



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Lorena Caixeta de Oliveira Simões

Purificação de xilanase do fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 e
aplicação de enzimas nativa purificada e recombinante para produção
de xilo-oligossacarídeos

São José do Rio Preto

2019

Lorena Caixeta de Oliveira Simões

Purificação de xilanase do fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 e aplicação de enzimas nativa purificada e recombinante para produção de xilo-oligossacarídeos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

São José do Rio Preto

2019

S593p

Simões, Lorena Caixeta de Oliveira

Purificação de xilanase do fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 e aplicação de enzimas nativa purificada e recombinante para produção de xilo-oligossacarídeos / Lorena Caixeta de Oliveira Simões. -- São José do Rio Preto, 2019

75 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Roberto da Silva

1. Tecnologia de alimentos. 2. Microbiologia. 3. Xilanases. 4. Fungos termofílicos. I. Título.

Lorena Caixeta de Oliveira Simões

Purificação de xilanase do fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 e aplicação de enzimas nativa purificada e recombinante para produção de xilo-oligossacarídeos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP - São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
UNESP - São José do Rio Preto

Prof. Dr. Eduardo da Silva Martins
UEMG - Frutal

São José do Rio Preto

28 de fevereiro de 2019

Ao meu marido, Fabrício Andrade Simões,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Não foi simples chegar até aqui! Foram mais de 20 mil quilômetros percorridos, distância de casa, novos desafios, algumas dificuldades. Ao longo desta caminhada, tive a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas, adquiri muito conhecimento e a certeza de que cumpri devidamente meu propósito.

Agradeço à Deus, pela vida e saúde.

Ao meu orientador, Professor Dr. Roberto da Silva, pela confiança, apoio e conhecimento.

Ao meu marido, Fabrício, por ser o maior incentivador na busca deste objetivo.

Aos meus pais, Imaculada e Reni, por sempre serem minha referência.

Ao meu irmão, Halley, pelos conselhos e exemplo de paixão pela Ciência.

Ao amigo, Carlos Eduardo, por ter sido minha companhia diária no laboratório e na vida. Com você compartilhei todas minhas dúvidas, ansiedades, conquistas e alegrias. Obrigada por tudo!

Ao amigo, Dr. Ronivaldo Rodrigues, por todo conhecimento, paciência e incentivo.

À amiga, Dra. Gabriela Salvador, pelos ensinamentos, conselhos e amizade.

Aos amigos, Carolina Kurebayashi e Eduardo Simioni, pela amizade.

Aos amigos, Diego e Pedro, pelo conhecimento e companheirismo.

À Dra. Márcia Maria Moretti, pela realização das análises cromatográficas.

Aos colegas de laboratório, Ana Lúcia, Carolina, Cíntia, Gabriel, Gabriela, Eduardo Duffeck, Erick, Gisele, Isabel, Janaína, Jaqueline, Jorge, Josiane, Julieth, Lacan, Maitê, Pâmela, Paula, Raísa, Thiago, Sidnei e Yuri por toda aprendizagem e prazerosa convivência.

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Xilanases são enzimas que agem na despolimerização da cadeia de xilana, principal componente da hemicelulose. Elas possuem diversas aplicações industriais tais como, na indústria de alimentos, do papel e de bioenergia. Neste contexto, há destaque para a produção de xilo-oligossacarídeos (XOS), que são considerados prebióticos. Estes possibilitam que probióticos sejam capazes de modular positivamente a microbiota intestinal, causando benefícios ao indivíduo hospedeiro. Nesse sentido, a busca de xilanases microbianas destaca-se como uma estratégia sustentável para a produção de prebióticos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi purificar e caracterizar uma xilanase do fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 e aplicar esta e duas xilanases recombinantes GH11 do referido fungo para obtenção de XOS. A enzima nativa purificada, com massa molecular estimada em 27 kDa, apresentou atividade máxima em pH 4,5 e 65 °C, e manteve média maior que 90% de sua atividade residual quando exposta a temperaturas entre 30 e 60 °C por 1 hora. Essa enzima pode ser caracterizada como uma endoxilanase pertencente à família GH11. Foram produzidos XOS do bagaço pré-tratado com ozonólise seguida de extração alcalina, xilana extraída do bagaço *in natura* e xilana *beechwood*. Os produtos da hidrólise enzimática dos diferentes substratos foram identificados por eletroforese capilar e/ou HPAE-PAD, sendo que o hidrolisado de xilana *beechwood* pela xilanase nativa purificada, após 12 horas de hidrólise, apresentou 234,2 mg de XOS/g de xilana. As enzimas avaliadas possuem potencial para aplicação na produção de xilo-oligossacarídeos para uso como prebióticos.

Palavras-chave: enzima fúngica, xilanase, purificação, xilo-oligossacarídeos

ABSTRACT

*Xylanases are enzymes that act in depolymerization of the xylan chain, the main component of hemicellulose. They have various industrial applications such as, food, paper and bioenergy industries. In this context, highlight the production of xylooligosaccharides (XOS), which are considered prebiotics. The XOS can be used with probiotic microorganisms to be able to positively modulate an intestinal microbiota, presenting benefits to the individual host. In this sense, a search for microbial xylanases stands out as a sustainable strategy for a production of prebiotics. Therefore, the objective of this work was to purify and characterize an xylanase of the fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 and to apply two recombinant enzymes of the same fungus to produce XOS. The enzyme, with the molecular weight estimated at 27 kDa, is at the maximum temperature of 4.5 and 65 °C, and continues more than 90% of its residual activity when exposed to temperatures between 30 and 60 °C for 1 hour. The purified native enzyme is presented as an endoxylanase for the GH11 family. XOS was produced from pretreated bagasse with ozonolysis followed by alkaline extraction, xylan extracted from the bagasse in natura and beechwood xylan. The products of the enzymatic hydrolysis of the different substrates were identified by capillary electrophoresis and/or HPAE-PAD, being that the beechwood Xylan hydrolysate by xylanase purified native, after 12 hours of hydrolysis, showed 234.2 mg/g of xylan. Evaluated enzymes have potential for applications in the production of xylooligosaccharides for use as prebiotics.*

Keywords: fungal enzyme, xylanase, purification, xylooligosaccharides

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do bagaço de cana-de-açúcar	19
Tabela 2 - Sumário de purificação da xilanase do fungo <i>M. heterothallica</i>	40
Tabela 3 - Composição química dos bagaços <i>in natura</i> e pré-tratado.	55
Tabela 4 - Análise de HPAE-PAD da hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado pela enzima GH11 recombinante expressa em <i>E.coli</i> por 24 horas.	60
Tabela 5 - Análise de HPAE-PAD da produção de xilose, xilobiose e xilotriose a partir de xilana extraída do bagaço de cana <i>in natura</i> sob ação de enzimas recombinantes GH11 após 12 horas de hidrólise.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da biomassa lignocelulósica ...	16
Figura 2 - Exemplo de uma estrutura de xilana com diferentes substituições.....	17
Figura 3 - Mecanismo de retenção de Glicosil Hidrolases	21
Figura 4 - Modo de ação das enzimas GH10 e GH11 em glucuronoxilana extraída por método alcalino.....	21
Figura 5 - Cultivo em meio de aveia do fungo <i>Myceliophthora heterothallica</i> F.2.1.428	
Figura 6 - Cultivo em estado sólido após 48 horas	29
Figura 7 - Preparo do bagaço de cana-de-açúcar.....	33
Figura 8 - Padronização do bagaço de cana-de-açúcar.....	34
Figura 9 - Coluna ozonólise.....	35
Figura 10 - Cromatografia de filtração em gel do extrato bruto concentrado em resina Sephadex® G-75.	41
Figura 11 - Cromatografia de troca iônica em resina Resource™ Q 6 mL.	42
Figura 12 - Efeito do pH na atividade enzimática.....	43
Figura 13 - Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	44
Figura 14 - Efeito do pH na estabilidade enzimática.	45
Figura 15 - Efeito da temperatura na estabilidade enzimática.....	46
Figura 16 - Efeito de íons metálicos na concentração de 5 mmol L ⁻¹ na atividade enzimática.	47
Figura 17 - Efeito de 5 mmol L ⁻¹ de reagentes na atividade enzimática.....	48
Figura 18 - Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática.....	49
Figura 19 - Gráfico de Michaelis-Menten (A) e Lineweaver-Burk (B) da xilanase purificada variando-se a concentração de xilana <i>beechwood</i> (1 a 20 mg mL ⁻¹) em ensaio realizado a 65 °C pH 4,5.....	50
Figura 20 - Atividade residual da xilanase purificada em diferentes condições de armazenamento por 24 horas.	51
Figura 21 - Bagaço de cana na coluna de vidro: não ozonizado (coluna superior) e ozonizado (coluna inferior)	52
Figura 22 - Compostos Fenólicos Totais (CFT) (A) e Açúcares Redutores Totais (ART) (B) após processo de lavagem alcalina e lavagem.....	53
Figura 23 - Espectro de infravermelho do bagaço de cana <i>in natura</i> e pré-tratado... 54	
Figura 24 - Bagaço de cana-de-açúcar e xilana extraída do bagaço de cana-de-açúcar	56
Figura 25 - Hidrólise enzimática da xilana <i>beechwood</i> pela enzima nativa purificada do <i>M. heterothallica</i> por 12 horas: (A) Eletroforese capilar (B) HPAE-PAD.	57
Figura 26 - Perfil de produção de açúcares redutores totais na hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado pela enzima GH11 recombinante expressa em <i>E.coli</i> por 24 horas.	59

Figura 27 - Perfil de produção de açúcares redutores totais na hidrólise enzimática da xilana <i>beechwood</i> , sob ação da xilanase recombinante GH11 expressa em <i>E.coli</i> 24 horas..	61
Figura 28 - Eletroforese capilar dos produtos de hidrólise da xilana <i>beechwood</i> pela xilanase recombinante expressa em <i>E. coli</i> GH11 de <i>M. heterothallica</i>	62
Figura 29 - Perfil de produção de açúcares redutores totais na hidrólise enzimática da xilana <i>beechwood</i> , sob ação de enzimas recombinantes GH11 expressa em <i>E.coli</i> e <i>Pichia</i> por 24 horas.	64
Figura 30 - Avaliação da inibição da enzima pela presença de xilose em diferentes concentrações	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ART	Açúcares Redutores Totais
CAZy	<i>Carbohydrate Active EnZymes</i>
CFT	Compostos Fenólicos Totais
CZE	<i>Capillary Zone Electrophoresis</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Ácido 3,5-Dinitrosalicílico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FTIR-ATR	<i>Fourier transform infrared-attenuated total reflectance</i>
GH11	Glicosil Hidrolase da família 11
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
K_m	Constante de Michaelis
pH	Potencial Hidrogeniônico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
U	Unidade de atividade enzimática
V_{max}	Velocidade Máxima

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Biomassa lignocelulósica	16
3.2 Bagaço de cana-de-açúcar	18
3.2.1 Produção e potencial de geração de valor agregado.....	18
3.2.2 Composição	18
3.3 Xilanases	19
3.3.1 Produção de xilanases.....	22
3.3.2 Fungos termofílicos na produção de enzimas xilanolíticas	23
3.4 Purificação de enzimas	23
3.5 Expressão heteróloga de proteínas	24
3.6 Hidrólise enzimática	26
3.7 Xilo-oligossacarídeos	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Produção de xilanase do fungo <i>Myceliophthora heterothallica</i>	28
4.1.1 Cultivo do fungo	28
4.1.2 Produção de xilanase por cultivo em estado sólido	28
4.2 Purificação da xilanase	29
4.3 Atividade enzimática xilanolítica.....	30
4.4 Quantificação da proteína total	30
4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	31
4.6 Caracterização físico-química da xilanase.....	31
4.6.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade enzimática.....	31
4.6.2 Efeito de íons metálicos e diferentes compostos	32
4.6.3 Determinação dos parâmetros cinéticos	32
4.6.4 Avaliação das condições de armazenamento.....	33
4.7 Bagaço de cana-de-açúcar	33
4.7.1 Padronização do bagaço de cana-de-açúcar.....	33
4.7.2 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.....	34
4.7.3 Compostos Fenólicos Totais (CFT)	35

4.7.4 Açúcares Redutores Totais (ART)	36
4.7.5 Espectroscopia no infravermelho (FTIR-ATR)	36
4.8 Extração da xilana do bagaço de cana-de-açúcar	36
4.9 Caracterização química de biomassa	36
4.10 Produção das enzimas recombinantes	37
4.11 Hidrólise enzimática	38
4.12 Análise dos xilo-oligossacarídeos por eletroforese capilar.....	38
4.13 Cromatografia de troca aniônica acoplada com detecção amperométrica pulsada (HPAE-PAD).....	39
4.14 Análise estatística	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Purificação da xilanase nativa.....	40
5.2 Caracterização físico-química	43
5.2.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade enzimática.....	43
5.2.2 Efeito de íons metálicos e diferentes compostos	46
5.2.3 Parâmetros cinéticos	49
5.2.4 Condições de armazenamento	51
5.3 Pré-tratamento do bagaço	52
5.4 Extração da xilana do bagaço de cana-de-açúcar	55
5.5 Hidrólise enzimática	56
5.5.1 Aplicação da xilanase nativa purificada	56
5.5.1.1 Xilana <i>beechwood</i>	56
5.5.2 Aplicação da xilanase GH11 recombinante	58
5.5.2.1 Bagaço de cana pré-tratado	58
5.5.2.1.1 Enzima expressa em <i>E. coli</i>	58
5.5.2.2 Xilana <i>beechwood</i>	60
5.5.2.2.1 Enzima expressa em <i>E. coli</i>	60
5.5.2.3 Xilana extraída do bagaço de cana-de-açúcar	63
5.5.2.3.1 Xilanase expressa em <i>E. coli</i> e <i>Pichia</i>	63
6 CONCLUSÕES	67
7 REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

As endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8) são enzimas que atuam na quebra das ligações glicosídicas da cadeia de xilana, gerando produtos de menor grau de polimerização. Elas são produzidas por fungos, bactérias, algas marinhas, sementes, dentre outros, com destaque para os fungos termofílicos, que tendem a produzir enzimas com maior termoestabilidade, sendo assim mais interessantes do ponto de vista industrial. As xilanases podem ser produzidas por processos fermentativos em estado sólido ou líquido, sendo que no processo em estado sólido, é possível a utilização de resíduos agrícolas, como o farelo de trigo (BHALLA et al., 2013; POLIZELI et al., 2005).

As xilanases pertencem à família de enzimas denominada Glicosil Hidrolases (GH). De acordo com o banco de dados CAZy (2018), as xilanases se encontram classificadas na famílias 5, 8, 30, 43, 51 e 98, sendo majoritariamente pertencentes às famílias GH10 e GH11. Xilanases são enzimas utilizadas em diversas áreas, como na alimentação animal, indústria de panificação, indústria do papel e celulose e têxtil (POLIZELI et al., 2005).

O processo de purificação e caracterização físico-química permite a obtenção de conhecimento da funcionalidade e características de atuação das enzimas e verificação de características de interesse para aplicação em processos industriais, como ampla estabilidade em diferentes pHs e temperatura (BAJPAI, 2014).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (CONAB, 2018). No processo produtivo de açúcar e etanol há a formação de resíduos, como a palha e o bagaço, que geralmente são utilizados para geração de energia na usina (CRUZ, 2008). No entanto, a preocupação com a questão ambiental de destinação de resíduos agrícolas, a perspectiva em agregar valor aos mesmos e a maior demanda da população por alimentos que tragam benefícios à saúde fazem com que haja a busca por alternativas, como a aplicação desses resíduos para produção de ingredientes com potencial prebiótico. Tendo em vista a quantidade expressiva de bagaço gerado, emerge o potencial de uso desse resíduo como fonte de bioproduto de maior valor agregado, como os xilo-oligossacarídeos (XOS), para aplicação como prebióticos em alimentos. Os prebióticos são ingredientes não digeríveis, que estimulam o crescimento de micro-organismos probióticos e causam alterações na

microbiota intestinal conferindo benefícios à saúde do organismo hospedeiro (VRESE; SCHREZENMEIR, 2008).

Os xilo-oligossacarídeos (XOS) são açúcares formados por unidades de xilose, apresentando grau de polimerização variável, podendo ser obtidos a partir da hidrólise da xilana presente na parede celular de materiais lignocelulósicos. Eles podem ser obtidos por processo físico-químico, biológico ou combinação de outros métodos. Neste sentido, a hidrólise enzimática é mais aconselhável, devido aos inconvenientes que outros processos podem gerar, como por exemplo, a formação de produtos indesejáveis e produção de monossacarídeo (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012). No entanto, para que o bagaço seja utilizado eficientemente pela enzima como substrato na hidrólise enzimática, o mesmo deve ser submetido a um pré-tratamento adequado, que permita a desestruturação da parede celular de modo a permitir o acesso da enzima à xilana ou a xilana deve ser extraída do material lignocelulósico.

Considerando o potencial de aplicação dos XOS na indústria farmacêutica e de alimentos, há a demanda pela prospecção de novas xilanases que sejam capazes de hidrolisar a xilana gerando xilo-oligossacarídeos com função prebiótica. Há relatos na literatura de diversas pesquisas realizadas com xilanases para a obtenção de xilo-oligossacarídeos, no entanto, não há trabalhos de purificação de xilanase do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 e produção de xilo-oligossacarídeos com enzimas do referido fungo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Purificar e caracterizar uma xilanase nativa do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 e produzir xilo-oligossacarídeos a partir de bagaço pré-tratado, xilana extraída do bagaço *in natura* e xilana *beechwood*, com o uso de xilanases nativa purificada e recombinantes do referido fungo, expressas em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*.

2.2 Objetivos específicos

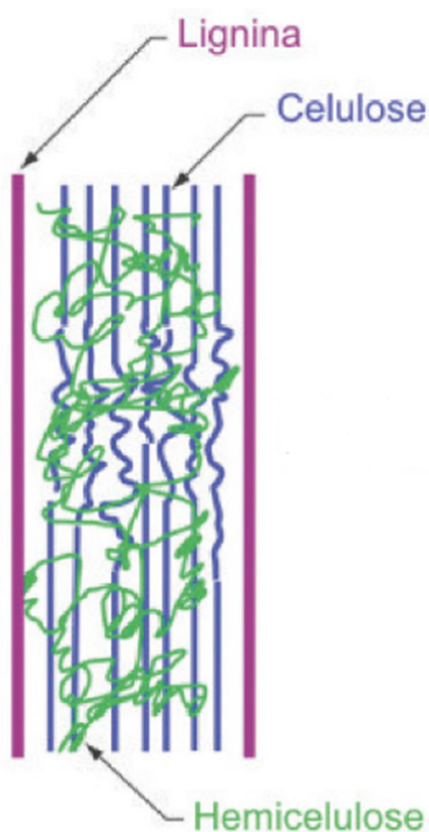
- Purificar e caracterizar de forma físico-química uma xilanase nativa do fungo *M. heterothallica*;
- Realizar pré-tratamento de ozonólise seguido de lavagem alcalina no bagaço de cana-de-açúcar;
- Extrair xilana do bagaço de cana *in natura*;
- Caracterizar o bagaço com e sem pré-tratamento e xilana extraída do bagaço *in natura*;
- Produzir xilo-oligossacarídeos a partir do bagaço de cana pré-tratado, xilana extraída e xilana *beechwood*, mediante a ação das três xilanases mencionadas no objetivo geral.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é a maior fonte de carboidratos e é composta por fibras de celulose envolvidas em uma matriz de lignina e hemicelulose, disposta na parede celular de plantas conforme Figura 1 (SANTOS et al., 2012).

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da biomassa lignocelulósica



Fonte: Santos e colaboradores (2012).

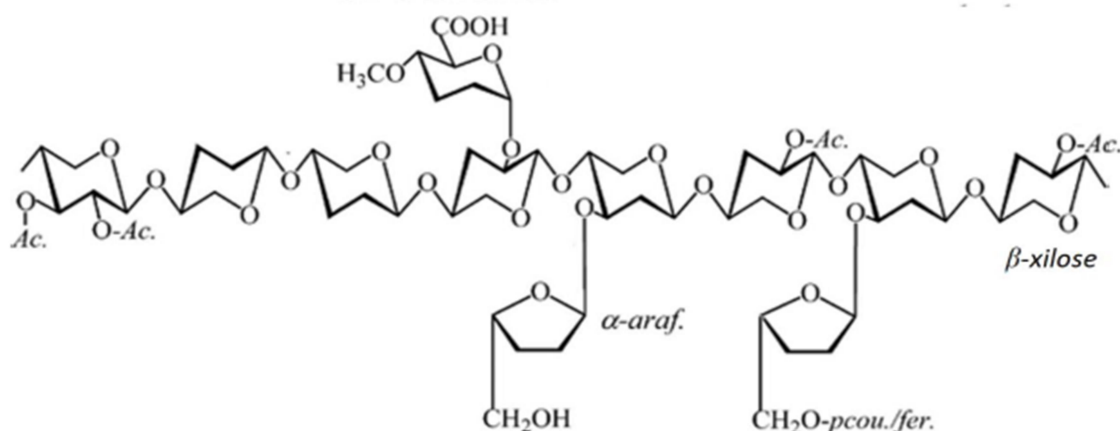
A celulose, presente na parede celular das plantas, é o polissacarídeo mais abundante. É um polímero linear, que possui de 8.000 a 12.000 unidades de D-glicopirranose unidas através de ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). Em função da estrutura linear da molécula, os grupos hidroxila se ligam uns aos outros através de ligações de hidrogênio formando uma estrutura cristalina insolúvel, porém ao longo

da estrutura da celulose há regiões desordenadas, denominadas amorfas (ARO; PAKULA; PENTILLA, 2005).

A lignina fornece rigidez e impermeabilidade à parede celular da planta, fazendo com que a mesma possua resistência ao ataque de patógenos. Por outro lado, ela dificulta o acesso de enzimas aos demais polímeros que podem gerar açúcares de interesse (VANHOLME et al., 2010). A lignina age como uma barreira física à ação das enzimas durante a hidrólise enzimática (SANTOS et al., 2012).

As hemiceluloses correspondem de 20 a 35% da biomassa proveniente de materiais lignocelulósicos, sendo consideradas o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. É um heteropolissacarídeo altamente diversificado constituído de diferentes graus de variados tipos de açúcares (*D*-glicose, *D*-galactose, *D*-manose, *D*-xilose, entre outros), sendo que são comumente classificadas conforme o resíduo de açúcar predominante presente na cadeia principal. As xilanas de diversas espécies de madeira (em especial *hardwood*) são acetiladas, o que faz com que as mesmas tenham maior hidrossolubilidade (BIELY, 1985). A xilana é a principal hemicelulose, sendo constituída de unidades de *D*-xilose unidas através de ligações β (1 \rightarrow 4) (ARO; PAKULA; PENTILLA, 2005; SANTOS et al., 2012) (Figura 2). A composição da xilana é dependente da origem da mesma e a qual parte da planta pertence, sendo que os resíduos lignocelulósicos ricos em xilana são notáveis materiais para produção de xilo-oligossacarídeos (BRIENZO et al., 2014).

Figura 2 - Exemplo de uma estrutura de xilana com diferentes substituições



Fonte: Adaptado de Sunna e Antranikian (1997).

3.2 Bagaço de cana-de-açúcar

3.2.1 Produção e potencial de geração de valor agregado

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018), o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. A safra 2017/2018 foi de 633,26 milhões de toneladas, com uma produção predominante na região Sudeste, representando 65,9% da produção nacional, sendo o estado de São Paulo o principal produtor com 55,1%.

No processo produtivo de açúcar e etanol, são gerados 280 Kg de bagaço e 280 Kg de palha por tonelada de cana-de-açúcar utilizada, o que leva a uma estimativa que na safra de 2017/2018 foram gerados cerca de 190 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar. As usinas tradicionalmente utilizam o bagaço para queima em caldeiras, com o objetivo de geração de vapor e energia elétrica (CRUZ, 2008). No entanto, a utilização de resíduos lignocelulósicos tem sido prospectada com o objetivo de gerar produtos de maior valor agregado, como o uso do bagaço de cana para produção de biocombustível (produção de etanol através da fermentação da xilose), xilitol, ácidos orgânicos e xilo-oligossacarídeos (BRIENZO et al., 2016).

Os resíduos agrícolas excedentes, provenientes das atividades da agroindústria, constituem matéria-prima potencial para obtenção de produtos de valor agregado. Há relatos na literatura de diversos experimentos realizados com xilanases para a obtenção de xilo-oligossacarídeos a partir de biomassas de diferentes fontes, como bagaço da cana-de-açúcar, sabugo de milho, entre outros (SAMANTA et al., 2015).

3.2.2 Composição

O bagaço de cana-de-açúcar possui três constituintes majoritários: celulose (32-48%), hemicelulose (19-24%) e lignina (23-32%) (SANTOS et al., 2012). Na Tabela 1 seguem diferentes caracterizações feitas do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

Tabela 1 - Composição química do bagaço de cana-de-açúcar

Referência	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Grupos acetil	Cinzas
Brienzo, Siqueira e Milagres (2009)	42,4	25,2	19,6	NA	1,6
Rodrigues et al. (2010)	45,4 ± 0,8	24,1 ± 0,6	23,4 ± 0,2	3,5 ± 0,1	2,3 ± 0,1
Travaini et al. (2013)	46,2 ± 0,1	20,8 ± 0,05	22,6 ± 0,07	NA	1,19 ± 0,1
Perrone et al. (2016)	41,3 ± 2,7	19,3 ± 0,6	30,7 ± 2,7	NA	2,7 ± 0,1
Sporck et al. (2017)	40,4 ± 0,2	22,4 ± 0,3	21,1 ± 0,4	3,3 ± 0,9	NA

NA - Não avaliado

3.3 Xilanases

As xilanases são enzimas que atuam na despolimerização da xilana, podendo hidrolisar ligações no interior (endoxilanase) ou nas extremidades (exoxilanase) do polímero (LINARES-PASTÉN; ARONSSON; KARLSSON, 2018). Elas são importantes enzimas industriais com diversas aplicações, sendo algumas delas: produção de bioetanol, alimentação animal, biobranqueamento na indústria de papel, produção de xilo-oligossacarídeos, indústria de panificação, de suco de frutas e cerveja (BIELY, 1985; SHARMA; KUMAR, 2013).

As xilanases fazem parte da família das Glicosil Hidrolases (GH), que são responsáveis por hidrolisar as ligações glicosídicas de carboidratos, sendo em grande parte classificadas nas famílias GH10 e GH11, e de forma menos significativa nas famílias 5, 8, 30, 43, 51 e 98. De acordo com o banco de dados CAZy (2018), as enzimas provenientes da família GH11 são classificadas como endo- β -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) que agem na endohidrólise das ligações (1 \rightarrow 4)- β -D-xilosídicas na cadeia de xilana, sendo as mesmas cruciais para a produção de xilo-oligossacarídeos a partir da xilana (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012). As diferenças catalíticas das enzimas endo- β -1,4-xilanases das famílias GH10 e GH11

podem ser relacionadas à diferença existente na estrutura terciária das mesmas, sendo as GH11 menores (SHARMA; KUMAR, 2013).

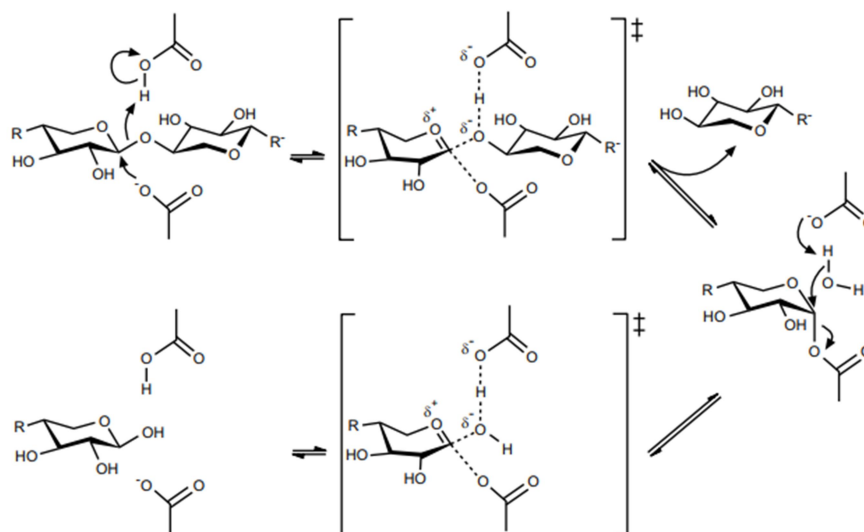
Comparativamente, as xilanases GH10 atuando sobre a xilana liberam produtos com GP (grau de polimerização) menores (principalmente GP = 3) do que aqueles liberados pelas xilanases GH11 (principalmente GP = 4) (BIELY; SINGH; PURCHAT, 2016), o que pode conferir efeitos prebióticos diferentes nas assimilações pelas bactérias probióticas.

Segundo Paës, Berrin e Beaugrand (2012), as xilanases da família GH11 possuem algumas características interessantes em relação às de outras famílias, sendo elas: alta seletividade ao substrato (“xilanases verdadeiras”), alta eficiência catalítica, tamanho pequeno, capacidade de atuação em ampla faixa de pH e temperatura.

A nomenclatura das GH, de acordo com a IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), é estabelecida pela especificidade do substrato e eventualmente pelo mecanismo molecular, não considerando as características estruturais das enzimas. Há algum tempo, as GH foram classificadas em famílias, sendo estas reunidas pela similaridade da sequência de resíduos. No entanto, pelo fato da estrutura de enovelamento das proteínas ser melhor preservado que a sequência primária, algumas famílias foram agrupadas em “clans”. Até o momento são relacionados 17 “clans” (GH-A/GH-Q), sendo as enzimas pertencentes à família GH11 referente ao “clan” GH-C, também denominado *β -jelly roll* (CAZY, 2018).

Há dois mecanismos gerais de hidrólise das Glicosil Hidrolases: inversão e retenção, os quais diferem pelo mecanismo da reação e distância entre os resíduos catalíticos. As famílias GH10 e GH11 consistem principalmente de endo-1,4- β -xilanases, que atuam na hidrólise através do mecanismo de retenção. Conforme indicado na Figura 3, a reação acontece por mecanismo de duplo deslocamento (LINARES-PASTÉN; ARONSSON; KARLSSON, 2018).

Figura 3 - Mecanismo de retenção de Glicosil Hidrolases

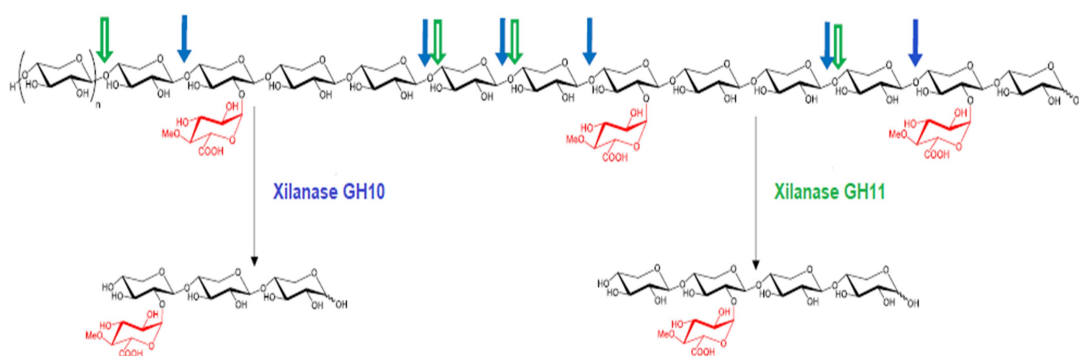


Fonte: Linares-Pastén, Aronsson e Karlsson (2018).

Para que xilanases da família GH11 tenham ação na cadeia de xilana é necessário que haja três resíduos consecutivos xilanopiranosil sem substituição, sendo que a enzima quebra a ligação antes do xilanopiranosil com substituição. Já enzimas da família GH10, requerem a presença de dois resíduos consecutivos xilanopiranosil sem substituição, sendo capazes de clivar a ligação no resíduo que possui a substituição (Figura 4) (BIELY; SINGH; PURCHAT, 2016). Portanto, xilo-oligossacarídeos ramificados podem ser gerados.

Diversos micro-organismos são capazes de crescerem utilizando XOS não ramificados como fonte de carbono, no entanto, há também cepas mais seletivas capazes de assimilar os XOS ramificados (KARLSSON et al., 2018).

Figura 4 - Modo de ação das enzimas GH10 e GH11 em glucuronoxilana extraída por método alcalino



Fonte: Adaptado de Biely, Singh e Purchat (2016).

3.3.1 Produção de xilanases

As xilanases podem ser produzidas por diversos organismos, tais como: fungos, bactérias, leveduras, algas marinhas, protozoários, insetos, sementes, dentre outros, sendo que a principal fonte de enzimas comerciais tem origem fúngica. A obtenção das enzimas xilanolíticas pode ser conduzida através de fermentação submersa ou em estado sólido. Apesar das enzimas serem produzidas comercialmente, prevalentemente através de fermentação submersa, destaque tem sido dado aos cultivos em estado sólido que utilizam resíduos lignocelulósicos como indutores da produção de enzimas (POLIZELI et al., 2005).

A fermentação em estado sólido é o cultivo no qual os micro-organismos são mantidos em meio sólido com uso de substratos úmidos sem a presença de fase aquosa livre. Este tipo de cultivo é indicado para o crescimento de fungos filamentosos, visto que há a simulação das condições ambientais de crescimento de muitos deles. Em comparação à fermentação submersa, a em estado sólido tende a apresentar maior produtividade, menor disposição à inibição pelo substrato e a contaminação por outros micro-organismos (HÖLKER; LENZ, 2005).

A temperatura dos processos fermentativos é de extrema importância tanto para o crescimento do micro-organismo, como para a produção dos itens de interesse. Os fungos se destacam pela habilidade de crescimento em uma ampla faixa de temperatura, que varia normalmente de 20 a 55 °C, de forma que mesmo que a temperatura aumente devido ao metabolismo microbiano e haja dificuldade de difusão do calor durante o processo de cultivo, o micro-organismo possivelmente se manterá ativo (KRISHNA, 2005).

Outro fator bastante importante nos processos fermentativos é o pH, que pode ser alterado de acordo com os metabólitos que são gerados ao longo do processo, impossibilitando o crescimento de determinados micro-organismos. Os fungos filamentosos também se destacam pela capacidade de crescimento em uma ampla faixa de pH (pH 2 a 9), sendo que é preferível trabalhar em um valor mais baixo, visando a redução do risco de contaminação por outros micro-organismos (KRISHNA, 2005).

3.3.2 Fungos termofílicos na produção de enzimas xilanolíticas

Os fungos termofílicos são capazes de produzir enzimas termoestáveis, que possuem vantagens na sua aplicação. Dentre estas se destacam: menor tempo de hidrólise e risco de contaminação, maior solubilidade dos reagentes e produtos (BHALLA et al., 2013).

Fungos termofílicos pertencentes ao mesmo gênero do *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 foram relatados como expressivos produtores de xilanases termoestáveis por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais, conforme relatado no trabalho de Moretti e colaboradores (2012) que obtiveram 1292 U g⁻¹ de xilanase utilizando como substrato bagaço de cana e farelo de trigo (1:1 m/m) com 96 horas de cultivo.

O mesmo gênero foi relatado como produtor de variada gama de enzimas degradadoras de material lignocelulósico, como CMCase, β-glicosidase, FPase e com maior destaque a elevada produção de xilanases. Quando o fungo foi cultivado com palha de arroz proporcionou atividade de 900 U g⁻¹ e com farelo de trigo 656 U g⁻¹ demonstrando que a fonte de carbono utilizada no cultivo influencia na quantidade de enzimas produzidas (BADHAN et al., 2007).

A classificação do fungo *Myceliophthora heterothallica* se deu a partir do *M. thermophila*, com base em estudos de filogenia e cruzamento sexual, de forma que houve a divisão em duas espécies: *M. thermophila* e *M. heterothallica*. A reclassificação do gênero em questão foi sugerida por Marin-Felix e colaboradores (2015), de forma que as espécies *M. heterothallica* e *M. thermophila* fossem designadas no gênero *Thermothelomyces*, como *T. heterothallica* e *T. thermophila*, respectivamente.

3.4 Purificação de enzimas

Ela tem por objetivo identificar a funcionalidade e estrutura das mesmas. O processo de purificação deve ter como foco a obtenção do maior rendimento, com a manutenção da maior atividade enzimática e pureza possíveis. O nível de pureza desejado varia de acordo com a finalidade a qual a enzima será aplicada (BAJPAI, 2014).

As técnicas cromatográficas são escolhidas de acordo com as diferenças em propriedades específicas dos componentes a serem purificados, tais como: tamanho

das biomoléculas (ex. filtração em gel), diferença de carga (ex. troca iônica), hidrofobicidade (ex. fase reversa), ponto isoelétrico (ex. cromatofocalização) e bioreconhecimento (ex. afinidade) (GE, 2000).

As xilanases provenientes de micro-organismos, geralmente são purificadas utilizando de duas a cinco técnicas cromatográficas, especialmente troca iônica e filtração em gel (BAJPAI, 2014). A cromatografia de filtração em gel, também conhecida como exclusão molecular, é uma técnica de separação baseada na diferença de tamanho dos constituintes, sendo que em condições adequadas as biomoléculas não se ligam a resina, não sendo necessário o uso de diferentes tampões no processo de separação (GE, 2000). Já a cromatografia de troca iônica é capaz de separar moléculas devido à diferença de cargas, através da interação reversível entre a carga que a molécula possui e a carga da resina. O processo de eluição geralmente ocorre com a utilização de cloreto de sódio. A escolha do pH é fundamental para que o processo seja capaz de separar a molécula de interesse. A maioria dos processos de cromatografia de troca iônica são conduzidos em quatro principais etapas, sendo: equilíbrio da fase estacionária, aplicação da amostra e lavagem, eluição e regeneração, que remove as moléculas que ainda permaneceram ligadas à coluna. No processo de eluição, as proteínas que se adsorveram a resina são eluídas através de diferenças na força iônica ou pH (GE, 2004).

3.5 Expressão heteróloga de proteínas

O emprego de micro-organismos selvagens em processos de produção de enzimas industriais apresenta alguns inconvenientes. Os fungos, principalmente, apresentam instabilidades fisiológicas devido a adaptações metabólicas, mutações e outros efeitos celulares pouco conhecidos que, frequentemente interrompem as secreções de determinadas enzimas, causando complicações e prejuízos no processo produtivo. Além disso, muitos micro-organismos com altos níveis de produção enzimática, não apresentam segurança necessária para uso em produtos alimentares (AHMAD et al., 2014).

Com a evolução da engenharia genética, por meio da tecnologia do DNA recombinante, é possível a obtenção de produtos de interesse em maior escala e com viabilidade econômica. A expressão de proteínas pode ser realizada em vários

organismos, de forma mais prevalente em bactérias (*Bacillus*, *Escherichia coli*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), fungos filamentosos (*Aspergillus niger*), dentre outros. A escolha do sistema de expressão deve levar em consideração características desejáveis, tais como: qualidade da proteína expressa, velocidade de produção, rendimento, funcionalidade (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

Escherichia coli é o principal sistema de expressão utilizado na produção de proteínas recombinantes. A escolha do vetor de expressão é crucial para a expressão da proteína de interesse (GUPTA; SHUKLA, 2016; AHMAD et al., 2018). Diversos trabalhos já foram realizados utilizando a *E.coli* como sistema de expressão de xilanases (VERMA et al., 2013; MANDELLI et al., 2014; HOFFMAM et al., 2016; SOUZA et al., 2016; AMO, 2018; HEGAZY et al., 2018; LIU et al., 2018). Dentre as vantagens destacadas no uso da *E. coli* como hospedeiro heterólogo se encontram: fácil manuseio, estrutura celular bem conhecida, processo de produção simples, boa viabilidade de rendimento e custo. No entanto, há também algumas desvantagens, como: possibilidade de formação de corpos de inclusão e não ocorrência de modificações pós-traducionais, que podem formar produtos sem funcionalidade ou com menor estabilidade (GUPTA; SHUKLA, 2016).

As leveduras, geralmente são utilizadas como sistema de expressão heteróloga, nos casos em que proteínas recombinantes não são produzidas de forma adequada através da expressão em *E.coli*, devido a problemas de glicosilação, por exemplo. A *Pichia* é uma levedura metilotrófica, que possui a capacidade de utilizar o metanol como única fonte de carbono. Dentre as vantagens do uso da *Pichia pastoris*, há destaque para a capacidade de realizar modificações pós-traducionais, como glicosilação e ligações dissulfeto, liberação da proteína de interesse para o meio extracelular (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). Vale destacar o fato deste sistema de expressão ser reconhecido como GRAS (*Generally Recognised As Safe*) segundo o FDA (*Food and Drug Administration*). A utilização de organismo GRAS é mais segura do ponto de vista sanitário para aplicação comercial, apresenta uma melhor reprodutibilidade dos níveis de produção e da pureza da enzima obtida. Dentre as desvantagens do uso da *Pichia*, aponta-se o uso do metanol como agente indutor, visto que pelo fato de ser altamente inflamável e tóxico é indesejável em processos fermentativos de larga escala (AHMAD et al., 2014). Xilanases têm sido

expressas heterologamente em *Pichia pastoris* (AMO, 2018; BASIT et al., 2018; MAITAN-ALFENAS et al., 2016).

3.6 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática, para a obtenção de xilo-oligossacarídeos a partir de resíduos lignocelulósicos, acontece em condições reacionais suaves de temperatura, pressão, não havendo a formação de subprodutos. Para que ocorra a hidrólise do material mediante a ação de enzimas específicas, é necessário contato direto da enzima com o substrato, para que a mesma adsorva na superfície e assim, proceda com a reação. Alguns fatores podem influenciar a eficiência hidrolítica da enzima, como: estrutura do material a ser hidrolisado e interações das enzimas com o material (BRIENZO et al., 2016).

A hidrólise da biomassa é difícil devido à recalcitrância da parede celular vegetal. As moléculas lineares da celulose e as cadeias ramificadas das hemiceluloses estão imersas numa matriz de lignina, que promove uma elevada resistência ao ataque microbiano e a hidrólise pelo sistema enzimático ligno e hemicelulolítico. Devido à recalcitrância da estrutura lignocelulósica da biomassa, é necessário um pré-tratamento de desconstrução desta estrutura para facilitar o acesso e hidrólise pelas celulasas e/ou xilanases (GUPTA; KHASA; KUHAD, 2011; TEIXEIRA; SIQUEIRA; BATISTA, 2016).

Os pré-tratamentos dos materiais lignocelulósicos podem ser classificados em processos: físico (tais como: moinho de bolas), químico (tais como: ácido sulfúrico diluído, hidróxido de sódio, ozonólise), biológico ou físico-químico (tais como: explosão a vapor). A escolha do método dependerá dos objetivos desejados na desconstrução do material, e do balanço entre as vantagens (por ex. custos) e desvantagens (por ex. liberação de inibidores) que cada método apresenta (SANTOS et al., 2012).

Travaini e colaboradores (2013) e Perrone e colaboradores (2016, 2017) avaliaram o uso do pré-tratamento por ozonólise no bagaço de cana e obtiveram resultados expressivos além da ausência de substâncias inibidoras da hidrólise, tais como, furfural, hidroximetilfurfural, vanilina, siringaldeído, ácidos cumárico e ferúlico.

3.7 Xilo-oligossacarídeos

Os xilo-oligossacarídeos (XOS) são oligômeros constituídos de unidades de xilose conectadas por ligações β (1 \rightarrow 4). Eles não são digeridos pelas enzimas do sistema digestivo humano e possuem a capacidade de estimular o crescimento de micro-organismos probióticos, sendo considerados prebióticos. Possuem potencial de aplicação em diversas áreas, como farmacêutica, alimentação animal e agricultura, porém o uso como aditivos alimentares é o mais relevante. Os XOS estão presentes naturalmente em pequena quantidade em vegetais e frutas, por exemplo, podendo ser obtidos pela hidrólise parcial da hemicelulose (VÁZQUEZ et al., 2000).

A Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) define prebiótico como "substrato que é seletivamente utilizado por micro-organismos hospedeiros conferindo benefícios à saúde" (GIBSON et al., 2017). Exemplos de prebióticos são a inulina, fruto-oligossacarídeos (FOS), galacto-oligossacarídeos (GOS), xilo-oligossacarídeos (XOS) e lactulose. Dentre estes, os XOS surgem como alternativa promissora, por serem obtidos de resíduos agrícolas, que são abundantes, baratos e renováveis na natureza (SAMANTA et al., 2015). Os XOS de menor grau de polimerização, como xilobiase e xilotriose, são os que são mais rapidamente assimilados pelos micro-organismos probióticos, sendo assim, os de maior interesse (GULLÓN et al., 2011).

Já os probióticos, são definidos pela Organização Mundial de Saúde juntamente com a FAO, como "micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro" (FAO; WHO, 2006).

Dos mecanismos básicos que levam à obtenção dos benefícios do consumo de prebióticos e probióticos, encontram-se a modulação provisória da microbiota intestinal e a habilidade de interagir de modo direto com o sistema imune ou mediado pela microbiota autóctone. Dentre os micro-organismos que possuem ação probiótica, os pertencentes aos gêneros de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os predominantes (VRESE; SCHREZENMEIR, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção de xilanase do fungo *Myceliophthora heterothallica*

4.1.1 Cultivo do fungo

O fungo termofílico *M. heterothallica* F.2.1.4, isolado de camas de frango (ZANPHORLIN et al., 2010), pertence a coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo. O fungo foi cultivado em meio contendo 2% de aveia e 1% de ágar, à temperatura de 45 °C por 2 dias, até que o mesmo preenchesse toda a placa. Após, as placas foram armazenadas à temperatura ambiente até o momento do uso.

Figura 5 - Cultivo em meio de aveia do fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4



Fonte: autoria própria.

4.1.2 Produção de xilanase por cultivo em estado sólido

A produção de enzimas xilanolíticas pelo fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 foi conduzida em cultivo em estado sólido a 45 °C por 48 horas em repouso, utilizando o farelo de trigo como substrato em embalagens de polipropileno (15 cm x 25 cm). O inóculo foi padronizado com a adição de 4 discos miceliais (1 disco

micelial = 0,5 cm²), para cada embalagem, contendo 5 gramas de farelo de trigo. Para cada unidade de cultivo, foi adicionado 10 mL de solução salina composta por 0,1% NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄ e MgSO₄.7H₂O. As embalagens foram autoclavadas por 20 minutos a 121 °C. Após este período, foi adicionada a cada embalagem 50 mL de água deionizada, sendo homogeneizada, filtrada e centrifugada a 8000 xg por 20 min, a 4 °C.

Figura 6 - Cultivo em estado sólido após 48 horas



Fonte: autoria própria.

4.2 Purificação da xilanase

O extrato bruto, obtido do cultivo do fungo, foi precipitado através da adição de álcool etílico 96 °GL na proporção de 1:3 (extrato:álcool) *overnight* a -20 °C. Após, a solução foi centrifugada a 3500 xg por 10 minutos e o precipitado ressuspensão em tampão fosfato de sódio pH 6 (concentrado 25 vezes do volume inicial de extrato). A purificação da xilanase foi realizada em duas etapas cromatográficas: filtração em gel (Sephadex[®] G-75) e troca iônica (Resource[™] Q). Primeiro, a coluna Sephadex[®] G-75 (2,5 x 100 cm) foi equilibrada com 5 volumes de coluna utilizando o tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ + cloreto de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 6) a uma vazão de 0,5 mL min⁻¹. Após, 2 mL do extrato concentrado foram

aplicados na coluna, tendo sido coletado frações de 4,5 mL cada. A atividade enzimática de cada fração foi determinada conforme item 4.3, assim como a absorbância a 280 nm, sendo o perfil cromatográfico estabelecido.

As frações que apresentaram atividade xilanolítica foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%). As frações com perfil eletroforético similar foram reunidas e dialisadas em membrana de celulose de 6 a 8 kDa (*overnight*) em tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 6. A amostra dialisada foi submetida à cromatografia de troca iônica em resina Resource™ Q 6 mL, utilizando o equipamento ÄKTA Purifier (GE Healthcare).

A resina foi previamente equilibrada com cinco volumes de coluna utilizando o tampão A (fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 6) em um fluxo de 1 mL min⁻¹. Após injeção da amostra e lavagem da fração não ligada, foi utilizado um gradiente linear (0 a 100% B) de cloreto de sódio com o uso do tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ + cloreto de sódio 0,4 mol L⁻¹ pH 6 (Tampão B). A eluição da proteína foi detectada a 280 nm sendo os volumes das frações de 2 mL. As frações que exibiram atividade xilanolítica foram analisadas por SDS-PAGE 10 %.

4.3 Atividade enzimática xilanolítica

A atividade enzimática da xilanase foi avaliada a partir da hidrólise da xilana *beechwood* 1% (m/v) (Sigma) e quantificação de açúcares redutores pelo método de Miller (1959) que utiliza o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Os ensaios foram realizados conforme descrito por Bailey e colaboradores (1992) com volumes adaptados para microrreação. Uma unidade de xilanase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto, sob condições ótimas reacionais. Uma curva de calibração foi confeccionada com D-xilose.

4.4 Quantificação da proteína total

A quantificação de proteína foi realizada de acordo com Noble e Bailey (2009) e Noble (2014).

4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As análises de eletroforese em presença de dodecil sulfato de sódio foram realizadas conforme proposto por Laemmli (1970) utilizando gel separador de 10 % e gel concentrador de 3 % de poliacrilamida para a separação das proteínas e coloração com nitrato de prata conforme See e Jackowski (1989). As amostras foram diluídas no tampão de amostra (950 μL de solução Laemmli 2x + 50 μL β -mercaptoetanol) na proporção 1:1. As amostras foram incubadas por 5 minutos em banho de ebulição. Foram aplicados 20 μL de amostra em cada poço do gel e 2 μL do marcador padrão de massa molecular de proteínas (Broad Range, Catalog Number 161-0317, BioRad). A corrida para separação das proteínas foi realizada a 150 V.

4.6 Caracterização físico-química da xilanase

O tempo de reação ótimo para a determinação da atividade enzimática foi estabelecido através da avaliação de relação linear entre a quantidade de produto liberada e o tempo de reação. Foram avaliados quatro tempos, 5, 10, 15 e 20 minutos.

4.6.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade enzimática

O pH ótimo foi determinado utilizando solução de xilana *beechwood* 1% (m/v) (Sigma-Aldrich), em tampões 0,1 mol L⁻¹ com faixa de pH variando de 3 a 10, sendo eles: citrato (pH 3,0), acetato (pH 3,5 a 5,5), MES (pH 6,0 e 6,5), HEPES (pH 7,0 e 7,5), Bicine (pH 8,0 a 9,0), CAPS (9,5 e 10,0). A reação foi conduzida em um tempo de 10 minutos a 50 °C. O pH no qual foi obtido maior atividade enzimática, foi considerado como 100%, sendo o resultado expresso em atividade relativa.

Para a determinação da temperatura ótima, a atividade enzimática foi determinada utilizando o tampão no pH ótimo de atividade e variando-se a temperatura na faixa de 30 a 85 °C. A temperatura na qual foi obtida maior atividade enzimática foi considerada 100%, sendo o resultado expresso em atividade relativa.

O efeito do pH na estabilidade enzimática foi determinado usando os tampões descritos anteriormente na faixa de pH de 3,0 a 10,0 (0,1 mol L⁻¹), sem o substrato

da reação enzimática. A enzima foi pré-incubada nos diferentes valores de pH por 24 horas a 4 °C e 25 °C.

O efeito da temperatura sobre a estabilidade enzimática foi determinado através da pré-incubação da enzima em tampão no pH ótimo de atividade na faixa de temperatura entre 30 a 85 °C por 60 minutos, sendo após resfriado a 4 °C.

Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual, considerando-se a atividade da enzima sem tratamento como 100%, sendo mensurada nas condições ótimas de pH e temperatura.

4.6.2 Efeito de íons metálicos e diferentes compostos

O efeito de cátions na forma de sais de cloro, na atividade enzimática, foi avaliado através da adição individual de AlCl_3 , CaCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 , FeCl_3 , HgCl_2 , MnCl_2 , MgCl_2 , NiCl_2 e ZnCl_2 na concentração final de 5 mmol L^{-1} . A análise foi realizada através da incubação da enzima na presença dos referidos íons durante 5 minutos.

O efeito dos agentes químicos (Triton X-100, SDS, DMSO, DTT, EDTA) na atividade enzimática foi avaliado na concentração de 5 mmol L^{-1} , por 5 minutos. Já a influência de solventes orgânicos (acetona, etanol e metanol) na atividade enzimática foi avaliada nas concentrações: 20, 30 e 50% (v/v).

As reações ocorreram nas condições ótimas de pH e temperatura. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual, considerando-se a atividade da enzima sem tratamento como 100%.

4.6.3 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} foram estabelecidos nas condições ótimas de atividade enzimática através da variação na concentração (1 a 20 mg mL^{-1}) da xilana *beechnwood* (Sigma-Aldrich). Os valores de K_m e V_{max} foram obtidos por meio de regressão não-linear, conforme o modelo de Michaelis-Menten e, por regressão linear do modelo de Lineweaver-Burk, através do software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

4.6.4 Avaliação das condições de armazenamento

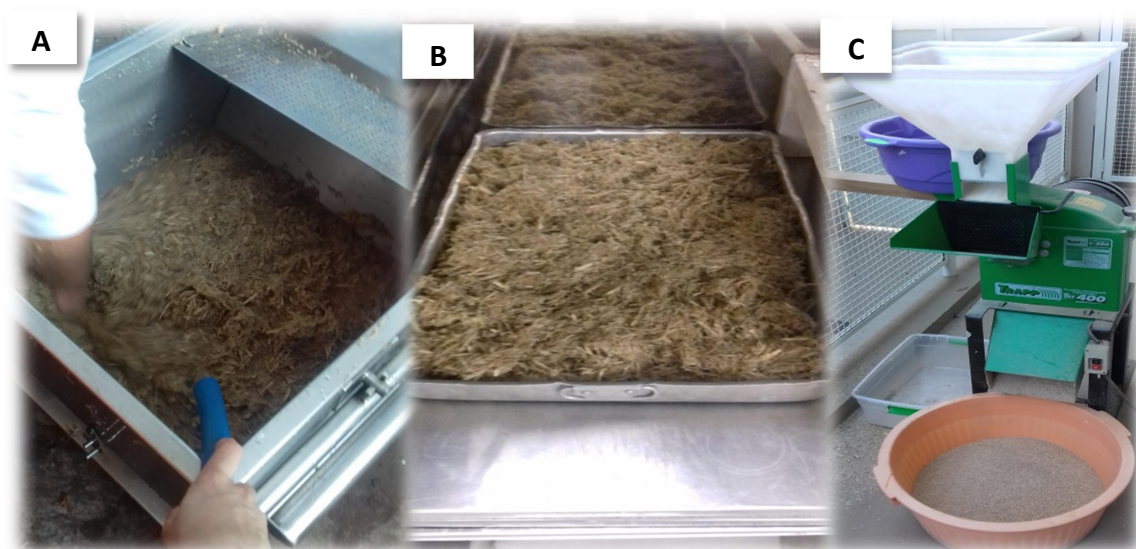
A enzima purificada foi armazenada em quatro temperaturas (- 80 °C, - 20 °C, 4 °C e 25 °C) por um período de 24 horas. A atividade enzimática foi mensurada antes da incubação e o valor obtido foi considerado como controle (100%) para o cálculo da atividade residual.

4.7 Bagaço de cana-de-açúcar

4.7.1 Padronização do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço utilizado no trabalho foi fornecido pela Usina Itajobi. O mesmo foi lavado cinco vezes e secado em estufa com circulação de ar a 40 °C até redução desejada da umidade (< 10%). O bagaço foi triturado em triturador de marca/modelo (TRAPP® 400), sendo depois padronizado em relação ao tamanho em duas peneiras de tamanho de aberturas padronizados, sendo 1 mm e 1,41 mm (Figura 7).

Figura 7 - Preparo do bagaço de cana-de-açúcar. A: Lavagem, B: Secagem, C: Trituração



Fonte: autoria própria.

Desta maneira, foram obtidos três dimensões de bagaço, consistindo de menor que 1 mm, entre 1 e 1,41 mm (usado na hidrólise) e maior que 1,41 mm (Figura 8).

Figura 8 - Padronização do bagaço de cana-de-açúcar



Fonte: autoria própria.

4.7.2 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Neste trabalho foi utilizado como pré-tratamento a ozonólise seguida de lavagem alcalina. O ozônio foi gerado através do equipamento Radast (10C, Ozoxi-Ozônio), mostrado na Figura 9. O bagaço a ser ozonizado, foi previamente umidificado de forma que a umidade estivesse em aproximadamente 45%. Para isso, foram adicionados 0,8 mL de água para cada grama de bagaço seco. Foram inseridas 25 gramas de bagaço umidificado em coluna de vidro (2,7 cm de diâmetro x 50 cm de comprimento) e então, submetido ao fluxo de ozônio por 60 minutos, sendo a injeção do ozônio feita a cada 30 minutos em uma entrada da coluna, garantindo assim melhor homogeneização da amostra. O fluxo de ozônio utilizado em cada coluna foi de 32 mg de ozônio por minuto (PERRONE et al., 2016). O cálculo do fluxo de ozônio foi feito de acordo com o procedimento descrito em “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (APHA, 1999).

Figura 9 - Coluna ozonólise

Injeção de
ozônio



Fonte: autoria própria.

O bagaço ozonizado foi submetido à lavagem alcalina utilizando solução de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para cada 2 g de bagaço foram adicionados 40 mL de solução alcalina, deixando o mesmo em repouso por 2 horas (PERRONE et al., 2016). Após o tempo determinado, o bagaço foi peneirado, separando o sobrenadante para análise de Compostos Fenólicos Totais (CFT) e Açúcares Redutores Totais (ART), sendo estas amostras denominadas “lavagem alcalina”.

Com o objetivo de reduzir a presença de CFT no bagaço, foi realizada uma etapa de lavagem com água deionizada (6% m/m) por 1 hora a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 300 rpm (TRAVAINI et al., 2013). Foram coletadas amostras da água de lavagem a fim de quantificar os CFT e ART, tendo sido as amostras denominadas “lavagem”.

4.7.3 Compostos Fenólicos Totais (CFT)

A determinação de CFT foi realizada com base na metodologia descrita por Singleton e colaboradores (1999) com adaptações. A reação foi realizada adicionando-se $1,580 \text{ } \mu\text{L}$ de água, $20 \text{ } \mu\text{L}$ da amostra (ambas as amostras diluídas 4 vezes) e $100 \text{ } \mu\text{L}$ do reagente Folin-Ciocalteu. Os ensaios foram incubados por 8 minutos à temperatura ambiente, sendo que após foi adicionado $300 \text{ } \mu\text{L}$ de carbonato de sódio (200 g L^{-1}). Os tubos foram incubados a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos,

com posterior medida da absorvância a 765 nm. Foi preparada uma curva de calibração (5 pontos) tendo como padrão o ácido gálico na concentração de 50 a 500 mg L⁻¹, de forma que o resultado foi expresso em miligramas por litro de Equivalente de Ácido Gálico (EAG).

4.7.4 Açúcares Redutores Totais (ART)

A quantificação de ART foi feita segundo metodologia descrita por Miller (1959), sem adição de fenol, com volumes adaptados para microrreação. A reação foi efetuada com a adição de alíquotas de 100 µL da amostra e do reagente de DNS em microplacas de 96 poços. Foi realizada leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Foram traçadas curvas de calibração de glicose e xilose, sendo os resultados expressos em miligrama por mililitro.

4.7.5 Espectroscopia no infravermelho (FTIR-ATR)

A análise de espectroscopia no infravermelho foi realizada prensando-se aproximadamente 100 mg de amostra para a formação de discos de 12 mm de diâmetro e 1 mm de espessura (PERRONE et al., 2016). Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Perkin Elmer (*FT-IR Spectrum Two*) na região de 400 a 4000 cm⁻¹.

4.8 Extração da xilana do bagaço de cana-de-açúcar

A extração da xilana a partir do bagaço de cana-de-açúcar (< 1 mm) foi realizada conforme descrito por Kaur e colaboradores (2018) utilizando NaOH 15% (m/v) com adequação da neutralização do extrato feita por ácido fosfórico.

4.9 Caracterização química de biomassa

A determinação da composição química da biomassa foi realizada de acordo com os procedimentos analíticos padronizados NREL/TP-510-42618/42619 do *National Renewable Energy Laboratory* - NREL: determinação de extrativos em biomassa (SLUITER et al., 2008) e determinação de carboidratos estruturais e lignina na biomassa (SLUITER et al., 2012).

4.10 Produção das enzimas recombinantes

A *Escherichia coli* e *Pichia pastoris* hospedeira do gene da xilanase da família GH11 do fungo filamentoso *M. heterothallica* F.2.1.4, utilizada no presente trabalho, foi desenvolvida pela aluna Gabriela Salvador de Amo em seu projeto de doutorado em Microbiologia denominado “Expressão heteróloga e caracterização de xilanase de *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4”. No seu projeto de doutorado a mesma analisou o transcriptoma do fungo, tendo identificado genes transcritos que foram expressos, identificou um gene de xilanase e realizou a clonagem e expressão deste gene em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*. O projeto foi executado no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, do IBILCE - UNESP, São José do Rio Preto.

A produção da proteína recombinante deu-se inicialmente pelo preparo de 20 mL de pré-inóculo da *E. coli* modificada, seguido pelo seu inóculo em 1 litro de meio Luria Bertani (LB) contendo 50 µg mL⁻¹ de canamicina e cultivados a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Após a cultura atingir densidade ótica entre 0,6 e 0,8, a mesma foi induzida com IPTG por 16 horas, tendo sido cultivada a 20 °C, com 200 rpm de agitação. Após o cultivo, a cultura foi centrifugada a 5.000 xg por 15 minutos para recuperação das células. O *pellet* foi ressuspendido em tampão de lise constituído por 50 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio pH 7,5, sendo utilizado 5 mL para cada 1 grama de célula. A solução foi submetida a 4 pulsos de 40 segundos no ultrassom com intervalo de 1 minuto entre eles, mantendo a enzima em banho de gelo. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 20 minutos a 10.000 xg a 4 °C.

Já a produção da enzima recombinante expressa em *Pichia* foi realizada através da inoculação de 1 colônia transformante em 25 mL de meio BMGY (extrato de levedura 1 %, peptona 2 %, tampão fosfato pH 6,0 100 mmol L⁻¹, YNB 1,34%, biotina 4x10⁻⁵% e glicerol 1%) e cultivada a 28 °C sob agitação de 240 rpm até atingir densidade ótica acima de 2,0. Após, o cultivo foi centrifugado a 1500 xg por 5 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em 200 mL de meio BMMY (mesma composição do meio BMGY, porém, com 0,5% de metanol ao invés de 1% de glicerol. A indução foi realizada através da adição de 1 mL de metanol a cada 24 horas por 120 horas.

4.11 Hidrólise enzimática

Os experimentos foram realizados em *erlenmeyers* de 50 mL, com volume final de hidrólise de 10 mL, utilizando 3% de substrato (m/v) (bagaço pré-tratado com ozonólise seguida de lavagem alcalina, xilana extraída do bagaço de cana *in natura* e xilana *beechwood*) em tampão acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 5 a temperatura de 40 °C sob agitação de 180 rpm em tempos variáveis. Ao final da hidrólise, as amostras foram submetidas a banho de ebulição por 5 minutos, sendo filtradas em tecido tipo musseline e centrifugadas a 2500 xg por 10 minutos.

O rendimento da hidrólise foi obtido dividindo o total de açúcares obtidos após a hidrólise pela quantidade de xilana presente no ensaio.

4.12 Análise dos xilo-oligossacarídeos por eletroforese capilar

A análise dos xilo-oligossacarídeos por eletroforese capilar acoplada a detector de fluorescência induzida por laser (CE-LIF) foi realizada em um aparelho P/ACE MDQ (Beckman Coulter) visando a determinação do perfil de produtos resultantes da hidrólise de xilana *beechwood* (Sigma-Aldrich) pela ação das xilanases (recombinantes e nativa purificada). As amostras foram marcadas através de reação de aminação redutiva com o fluoróforo APTS (ácido 1,3,6-trissulfônico-8-aminopireno-Sigma-Aldrich), conforme escrito por Evangelista e colaboradores (1995).

Um capilar de sílica fundida (TSP 050375, Polymicro Technologies) foi usado como coluna de separação dos xilo-oligossacarídeos. A corrida foi realizada utilizando tampão fosfato de sódio 40 mmol L⁻¹, pH 2,5, nas condições de 20kV/70-100 µA com polaridade reversa sob temperatura controlada de 25 °C. Os xilo-oligossacarídeos marcados com APTS foram excitados a 488 nm e a emissão foi determinada a 520 nm. Para prevenir a ocorrência de contaminações cruzadas, o capilar foi lavado entre as corridas com água e, em seguida, com o tampão de corrida. Os picos resultantes foram identificados pela comparação com os tempos de retenção dos padrões de xilose (Sigma-Aldrich) e xilo-oligossacarídeos de grau de polimerização de 2 a 6 (Megazyme).

Esta análise foi realizada pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) localizado no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo.

4.13 Cromatografia de troca aniônica acoplada com detecção amperométrica pulsada (HPAE-PAD)

A análise dos hidrolisados foi realizada em equipamento Dionex ICS-3000 Ion Chromatography System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). A determinação dos XOS foi feita utilizando uma coluna CarboPac PA200 (3 mm × 250 mm) e coluna de guarda CarboPac PA200 (3 mm × 50 mm) a 30 °C com fluxo de 0,5 mL min⁻¹ por 17 minutos. A identificação e quantificação de xilose (X1), xilobiase (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentaose (X5) e xilohexaose (X6) foi feita utilizando padrões comerciais (Megazyme, para XOS e Sigma-Aldrich para xilose).

4.14 Análise estatística

As médias dos dados foram comparadas por meio do teste t de Student ($p < 0,05$) utilizando o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Purificação da xilanase nativa

A purificação da xilanase secretada pelo fungo *M. heterothallica* foi conduzida em duas etapas cromatográficas, sendo: filtração em gel (Sephadex[®] G-75) e troca iônica (Resource[™] Q) conforme indicado na Tabela 2.

Tabela 2 - Sumário de purificação da xilanase do fungo *M. heterothallica*

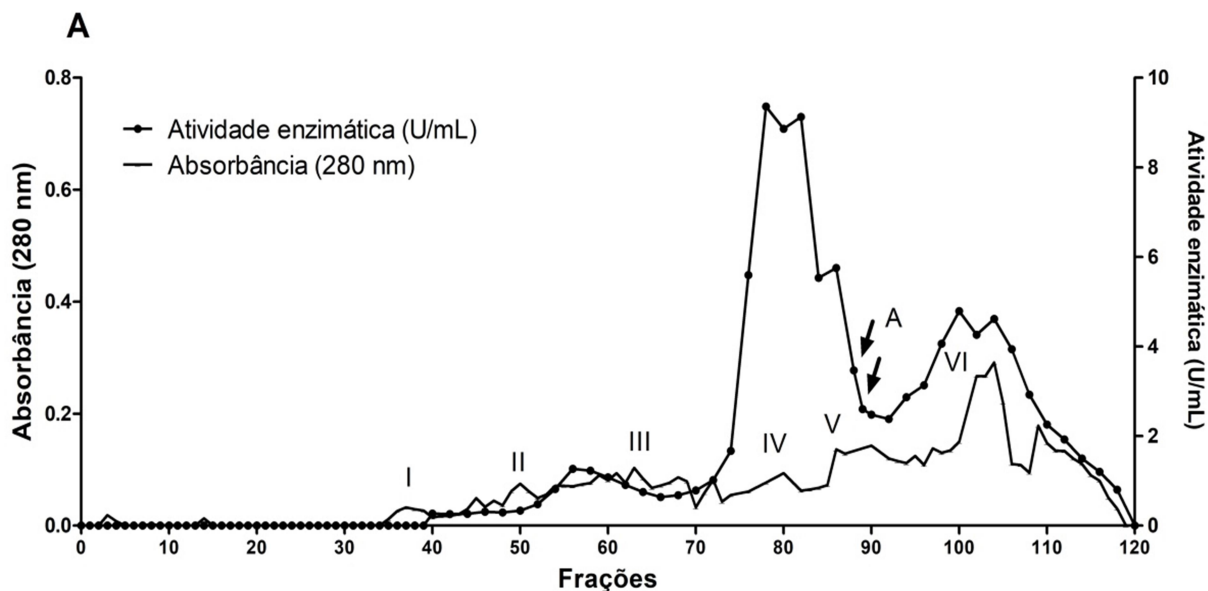
	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto concentrado	10.900	210,00	52	1,00	100
Sephadex [®] G-75	645	1,19	542	10,44	5,92
Resource [™] Q	384	0,24	1.600	30,83	3,52

Fonte: autoria própria.

Na primeira etapa cromatográfica, a xilanase eluída da resina Sephadex[®] G-75 mostrou uma purificação cerca de 10 vezes com rendimento de aproximadamente 6%. Já ao final da cromatografia de troca iônica, o rendimento foi de 3,52%, com um fator de purificação de aproximadamente 31 vezes. O rendimento final obtido no presente trabalho é superior ao reportado por McPhillips e colaboradores (2014), na purificação de xilanase do *Remersonia thermophila* CBS 540.69, que obtiveram 1,37% de rendimento final tendo utilizado as mesmas etapas cromatográficas.

Analisando o cromatograma da resina Sephadex[®] G-75 (Figura 10), é possível perceber seis picos definidos para proteína e atividade enzimática sobre as frações coletadas. As frações (84 a 95), após o pico de maior atividade xilanolítica, foram selecionadas e concentradas em concentrador à vácuo. As frações concentradas foram analisadas por SDS-PAGE 10% a fim de escolher as amostras a serem dialisadas. Conforme indicado na Figura 10, as frações identificadas como "A" (88 e 89), foram direcionadas para a etapa de diálise, por estarem melhor pré-purificadas, conforme indicado pelo gel de eletroforese.

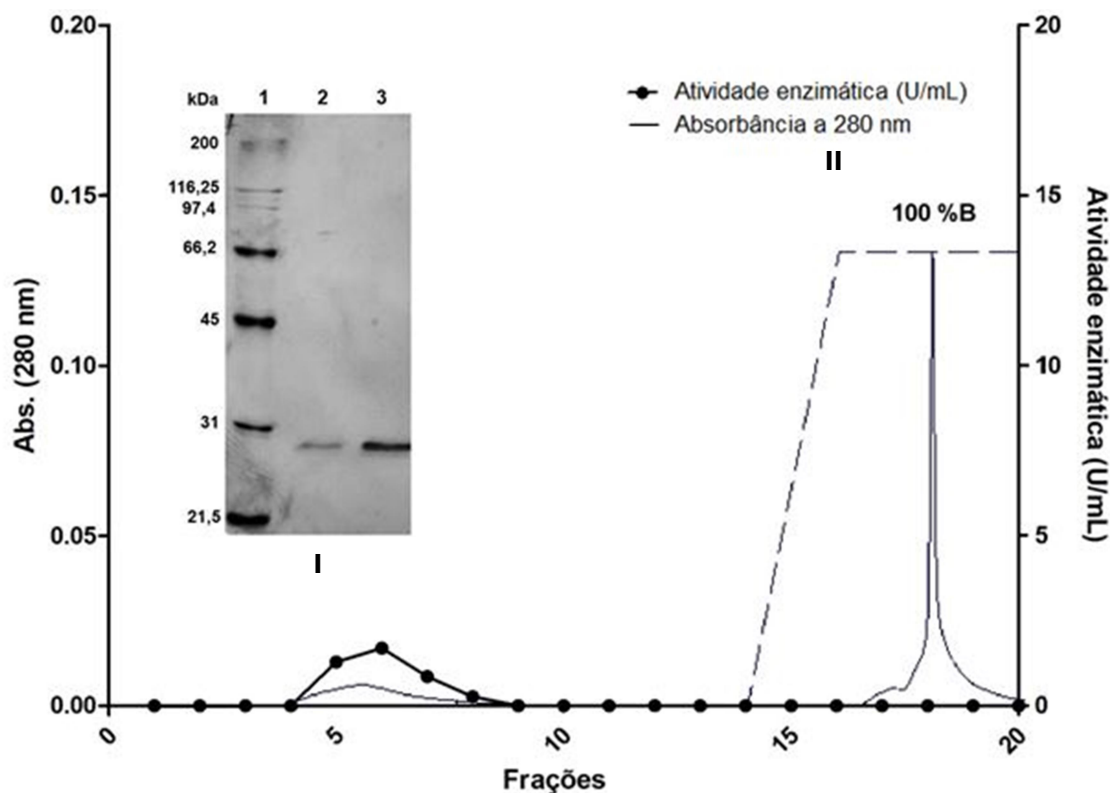
Figura 10 - Cromatografia de filtração em gel do extrato bruto concentrado em resina Sephadex® G-75. Tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ + NaCl 50 mmol L⁻¹, pH 6. Vazão de eluição correspondente a 0,5 mL min⁻¹ e volume de coleta de 4,5 mL. A: Frações selecionadas para diálise



Fonte: autoria própria.

A segunda etapa cromatográfica (Figura 11) exibiu dois picos, correspondentes a proteína não adsorvida na resina (Pico I) e adsorvida na resina (Pico II), sendo possível identificar que a enzima não adsorveu na resina. A análise feita através de SDS-PAGE 10 % demonstrou que as frações 6, 7 e 8 (dado não mostrado) contém xilanase pura com massa molecular estimada em 27 kDa, sendo estas frações eluídas com tampão A.

Figura 11 - Cromatografia de troca iônica em resina Resource™ Q 6 mL. Tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 6 (Tampão A), tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ + cloreto de sódio 0,4 mol L⁻¹ M pH 6 (Tampão B). SDS-PAGE 10 % da enzima pura. 1 - Marcador de massa molecular (BioRad): 200 kDa (Miosina), 116,25 kDa (β-galactosidase), 97,4 kDa (fosforilase b), 66,2 kDa (albumina sérica), 45 kDa (ovalbumina), 31 kDa (anidrase carbônica), 21,5 kDa (inibidor de trpsina); 2 - Fração 6; 3 - Fração 7; I - Fração não adsorvida; II - Fração adsorvida



Fonte: autoria própria.

A massa molecular foi estimada através da relação entre a mobilidade relativa das bandas e o log da massa molecular do marcador. A mobilidade da amostra no gel foi 0,7, sendo que ao substituir este valor na equação da reta e fazer o log do mesmo (desconsiderando o valor negativo), obtêm-se o valor estimado de 27 kDa.

Com base na massa molecular da enzima purificada, pode-se inferir que ela não pertence à família GH10, uma vez que as enzimas pertencentes a essa família apresentam maior massa molecular, aproximadamente 40 kDa (BEAUGRAUND et al., 2004). Algumas xilanases GH11 produzidas por fungos termofílicos apresentaram massa molecular semelhante ao encontrado neste estudo, como as xilanases de *Malbranchea flava* (25,2 kDa) (SHARMA et al., 2010) e *Rhizomucor miehei* (27 kDa) (FAWZI, 2011).

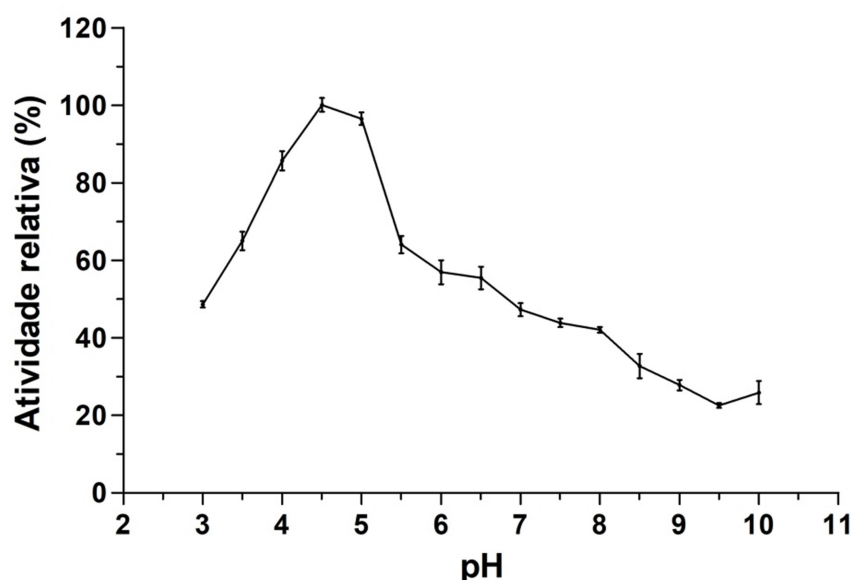
5.2 Caracterização físico-química

Após avaliação de quatro tempos de incubação da enzima, o tempo ótimo foi determinado como 10 minutos.

5.2.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade enzimática

A enzima pura apresentou maior atividade em pH 4,5 (pH ótimo) e na faixa de 3 a 5,5 manteve mais de 50% da atividade relativa (Figura 12).

Figura 12 - Efeito do pH na atividade enzimática. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.

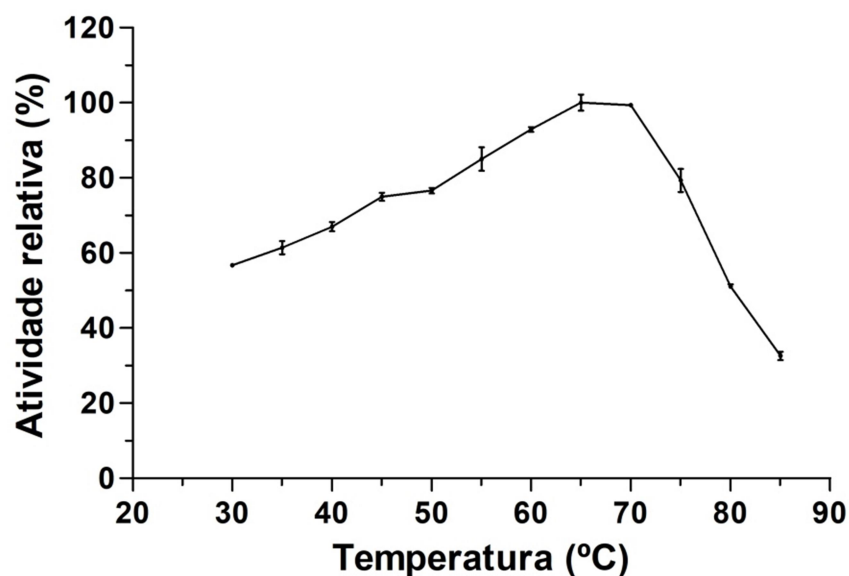


Fonte: autoria própria.

Valores diferentes foram encontrados para xilanases recombinantes da família GH11 do fungo *M. thermophila*, pertencente ao mesmo gênero do *M. heterothallica*, que apresentaram pH ótimo 6,0 e 7,0 (BASIT et al., 2018).

Quanto à temperatura ótima (Figura 13), a maior atividade foi obtida com 65 e 70 °C, não havendo diferença significativa entre elas ($p < 0,05$). Desta forma, a temperatura de 65 °C foi definida como ótima. Resultado similar foi descrito para xilanase purificada do fungo *Remersonia thermophila* CBS 540.69 (MCPHILLIPS et al., 2014).

Figura 13 - Efeito da temperatura na atividade enzimática. Os valores são expressos como média (n = 3) ± desvio padrão.

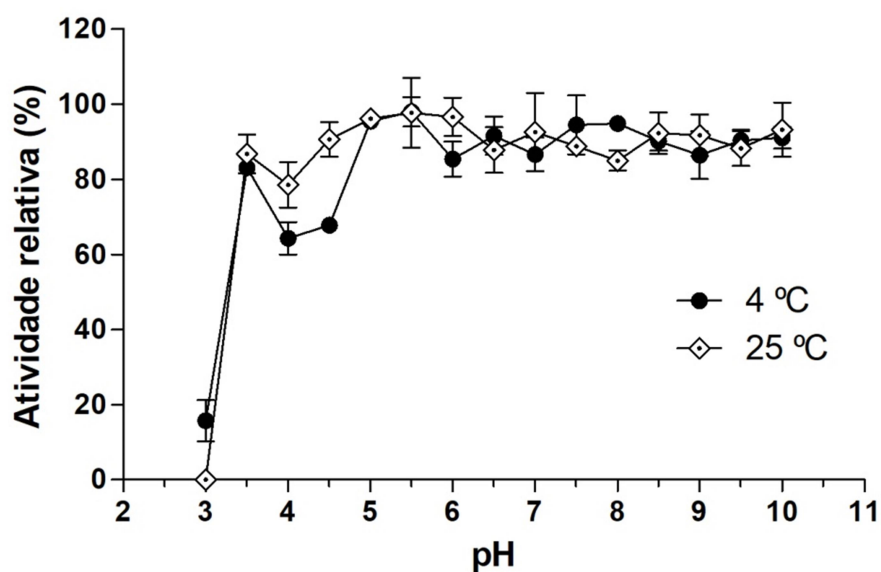


Fonte: autoria própria.

Estes dados corroboram o trabalho de Basit e colaboradores (2018), que obtiveram temperatura ótima parecida ao do presente trabalho com valor moderadamente inferior (60 °C). Souza e colaboradores (2016) relataram que xilanase do fungo *Thermoascus aurantiacus* obtida por expressão heteróloga em *E.coli* mostrou valores ótimos similares ao presente trabalho (pH 5,0, temperatura 65 °C).

A estabilidade da enzima a diferentes valores de pH foi analisada por 24 horas a temperaturas de 4 e 25 °C (Figura 14). Em seu pH ótimo a 25 °C, a enzima manteve 90,6% da atividade. A xilanase apresenta atividade residual maior que 85% na faixa de pH 5 a 10 em ambas as temperaturas (4 °C e 25 °C). Esta característica é muito interessante, principalmente por facilitar o processo de purificação da enzima, visto que muitas vezes a enzima é incubada em soluções tampões em processos de diálise e cromatografia.

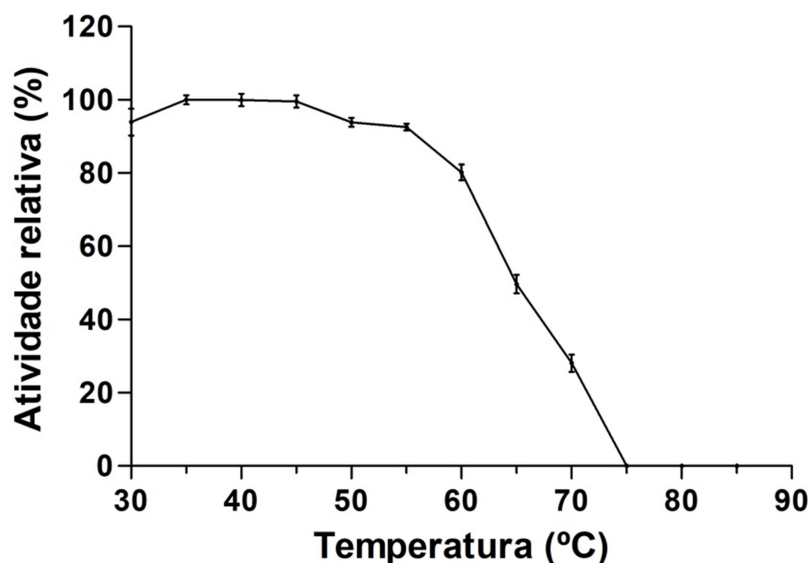
Figura 14 - Efeito do pH na estabilidade enzimática. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.



Fonte: autoria própria.

Referente a termoestabilidade enzimática, foi verificado conforme a Figura 15, que a enzima manteve média maior que 90% da atividade quando incubada a faixa de temperatura de 30 a 60 °C por 1 hora. Após a incubação por 1 hora a 55 °C, a enzima purificada apresentou atividade relativa de 92%. Dado similar foi encontrado por Liu e colaboradores (2018), todavia, o tempo de incubação foi inferior (30 minutos). Já na temperatura ótima (65 °C) houve uma redução de 50% na atividade. Não foi detectado atividade quando a enzima foi incubada em temperatura igual ou superior a 75 °C.

Figura 15 - Efeito da temperatura na estabilidade enzimática. Os valores são expressos como média (n = 3) ± desvio padrão.



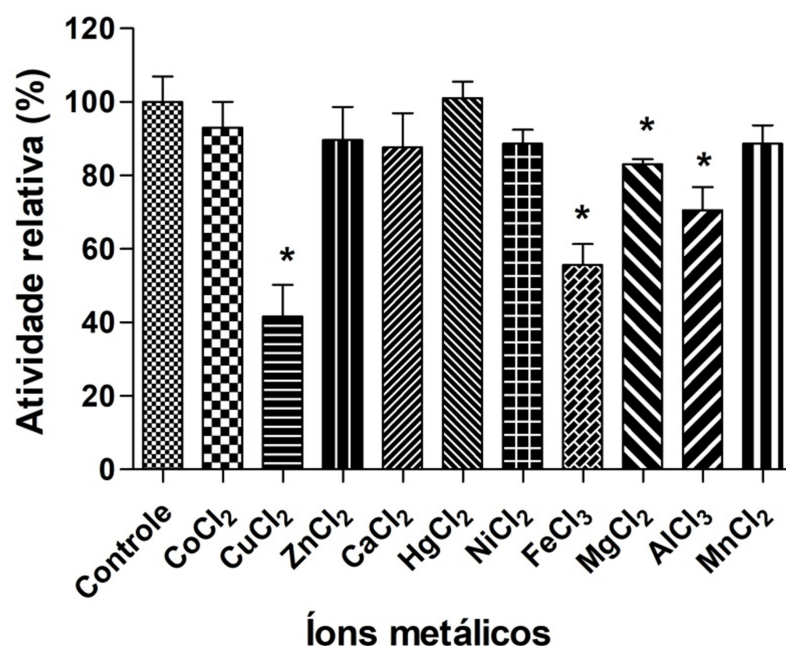
Fonte: autoria própria.

5.2.2 Efeito de íons metálicos e diferentes compostos

Com o objetivo de verificar uma possível modulação positiva ou negativa da enzima, foi avaliada a influência da presença de diferentes cátions na forma de sais de cloro na atividade enzimática.

Dentre os íons metálicos avaliados (Figura 16), nenhum deles apresentou capacidade de modular positivamente a enzima. Foi notável a modulação negativa na presença de determinados íons, como Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} e Al^{3+} . O maior efeito na redução da atividade enzimática foi detectado na presença do íon Cu^{2+} , que apresentou atividade relativa em torno de 40%. O íon cobre se liga aos grupos sulfidrilas de proteínas, desestabilizando a estrutura proteica, levando a redução da atividade (MIZRAHI; ACHITUV, 1989). O efeito de modulação negativa causado pelo íon cobre, também foi relatado para outras xilanases (BASIT et al., 2018; MCPHILLIPS et al., 2014; SHARMA et al.; 2010).

Figura 16 - Efeito de íons metálicos na concentração de 5 mmol L⁻¹ na atividade enzimática. Os valores são expressos como média (n = 3) ± desvio padrão. Os asteriscos representam diferenças significativas (p<0,05) pelo teste t de Student em relação ao controle.

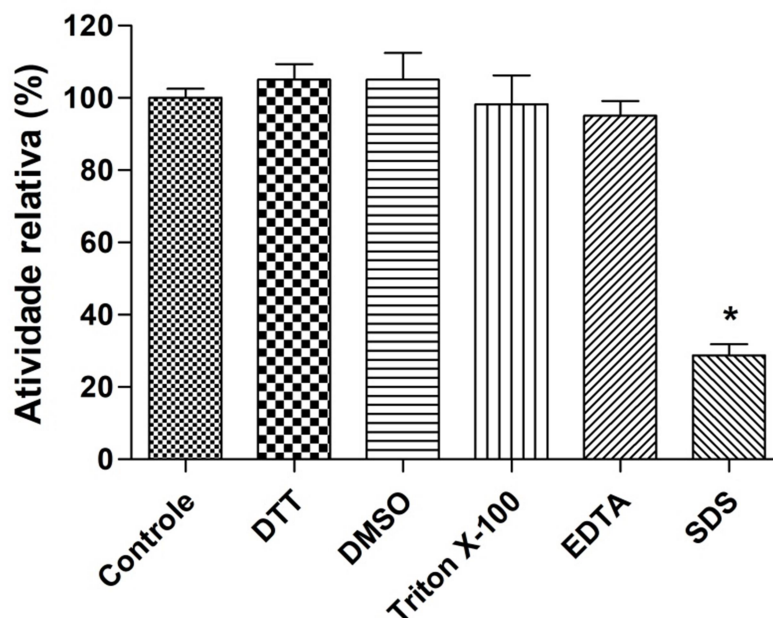


Fonte: autoria própria.

Foi avaliado o efeito da presença de diferentes compostos na atividade enzimática, sendo os resultados apresentados na Figura 17. Dos compostos avaliados, o SDS se destaca como promotor de modulação negativa na concentração de 5 mmol L⁻¹, sendo significativamente diferente em relação ao controle, mantendo somente 28,7% da atividade. A redução da atividade da enzima ocorre porque o SDS é um reagente tensoativo aniônico que apresenta uma porção hidrofóbica apta a remover interações existentes na estrutura da proteína, desestabilizando-as (KANNAN et al., 2012).

Como o EDTA não apresentou efeito significativo de modulação negativa da enzima, pode-se supor que a mesma é independente de metais como cofator, visto que o EDTA complexa metais. Isto também foi evidenciado para xilanases caracterizadas do fungo *M. thermophila* expressa em *Pichia pastoris* (BASIT et al., 2018). Já os outros compostos (DTT, DMSO e Tritox X-100) não influenciaram na atividade enzimática.

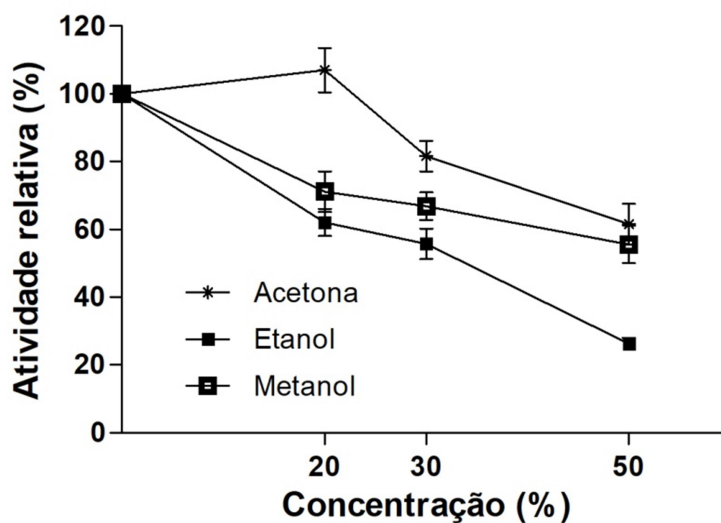
Figura 17 - Efeito de 5 mmol L⁻¹ de reagentes na atividade enzimática. Os valores são expressos como média (n = 3) ± desvio padrão. Os asteriscos representam diferenças significativas (p<0,05) pelo teste t de Student em relação ao controle.



Fonte: autoria própria.

O efeito da presença de três solventes orgânicos foi avaliado nas concentrações: 20, 30 e 50%, de acordo com o exposto na Figura 18. A enzima se manteve estável à acetona na concentração de 20% e menos estável nesta mesma concentração para o etanol e metanol, 62,1% e 71,2%, respectivamente. A presença de etanol foi a que teve maior impacto sobre a atividade mantendo apenas 26,3% enquanto para acetona e metanol, 61,5% e 55,6%, respectivamente, todos a 50% de concentração. A maior inativação da enzima pelo etanol deve-se ao fato dele ser menos polar que o metanol.

Figura 18 - Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática. Os valores são expressos como média (n = 3) ± desvio padrão.

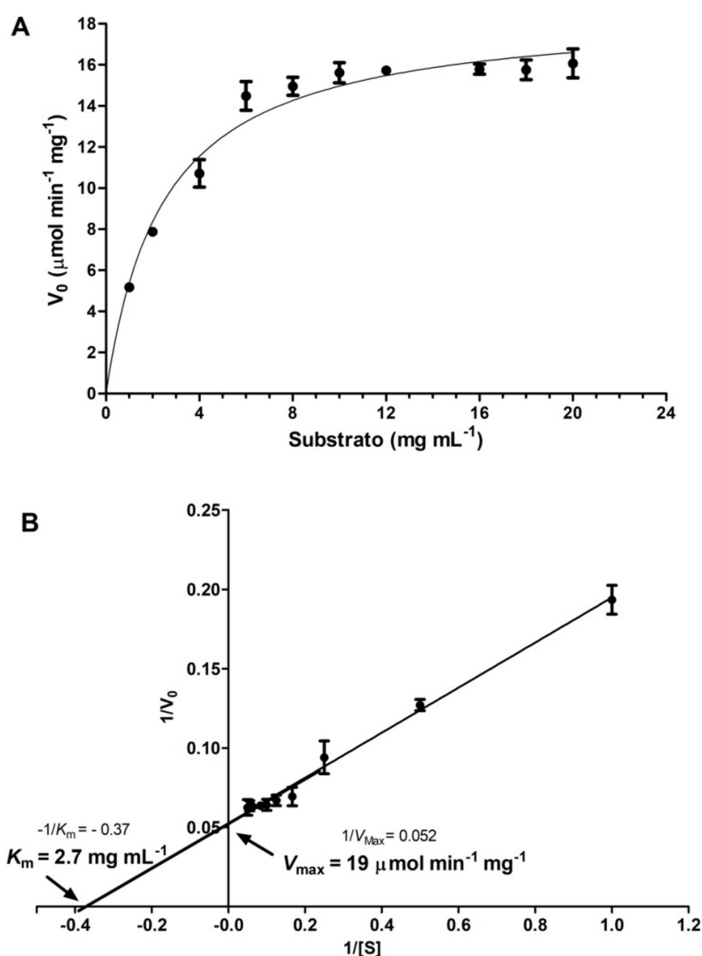


Fonte: autoria própria.

5.2.3 Parâmetros cinéticos

Na faixa de concentração do substrato analisado, que foi de 1 a 20 mg mL⁻¹, a xilanase purificada teve comportamento compatível com o perfil de cinética de Michaelis-Menten, conforme evidenciado na Figura 19.

Figura 19 - Gráfico de Michaelis-Menten (A) e Lineweaver-Burk (B) da xilanase purificada variando-se a concentração de xilana *beechwood* (1 a 20 mg mL⁻¹) em ensaio realizado a 65 °C pH 4,5. Os valores são expressos como média (n = 3) ± desvio padrão.



Fonte: autoria própria.

Observando a Figura 19, é possível notar que os resultados obtidos foram similares. Os valores de K_m e V_{max} para a curva de Michaelis-Menten foram estimados em $2,46 \pm 0,26 \text{ mg mL}^{-1}$ e $18,64 \pm 0,48 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectivamente. Enquanto o K_m e V_{max} para a plotagem de Lineweaver-Burk foi $2,7 \pm 0,28 \text{ mg mL}^{-1}$ e $19 \pm 1 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectivamente. Os valores de V_{max}/K_m são similares para a curva de Michaelis-Menten (7,5) e a plotagem de Lineweaver-Burk (7), o que reforça a fidelidade os resultados demonstrados neste trabalho.

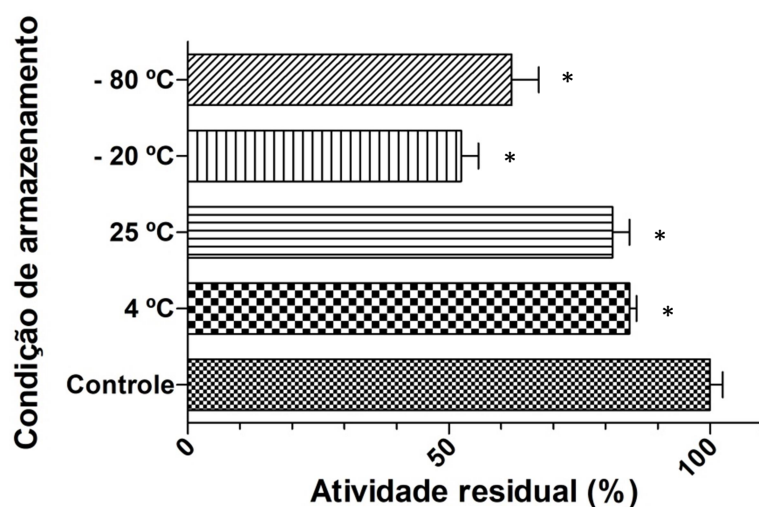
O valor de K_m se encontra dentro da faixa de xilanases microbianas que é de 0,14 a 14 mg mL^{-1} (VERMA et al., 2013). Valor similar de K_m ($2,477 \text{ mg mL}^{-1}$) foi encontrado para xilanase do *Remersonia thermophila* utilizando xilana *beechwood* (MCPHILLIPS et al.; 2014). Basit e colaboradores (2018) obtiveram valores

superiores de K_m ($8,80 \text{ mg mL}^{-1}$ e $5,67 \text{ mg mL}^{-1}$) para duas endo- β -1,4-xilanases do *Myceliophthora thermophila* utilizando xilana RBB (*Remazol Brilliant Blue*). Pelo fato da enzima purificada apresentar baixo valor de K_m , pode-se inferir que a mesma possui alta especificidade em relação ao substrato avaliado.

5.2.4 Condições de armazenamento

No teste de armazenamento da enzima purificada em quatro diferentes condições foi possível perceber diferenças, conforme resultados apresentados na Figura 20. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t de Student, em relação ao controle, para todas as amostras.

Figura 20 - Atividade residual da xilanase purificada em diferentes condições de armazenamento por 24 horas. Os valores são expressos como média ($n = 3$) \pm desvio padrão. Os asteriscos representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste t de Student em relação ao controle.



Fonte: autoria própria.

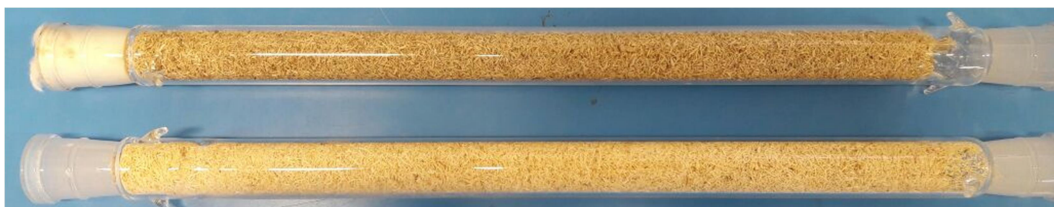
Dentre as condições avaliadas, o armazenamento da enzima que apresentou maior atividade residual foi nas condições de 4 °C e 25 °C, embora todas as condições tenham apresentado diferença significativa em relação ao controle. A -20 °C a enzima apresentou somente 52% de atividade residual, possivelmente devido ao dano causado pelo processo de congelamento e descongelamento da enzima, que pode causar a perda da estrutura terciária da proteína, fazendo com que a

mesma perda ou reduza sua propriedade catalítica. Desta forma, o armazenamento da enzima por 24 horas não é recomendado nas condições de -20 °C e -80 °C, por terem apresentado menor atividade residual.

5.3 Pré-tratamento do bagaço

O bagaço de cana-de-açúcar (1 a 1,41 mm) foi submetido ao processo de ozonólise seguido de lavagem alcalina. O resultado da ozonólise pode ser observado pela mudança na coloração das amostras conforme Figura 21, sendo que a fibra do bagaço fica com o aspecto mais claro após o pré-tratamento.

Figura 21 - Bagaço de cana na coluna de vidro: não ozonizado (coluna superior) e ozonizado (coluna inferior)

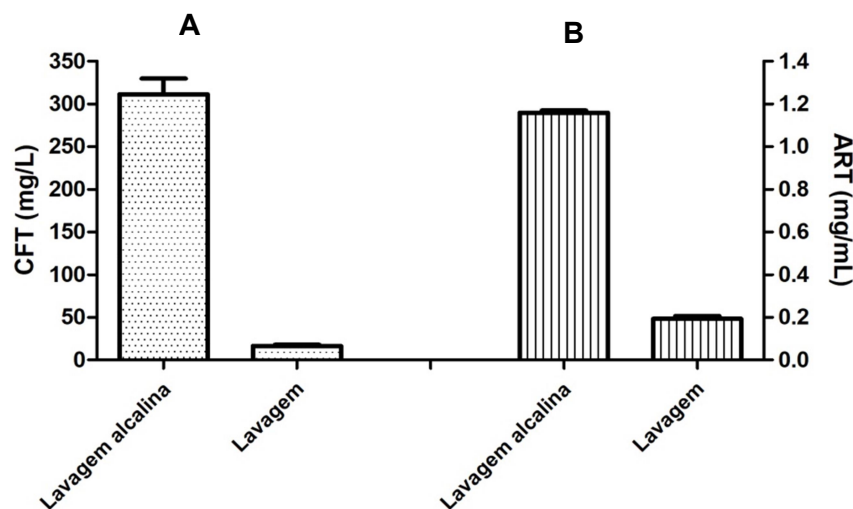


Fonte: autoria própria.

Neste trabalho, a aplicação da lavagem alcalina após a ozonólise, teve como intuito contribuir para o processo de desconstrução do material lignocelulósico, tendo como foco principal a deslignificação do material ligado a carboidratos. O processo de ozonólise gera compostos de inibição provenientes da degradação de açúcar, como o ácido acético e fórmico e da lignina, compostos aromáticos (TRAVAINI et al., 2013).

Visando a detoxificação do material pré-tratado, com objetivo principal de reduzir a quantidade de compostos fenólicos, que podem agir como inibidores enzimáticos, foi realizada uma etapa de lavagem. Os resultados são apresentados na Figura 22.

Figura 22 - Compostos Fenólicos Totais (CFT) (A) e Açúcares Redutores Totais (ART) (B) após processo de lavagem alcalina e lavagem. Os valores são expressos como média (n = 3) ± desvio padrão.



Fonte: autoria própria.

Conforme a Figura 22A, a etapa de lavagem do bagaço pré-tratado se mostrou eficiente para redução do teor de compostos fenólicos presentes na etapa de lavagem alcalina, visto que o valor de $311,25 \pm 18,46 \text{ mg L}^{-1}$ foi reduzido para $16,55 \pm 1,34 \text{ mg L}^{-1}$ de CFT, correspondente a 94,7%. Uma redução similar na quantidade de CFT foi obtida por Bordignon (2017), no qual houve uma redução de 88%, no entanto foram necessários cinco ciclos de lavagem para alcance deste resultado.

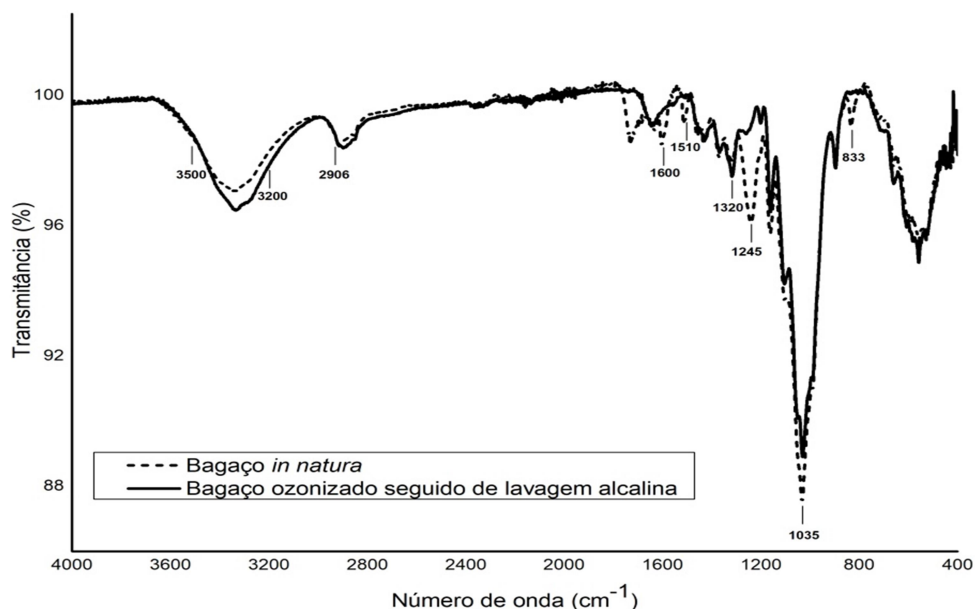
A ação do ozônio na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar foi evidenciada por Travaini e colaboradores (2013) através da análise da conversão parcial da lignina insolúvel em lignina solúvel, e degradação de parte da lignina total (redução de 39,6%).

Na figura 22B, é possível observar uma redução no teor de açúcares redutores totais, de 83,6%, sendo a redução de $1,16 \pm 0,009$ para $0,19 \pm 0,012 \text{ mg L}^{-1}$ com a etapa de lavagem. O valor encontrado na etapa de lavagem alcalina (19 mg g^{-1} de bagaço) foi inferior ao obtido por Perrone (2015), que foi de $48,3 \text{ mg g}^{-1}$ de bagaço.

A eficiência do pré-tratamento do bagaço foi verificada por comparação do espectro de infravermelho do bagaço submetido ao pré-tratamento e *in natura*, com

o objetivo de verificar mudanças na estrutura da fibra do bagaço. Os resultados são apresentados na Figura 23.

Figura 23 - Espectro de infravermelho do bagaço de cana *in natura* e pré-tratado



Fonte: autoria própria.

Conforme a Figura 23 é possível perceber redução nas bandas correspondentes à absorção no infravermelho pela lignina, como 833 cm^{-1} (FAIX, 1991), 1510 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} (STEWART, 1998). Também é possível verificar redução relacionada à presença de grupos acetil de hemiceluloses em 1245 cm^{-1} (LIU et al., 2007; JU et al., 2011). Algumas bandas relacionadas à absorção por celulose e hemicelulose mantiveram-se com comportamento quase similar ao bagaço sem pré-tratamento, tais como em 1035 cm^{-1} (LIU et al., 2007), 1320 cm^{-1} (CAO; TAN, 2004), 2906 cm^{-1} , 3200 cm^{-1} e 3500 cm^{-1} (YANG et al., 2007; JU et al., 2011), demonstrando pouca ou nenhuma alteração em relação ao bagaço *in natura*.

O bagaço de cana *in natura* e submetido ao pré-tratamento foi caracterizado quimicamente conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Composição química dos bagaços *in natura* e pré-tratado. Os valores são expressos como média (n = 3) ± desvio padrão.

	Bagaço <i>in natura</i>	Bagaço pré-tratado
Celulose* (%)	44,1 ± 2,0	52,0 ± 0,1
Hemicelulose** (%)	27,7 ± 2,2	30,1 ± 0,5
Lignina (%)	25,6 ± 0,1	20,8 ± 2,9
Extrativos (%)	6,0 ± 0,1	NA

NA - Não analisado

* - expressa em glicose

** - expressa em xilose e arabinose

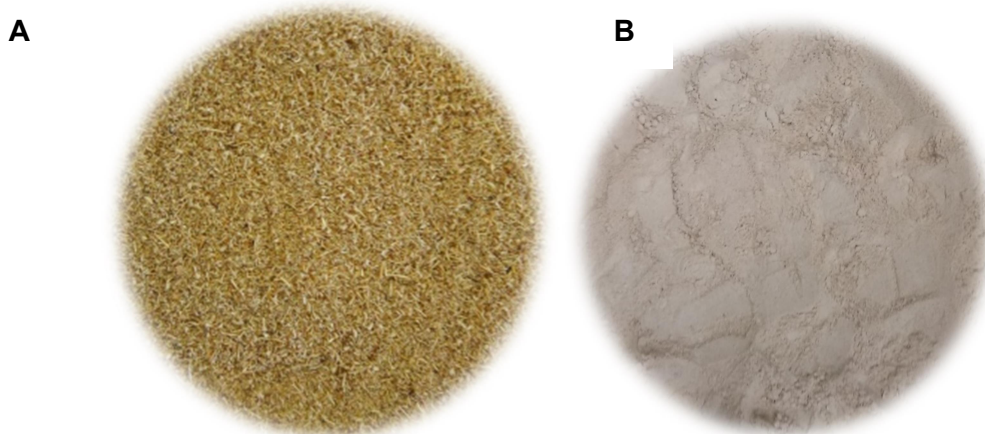
Fonte: autoria própria.

A Tabela 3 demonstra que houve uma redução de 18,8% no teor de lignina, resultando num aumento de 18% e 8,6% de concentração das frações de celulose e de hemicelulose, respectivamente. Os dados obtidos corroboram o trabalho de Perrone e colaboradores (2016) em relação à lignina e celulose. Os mesmos realizaram pré-tratamento de ozonólise seguido de lavagem alcalina nas mesmas condições do presente trabalho, tendo obtido os seguintes resultados: redução de 26,9% de hemicelulose, 18,8% de lignina e aumento de 18,4% de celulose. A diferença dos resultados obtidos em relação à hemicelulose pode estar relacionada à variedade do bagaço e a inversão do fluxo de ozônio após 30 minutos, por permitir assim, menor impacto na estrutura da hemicelulose. Estes autores também avaliaram a composição do bagaço submetido somente a ozonólise, de forma que obtiveram aumento de 5,5% de celulose e redução de 21,2% de hemicelulose e 11% de lignina. O uso da lavagem alcalina após a ozonólise possibilitou uma maior taxa de deslignificação, possivelmente devido à solubilização da lignina em meio alcalino.

5.4 Extração da xilana do bagaço de cana-de-açúcar

A xilana extraída apresentou 70% de xilose na composição e aspectos físicos conforme a Figura 24.

Figura 24 - Bagaço de cana-de-açúcar e xilana extraída do bagaço de cana-de-açúcar



A - Bagaço de cana *in natura*

B - Xilana extraída do bagaço de cana *in natura*

Fonte: autoria própria.

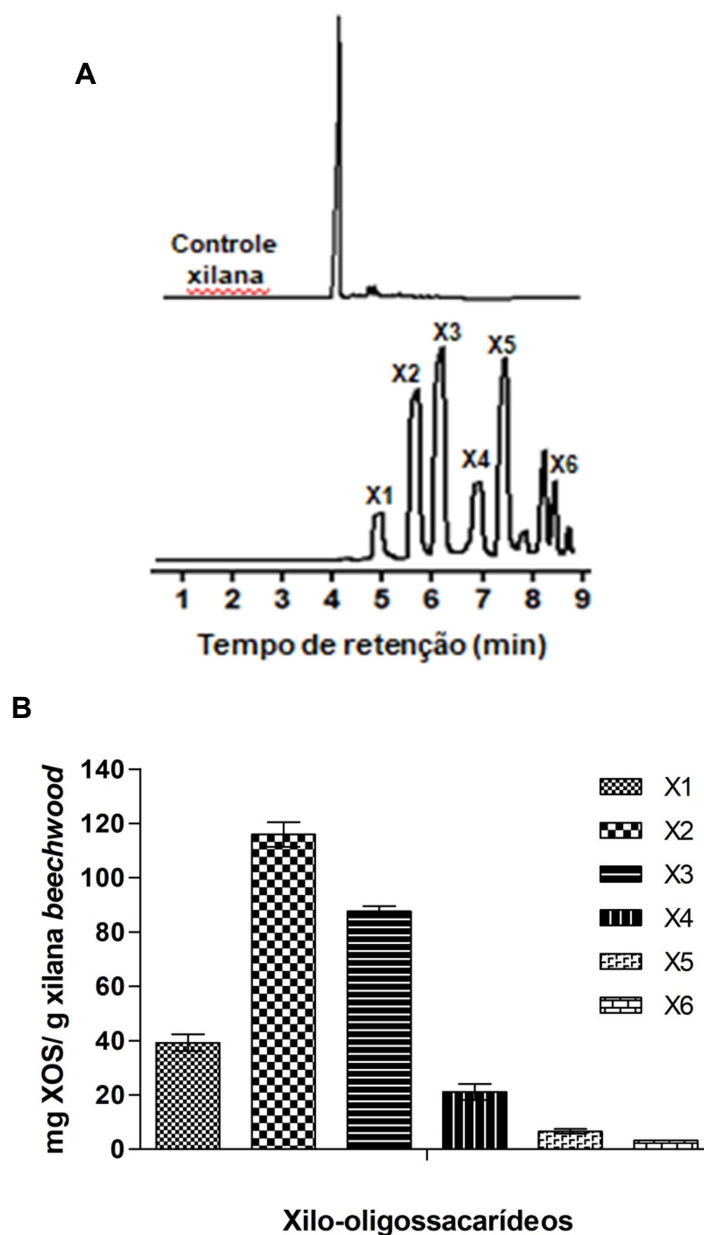
5.5 Hidrólise enzimática

5.5.1 Aplicação da xilanase nativa purificada

5.5.1.1 Xilana *beechwood*

Os principais produtos gerados, diante ação da xilanase nativa purificada na hidrólise da xilana *beechwood*, foram identificados por análise de eletroforese capilar (Figura 25A) e quantificados em relação a composição de xilose e xilo-oligômeros por HPAE-PAD (Figura 25B).

Figura 25 - Hidrólise enzimática da xilana *beechwood* pela enzima nativa purificada do *M. heterothallica* por 12 horas: (A) Eletroforese capilar (B) HPAE-PAD. Condições de hidrólise: 3 % (m/v) xilana *beechwood*, 60 U/g, 40 °C.



Fonte: autoria própria.

De acordo com a Figura 25B, os principais produtos liberados foram xilobiose e xilotriose e, em menor quantidade, xilose, xilotetraose e xilopentaose. Hoffmam e colaboradores (2016) também obtiveram xilobiose como produto principal da hidrólise da xilana *beechwood* diante ação de enzima quimérica (GH11). As características da enzima purificada, bem como o perfil de produtos liberados na hidrólise da xilana *beechwood*, caracterizam a enzima purificada como uma

endoxilanase pertencente à família GH11 (SANTOS et al., 2014; HOFFMAM et al., 2016). A enzima nativa purificada indica se tratar de uma xilanase diferente das enzimas recombinantes utilizadas na hidrólise neste trabalho, apesar de serem do mesmo fungo. A xilanase nativa purificada apresentou massa molecular maior que as outras enzimas (25 kDa) e características físico-químicas diferentes (*E.coli*, temperatura ótima 55 °C pH 6,0; *Pichia*, temperatura ótima 70 °C pH 6,5) (AMO, 2018).

A hidrólise enzimática da xilana *beechwood* pela enzima nativa purificada apresentou rendimento de 30,4% em açúcares totais, dos quais 26% são XOS. Após 12 horas de hidrólise, 234,2 mg de XOS / grama de xilana *beechwood* foram produzidos, com aproximadamente metade desta quantidade correspondendo a xilobiose (115,9±4,52 mg/g xilana).

A enzima purificada possui modo de ação que permite a produção de xilo-oligossacarídeos de interesse para aplicação em alimentos, já que XOS de menor grau de polimerização, como xilobiose e xilotriose, são os que são mais rapidamente assimilados pelos micro-organismos probióticos (GULLÓN et al., 2011).

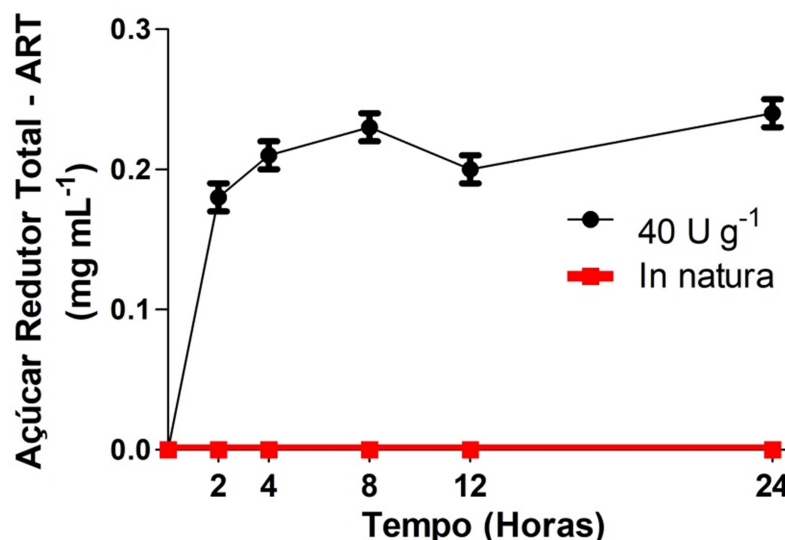
5.5.2 Aplicação da xilanase GH11 recombinante

5.5.2.1 Bagaço de cana pré-tratado

5.5.2.1.1 Enzima expressa em *E. coli*

A enzima recombinante GH11 expressa em *E.coli* obteve o perfil de liberação de açúcares redutores totais conforme a Figura 26.

Figura 26 - Perfil de produção de açúcares redutores totais na hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado pela enzima GH11 recombinante expressa em *E.coli* por 24 horas. Condições de hidrólise: 3 % (m/v) bagaço pré-tratado, 40 U/g, 40 °C.



Fonte: autoria própria.

Ao longo da hidrólise enzimática, cinco tempos foram avaliados, sendo que a produção de ART aumentou nas primeiras horas com uma tendência a estabilizar a partir de 8 horas. A produção máxima de açúcares redutores totais de $0,24 \pm 0,01$ mg/mL em 24 horas.

As xilanas provenientes de resíduos agrícolas, como do bagaço de cana-de-açúcar, são predominantemente caracterizadas como arabinoglucuronoxilana. Os pré-tratamentos alcalinos possibilitam a remoção de grande parte dos grupos acetil do polissacarídeo através da saponificação das ligações éster e elimina os substituintes ácidos. No entanto, caso o tratamento alcalino seja brando, pode não haver a remoção das ligações éster, assim como o ácido ferúlico e outros podem continuar ligados à cadeia (BIELY; SINGH; PURCHAT, 2016).

O pré-tratamento de ozonólise seguida de lavagem alcalina permitiu o acesso da enzima à hemicelulose, visto que, não foi obtido ART na hidrólise do bagaço *in natura* (Figura 26).

A composição de xilose e xilo-oligossacarídeos presente na amostra submetida a 24 horas de hidrólise foi avaliada por HPAE-PAD conforme Tabela 4. É possível verificar que dentre os açúcares pesquisados, xilobiose e xilotriose foram o que tiveram maior predominância. Bragatto e colaboradores (2013) avaliaram a produção de XOS a partir do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com peróxido de

hidrogênio e ácido acético sob ação da xilanase recombinante de *Bacillus subtilis*, tendo obtido majoritariamente xilotriose, xilotetraose e xilopentaose.

Tabela 4 - Análise de HPAE-PAD da hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado pela enzima GH11 recombinante expressa em *E.coli* por 24 horas. Condições de hidrólise: 3 % (m/v) bagaço pré-tratado, 40 U/g, 40 °C.

	mg / g de bagaço pré-tratado	mg / g xilana	%
X1	0,61 ± 0,02	2,04 ± 0,08	0,20 ± 0,01
X2	2,51 ± 0,12	8,33 ± 0,41	0,83 ± 0,04
X3	2,57 ± 0,17	8,54 ± 0,58	0,85 ± 0,06
X4	0,35 ± 0,06	1,15 ± 0,19	0,11 ± 0,02
X5	-	-	-
X6	-	-	-
XOS Total	5,43 ± 0,35	18,02 ± 1,18	1,79 ± 0,12

Fonte: autoria própria.

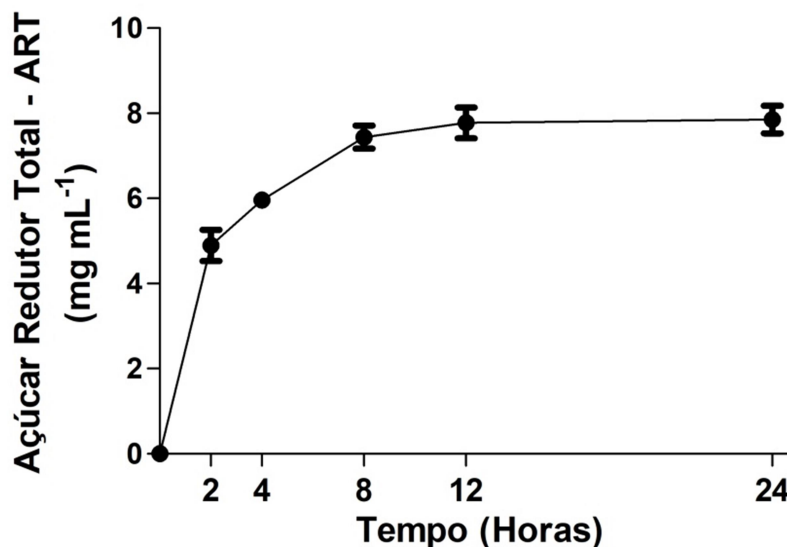
Mandelli e colaboradores (2014) avaliaram a produção enzimática de XOS do bagaço de cana-de-açúcar utilizando enzima quimérica xilanase-ferulil esterase de *Clostridium thermocellum* em diferentes substratos por 5 horas. Os autores realizaram a identificação dos produtos liberados por eletroforese capilar, de forma que a maior predominância de xilobiose, xilotriose e xilotetraose foi obtida no ensaio feito com arabinoxilana de trigo (Megazyme). Nos ensaios realizados com bagaço *in natura*, os mesmos identificaram uma predominância de xilose, comportamento diferente dos bagaços que foram submetidos a pré-tratamento, que tiveram prevalência de xilobiose.

5.5.2.2 Xilana *beechwood*

5.5.2.2.1 Enzima expressa em *E. coli*

Na hidrólise da xilana *beechwood*, utilizando 60 U g⁻¹, foi obtido o perfil (Figura 27) durante o período avaliado. Em 24 horas, a enzima foi capaz de hidrolisar 261,88 mg de açúcar total/grama de xilana, sendo que em 2 horas de hidrólise a enzima já havia liberado 62% do total de ART liberado em 24 horas.

Figura 27 - Perfil de produção de açúcares redutores totais na hidrólise enzimática da xilana *beechwood*, sob ação da xilanase recombinante GH11 expressa em *E.coli* 24 horas. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão. Condições de hidrólise: 3 % (m/v) xilana *beechwood*, 60 U/g, 40 °C.



Fonte: autoria própria.

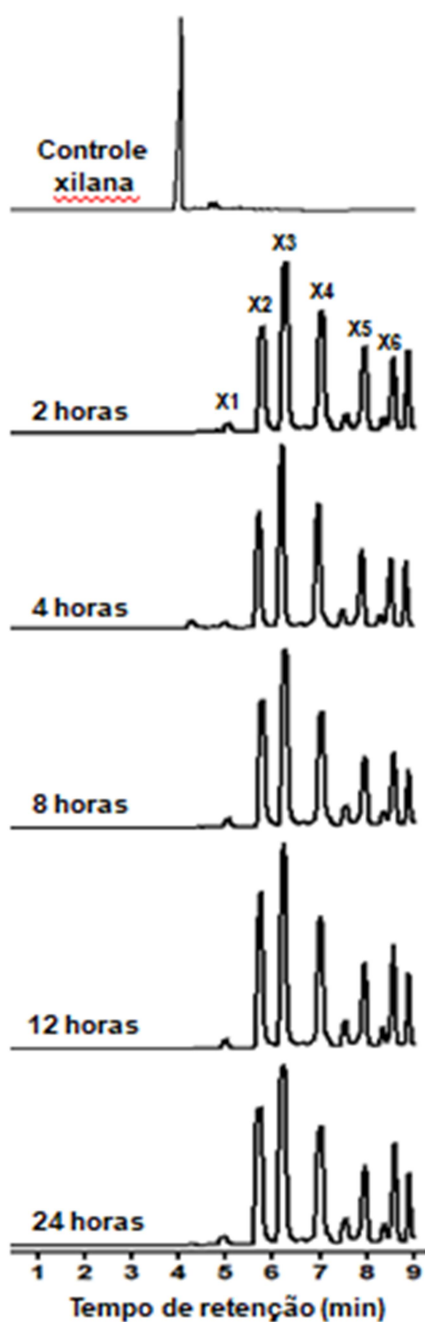
As xilanas *hardwood*, como a xilana *beechwood*, são classificadas como glucuroxilanas. No processo de extração da xilana *beechwood*, caso a extração não tenha sido realizado por meio de pré-tratamento alcalino, esta pode ser parcialmente acetilada. A acetilação faz com que o polissacarídeo seja mais resistente à ação de xilanases. No entanto, a presença de grupos acetil favorece o processo de hidrólise, visto que propicia uma maior solubilidade à hemicelulose, por evitar a associação dos resíduos que não possuem substituição, embora as xilanases ajam somente em regiões não substituídas ou nas posições onde os grupos acetil são tolerados pelas mesmas (BIELY; SINGH; PURCHAT, 2016).

Com o objetivo de identificar quais produtos estavam sendo liberados na hidrólise enzimática e ter conhecimento do modo de ação das enzimas, foram realizadas análises de eletroforese capilar. Inicialmente, foram determinados os tempos de retenção dos padrões de xilose, xilobiose, xilotriose, xilotetraose, xilopentaose e xilohexaose, que posteriormente foram utilizados na identificação dos picos das amostras da hidrólise.

As amostras da hidrólise correspondente à Figura 27 foram submetidas à eletroforese capilar, conforme resultado apresentado na Figura 28. Conforme esperado, a enzima recombinante GH11 apresentou pico de xilose pouco expressivo

nos cinco tempos avaliados. Ao longo da hidrólise, o produto predominantemente gerado pela ação da enzima recombinante foi xilotriose. Picos menos expressivos de xilobiose, xilotetraose, xilopentaose e xilohexaose também foram identificados.

Figura 28 - Eletroforese capilar dos produtos de hidrólise da xilana *beechwood* pela xilanase recombinante expressa em *E. coli* GH11 de *M. heterothallica* X1 - Xilose, X2 - Xilobiose, X3 - Xilotriose, X4 - Xilotetraose, X5 - Xilopentaose, X6 - Xilohexaose



Fonte: autoria própria.

Não foi perceptível alteração no perfil de liberação de xilo-oligossacarídeos ao longo do período de hidrólise.

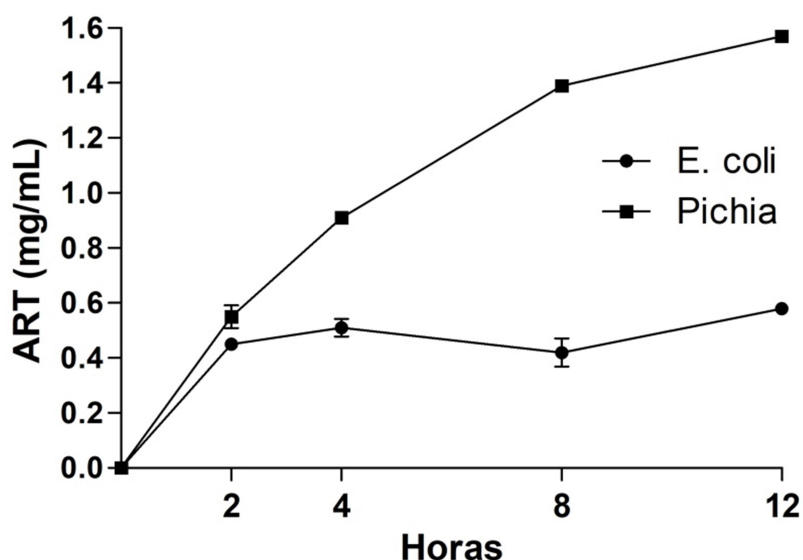
O efeito do grau de polimerização dos XOS na fermentabilidade *in vitro* de probióticos foi avaliado por Moura e colaboradores (2008). Foi demonstrado que o maior crescimento de cepas de *Bifidobacterium* aconteceu quando as mesmas foram cultivadas com XOS comerciais, que possuíam grau de polimerização de 2 a 5, contendo majoritariamente xilobiose e xilotriose.

5.5.2.3 Xilana extraída do bagaço de cana-de-açúcar

5.5.2.3.1 Xilanase expressa em *E. coli* e *Pichia*

Foi realizada hidrólise enzimática da xilana extraída do bagaço de cana *in natura* sob ação de xilanase recombinante GH11 expressa em *E.coli* e *Pichia*, com o objetivo de comparar os produtos gerados por cada enzima. Ao longo das 12 horas de hidrólise, foram feitas quatro mensurações da produção de açúcar redutor total, nos tempos 2, 4, 8 e 12 horas. Conforme a Figura 29, a produção de ART por ambas enzimas apresentou comportamento similar em 2 horas de hidrólise. No entanto, após este tempo, a produção de ART pela enzima recombinante expressa em *E.coli* tende a estabilizar, enquanto a da enzima expressa em *Pichia* apresenta tendência de crescimento.

Figura 29 - Perfil de produção de açúcares redutores totais na hidrólise enzimática da xilana *beechwood*, sob ação de enzimas recombinantes GH11 expressa em *E.coli* e *Pichia* por 24 horas. Os valores são expressos como média (n = 3) ± desvio padrão. Condições de hidrólise: 3 % (m/v) xilana *beechwood*, 60 U/g, 40 °C.



Fonte: autoria própria.

O perfil de liberação de xilose, xilobiose e xilotriose, a partir de xilana extraída do bagaço de cana *in natura*, sob ação de enzimas recombinantes GH11 foi analisado por HPAE-PAD após 12 horas de hidrólise. Vale ressaltar que a xilose, por ser um monômero, não é considerada xilo-oligossacarídeo, não sendo assim um produto de interesse da hidrólise enzimática na produção de XOS e também por ser considerada a principal inibidora de xilanase em biorreatores (HEGAZY et al., 2018). Os resultados (Tabela 5) mostram que nas amostras analisadas dos hidrolisados obtidos pela ação da enzima recombinante expressa em *E.coli*, não foi possível detectar a presença de xilose, tendo obtido $22,80 \pm 0,29$ mg de xilobiose e $21,38 \pm 0,37$ mg de xilotriose por grama de xilana. Já os hidrolisados da enzima recombinante expressa em *Pichia*, apresentaram liberação de xilose ($15,29 \pm 0,06$ mg de xilose por grama de xilana). A produção de xilobiose e xilotriose foi maior para a enzima expressa em *Pichia* em 12 horas de hidrólise, portanto, esta enzima possui maior interesse para aplicação que tenha por finalidade a produção de XOS. Perfil similar de liberação de XOS foi encontrado nos hidrolisados obtidos a partir de hidrólise enzimática da xilana extraída do sabugo de milho, no qual os produtos principais foram xilobiose e xilotriose (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012). Chapla, Pandit e Shah

(2012) obtiveram 107,04±4,6 mg de XOS/g sabugo de milho cru após 8 horas de hidrólise. No presente trabalho, foi atingido o resultado de 54,62±0,95 mg de XOS/g de xilana extraída após 12 horas de hidrólise.

Xilo-oligossacarídeos obtidos a partir de xilana extraída do sabugo de milho foram utilizados no cultivo de quatro micro-organismos probióticos (*Bifidobacterium adolescentes*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus fermentum*), sendo que todos eles foram capazes de utilizar os XOS como fonte de carbono para o crescimento. No entanto, as cepas de *Bifidobacterium* apresentaram crescimento superior ao apresentado quando utilizado glicose como fonte de carbono (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012).

Tabela 5 - Análise de HPAE-PAD da produção de xilose, xilobiase e xilotriose a partir de xilana extraída do bagaço de cana *in natura* sob ação de enzimas recombinantes GH11 após 12 horas de hidrólise

Hidrólise 12 horas	Xilose			Xilobiase			Xilotriose		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
				15,96	22,80	2,28	14,97	21,38	2,14
<i>E. coli</i> *	ND	ND	ND	±	±	±	±	±	±
				0,20	0,29	0,03	0,26	0,37	0,04
	10,7	15,29	1,53	27,71	39,59	3,96	26,91	38,44	3,84
<i>Pichia</i> **	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,04	0,06	0,01	0,42	0,60	0,06	0,53	0,75	0,08

A - mg/g xilana extraída

B - mg/g xilana

C - %

ND - Não detectado

* - amostras diluídas 50 vezes

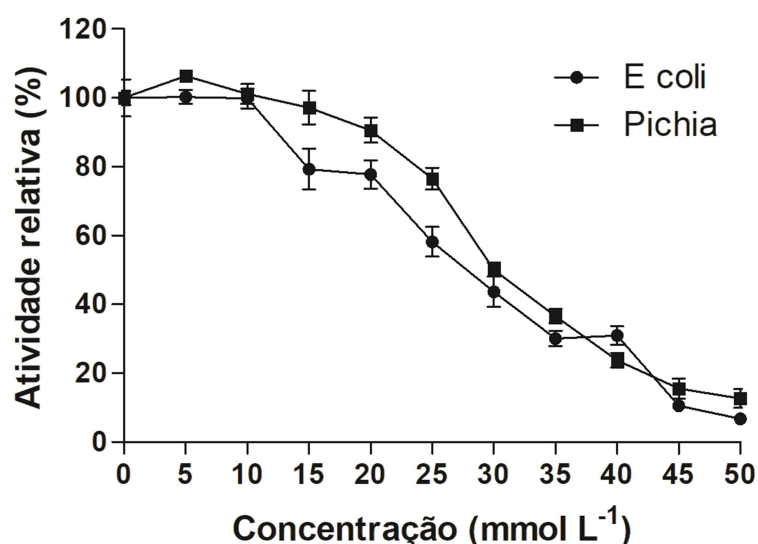
** - amostras diluídas 100 vezes

Fonte: autoria própria.

Hegazy e colaboradores (2018) relataram que a xilose é o principal inibidor da xilanase em biorreatores. Para avaliar a influência de um dos produtos da hidrólise na catálise da xilanase, foi realizado teste de incubação da enzima na presença de diferentes concentrações de xilose (5-50 mmol L⁻¹). De acordo com a Figura 30, ambas as enzimas não apresentaram alteração significativa de comportamento nas

concentrações de 5 e 10 mmol L⁻¹ de xilose. No entanto, a partir de 10 mmol L⁻¹ ambas enzimas apresentaram tendência de queda da atividade enzimática, sendo que a *E.coli* se mostrou mais facilmente inibida na presença de xilose. Isto demonstra que no decorrer da hidrólise, a enzima pode sofrer inibição catalítica a depender da concentração de xilose presente no hidrolisado. Comportamento similar foi observado para xilanase GH10 de *Geobacillus stearothermophilus*, a qual apresentou maior inibição da atividade enzimática conforme aumento da concentração de xilose (0 a 100 mmol L⁻¹) (HEGAZY et al., 2018).

Figura 30 - Avaliação da inibição da enzima pela presença de xilose em diferentes concentrações



Fonte: autoria própria.

A redução da taxa de hidrólise pode estar relacionada com a redução da disponibilidade de sítios catalíticos e a redução da atividade enzimática pela inibição por produtos formados na reação (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012). Maitan-Alfenas e colaboradores (2016) relataram inibição total de xilanase fúngica (XInB) expressa em *Pichia pastoris*, por xilotriose na concentração de 1 mg mL⁻¹. Herrmann e colaboradores (1997) descreveram inibição de β-D-xilosidase do *Trichoderma reesei* por xilose.

6 CONCLUSÕES

A xilanase purificada do fungo *M. heterothallica* F.2.1.4 apresenta vantagens em relação a sua alta especificidade ao substrato xilana *beechwood*, estabilidade térmica e ampla estabilidade ao pH, apresentando características que possibilitam sua utilização em processos de sacarificação enzimática de xilana para a produção de XOS. Além disso, para nosso conhecimento, nenhuma xilanase nativa do referido fungo termofílico foi purificada. As características da enzima, bem como seu modo de ação, que em hidrólise de xilana *beechwood* liberam predominantemente xilobiose e xilotriose, favorecem futuros ensaios de obtenção de XOS a partir de outros substratos e aplicação dos mesmos para avaliação da capacidade de assimilação por probióticos.

As enzimas recombinantes avaliadas demonstraram ter modo de ação relevante para a obtenção de XOS de cadeia curta, que são os de maior potencial prebiótico, por serem mais facilmente assimilados pela maioria dos micro-organismos probióticos.

As diferenças estruturais dos diferentes substratos (ex. bagaço de cana pré-tratado e xilana isolada) fazem com que a mesma enzima tenha um modo de ação diferente em cada um deles. Esta diferença é decorrente da acessibilidade que a enzima tem ao substrato, que é menor no caso de resíduo lignocelulósico submetido à pré-tratamento em relação a xilana isolada e também de acordo com o tipo e quantidade de resíduos de xilose com substituição presentes.

7 REFERÊNCIAS

- AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H.; SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 98, p. 5301-5317, 2014.
- AHMAD, I.; NAWAZ, N.; DARWESH, N. M.; RAHMAN, S.; MUSTAFA, M. Z.; KHAN, S. B.; PATCHING, S. G. Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli* **Protein Expression and Purification**, v. 144, p. 12-18, 2018.
- AMO, G. S. Expressão heteróloga e caracterização de xilanase de *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4., 2018. Tese (Doutorado em Microbiologia). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.
- APHA - American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Washington, p. 191-195, 1999.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTILLA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology review**, v. 29, p. 719-739, 2005.
- BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, p.504-510, 2007.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270, 1992.
- BAJPAI, P. Xylanolytic enzymes. Chapter 6 - Purification of xylanases, Academic Press, p. 53-61, 2014.
- BASIT, A.; LIU, J.; MIAO, T.; ZHENG, F.; RAHIM, K.; LOU, H.; JIANG, W. Characterization of two endo- β -1,4-xylanases from *Myceliophthora thermophila* and their saccharification efficiencies, synergistic with commercial cellulase. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 233, 2018.
- BEAUGRAND, J.; CHAMBAT, G.; WONG, V. W. K.; GOUBET, F.; RÉMOND, C.; PAËS, G.; BENAMROUCHE, S.; DEBEIRE, P.; O'DONOHUE, M.; CHABBERT, B. Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2529-2540, 2004.
- BHALLA, A.; BANSAL, N.; KUMAR, S.; BISCHOFF, K. M.; SANI, R.K. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. **Bioresource Technology**, v.128, p. 751-759, 2013.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v.3, p. 286-290, 1985.

BIELY, P.; SINGH, S.; PURCHAT, P. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, p.1260-1274, 2016.

BORDIGNON, S. E. Bioprocesso de produção de etanol celulósico via tratamento com ozônio e hidrotérmico, 2017. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.

BRAGATTO, J.; SEGATO, F.; SQUINA, F. M. Production of xylooligosaccharides (XOS) from delignified sugarcane bagasse by peroxide-HAc process using recombinant xylanase from *Bacillus subtilis*. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 123-129, 2013.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 199-204, 2009.

BRIENZO, M.; FERREIRA, S.; VICENTIM, M. P.; SOUZA, W.; SANT'ANNA, C. Comparison study on the biomass recalcitrance of different tissue fractions of sugarcane culm. **Bioenergy Research**, v. 7, p. 1454-1465, 2014.

BRIENZO, M.; CARVALHO, A. F. A.; FIGUEIREDO, F. C.; NETO, P. O. Sugarcane bagasse hemicellulose properties, extraction technologies and xylooligosaccharides production. Food Waste: Practices, Management and Challenges. 1^{ed} New York: **Nova Science Publishers**, p. 155-188, 2016.

CAO, Y.; TAN, H. Structural characterization of cellulose with enzymatic treatment. **Journal of Molecular Structure**, v. 705, p. 189-193, 2004.

CAZy - Carbohydrate Active Enzymes database. Disponível em: <<http://www.cazy.org/>>. Acesso em: 26 jun de 2018.

CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by prebiotics. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 215-221, 2012.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento Safra Brasileira Cana-de-Açúcar**, v. 4 - Safra 2017/18, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-77, 2018. Disponível em:< https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar/item/download/17026_e0504d08aca77ee13e86c2e7e7f43424>. Acesso em: 29 mai de 2018.

CRUZ, S. H. Bagaço e palha da cana são fontes de celulose para gerar álcool. **Visão agrícola**, n. 8, 2008.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 297-306, 2009.

EVANGELISTA, R. A.; LIU, M. S.; CHEN, F. T. A. Characterization of 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonate derivatized sugars by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 13, p. 2239-2245, 1995.

FAIX, O. Classification of lignin from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. **Holzforschung Journal**, v. 45, p. 21-27, 1991.

FAWZI, E. M. Highly thermostable xylanase purified from *Rhizomucor miehei* NRL 3169. **Acta Biologica Hungarica**, v. 62(1), p. 85-94, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES - FAO; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. Roma, n. 85, 2006.

GE Life Sciences - Size Exclusion Chromatography Principles and Methods, 2000.

GE - Ion Exchange Chromatography and Chromatofocusing Principles and Methods, 2004.

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L.; REIMER, R. A.; SALMINEN, S. J.; SCOTT, K.; STANTON, C.; SWANSON, K. S.; CANI, P. D.; VERBEKE, K.; REID, G. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, p. 491-502, 2017.

GULLÓN, P., GONZÁLEZ-MUNÓZ, M. J., PARAJÓ, J. C. Manufacture and prebiotic potential of oligosaccharides derived from industrial solid wastes. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6112-6119, 2011.

GUPTA, S.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Evaluation of pretreatment methods in improving the enzymatic saccharification of cellulosic materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 1103-1109, 2011.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 36(6), p. 1089-1098, 2016.

HEGAZY, U. M.; EL-KHONEZY, M. I.; SHOKEER, A.; ABDEL-GHANY, S. S.; BASSUNY, R. I.; BARAKAT, A. Z.; SALAMA, W. H.; AZOUZ, R. A. M.; HERRMANN, M. C.; VRSANSKA, M.; JURICKOVA, M.; HIRSCH, J.; BIELY, P.; KUBICEK, C. P. The β -D-xylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional b-D-xylan xylohydrolase **Biochemical Journal**, v. 321, p. 375-381, 1997.

HOFFMAM, Z. B.; ZANPHORLIN, L. M.; COTA, J.; DIOGO, J. A.; ALMEIDA, G. B.; DAMÁSIO, A. R. L.; SQUINA, F.; MURAKAMI, M. T.; RULLER, R. Xylan-specific carbohydrate-binding module belonging to family 6 enhances the catalytic

performance of a GH11 endo-xylanase. **New Biotechnology**, v. 33, p. 467-472, 2016.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation-are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301-306, 2005.

JU, Y.; HUYNH, L.; KASIM, N. S.; GUO, T.; WANG, J.; FAZARY, A. E. Analysis of soluble and insoluble fractions of alkali and subcritical water treated sugarcane bagasse. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 591-599, 2011.

KANNAN, A.; HETTIARACHCHY, N. S.; MARSHALL, M. R. **Food proteins - peptides**. In: HETTIARACHCHY, N.S. et al. Food proteins and peptides chemistry, functionality, interactions, and commercialization. CRC, p.1-24, 2012.

KARLSSON, E. N.; SCHMITZ, E.; LINARES-PASTÉN, J. A.; ADLERCREUTZ, P. Endo-xylanases as tools for production of substituted xylooligosaccharides with prebiotic properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 9081-9088, 2018.

KAUR, R.; UPPAL, S. K.; SHARMA, P. Production of Xylooligosaccharides from Sugarcane Bagasse and Evaluation of Their Prebiotic Potency In Vitro **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-9, 2018.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems-an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 1-30, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LINARES-PASTÉN, J. A.; ARONSSON, A.; KARLSSON, E. N. Structural considerations on the use of endo-xylanases for the production of prebiotic xylooligosaccharides from biomass. **Current Protein and Peptide Science**, v. 19, p. 48 - 67, 2018.

LIU, Q.; WANG, S.; ZHENG, Y.; LUO, Z.; CEN, K. Mechanism study of wood lignin pyrolysis by using TG-FTIR analysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. v. 82, p. 170-177, 2007.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; OLIVEIRA, M. B.; NAGEM, R. A. P.; VRIES, R. P.; GUIMARÃES, V. M. Characterization and biotechnological application of recombinant xylanases from *Aspergillus nidulans*, **Biological Macromolecules**, v. 91, p. 60-67, 2016.

MANDELLI, F.; BRENELLI, L. B.; ALMEIDA, R. F.; GOLDBECK, R.; WOLF, L. D.; HOFFMAM, Z. B.; RULLER, R.; ROCHA, G. J. M.; MERCADANTE, A. Z.; SQUINA, F. M. Simultaneous production of xylooligosaccharides and antioxidant compounds from sugarcane bagasse via enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 770-775, 2014.

MARIN-FELIX, Y.; STCHIGEL, A. M.; MILLER, A. N.; GUARRO, J.; CANO-LIRA, J. F. A re-evaluation of the genus *Myceliophthora* (Sordariales, Ascomycota): its segregation into four genera and description of *Corynascus fumimontanus* sp. nov. **Mycologia**, v. 107, n. 3, p. 619-632, 2015.

MATHEW, S.; ARONSSON, A.; KARLSSON, E. N.; ADLERCREUTZ, P. Xylo- and arabinoxylooligosaccharides from wheat bran by endoxylanases, utilisation by probiotic bacteria, and structural studies of the enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102(7), p. 3105-3120, 2018.

MCPHILLIPS, K.; WATERS, D. M.; PARLET, C.; WALSH, D. J.; ARENDT, E. K.; MURRAY, P. G. Purification and Characterisation of a β -1,4-Xylanase from *Remersonia thermophila* CBS 540.69 and Its Application in Bread Making. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 1747-1762, 2014.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-429, 1959.

MIZRAHI, L.; ACHITUV, Y. Effect of Heavy Metals Ions on Enzyme Activity in the Mediterranean Mussel, *Donax trunculus*. Bulletin of **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, p. 854-859, 1989.

MORETTI, M. M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; DA SILVA, R.; RODRIGUES, A.; SETTE, L.D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, p.1062-1071, 2012.

MOURA, P.; CABANAS, S.; LOURENÇO, P.; GÍRIO, F.; LOUREIRO-DIAS, M. C.; ESTEVES, M. P. In vitro fermentation of selected xylo-oligosaccharides by piglet intestinal microbiota. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, 1952-1961, 2008.

NOBLE, J. E.; BAILEY, M. J. A. Quantification of Protein. Methods in Enzymology, pp. 81. In: Lorsch, J. (Ed.), **Methods in enzymology**. Academic Press, v. 463, 73-95, 2009.

NOBLE, J. E. Quantification of protein concentration using UV absorbance and coomassie dyes, pp. 21. In: Lorsch, J. (Ed.), **Methods in enzymology**, Academic Press, v. 536, 2014.

PAËS, G.; BERRIN, J.G.; BEAUGRAND. J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 564-592, 2012.

PERRONE, O. M. Avaliação térmica e estrutural do bagaço de cana de açúcar pré-tratado com ozônio, ultrassom e micro-ondas para produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2015.

PERRONE, O.M., COLOMBARI, F.M., ROSSI, J.S., MORETTI, M.M.S., BORDIGNON, S.E., NUNES, C. da C.C., GOMES, E., BOSCOLO, M., DA-SILVA, R. Ozonolysis combined with ultrasound as a pretreatment of sugarcane bagasse: Effect on the enzymatic saccharification and the physical and chemical characteristics of the substrate. **Bioresource Technology**, 218, p. 69-76, 2016.

PERRONE, O. M.; ROSSI, J. S.; MORETTI, M. M. S.; NUNES, C. C. C.; BORDIGNON, S. E.; GOMES, E.; DA-SILVA, R.; BOSCOLO, M. Influence of ozonolysis time during sugarcane pretreatment: Effects on the fiber and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 224, p.733-737, 2017.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications Applied Microbiology Biotechnology, v. 67, p. 577-591, 2005.

RODRIGUES, R. C. L. B; ROCHA, G. J. M.; RODRIGUES JÚNIOR, D.; FILHO, H. J. I.; FELIPE, M. G. A.; PESSOA JÚNIOR, A. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1247-1253, 2010.

SAMANTA, A. K.; JAYAPAL, N.; JAYARAM, C.; ROY, S.; KOLTE, A. P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, p. 62-71, 2015.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, C. R.; HOFFMAM, Z. B.; MARTINS, V. P. M.; ZANPHORLIN, L. M.; ASSIS, L. H. P.; HONORATO, R. V.; OLIVEIRA, P. S. L.; RULLER, R.; MURAKAMI, M. T. Molecular Mechanisms Associated with Xylan Degradation by *Xanthomonas* Plant Pathogens. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 32186-32200, 2014.

SEE, Y. S.; JACKOWSKI, G. Estimating molecular weights of polypeptides by SDS gel electrophoresis. In: Creighton TE editor. **Protein structure a practical approach**. New York: Oxford University; 1-19, 1989.

SHARMA, S.; KUMAR, A. Xylanases: An Overview. **British Biotechnology Journal**, v. 3(1), p. 1-28, 2013.

SHARMA, M.; CHADHA, B. S.; SAINI, H. S. Purification and characterization of two thermostable xylanases from *Malbranchea flava* active under alkaline conditions. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8834-8842, 2010.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, 1999.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass. NREL, Golden, Colorado, USA, 2008.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass (LAP). **NREL**, Golden, Colorado, USA, 2012.

SOUZA, A. R.; ARAÚJO, G. C.; ZANPHORLIN, L. M.; RULLER, R.; FRANCO, F. C., TORRES, F. A. G.; MERTENS, J.A.; BOWMAN, M. J.; GOMES, E.; SILVA, R. Engineering increased thermostability in the GH-10 endo-1,4- β -xylanase from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 20-26. 2016.

SPORCK, D.; REINOSO, F. A. M.; RENCORET, J.; GUTIÉRREZ, A.; RIO, J. C.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Xylan extraction from pretreated sugarcane bagasse using alkaline and enzymatic approaches. **Biotechnology Biofuels**, 10:296, p. 1-11, 2017.

STEWART, D. Application of Fourier-transform infrared and Raman spectroscopies to plant science. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1998.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 17, n. 1, p. 39-67, 1997.

TEIXEIRA, T. S.; SIQUEIRA, F. G.; BATISTA, R. D. Enzimas microbianas de desconstrução da parede celular: novas abordagens. **Revista Eletrônica de Energia**, v. 6, n. 1, p. 27-37, 2016.

TRAVAINI, R.; OTERO, M.D.M.; COCA, M.; DA-SILVA, R.; BOLADO, S. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. **Bioresource Technology** 133, p. 332-339, 2013.

VANHOLME, R.; DEMEDTS B.; MORREEL, K.; RALPH J.; BOERJAN W. Lignin biosynthesis and structure. **Plant physiology**, v. 153, n. 3, p. 895-905, 2010.

VÁZQUEZ, M. J.; ALONSO, J. L.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, p. 387-393, 2000.

VERMA, D.; ANAND, A.; SATYANARAYANA, T. Thermostable and alkalistable endoxylanase of the extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1: cloning, expression, characteristics and its applicability in generating xylooligosaccharides and fermentable sugars. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, n. 1, p. 119-130, 2013.

VRESE, M.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 111, p. 1-66, 2008.

YANG, H.; YAN, R.; CHEN, H.; LEE, D. H.; ZHENG, C. Characteristics of hemicelluloses, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, v. 86, p. 1781-1788, 2007.

ZANPHORLIN, L. M.; FACCHINI, F. D. A.; VASCONCELOS, F.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; RODRIGUES, A. SETTE, L. D.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Journal of Microbiology**, v. 48, p. 331-336, 2010.