminuiu gradualmente até um nível residual de 30% em pH 7,0. Neste mesmo pH, valores desprezíveis de atividade foram determinados na ausência de sal.

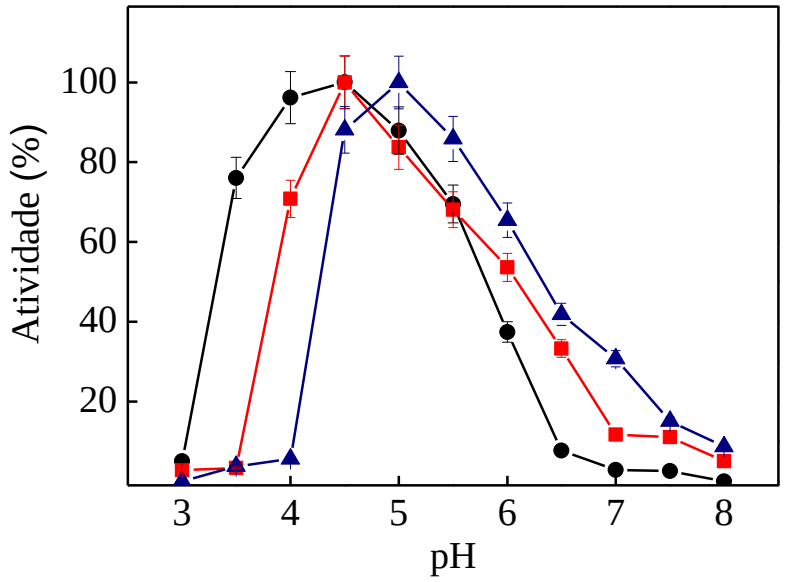


Figura 16. Efeito do pH sobre a atividade ß-xilosidásica de Bxcg na ausência e na presença de NaCl.

A atividade foi determinada a 65 ºC, em tampão McIlvaine ajustado para diferentes valores de pH, empregando *p*NP-XIL como substrato na ausência (●) e presença de NaCl em concentração 0,5 mol L^{-1} (■) e 2,5 mol L^{-1} (▲), conforme descrito em Material e métodos. Os controles (100%) corresponderam a 288,0 ± 14,1 U mg^{-1} na ausência de NaCl, e 263,9 ± 10,7 U mg^{-1} e 178,6 ± 7,9 U mg^{-1} na presença de NaCl 0,5 e 2,5 mol.L^{-1}, respectivamente.

Similarmente ao observado para Bxcg, a maioria das ß-xilosidases fúngicas apresenta pH ótimo entre 4,0 e 4,5 (XIMENES et al., 1996; KISS e KISS, 2000; RIZZATTI et al., 2001; SAHA, 2001; SAHA, 2003; WAKIYAMA et al., 2008; MICHELIN, et al., 2012). Em contraste, uma ß-xilosidase de *P. sclerotiorum* apresentou pH ótimo de 2,5 (KNOB e CARMONA, 2012). Visando a aplicação da enzima purificada em processos de sacarificação da biomassa lignocelulósica, o pH ótimo de reação de Bxcg entre 4,0 – 5,0 é uma característica atraente, uma vez que estes processos são geralmente conduzidos nessa faixa de pH, que é ótima para a atividade de muitas celulases, xilanases e β-glucosidases.

Nenhum relato foi encontrado na literatura, até o momento, no que diz respeito ao efeito de NaCl sobre o pH ótimo de reação de β-xilosidases halotolerantes. No entanto, alterações nos perfis de pH ótimo em resposta à presença de NaCl também foram descritas para a xilanase halotolerante de *C. graminicola* (CARLI, 2016). Por outro lado, o pH ótimo de uma β-glucosidase halofílica de *Bacillus* sp. SJ-10 (LEE, J et al., 2015) e de uma endoglucanase halofílica de *Vibrio* sp. G21 (GAO et al., 2010) não foi afetado pela presença de NaCl no meio reacional.

As β-xilosidases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas por meio de dois mecanismos principais: com inversão ou retenção da configuração do carbono anomérico (KNOB et al., 2010; LAGAERT et al., 2014). No mecanismo de retenção, a hidrólise envolve a ação de dois resíduos catalíticos com cadeias laterais de ácidos carboxílicos: um deles atua como nucléofilo e o outro como um catalisador ácido/base (**Fig. 4**).

As alterações nos perfis de pH ótimo observadas em presença de NaCl podem ser atribuídas a mudanças nos valores de pKa das cadeias laterais dos resíduos catalíticos. Como citado anteriormente, em concentrações salinas elevadas os íons removem a camada de hidratação da superfície da enzima, podendo provocar mudanças conformacionais. Consequentemente, podem ocorrer alterações no microambiente dos resíduos catalíticos, levando a alterações nos valores de pKa dos seus grupos carboxílicos. Dessa forma, a diminuição da atividade de Bxcg em pHs mais ácidos, em altas concentrações de sal, pode estar relacionada ao aumento do pKa do grupo carboxílico do resíduo catalítico que atua como nucleófilo e que deve necessariamente estar desprotonado para que a catálise ocorra. Por outro lado, o aumento do pKa do grupo carboxílico do resíduo catalítico que atua como doador de prótons e que deve estar protonado durante a catálise, pode estar relacionado ao fato de Bxcg apresentar maior atividade em pHs mais alcalinos, em presença de sal, se comparada à aquela determinada na sua ausência.

5.3.4. Estabilidade térmica de Bxcg na ausência e presença de NaCl

A estabilidade térmica de Bxcg em diferentes temperaturas na ausência e na presença de NaCl é mostrada na **Figura 17**. A enzima purificada foi completamente estável quando incubada por 120 minutos a 65 ºC, tanto na ausência quanto na presença de NaCl em ambas as concentrações testadas (**Fig. 17A**). Entretanto, na ausência de sal, a atividade de Bxcg decaiu rapidamente em resposta à incubação a 70 ºC, com tempo de meia vida de cerca de 30 minutos (**Fig. 17B**). Em contraste, quando incubada na mesma temperatura em presença de NaCl em concentração 0,5 mol L^{-1}, a enzima apresentou maior tempo de meia vida (cerca de 50 minutos). Já em presença de NaCl 2,5 mol L^{-1} ocorreu um forte efeito estabilizante sobre a atividade da enzima a 70 ºC e, após 120 minutos de incubação, Bxcg ainda mantinha 67% da sua atividade controle. Este efeito estabilizante do sal também foi observado na temperatura de 75 ºC (**Fig. 18C**). Pode-se observar que na ausência de sal e na presença de NaCl 0,5 mol L^{-1}, a atividade da enzima diminuiu abruptamente a 75 ºC, atingindo cerca de 5 % da atividade controle após 10 minutos de incubação. Em contraste, Bxcg apresentou um tempo de meia vida de cerca de 25 minutos em presença de NaCl em concentração 2,5 mol L^{-1}.

A estabilidade térmica de Bxcg também foi avaliada a 50 °C por períodos prolongados de incubação, na ausência e na presença de NaCl (**Fig. 18**). Pode-se observar que Bxcg mostrou excelente estabilidade a 50 ºC por até 24 horas, tanto na ausência quanto na presença de NaCl em ambas as concentrações testadas, mantendo cerca de 90% da sua atividade inicial.

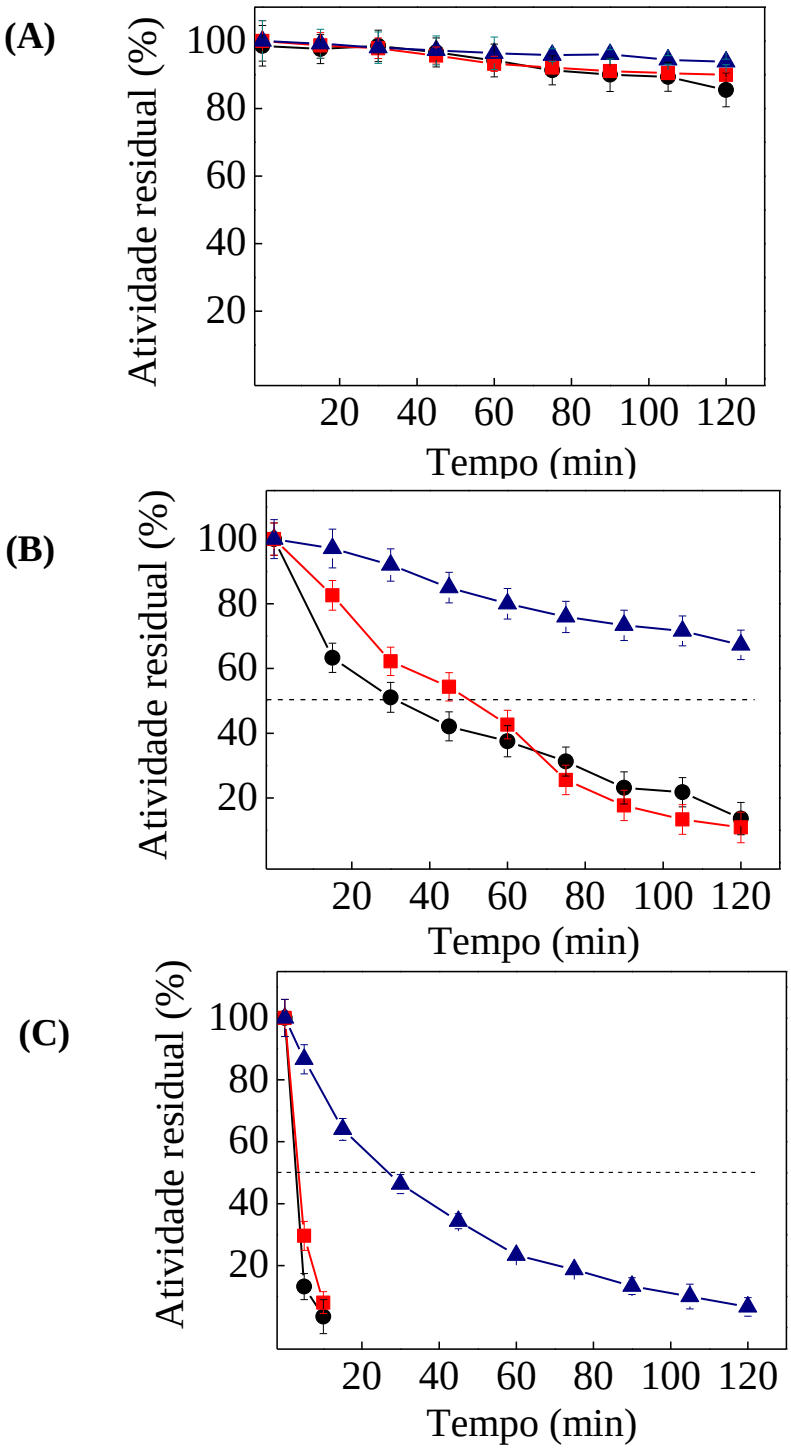


Figura 17. Estabilidade térmica de Bxcg em diferentes temperaturas na ausência e presença de NaCl.

A enzima convenientemente diluída foi incubada por 120 minutos a 65 ºC **(A)**, 70 ºC **(B)** e 75 ºC **(C)** na ausência (●) e presença de NaCl em concentração 0,5 mol L^{-1} (■) e 2,5 mol L^{-1} (▲). A atividade residual foi determinada a 65 °C na ausência de NaCl, conforme descrito em Material e métodos. Os controles (100%) corresponderam a 286,9 ± 10,3 U mg^{-1} **(A)**, 287,4 ± 9,8 U mg^{-1} **(B)** e 292,3 ± 11,2 U mg^{-1} **(C)**.

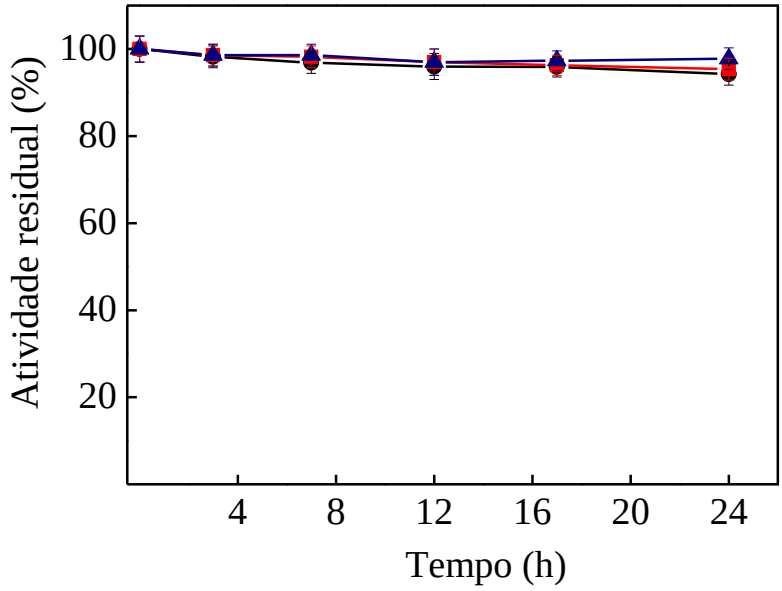


Figura 18. Estabilidade térmica de Bxcg a 50 ºC em períodos longos de incubação. A enzima convenientemente diluída foi incubada a 50 ºC por até 24 horas na ausência (●) e presença de NaCl em concentração 0,5 mol L^{-1} (■) e 2,5 mol L^{-1} (▲). A atividade residual foi determinada a 65 °C, na ausência de NaCl, conforme descrito em Material e métodos. A atividade controle (100%) correspondeu a 294,7 ± 10,4 U mg^{-1}.

Bxcg mostrou-se mais termoestável que várias ß-xilosidases de outros fungos mesófilos, tais como aquelas produzidas por *A. carbonarus* (KISS e KISS, 2000), *Aspergillus tamarii* (EL-GINDY et al., 2015), *Aspergillus versicolor* (ANDRADE et al. 2004) e *A. nidulans* (KUMAR e RAMÓN et al., 1996). De modo semelhante, quando comparada às ß-xilosidases de fungos termófilos, Bxcg mostrou uma melhor termoestabilidade que as enzimas de *S. thermophilum* (ZANOELO et al., 2004) e *H. grisea var. thermoidea* (ALMEIDA et al., 1995), que apresentaram tempos de meia vida de 11 minutos a 65 ºC e 26 minutos a 60 °C, respectivamente.

Visando a aplicação da enzima purificada em processos de sacarificação da biomassa lignocelulósica, a excelente termoestabilidade de Bxcg, especialmente a 50 °C, é uma característica particularmente interessante, uma vez que estes processos são comumente conduzidos em temperatura na faixa de 45 a 50 ºC. Além disso, o uso de enzimas termoestáveis em processos industriais apresenta uma série de vantagens, tais como a diminuição dos riscos de contaminação microbiana em temperaturas elevadas, a possibilidade de armazenamento e transporte das enzimas à temperatura ambiente e a

minimização da reposição enzimática durante o processo, diminuindo custos (BHALLA et al., 2013).

Em relação às β-xilosidases halotolerantes nenhum relato foi encontrado até o momento, no que diz respeito ao efeito de NaCl sobre a sua termoestabilidade. No entanto, aumento da termoestabilidade em presença de concentração elevada de sal também foi descrito para uma β-glucosidase halofílica de *Bacillus* sp. SJ-10 (LEE, J. et al., 2015) e para uma xilanase halofílica de *Zunongwangia profunda* (LIU et al., 2014). Além disso, em contraste ao observado para Bxcg, NaCl em concentração de 0,5 mol L^{-1} teve pequeno efeito prejudicial sobre a termoestabilidade da xilanase halotolerante de *C. graminicola* (CARLI, 2016), comparando-se à condição de ausência de sal.

5.3.5. Determinação de parâmetros termodinâmicos da inativação térmica de Bxcg

Estudos de estabilidade térmica de Bxcg mostraram um aumento da estabilidade da enzima quando incubada em presença de concentrações elevadas de sal (**Fig. 18, item 5.3.4**). Porém, os mecanismos físico-químicos subjacentes a este efeito ainda não são bem compreendidos. Assim, tornou-se relevante investigar o efeito do sal sobre os parâmetros termodinâmicos do processo de inativação térmica de Bxcg.

Os parâmetros termodinâmicos energia livre de Gibb's (ΔG), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) para a inativação térmica são marcadores confiáveis da estabilidade das proteínas, de modo que um menor valor de ΔG indica uma menor estabilidade da enzima (LEE, J. et al., 2015). De uma maneira geral, a desnaturação térmica das enzimas resulta da quebra das interações fracas, tais como ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas, levando a um aumento no valor de ΔH. Além disso, o desdobramento da estrutura da enzima durante o processo de desnaturação térmica resulta num aumento no valor de ΔS (LEE, J. et al., 2015).

A **Figura 19** mostra as curvas de inativação térmica de Bxcg na ausência e na presença de NaCl e os valores de k_i foram estimados assumindo cinética de primeira ordem. O gráfico de Arrhenius para a inativação térmica de Bxcg na ausência e na presença de NaCl é mostrado na **Figura 20** e os valores de E_d foram estimados a partir do coeficiente angular das retas obtidas.

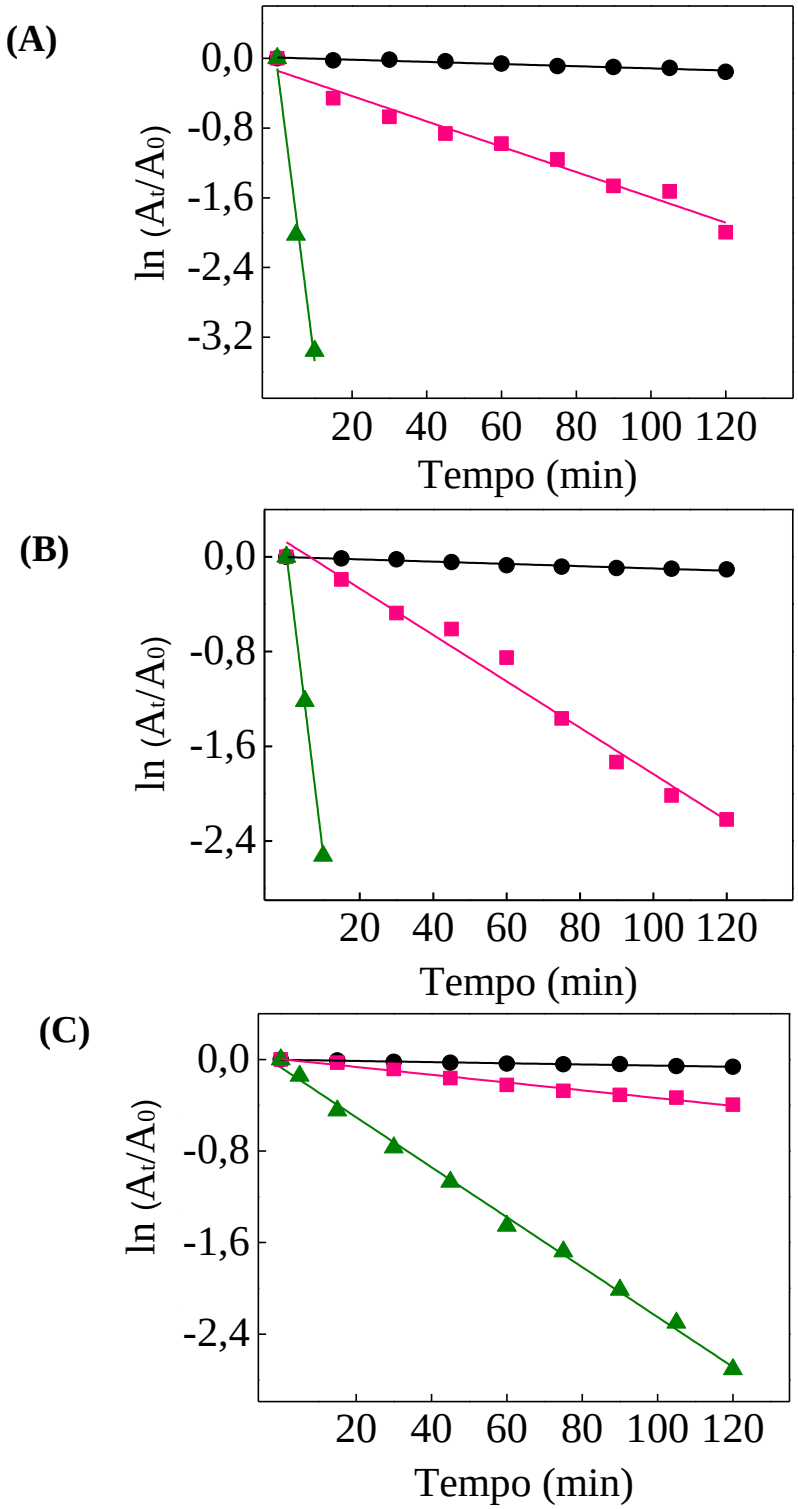


Figura 19. Curvas de inativação térmica de Bxcg na ausência e na presença de NaCl. A enzima foi diluída em água e incubada por até 120 minutos a 65 ºC (●), 70 ºC (■) e 75 ºC (▲), na ausência **(A)** e na presença de NaCl em concentração 0,5 mol L^{-1} **(B)** e 2,5 mol L^{-1} **(C)**.

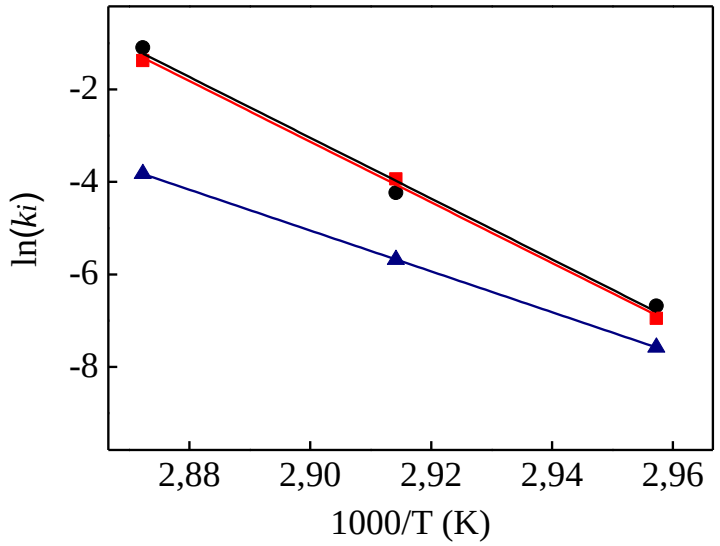


Figura 20. Gráfico de Arrhenius para a inativação térmica de Bxcg na ausência e na presença de NaCl.

Os valores de k_i foram determinados a partir da **Figura 19**, conforme descrito em Material e métodos. Símbolos: (●) na ausência de NaCl, (■) na presença de NaCl em concentração 0,5 mol L^{-1} e (▲) 2,5 mol L^{-1}.

Na **Tabela 3** estão reunidos os parâmetros termodinâmicos determinados para a inativação térmica de Bxcg na ausência e na presença de sal. Pode-se observar que os valores de ΔH, ΔS e ΔG para a inativação térmica de Bxcg em presença de NaCl em concentração 0,5 mol L^{-1} foram muito semelhantes aos parâmetros termodinâmicos determinados na ausência de sal. De fato, a presença de sal nessa concentração não teve efeito estabilizante sobre a enzima, conforme observado anteriormente (**Fig. 18, item 5.3.4**). Em contraste, em presença de NaCl em concentração 2,5 mol L^{-1} foi observada uma diminuição dos valores de ΔH e ΔS, se comparados à condição de ausência de sal. Além disso, os valores de ΔG foram levemente maiores na presença de sal nesta concentração elevada, indicando que Bxcg é mais estável nessa condição, em concordância com os resultados apresentados anteriormente (**Fig. 18, item 5.3.4**).

Tabela 3. Parâmetros termodinâmicos para a inativação térmica de Bxcg na ausência e presença de NaCl

NaCl (mol L^{-1})	Temperatura (K)	ΔH (kJ mol^{-1})	ΔG (kJ mol^{-1})	ΔS (J $K^{-1}mol^{-1}$)
0	338,15	544,15	113,8	1273,60
0	343,15	544,11	108,2	1270,31
0	348,15	544,06	100,7	1273,80
0,5	338,15	542,86	113,48	1269,81
0,5	343,15	542,82	108,20	1266,57
0,5	348,15	542,78	100,73	1269,71
2,5	338,15	364,60	116,00	735,20
2,5	343,15	364,56	113,82	730,72
2,5	348,15	364,50	108,64	734,96

Os parâmetros termodinâmicos foram calculados a partir dos resultados mostrados nas **Figuras 19 e 20**, utilizando as equações descritas em Material e métodos.

Similarmente ao observado para Bxcg, o aumento da estabilidade térmica de outras enzimas também foi acompanhado pela redução nos valores de ΔH e ΔS (URABE et al., 1973; MATTHEWS et al., 1987; MUNCH e TRITSCH D, 1990; LEE, J. et al., 2015). De uma maneira geral, acredita-se que a diminuição de ΔS em presença de NaCl em alta concentração pode ser devida à mudanças conformacionais da enzima, de modo a reforçar as interações hidrofóbicas e/ou minimizar a repulsão entre grupos carregados adjacentes, diminuindo a flexibilidade e estabilizando as enzimas quando incubadas em presença de concentrações elevadas de sal (LEE, J. et al., 2015). Dessa forma, o aumento da termoestabilidade de Bxcg pode ser atribuído a mudanças conformacionais da enzima em temperaturas elevadas, na presença de NaCl 2,5 mol L^{-1}.

5.3.6. Estabilidade ao pH de Bxcg na ausência e presença de NaCl

A estabilidade ao pH de Bxcg na ausência e presença de NaCl é mostrada na **Figura 21**. A enzima purificada mostrou-se estável na faixa de pH entre 4,0 e 7,5, na ausência de sal, mantendo no mínimo cerca de 87% da sua atividade controle. Entretanto, em valores de pH acima e abaixo desta faixa, a atividade diminuiu, atingindo cerca de 56% e 70% do controle em pH 3,0 e 8,0, respectivamente. Já em presença de NaCl (em concentrações 0,5 e 2,5 mol L^{-1}), Bxcg apresentou uma melhor estabilidade em pHs mais alcalinos, mantendo cerca de 97% da sua atividade em pH 8,0. Em contraste, a sua estabilidade foi prejudicada na faixa de pH de 3,0 a 4,0, quando comparada àquela observada na ausência de sal.

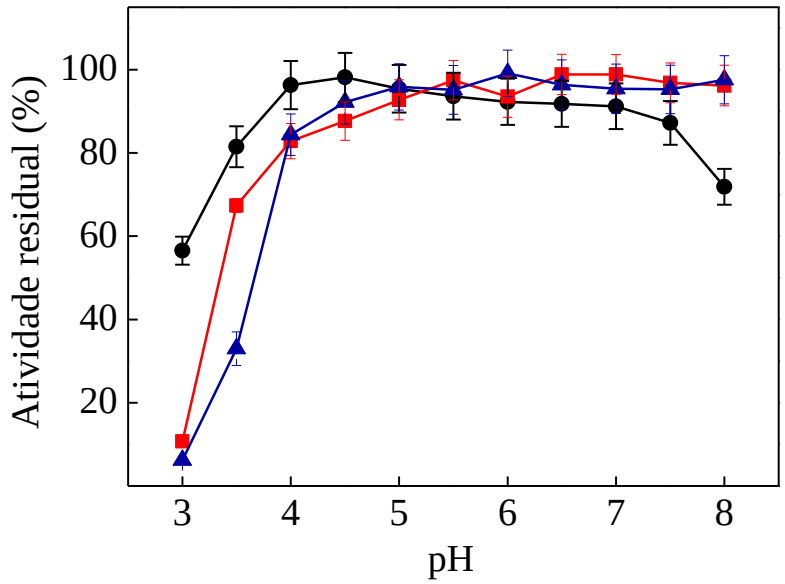


Figura 21. Estabilidade ao pH de Bxcg na ausência e presença de NaCl.
A enzima foi diluída em tampão McIlvaine (pH 3,0 a 8,0) e incubada por 24 horas a 4 ºC, na ausência (●) e presença de NaCl em concentração 0,5 mol L^{-1} (■) e 2,5 mol L^{-1} (▲). A atividade residual foi determinada a 65 °C, em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 4,5, empregando *p*NP-XIL como substrato, conforme descrito em Material e métodos. O controle (100%) correspondeu a 283,1± 12,1 $U.mg^{-1}$.

Similarmente a Bxcg, algumas ß-xilosidases fúngicas descritas são estáveis no mesmo intervalo de pH (KISS e KISS, 2000; RIZZATTI et al., 2001; MICHELIN, et al., 2012). Em contraste, outras ß-xilosidases apresentam estabilidade em faixas estreitas de pH, frequentemente mais alcalinas, tais como as enzimas de *P. thermophila* (YAN et al., 2008), *T. thermophilus* (GUERFALI et al., 2008) e *S. thermophile* (KATAPODIS et al., 2006). A excelente estabilidade de Bxcg entre pH 4,0 e 5,0 é uma propriedade interessante visando à sua aplicação em processos de hidrólise de materiais lignocelulósicos, geralmente conduzidos nessa faixa de pH. Além disso, em muitos processos industriais há etapas em que as enzimas podem ser expostas temporariamente a valores de pH muito diferentes do seu pH ótimo de reação, podendo ser inativadas. Assim, a boa estabilidade de Bxcg numa ampla faixa de pH (4,0 - 7,5) também é uma característica interessante da enzima para aplicações biotecnológicas em geral.

Até o momento, nenhum relato foi encontrado na literatura no que diz respeito ao efeito de NaCl sobre a estabilidade ao pH de β-xilosidases halotolerantes. Entretanto, de modo similar ao observado para Bxcg, a presença de NaCl teve um efeito desestabilizante sobre a xilanase halotolerante de *C. graminicola* (CARLI, 2016) em condições mais ácidas de pH.

As alterações nos perfis de estabilidade ao pH de Bxcg em presença de concentrações elevadas de sal podem ser atribuídas a mudanças nos valores de pKa das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da superfície da enzima. Em condições de extrema salinidade, o processo de dessolvatação da enzima pode provocar o aumento nos valores de pKa das cadeias laterais dos resíduos ácidos, bem como a diminuição nos valores de pKa das cadeias laterais dos resíduos básicos da superfície da enzima, no sentido de favorecer sua forma neutra destes grupos (ELCOCK e MCCAMMON, 1998). Assim, a desestabilização de Bxcg em pHs mais ácidos, em altas concentrações de sal, pode estar relacionada ao aumento dos valores de pKa dos grupos ácidos, ocasionando ruptura de interações iônicas que seriam importantes para a estabilidade da enzima. Da mesma forma, a maior estabilidade de Bxcg em pHs mais alcalinos na presença de altas concentrações de sal pode estar relacionada à diminuição dos valores de pKa dos grupos básicos, diminuindo forças de repulsão entre grupos carregados adjacentes que, na ausência de sal, poderiam desestabilizar a enzima.

5.3.7. Especificidade de substrato de Bxcg

A especificidade de substrato da enzima purificada foi analisada empregando diferentes substratos sintéticos e naturais (**Tabela 4**). Em relação aos substratos sintéticos, Bxcg mostrou alta especificidade para *p*NP-XIL, porém hidrolisou também todos os outros substratos com ligações glicosídicas em configuração β, como *p*NP-β-D-Glucopiranosídeo e *p*NP-β-D-Galactopiranosídeo, que foram hidrolisados com velocidades cerca de 15-12 vezes menores, se comparados ao *p*NP-XIL. Além disso, a enzima purificada foi capaz de hidrolisar substratos com ligações glicosídicas em configuração α, como *p*NP-α-L-Arabinofuranosídeo e *p*NP-α-L-Arabinopiranosídeo, com atividades cerca de 4,2 e 5,2 vezes menores, respectivamente, em relação ao *p*NP-XIL. Entretanto, Bxcg não hidrolisou *p*NP-α-D-Xilopiranosídeo e *p*NP-α-D-Manopiranosídeo, sugerindo que a enzima seja capaz de hidrolisar substratos com ligações glicosídicas em configuração α desde que apresentem L-arabinose.

Bxcg mostrou alta especificidade para a hidrólise de xilobiose, seu substrato natural. Além disso, a enzima foi capaz de hidrolisar as diferentes xilanas testadas (*beechwood*, *birchwood* e *oat spelt*), porém com menores velocidades, se comparadas a xilobiose. Entretanto, celobiose ou substratos poliméricos com monômeros de glicose ligados entre si por ligações glicosídicas em configuração β-1,4, como CMC e Avicel, não foram hidrolisados por Bxcg.

Tabela 4. Especificidade de substrato de Bxcg

Substratos sintéticos	**Atividade (%)**	**Tipo de ligação**
*p*NP-β-D-Xilopiranosídeo	100 ± 1,2	D-Xilose β-1
*p*NP-β-D-Glucopiranosídeo	6,5 ± 0,32	D-Gilose β-1
*p*NP-β-D-Galactopiranosídeo	3,8 ± 0,08	D-Galactose β-1
*o*NP-β-D-Galactopiranosídeo	1,5 ± 0,19	D-Galactose β-1
*p*NP-β-D-Fucopiranosídeo	0,50 ± 0,02	D-Fucose β-1
*p*NP- β-D-Manopiranosídeo	0,03 ± 0,005	D-Manose β-1
*p*NP-α-L-Arabinofuranosídeo	23,8 ± 0,8	L-Arabinofuranose α-1
*p*NP-α-L-Arabinopiranosídeo	19,3 ± 0,7	L-Arabinopiranose α-1
*p*NP-α-D-Xilopiranosídeo	0	D-Xilose α-1
*p*NP-α-D-Manopiranosídeo	0	D-Manose α-1
Substratos naturais	**Atividade (%)**	**Tipo de ligação**
Xilobiose	100,0 ± 2,3	D-Xilose β-1,4
Xilana *beechwood*	0,16 ± 0,05	D-Xilose β-1,4
Xilana *birchwood*	0,17 ± 0,03	D-Xilose β-1,4
Xilana *oat spelt*	0,12 ± 0,07	D-Xilose β-1,4
Celobiose	0	D-Glicose β-1,4
CMC	0	D-Glicose β-1,4
Avicel	0	D-Glicose β-1,4

A atividade foi determinada a 65 °C, em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 4,5, conforme descrito em Material e métodos. A hidrólise dos substratos, em concentração final 5 mmol L^{-1} e/ou 1% (m/v), foi acompanhada por até 2 horas. Os controles (100%) corresponderam a 284,1 ± 11,3 U mg^{-1} para *p*NP-β-D-Xilopiranosídeo e 322,0 ± 9,6 U mg^{-1} para xilobiose.

Similarmente ao observado para Bxcg, boa atividade sobre diferentes substratos sintéticos, especialmente sobre *p*NP-α-L-Arabinofuranosídeo e *p*NP-α-L-Arabinopiranosídeo, também foi descrita para muitas ß-xilosidases fúngicas (XIMENES et al.,1996; LI, Y. et al., 2000; KISS e KISS, 2000; ANDRADE et al., 2004; KATAPODIS et al., 2004; WAKIYAMA et al., 2008; YAN et al., 2008; KNOB e CARMONA, 2012; MICHELIN et al., 2012). Essa atividade elevada que algumas ß-xilosidases apresentam sobre o substrato *p*NP-α-L-Arabinofuranosídeo deve-se

principalmente à semelhança espacial entre os monossacarídeos D-xilopiranose e L-arabinofuranose, de modo que ambos podem ser acomodados no sítio ativo das enzimas (MAI et al. 2000; LEE, R. et al. 2003; JORDAN e LI, 2007; HUY et al., 2013).

Em relação aos substratos naturais, a maioria das ß-xilosidades já purificadas não apresenta atividade hidrolítica sobre substratos poliméricos (RIZZATTI et al., 2001; ZANOELO et al., 2004; YAN et al., 2008). Entretanto, de modo similar a Bxcg, uma ß-xilosidade de *Aspergillus ochraceus* é capaz de liberar xilose a partir de xilana (MICHELIN et al., 2012).

Estes resultados mostraram que Bxcg possui uma ampla especificidade de substrato, considerando-se os substratos sintéticos. Entretanto, tem grande preferência por substratos contendo resíduos de xilose, quando se trata de substratos naturais. Além disso, devido à alta atividade sobre o substrato *p*NP-α-L-Arabinofuranosídeo, Bxcg pode ser considerada uma enzima bifuncional, ou seja, uma β-D-xilosidase/α-L-arabinofuranosidase. Os bons níveis de atividade de β-xilosidase e α-L-arabinofuranosidase representam uma característica muito interessante de Bxcg para a hidrólise de xilanas substituídas.

5.3.8. Determinação dos parâmetros cinéticos para a hidrólise de *p*NP-XIL por Bxcg na ausência e presença de NaCl

O efeito de concentrações crescentes de *p*NP-XIL sobre a atividade de Bxcg na ausência e presença de NaCl está apresentado na **Figura 22**. Em todas as condições, foram observadas curvas simples de saturação e a estimulação da atividade pelo substrato ocorreu segundo cinética Michaeliana.

Um resumo dos parâmetros cinéticos obtidos para a hidrólise de *p*NP-XIL por Bxcg na ausência e presença de NaCl está apresentado na **Tabela 5**. Na ausência de sal, os parâmetros cinéticos determinados para a hidrólise de *p*NP-XIL foram $V_{máx}$ de 348,8 ± 11,5 U mg^{-1} e K_M de 0,52 ± 0,02 mmol L^{-1}, resultando numa eficiência catalítica de 1432,7 ± 47,3 L $mmol^{-1}$ s^{-1}. Na presença de NaCl, entretanto, a afinidade aparente de Bxcg pelo substrato foi levemente menor com valores de K_M de 0,59 ± 0,02 mmol L^{-1} e 0,57 ± 0,03 mmol L^{-1} nas concentrações de sal de 0,5 e 2,5 mol L^{-1}, respectivamente. Em relação à velocidade máxima, a atividade máxima na presença de NaCl em concentração

0,5 mol L^{-1} o valor de $V_{máx}$ foi de 306,5 ± 12,8 U mg^{-1}, resultando numa eficiência catalítica 1,3 vezes menor que a determinada na ausência de sal. Já na presença de NaCl em concentração 2,5 mol L^{-1}, o valor de $V_{máx}$ foi 1,5 vezes menor e em função disso, a eficiência catalítica determinada foi cerca 1,6 de vezes menor que aquela determinada na ausência do sal.

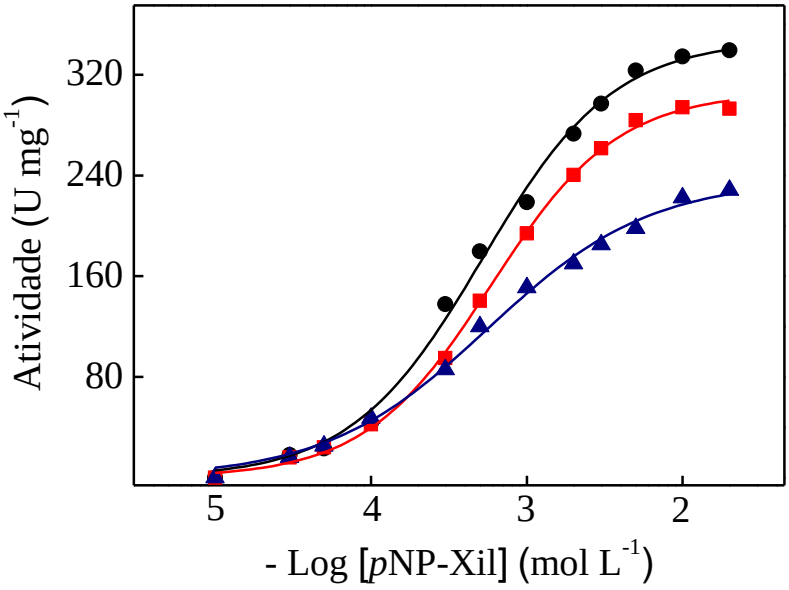


Figura 22. Efeito de concentrações crescentes de *p*NP-XIL sobre a atividade de Bxcg. A atividade foi determinada a 65°C, em tampão acetato de sódio, pH 4,5, contendo concentrações crescentes de *p*NP-XIL, na ausência (●) e na presença de NaCl em concentração 0,5 mol L^{-1} (■) e 2,5 mol L^{-1} (▲), conforme descrito em Material e métodos.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos para a hidrólise de *p*NP-XIL por Bxcg na ausência e presença de NaCl

[NaCl] (mol L^{-1})	K_M (mmol L^{-1})	$V_{máx}$ (U mg^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M (L $mmol^{-1}$ s^{-1})
0	0,52 ± 0,02	348,8 ± 11,5	747,6 ± 24,7	1432,7 ± 47,3
0,5	0,59 ± 0,02	306,5 ± 12,8	656,9 ± 27,6	1109,1 ± 46,6
2,5	0,57 ± 0,03	238,1 ± 11,9	510,3 ± 25,5	892,2 ± 44,6

Em geral, Bxcg apresenta alta eficiência catalítica para a hidrólise de *p*NP-XIL quando comparada às ß-xilosidases fúngicas já descritas **(Tabela 6)**. Afinidades aparentes por *p*NP-XIL cerca de 1,7 e 2,6 maior que a estimada para Bxcg foram descritas para as ß-xilosidase de *Aspergillus japonicus* (WAKIYAMA et al., 2008) e de *A. carbonarus* (KISS e KISS, 2000), porém a hidrólise do substrato ocorreu com baixa $V_{máx}$, resultando em eficiência catalítica cerca de 2,1 e 47 vezes menor que a estimada para Bxcg. Em contraste, as β-xilosidases de *A. versicolor* (ANDRADE et al., 2004) apresentaram valores de eficiência catalítica cerca de 2 e 8 vezes maiores que a estimada para Bxcg.

Considerando as β-xilosidases halotolerantes, nenhum relato foi encontrado na literatura, até o momento, no que diz respeito à determinação dos parâmetros cinéticos para a hidrólise de *p*NP-XIL em presença de NaCl. No entanto, similarmente ao observado para Bxcg, os parâmetros cinéticos determinados para a hidrólise de xilana *beechwood* pela xilanase de *C. graminicola* (CARLI, 2016) foram levemente alterados pela presença de sal, com aumento de K_M e diminuição de $V_{máx}$, resultando em menor eficiência catalítica.

A eficiência catalítica para a hidrólise de *p*NP-XIL por Bxcg pode ser considerada elevada mesmo em presença de NaCl, quando comparada às outras ß-xilosidase já descritas (**Tabela 6)**, o que é uma característica muito interessante visando à aplicação da enzima em processos biotecnológicos conduzidos em concentrações salinas elevadas.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos para hidrólise de *p*NP-XIL por outras β-xilosidases fúngicas

Organismo	K_M (mmol L^{-1})	$V_{máx}$ (U mg^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M (L $mmol^{-1}$ s^{-1})	Referência
	0,52	348,8	747,6	1432,7	
C. graminicola	0,59 (a)	306,5 (a)	656,9 (a)	1109,1(a)	Este trabalho
	0,57 (b)	238,1 (b)	510,3 (b)	892,2 (b)	
P. sclerotirum	0,78	0,5	1,2	1,6	KNOB e CARMONA, 2012
A. japonicus	0,31	114,0	215,1	685,0	WAKIYAMA et al., 2008
S. thermophile	1,10	114,0	899,3	81,2	KATAPODIS et al.,2006
A. versicolor	0,32	922,0	922,0	2881,3	ANDRADE et al., 2004
A. versicolor	0,19	1346,0	2243,3	11807,0	ANDRADE et al., 2004
S. hermophilum	1,30	880,0	55,7	42,9	ZANOELO et al., 2006
F. proliferatum	0,77	75,0	114,0	148,1	SAHA, 2003
A. phoenicus	2,36	920,7	2025,5	858,3	RIZZATTI et al., 2001
A. carbonarus	0,20	3,6	6,1	30,6	KISS e KISS, 2000
A. nidulans	1,10	25,6	76,8	69,8	KUMAR e RAMÓN, 1996

(a) Parâmetros cinéticos determinados na presença de NaCl em concentração 0,5 mol L^{-1}

(b) Parâmetros cinéticos determinados na presença de NaCl em concentração 2,5 mol L^{-1}

5.3.9. Determinação dos parâmetros cinéticos para a hidrólise de *p*NP-α-L-arabinopiranosídeo por Bxcg

O efeito de concentrações crescentes de *p*NP-α-L-arabinopiranosídeo sobre a atividade de Bxcg está apresentado na **Figura 23**. Os parâmetros cinéticos determinados para a hidrólise de *p*NP-α-L-arabinopiranosídeo foram $V_{máx}$ de 148,4 ± 4,4 U mg^{-1} e K_M de 9,6 ± 0,5 mmol L^{-1}, resultando em eficiência catalítica de 33,1 ± 1,6 L $mmol^{-1}$ s^{-1}. Assim, Bxcg hidrolisou *p*NP-α-L-arabinopiranosídeo com afinidade aparente cerca de 18 vezes menor que a estimada para *p*NP-XIL e a hidrólise do substrato ocorreu com $V_{máx}$ cerca de 2,3 menor. A eficiência de utilização dos substratos (k_{cat}/K_M) comprova que *p*NP-XIL é um melhor substrato para Bxcg, se comparado a *p*NP-α-L-arabinopiranosídeo.

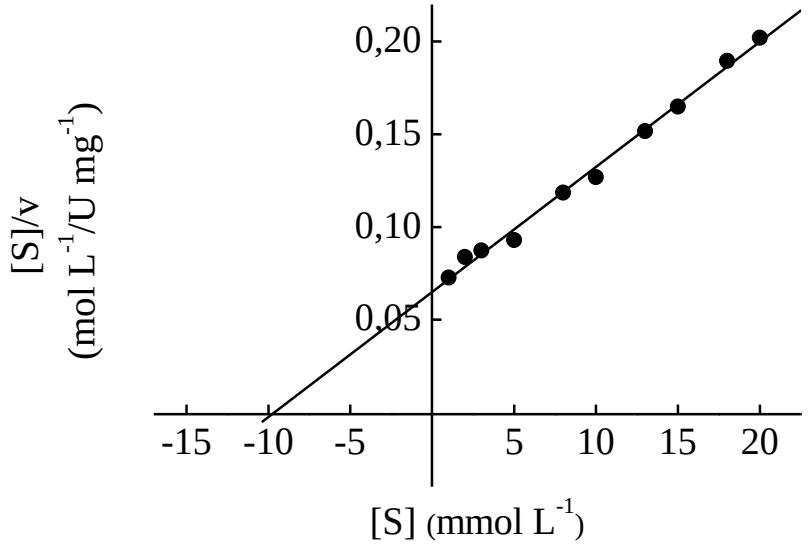


Figura 23. Representação de Hanes-Wolf para determinação dos parâmetros cinéticos para hidrolise de *p*NP-α-L-arabinopiranosídeo por Bxcg.

A atividade foi determinada a 65 °C, em tampão acetato de sódio, pH 4,5, contendo concentrações crescentes de *p*NP-α-L-arabinopiranosídeo, conforme descrito em Material e métodos.

Como citado anteriormente, apresentar atividade sobre os substratos *p*NP-α-L-arabinopiranosídeo e *p*NP-α-L-arabinofuranosídeo é uma característica muito comum entre as ß-xilosidases fúngicas já descritas (XIMENES et al.,1996; LI, Y. et al., 2000; KISS e KISS, 2000; ANDRADE et al., 2004; KATAPODIS et al., 2004; WAKIYAMA et al., 2008; YAN et al., 2008; KNOB e CARMONA, 2012; MICHELIN et al., 2012). Entretanto, poucos estudos foram realizados até o momento no que diz respeito à determinação dos parâmetros cinéticos para a hidrólise desses substratos. Uma ß-xilosidase de *A. carbonarus* (KISS e KISS, 2000) hidrolisou *p*NP-α-L-Arabinopiranosídeo com afinidade aparente cerca de 1,7 vezes maior que a estimada para Bxcg. Entretanto, a hidrólise ocorreu com $V_{máx}$ cerca de 23 vezes menor, resultando numa eficiência catalítica cerca de 17 vezes menor que aquela determinada para Bxcg. Já uma β-xlosidase heteróloga de *Aspergillus niger* ASKU28 expressa em *Pichia pastoris* (CHOENGPANYA et al., 2015) apresentou afinidade aparente pelo substrato cerca de 2,1 vezes maior que a determinada para Bxcg, porém a hidrolise ocorreu com baixa $V_{máx}$, resultando numa eficiência catalítica 1,3 vezes menor que a estimada para Bxcg. Assim, pode-se afirmar que Bxcg apresentou alta eficiência catalítica para a hidrólise de *p*NP-α-L-Arabinopiranosídeo, confirmando seu caráter bifuncional de β-xilosidase/α-L-arabinofuranosidase, característica interessante da enzima para a hidrólise de xilanas substituídas.

5.3.10. Efeito de íons metálicos e outros efetores sobre a atividade de Bxcg

O efeito de diferentes íons e outros efetores sobre a atividade ß-xilosidásica de Bxcg está apresentado na **Tabela 7**. A enzima mostrou-se tolerante à presença dos íons K^+, Na^+ Mn^{2+}, Mg^{2+}, Co^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, em ambas as concentrações testadas (1 e 5 mmol L^{-1}). Em contraste, Ni^{2+} e Sr^{2+} não afetaram a atividade enzimática na concentração mais baixa, porém tiveram efeito inibitório de cerca de 27% em concentração 10 mmol L^{-1}. Já os íons Fe^{3+} e Ag^+ (em concentração 1 mmol L^{-1}) inibiram fortemente a atividade em 76%, contrastando com Pb^{2+}, Cr^{3+} e Cu^{2+} com uma inibição de cerca de 40-25% da atividade controle. Além disso, a atividade foi fortemente inibida por Hg^{2+} na mesma concentração, com atividade residual de apenas 6%. EDTA e β-mercaptoetanol não apresentaram efeito

sobre a atividade β-xilosidásica. Entretanto, SDS (dodecil sulfato de sódio) em concentração 5 mmol L^{-1}, resultou na perda total da atividade de Bxcg.

Tabela 7. Efeito de íons e outros efetores sobre a atividade de Bxcg

Efetores	Atividade residual (%)	
	1 mmol L^{-1}	**5 mmol L^{-1}**
KCl	101,2	104,4
NaCl	98,3	101,5
$NiCl_2$	90,2	72,7
$MnCl_2$	95,1	93,9
$MgCl_2$	100,2	89,8
$HgCl_2$	6,3	0,0
$CoCl_2$	99,0	90,2
$CaCl_2$	105,6	91,2
$ZnCl_2$	96,8	88,1
$SrCl_2$	90,2	72,9
$FeCl_3$	26,3	12,2
$Pb(NO)_3$	58,5	20,5
$AgNO_3$	21,2	0,0
$Cr(NO_3)_3$	62,0	60,5
$Cu(SO_4)_2$	75,1	5,4
EDTA	102,7	93,2
SDS	91,2	0,0
β-mercaptoetanol	104,1	102,0

A atividade foi determinada a 65°C, em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 4,5, empregando *p*NP-XIL como substrato em presença dos efetores testados nas concentrações indicadas, conforme descrito em Material e métodos. A atividade controle (100%) foi determinada em ausência dos efetores testados e correspondeu a 290,7 ± 13,1 U mg^{-1}.

O efeito inibitório provocado por Fe^{3+}, Ag^{+}, Pb^{2+} e Cu^{2+} foi similar ao observado para outras ß-xilosidases fúngicas (KUMAR e RAMÓN, 1996; GUERFALI et al., 2008; YAN et al., 2008; EL-GINDY et al., 2015). A forte inibição por Hg^{2+} é uma característica comum a muitas ß-xilosidases, sendo descrita para a maioria dessas enzimas (RIZZATTI et al., 2001; ANDRADE et al., 2004; ZANOELO et al., 2008; MICHELIN, et al., 2012). Em contraste, Hg^{2+} em concentração até 25 mmol L^{-1} não afetou a atividade enzimática da ß-xilosidase de *Trichoderma koningil* G-39 (LI, Y. et al., 2000). O EDTA, um quelante de íons divalentes, não apresentou efeito inibitório, sugerindo que Bxcg não é uma metaloenzima, conforme observado para outras β-xilosidases já estudadas (ALMEIDA et al., 1995; YAN et al., 2008; MICHELIN, et al., 2012). Similarmente a Bxcg, outras ß-xilosidases não foram afetadas pela presença de ß-mercaptoetanol, porém foram inibidas por SDS (RIZZATTI et al., 2001; YAN et al., 2008; KNOB e CARMONA, 2012; MICHELIN et al., 2012). Entretanto, a β-xilosidase de *P. sclerotiorum* (KNOB e CARMONA, 2012) foi estimulada em aproximadamente 44% em presença de ß-mercaptoetanol em concentração 10 mmol L^{-1}.

5.3.11. Efeito de carboidratos sobre a atividade de Bxcg

O efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade da enzima purificada é mostrado na **Tabela 8**. A atividade de Bxcg não foi afetada pela maioria dos açúcares testados, nas concentrações 10 e 50 mmol L^{-1}. Entretanto, na maior concentração, a atividade foi fortemente inibida por xilose, com atividade residual de apenas 29%. Similarmente ao observado para Bxcg, a maioria das ß-xilosidases fúngicas são inibidas por xilose. Em contraste, xilose em concentrações até 200 mmol L^{-1} não afetou a atividade de uma ß-xilosidase de *S. thermophilum*, indicando alta tolerância desta enzima ao produto de sua ação (ZANOELO et al., 2004).

Tabela 8. Efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade de Bxcg

Carboidratos	Atividade Residual (%)	
	10 mmol L^{-1}	**50 mmol L^{-1}**
Glicose	91 ± 0,8	94 ± 1,0
Xilose	67 ± 1,2	29 ± 1,5
Galactose	91 ± 0,9	95 ± 1,1
Maltose	97 ± 1,1	95 ± 0,8
Sacarose	96 ± 0,8	87 ± 1,0
Manose	105 ± 1,5	84 ± 1,5
Frutose	102 ± 1,3	85 ± 1,2
Arabinose	95,9 ± 1,2	85 ± 1,1

A atividade foi determinada a 65°C, em tampão acetato de sódio, pH 4,5, empregando *p*NP-XIL como substrato em presença dos carboidratos testados nas concentrações indicadas, conforme descrito em Material e métodos. A atividade controle (100%) foi determinada em ausência dos carboidratos testados e correspondeu a 287,5 ± 7,9 U mg^{-1}.

5.3.12. Efeito de concentrações crescentes de xilose sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg

O efeito de concentrações crescentes de xilose sobre a hidrólise de *p*NP-XIL por Bxcg está apresentado na **Figura 24**. A enzima purificada manteve cerca de 50 % de sua atividade inicial em presença de xilose em concentração 30 mmol L^{-1}. Entretanto, acima de 100 mmol L^{-1} a atividade atingiu valores desprezíveis, se comparados ao controle. A análise da inibição empregando o tratamento gráfico proposto por Dixon revelou um valor de K_I estimado em 3,3 mmol L^{-1} (**Fig. 25**) e a inibição foi do tipo competitiva pura (**inserção da Fig. 25**).

Como citado anteriormente, a maioria das ß-xilosidases fúngicas são inibidas por xilose e apresentam constantes de inibição de 2 a 5 mmol L^{-1} (SAHA, 2001; SAHA 2003; ANDRADE et al., 2004). Em contraste, algumas β-xilosidases parecem ser tolerantes a xilose, como por exemplo, a ß-xilosidase de *P. thermophila* (YAN et al., 2008) com

constante de inibição de 139 mmol L^{-1}. Já a ß-xilosidase de *S. thermophilum* (ZANOELO et al., 2004) mostrou tolerância ao monossacarídeo em concentrações até 200 mmol L^{-1}.

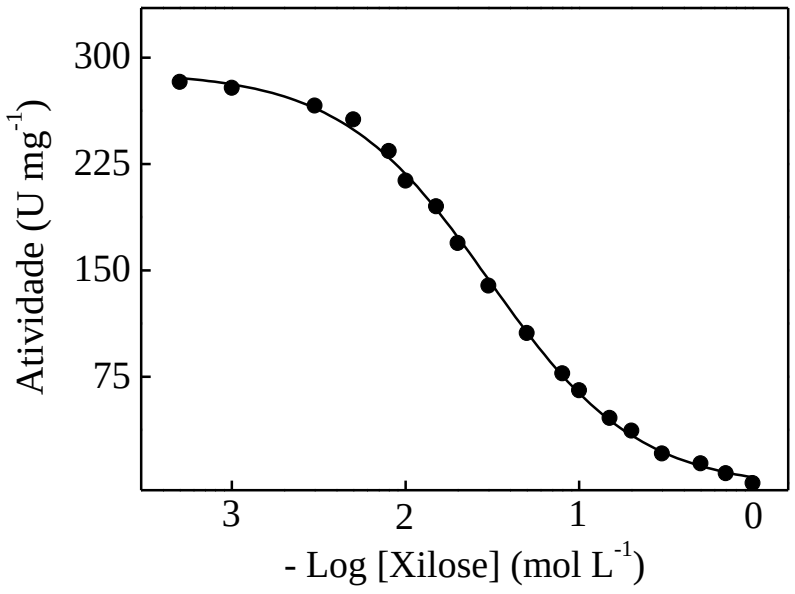


Figura 24. Inibição da atividade de Bxcg sobre *p*NP-XIL por xilose.

A atividade foi determinada a 65 °C, em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 4,5, empregando *p*NP-XIL como substrato e xilose na faixa de concentração de 0,05 a 1,0 mol L^{-1}, conforme descrito em Material e métodos.

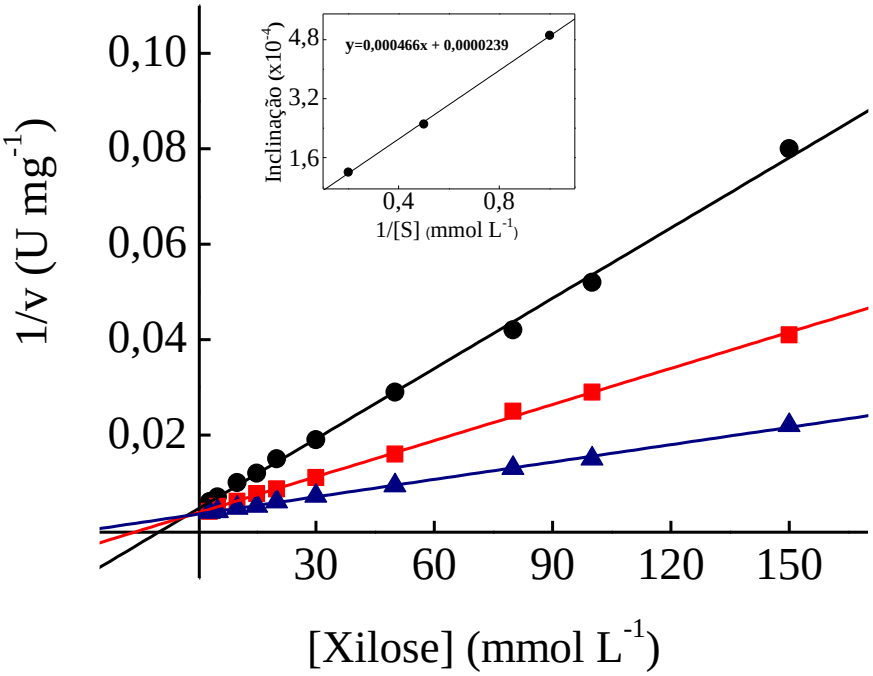


Figura 25. Gráfico de Dixon para a inibição da hidrolítica de Bxcg sobre *p*NP-XIL por xilose.

O efeito de concentrações crescentes de xilose (3 – 150 mmol L^{-1}) sobre a atividade foi estimado na presença de concentrações fixas de *p*NP-XIL: (●) 1 mmol L^{-1} (■) 2 mmol L^{-1} e (▲) 5 mmol L^{-1}. A atividade foi determinada a 65 °C, em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 4,5, conforme descrito em Material e métodos.

5.3.13. Efeito de diferentes solventes orgânicos, surfactantes e acetato de sódio sobre a atividade ß-xilosidásica de Bxcg

O efeito de diferentes solventes orgânicos, surfactantes e acetato de sódio sobre a atividade de Bxcg é mostrado na **Figura 26**. Bxcg mostrou-se tolerante aos solventes butanol, glicerol, tolueno e acetona em concentração de 5% (v/v). Entretanto, metanol e propanol inibiram a atividade enzimática em cerca de 25%, contrastando com o etanol, com inibição de cerca de 42% da atividade controle. Além disso, a enzima mostrou-se tolerante aos surfactantes Triton X-100, Tween 80 e Tween 20 em concentração de 5% (v/v), enquanto SDS, na mesma concentração, teve efeito inibitório de cerca de 36%.

Em presença de acetato de sódio 0,05 mol L^{-1}, Bxcg manteve 87% da sua atividade controle, enquanto que na maior concentração testada (200 mmol L^{-1}), a atividade foi inibida em cerca de 38%.

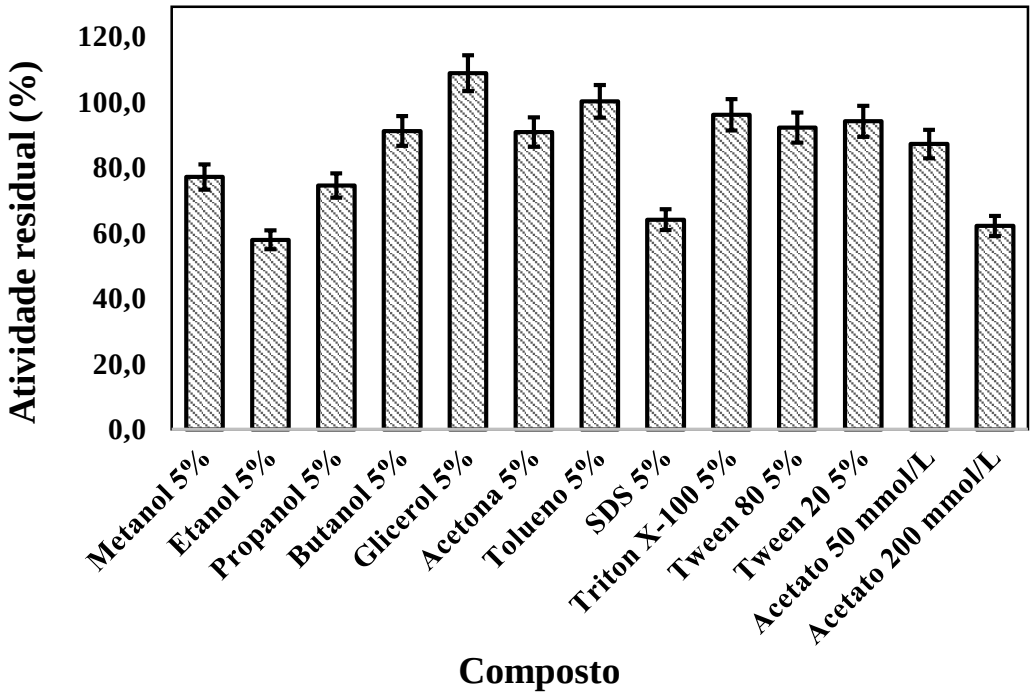


Figura 26. Efeito de diferentes solventes orgânicos, surfactantes e acetato de sódio sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg.

A atividade foi determinada a 50 ºC em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 4,5, empregando *p*NP-XIL como substrato e na presença dos compostos indicados na figura, nas concentrações informadas. A atividade controle (100%) foi determinada na ausência dos compostos testados e correspondeu a 117,2 ± 2,2 U mg^{-1}.

Até o momento, nenhum relato foi encontrado na literatura no que diz respeito ao efeito dos compostos testados sobre a atividade de β-xilosidases fúngicas. Entretanto, este efeito foi avaliado sobre a atividade de outras glicosil-hidrolases. Similarmente a Bxcg, a xilanase de *C. graminicola* (CARLI, 2016) mostrou-se tolerante a tolueno e acetona em concentração 5% (v/v), porém foi inibida em presença de glicerol e butanol, na mesma concentração. De modo similar ao observado para Bxcg, glicerol e Tween 20, em

concentração 5% (v/v), não afetaram a atividade de uma xilanase de *Bacillus* sp. SN5 (BAI et al., 2012). Já uma xilanase de *Chromohalobacter* sp. TPSV 101 (PRAKASH et al., 2012) foi inibida em cerca de 35% em presença dos surfactantes Triton X-100 e Tween 80 em concentração 1% (v/v).

É bem conhecido que a presença de solventes orgânicos no meio reacional resulta na redução da atividade de muitas das enzimas (DOUKYU e OGINO, 2010). Um dos fatores responsáveis por esta redução é o efeito que estes solventes polares exercem sobre a camada de hidratação da superfície da enzima, por um mecanismo similar ao descrito para o efeito de concentrações elevadas de sal (DOUKYU e OGINO, 2010; KARAN et al., 2012). Já os solventes menos polares e hidrofóbicos apresentam menor capacidade de remover as moléculas de água essenciais para a hidratação das enzimas, se comparados aos solventes hidrofílicos (SERDAKOWSKI e DORDICK, 2008; DOUKYU e OGINO, 2010). Em concordância, a atividade enzimática de Bxcg foi levemente inibida na presença de solventes orgânicos mais polares como metanol, etanol e propanol, enquanto que a presença de tolueno, um solvente orgânico apolar, não teve efeito sobre a atividade enzimática.

No que diz respeito aos surfactantes, eles podem ser classificados em iônicos (aniônicos e catiônicos) e não-iônicos de acordo com o seu grupo polar. Geralmente, os surfactantes não-iônicos, tais como Triton X-100, Tween 20 e Tween 80, não desnaturam as enzimas, o que é coerente com a ausência de efeito destes surfactantes sobre a atividade de Bxcg. Já os surfactantes iônicos, como o SDS, possuem maior capacidade de se ligar às proteínas, rompendo as interações fracas que mantém a estrutura nativa das enzimas e resultando em desnaturação, mesmo em concentrações relativamente baixas (OTZEN, 2011).

Nos últimos anos, é grande o interesse na identificação de enzimas lignocelulolíticas tolerantes à presença de concentrações residuais de solventes orgânicos e surfactantes utilizados nas etapas de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, o que permite reduzir o volume de água empregado em etapas de lavagem (DOUKYU e OGINO, 2010). Da mesma forma, são interessantes enzimas tolerantes ao ânion acetato, um subproduto da desacetilação das xilanas formado durante etapas de pré-tratamento alcalino da biomassa e que pode atingir concentrações de cerca de 25 a 200 mmol L^{-1} (MARTINEZ et al., 2001; MILLS et al., 2009; FERNANDEZ-SANDOVAL et al., 2012). Nesse contexto, a tolerância de Bxcg aos solventes orgânicos e surfactantes testados é

uma propriedade interessante para uma possível aplicação em processos de sacarificação de biomassa lignocelulósica pré-tratada, diminuindo a necessidade de etapas de lavagem.

5.3.14. Efeito do líquido iônico acetato de 1-etil-3-metilimidazólio sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg

O efeito de diferentes concentrações de [Emim][Ac] sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg é mostrado na **Figura 27**. A presença do LI [Emim][Ac] no meio reacional não afetou a atividade de Bxcg na concentração de 0,2 % (m/v). Em contraste, em concentrações acima de 0,5 % (m/v) a atividade de Bxcg foi fortemente inibida, atingindo uma atividade residual de apenas 27% em concentração 5 % (m/v).

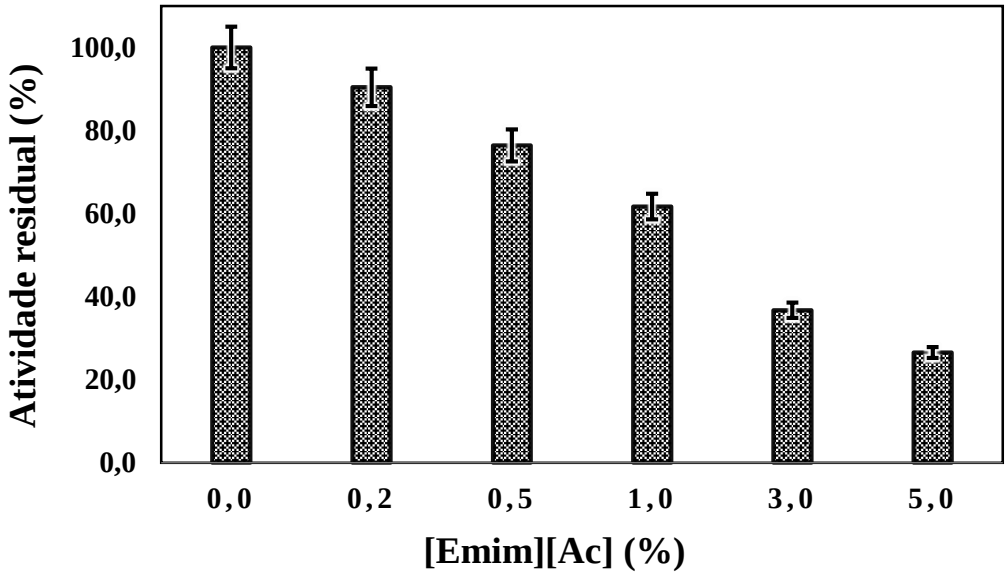


Figura 27. Efeito do líquido iônico [Emim][Ac] sobre a atividade β-xilosidásica de Bxcg.

A atividade foi determinada a 50 ºC em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 4,5, empregando *p*NP-XIL como substrato e [Emim][Ac] em concentrações crescentes, conforme descrito em Material e métodos. A atividade controle (100%) foi determinada na ausência do liquido iônico testado e correspondeu a 113,1 ± 1,9 U mg^{-1}.

Nenhum relato foi encontrado na literatura, até o momento, no que diz respeito ao efeito de líquidos iônicos sobre a atividade de β-xilosidases fúngicas. No entanto, essa característica tem sido explorada para diferentes glicosil hidrolases. De maneira similar ao observado para Bxcg, o líquido iônico [Emim][Ac] em concentração 5% (m/v) teve efeito inibitório (cerca de 20%) sobre a atividade de uma xilanase de *Dictyoglomus thermophilum* (LI, H et al., 2013). Em contraste, uma endoglucanase de *Pyrococcus horikoshii* (DATTA et al., 2010) manteve 95% da sua atividade controle em presença de [Emim][Ac] em concentração 20% (m/v).

A atividade e estabilidade das enzimas podem ser fortemente afetadas tanto pelo cátion quanto pelo ânion de um LI e também pelas suas propriedades físico-químicas, tais como polaridade, hidrofobicidade e viscosidade (NAUSHAD et al., 2012; ZHAO, H. 2016). Um dos principais fatores responsáveis pela redução da atividade enzimática está relacionado ao ânion do LI, devido às suas propriedades de nucleofilicidade e capacidade de formar ligações de hidrogênio (NAUSHAD et al., 2012; WAHLSTRÖM e SUURNÄKKI, 2015; ZHAO, H. 2016). Assim, ânions com alta capacidade de formar ligações de hidrogênio, tais como acetato, cloreto e formiato, podem interagir fortemente com a enzima, levando a mudanças conformacionais, que afetam negativamente a atividade enzimática (NAUSHAD et al., 2012; ZHAO, H. 2016).

Atualmente, as enzimas lignocelulolíticas tolerantes a níveis residuais de LIs utilizados nas etapas de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica também têm despertado o interesse da comunidade científica, visando reduzir o volume de água empregado em etapas de lavagem da biomassa pré-tratada. Embora Bxcg tenha sido fortemente inibida pela presença do LI [Emim][Ac], é importante ressaltar que as propriedades físico-químicas dos LIs variam amplamente dependendo da natureza do cátion e do ânion, bem como seus efeitos sobre a atividade enzimática, que podem ser positivos ou negativos. Assim, outros experimentos devem ser realizados empregando outros tipos de LIs a fim de avaliar com maior precisão a tolerância de Bxcg à presença de LIs no meio reacional.

5.4. Análise dos produtos de hidrólise de xilooligossacarídeos por Bxcg

A análise por CCD dos produtos formados por ação de Bxcg sobre uma mistura de xilooligossacarídeos na ausência e presença de NaCl está mostrada na **Figura 28**. Na ausência de sal, após 30 minutos de reação Bxcg hidrolisou completamente xilobiose (X2), com liberação de xilose (X1) como produto final (**Fig. 28A**). Além disso, pode-se observar que em tempos curtos de reação ocorreu a hidrólise parcial de xilotriose (X3), xilotriose com ramificação de ácido 4-O-metil-glucorônico (X3-O-MeGlu), xilotetraose (X4) e xilopentaose (X5). Após 9 horas de reação, verificou-se a hidrólise total de X3, X3-O-MeGlu e X4, enquanto que após tempos mais prolongados (24 horas) foi possível observar que Bxcg hidrolisou completamente xilopentaose (X5) e xilohexaose (X6). Além disso, a enzima aparentemente agiu exclusivamente pela remoção de xilose dos xilooligossacarídeos, uma vez que o produto final majoritário foi sempre xilose, independentemente do tempo de reação

O perfil de hidrólise obtido na presença de NaCl em concentração 0,5 mol L^{-1} foi muito semelhante àquele obtido na sua ausência (**Fig. 28B**), confirmando o potencial de aplicação de Bxcg em processos biotecnológicos conduzidos em condições de salinidade mais elevada.

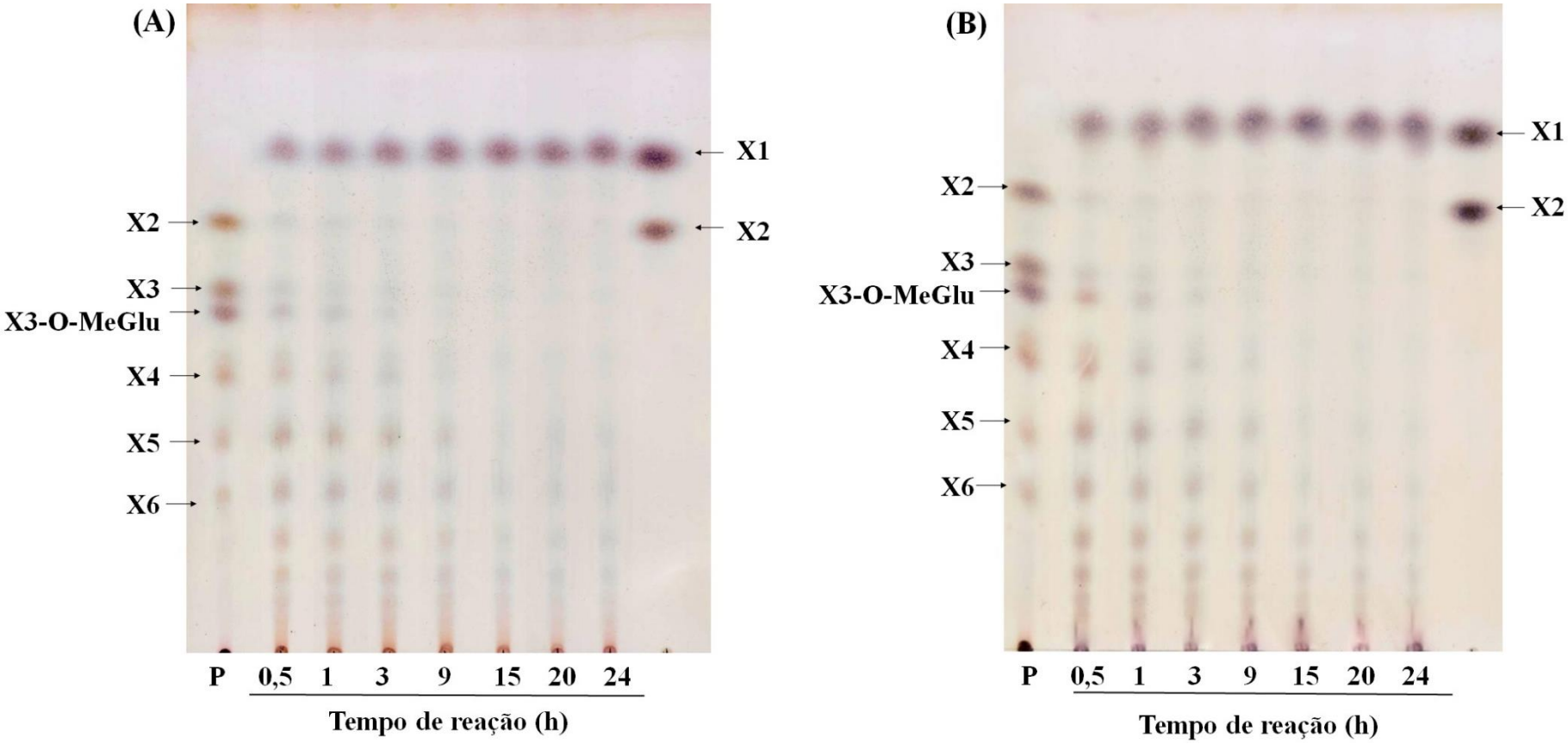


Figura 28. Padrão de hidrólise de xilooligossacarídeos por ação de Bxcg na ausência e na presença de NaCl.

As reações foram realizadas a 50 °C em tampão acetato de sódio, pH 5,0, contendo uma mistura de xilooligossacarídeos na ausência **(A)** e na presença de NaCl em concentração 0,5 mol L^{-1} **(B)**, empregando 1U de Bxcg, conforme descrito em Material e métodos. Padrões: (P) mistura de xilooligossacarídeos obtidos pela ação da xilanase Excg1 sobre xilana *beechwood* (X1, X2, X3, X3-O-MeGlu; X4, X5 e X6); X1 (1µL; 100 mmol L^{-1}) e X2 (2 µL;15 mmol L^{-1}).

Um comportamento semelhante ao observado para Bxcg foi descrito para uma ß-xilosidase de *F. proliferatum* (SAHA, 2003), que hidrolisou xilooligossacarídeos com até seis monômeros ligados. Em contraste, outras ß-xilosidases fúngicas descritas foram capazes de hidrolisar apenas xilooligossacarídeos contendo até três a quatro resíduos de xilose (RIZZATTI et al., 2001; ANDRADE et al., 2004). Por outro lado, não foram encontrados relatos na literatura, até o momento, sobre o efeito de NaCl sobre o padrão de hidrólise de xilooligossacarídeos por β-xilosidases fúngicas.

5.5. Ação conjunta de Bxcg e Excg1 na hidrólise de xilana *beechwood*

Visando avaliar o potencial de aplicação da enzima purificada para compor coquetes enzimáticos para a hidrólise da biomassa lignocelulósica, investigou-se o sinergismo entre Bxcg e a endo-xilanase halotolerante (Excg1; CARLI, 2016) produzida por *C. graminicola* para a hidrólise de xilana *beechwood*.

A análise por CCD dos produtos formados por ação conjunta de Bxcg e Excg 1 sobre xilana *beechwood* está mostrada na **Figura 29**. Na ausência de Bxcg, os produtos resultantes da ação de Excg1 sobre xilana *beechwood*, após 24 horas de reação, foram X2, X3-O-MeGlu e vestígios de X1 (**Fig. 29A**). No que diz respeito à ação de Bxcg, o único produto formado foi X1. Pode-se observar ainda que Bxcg foi capaz de hidrolisar xilana *beechwood* somente após tempos longos de reação (acima de 9 horas). Um forte efeito sinérgico foi observado entre Bxcg e Excg1 no que diz respeito à liberação de xilose (**Fig. 29C**). Após 1 hora de reação os principais produtos formados foram X1 e xilooligossacarídeos de X2 até X4. Já após 9 horas de reação ocorreu a hidrólise de X2 e xilooligossacarídeos maiores, resultando em aumento da concentração de X1. Porém, até esse intervalo de tempo a concentração de X3-O-MeGlu permaneceu praticamente constante. Em tempos maiores de reação, entretanto, este oligossacarídeo também foi hidrolisado, e após 24 horas de reação observou-se a hidrólise completa dos xilooligossacarídeos a xilose.

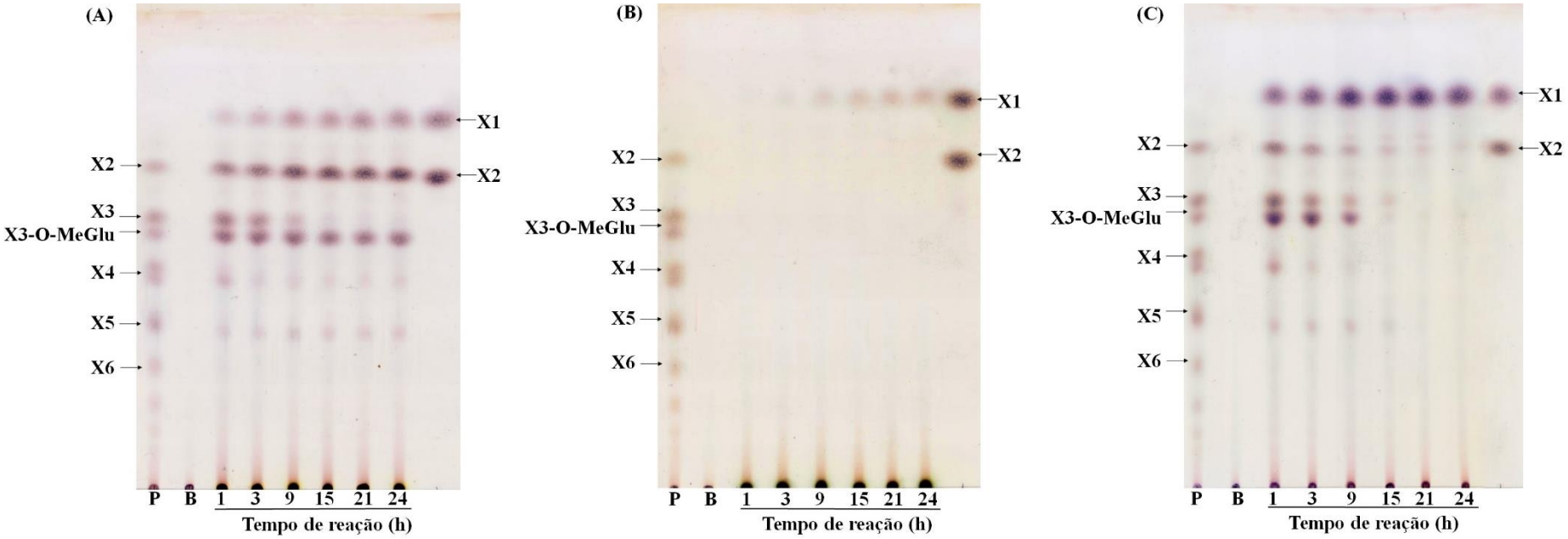


Figura 29. Hidrólise de xilana *beechwood* por ação conjunta de Bxcg e Excg1 na ausência e na presença de NaCl.

As reações foram realizadas a 50 °C em tampão acetato de sódio, pH 5,0, contendo xilana beechwood, empregando 5U de Excg1 **(A)**, 1U de Bxcg **(B)** e uma mistura de 5U de Excg1 e 1U de Bxcg **(C)**, conforme descrito em Material e métodos. Padrões: P: mistura de xilooligossacarídeos obtidos pela ação da xilanase Excg1 sobre xilana *beechwood* (X1, X2, X3, X3-O-MeGlu; X4, X5 e X6); X1 (1µL; 100 mmol L^{-1}) e X2 (2 µL; 15 mmol L^{-1}).

Na ausência de Bxcg, a concentração final de xilose liberada pela ação de Excg1 sobre a xilana *beechwood* após 24 horas de reação foi de 1,29 mg mL^{-1}, enquanto que a ação de Bxcg, nas mesmas condições e na ausência de Exg1, resultou numa concentração final de xilose de apenas 0,31 mg mL^{-1}. Já a ação conjunta de Bxcg e Excg1 resultou numa concentração final de xilose de 5,01 mg mL^{-1}. Desta forma, a ação simultânea de Bxcg e Exg1 sobre xilana *beechwood* resultou num efeito sinérgico de 3,1 vezes, no que diz respeito à liberação de xilose (**Tabela 9**). Esses resultados reforçam aqueles obtidos na análise por análise por CCD.

O efeito de NaCl em concentração 0,5 mol L^{-1} sobre o padrão de hidrólise de xilana *beechwood* por ação conjunta de Bxcg e Excg1 também foi avaliado por CCD, como mostrado na **Figura 30**. Pode-se observar que o perfil de hidrólise obtido na presença do sal foi muito semelhante àquele obtido na sua ausência. O grau de sinergismo entre Bxcg e Exg1 sobre a xilana *beechwood* em presença de NaCl 0,5 mol L^{-1} também não foi alterado pela presença de sal (**Tabela 9**), confirmando o potencial de aplicação da enzima em processos biotecnológicos conduzidos em condições de salinidade elevada.

Tabela 9. Ação sinérgica de Bxcg e Excg1 na hidrólise de xilana *beechwood* na ausência e na presença de NaCl

Enzima	Ausência de NaCl		Presença de NaCl 0,5 mol L^{-1}	
	[Xilose] (mg mL^{-1})	Sinergismo	[Xilose] (mg mL^{-1})	Sinergismo
Excg1	1,29	-	1,15	-
Bxcg	0,31	-	0,28	-
Bxcg + Excg1	5,01	3,13	4,29	3,00

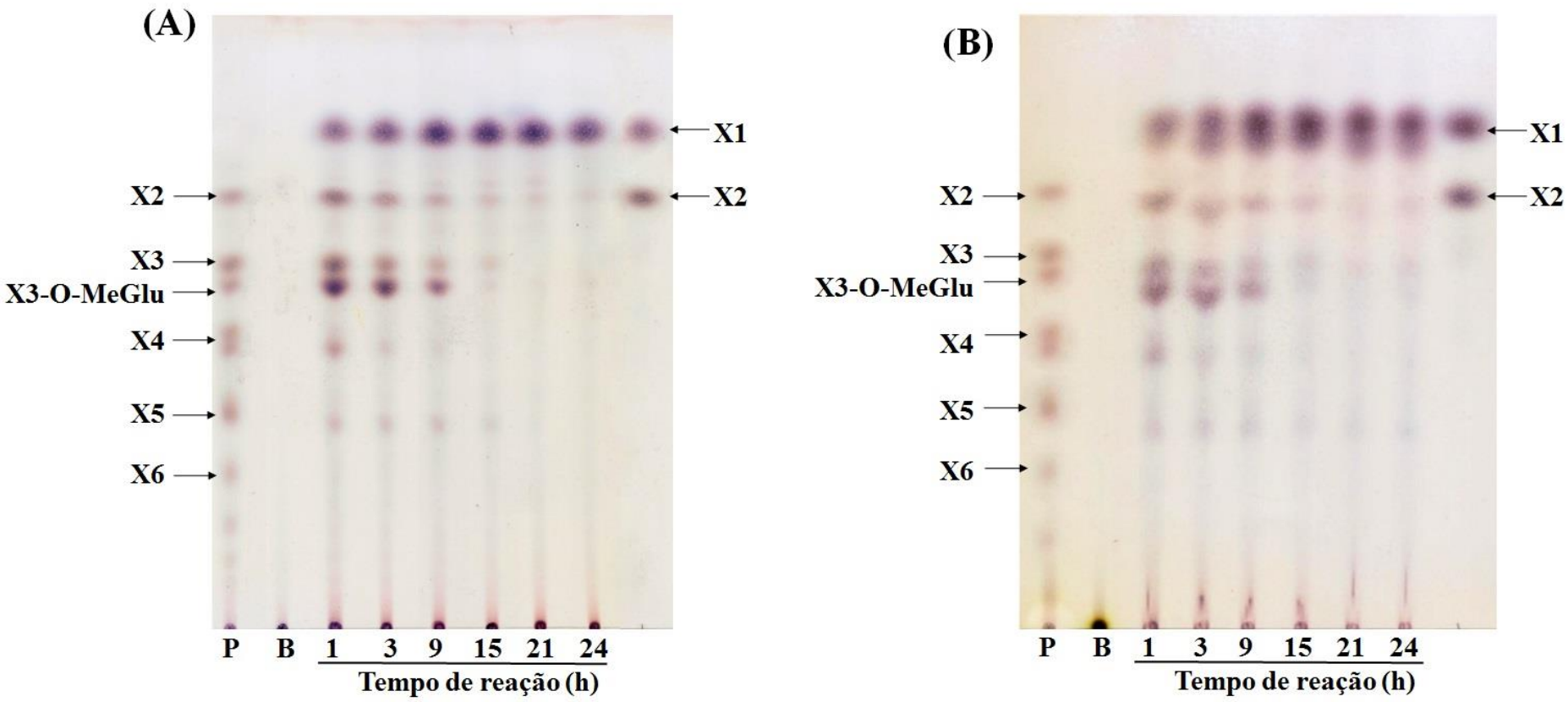


Figura 30. Hidrólise de xilana *beechwood* por ação conjunta de Exg1 e Bxcg na ausência e na presença de NaCl.

As reações foram realizadas a 50 °C em tampão acetato de sódio pH 5,0, contendo xilana *beechwood* na ausência de NaCl **(A)** e na presença de NaCl em concentração 0,5 mol L^{-1} **(B)**, empregando uma mistura de 5U de Excg1 e 1U de Bxcg, conforme descrito em Material e métodos. Padrões: P: mistura de xilooligossacarídeos obtidos pela ação da xilanase Excg1 sobre a xilana *beechwood* (X1, X2, X3, X3-O-MeGlu; X4, X5 e X6); X1 (1µL; 100 mmol L^{-1}) e X2 (2 µL;15 mmol L^{-1}).

É bem conhecido que um efeito sinérgico entre as enzimas xilanolíticas é essencial para a hidrólise completa e eficiente das hemiceluloses. Similarmente aos resultados obtidos neste trabalho outros autores reportaram a ação sinérgica de ß-xilosidases e endo-xilanases para a hidrólise de xilanas de diferentes fontes, visando à produção de xilose (SØRENSEN et al., 2003; YANG et al., 2014; CHOENGPANYA et al., 2015; HUY et al., 2015). Esse forte efeito sinérgico tem sido atribuído à ação das β-xilosidases sobre xilooligossacarídeos e xilobiose, conhecidos inibidores das endo-xilanases, permitindo assim uma hidrólise mais eficiente da xilana (KNOB et al., 2010; YANG et al., 2014; HUY et al., 2015;). Em relação à ação sinérgica das enzimas xilanolíticas em presença de concentrações elevadas de sal, um único relato foi encontrado na literatura, até o momento. Nesse estudo, HASHIMOTO e NAKATA (2003) relataram um efeito sinérgico para a hidrólise de arabinoxilana em presença de NaCl em concentração 3,0 mol L^{-1} pela ação conjunta de uma ß-xilosidase, uma endo-xilanase e uma α-L-arabinofuranosidase produzidas por uma linhagem de *A. oryzae*.

6. Conclusões

- O protocolo experimental padronizado para a purificação de uma ß-xilosidase majoritária produzida por uma linhagem de *C. graminicola* mostrou-se eficiente, envolvendo pequeno número de passos e apresentando bom rendimento.

- Bxcg apresentou propriedades promissoras para aplicações biotecnológicas em geral, tais como elevada estabilidade térmica, alta eficiência catalítica para a hidrólise de *p*NP-XIL e boa estabilidade numa ampla faixa de pH.

- O pH ótimo na faixa de 4,0-5,0, bem como a estabilidade da enzima nesse intervalo de pH e a boa termoestabilidade a 50 ºC por longos períodos de incubação são propriedades atraentes para aplicação da enzima em processos de sacarificação da biomassa lignocelulósica, geralmente conduzidos nessas condições.

- A enzima purificada mostrou boa tolerância a concentrações elevadas de sal, além de boa estabilidades nessas condições.

- O padrão de hidrólise de xilooligossacarídeos não foram alterados pela presença de NaCl 0,5 mol L^{-1}, concentração próxima daquela encontrada na água do mar.

- A termoestabilidade da enzima foi aumentada em presença de sal em concentração 2,5 mol L^{-1}. Assim, Bxcg apresenta propriedades atraentes para aplicação em processos biotecnológicos conduzidos em elevadas concentrações salinas ou naqueles em que se pretende utilizar a água do mar em substituição água doce e potável.

- Bxcg mostrou boa tolerância a níveis residuais de solventes orgânicos e surfactantes não-iônicos, comumente utilizados em etapas de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, sugerindo que a enzima também pode ser empregada em processos de sacarificação de biomassa pré-tratada, reduzindo os gastos e o consumo de água nas etapas de lavagem da biomassa.

- Bxcg apresenta atividade bifuncional de β-xilosidase/α-L-arabinofuranosidase, hidrolisando *p*NP-Arabinopiranosídeo com alta eficiência catalítica

- Bxcg hidrolisou eficientemente xilooligossacarídeos até xilohexaose, bem como xilotriose com ramificação de 4-O-metil-glucorônico.

- Bxcg e uma a endo-xilanase produzida pelo mesmo microrganismo mostraram forte sinergismo para a hidrólise de xilana *beechwood*, liberando xilose. O grau de sinergismo e o padrão de hidrólise de xilana *beechwood* não foram alterados pela presença de NaCl 0,5 mol L^{-1}.

- Em conjunto, as propriedades apresentadas por Bxcg sugerem bom potencial de aplicação em processos biotecnológicos realizados em concentrações salinas elevadas ou naqueles em que se possa utilizar água do mar em substituição a água doce, bem como em processos de sacarificação da biomassa pré-tratada, reduzindo gastos e consumo de água em etapas de lavagem.

7. Referências bibliográficas

ACOSTA-RODRIGUES, I.; PIÑÓN-ESCOBEDO, C.; ZAVALA-PÁRAMO, M. A. G.; LÓPEZ-ROMERO, E.; CANO-CAMACHO, H. Degradation of celulose by the beanpathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Production of extracellular cellulolytic enzymes by cellulose induction. **Antonie. Van. Leeuwenhoek.,** 87, 301-310, 2005.

ALMEIDA, E. M.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A. Purification and biochemical characterization of β-xylosidase from *Humicola grisea var. thermoidea.* **FEMS Microbiol. Lett.,** 130, 71-176, 1995.

ANDRADE, S. V.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A. Effect of carbon source on the biochemical properties of β-xylosidases produced by *Aspergillus versicolor.* **Process Biochem.,** 39,1931-1938, 2004.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresour. Technol.,** 101, 4851-4861, 2010.

BADGUJAR, K.C.; BHANAGE, B. M. Factors governing dissolution process of lignocellulosic biomass in ionic liquid: Current status, overview and challenges. **Bioresour. Technol.,** 178, 2-18, 2015.

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.

BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renew. Sust. Energ. Rev.,** 36, 91-106, 2014.

BERGMEYER, H.U.; BERNT, E. In: Methods of enzymatic analysis (Bergmeyer, H.U. ed.), Verlag/Academic Press. New York, vol.3, pp. 1205-1215, 1974

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.

BOSETTO, A.; JUSTO, P. I.; ZANARDI, B.; VENZON, S. S.; GRACIANO, L.; SANTOS, E. L.; SIMÃO, R. C. G. Research Progress Concerning Fungal and Bacterial β-Xylosidases. **Appl. Biochem. Biotechnol.,** 178, 766-795, 2016.

BRUYNE, C. K.; LOONTIENS, F. G. A fluorigenic substrate for β-D-xylosidase. **Kurze Originalmitteilungen,** 52, 661, 1965.

CARLI, S. Purificação, caracterização bioquímica e potencial de aplicação biotecnológica de uma xilanase halotolerante e termoestável de Colletotrichum graminicola. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

CECCHINI, D. A.; FAURÉ R.; LAVILLE E.; POTOCKI-VERONESE, G. Biochemical identification of the catalytic residues of a glycoside hydrolase family 120 β-xylosidase, involved in xylooligosaccharide metabolisation by gut bacteria. **FEBS Lett.,** 589, 3098-3106, 2015.

CHANG, K.; CHEN, X.; HAN, Y.; WANG, X.; POTPROMMANEE, L.; NING, X.; LIU, J.; SUN, J., PENG, Y.; SUN, S.; LIN, Y. Synergistic effects of surfactant-assisted ionic liquid pretreatment rice straw. **Bioresour. Technol.,** 214, 371-375, 2016.

CHAWACHART, N.; ANBARASAN, S.; TURUNEN, S.; LI, H.; KHANONGNUCH, C.; HUMMEL, M.; SIXTA, H.; GRANSTRO, T.; LUMYONG, S.; TURUNEN, O. Thermal behaviour and tolerance to ionic liquid [emim]OAc in GH10 xylanase from *Thermoascus aurantiacus* SL16W. **Extremophiles,** 18, 1023-1034, 2014.

CHEN, H.; FU, X. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. Renew. Sust. Energ. Rev., 57, 468-478, 2016.

CHOENGPANYA, K.; ARTHORNTHURASUK, S.; WATTANA-AMORN, P.; HUANG, W.; PLENGMUANKHAE, W.; LI, Y.; KONGSAEREE, P. T. Cloning, expression and characterization of β-xylosidase from *Aspergillus niger* ASKU28. **Protein. Expres. Purif.,** 115, 132–14, 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.

da COSTA LOPES, A.; JOÃO, K. G.; MORAIS, A. R. C.; BOGEL-ŁUKASIK, E.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Ionic liquids as a tool for lignocellulosic biomass fractionation. ***Sustain Chem. Processes***., 1, 3, 2013.

de MARIA, P. D. On the Use of Seawater as Reaction Media for Large-Scale Applications in Biorefineries. **Chem. Cat. Chem.,** 5, 1643-1648, 2013.

DATTA S., HOLMES B., PARK J. I., CHEN Z., DIBBLE D. C., HADI M., BLANCH H. W., SIMMONS B. A., SAPRA R. Ionic liquid tolerant hyperthermophilic cellulases for biomass pretreatment and hydrolysis. **Green Chem.,** 12, 338, 2010.

DAVIS, B. J. Disc electrophoresis - II Method and application to human serum proteins. **Ann. N.Y. Acad. Sci.,** 121:404-427, 1964.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy,** 1, 2-17, 2009.

DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochem. Eng. J.,** 48, 270-282, 2010.

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, 350-356, 1956.

ELCOCK, A. H; MCCAMMON, J. A. Electrostatic contributions to the stability of halophilic proteins. **J. Mol. Biol.,** 280, 731-748, 1998.

ENGEL, P.; KRULL, S.; SEIFERHELD, B.; SPIESS, A. C. Rational approach to optimize cellulase mixtures for hydrolysis of regenerated cellulose containing residual ionic liquid. **Bioresour. Technol.,** 115, 27-34, 2012.

ELGHARBAWY, A. A.; ALAM, M. Z.; MONIRUZZAMAN, M.; GOTO, M. Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Biochem. Eng. J.,** 109, 252-267, 2016.

EL-GINDY, A. A.; SAAD, R. R.; FAWZI, E. M. Purification of β-xylosidase from *Aspergillus tamarii* using ground oats and a possible application on the fermented hydrolysate by Pichia stipitis. **Ann. Microbiol.,** 65, 965-974, 2015.

FANG, C.; THOMSEN, M. H.; BRUDECKI, G. P.; CYBULSKA, I.; FRANKÆR, C. G.; BASTIDAS-OYANEDEL, J.; 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.

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.

FONSECA-MALDONADO, R.; VIEIRA, D. S.; ALPONTI, J. S.; BONNEIL, E.; THIBAULT, 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.,** 60, 560–571, 1988.

GAO, Z.; RUAN, L.; CHEN, X.; ZHANG, Y.; XU, X. A novel salt-tolerant endo-β-1,4-glucanase Cel5A in *Vibrio* sp. G21 isolated from mangrove soil. **Appl. Microbiol. Biotechnol.,** 87, 1373-1382, 2010.

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.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresour. Technol.,** 101, 4775-4800, 2010.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energ Policy,** 36, 2086-2097, 2008.

GUERFALI, M.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. *Talaromyces thermophilus* β-D-Xylosidase: Purification, Characterization and Xylobiose Synthesis. **Appl. Biochem. Biotechnol.,** 150, 267-279, 2008.

GUPTA, K. M.; JIANG, J. Cellulose dissolution and regeneration in ionic liquids: A computational perspective. **Chem. Eng. Sci.,** 121,180-189, 2015.

HASHIMOTO, T.; NAKATA, Y. Synergistic Degradation of Arabinoxylan Xylanase and β-Xylosidase from with α-L0Arabinofuranosidase, Soy Sauce Koji Mold, *Aspergillus oryzae*, in High Salt Condition. **J. Biosci. Bioeng.,** 95, 164-169, 2003.

HASHIMOTO, T.; MORISHITA, M.; IWASHITA, K.; SHIMOI, H.; NAKATA, Y.; TSUJI, Y.; ITO, K. Production and some properties of salt-tolerant β-xylosidases from a Shoyu Koji Mold, *Aspergillus oryzae* in solid and liquid cultures. **J. Biosci. Bioeng.,** 88, 479-483, 1999.

HEBERT, P. D.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS, C. M. Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biol.,** 2, 312, 2004.

HONG, J.; TAMAKI, H.; YAMAMOTO, K.; KUMAGAI, H. Cloning of a gene encoding thermostable cellobiohydrolase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. **Appl. Microbiol. Biotechnol**., 63, 42-50, 2003.

HU, J.; ARANTES V.; PRIBOWO A.; SADDLER J. N.The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a "cellulase mixture" but is highly substrate specific. **Biotechnol. Biofuels,** 6, 112, 2013.

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. Biotechn.,** 25, 662-671, 2015.

HUY, N. D.; NGUYEN, C.L.; SEO, J. W.; KIM, D.; PARK, S. Putative endoglucanase PcGH5 from *Phanerochaete chrysosporium* is a β-xylosidase that cleaves xylans in synergistic action with endo-xylanase**. J. Biosci. Bioeng.,** 119, 416-420, 2015.

HUY, N. D.; THAYUMANAVAN, P.; KWON, T.; PARK1, S. Characterization of a recombinant bifunctional xylosidase/arabinofuranosidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **J. Biosci. Bioeng.,** 116, 152-159, 2013.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polym. Chem.,** 6, 4497-4559, 2015.

JIA, L.; GONÇALVES, G. A. L.; TAKASUGI, Y.; MORI, Y.; NODA, S.; TANAKA, T.; ICHINOSE, H.; KAMIYA, N. Effect of pretreatment methods on the synergism of cellulase and xylanase during the hydrolysis of bagasse. **Bioresour. Technol.,** 185, 158-164, 2015.

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.

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.

JORDAN, D. B.; LI, X. Variation in relative substrate specificity of bifunctional β-D-xylosidase/α-L-arabinofuranosidase by single-site mutations: Roles of substrate distortion and recognition. **Biochim. Biophys. Acta**, 1774, 1192-1198, 2007.

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.

KATAPODIS, P.; NERINCKX, W.; CLAEYSSENS, M.; CHRISTAKOPOULOS, P. Purification and characterization of a thermostable intracellular β-xylosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. **Process Biochem.,** 41, 2402-2409, 2006.

KIM, H.; AHN, Y.; KWAK, S. Comparing the influence of acetate and chloride anions on the structure of ionic liquid pretreated lignocellulosic biomass. **Biomass Bioenergy,** 93, 243-253, 2016.

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.

KIRIKYALI N., CONNERTON I. F. Xylan Degrading Enzymes from Fungal Sources. **J. Proteomics Enzymol.,** 4, 1, 2015.

KING, B. C. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. **Biotechnol. Biofuels.,** 4, 4, 2011.

KISS, T.; KISS, L. Purification and characterization of an extracellular β-D-xylosidase from *Aspergillus carbonarius*. **World J. Microbiol. Biotechnol.,** 16, 465-470, 2000.

KNOB, A.; CARMONA, E.C. Purification and properties of an acid β-xylosidase from *Penicillium sclerotiorum*. **Ann. Microbiol.,** 62, 501-508, 2012.

KNOB, A.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. β-Xylosidases from filamentous fungi: an overview. **World J. Microbiol. Biotechnol.,** 26, 389-407, 2010.

KUMAR, S.; RAMÓN, D. Purification and regulation of the synthesis of a β-xylosidase from *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiol. Lett**., 135, 287-293, 1996.

LAEMMILI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of he 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, R. C.; HRMOVA, M; BURTON, R. A.; LAHNSTEIN, J.; FINCHER, G. B. Bifunctional Family 3 Glycoside Hydrolases from Barley with α-L-Arabinofuranosidase and β-D-Xylosidase Activity: CHARACTERIZATION, PRIMARY STRUCTURES, AND COOH-TERMINAL PROCESSING. **J. Biol. Chem.,** 278, 5377-5387, 2003.

LEE, J. M.; KIM, Y.; KIM, J, K.; JEONG, G.; HA, J.; KONG, I. Characterization of salt-tolerant β-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.Á.; 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, H.; KANKAANPÄÄ, A.; XIONG, H.; HUMMEL, M.; SIXTA, H.; OJAMO, H.; TURUNEN, O. Thermostabilization of extremophilic *Dictyoglomus thermophilum* GH11 xylanase by an N-terminal disulfide bridge and the effect of ionic liquid [emim]OAc on the enzymatic performance. **Enzyme Microb. Technol.,** 53, 414-419, 2013.

LI, K.; WAN, J.; WANG, X.; WANG, J.; ZHANG, J. Comparison of dilute acid and alkali pretreatments in production of fermentable sugars from bamboo: Effect of Tween 80. **Ind. Crop. Prod.,** 83, 414-422, 2016.

LI, Y.; YAO, H.; CHO, Y. Effective induction, purification and characterization of *Trichoderma koningii* G-39 β-xylosidase with high transferase activity. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 31, 119, 2000.

LIGUORI, R.; AMORE, A.; FARACO, V. Waste valorization by biotechnological conversion into added value products. **Appl. Microbiol. Biotechnol.,** 97, 6129-6147, 2013.

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.

MAI, V.; WIEGEL, J.; LORENZ, W. W. Cloning, sequencing, and characterization of the bifunctional xylosidase–arabinosidase from the anaerobic thermophile *Thermoanaerobacter ethanolicus*. **Gene,** 247,137-143, 2000.

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.

MAURYA, D. P.; SINGLA, A.; NEGI, S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. **3 Biotech.,** 5, 597-609, 2015.

MATTHEWS B. W., NICHOLSON H., BECKTEL W. J. Enhanced protein thermostability from site directed mutations that decrease the entropy of unfolding. **Proc. Nati. Acad. Sci.,** 84, 6663–6667, 1987.

MCILVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. **J. Biol. Chem.,** 49, 183-186, 1921.

MESQUITA, J. F.; FERRAZ, A.; AGUIAR, A. Alkaline-sulfite pretreatment and use of surfactants during enzymatic hydrolysis to enhance ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioprocess Biosyst. Eng.,** 39, 441-448, 2015.

MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; SILVA, T. M.; JORGE, J. A.; TERENZI, H. F.; Teixeira, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. A novel xylan degrading β-D-xylosidase: purification and biochemical characterization. **World J. Microbiol. Biotechnol.,** 28, 3179-3186, 2012.

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.

MUNCH O.; TRITSCH D. Irreversible thermoinactivation of glucoamylase from *Aspergillus niger* and thermostabilization by chemical modification of carboxyl groups. **Biochim. Biophys. Acta**, 1041, 111–116, 1990.

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.

NAUSHAD, M.; ALOTHMAN, Z. A.; KHAN, A. B.; ALI, M. Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: A review. **Int. J. Biol. Macromol.,** 51, 555-560, 2012.

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric-focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using coomassie brilliant blue G-250 and R-250. **Electrophoresis,** 9, 255-262, 1988.

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.; ALVARADOBALDERRAMA, 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.; SCHULZELEFERT, 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 Genetics,** 44, 1060-1067, 2012.

OTZEN, D. Protein–surfactant interactions: A tale of many states. **Biochim. Biophys. Acta**, 1814, 562-591, 2011.

PANDEY, A. K.; NEGI, S. Impact of surfactant assisted acid and alkali pretreatment on lignocellulosic structure of pine foliage and optimization of its saccharification parameters using response surface methodology. **Biores. Technol**., 192,115-125, 2015.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of stylosanthes a Ærst report. **Mycologia**, 85, 362-364, 1993.

PRAKASH, B.; VIDYASAGAR, M.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Purification and some properties of low-molecular-weight extreme halophilic xylanase from *Chromohalobacter* sp. TPSV 101**. J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 74, 192-198, 2012.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENZI, 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.

QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C. E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Biores. Technol**., 101, 9624-9630, 2010.
QING, Q.; WYMAN, C. E. Supplementation with xylanase and β-xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover. **Biotechnol. Biofuels**, 4, 18, 2011.

RAJ, T.; GAUR, R.; DIXIT, P.; GUPTA, R. P.; KAGDIYAL, V.; KUMAR, R.; TULI, D. K. Ionic liquid pretreatment of biomass for sugars production: Driving factors with a plausible mechanism for higher enzymatic digestibility. **Carbohydr. Polym.,** 149, 369-381, 2016.

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.

REDDY, P. A critical review of ionic liquids for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **S. Afr. J. Sci.**, 111, 1-9, 22, 2015.

REED, C. J.; LEWIS, H.; TREJO, E.; WINSTON, V.; EVILIA, C. Protein Adaptations in Archaeal Extremophiles. **Archaea,** 1-14, 2013.

REN, H.; ZONG, M.; WU, H.; LI, N. Utilization of Seawater for the Biorefinery of Lignocellulosic Biomass: Ionic Liquid Pretreatment, Enzymatic Hydrolysis, and Microbial Lipid Production. **ACS Sustain. Chem. Eng.,** 4, 5659-5666, 2016.

RYVARDEN, L. Genera of Polypores: Nomenclature and Taxonomy. Synopsis Fungorum. Fungi Flora A/S, Oslo, Norway. 5, 1-363, 1991.

RIZZATTI, A. C. S.; JORGE, J. A.; TERENZI, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and properties of a thermostable extracellular β-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.,** 26, 1-5, 2001.

SAHA, B.C. Purification and characterization of an extracellular β-xylosidase from a newly isolated *Fusarium verticillioides*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.,** 27, 241-245, 2001.

SAHA, B.C. Purification and properties of an extracellular β-xylosidase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Bioresour. Technol.,** 90, 33-38, 2003.

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, 2014.

SEGEL I. H. Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. John Willey & Sons; 1975.
SERDAKOWSKI, A. L.; DORDICK, J. S.. Enzyme activation for organic solvents made easy. **Trends Biotechnol.,** 26, 48-54, 2008.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. **Bioresour. Technol.,** 199, 76–82, 2016.

SINHA, R.; KHARE, S. K. Protective role of salt in catalysis and maintaining structure of halophilic proteins against denaturation. **Front. Microbiol.,** 5, 1-6, 2014.

SKROPETA, D. The effect of individual N-glycans on enzyme activity. **Bioorg. Med. Chem.,** 17, 2645–2653, 2009.

SØRENSEN, H. R.; MEYER, A. S.; PEDERSEN, S. Enzymatic hydrolysis of water-soluble wheat arabinoxylan. 1. Synergy between α-L-arabinofuranosidases, endo-1,4-β-xylanases, and β-xylosidase activities. **Biotechnol. Bioeng.,** 81, 726-731, 2003.

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.

TEIXEIRA, A.R. Método para estudo das hifas do basidiocarpo de fungos poliporáceos. Manual n° 6. São Paulo, Instituto de Botânica, 1995.

URABE I.; NANJO H.; OKADA H. Effect of acetylation of *Bacillus subtilis* α-amylase on the kinetics of heat inactivation. **Biochim. Biophys. Acta,** 302, 73–79, 1973.

WAHLSTRÖM, R. M.; SUURNÄKKI, A. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic polysaccharides in the presence of ionic liquids. **Green Chem.**, 17, 694-714, 2015.

WAKIYAMA, M.; YOSHIHARA, K.; HAYASHI, S.; OHTA, K. Purification and Properties of an Extracellular β-Xylosidase from *Aspergillus japonicus* and Sequence Analysis of the Encoding Gene. **J. Biosci. Bioeng.** 106, 398-404, 2008.

WANG, M.; LIU, K.; DAI, L.; ZHANGA, J.; FANGA, X. The structural and biochemical basis for cellulose biodegradation. **J. Chem. Technol. Biotechnol.,** 88, 491-500, 2012.

WU, H.; Mora-Pale, M.; Miao, J.; Doherty, T. V.; Linhardt, R. J.; Dordick, J. S. Facile pretreatment of lignocellulosic biomass at high loadings in room temperature ionic liquids. **Biotechnol. Bioeng.,** 1**0**8, 2865-2875, 2011.

XIMENES, F. A.; SILVEIRA, F. Q. P.; FILHO, E. X. F. Production of β-xylosidase activity by *Trichoderma harzianum* strains. **Curr. Microbiol.,** 33, 71-76, 1996.

XU, K.; WANG, X.; HUA, L.; XIAA, J.; WUA, Z.; XUA, N.; DAIA, B.; WUC, B. A novel ionic liquid-tolerant *Fusarium oxysporum* BN secreting ionic liquid-stable cellulase: Consolidated bioprocessing of pretreated lignocellulose containing residual ionic liquid. **Bioresour. Technol.,** 181, 18-25, 2015.

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.; WANGA, Y.; ZHANG, W.; YAO, B. Two xylose-tolerant GH43 bifunctional β-xylosidase/α-arabinosidases and one GH11 xylanase from *Humicola insolens* and their synergyin the degradation of xylan. **Food Chem.** 148, 381–387, 2014.

ZHANG, K.; PEI, Z.; WANG, D. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. **Bioresour. Technol.,** 199, 21-33, 2016.

ZANOELO, F. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant β-D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.,** 31, 170-176, 2004.

ZHAO, H. Protein stabilization and enzyme activation in ionic liquids: specific ion effects. **J. Chem. Technol. Biotechnol.,** 91, 25-50, 2015.

ZHAO, X., CHENG, K., LIU, D., Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Appl. Microbiol. Biotechnol.,** 82, 815–827, 2009.

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.

ZHOU, J.; BAO, L.; CHANG, L.; ZHOU, Y.; LU, H. Biochemical and kinetic characterization of GH43 β-d-xylosidase/α-L-arabinofuranosidase and GH30 α-L-arabinofuranosidase/β-D-xylosidase from rumen metagenome. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.,** 39, 143-152, 2012.

ZIMBARDI, A.L.R.L. Produção e caracterização bioquímica de enzimas lignocelulolíticas fúngicas e sua aplicação na sacarificação de biomassa lignocelulósica. 202 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

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.