



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

Sirlene do Nascimento Senna

Produção, purificação parcial e caracterização de xilanase produzida por
fungo filamentosos

São José do Rio Preto

2018

Sirlene do Nascimento Senna

Produção, purificação parcial e caracterização de xilanase produzida por
fungo filamentoso

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 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^ª. Dr^ª. Heloiza Ferreira Alves Prado

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

São José do Rio Preto

2018

Senna, Sirlene do Nascimento.

Produção, purificação parcial e caracterização de xilanase produzida por fungo filamentosos / Sirlene do Nascimento Senna. – São José do Rio Preto, 2018

122 f. : il., tabs.

Orientador: Heloiza Ferreira Alves Prado

Coorientador: Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Enzimas de fungos – Aplicações industriais. 3. Fungos. 4. Xilanases. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 663.12

Sirlene do Nascimento Senna

Produção, purificação parcial e caracterização de xilanase produzida por fungo filamentosos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 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^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves Prado
UNESP–Câmpus de Ilha Solteira
Orientadora

Prof. Dr^a. Daniela Alonso Bocchini
UNESP–Câmpus de Araraquara

Prof. Dr. Eduardo Martins da Silva
UEMG- Universidade de Minas Gerais

Prof. Dr^a Maria Lourdes Texeira de Moraes Polizeli
USP-Universidade de São Paulo

Prof^a. Dr. Renato Grillo
UNESP–Câmpus de Ilha Solteira

São José do Rio Preto
03 de Agosto de 2018

Agradecimentos

A DEUS, pela saúde, por fortalecer minha fé e esperança, por guiar-me em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, Izenilda e Auceniro, pelo amor e incentivo em todas as etapas da minha vida. Ao meu irmão Sergio, pelo apoio e convivência ao longo dos anos.

Ao meu namorado Mateus, pelo amor, compreensão, incentivo, ajuda e preocupação. Tenho certeza que a caminhada durante essa etapa teria sido muito mais difícil se eu não tivesse você do meu lado, me ajudando a lidar com as matemáticas da vida. Muito obrigada.

A minha orientadora, professora Dr^a. Heloiza Ferreira Alves Prado, por ter recebido no laboratório de Biotecnologia, pela paciência, confiança depositada e por me ajudado durante esses seis anos desde o mestrado.

Ao meu coorientador professor Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez por ter me ensinado e acompanhado em várias etapas da purificação. Obrigada por ter ficado do meu lado discutindo comigo os meus resultados e pelo acolhimento no laboratório de Bioquímica de proteínas.

Ao professores Dr^a. Eleni Gomes e Dr. Roberto da Silva, que disponibilizaram o Laboratório de Microbiologia Aplicada e alguns reagentes sempre que precisei utilizar.

Ao professor Dr. Paulo Ceresini por ter me disponibilizado o laboratório de Fitopatologia para a etapa de identificação do fungo e por ter me autorizado a submeter as sequências para Coréia. Em especial agradeço à sua pós doutoranda Vanina, pela amizade, disposição em ensinar e auxílio na etapa de Molecular do projeto.

A todos os meus amigos e amigas: (as) Luciana, Camila, Bárbara, Heloisa, Crislen, Mariana, Jaqueline Cristine, Jaqueline Ferreira, Andreia, Maria Fernanda, Keila, Luiz Fernando, Lisandra, Neuterlândio, Cristiane, Cinthia, Mirian e Glaucia. Obrigada pelo carinho, amizade, apoio, suporte e palavras de incentivo. Em especial a amiga

Elis Marina por ter ensinado a rodar estatística em parte dos meus resultados.

Aos amigos dos Laboratórios de Ilha e de São José do Rio Preto: Cintia Lionela, Jozi, Wanderleia, Raisal, Jéssica, Vanessa, Aline, Letícia, Lumena, Morgana, com os quais compartilhei as dificuldades e alegrias nesta árdua jornada, obrigada meninas pelas palavras de incentivo e ajuda. Agradeço também a Larissa pelas mensagens de fé, nos momentos difíceis e orações.

A amiga de pós graduação, Marianny Canedo, que foi minha segunda família no período em que eu morei em São José do Rio Preto. Obrigada pela amizade, carinho, preocupações e favores sempre que precisei resolver algo à distância, após ter voltado para Ilha Solteira.

À técnica de laboratório Selma Buzetti pela preocupação e pela ajuda ao longo desta etapa.

A CAPES pelo apoio financeiro por meio de bolsa de estudos.

A todos os funcionários da sessão de pós-graduação, do Instituto de Biociências, letras e Ciências Exatas UNESP, Campus de São José do Rio Preto, pela atenção e dedicação no atendimento.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite.

A todos que, de alguma forma, contribuíram neste trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Os fungos filamentosos são microrganismos muito eficientes na produção de xilanases, enzimas que apresentam diversas aplicações biotecnológicas, tais como, branqueamento do papel, aditivos em rações animais, panificação, extração e clarificação de sucos, entre outras. Este trabalho teve como objetivo selecionar e otimizar as condições de cultivo do microrganismo de maior potencial para a produção de xilanase, caracterizando a mesma bioquimicamente, e purificar parcialmente a de interesse. Onze fungos isolados em áreas de Cerrado, no estado do Mato do Grosso Sul, com crescimento a 30 °C, foram reativados para ensaio de produção da xilanase. A maioria dos isolados produziram xilanase por cultivo em estado sólido, inicialmente, utilizando o farelo de trigo como substrato, se destacando três espécies identificadas como IPS8.2, IPS14.3F e IPS 9.3. O fungo IPS8.2 foi selecionado para estudo posteriores e identificado como *Gongronella butleri* com base sequenciamento de rDNA por ITSs. Além do cultivo inicial com farelo de trigo, esta espécie foi submetida ao efeito de diferentes fontes de carbono com outros substratos, tais como: casca de maracujá, serragem, papelão, casca de soja, sabugo triturado, bagaço de cana-de-açúcar, braquiária, sabugo de milho e xilana, nos cultivos em estado sólido (CES) e submerso (Csm). Os resultados obtidos nessa etapa não sobrepuseram à utilização inicial, em farelo de trigo em CES. Partindo desses resultados buscou-se verificar o efeito da concentração de sais, umidade e tempo no cultivo em estado sólido. Entre as condições testadas, *Gongronella butleri* IPS8.2 obteve sua melhor produção de xilanase em 72 horas de cultivo, com água destilada e 70% de umidade. A solução enzimática bruta, foi submetida à purificação parcial por troca iônica em Hitrap Q-Sepharose FF. As atividades da xilanase bruta e parcialmente purificada foram favorecidas à 45 °C e pH 5,5. A enzima parcialmente purificada apresentou uma estabilidade de temperatura e uma faixa de estabilidade de pH inferiores à amostra bruta. A maioria dos íons utilizados não inibiu a xilanase bruta e à parcialmente purificada. Para ambas as condições testadas, o íon Ag^+ foi o que proporcionou maior diminuição na atividade da enzima em estudo.

Palavras-chave: Fungos, resíduos agroindustriais, xilanases, caracterização e purificação enzimática.

ABSTRACT

Filamentous fungi are very efficient microorganisms in the production of xylanases, enzymes that present several biotechnological technologies, such as paper bleaching, additives in animal feed, breads, extraction and clarification of juices, among others. The goal of this work was to select and optimize the culture conditions of the microorganism with the greatest potential for the production of xylanase, characterizing the same biochemically, and to partially purify the one of interest. Eleven fungi, with growth at 30°C, isolated in Cerrado areas, in the state of Mato Grosso do Sul, were reactivated for the production of the xylanase. The majority of isolates produced xylanase by solid-state cultivation, initially using wheat bran as substrate, highlighting three species identified as IPS8.2, IPS14.3F and IPS 9.3. The fungus IPS8.2 was selected for further study and identified as *Gongronella butleri*, based on rDNA sequencing by ITSs. In addition to the initial cultivation with wheat bran, this species was submitted to the effect of different sources of carbon with other substrates, such as passion fruit peel, sawdust, cardboard, soybean hull, crushed cob, sugar cane bagasse, corn cob and xylan, in the solid state cultivation (SSC) and submerged cultivation (SC). The obtained results at this stage did not overlap with the initial use of wheat bran at SSC. Based on these results, was tried to verify the effect of the concentration of salts, humidity and time in the solid state cultivation. Among the tested conditions, *Gongronella butleri* IPS8.2 obtained its best xylanase production at 72 hours of culture with distilled water and 70% of humidity. The crude enzymatic solution, was subjected to partial purification by ion exchange in Hitrap Q-Sepharose FF. The activities of crude and partially purified xylanase were favored at 45 °C and pH 5.5. The partially purified enzyme had a temperature stability and pH stability range lower than the crude sample. The majority of the ions used didn't inhibit the crude and partially purified xylanase. For both conditions tested, the Ag⁺ ion provided the greatest decrease in the activity of the enzyme under study.

Keywords: Fungi, agroindustrial residues, xylanases, enzymatic characterization and purification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da fibra vegetal.	19
Figura 2 - Estrutura dos principais componentes da biomassa lignocelulósica.	21
Figura 3 - Representação da estrutura de celulose ilustrando a extremidade redutora e não redutora da celulose e a celobiose formada pela união de duas moléculas de glicose.	23
Figura 4 - Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa na microfibrila. A: celulose cristalina está no centro da microfibrila e é envolta pelo substrato amorfo. B: As regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal	23
Figura 5 - Estrutura representativa da miofibrila de celulose.	24
Figura 6 - três principais precursores de lignina (monolignóis) e suas estruturas correspondentes em polímeros de lignina.	25
Figura 7 - Fragmento de Lignina, mostrando importantes ligações intramoleculares.	26
Figura 8 - Estrutura molecular dos carboidratos constituintes da hemicelulose.	27
Figura 9 - Estrutura da xilana, mostrando os diferentes grupos substituintes e o ponto de clivagem das xilanases microbianas.	30
Figura 10 - Mecanismo de retenção para hidrólise de uma ligação covalente O-glicosídica por uma xilanase.	33
Figura 11 - À esquerda, vista lateral e à direita, vista superior da representação esquemática da proteína tridimensional (3D) da xilanase GH 10 produzida por <i>Streptomyces halstedii</i> , PDB 1NQ6. As hélices α e as cadeias β da estrutura de barril (α/β) ₈ , são coloridas em laranja e verde, respectivamente.	34
Figura 12 - Representação esquemática da proteína tridimensional (3D) da xilanase GH 11 produzida <i>Thermomyces lanuginosus</i> , PDB1YNA.	35
Figura 13 - Atividades xilanase de fungos isolados em áreas de Cerrado, no município de Inocência MS. Cultivo em estado sólido em 72 horas, à 30 °C.	65
Figura 14 - Isolados fúngicos a partir de solo de Cerrado.	66
Figura 15 - Análise eletroforética em gel de agarose 1% do DNA total extraído de alguns isolados, as linhas 03 e 17 correspondem ao DNA do isolado IPS 8.2.	67
Figura 16 - Alinhamento entre as sequências disponíveis no GenBank e a sequência do isolado IPS8.2.	68

Figura 17 - Efeito da fonte de carbono na produção de xilanase por <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2 sob cultivo em estado sólido em 72 horas, à 30°C.	69
Figura 18 - Efeito da fonte de carbono na produção de xilanase para <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2 sob cultivo em estado submerso à 30 °C em 72 horas de cultivo.	70
Figura 19 - Produção de xilanase em cultivo sólido, dados referente ao planejamento fatorial 2 ⁴ com dois ensaios no ponto central.	72
Figura 20 - Efeitos principais e de interações dos fatores estudados no planejamento fatorial 2 ⁴ com dois ensaios no ponto central, baseado no teste t “Student” para $t_{(44; 0,95)} = 2,15$	74
Figura 21 - Distribuição dos valores observados e dos valores preditos pelo modelo linear com base no planejamento fatorial 2 ⁴ com quatro ensaios no ponto central. ...	75
Figura 22 - Perfil de produção de xilanase do fungo <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2 cultivado em estado sólido, utilizando farelo de trigo a 30°C.	80
Figura 23 - À esquerda temos o Perfil Gel de SDS-PAGE. À direita temos o Zimograma específico para detecção de atividade de xilanase.	84
Figura 24 - Gel zimograma à 10% coluna 1 e 3 corresponde a amostra concentradas por liofilização, coluna 2 solução enzimática bruta sem concentrar.	84
Figura 25 - Perfil da cromatografia do extrato enzimático de <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2 proveniente da concentração por liofilização, e aplicada em coluna de filtração em gel "Sephacryl™ S-100" Vo de aproximadamente 150 mL e fluxo de 0,7 mL min ⁻¹	85
Figura 26 - Gel SDS-PAGE a 10% das frações coletadas na gel filtração S100. Na coluna 1 encontra se o marcador, já a coluna 2 corresponde as junções dos tubos 98 ao 113, já na coluna 3 é possível visualizar a agrupamentos do tubos do 114 ao 128 e na 4 observa-se as frações do 82 ao 96.	86
Figura 27 - Perfil da cromatografia do extrato enzimático de <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2 proveniente da concentração por liofilização, e aplicada em coluna de troca iônica HiTrap SP XL (<i>Fast Flow</i>).	87
Figura 28 - Gel SDS-PAGE 10% coluna 3 corresponde as junção da amostras 7 e 8 com atividade xílanolítica concentradas com TCA, coletadas na cromatografia de troca iônica HiTrap SP XL (<i>Fast Flow</i>).	88
Figura 29 - Gel SDS-PAGE 10% das frações eluídas coletadas na gel filtração G 50. Coluna 1 corresponde as frações agrupadas do tubos 27 ao 37, a coluna 2 corresponde 38 ao 60 e a coluna 3 corresponde 61 ao 76.	89

Figura 30 - Perfil da cromatografia do extrato enzimático de <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2 proveniente da concentração por liofilização e aplicada em coluna Q Sepharose <i>Fast Flow</i>	90
Figura 31 - Gel a 10% SDS-PAGE das frações coletadas na cromatografia de troca aniônica Q Sepharose FF, colunas 4,5 e 6 correspondem as amostras com atividade xilanolítica, coluna 1 corresponde ao extrato bruto.	91
Figura 32 - Gráfico do logaritmo da massa molecular dos padrões vs. a rf em gel de poliacrilamida.	91
Figura 33 - Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade xilanolítica em extrato bruto e parcialmente purificado de <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2.	93
Figura 34 - Efeito da estabilidade de temperatura na atividade xilanolítica em extrato bruto e parcialmente purificado de <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2, à 45 °C e pH 5,5.	94
Figura 35 - Efeito do pH na atividade da xilanase bruta e parcialmente purificada obtida da espécie <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2 cultivado em farelo de trigo sob cultivo sólido.	95
Figura 36 - Efeito da estabilidade de pH na atividade da xilanase bruta e parcialmente purificada obtida da espécie <i>Gongronella butleri</i> IPS 8.2 cultivado em farelo de trigo sob cultivo estado sólido.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição percentual de celulose, hemicelulose e lignina de diferentes materias lignocelulósicos.....	22
Tabela 2 - Produção de enzimas xilanolíticas por fungos sob cultivo em estado sólido e submerso.....	38
Tabela 3 - Exemplos de técnicas de purificação de xilanases fúngicas.....	40
Tabela 4 - Origem dos substratos utilizados para o cultivo microrganismo selecionado.....	48
Tabela 5 - Fatores e valores dos níveis analisados no planejamento fatorial 2^4 com quatro ensaios no ponto central.....	52
Tabela 6 - Matriz planejamento fatorial 2^4 completo com dois pontos centrais.....	53
Tabela 7 - Produção de xilanase em cultivo sólido, dados referente ao planejamento fatorial 2^4 com dois ensaios no ponto central.....	72
Tabela 8 - Estimativa de efeitos e análise de regressão calculada para o planejamento fatorial 2^4 com dois pontos centrais (simplificada).....	73
Tabela 9 - Análise de variância, para o ajuste do modelo linear aos resultados do planejamento fatorial 2^4 com dois ensaios no ponto central.....	75
Tabela 10 - Matriz com os pontos em direção a máxima inclinação ascendente “steepest ascent”.....	77
Tabela 11 - Umidades, atividade da xilanase e proteína para espécie <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2, sob cultivo em estado sólido em diferentes umidades, à 30°C.....	78
Tabela 12 - Efeito de compostos fenólicos na concentração de 10 mmol L ⁻¹ sobre a atividade relativa (%) de xilanases presente em extrato bruto produzido pelo fungo <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2.....	81
Tabela 13 - Produção enzimática pela espécie <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2, em 72 horas de cultivo sólido, em farelo de trigo.....	83
Tabela 14 - Resumo da purificação parcial da xilanase produzida por <i>Gongronella butleri</i> IPS8.2.....	92
Tabela 15 - Efeito dos íons e reagentes na atividade da xilanase bruta obtida de <i>Gongronella butleri</i> IPS 8.2.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B	Braquiária
BC	Bagaço de cana-de-açúcar
BDA	Batata-dextrose-ágar
BMS	Biomassa dos microrganismos do solo
CES	Cultivo em estado sólido
CM	Casca de maracujá
CMC	Carboximetil celulose
CSm	Cultivo submerso
CS	Casca de soja
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DTT	Dithiothreitol
EB	Extrato bruto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FEPE	Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE), da UNESP Câmpus de Ilha Solteira
FT	Farelo de trigo
GH	Glicosil Hidrolase
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
ITS	"Internal transcribed spacer" / espaçador interno transcrito
KDa	Kilo em dalton
mL	Mililitro
P	Papelão
PAGE	Eletroforese em gel de policrilamida
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PM	Palha Milho
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
pNPβG	p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo
RCF	Força Centrífuga Relativa
RPM	Rotações por minuto
S	Serragem

SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SM	Sabugo de milho
SMT	Sabugo de milho triturado
UI	Unidade Internacional
μmol	Micromol
μL	Microlitro
UNESP	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
UV	Radiação ultravioleta
TBE	Tris/Borato/EDTA
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
XB	Xilana beechwood
XOS	Xilooligossacarídeos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 PAREDE CELULAR VEGETAL.....	19
2.1.1 Biomassa lignocelulósica	20
2.1.2 Celulose	22
2.1.3 Lignina	24
2.1.4 Hemicelulose	26
2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS XILANASES	31
2.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS	36
2.3.1 Fungos filamentosos	36
2.4 PRODUÇÃO DE XILANASE POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO E CULTIVO SUBMERSO.....	37
2.4.1 Otimização das condições de cultivo	38
2.5 PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS	39
2.6 APLICAÇÃO DE XILANASES	41
2.6.1 Aplicação de xilanase na fabricação de pão, alimentos e bebidas	41
2.6.2 Aplicação xilanase na ração animal	43
2.6.3 Aplicação da xilanase no biobranqueamento	44
2.6.4 Aplicação de xilanase na produção de Bioetanol	45
3 OBJETIVOS	47
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 MICRORGANISMOS.....	48
4.2 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	48
4.2.1 Preparo dos substratos agrícolas e agroindustrias	48
4.2.2 Cultivo em estado sólido (CES)	49
4.2.3 Cultivo submerso (CSm)	49
4.2.4 Efeito da fonte de carbono	50
4.3 IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO	50
4.3.1 Cultivo do isolado para extração do DNA	50
4.3.2 Extração de DNA	50
4.3.3 Reação de PCR	51

4.3.4 Análise computacional das sequências	51
4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE XILANASE	52
4.4.1 Planejamento experimental	52
4.4.2 Análises estatísticas	53
4.5 TEOR DE UMIDADE DO SUBSTRATO E ANÁLISE DA PRODUÇÃO XILANOLÍTICA	54
4.6 ESTUDO DO PERFIL DE PRODUÇÃO DE XILANASE	54
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CMCASE, AVICELASE E XILANASE.....	55
4.8 ATIVIDADE DE AMILASE	56
4.9 ATIVIDADE DE B-GLICOSIDASE.....	56
4.10 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA	57
4.11 EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE A ATIVIDADE XILANOLÍTICA	57
4.12 PURIFICAÇÃO	58
4.12.1 Etapa da Concentração	58
4.12.2 Protocolo para cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-100)	58
4.12.3 Protocolo para cromatografia de troca iônica HiTrap SP XL	59
4.12.4 Protocolo cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-50)	60
4.12.5 Protocolo para cromatografia de troca iônica Q-sepharose® Fast Flow	61
4.13 ANÁLISES ELETROFORÉTICAS	61
4.13.1 Gel poliacrilamida SDS-PAGE	61
4.13.2 Zimograma	61
4.14 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA XILANASE BRUTA E DA PARCIALMENTE PURIFICADA.....	62
4.14.2 Efeito do pH na atividade enzimática da xilanase bruta e parcialmente purificada	62
4.14.3 Estabilidade térmica da xilanase bruta e parcialmente purificada	63
4.14.4 Estabilidade em relação ao pH das xilanases brutas e parcialmente purificada	63
4.15 EFEITO DE SAIS E REAGENTES SOBRE A ATIVIDADE XILANOLÍTICA BRUTA E PARCIALMENTE PURIFICADA PELA CROMATOLOGRAFIA DE TROCA IÔNICA Q-SEPHAROSE FAST FLOW.	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 PRODUÇÃO DE XILANASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO	65

5.2 IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO	66
5.3 EFEITO DA FONTE DE CARBONO SOBRE A PRODUÇÃO DA ENZIMA: CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSO	68
5.4 OTIMIZAÇÃO DA SOLUÇÃO SALINA DO MEIO CULTIVO SÓLIDO	71
5.5 INFLUÊNCIA DA UMIDADE NA PRODUÇÃO DA XILANASE.....	78
5.6 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DA XILANASE.....	79
5.7 EFEITOS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE A ATIVIDADE DA XILANASE.....	80
5.8 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	83
5.9 PURIFICAÇÃO.....	83
5.9 TEMPERATURA ÓTIMA E DE ESTABILIDADE	92
5.10 pH ÓTIMO E DE ESTABILIDADE	94
5.11 EFEITO DE ÍONS E OUTROS COMPOSTOS NA ATIVIDADE DA XILANASE BRUTA E PARCIALMENTE PURIFICADA	96
6 CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais desafios na conservação do Cerrado é demonstrar a importância que a biodiversidade desempenha no funcionamento dos ecossistemas (KLINK; MACHADO, 2005). Dentro dessa diversidade encontram-se os microrganismos, responsáveis pela ciclagem de nutrientes no solo. O monitoramento da quantidade e atividade dos microrganismos permite compreensão das mudanças nos fluxos de carbono, de energia e de gases de efeito estufa em áreas que foram modificadas por atividades agrícolas (MENDES et al., 2012). Além disso, a biomassa dos microrganismos do solo (BMS) é considerada indicador ecológico sensível da degradação do solo, por ser a principal responsável pela transformação da matéria orgânica e pelo fluxo de energia no solo. O carbono presente na BMS representa a quantidade desse elemento que a biomassa microbiana do solo imobiliza em suas células, por meio de sua avaliação é possível realizar comparações entre solos e mudanças de manejo, avaliando possíveis impactos ambientais (ALVES et al., 2011; MENDES et al., 2012).

Dentre os microrganismos presentes no solo com potencial para aplicações biotecnológicas os fungos têm despertado grande interesse, devido à vasta diversidade de enzimas que secretam no ambiente. A secreção extracelular de enzimas reduz custos nos sistemas de produção, como dispensar etapas de rompimento celular, que poderiam ocorrer em fungos leveduriformes e bactérias (GUIMARÃES et al., 2006; ANDRADE-LINARES et al., 2015). O cultivo de fungos filamentosos em substratos lignocelulósicos, nos quais se incluem os resíduos agroindustriais, tais como palhas de milho, arroz e trigo, bem como, o bagaço de cana-de-açúcar, fornecem elementos à nutrição fúngica, semelhante ao que ocorre em habitats naturais. Além disso, esses resíduos vêm sendo utilizados como substratos e/ou fontes de carbono para induzir a produção de diversas enzimas como celulases, amilases, proteases e xilanases (SINGH; KAPOOR; KUMAR, 2012).

As xilanases são enzimas responsáveis pela hidrólise da xilana, importante componente da hemicelulose contida na parede celular vegetal. A sua hidrólise é realizada pela ação de várias enzimas, principalmente endo- β -1,4 xilanase (EC 3.2.1.8), que hidrolisam as ligações β -1,4 na cadeia principal do polissacarídeo (CARVALHO et al., 2017).

As enzimas xilanolíticas apresentam uma gama de aplicações, tais como: a hidrólise de materiais lignocelulósicos para produção de etanol, na ração animal, no processo de branqueamento da polpa de papel Kraft, nas indústrias de alimentos, como aditivo para melhorar a qualidade de pães, na clarificação de sucos, entre outras (POLIZELI et al., 2005; PAL; KHANUM, 2011).

O uso de resíduos agroindustriais no cultivo de microrganismos, além de economicamente viável, pode ajudar a resolver problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (ALVIRA et al., 2010; STROPARO et al., 2012; CARVALHO et al., 2017). Estes resíduos podem ser utilizados no cultivo de fungos em estado sólido assim como no submerso, para bactérias ou fungos, tais como, *Achromobacter xylosoxidans* (MAHALAKSHMI; JAYALAKSHMI, 2016) *Aspergillus niger* e *Aspergillus Flavus* (GUIMARÃES et al., 2013), *Ceriporiopsis subvermispora* (CHMELOVÁ; ONDREJOVIC, 2012), *Bacillus pumilus* SV-85S MTCC 9861 (NAGAR et al., 2014), *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 (CHAPLA et al., 2010) *Holomonas meridiana* (PALAVESAM, 2015).

O conhecimento do conjunto de enzimas que um microrganismo produz, em um determinado substrato, permite avaliar seu potencial enzimático. A caracterização das enzimas é um passo importante para que se conheçam suas propriedades de atividade ótima de atuação e de estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura. O conhecimento dessas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em diferentes processos industriais. O custo da enzima é um dos principais fatores que influenciam na onerosidade dos processos. A redução no custo, pode ser alcançado pela otimização dos processos de produção (SHAH; MADAMWAR, 2005).

O processo de purificação enzimática pode ser total ou parcial, em comparação com o extrato bruto, este processo potencializa a eficiência de sua ação e rendimento. Após cada etapa de purificação o grau de pureza de proteína deve ser verificado. Nem sempre é necessário purificação total, uma vez que a purificação da enzima é um processo caro e demorado. Portanto, é necessário ter conhecimento da aplicabilidade da enzima alvo (DUTRA-MOLINO et al., 2014).

Nesse contexto, o presente trabalho visa contribuir para o descobrimento de uma espécie com potencial para produção de xilanase. Na primeira etapa, os isolados fúngicos foram reativados e cultivados sob estado sólido, utilizando farelo

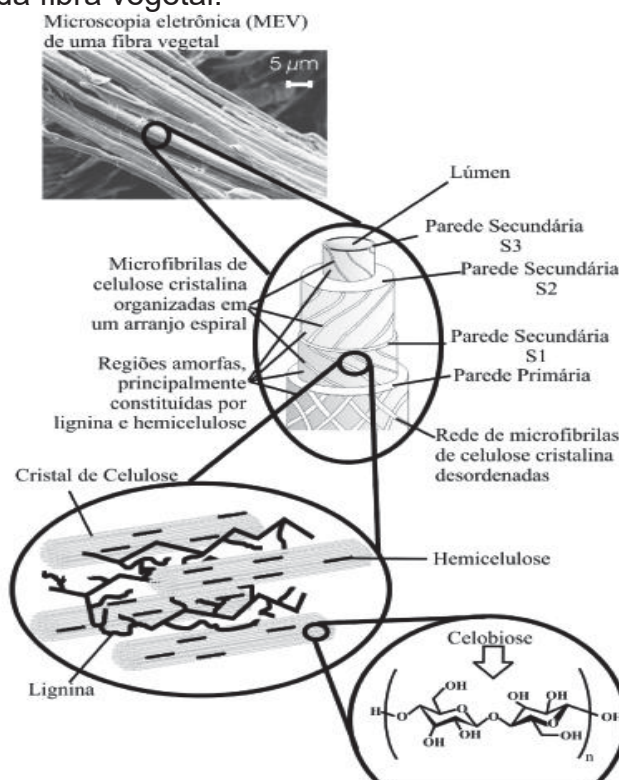
de trigo como substrato, a seguir foi realizada a seleção do isolado de maior potencial de xilanase. Na segunda etapa, com o microrganismo selecionado, avaliou-se a produção em diferentes substratos lignocelulósicos como fonte de carbono, através dos cultivos em estado sólido e submerso. Na terceira etapa, foram avaliadas as melhores condições para a umidade, o tempo de cultivo e a solução salina, a fim de serem utilizadas para produção de xilanase pelo fungo *Gongronella butleri* IPS8.2 no cultivo em estado sólido. Por fim, foram estudadas as características dessa enzima, pH e temperatura ótima, e a mesma foi submetida a purificação parcial, visando a caracterização e um maior detalhamento da enzima para futuras aplicações biotecnológicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PAREDE CELULAR VEGETAL

Uma das principais características da célula vegetal é a presença de uma fina, porém muito resistente, parede celular. Durante a vida da planta, a parede celular vegetal apresenta funções fisiológicas, como comunicação intercelular, defesa contra patógenos, resistência mecânica e interação com o meio ambiente, além de ser a maior reserva fixa de carbono na natureza. Morfologicamente, a parede celular vegetal varia em espessura, dependendo do papel que determinadas células desempenham na estrutura da planta (RAVEN et al., 2001). A organização mais comum da fibra vegetal está representada na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura da fibra vegetal.



Fonte: Silva et al. (2009).

A primeira camada da parede celular a ser formada constitui a parede primária, a qual possui um elevado teor de água, depositada antes e durante o crescimento da célula vegetal. É formada, basicamente, de celulose, hemicelulose, pectina e proteínas. Esta parede define o modo de crescimento das células vegetais,

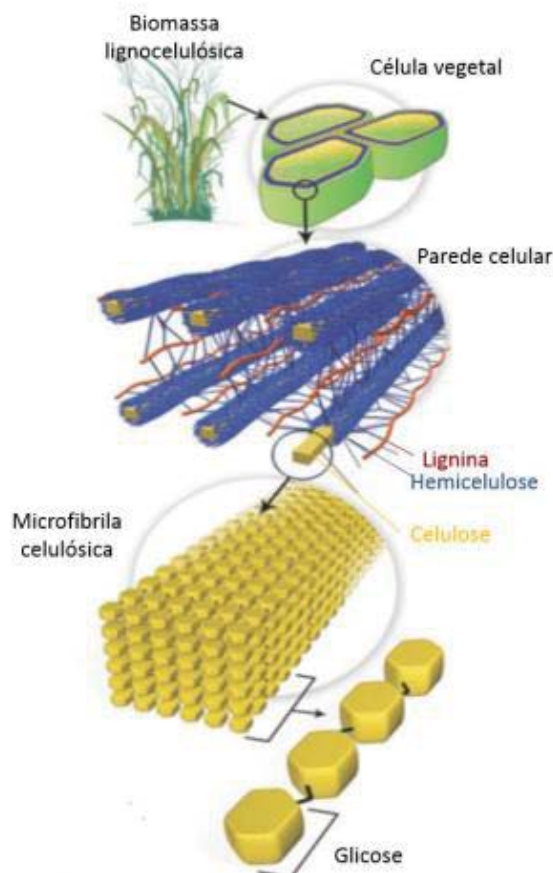
assim como o tamanho e a forma da célula (RAVEN et al., 2001; SIQUEIRA; FILHO, 2010).

As regiões de união das paredes primárias de células adjacentes constituem a lamela média. Muitas células, subsequentemente, depositam camadas celulares adicionais internamente, formando a parede secundária. A parede secundária é mais espessa, pode apresentar até três camadas, S1, S2 e S3, podendo ser densa devido a presença da lignina. A formação da parede secundária ocorre, principalmente, após a célula ter cessado seu crescimento e a parede primária não aumentar mais em superfície. Possui um teor de água inferior quando comparado com a parede primária. As paredes secundárias limitam o espaço e conferem maior rigidez, são formadas, basicamente, de celulose, hemicelulose, pectina e lignina (RAVEN et al., 2001; TAIZ; ZIEGER, 2002).

2.1.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa vegetal é uma importante fonte de energia e sua utilização como material de partida para vários produtos químicos e para a produção de combustíveis tem recebido um interesse considerável nos últimos anos (HASUNUMA et al., 2012). Basicamente, a biomassa celulósica é composta de cadeias de celulose (polissacarídeo formado por moléculas de glicose ligadas através de ligações glicosídicas β -1,4) unidas entre si por ligações de hidrogênio. Essas longas fibras celulósicas são, por sua vez, recobertas por hemiceluloses (polissacarídeos ramificados formados principalmente por D-xilose com pequenas quantidades de L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, e ácidos glucurônico, metilglucurônico e galacturônico) e ligninas (redes poliméricas tridimensionais formadas por unidades fenilpropano interligadas), Figura 2 (OGEDA; PETRI et al., 2010).

Figura 2 - Estrutura dos principais componentes da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Rubin (2008).

Tipicamente, a maior parte da biomassa lignocelulósica agrícola é constituída por cerca de 10-25% de lignina, 20-30% de hemicelulose e 40-50% de celulose. As porções celulósicas e hemicelulósicas da biomassa vegetal são polissacarídeos que podem ser hidrolisados a açúcares fermentescíveis. As ligninas, quando degradadas em frações de massas molares menores, podem ser utilizadas na fabricação de espumas de poliuretanas, resinas fenólicas, como fontes de fenol e etileno, e podem ser convertidas em fibras de carbono (OGEDA; PETRI et al., 2010). Na Tabela 1 apresentam-se as porcentagens típicas de todos os três componentes, em diversos materiais lignocelulósicos e que diferem em composição devido à variabilidade genética entre diferentes fontes (ANWAR et al., 2014), espécies de plantas e mesmo tecidos da própria planta (UDAY et al., 2016).

Tabela 1 - Composição percentual de celulose, hemicelulose e lignina de diferentes materias lignocelulósicos.

Material lignocelulósico	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
Farelo de trigo	18,5	51,8	10,8	Meralli et al. (2015)
Bagaço de cana-açúcar	42	25	20	Kim e Day (2011)
Palha de Milho	44,44	30,70	19,80	Santos et al. (2014)
Sabugo de Milho	38,8	44,4	11,9	Pointner et al. (2014)
Casca de soja	47,78	20,42	5,26	Retore et al. (2010)

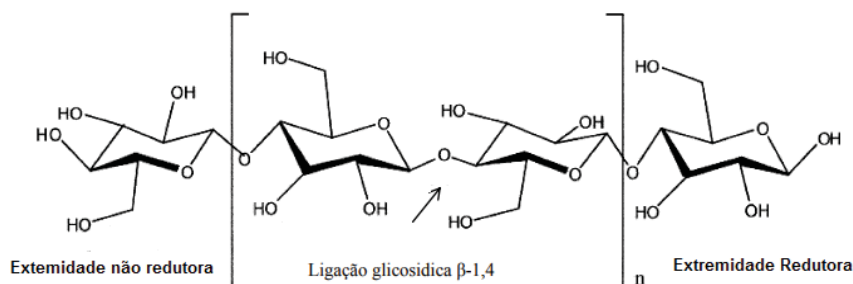
Fonte: Dados do próprio autor.

2.1.2 Celulose

A celulose é o principal polímero estrutural de plantas, este homopolissacarídeo linear é composto por unidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 e apresenta a fórmula comum $(C_6H_{10}O_5)_n$. Cada resíduo de glicose tem orientação de 180° em relação ao resíduo adjacente, formando, assim, a celobiose subunidade básica e repetitiva da celulose (Figura 3). A extremidade da cadeia de celulose, em que se encontra um carbono anomérico livre, é chamada de extremidade redutora, e a extremidade em que o carbono anomérico não está disponível é chamada de não redutora (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2007; GUPTA et al., 2012).

O tamanho ou extensão da cadeia de celulose é medido através de seu grau de polimerização (GP) que representa o número de unidades de glicose que formam cada cadeia polimérica. O GP da celulose varia de acordo com a fonte vegetal, o grau de maturação da parede celular, parte da planta e, também, com o processamento a que as fibras foram submetidas. De acordo Siqueira, Bras e Dufresne (2010), as cadeias de celulose em parede celular primária de plantas têm GP que varia na faixa de 5.000 à 7.500. O GP da celulose de madeiras é em torno 10.000, enquanto a celulose do algodão apresenta uma faixa de 15.000.

Figura 3 - Representação da estrutura de celulose ilustrando a extremidade redutora e não redutora da celulose e a celobiose formada pela união de duas moléculas de glicose.

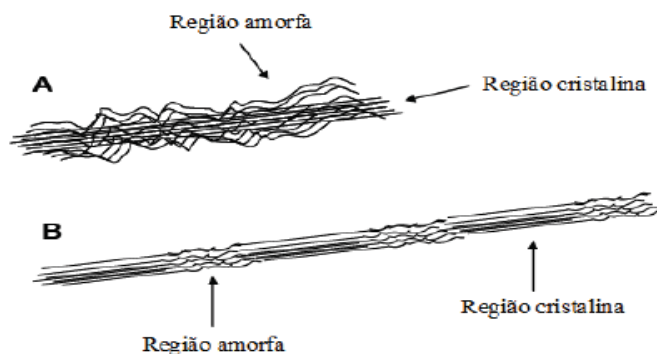


Fonte: Adaptado de Zhang e Lynd (2004).

A celulose apresenta regiões altamente ordenadas, correspondendo a regiões cristalinas, sendo estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, e áreas menos ordenadas ou regiões amorfas (Figura 4) (CHEN et al., 2017).

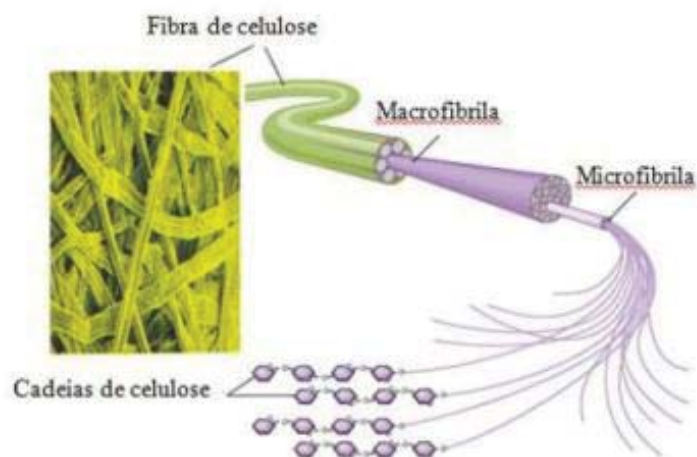
A configuração β permite que a celulose forme cadeias muito longas e retas. As fibrilas são formadas por cadeias paralelas que interagem entre si através de ligações de hidrogênio, formando as microfibrilas (Figura 5). A cadeia linear formada por ligações β confere a essa molécula uma elevada resistência a hidrólise ácida ou enzimática (SÁNCHEZ, 2009). Sete formas cristalinas foram identificadas para celulose, e são designadas como α , β , II, III, IIII, VI e VII. Na natureza, a celulose α e β são as formas cristalinas mais abundantes (OGEDA; PETRI, 2010).

Figura 4 - Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa na microfibrila. A: celulose cristalina está no centro da microfibrila e é envolta pelo substrato amorfo. B: As regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal



Fonte: Andersen (2007).

Figura 5 - Estrutura representativa da miofibrila de celulose.



Fonte: Ramires (2010).

A degradação da celulose se dá através ação de enzimas conhecidas como celulases. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (LYND et al., 2002; CASTRO; PEREIRA, 2010).

2.1.3 Lignina

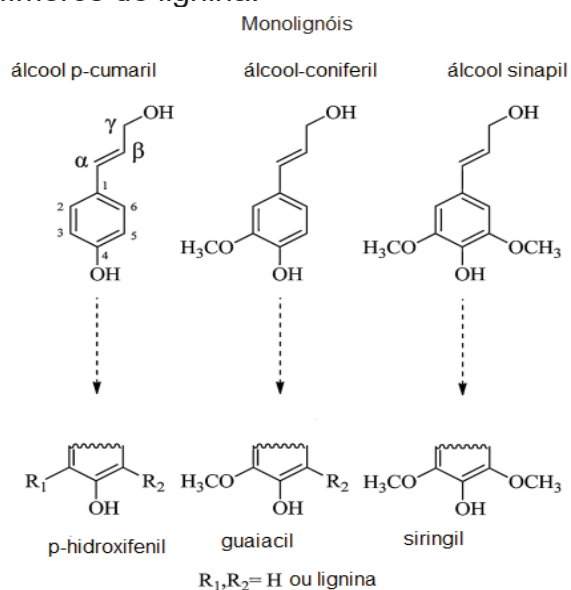
A lignina é um biopolímero amorfo de natureza aromática com alta massa molecular, cuja a biossíntese geralmente é proveniente da polimerização de três tipos de unidades de fenilpropano (monolignóis): álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico, no entanto, outros lignóis podem estar presentes em quantidades menores (THAKUR; THAKUR, 2015). As subestruturas fenólicas que originam estes monolignóis são chamadas de hidroxifenila (H, do álcool cumarílico), guaiacila (G, de álcool coniferílico) e siringila (S, de álcool sinapílico), apresentadas na figura 6 (PU et al., 2011; LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014).

Durante o processo de lignificação biológica, as unidades dos monolignóis ligam-se entre si por meio de reações de acoplamento dos radicais, formando uma complexa estrutura molecular tridimensional (Figura 7). Os produtos de acoplamento dos radicais fenilpropanóide apresentam ligações do tipo éter, mais fracas, e

ligações carbono-carbono, que são as mais fortes. Nas madeiras folhosas, aproximadamente, 50% das ligações são do tipo éter β -O-4 (ZANUNCIO; COLODETTE, 2011; LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014).

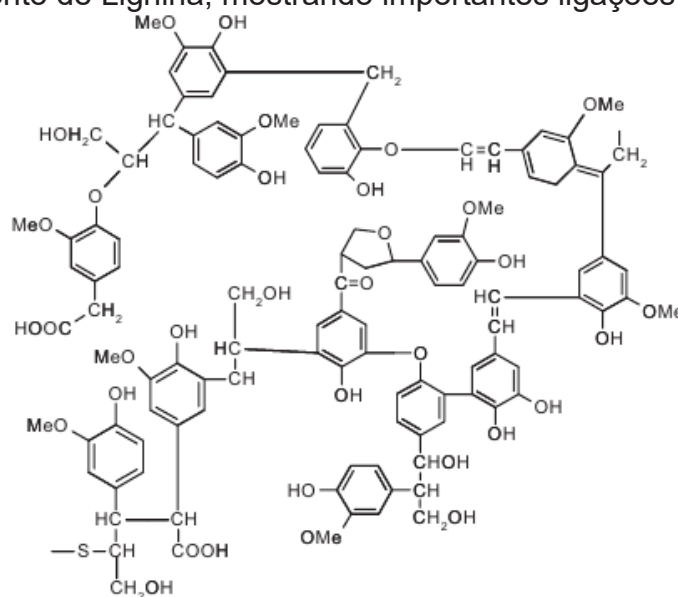
A composição e a proporção de diferentes monômeros na lignina variam consideravelmente de acordo com o tipo de material vegetal, sendo influenciados pelo ambiente (BOERJAN et al., 2003; RAGAUSKAS et al., 2014). Embora existam exceções, as ligninas de angiospermas são constituídas, principalmente, por unidades G e S e vestígios de unidades H, enquanto as ligninas de gimnospermas compreendem, principalmente, unidades G e baixos níveis de unidades H. Ligninas de gramíneas (monocotiledôneas) incorporaram as unidades G e S em níveis comparáveis, além disso, possuem mais unidades H que as dicotiledôneas (BOERJAN et al., 2003).

Figura 6 - Os três principais precursores de lignina (monolignóis) e suas estruturas correspondentes em polímeros de lignina.



Fonte: Laurichesse e Avérous (2014).

Figura 7 - Fragmento de Lignina, mostrando importantes ligações intramoleculares.



Fonte: Norgren e Edlund (2014).

2.1.4 Hemicelulose

Hemiceluloses são heteropolissacarídeos que representam de 15 a 35% da biomassa vegetal e que podem ser compostos por pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), e hexoses (β -D-manose, β -D-glucose, β -D-galactose) e/ou ácidos urónicos (α -D-glucurônico, α -D-4-O-metilgalacturônico e α -D-galacturônicos). Outros açúcares como α -L-ramnose e α -L-fucose também podem estar presentes (Figura 8). Estes heteropolissacarídeos são nomeados de acordo com o principal resíduo de açúcar da cadeia polimérica (GIRIO et al., 2010).

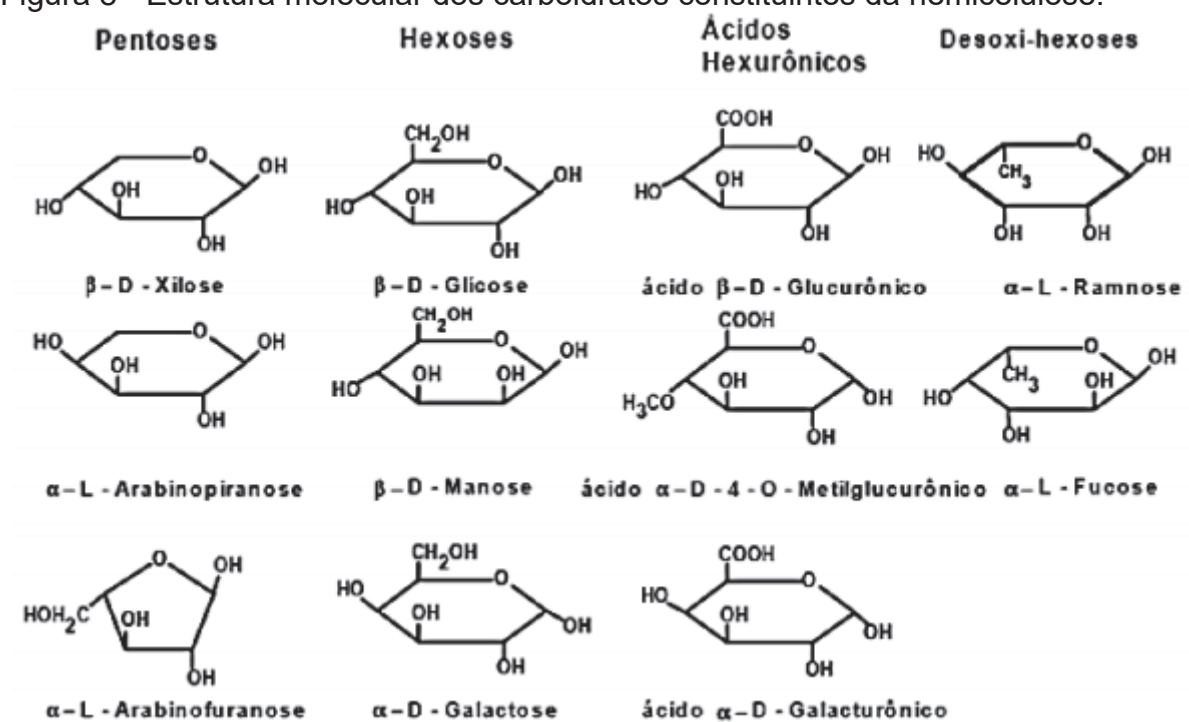
Geralmente esses açúcares formam cadeias curtas, sendo essas ramificadas, com um grau de polimerização em torno de 80-200. O conteúdo e a estrutura química das hemiceluloses podem ser variados em diferentes plantas (SUN et al., 2016). Homopolímeros de xilose, os chamados homoxilanos só ocorrem em algas marinhas vermelhas (*Porphyra* e *Bangia*) e verdes (*Caulerupa*, *Bryopsis* e *Udotea*) (ARAKI et al., 2000; OKAZAKI et al., 2011).

As hemiceluloses encontram-se intercaladas às microfibrilas de celulose, impedindo que elas se toquem, dando elasticidade e consistência a parede celular. A extração da hemicelulose das paredes celulares ocorre por soluções alcalinas fortes devido à existência de pontes de hidrogênio entre a hemicelulose e as

microfibrilas de celulose. Uma vez extraída da parede celular a hemicelulose passa a ser solúvel em água (TAVERNARI et al., 2008; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

Dependendo da unidade da cadeia principal, as hemiceluloses podem ser divididas em quatro grandes grupos: as xilanas, mananas, glucanas e as galactanas (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

Figura 8 - Estrutura molecular dos carboidratos constituintes da hemicelulose.



Fonte: Fengel e Wegener (1989) citado por Rabelo (2010).

2.1.4.1 Estrutura da xilana e substituintes

O mais importante polissacarídeo da hemicelulose é a xilana, a qual é composto por resíduos de xilose ligados por ligações glicosídicas β -1,4 na cadeia principal, que podem ser parcialmente substituídos por grupos O-acetil nas posições O-2 e/ou O-3, sendo que as ramificações podem ser compostas por α -L-arabinose, ácidos D-glucurônico ou 4-O-metil-D-glucurônico, e ainda ácidos ferúlico e *p*-cumárico podem estar ligados aos resíduos de L-arabinose (SILVIA et al., 1998; BEG et al., 2001; COLLINS et al., 2005; DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012).

A composição e a ligação das cadeias secundárias determinam o tipo específico de variação da xilana sendo nomeadas como homoxilana, arabinoxilana,

glucuronoxilana e arabinoglucuronoxilanas (LI et al., 2017). Removendo ramificações geralmente se eleva a taxa de degradação por enzimas endoxilanolíticas. Os grupos laterais de xilana tem um papel importante na ligação das hemiceluloses com a ligninas (OGEDA; PETRI, 2010).

A homoxilana contém apenas resíduos de xilose, cujo biopolímero pode ser linear ou ramificado (CHAKDAR et al., 2016).

A glucuronoxilana (O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano) é a principal hemicelulose encontrada na madeira dura, que também pode conter pequenas quantidades de glucomananas (hexosanas que por hidrólise libertam simultaneamente glucose e manose). Em madeira dura, a glucuronoxilana representa de 15 à 30% de sua massa seca (LINARES-PASTÉN; ARONSSON; KARLSSON, 2018). Neste polissacarídeo, algumas unidades de xilose são acetiladas na posição C2 e C3 e, além disso, uma a cada dez moléculas possuem um grupo de ácido urônico (ácido-4-O-metilglucurônico) unidos por ligações α -1,2. A porcentagem de grupos acetil varia entre 8% à 17% do total de xilana, correspondendo, em média de 3,5 à 7 grupos acetilados a cada 10 unidades de xilose (GIRIO et al., 2010).

Na glucuronoxilana as ligações xilosídicas entre as unidades de xilose são facilmente hidrolisadas por ácidos, entretanto, as ligações entre os grupos de ácido urônico e a xilose são muito resistentes (PENG et al., 2012). O grau médio de polimerização (DP) da glucuronoxilana está na faixa de 100-200 (PEREIRA et al 2003; GIRIO, 2010). Além dessas unidades, β -D-xilanopiranosil e ácido-4-O-metilglucurônico, a glucuronoxilana também pode conter pequenas quantidades de L-ramnose e ácido galacturônico. O que aumenta a resistência do polímero a agentes alcalinos (GIRIO, 2010).

A arabinoxilana é a maior fração de hemicelulose encontrada em grãos de cereais, tais como: trigo, cevada, aveia, arroz, sorgo (IZYDORCZYK; BILIADERIS, 1995; NAIDU et al., 2018). A arabinose é o principal grupo lateral da arabinoxilana, este composto está ligado à posição de carbono 2 ou 3 da unidade xilose que formam a espinha dorsal do xilana (EBRINGEROVÁ, 2005; NAIDU et al., 2018). As unidades de xilose também podem ser substituídas nas posições de carbono 2 e 3 por grupos acetil. Um fator importante das propriedades da arabinoxilana é a proporção de arabinose e xilose, pois afeta o grau de ramificação. O grau de

polimerização das arabinoxilanas varia de 50 a 185 unidades de monómero (ZHOU et al., 2016).

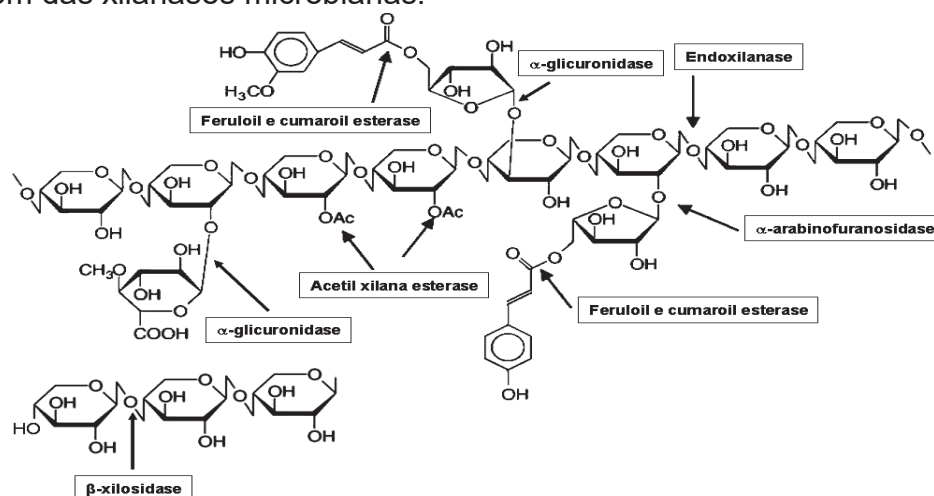
Nas paredes celulares das gramíneas, a arabinoglucuronoxilana ou glucuronoarabinoxilana corresponde a maior componente da hemicelulose, de 40% à 50%, enquanto em madeiras estes componentes são encontrados em menores quantidades, de 5% à 15% (SOREK et al., 2014). A arabinoglucuronoxilana possui um ácido 4-O-metil-glucurônico e um α -L-arabinofuranosil, ligados, respectivamente, nas posições O-2 e O-3 da cadeia de xilose, através de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (PENG et al., 2012). Essas substituições são aproximadamente 1 unidade de ácido glucurônico para cada 5-6 unidades de xilose e 1 de arabinofuranose para cada 5-12 de xilose (SHIMIZU, 2001). Não foram relatados casos de arabinose e ácido glucurônico sendo substituídos na mesma unidade de xilose (KOZLOVA; MIKSHINA; GORSHKOVA, 2012).

Em cada categoria de xilana existe uma heterogeneidade em relação a natureza e ao grau de ramificação.

2.1.4.2 Hidrólise da xilana e o sistema xilanolítico

Devido à heterogeneidade e a natureza química complexa da xilana, sua despolimerização completa requer a ação de várias enzimas hidrolíticas do complexo xilanolítico, com diversas especificidades e modos de ação. O sistema enzimático xilanolítico é composto pelas enzimas endoxilanases (1,4- β -D-xilana xilanoidrolase EC 3.2.1.8), β -D-xilosidases (1,4- β -D-xilana xiloidrolase; EC 3.2.1.37), α -glucosiduronase (E.C.3.2.1.139), acetilxilana esterase (E.C.3.1.1.72), arabinases e ácido ferúlico esterase (E.C.3.1.1) (SAINZ-POLO et al., 2014), como ilustrado na Figura 9. Entre essas enzimas conhecidas como xilanases, as endoxilanases e β -D-xilosidases, são as mais estudadas (TERRASAN; GUIBAN; CARMONA, 2016).

Figura 9 - Estrutura da xilana, mostrando os diferentes grupos substituintes e o ponto de clivagem das xilanases microbianas.



Fonte: Chavez et al. (2006).

As endo-1,4-β-D-xilanases clivam as ligações glicosídicas β-1,4 internas das moléculas de xilana, liberando xilooligossacarídeos (XOXs) e a β-D-xilosidase hidrolisa estes XOXs para liberar xilose (HALTRICH et al., 1996). A clivagem da xilana pela enzima não é aleatória, ela é dependente do comprimento da cadeia, do grau de ramificação e da presença de substituintes na molécula do substrato. Algumas xilanases clivam facilmente regiões sem substituições, enquanto outras dependem da presença de substituintes para exercer sua função (LI et al., 2000).

As β-D-xilosidases (1,4-β-D-xilana xilohidrolase; EC 3.2.1.37) liberam xilose a partir de xilooligossacarídeos curtos e xilobiose. Normalmente, não são capazes de hidrolisar xilana, e seu melhor substrato é xilobiose, mas estas enzimas são capazes de clivar substratos artificiais como p-nitrofenil e nitrofenil β-D-xilopiranosídeo (POLIZELI et al., 2005; KNOB; TERRASAN; CARMONA, 2010).

Um importante papel das enzimas β-D-xilosidases é diminuir a inibição causada pela concentração de xilooligossacarídeos, pois as xilanases são inibidas por altas concentrações de seus produtos (POLIZELI et al., 2005; KNOB; TERRASAN; CARMONA, 2010).

A acetilxilana esterase (EC 3.1.1.72) cliva a ligação éster com o ácido acético das hemiceluloses acetiladas. Vários tipos de xilanas e outras hemiceluloses são frequentemente acetiladas (KOMIYA et al., 2017). A ácido ferúlico esterase (EC 3.1.1.-) e a ácido p-cumaroil esterase (E.C.3.1.1) também clivam as ligações

ésteres da xilana, sendo que a primeira hidrolisa a ligação entre a arabinose e o ácido ferúlico e a segunda entre a arabinose e o ácido-p-cumárico (WONG et al., 1988).

As arabinases removem resíduos de L-arabinose na posição do C2 e C3 do β -D-xilopiranosil e podem apresentar dois modos de ação: As endo-1,5- α -L-arabinase (E.C. 3.2.1.99) clivam arabinanas lineares de forma aleatória, liberando arabino-oligossacarídeos, estas enzimas também são ativas em p -nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo; Já as exo- α -L-arabinofuranosídeo (EC 3.2.1.55), degradam arabinanas ramificadas liberando arabino-oligossacarídeos curtos, e são inativas ao p -nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo. A exo- α -L-arabinofuranosídeo é específica na hidrólise da arabinoxilana (WONG; CHAN; BATT, 2008).

A α -glucuronidase (EC 3.2.1.-) hidrolisa as ligações α -1,2 entre o ácido-4-O-metilglucurônico e a unidades de β -D-xilopiranosil, da cadeia de glucoranoxilana (WONG et al., 1988). A α -glucuronidase de origem fúngica se difere da bacteriana no tamanho e na estrutura quaternária da proteína, porém, ambas apresentam sítios ativos altamente conservados. As α -glucuronidases bacterianas apresentam massa molecular de 70 kDa, enquanto as α -glucuronidases fúngicas possuem massa molecular de cerca de 90 kDa. A diferença na massa molecular das α -glucuronidases isoladas destes microrganismos se deve à glicosilação das enzimas fúngicas. A enzima em ambas as origens utiliza o mecanismo inversor para catálise (YEOMAN et al., 2010).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS XILANASES

As xilanases são glicosídeses (hidrolases O-glicosídicas, EC 3.2.1.x) produzidas por fungos, bactérias, algas marinhas, protozoários, crustáceos, insetos e sementes. Contudo, comercialmente, sua principal fonte é a produção através de fungos filamentosos (COLLINS; GERDAY; FELLER 2005; BAJPAI, 2014).

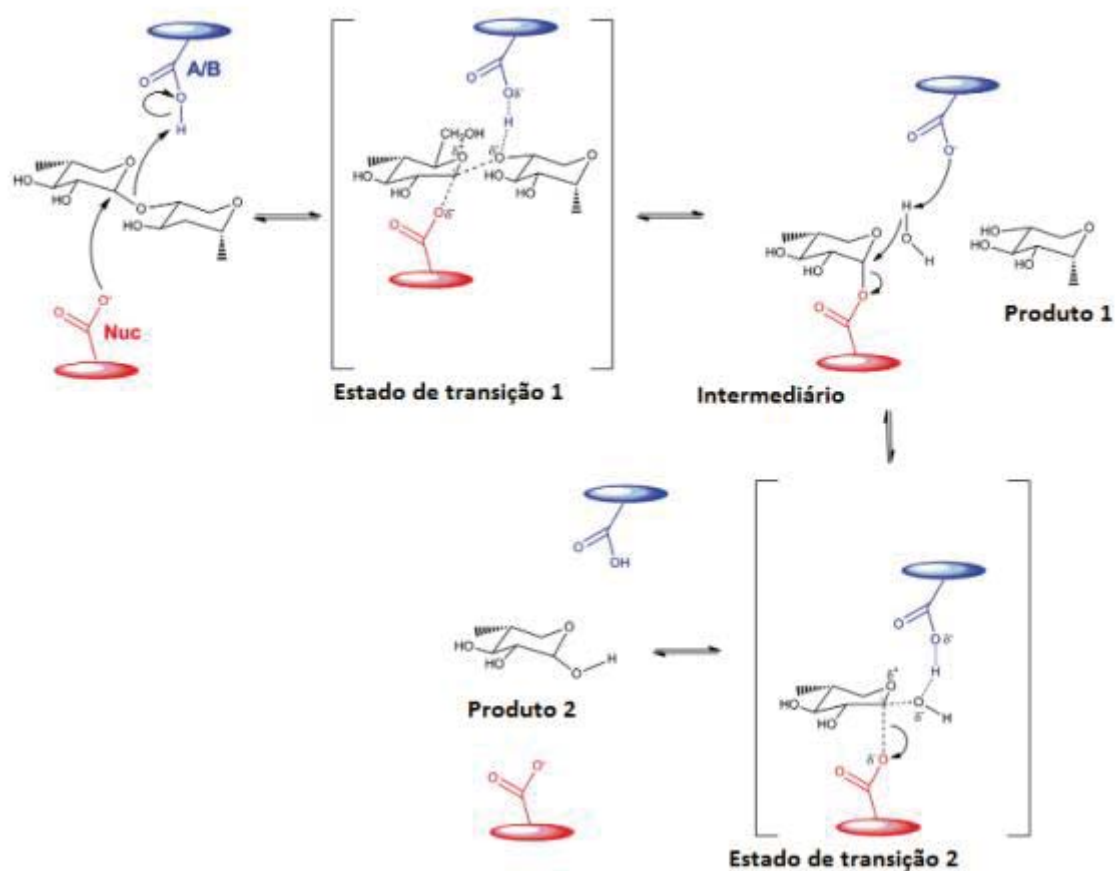
As xilanases foram relatadas pela primeira vez em 1955, sendo originalmente denominadas pentosanases. Posteriormente, foram reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) em 1961, quando foram classificadas como EC 3.2.1.8 (COLLINS; GERDAY; FELLER 2005)

A IUBMB determina a nomenclatura das glicosil hidrolases (GH) baseando-se na especificidade ao substrato e, ocasionalmente, em seu mecanismo molecular. Essa classificação é feita com base na similaridade da sequência dos aminoácidos, levando à definição de 149 famílias diferentes, disponível no site do CAZy (<http://www.cazy.org>).

A hidrólise de ligações glicosídicas é realizada por meio de catálise ácida e requer dois resíduos de aminoácidos: um doador de prótons e um nucleófilo (base). Essa hidrólise pode ocorrer por meio de dois mecanismos que são diferenciados pela retenção ou pela inversão da configuração do carbono anomérico. Em ambos os mecanismos a posição do doador de prótons é idêntica, perto o suficiente para formar uma ligação de hidrogênio com o oxigênio glicosídico. Em enzimas que retêm a configuração, a base nucleofílica da catálise é “vizinha” do carbono anomérico do açúcar. As enzimas que invertem a configuração diferem justamente na distância dessa base, que é mais distante do alvo no substrato. Nesse caso, uma molécula de água pode se acomodar no espaço entre o nucleófilo e o açúcar (DAVIES; HENRISSAT, 1995). As famílias GH 10 e 11 possuem dois resíduos de glutamato como doador de prótons e nucleófilo atuando, geralmente, pelo mecanismo de retenção (figura 10) (COLLINS; GERDAY; FELLER 2005).

Sendo assim no mecanismo de retenção a primeira etapa da reação um dos resíduos de glutamato, inicialmente protonado, age como catalisador ácido-base, doando prótons H^+ para o substrato, enquanto o outro atua como nucleófilo, atacando o carbono anomérico e levando à clivagem da ligação glicosídica, com saída do grupo de partida e formação do intermediário covalente. No segundo passo, a cadeia lateral do primeiro resíduo de glutamato, que se encontra desprotonada, atua como acceptor de prótons H^+ , abstraindo um próton de uma molécula de água que ataca o carbono anomérico, liberando o produto final e regenerando a enzima livre (WAN et al., 2015, PAES; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

Figura 10 - Mecanismo de retenção para hidrólise de uma ligação covalente O-glicosídica por uma xilanase.



Nota: O mecanismo de retenção, em que o oxigênio da ligação glicosídica é protonado por um catalisador ácido (A/B) e o ataque nucleofílico é promovido por uma base (Nuc). A glicosil-enzima resultante (Intermediário) é hidrolisada por uma molécula de água e a segunda substituição no carbono anomérico gera um produto com estereoquímica idêntica àquela do substrato.

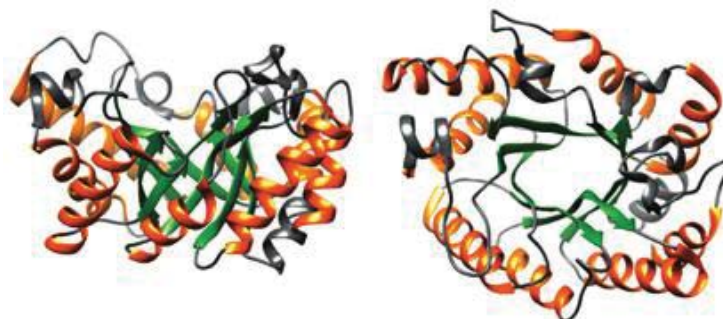
Fonte: Adaptado de Paës;Berrin; Beaugrand (2012).

As xilanases são classificadas em diversas famílias das GH 5, 8, 10, 11, 16, 26, 30, 43, 51, 62 e 98, porém as que possuem ação hidrolítica para a β -1,4, são encontradas restritamente nas famílias GH 5, 8, 10, 11, 30, 51 e 98 (PAES; BERRIN; BEAUGRAND, 2012; LINARES-PASTÉN; ARONSSON; KARLSSON, 2018).

As xilanases mais descritas em literatura são as das famílias GH 10 (antes conhecidas como F) e 11(antes conhecidas como G) (BIELY et al., 1997; JUTURU; WU, 2012). As da família GH 10 são produzidas por plantas, bactérias e fungos. Essas enzimas são altamente ativas sobre pequenos xilooligossacarídeos, o que indica pequenos sítios de ligação ao substrato (POLLET et al., 2010). Apresentam massa molecular acima de 30 kDa, baixo ponto isoeletrico (pI), os sítios catalíticos

formam uma estrutura de barril (α/β)₈ TIM (Figura 11) com loops estendidos, localizados em uma fenda que contêm, pelo menos, de quatro a cinco sub-sítios de ligação para substrato (COLLINS, GERDAY E FELLER, 2005; ZHANG et al., 2016). Existem relatos de enzimas dessa família que apresentam uma massa molecular menor podendo, em alguns casos, serem altamente glicosiladas (ÁLVAREZ-CERVANTES et al., 2016).

Figura 11 - À esquerda, vista lateral e à direita, vista superior da representação esquemática da proteína tridimensional (3D) da xilanase GH 10 produzida por *Streptomyces halstedii*, PDB 1NQ6. As hélices α e as cadeias β da estrutura de barril (α/β)₈, são coloridas em laranja e verde, respectivamente.



Fonte: Linares-Pastén, Aronsson e Karlsson (2018) adaptado de Canals et al. (2003).

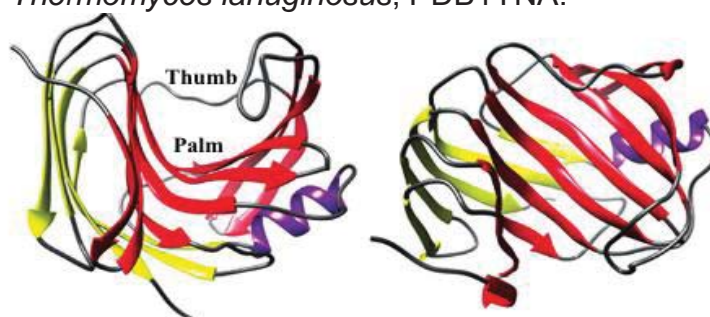
A maioria dos sub-sítios de ligação do substrato da xilanase pertencentes à família GH 10 são altamente conservados, mas as diferenças de afinidade entre estes sítios podem afetar seu modo de ação, bem como o substrato de preferências (ZHANG et al., 2016). Essas enzimas têm grande versatilidade catalítica, podendo catalisar a hidrólise de aril β -D-cellobiosídeos (COLLINS, GERDAY E FELLER, 2005; CHAKDAR et al., 2016).

Foram descritos muitos trabalhos relatando a produção de xilanases de GH 10 por várias espécies de fungos, tais como: *Penicillium citrinum* (BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR; 2016), *Penicillium canescens* (DENISENKO et al., 2017), *Aspergillus niger* (TAKAHASHI; KAWABATA; MURAKAMI, 2013), *Malbranchea pulchella* (RIBEIRO et al., 2014) e *Penicillium funiculosum* (LAFOND et al., 2011).

As xilanases da família GH 11 são produzidas, apenas, por bactérias e fungos, apresentam baixa massa molecular (20 kDa) e pIs ácidos e alcalinos. Estas enzimas apresentam domínios para catálise de 180 a 200 aminoácidos, na

conformação folha β , curvada para si, conhecida como " β -jelly roll", que geralmente é comparada a uma mão direita parcialmente fechada como apresentada na Figura 12 (WAN et al., 2015).

Figura 12 - Representação esquemática da proteína tridimensional (3D) da xilanase GH 11 produzida *Thermomyces lanuginosus*, PDB1YNA.



Fonte: Linares-Pastén, Aronsson e Karlsson (2018) adaptado de Gruber et al. (1998).

Estas enzimas atuam exclusivamente em substratos que contêm resíduo D-xilose (BIELY et al., 1997). As xilanases de GH 11 são produzidas por vários microrganismos a exemplo, podem-se citar *Humicola insolens* (YANG et al 2014), *Fusarium oxysporum* (MOUKOULI; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS 2011), *Penicillium occitanis* (DRISS et al., 2012), *Aspergillus tamaris* (HEINEN et al., 2018) e *Orpinomyces sp* (VENTORIM et al., 2018).

As famílias GH 16, 43 e 62 contêm enzimas bifuncionais que possuem dois domínios, com propriedades catalíticas distintas. Na família 26, as xilanases agem em ligações β -1,3 em vez de β -1,4 (PAES; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

Na família GH 30, as xilanases demonstram serem dependentes das substituições de ácido metilglucurônico para atividade, sendo consideradas glucuronoxilanases (SAINZ-POLO et al., 2014). Entretanto, a xilanase de GH 5 (Xyl5A), produzida por *Clostridium thermocellum*, possui especificidade para hidrolisar substituições de arabinose (CORREIA et al., 2011). Um pequeno número de xilanases caracterizadas estão incluídas na família GH 8. Esta família, de forma semelhante às xilanases GH 10 e 11, não requer substituições na cadeia de xilana, mas difere das mesmas pelo mecanismo de reação inversa de deslocamento único (VALENZUELA et al., 2016). Este mecanismo também foi descrito para xilanases, pertencentes às famílias GH 43 e 98, que difere das xilanases com mecanismo de

retenção com deslocamento duplo, pertencem as famílias GH 5, 10, 11, 26, 30 e 51 (LINARES-PASTÉN; ARONSSON; KARLSSON 2018).

2.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS

2.3.1 Fungos filamentosos

Os fungos são seres eucarióticos altamente eficientes na degradação de uma ampla gama de substratos para sua nutrição. Estes microrganismos são hábeis em degradar o material lignocelulósico dos resíduos agrícolas. Inicialmente, os fungos secretam enzimas extracelulares ao meio que podem degradar as macromoléculas em moléculas pequenas que serão incorporadas e utilizadas nutricionalmente. Entre as enzimas produzidas pelos fungos destacam-se as celulases, lacases, xilanases, pectinases e amilases (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Esses microrganismos se apresentam sob a forma unicelular, as leveduras e a forma multicelular, filamentosa. A forma filamentosa é constituída de um conjunto de estruturas tubulares, denominadas de hifas, que quando agrupadas, formam o micélio (TORTORA; CASE; FUNKE, 2012).

Os fungos da ordem Mucorales são principalmente saprófitas, capazes de crescer em condições limitadas nutrientes e assimilar diferentes tipos de açúcares. Eles já são bem conhecidos em países como a China e Sudeste Asiático, sendo utilizados na produção de alimentos fermentados como tempe e o tofu. Nos últimos tempos, também têm sido investigado e utilizado para a produção de uma ampla gama de produtos metabólicos, tais como ácidos orgânicos, enzimas e biocombustíveis, como bioetanol e biodiesel. Além disso, a biomassa dos Mucoromycota, contém quantidades benéficas de proteínas, lipídios, aminoácidos, quitosana e quitina. Esses microrganismos são conhecidos como amilolíticos, sendo capazes de realizar sacarificações simultâneas e fermentações de materiais de amido (FERREIRA et al., 2013; MILLATI et al., 2014).

Gongronella spp. estão entre os membros mais comuns e economicamente importantes da Ordem Mucorales. Entre os vários fungos pertencentes a esta Ordem, *Gongronella butleri* é um fungo mesofílico, importante na produção de quitosana (TAN et al., 1996; BABU et al., 2015). Com relação a produção enzimática para a espécie, em literatura foram encontrados alguns trabalhos com β -glicosidase

(FANG et al., 2014, SANTOS et al., 2016) e amilase (CAVALHEIRO et al., 2017). Reforçando a importância desse estudo, quanto a produção de xilanases por *Gongronella butleri*.

2.4 PRODUÇÃO DE XILANASE POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO E CULTIVO SUBMERSO

O processo de cultivo dos microrganismos para a produção de enzimas podem ser conduzidos utilizando o cultivo em estado sólido (CES) ou cultivo submerso (CSm) (VITCOSQUE et al., 2016).

O CES emprega a utilização de um substrato sólido, apresenta pouca água livre, ou seja, a umidade é suficiente apenas para manter o crescimento e metabolismo do microrganismo (SINGHANIAA et al., 2009). Já no CSm, o meio consiste essencialmente de água, contendo os nutrientes dissolvidos. A técnica de cultivo submerso possui inúmeras vantagens como controle do pH, oxigênio dissolvido, temperatura, concentração de água e moléculas solúveis (FARINAS et al., 2015). Descobriu-se que CSm é normalmente mais indicada para processos que exigem enzimas mais purificadas (GARCIA-KIRCHNER et al., 2002). Essa técnica de cultivo é mais indicada para bactérias, ou leveduras, que requerem elevada umidade (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

O CES mostrou ser uma técnica vantajosa para cultivo de fungos filamentosos, pois simula seu habitat natural, sendo adequada como método de cultivo para tais microrganismos por permitir a penetração das hifas nos poros entre as partículas de substratos, o que auxilia as trocas gasosas e a manutenção metabólica. Além disso, as enzimas produzidas por CES são menos susceptíveis a problemas de inibição pelo substrato e são mais estáveis em termos dos efeitos da temperatura e do pH (BARRIOS-GONZALEZ, 2012).

Do ponto de vista ambiental, a vantagem do CES é a possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais como substratos sólidos, que servem como fonte de carbono para o crescimento e produção de enzimas (ERGUN; UREK, 2017).

A eficiência dos CES e CSm estão diretamente relacionadas com a fonte de carbono e microrganismo utilizado. O CES apresenta algumas limitações, como o controle de parâmetros como temperatura, pH, teor de umidade, aeração e a

concentração de nutrientes, principalmente quando utilizado em grandes escalas, influenciando diretamente o processo fermentativo (FARINAS et al., 2015).

Foram encontrados vários trabalhos, utilizando o CES e Csm para produção de xilanase fúngica. A tabela 2 traz alguns exemplos relacionados às xilanases.

Tabela 2 - Produção de enzimas xilanolíticas por fungos sob cultivo em estado sólido e submerso.

Fungo	Temperatura de crescimento	Substrato	Tipo	Tempo (horas)	Referências
<i>Aspergillus foetidus</i> MTCC 4898	30 °C	Sabugo de milho	CES	168	Chapla, Pandit e Shah (2012)
<i>Tuber Maculatum</i>	22 °C	Xilana beechwood	Csm	240	Bedade et al. (2017)
<i>Apergillus awamori</i>	30 °C	Coco babaçu	CES	72-120	Castro, Castilho e Freire (2015)
<i>Thermoascus aurantiacus</i> ATCC 204492	45 °C	Palha de trigo	Csm	168	Brienzo, Carvalho e Milagres (2010)

Fonte: Dados do próprio autor.

2.4.1 Otimização das condições de cultivo

Recentemente, a pesquisa científica tem trazido grandes avanços em todas as áreas da ciência, gerando um elevado número de informações. No Brasil, a aplicação de ferramentas estatísticas é de extrema importância, pois os recursos financeiros e laboratoriais encontram-se escassos, em decorrência das restrições de verbas para a aquisição de equipamentos e materiais de consumo. Uma reflexão deve ser realizada no início de cada pesquisa científica, para a definição das condições experimentais que permitam a aquisição de resultados confiáveis, já que a otimização de parâmetros experimentais de relevância é considerada como uma das etapas mais críticas do trabalho científico, principalmente daqueles que têm por objetivo o desenvolvimento de processos tecnológicos aplicáveis em grande escala (CUNICO et al., 2008; WALIA et al., 2017)

A otimização visa melhorar o desempenho de um sistema, de um processo ou de um produto, de forma a obter deles o máximo de benefícios possíveis, minimizando quaisquer prejuízos (UDAY et al 2016).

Foram encontrados vários trabalhos que relataram a otimização satisfatória de xilanase e outras enzimas, produzidas a partir de bactérias e fungos usando uma abordagem estatística (GULERIA et al. 2015; WALIA et al. 2015a; GULERIA et al. 2013).

Tradicionalmente, os processos de otimização são realizados pelo monitoramento de um fator por vez e observação de sua influência sobre uma resposta experimental. Neste tipo de abordagem, chamado de otimização univariada, enquanto o nível de um fator é alterado, os níveis dos demais são mantidos em um valor constante. Em anos recentes, tem aumentado a utilização de ferramentas quimiométricas multivariadas para a otimização de métodos analíticos. Considerando suas vantagens, como a redução do número de experimentos, resulta-se em um menor gasto de reagentes e de tempo. Estas ferramentas baseiam-se no desenvolvimento de modelos matemáticos que permitem estabelecer a relevância e a significância estatística dos efeitos dos fatores estudados, bem como avaliar os efeitos de interação entre os mesmos (NOVAES et al., 2017).

Planejamentos fatoriais completos, ou fracionários, são planejamentos multivariados que se baseiam na variação de fatores simultaneamente a um limitado número de níveis (normalmente dois), para cada variável. Esses tipos de planejamento são especialmente importantes no início de um estudo experimental, pois permitem realizar uma triagem de variáveis, evidenciando as mais significativas e quantificando suas interações (NOVAES et al., 2017).

O presente trabalho propõe um planejamento fatorial completo 2^4 , seguindo de um "steepest ascent" e análise de variância da atividade xilanolítica da espécie selecionada em estudo, cultivada em estado sólido, utilizando o farelo de trigo como substrato.

2.5 Purificação de Enzimas

O setor da Biotecnologia exige etapas rápidas e econômicas para purificação de proteínas. Neste contexto, diferentes técnicas de purificação são

utilizadas, ofertando à indústria alta recuperação e pureza ao produto final (DUTRA-MOLINO et al., 2014). A purificação é uma etapa importante variadas técnicas de purificação, ou combinação de mais de uma delas, são utilizadas tais como filtração em gel, troca iônica, interação hidrofóbica e etc., como apresentado na Tabela 3. Tais procedimentos são essenciais para a obtenção de enzimas puras e/ou sem perdas de atividade enzimática (SANTOS; ISHII, 2011).

Tabela 3 - Exemplos de técnicas de purificação de xilanases fúngicas.

Microrganismo	Substrato utilizado	Técnica de purificação	Referência
<i>Trichoderma inhamatum</i>	Xilana de aveia	Troca Iônica (DEAE Sephadex) e Filtração em gel (G 75)	Silva, Terrasan e Carmona (2015)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de arroz	Precipitação Salina $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20%; Exclusão molecular (Sephadex G-100) e Troca iônica (DEAE-cellulose C545)	Chanwicha et al. (2015)
<i>Humicola Grisea</i>	Farelo de trigo	Troca iônica (DEAE-Sepharose) e Interação Hidrofóbica	Lucena-Neto e Ferreira-Filho (2004)
<i>Malbranchea cinnamomea</i>		Precipitação Salina $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60-80%; Troca iônica (Q Sepharose) e Exclusão molecular (Sephadex G75)	Fan et al. (2014)
<i>Myceliophthora thermophila</i>	Palha de arroz, farinha de milho	Precipitação Salina $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20–80% de sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, filtração em gel G100 e troca iônica (DEAE-Cellulose)	Boonrung et al. (2016)

Fonte: Dados do próprio autor.

A purificação enzimática também pode ser baseada na alteração da solubilidade. Em concentrações mais elevadas de sal, a solubilidade protéica, geralmente, diminui, ocasionando à precipitação das proteínas. Este mecanismo é denominado *salting out*. Estes sais tendem reduzir a solubilidade das proteínas e aumentar a estabilidade da conformação nativa, no entanto, os íons presentes nos sais são geralmente desnaturantes (GREEN; HUGHES, 1955; WINGFIELD, 2016).

As técnicas utilizadas neste estudo são a troca iônica e a filtração em gel. No método da troca iônica têm-se fixação de substâncias carregadas a um suporte que contém uma carga oposta. A separação ocorre, pois as interações eletrostáticas entre os grupos são reversíveis e dependentes da afinidade de cada substância pelo

trocador. Esta afinidade é função do pH do meio, da temperatura, da força iônica, do tampão e etc. Na purificação por filtração em gel as moléculas são separadas de acordo com seu tamanho efetivo quando em solução, utilizando matrizes (ou géis) com porosidade definida. Geralmente, essa técnica é utilizada após a realização de uma separação baseada na carga da proteína (BERG et al., 2002).

2.6 APLICAÇÃO DE XILANASES

As xilanases despertaram um grande interesse recentemente, devido ao seu potencial para aplicação em muitos processos industriais. Nos últimos anos, o uso biotecnológico de xilanos e xilanases cresceu notavelmente (YEGIN, 2017).

As xilanases começaram a ser utilizadas na década de 1980, inicialmente na preparação de alimentos para animais e mais tarde nas indústrias de alimentos, têxteis e papelaria (HO, 2016). Atualmente, xilanases e celulasas, juntamente com pectinases, correspondem a 20% do mercado mundial de enzimas (HO, 2017).

A maioria das xilanases comerciais são produzidas por *Trichoderma*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium* e *Talaromyces sp* (ADDELA et al., 2015). A revisão será focada na aplicação da xilanase nas indústrias de alimentos, ração animal, biocombustível, papel e celulose.

2.6.1 Aplicação de xilanase na fabricação de pão, alimentos e bebidas

As xilanases são amplamente utilizadas como aditivo na indústria de panificação, em conjunto com as amilases. Estas enzimas melhoram significativamente a textura, o tamanho e a vida útil do pão (BUTT et al., 2008).

Os arabinoxilanos podem ser classificados como arabinoxilanos extraíveis em água (AEA) e arabinoxilanos não extraíveis em água (ANEA). Embora eles sejam encontrados em pequenas quantidades na farinha de trigo, os arabinoxilanos afetam diretamente as características da massa (BUTARDO;SREENIVASULU, 2016). O AEA é relatado como benéfico, enquanto ANEA tem efeitos negativos em produtos de panificação, pois afetam as propriedades visco-elásticas da massa. A exemplo, pode-se citar a hidratação insuficiente do glúten e a restrição da capacidade de retenção de gás, conseqüentemente a massa não se desenvolve,

acarretando a produção de pães duros, com textura desagradável. As xilanases atuam sobre o arabinosilano e minimiza esses efeitos indesejáveis (JIANG et al., 2005; GAAVILIGHI et al., 2006; GHOSHAL; SHIVARE; BANERJEE, 2016).

Uma outra questão a ser observada no processo de fabricação de pães foi descrita por Ahmad et al (2014), nesse estudo foram analisados vários tratamentos com xilanase, produzida por *Aspergillus niger*. Essa xilanase foi aplicada durante o preparo de grãos de trigo, assim como no momento da mistura da farinha na preparação da massa. Pôde-se concluir que a aplicação da xilanase em ambos tratamentos do processo de panificação, apresentando melhoria nas características da qualidade da massa, aumentando os atributos de qualidade do pão e a aceitabilidade do consumidor. No entanto, para obter os benefícios máximos dessa enzima, deve-se utilizá-la durante o preparo dos grãos de trigo, onde há tempo suficiente para desempenhar seu papel potencial, melhorando a qualidade da massa e do pão, em comparação com sua aplicação durante a mistura da farinha.

A xilanase também tem sido recomendada para fabricação de biscoitos do tipo cream cracker melhorando a textura, palatabilidade e a uniformidade dos mesmo (POLIZELI et al., 2005).

As xilanases, juntamente com as celulasas e pectinases, podem ser utilizadas na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais. Após o prensamento, centrifugação e filtração das frutas, essas enzimas são utilizadas para clarear o suco e aumentar a liquefação através da degradação da fase sólida que é gerada. O processamento enzimático aumenta o rendimento do suco, reduz o tempo de processamento e melhora a qualidade do produto (SHARMA; PATEL; SHARMA, 2014).

Em sucos de abacaxi e maçã, a xilanase produzida por *Bacillus licheniformis* P11(C) reduziu a turbidez em 70,1% e 78,8% respectivamente (BAJAJ; MANHAS, 2012). A eficiência da xilanase produzida por *Thermomyces lanuginosus* também foi verificada na clarificação de sucos de maçã e abacaxi. Além dessas frutas, foi também testado em suco de laranja, demonstrando que o tratamento com xilanase no suco de abacaxi foi mais eficaz, em comparação a utilização da enzima nos sucos de maçã e de laranja, este fato provavelmente pode estar relacionado com o baixo teor de pectina do suco de abacaxi (0,06 mg/100 mL), quando comparado ao teor hemicelulósico (1,15 mg/100 mL), enquanto que os

demais sucos, de maçã e de laranja, contêm teores mais elevados de pectina. (SHAHRESTANI et al., 2016).

Além dessa aplicação, as xilanases têm sido utilizadas para hidrólise enzimática, da xilana de várias fontes, como cascas de cevada, grãos de malte, espigas de milho, palha de milho, casca de arroz, farelo de trigo, palha de trigo e entre outros, liberando os xilooligocassarídeos (XOS). Os XOS têm um potencial notável de serem novos prebióticos, seus benefícios excepcionais incluem melhora na função intestinal, aumentando a disponibilidade biológica de cálcio, melhorando sua absorção, e reduzindo o risco de câncer de cólon (JAIN; KUMAR; SATYANARAYANA, 2015).

Nos cereais como a cevada, a arabinoxilana é o principal polissacarídeo após o amido. Neste cereal a arabinoxilana é parcialmente solúvel em água, este polímero na forma hidratada resulta em uma solução aquosa altamente viscosa, o que prejudica o processo de filtração e leva ao escurecimento da cerveja, assim, o pré-tratamento com xilanases degrada a arabinoxilana e facilita o processo, reduzindo a viscosidade e resultando em clarificação (KAPILAN; ARASARATNAM, 2017).

Segundo Polizeli et al. (2005), a xilose produzida pela ação das xilanases pode ser convertida a xilitol, um poliálcool que apresenta característica adoçante, semelhante à sacarose, de baixo teor calórico e não cariogênico, aspectos que conferem ao xilitol a capacidade de ser utilizado como adoçante de baixa caloria nas indústrias alimentícias.

2.6.2 Aplicação xilanase na ração animal

O uso de enzimas em dietas de animais começou nos anos 80 e avançou nos anos 90. As xilanases têm sido utilizadas na ração animal, juntamente com glucanases, pectinases, celulases, proteases, amilases, fitase, galactosidases e lipases (SINGH et al., 2016).

As xilanases são de grande importância na alimentação animal pois cereais incluindo trigo e soja, são ricos em biomassa lignocelulosicas. As xilanases atuam reduzindo a viscosidade do produto, facilitando a liberação dos nutrientes e acesso dos mesmos para enzimas digestivas, com isso tem-se melhor absorção dos

mesmos. Desta forma, o valor nutricional da dieta é aumentado. O tratamento enzimático com xilanases em forragens pode atuar na melhora de qualidade da silagem, resultando em uma taxa melhorada de digestão da parede celular da planta pelos ruminantes (KALIM; BÖHRINGER; ALI, 2015).

A utilização combinada das enzimas, fitase e a xilanase, pode tornar o farelo de arroz uma excelente alternativa de alimentação para as aves, inclusive como ótima fonte de fósforo, já que os principais fatores antinutritivos presentes no farelo de arroz são o alto teor de fibra e fitato (CONTE et al., 2003).

2.6.3 Aplicação da xilanase no biobranqueamento

A indústria de celulose e papel tem cada vez mais investidos em novos métodos de biotecnologia, visando a substituição de uma parte dos produtos químicos utilizados no processo de fabricação de papel (WALIA et al., 2017).

A polpa de celulose, geralmente, é composta por celulose (90-99%), hemicelulose (2-4%) e traços residuais de lignina e minerais. As hemiceluloses são consideradas impurezas para o processo de branqueamento da polpa, por afetarem a capacidade de filtração no processo de produção da fibra, alterando as propriedades dos produtos finais de celulose, como a força da fibra (IBARRA et al., 2010).

Os métodos mais utilizados para o processamento da polpa de celulose são os processos Kraft e o ácido sulfito (IBARRA et al., 2010). No método Kraft, a celulose passa por um cozimento contínuo, nesta etapa são empregados o hidróxido de sódio (NaOH) e o sulfeto de sódio (Na₂S), como agentes ativos na reação. A polpa marrom retirada do digestor, após a etapa de cozimento, passa por uma série de lavagens. A mesma é branqueada pela remoção da lignina e hemiceluloses, através de uma série de processos químicos que utilizam oxigênio, peróxido de hidrogênio, soda cáustica e dióxido de cloro, entre outros agentes de branqueamento (ALVES et al., 2015). Esse procedimento, citado acima, leva a produção de efluentes ricos em organoclorados e com elevada toxicidade (GUPTA et al., 2015).

As xilanases facilitam as etapas de biobranqueamento da polpa de celulose, o objetivo principal da utilização destas enzimas é a remoção das hemiceluloses

sem degradar a celulose. O tratamento com xilanases torna a polpa mais acessível para a ação dos reagentes químicos, facilitando a remoção da lignina (redução do número de Kappa) e diminuindo a utilização dos produtos organoclorados (GANGWAR; PRAKASH; PRAKASH, 2014).

A inovação também aumenta a qualidade do papel, a espessura da massa e pode diminuir a liberação de compostos orgânicos voláteis. Dessa forma, as xilanases, utilizadas como parte do biobranqueamento do papel, podem ser uma opção mais segura para a substituição dos perigosos compostos clorados (WALIA et al., 2015b).

Segundo Sharma et al. (2015), o uso de xilanases em biobranqueamento diminuiu a utilização de 10 a 20% do cloro, aumentando os níveis de brilho em 5,8%. Também foi encontrada uma economia de 25% de compostos organoclorados, através da utilização xilanases, nas etapas de pré-branqueamento (LÓPEZ; SILVA; SANTOS, 2017). As xilanases também têm sido utilizadas no processo de reciclagem de papel, como por exemplo, em jornais (CHUTANI; SHARMA, 2015).

Vários trabalhos descrevem sobre a produção e aplicação de xilanases no processo de biobranqueamento da polpa de celulose para diferentes espécies de fungos, tais como *Penicillium crustosum* (SILVA et al., 2016), *Aspergillus oryzae* (CHUTANI; SHARMA, 2015), *Aspergillus niger* (SRIDEVI et al., 2016) e *Trichoderma longibrachiatum* (MEDEIROS et al., 2007). A xilanase utilizada, com o objetivo final de biobranqueamento, deve ser, preferencialmente, resistente a altas temperaturas, termoestável e livre de atividade celulolítica (WALIA et al., 2015b).

2.6.4 Aplicação de xilanase na produção de Bioetanol

Atualmente, a conversão de materiais lignocelulósicos em etanol e produtos químicos de valor agregado ainda é uma proposta desafiadora (BOONCHUAY et al., 2018). Os materiais lignocelulósicos têm sido um atraente substrato para a produção de bioetanol, pois utilizam um substrato de baixo custo, geram uma pequena quantidade de gás de efeito estufa, empregando um processo de produção ambientalmente amigável e reduzindo o uso da terra (SOCCOL et al., 2017). A biomassa lignocelulósica consiste na complexa rede de celulose, hemiceluloses e lignina (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). O primeiro passo na produção de etanol

lignocelulósico é o pré-tratamento da biomassa, que envolve deslignificação do complexo lignocelulose para liberar celulose e hemicelulose. O segundo passo são as sacarificações dos açúcares complexos para açúcares fermentecíveis ao microrganismos, por métodos ácidos ou enzimático (BEG et al., 2001).

A sacarificação ácida gera vários compostos indesejados, inibidores de fermentação, tais como furfural, hidroximetilfurfural (HMF), compostos fenólicos e ácidos orgânicos, portanto, a sacarificação enzimática é o método mais preferido sobre o ácido (PANDEY; EDGARD; NEGI, 2016). O método enzimático requer ação de dois grupos de enzimas específicas, como as celulasas e as xilanases, para a sacarificação da celulose e hemicelulose respectivamente, em hexoses e pentoses fermentecíveis (HORN et al., 2012).

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo selecionar fungos filamentosos, provenientes de uma coleção de isolados do bioma Cerrado e investigá-los quanto a sua produção de xilanases, utilizando resíduos agroindustriais.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar o microrganismo melhor produtor de xilanase e identificá-lo baseado no sequenciamento de rDNA por ITSs;
- Comparar a produção da enzima através de cultivo em estado sólido e cultivo submerso, utilizando como substratos resíduos agroindústrias;
- Estabelecer as melhores condições de produção dessas enzimas, utilizando o substrato mais promissor;
- Avaliar, o uso do inóculo em discos para otimização da xilanase, por meio de análises estatísticas;
- Avaliar a influência da umidade e do tempo de cultivo na produção da xilanase;
- Purificar parcialmente a xilanase secretada pelo microrganismo selecionado, quando cultivado nas melhores condições estabelecidas;
- Caracterizar bioquimicamente a xilanase bruta e a xilanase parcialmente purificada quanto aos seguintes parâmetros: pH e temperatura ótima; estabilidade frente ao pH e a temperatura; efeito de íons e reagentes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS

Os fungos filamentosos utilizados nesse trabalho foram isolados em projeto anterior de mestrado desenvolvido por Senna 2014. Estão disponíveis, na coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP, Câmpus de Ilha Solteira.

4.2 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

4.2.1 Preparo dos substratos agrícolas e agroindustrias

Os substratos utilizados como fontes de carbono, e seus respectivos locais de origem estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Origem dos substratos utilizados para o cultivo microrganismo selecionado.

Fonte de carbono	Sigla	Origem	Dimensões
Bagaço de cana-de-açúcar	BC	Usina Santa Délia	~ 30 mm
Casca de maracujá	CM	FEPE-UNESP	< 7 mm
Palha de milho	PM	FEPE-UNESP	~ 20 mm
Braquiária	B	FEPE-UNESP	< 2mm
Sabugo de milho	SM	FEPE-UNESP	~ 10 mm
Casca de soja	CS	FEPE-UNESP	< 2mm
Farelo de trigo	FT	Comércio local	< 5 mm
Serragem	S	FEPE-UNESP	< 2mm
Papelão	P	Comércio local	< 4mm

Fonte: Dados do próprio autor.

Os substratos farelo de trigo (FT), palha de milho (PM), sabugo de milho (SM) e bagaço de cana-de-açúcar (BC), antes da utilização, foram submetidos a diversas lavagens para retirada de açúcares, amido e possíveis detritos presentes. A seguir foram colocados em bandejas cobertas com jornal e secos ao sol em ar livre por 8 horas a cada 1 hora o material era homogeneizado, a fim de proporcionar uma secagem completa do material todo.

4.2.2 Cultivo em estado sólido (CES)

O CES foi realizado em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 5,0 g de substrato, o qual foi umedecido inicialmente com 10 mL de solução de sais contendo 0,14 gL⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,2 gL⁻¹ de K₂HPO₄, 0,02 gL⁻¹ de MgSO₄, 0,03 gL⁻¹ de CaCl₂ para pH 5,0. O substrato utilizado como fonte de carbono nos ensaios iniciais foi o farelo de trigo (FT). A esterilização dos frascos com FT e com a solução de sais foi realizada separadamente em autoclave, posteriormente, o material sólido foi umedecido com solução salina e inoculado com a cultura fúngica. O inóculo foi preparado a partir do cultivo em placa de Petri contendo meio Agar Dextrose Sabouraud. Após 48 horas de crescimento, cinco discos de 0,5 cm de diâmetro foram utilizados como inóculo e transferidos para os Erlenmeyers contendo o substrato. Foi utilizado um bastão de vidro esterilizado para homogenizar o inóculo no substrato. Os frascos de Erlenmeyers foram incubados em estufa a 30 °C, por 72 horas, e o crescimento fúngico foi avaliado através da visualização do crescimento micelial típico. Após o tempo de fermentação, foram adicionados 50 mL de água destilada autoclavada aos Erlenmeyers contendo crescimento fúngico. Estas amostras foram colocadas sob agitação orbital em Shaker, por 1 hora. Após a centrifugação a 10.000 rcf, por 10 minutos a 5 °C, a solução enzimática bruta foi utilizada para as análises enzimáticas.

4.2.3 Cultivo submerso (CSm)

No CSm, dois discos de 0,5 cm de diâmetro do isolado selecionado, foram inoculados em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 20 mL de meio líquido com a seguinte composição: 0,12 gL⁻¹ de MgSO₄, 0,15 gL⁻¹ de KH₂PO₄, 5,0 gL⁻¹ de NH₄H₂PO₄, 2 gL⁻¹ de peptona, 0,45% de extrato de levedura e 10 gL⁻¹ de xilana beechwood entre outros substratos (Tabela 4). Os frascos foram incubados sob agitação orbital de 125 ciclos por minutos, a 30 °C, durante 72 horas. O crescimento fúngico foi subsequente filtrado com gase e centrifugado à 10.000 rcf, por 10 minutos a 5 °C. A solução enzimática bruta foi utilizada para as análises enzimáticas.

4.2.4 Efeito da fonte de carbono

O isolado que mais se destacou na produção de xilanase foi submetido ao ensaio em diferentes substratos.

Este fungo foi cultivado em estado sólido, com nove diferentes tipos de substratos (Tabela 4), como no Item 4.2.2. O sabugo de milho foi testado com duas granulometrias diferentes, selecionando as frações retidas em peneira de 10 (2 mm) e 20 mesh (0,84 mm). O cultivo e extração seguiu os mesmos parâmetros descritos no Item 4.2.2.

No cultivo submerso, foram utilizados seis substratos: farelo de trigo (FT), casca de maracujá (CM), palha de milho (PM), braquiária (B), sabugo de milho triturado (SMT), bagaço de cana-de-açúcar (BC). Todas fontes de carbono foram utilizadas à 10 g.L⁻¹ juntamente com o meio, seguindo os parâmetros descritos no Item 4.2.3.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO

4.3.1 Cultivo do isolado para extração do DNA

O isolado selecionado para identificação molecular foi cultivado em tubo Falcon 50 mL, contendo 15 mL de meio líquido BD (batata-dextrose, Himedia, Mumbai, MA, Índia), com 50 µg.mL⁻¹ de cloranfenicol e estreptomicina, por sete dias a 25 °C sob agitação a 75 rpm. O inóculo foi constituído de um disco de 0,5 cm de diâmetro, crescido em placa de petri com meio Sabouraud. Após o crescimento, os micélios foram filtrados em gaze de algodão e transferidos para freezer por 48 horas, e em seguida, submetidos à liofilização por 24 horas.

4.3.2 Extração de DNA

O DNA dos fungo foi extraído de micélio liofilizado, usando-se o GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A visualização do DNA quantificado foi realizada em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5 X, em corrida de 1 hora à 110 V. Os géis foram

corados com Nancy 520, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação Carestream (Gel Logic).

4.3.3 Reação de PCR

A amostra de DNA genômico foi submetida a PCR para a amplificação do DNA. Os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram utilizados para amplificação da região ITS do rDNA, conforme descrito por White et al. (1990). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 25 μ L, contendo 2 μ L de DNA, 0,5 μ mol/L de cada iniciador ITS1 e ITS4, 2 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 0,08 mmol L⁻¹ de cada dNTP, e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich, EUA). As amplificações foram realizadas em termociclador ProFlex (Applied Biosystems, EUA), com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 95 °C, 1 minuto de anelamento a 57,5 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5 X, em corrida de 1 hora à 110 V. Os géis foram corados com Nancy 520, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação Carestream (Gel Logic). Os produtos da PCR foram sequenciados pela Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul).

4.3.4 Análise computacional das sequências

As sequências foram visualizadas, alinhadas, com o programa Genenious R6 (Biomatters Limited, Nova Zelândia) e analisadas utilizando-se o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) desenvolvido pelo National Center For Biothechnology.

4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE XILANASE

A partir dos resultados obtidos no estudo da fonte de carbono e no tipo de cultivo, propôs-se analisar a concentração da solução de sais utilizadas na umidificação do substrato no cultivo em estado sólido. Para tais estudos adotou-se um planejamento experimental.

4.4.1 Planejamento experimental

O delineamento experimental adotado para verificar a influência das concentrações de sais na produção da xilanase, foi o planejamento fatorial 2^4 com dois ensaios no ponto central.

Os fatores analisados foram as concentrações de sulfato de amônio, de fosfato de potássio monobásico, de cloreto de cálcio e de sulfato de magnésio. Os níveis dos fatores e concentração real utilizadas no planejamento fatorial 2^4 , estão dispostos na Tabela 5. Os níveis -1, 0 e +1 correspondem aos valores mínimos, centrais e máximos, para cada um dos fatores em estudo. A Tabela 6 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^4 com dois ensaios no ponto central, onde foi realizado um sorteio para determinar a ordem dos ensaios e, desta forma, manter uma condição de aleatoriedade. O CES foi realizado com farelo de trigo seguindo o protocolo descrito no Item 4.2.2.

Tabela 5 - Fatores e valores dos níveis analisados no planejamento fatorial 2^4 com quatro ensaios no ponto central.

Componentes	Níveis		
	- (mínimo)	0 (central)	+ máximo
1 - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_1 ,%)	0,10	0,15	0,20
2 - KH_2PO_4 (X_2 ,%)	0,05	0,10	0,15
3 - CaCl_2 (X_3 ,%)	0	0,015	0,03
4 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (X_4 ,%)	0	0,01	0,02

Fonte: Dados do próprio autor.

O planejamento fatorial com dezoito ensaios no ponto central teve o intuito de determinar, quantitativamente, quais fatores tiveram os maiores efeitos na produção da enzima xilanase, e as possíveis interações entre eles, encontra-se apresentado

na Tabela 6. Partindo-se desses resultados, foi realizado mais um experimento na direção de máxima inclinação ascendente ("steepest ascent"), que é a direção de maior crescimento de resposta.

Tabela 6 - Matriz planejamento fatorial 2^4 completo com dois pontos centrais.

	Níveis Codificados				Níveis Não-Codificados			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂	MgSO ₄ .7H ₂ O
1	-	-	-	-	0,1	0,05	0	0
2	+	-	-	-	0,2	0,05	0	0
3	-	+	-	-	0,1	0,15	0	0
4	+	+	-	-	0,2	0,15	0	0
5	-	-	+	-	0,1	0,05	0,03	0
6	+	-	+	-	0,2	0,05	0,03	0
7	-	+	+	-	0,1	0,15	0,03	0
8	+	+	+	-	0,2	0,15	0,03	0
9	-	-	-	+	0,1	0,05	0	0,02
10	+	-	-	+	0,2	0,05	0	0,02
11	-	+	-	+	0,1	0,15	0	0,02
12	+	+	-	+	0,2	0,15	0	0,02
13	-	-	+	+	0,1	0,05	0,03	0,02
14	+	-	+	+	0,2	0,05	0,03	0,02
15	-	+	+	+	0,1	0,15	0,03	0,02
16	+	+	+	+	0,2	0,15	0,03	0,02
17	0	0	0	0	0,15	0,1	0,015	0,01
18	0	0	0	0	0,15	0,1	0,015	0,01

Fonte: Dados do próprio autor.

4.4.2 Análises estatísticas

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente, de acordo com os Planejamentos preestabelecidos, para verificar o nível dos efeitos dos fatores e de suas interações. As análises estatísticas dos dados foram realizadas pelo software "STATISTICA[®] for Windows" versão 5.0, utilizando a função "Experimental Design".

A análise de variância da atividade xilanolítica, após o "steepest ascent", foi realizada pelo programa Sisvar.

4.5 TEOR DE UMIDADE DO SUBSTRATO E ANÁLISE DA PRODUÇÃO XILANOLÍTICA

Para a determinação da umidade foi realizada pesagem das cápsulas de alumínio utilizadas e o valor obtido foi designado peso da cápsula. Em seguida, cinco gramas de farelo de trigo foram adicionados nas cápsulas de alumínio, assim como diferentes volumes de água destilada (2,5; 5,0 e 10 mL), as amostras foram pesadas novamente e o valor encontrado foi denominado peso úmido. O substrato foi umedecido com auxílio de pipeta e homogeneizado com bastão de vidro. As cápsulas de alumínio com farelo de trigo foram submetidas ao aquecimento em estufa de circulação forçada de ar à 105 °C por 24 horas. Após esse período, as amostras foram deixadas em dessecador por 3 horas e esse material foi novamente pesado e denominado peso seco. O cálculo para determinação da umidade percentual foi realizado como apresentado em (1).

$$((\text{Peso úmido} - \text{Peso seco}) / (\text{Peso úmido} - \text{Peso da cápsula})) * 100 \quad (1)$$

Prosseguindo com a análise em triplicata, foram realizados o cultivo em estado sólido do fungo selecionado, com farelo de trigo nas diferentes umidades encontradas, a fim de verificar a influência da mesma na produção da xilanase.

4.6 ESTUDO DO PERFIL DE PRODUÇÃO DE XILANASE

Após a determinação das melhores condições de cultivo para o fungo selecionado, foi avaliado o perfil de produção de xilanase ao longo do tempo de cultivo. Foi adotado o cultivo em estado sólido, com o farelo de trigo como substrato, umidificado com 10 mL de água destilada estéril. O ensaio seguiu o descrito no item 4.2.2, com análises a cada intervalo de 24 horas por até 120 horas de crescimento fúngico. O experimento foi realizado com três repetições.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CMCASE, AVICELASE E XILANASE

Para a determinação das atividades CMCCase, avicelase e xilanase primeiramente foi preparado os substratos carboximetilcelulose (CMC) a 4%, avicel (Sigma) a 1% e xilana beechwood (Sigma) a 1% em tampão acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 5,5. Numa segunda etapa a mistura reacional constituída de 0,025 mL da solução enzimática bruta em 0,225 mL do substrato específico foi incubada a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, por 10 minutos, e posteriormente, foi interrompida pela adição de 0,250 mL do reagente DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por Miller (1959). Na sequência os tubos eram colocados por 10 minutos em banho fervente realizando em seguida o resfriamento em bacia de gelo. Após o resfriamento eram adicionados 2,5 mL de água destilada.

Os controles foram preparados na seguinte ordem primeiro a amostra enzimática, posteriormente o reagente DNS e por fim o tampão com substrato, sendo submetidos a banho fervente por 10 minutos, resfriados em banho de gelo e completado o volume de 2,5 mL de água destilada.

No tubo branco o volume da solução de substrato reacional + volume da enzima ($250 \text{ } \mu\text{L}$) foram substituídos por água destilada e em seguida foi adicionado o reagente DNS. Em todas atividades as leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540 nm .

Uma unidade (IU) de atividade de CMCCase e avicelase foi definida como a quantidade de enzima necessária para libertar $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de glicose por minuto sob as condições de reação acima, utilizando uma curva analítica de glicose. Uma unidade (IU) de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para libertar $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de xilose por minuto sob as condições de reação acima, utilizando uma curva analítica de xilose. Quando necessário, diluições das amostras foram preparadas, para que a absorbância resultante estivesse contida no intervalo da curva analítica.

4.8 ATIVIDADE DE AMILASE

A atividade amilolítica foi analisada pelo método dextrinizante, descrito por Fuwa (1954), Ponsawasdi e Yagisawa (1987), com algumas modificações. Nesse método observa-se a capacidade da enzima em quebrar a molécula de amido, demonstrando a presença de mais de um tipo de amilase. A mistura da reação foi composta por 0,3 mL de solução de amido solúvel a 0,5%, em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ e pH 5,5 e 0,1 mL da solução enzimática bruta, a qual foi incubada a 50 °C, por 10 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 4,0 mL de solução de HCl 0,2 mol L⁻¹. Em seguida, a reação recebeu 0,5 mL de reativo de Iodo (0,30% de KI e 0,03% de I₂). A mistura de reação foi diluída com 10 mL de água destilada. O controle foi preparado conforme o processo descrito, substituindo-se a enzima pelo volume equivalente de enzima inativa. A absorbância foi determinada a 700 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% a intensidade da cor azul do complexo Iodo-Amido por minuto.

4.9 ATIVIDADE DE B-GLICOSIDASE

A determinação da atividade β-glicolítica foi realizada utilizando o substrato cromogênico p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (pNPβG). A reação consistiu de 250 μL de tampão acetato (0,1 mol L⁻¹ e pH 5), 250 μL de solução pNPβG (4 mmol L⁻¹) e 50 μL de solução enzimática bruta. Após a incubação desta mistura a 50 °C por 10 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 2 mL de tampão carbonato de sódio (2 mmol L⁻¹). Na reação controle o carbonato foi adicionado primeiro, seguido da enzima e demais reagentes utilizados. No tubo branco o volume da enzima foi substituída por água, em seguida foram adicionados o tampão acetato (0,1 mol L⁻¹ e pH 5), 250 μL de solução pNPβG (4 mmol L⁻¹) e 2 mL de tampão carbonato de sódio (2 mmol L⁻¹) em temperatura ambiente. A estimativa da atividade enzimática foi realizada em espectrofotômetro, através da leitura da absorbância (410 nm) do p-nitrofenol. Uma unidade (UI) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de nitrofenol por minuto de reação, utilizando a curva analítica do p-nitrofenil em variadas concentrações.

4.10 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

A determinação do teor total de proteína foi realizada pelo método de Hartree-Lowry (HARTREE, 1972), no qual a mistura da reação foi composta de 0,5 mL de solução de proteína (extratos bruto e o parcialmente purificado) convenientemente diluída, onde foi adicionado 0,450 mL do reagente A (2 g L^{-1} de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, 100 g L^{-1} de Na_2CO_3 , $0,5 \text{ mL L}^{-1}$ de solução NaOH a 1N) e incubado em banho Maria a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos. Após, a reação foi resfriada em temperatura ambiente e adicionado o reagente B (2% de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, 1% de CuSO_4 , 10% de solução NaOH , a 1N) e incubada em temperatura ambiente por 10 minutos. Na sequência foi adicionado 1,5 mL do reagente C (1 volume de Folin Ciocalteau (Sigma) com 15 volumes de água) e incubado em banho Maria a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos. A absorbância da mistura de reação foi determinada a 650 nm e a concentração de proteína nas amostras foi determinada por uma curva analítica de soro albumina bovina ($0\text{-}300 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). Para o branco da amostra, a proteína foi substituída por igual volume de água. A determinação da atividade específica foi obtida pela divisão da atividade enzimática (U mL^{-1}) pelo teor de proteína total (mg/mL^{-1}).

4.11 EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE A ATIVIDADE XILANOLÍTICA

O efeito foi avaliado pela determinação da atividade xilanolítica na presença de 10 mmol L^{-1} dos seguintes compostos: ácido tânico, ácido p-cumárico, ácido siríngico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzóico, vanilina, ácido vanílico, siringaldeído. Para isso, a enzima bruta foi submetida à presença dos compostos fenólicos por três diferentes tempos (10 minutos, 24 horas e 48 horas) em temperatura ambiente, para, posteriormente, dosagem da atividade xilanolítica à $45 \text{ }^\circ\text{C}$, como descrita no item 4.7. Os reagentes utilizados nesta etapa foram cedidos pelo Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da UNESP, Câmpus de São de José do Rio Preto, sob responsabilidade do professor Dr. Roberto da Silva e professora Dr^a Eleni Gomes.

4.12 PURIFICAÇÃO

A purificação parcial, da enzima de interesse, seguiu protocolos de concentração enzimática e processos cromatográficos em colunas com matriz para troca iônica e filtração em gel. As etapas adotadas seguem os Itens 4.12.1 à 4.12.5.

O extrato enzimático obtido, conforme descrito no Item 4.2.2, nas condições ótimas para produção da xilanase, foi concentrado por liofilização, e fracionado por cromatografias em sistema Äkta Purifier (GE Healthcare Life Science). As colunas de massa molecular ("Sephacryl S-100™" e Sepharose G-50) e troca iônica aniônica "Q-Sepharose Fast Flow" e catiônica "HiTrap SP Fast Flow" foram utilizadas. As frações foram coletadas em sistema fracionado seguidas de análise de proteína e atividade xilanolítica. O perfil protéico das bandas foi analisado em SDS-PAGE.

4.12.1 Etapa da Concentração

Após a obtenção da solução enzimática bruta, foram realizados testes para concentração da xilanase com sulfato de amônio, liofilização e *speed vacuum*. A técnica adotada foi a liofilização, com um volume aproximadamente de 25 mL da solução enzimática bruta, foi concentrado em vários tubos falcons de 50 mL. O liofilizado foi ressuspenso posteriormente em diferentes tampões e utilizados nas cromatografias.

4.12.2 Protocolo para cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-100)

A solução enzimática foi concentrada por liofilização e ressuspendida em 2,5 mL de tampão acetato 20 mmol L⁻¹ pH 5,0. Em seguida foi submetida à cromatografia de filtração em gel, utilizando uma coluna "Sephacryl S-100" conectada em Sistema Akta Purific, previamente equilibrada com tampão acetato 20 mmol L⁻¹ e pH 5,0; 0,2 mol L⁻¹ de NaCl. Foi aplicada na coluna 2 mL de amostra filtrada e esta foi eluída a uma vazão de 0,7 mL min⁻¹, utilizando como aluente o tampão de equilíbrio. Foram coletadas frações de 1,5 mL, à partir do V₀ da coluna (150 mL). Nos picos de proteínas, identificados por absorbância λ 280 nm, a atividade xilanolítica foi determinada à 45 °C, como descrito no Item 4.7. As frações

com atividade foram unidas e concentradas por liofilização e aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

4.12.2.1 Determinação do ponto isoelétrico da amostra do extrato bruto

O ponto isoelétrico das xilanases presentes no extrato foi estimado por focalização isoelétrica em gel de agarose, em um sistema de eletroforese horizontal BIO-RAD. Para preparo do gel, no suporte de eletroforese de 10 x 6,25 cm, 0,22 g de agarose, foram dissolvidos em 13,2 mL de água destilada e a solução foi aquecida em banho Maria a 50 °C até completa diluição do ágar. Na sequência, acrescentou-se 1,6 mL de anfólitos (Fluka BioChemika®) (faixa de pH de 3 a 10), e verteu-se a solução no suporte para solidificação do gel. A corrida ocorreu com as soluções de H_3PO_4 à 1 mol L^{-1} (solução anódica) e NaOH à 1 mol L^{-1} (solução catódica), em contato com as extremidades do gel através de dois pedaços de papel filtro, um para cada polo. Foi feita uma pré-focalização para a organização dos anfólitos e criação do gradiente de pH no gel, a qual ocorreu por 15 minutos a 5 mA. Posteriormente, a amostra de extrato enzimático bruto foi aplicada em uma única canaleta longa feita no centro do gel. Após a aplicação da amostra ajustou-se a corrente para 8 mA e a corrida decorreu por 40 minutos. Ao fim da corrida, o gel foi recortado em tiras de aproximadamente 1 cm e cada tira foi misturada com 2 mL de água destilada em tubos Falcon de 15 mL, sendo submetidas a dosagem da atividade enzimática. Para o tubo, no qual foi encontrada atividade enzimática, foi medido o pH, sendo este estimado como o pI das xilanases presentes no extrato enzimático bruto.

4.12.3 Protocolo para cromatografia de troca iônica HiTrap SP XL

A etapa de purificação foi processada em sistema Äkta Purifier (GE Healthcare Life Science), sendo realizada por cromatografia de troca catiônica, em coluna HiTrap SP XL (Fast Flow) de 1 mL. Cerca de 2 mL de solução enzimática bruta liofilizada, ressuspensa em tampão citrato a 20 mmol L^{-1} , pH de 3,5 e filtrada, foi injetada na coluna com auxílio de uma seringa, através do "loop" 1 mL. O tampão de equilíbrio, e carregamento utilizado, foi citrato à 20 mmol L^{-1} e pH de 3,5, definido

após a estimativa do ponto isoelétrico. Após o carregamento, a proteína foi eluída com gradiente de cloreto de sódio à $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ no mesmo tampão, com fluxo de 1 mL/minuto . As amostras eluídas foram coletadas em volume final de $1,5 \text{ mL}$, usando detector de UV a 280 nm . Nos picos de proteínas, identificados por absorvância $\lambda 280 \text{ nm}$, a atividade xilanolítica foi determinada à $45 \text{ }^\circ\text{C}$, como descrita no Item 4.7. As frações com atividade xilanolítica, foram unidas e concentradas com ácido tricloroacético (TCA) e submetidas à eletroforese em SDS-PAGE à 10%.

4.12.3.1 Precipitação por Ácido tricloroacético

A precipitação da xilanase parcialmente purificada por ácido tricloroacético (TCA) a 10%, seguiu o seguinte protocolo: em "eppendorf", foram acondicionados $750 \mu\text{l}$ da amostra mais $250 \mu\text{l}$ de TCA (10%), que permaneceram em banho de gelo por 10 minutos, após esse período, o eppendorf foi centrifugado a 13.500 rpm em $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, no precipitado foi adicionado $400 \mu\text{l}$ de acetona gelada e, posteriormente, o eppendorf com precipitado foi agitado e novamente centrifugado a 13.500 rpm a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos. A etapa de retirada do TCA pela acetona foi repetido por 3 vezes, para a total evaporação da acetona, o precipitado foi deixado por 5 minutos em banho fervente.

4.12.4 Protocolo cromatografia de filtração em gel (Sephrose G-50)

A solução enzimática bruta, concentrada por liofilização, foi ressuspendida em $2,5 \text{ mL}$ de tampão de corrida citrato à 20 mmol L^{-1} , pH de 3,5 contendo $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, e aplicada em coluna de exclusão molecular "Sephrose G-50", acoplada em sistema Äkta Purifier (GE Healthcare Life Science). Após o equilíbrio, com 3 volumes de coluna de tampão corrida, aproximadamente, 2 mL de amostra foram injetados na coluna e eluída num fluxo $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$. Foram coletadas frações de 1 mL , a partir do volume morto (V_0) da coluna de 32 mL . Nos picos de proteínas, identificados por absorvância $\lambda=280 \text{ nm}$, a atividade xilanolítica foi determinada à $45 \text{ }^\circ\text{C}$, como descrita no Item 4.7. As frações com atividade foram unidas e concentradas com ácido tricloroacético (TCA) e o grau de pureza analisado em eletroforese SDS-PAGE 10%.

4.12.5 Protocolo para cromatografia de troca iônica Q-sepharose® Fast Flow

A etapa de purificação foi processada em sistema Äkta Purifier (GE Healthcare Life Science). Essa etapa foi realizada por cromatografia de troca aniônica, contendo 1 mL resina Q-sepharose® Fast Flow (Sigma-Aldrich). Aproximadamente, 2 mL de amostra ressuspendida em tampão de corrida Tris HCl à 20 mmol L⁻¹, pH de 8,5 e filtrada, foram injetados na coluna. Após equilibrar a coluna com 10 mL do tampão de corrida Tris, a amostra foi aplicada na cromatografia. Passado o carregamento da amostra, foi iniciado o gradiente linear de 0 até 100% de 0,3 mol L⁻¹ de NaCl no mesmo tampão, em um fluxo de 0,5 mL por minuto. As amostras eluídas foram coletadas em volume de 1 mL, usando detector de UV $\lambda=280$ nm. Nas frações correspondentes aos picos de proteína, visualizados no cromatograma, foi avaliada a atividade xilanolítica à 45 °C, como descrita Item 4.7. As alíquotas com atividade foram liofilizadas e o grau de pureza analisado em eletroforese SDS-PAGE 10%.

4.13 ANÁLISES ELETROFORÉTICAS

4.13.1 Gel poliacrilamida SDS-PAGE

O perfil de proteínas foi analisado por eletroforese desnaturante, em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), como descrito por Laemmli (1970). O gel de corrida foi preparado em concentrações de 10% e o gel de empilhamento à 5%. O tampão de corrida utilizado foi Tris-Glicina com pH de 8,3. Na preparação da amostra, utilizou-se a proporção de 2:1 (v/v) de solução enzimática mais tampão de amostra contendo azul de bromofenol à 0,1%, glicerol à 20% e SDS à 10%, para serem aplicadas nos poços do gel. Como método de coloração do gel adotou-se nitrato de prata. Utilizou-se 3 μ L da mistura dos marcadores de massa molecular *Low range* 6,5- 200,0 kDa (Sigma-Aldrich).

4.13.2 Zimograma

Para o zimograma, utilizou-se o protocolo estabelecido por Polizeli et al. (2012), porém, foram adicionadas algumas modificações de acordo com Liao et al.

(2012). Após a corrida, o gel permaneceu por 30 minutos em 1% (v/v) de Triton X-100 para remoção do SDS e eventual renaturação protéica, sendo, posteriormente, incubado em tampão acetato a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH de 5,5. Depois de 15 minutos, trocou-se a solução por um tampão acetato à $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH de 5,5 enriquecido com 1% do substrato xilana "*Beechwood*", permanecendo a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por mais 30 minutos. A coloração foi feita em temperatura ambiente, com 0,1% de vermelho Congo durante 1 hora e a descoloração foi feita com NaCl a 1 mol L^{-1} , até o surgimento de bandas claras. Para dar o efeito de contraste ao gel, e possibilitar melhor visualização, acrescentaram-se gotas de HCl a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

4.14 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA XILANASE BRUTA E DA PARCIALMENTE PURIFICADA

A xilanase bruta produzida nas melhores condições de cultivo e a mesma purificada parcialmente pela cromatografia de troca aniônica com Q-Sepharose FF, foram utilizadas para caracterização físico-química.

4.14.1 Efeito da temperatura na atividade enzimática da xilanase bruta e parcialmente purificada

O efeito da temperatura, sobre a atividade das xilanasas, foi analisado nas mesmas condições descritas no item 4.7, variando a temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ à $75 \text{ }^\circ\text{C}$. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata. A maior atividade de xilanase encontrada, nas diferentes temperaturas testadas foi utilizada como controle e sua atividade relativa foi medida como 100%.

4.14.2 Efeito do pH na atividade enzimática da xilanase bruta e parcialmente purificada

A determinação do pH ótimo, para as xilanasas, seguiu as mesmas condições descritas no item 4.7, em diferentes valores de pH. A reação foi realizada na temperatura ótima previamente encontrada por 10 minutos, descrita no item 4.14.1. Tampões a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram utilizados para a xilanase bruta e parcialmente

purificado, sendo eles: Mcllvaine (pH 3,0-8,0) e tampão glicina-NaOH (pH 8,0-11). A maior atividade obtida no pH ótimo foi utilizada como controle e sua atividade relativa foi medida como 100%.

Mcllvaine (pH 3,0-8,0) e tampão glicina-NaOH (pH 8,0-11).

4.14.3 Estabilidade térmica da xilanase bruta e parcialmente purificada

A xilanase bruta e a parcialmente purificada foram incubadas, variando a temperatura de 30 °C a 75 °C, por 60 minutos, na ausência de substrato, em banho maria. Posteriormente, as amostras foram colocadas em banho de gelo, para determinação da atividade da xilanase, nas mesmas condições descritas no item 4.7, mantendo as condições ótimas de temperatura e pH descritos nos Itens 4.14.1 e 4.14.2. A maior atividade obtida na análise de estabilidade de temperatura foi utilizada como controle e sua atividade relativa foi medida como 100%.

4.14.4 Estabilidade em relação ao pH das xilanases brutas e parcialmente purificada

Para determinar a estabilidade da xilanase em relação ao pH, a xilanase bruta e a parcialmente purificada foram diluídas, incubando as amostras em tampões com diferentes valores de pH, na proporção de 1:1 (v/v) na ausência de substrato. O tratamento foi realizado por 24 horas à temperatura ambiente. A atividade enzimática residual, após o tratamento, foi medida como descrito no item 4.7, mantendo-se as condições ótimas de temperatura e pH. A maior atividade obtida no estabilidade de pH foi utilizada como controle e sua atividade relativa foi medida como 100%.

4.15 EFEITO DE SAIS E REAGENTES SOBRE A ATIVIDADE XILANOLÍTICA BRUTA E PARCIALMENTE PURIFICADA PELA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA Q-SEPHAROSE FAST FLOW.

Para realização de uma análise confiável do efeito de íons e outras substâncias químicas na atividade enzimática (inibidores e ativadores) é necessário

efetuar a retirada de contaminantes e sais do extrato bruto e no parcialmente purificado. Assim sendo, as amostras foram submetidas a uma resina de troca iônica mista (Mixed Bed Resin), que retém cátions e ânions. A seguir em "ependorfs" a amostra bruta e parcialmente purificada, foram incubadas por uma hora em temperatura ambiente com diferentes soluções contendo sais e reagentes nas concentrações finais de 5 mmol L^{-1} e 10 mmol L^{-1} . Posteriormente, as amostras foram testadas quanto à sua atividade xilanolítica. Os sais utilizados foram: CuSO_4 , NaCl , FeSO_4 , CoCl_2 , CaCl_2 , HgCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , MnSO_4 , NH_4Cl , MgSO_4 , ZnSO_4 , AgNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Os reagentes eram: EDTA, DTT, Triton e SDS. Para determinação da atividade enzimática à $45 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH de 5,5, seguiu-se o protocolo descrito no Item 4.7. Alguns dos reagentes utilizados nesta análise foram cedidos pelo Laboratório de Bioquímica de proteínas, coordenado pelo professor Drº Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez.

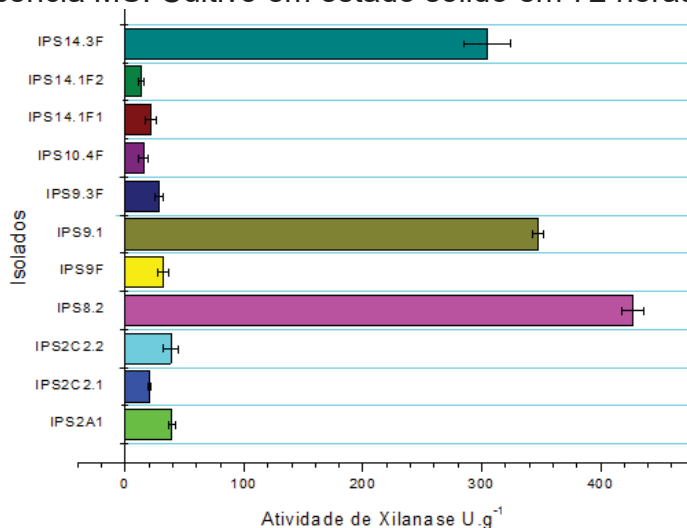
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE XILANASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

Em estudo anterior foram isolados 20 fungos filamentosos, com crescimento à 30 °C, a partir de amostras de solo e serrapilheira (SENNÁ, 2014). Desses, onze foram reativados, e testados quanto ao potencial de produção de xilanases. Os isolados foram cultivados inicialmente em farelo de trigo. Este substrato tem sido excelente meio para o crescimento de fungos e para a produção de xilanases, em função do seu elevado teor de nutrientes e polissacarídeos, que fornecem suporte para o crescimento fúngico e possuem uma grande área de superfície, resultando num aumento da transferência de oxigênio ao fungo (HAQUE et al., 2002; BETINI et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2013; MERALI et al., 2015).

A Figura 13 apresenta os diferentes isolados fúngicos em estudo, e suas diferenças quanto ao potencial de produção de xilanases.

Figura 13 - Atividades xilanase de fungos isolados em áreas de Cerrado, no município de Inocência MS. Cultivo em estado sólido em 72 horas, à 30 °C.



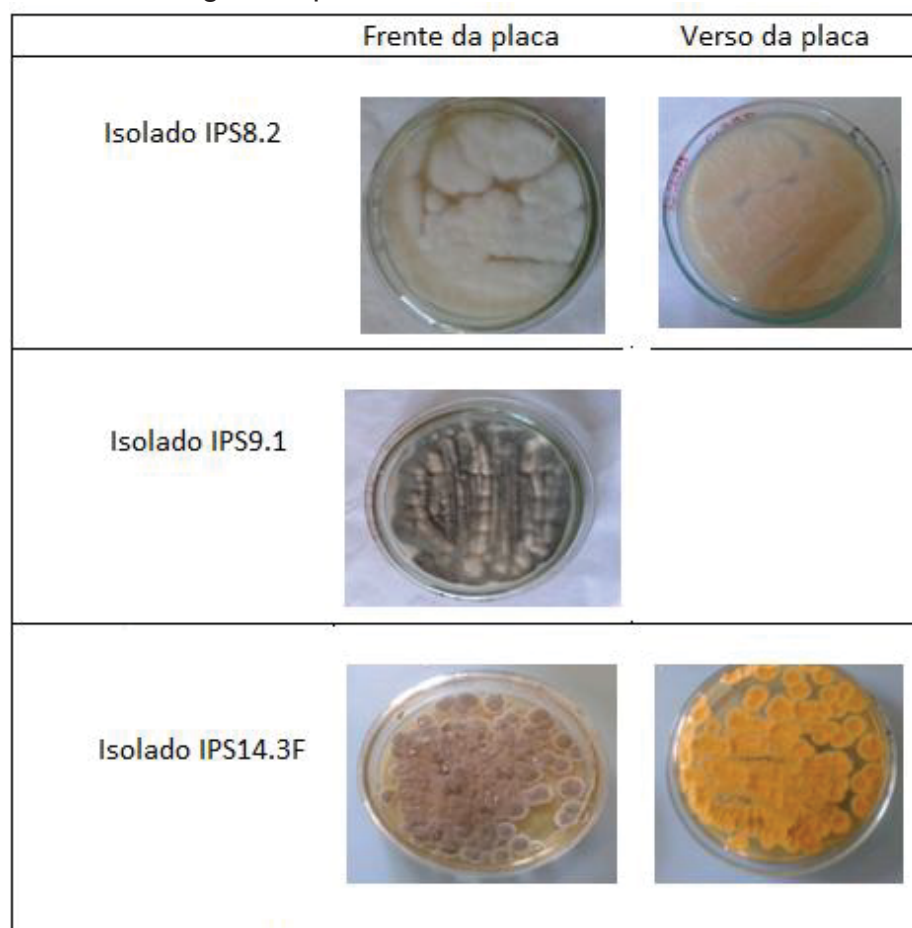
Fonte: Dados do próprio autor.

Quantitativamente, os diferentes valores para atividade de xilanase encontrados podem não refletir as diferenças reais entre o nível de enzima produzido, pois a preferência do substrato é um fator relevante (BEDFORD, 1997; KNOB et al., 2014). Nas condições testadas, as melhores atividades foram obtidas

pelos isolados IPS8.2, IPS9.1 e IPS14.3F, com atividade respectivamente de 427,3 U.g⁻¹ (42,7 U mL⁻¹), 347,6 U.g⁻¹ (34,76 U mL⁻¹) e 305 U.g⁻¹ (30,5 U mL⁻¹).

A Figura 14 mostra o crescimento característico de cada um dos isolados que obtiveram elevada produção de xilanase em meio Ágar Dextrose Sabouraud.

Figura 14 - Isolados fúngicos a partir de solo de Cerrado.



Fonte: Dados do próprio autor.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO

Com o intuito de obter mais informações sobre o isolado de maior interesse, foi realizada identificação molecular desse fungo. Para tanto, o DNA total do isolado foi extraído a partir do micélio, cultivado em meio líquido BD (batata-dextrose, Himedia, Mumbai, MA, Índia), e analisado, quanto à sua integridade, em gel de agarose 1%, corado com Nancy 520 (Figura 15). As linhas 03 e 17 correspondem ao DNA da espécie selecionada IPS8.2, diluído e puro, respectivamente.

Figura 15 - Análise eletroforética em gel de agarose 1% do DNA total extraído de alguns isolados, as linhas 03 e 17 correspondem ao DNA do isolado IPS 8.2.



Fonte: Dados do próprio autor.

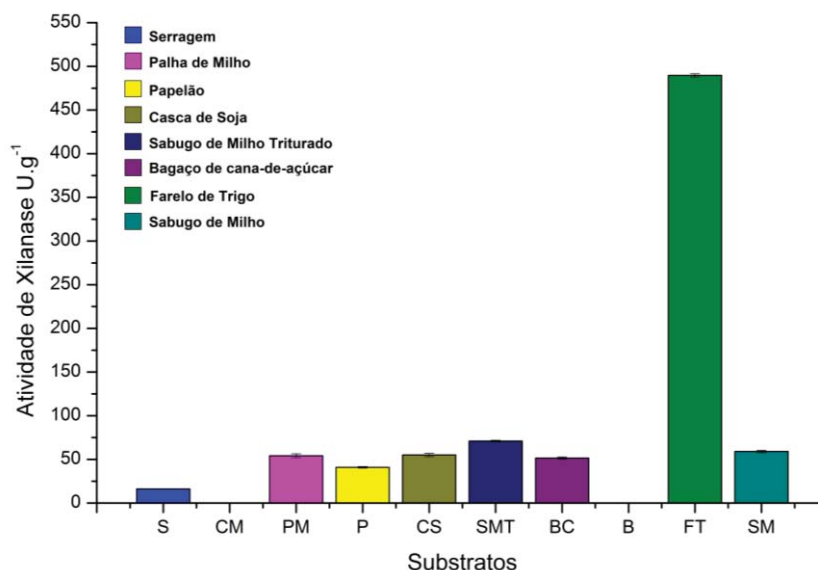
Tendo o ácido Desoxirribonucleico (DNA) total como molde, foi realizada uma reação de PCR para a amplificação das regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossomal da espécie selecionada, utilizando os iniciadores ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC).

O sequenciamento da região ITS separa os genes 18S e 28S do rDNA, os quais podem ser amplificados com primers específicos ancorados nessas duas regiões. Essa região é altamente conservada, intraespecificamente, mas variável entre diferentes espécies, o que possibilita a distinção ao nível específico (FUNGARO, 2000).

Para o isolado IPS8.2 foi obtida uma sequência de 655 nucleotídeos, a qual foi analisada pela ferramenta Blast, disponível no GenBank, a qual apresentou identidade de 99% com *Gongronella butleri*, isolado CFR-VS04 com número de acesso KM083049.1. A Figura 16 ilustra o alinhamento entre as sequências disponíveis no Genbank e a do isolado IPS8.2. A sequência parcial do isolado IPS8.2 foi submetida ao banco de dados com número de acesso KU686888.

Com a análise dos produtos de amplificação, por meio de sequenciamento do DNA e posterior análise das sequências obtidas, foi possível fazer uma classificação para o isolado IPS8.2, que passou a ser denominado *Gongronella butleri* IPS8.2.

Figura 17 - Efeito da fonte de carbono na produção de xilanase por *Gongronella butleri* IPS8.2 sob cultivo em estado sólido em 72 horas, à 30°C.

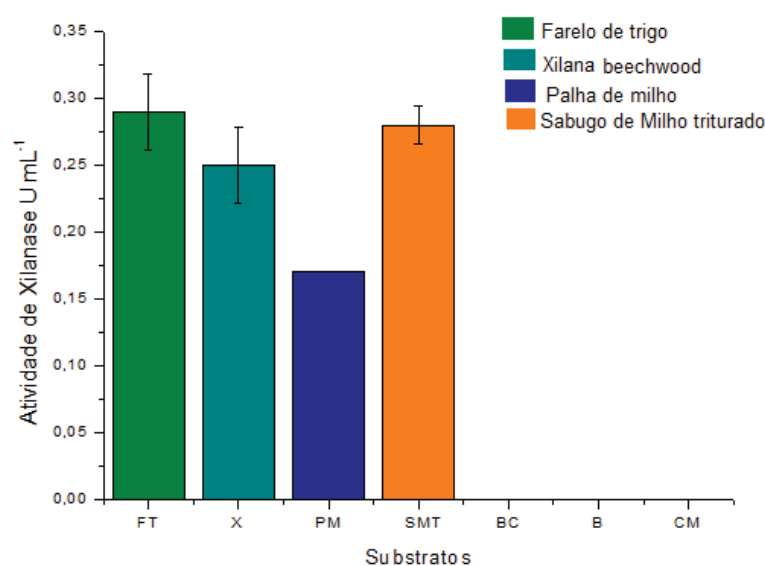


Nota: S:Serragem, CM:Casca de Maracujá, PM:Palha de Milho, P:Papelão, CS:Casca de soja, SMT:Sabugo de Milho triturado, BC:Bagaço de cana-de-açúcar, B:Braquiaria, FT:Farelo de trigo, SM:Sabugo de Milho.

Fonte: Dados do próprio autor.

Foi possível observar que os melhores substratos para produção desta enzima foram, respectivamente, farelo de trigo ($489,6 \text{ U.g}^{-1}$ ou $48,9 \text{ U mL}^{-1}$) e sabugo de milho triturado ($71,05 \text{ U.g}^{-1}$ ou $7,16 \text{ U mL}^{-1}$). A produção foi muito baixa com a serragem ($16,25 \text{ U.g}^{-1}$ ou $1,62 \text{ U mL}^{-1}$) e inexistente para a casca de maracujá e braquiária. Já no cultivo submerso, os resultados foram inferiores aos obtidos em cultivo em estado sólido, sendo as maiores atividades obtidas quando cultivado em farelo de trigo ($0,29 \text{ U mL}^{-1}$) e sabugo de milho triturado ($0,28 \text{ U mL}^{-1}$), respectivamente (Figura 18). Pode-se verificar que não houve produção de xilanases utilizando casca de maracujá, braquiária e bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 18 - Efeito da fonte de carbono na produção de xilanase para *Gongronella butleri* IPS8.2 sob cultivo em estado submerso à 30 °C em 72 horas de cultivo.



Fonte: Dados do próprio autor.

A utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono na produção de xilanase, foi relatada para vários fungos (MORETTI et al., 2012; KAUSHIK; MISHRA; MALIK, 2014; IZIDORO; KNOB, 2014; IRFAN; NADEEM; SYED, 2014; ELEGBEDE; LATEEF, 2017; SILVA et al., 2018; TERRONE et al., 2018). No presente estudo, o isolado *Gongronella butleri* IPS8.2 apresentou uma maior produção de xilanase em farelo de trigo. O mesmo substrato foi um bom indutor para a produção de xilanase para outros microrganismos tais como *Aspergillus brasiliensis* (HO; LAU, 2014), *Colletotrichum graminicola* (ZIMBARDI et al., 2013), *Trichoderma reesei* (KAR et al., 2013), *Fusarium heterosporum* (HEINEN et al., 2014), *Aspergillus niger* (SULEMAN et al., 2016). ROY et al (2013) relatou um menor nível de atividade de xilanase ($3,93 \text{ U mL}^{-1}$) para *Simplicillium obclavatum* MTCC 9604, após 168 horas de cultivo em estado sólido com farelo de trigo, e neste mesmo substrato Suleman et al. (2016) verificaram a maior atividade de xilanase por *Aspergillus niger* ($80,04 \text{ U mL}^{-1}$). *Trichoderma viride* produziu uma maior quantidade de xilanase ao ser cultivado sob estado submerso em farelo de trigo ($29,39 \text{ U mL}^{-1}$) e casca de maracujá ($11,08 \text{ U mL}^{-1}$) (FORTKAMP; KNOB, 2014). Com este mesmo tipo de cultivo, Guimarães et al. (2013) verificaram uma melhor produção de xilanase para *Aspergillus niger* em farelo de trigo ($8,42 \text{ U mL}^{-1}$), xilana ($7,27 \text{ U mL}^{-1}$), sabugo

de milho ($8,00 \text{ U mL}^{-1}$) e bagaço de cana-de-açúcar ($5,49 \text{ U mL}^{-1}$). *Gongronella butleri* IPS8.2, sob cultivo submerso, revelou uma menor de atividade de xilanase quando comparado ao cultivo em estado sólido, estes resultados estão de acordo com os encontrados por Nair et al. (2008), Amaro-Reyes et al. (2011) e Menezes, Rossi e Ayub (2017).

O cultivo em estado sólido é frequentemente indicado para fungos filamentosos, pois permite a eles uma colonização eficiente dos substratos e das regiões porosas entre as partículas (MENEZES; ROSSI; AYUB, 2017).

Visto que, o farelo de trigo foi o melhor substrato indutor para xilanases, o mesmo foi adotado para todos os experimentos seguintes, com o cultivo em estado sólido. Numa segunda etapa do projeto, foi realizada a otimização da solução salina, para produção da xilanase.

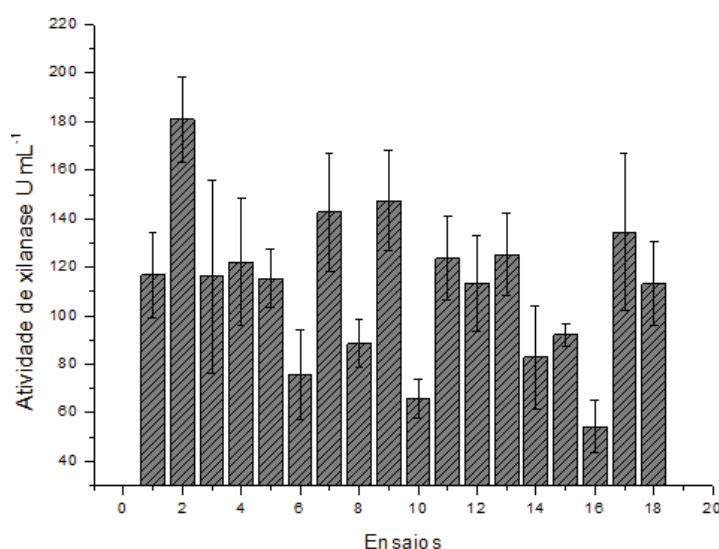
5.4 OTIMIZAÇÃO DA SOLUÇÃO SALINA DO MEIO CULTIVO SÓLIDO

Nesse trabalho, inicialmente, foi proposto um planejamento experimental da solução salina utilizada no meio de cultivo como descrito no item 4.4.1. Os resultados completos das análises do planejamento fatorial 2^4 com dois ensaios no ponto central são apresentados a seguir.

Cada um dos ensaios do planejamento fatorial foi realizado em triplicata e dessa forma, consideraram-se as médias dos resultados obtidos dessas repetições.

Na Figura 19, e na Tabela 7, são apresentados os resultados iniciais das atividades de xilanase para os ensaios analisados pelo planejamento fatorial 2^4 com dois pontos centrais, para a concentração da solução salina utilizada no cultivo fúngico. Observa-se que as três maiores atividades enzimáticas ocorreram nos segundo, sétimo e nono ensaios. O segundo ensaio apresentou o valor máximo para variável $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e os mínimos para KH_2PO_4 , CaCl_2 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O nono ensaio apresentou valores de máximo para variável $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e mínimos para demais componentes analisados. Os resultados obtidos até essa etapa indicam que não são todos os sais, até aqui estudados, que possuem significância na atividade enzimática da xilanase, no entanto, a presença deles pode ter efeito positivo ou negativo para a produção xilanólítica, dependendo da concentração.

Figura 19 - Produção de xilanase em cultivo sólido, dados referente ao planejamento fatorial 2^4 com dois ensaios no ponto central.



Fonte: Dados do próprio autor.

Tabela 7 - Produção de xilanase em cultivo sólido, dados referente ao planejamento fatorial 2^4 com dois ensaios no ponto central.

	Níveis Codificados				Níveis Não-Codificados				Atividade de Xilanase (U.mL ⁻¹)	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂	MgSO ₄ .7H ₂ O	Média	Desvio
1	-	-	-	-	0,1	0,05	0	0	116,82	17,63
2	+	-	-	-	0,2	0,05	0	0	180,84	17,29
3	-	+	-	-	0,1	0,15	0	0	116,06	39,59
4	+	+	-	-	0,2	0,15	0	0	122,08	26,11
5	-	-	+	-	0,1	0,05	0,03	0	115,44	12,00
6	+	-	+	-	0,2	0,05	0,03	0	75,55	18,60
7	-	+	+	-	0,1	0,15	0,03	0	142,80	24,25
8	+	+	+	-	0,2	0,15	0,03	0	88,43	9,86
9	-	-	-	+	0,1	0,05	0	0,02	147,30	20,71
10	+	-	-	+	0,2	0,05	0	0,02	65,86	8,11
11	-	+	-	+	0,1	0,15	0	0,02	123,61	17,15
12	+	+	-	+	0,2	0,15	0	0,02	113,42	19,73
13	-	-	+	+	0,1	0,05	0,03	0,02	125,24	16,79
14	+	-	+	+	0,2	0,05	0,03	0,02	82,82	21,27
15	-	+	+	+	0,1	0,15	0,03	0,02	92,01	4,90
16	+	+	+	+	0,2	0,15	0,03	0,02	54,20	10,89
17	0	0	0	0	0,15	0,1	0,015	0,01	134,40	32,53
18	0	0	0	0	0,15	0,1	0,015	0,01	113,25	16,98

Fonte: Dados do próprio autor.

As análises dos efeitos e dos coeficientes de regressão realizados para os fatores principais, e interações entre dois fatores, foram calculadas utilizando todo o conjunto de 54 amostras (três repetições por cultivo em estado sólido com farelo de trigo), baseado na atividade enzimática medida pelo método DNS, proposto por Miller (1959), e empregando o teste t "Student" ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), ou seja, assumindo um nível de confiança de 95%, o valor de t encontrado, para 44 graus de liberdade, foi de 2,02. Foi considerado estatisticamente significativo o efeito cujo valor absoluto excedeu o valor do t tabelado ($t_{44; 0,95} = 2,02$), os fatores principais significantes foram no CaCl_2 (X_3), seguindo-se os $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (X_4) e as interações entre esses três fatores (Tabela 8).

Tabela 8 - Estimativa de efeitos e análise de regressão calculada para o planejamento fatorial 2^4 com dois pontos centrais (simplificada).

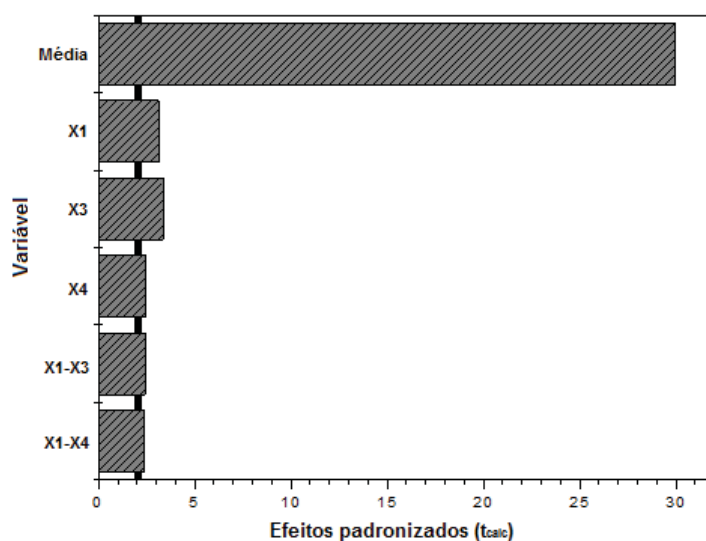
	Coeficiente	Desvio	t-'Student'	p-valor
Média	110,50	3,69	29,96	0,0000
X_1^*	-12,25	3,91	-3,13	0,0031*
X_2	-3,58	3,91	-0,92	0,3651
X_3^*	-13,09	3,91	-3,35	0,0017*
X_4^*	-9,60	3,91	-2,45	0,0183*
X_1-X_2	0,21	3,91	0,05	0,9571
$X_1-X_3^*$	-9,55	3,91	-2,44	0,0188*
$X_1-X_4^*$	-9,23	3,91	-2,36	0,0229*
X_2-X_3	0,88	3,91	0,22	0,8238
X_2-X_4	-1,17	3,91	-0,30	0,7666
X_3-X_4	1,10	3,91	0,28	0,7790

*variáveis significantes; $t(44)$ = teste t "Student"; p = grau de significância

Fonte: Dados do próprio autor.

A Figura 20, gráfico de Pareto, apresenta os valores de t para cada um dos efeitos analisados e confirmando seus resultados, apresentados na Tabela 8.

Figura 20 - Efeitos principais e de interações dos fatores estudados no planejamento fatorial 2^4 com dois ensaios no ponto central, baseado no teste t “Student” para $t_{(44; 0,95)} = 2,15$.



Fonte: Dados do próprio autor.

Aplicando os mesmos critérios, a fim de verificar a significância dos efeitos dos fatores, fez-se a análise de regressão. A partir dos valores dos coeficientes estimados, obteve-se o modelo linear de (2):

$$Y_1 = 110,50 - 12,25 X_1 - 13,09 X_3 - 9,60 X_4 - 9,55 X_1 X_3 - 9,23 X_1 X_4 \quad (2)$$

Sendo:

- Y_1 , valor estimado de xilanase;
- X_1 , fator codificado para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- X_3 , fator codificado para CaCl_2 ;
- X_4 , fator codificado para $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

A Tabela 9 apresenta os resultados da análise de variância para o modelo linear ajustado. A regressão, ajustada pelo modelo, foi considerada estatisticamente significativa por apresentar o valor de f igual a 4, maior que o valor tabelado de f , para 95% de confiança ($f_{0,95;10;43} = 2,08$), podendo afirmar que a quantidade de variação devida ao modelo foi maior que a variação não explicada dentro do espectro abrangido pelo mesmo.

Tabela 9 - Análise de variância, para o ajuste do modelo linear aos resultados do planejamento fatorial 2^4 com dois ensaios no ponto central.

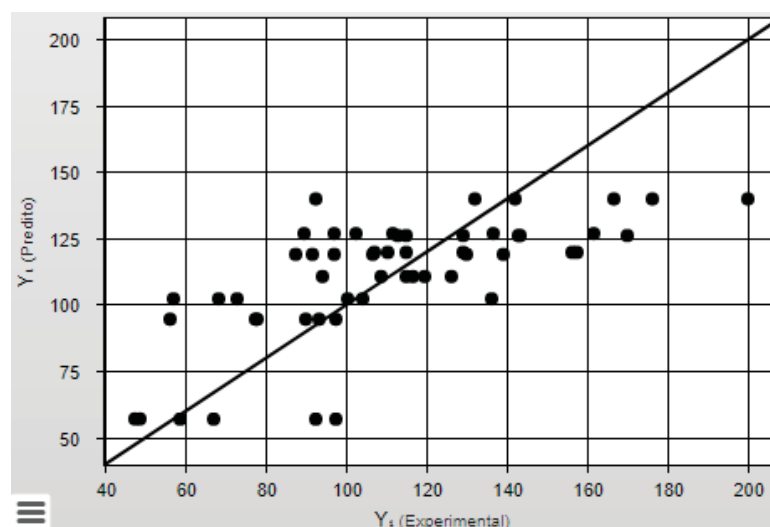
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	Fcalc
Regressão	29107,2	10	2910,7	4
Resíduos	31577,5	43	734,4	
Total	60684,7	53		

$R^2=47,96\%$

Fonte: Dados do próprio autor.

Porém, comparando-se os valores obtidos nos ensaios com os preditos pelo modelo, é notável que alguns dos dados observados encontram-se bastante dispersos do modelo linear, Figura 21.

Figura 21 - Distribuição dos valores observados e dos valores preditos pelo modelo linear com base no planejamento fatorial 2^4 com quatro ensaios no ponto central.



$R^2=47,96\%$

Fonte: Dados do próprio autor.

O modelo linear, ajustado pelos resultados do planejamento fatorial 2^4 , com dois ensaios no ponto central, mostrou-se parcialmente satisfatório, uma vez que o valor de R^2 foi de 47,96%. Que implica uma correspondência de 47,96% da resposta sendo explicada pelo modelo linear.

A partir dos resultados pode-se levantar algumas hipóteses:

- Uma das repetições do experimento pode ter deixado a aproximação linear falha, em decorrência de alguma alteração do próprio metabolismo do fungo, quanto a sua produção da enzima em estudo;
- Vários parâmetros podem influenciar o cultivo em estado sólido, tais como, a dificuldade de remoção do calor metabólico gerado pelo crescimento do fungo, a formação de gradientes de temperatura e concentração de metabólitos. Parâmetros que podem ter variado a cada experimento;
- Em virtude da distribuição dos dados experimentais no gráfico da figura 23, é visível que, qualquer modelo de regressão linear pretendida não proporcionaria uma correspondência muito alta com os pontos.

Para confirmar, ou descartar, qualquer uma das hipóteses levantadas, para ensaios futuros seria necessário uma repetição de análises, a fim de elucidar uma melhor fidelidade de respostas da produção xilanolítica do fungo em estudo ou, alternativamente, realizar o inóculo com contagem de esporos, ao invés de discos.

A região ótima de produção da enzima não foi alcançada, partindo dos resultados foi realizado um novo deslocamento na direção de máxima inclinação ascendente para estabelecer uma nova região de estudo e um novo ponto central. Em termos algébricos, a trajetória de máxima inclinação ascendente (“steepest ascent”) pode ser determinada a partir dos coeficientes de regressão do modelo ajustado, partindo-se do ponto central.

Em função da concentração de KH_2PO_4 , na fase anterior, ser a variável de menor influência nas respostas estudadas, manteve-se sua não aplicabilidade no modelo.

Os fatores estudados foram representados por X_1 (NH_4SO_4), X_3 (CaCl_2), X_4 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e seus valores originais, para os pontos de máxima inclinação ascendente, foram determinados segundo as equações abaixo:

$$X_1 = (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 0,15 / 0,05$$

$$X_3 = \text{CaCl}_2 - 0,015 / 0,015$$

$$X_4 = \text{MgSO}_4 - 0,01 / 0,01$$

Aplicando-se os valores codificados às equações acima, foram obtidos os valores originais para cada um dos fatores, os quais estão dispostos na Tabela 10 junto com os valores para a atividade enzimática nesta fase. Também foi realizado um controle com somente água destilada, amostra 22.

Tabela 10 - Matriz com os pontos em direção a máxima inclinação ascendente "steepest ascent".

Ensaio	Fator codificado			Fator original (g/l)			Atividade de Xilanase (U.mL ⁻¹)
	X ₁	X ₃	X ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	CaCl ₂	MgSO ₄	
19	0,94	1	0,73	0,1032	0,0000	0,0027	55,24±3,76 ^a
20	1,82	2	1,46	0,0564	-0,0150	-0,0047	51,08±1,08 ^a
21	2,82	3	2,19	0,0096	-0,0300	-0,0120	55,67±1,43 ^a
Controle	-	-	-	-	-	-	55,24±8,84 ^a

Nota: As letras acima das colunas são característica da saída de resultados do SISVAR. A ocorrência de duas letras diferentes indica que houve variância significativa (P<0,05) nos ensaios.

Fonte: Dados do próprio autor.

Nota-se, pelo ensaio 21 que a solução adotada favoreceu a produção da xilanase (Tabela 10), com concentração de NH₄2SO₄ de 0,0096 g/L, ainda podemos notar uma variação menor dos desvios nas repetições do ensaio 21, em relação ao ensaio inicial. Com as atividades da xilanase obtidas pela análise do "steepest ascent", também foi realizada uma análise de variância (ANOVA), a qual comprovou estatisticamente que não houve diferença significativa, entre as diferentes soluções salinas utilizadas e o cultivo controle com somente água destilada, sendo assim, a técnica de cultivo em estado sólido com água destilada foi adotada para etapas seguintes deste estudo. Esse resultado foi interessante e permitiu diminuir custos no processo de CES.

Os resultados encontrados nessa etapa foram importantes, pois foi possível verificar que houve um aumento na produção da xilanase, quando comparados aos ensaios preliminares. Na literatura, foram encontrados diversos trabalhos utilizando o cultivo em estado sólido e/ou submerso, com variados parâmetros otimizados. Todos esses utilizaram o esporo em suspensão como forma de inóculo (GAFFNEY; DOYLE; MURPHY, 2009; IRFAN; NADEEM; SYED, 2014; ZHANG; SANG, 2015; AJIJOLAKEWU et al., 2017).

Cunha et al. (2018) analisaram as variáveis pH, temperatura e agitação. A análise estatística dos resultados mostrou que a interação do pH e da temperatura, influenciaram a produção de xilanase, com o melhor nível de $13,98 \text{ U mL}^{-1}$, ocorrendo no cultivo submerso por 168 horas, pH 7,0, à $28 \text{ }^\circ\text{C}$ e 120 rpm, para o fungo *Aspergillus foetidus*, utilizando o resíduo de soja como substrato, resultado inferior ao encontrado no presente estudo. No entanto, Saha e Ghosh (2014) descreveram resultados superiores na otimização da xilanase produzida por *Penicillium citrinum*, as três variáveis otimizadas foram a concentração de farelo de trigo, pH do meio e temperatura. As interações entre essas variáveis contribuíram para o aumento significativo da produção de xilanase, de 1.853 U mL^{-1} para 2.834 U mL^{-1} .

5.5 INFLUÊNCIA DA UMIDADE NA PRODUÇÃO DA XILANASE

A fim de verificar a condição ideal de umidade foram realizados testes com 2,5, 5 e 10 mL de água destilada. Os resultados obtidos na determinação da atividade xilanolítica, nas diferentes condições de cultivo, são apresentados na Tabela 11. O objetivo dessa etapa foi encontrar a umidade, dentre as testadas, que proporcionasse uma melhor produção de xilanase pelo microrganismo selecionado.

Tabela 11 - Umidades, atividade da xilanase e proteína para espécie *Gongronella butleri* IPS8.2, sob cultivo em estado sólido em diferentes umidades, à 30°C .

Volume Solução salina	Umidade	Atividade Xilanase		Proteína	Atividade específica
		(U mL⁻¹)	(U.g⁻¹)	(mg mL⁻¹)	(U mg⁻¹)
2,5	41,09%	38,46 ±1,5	384,6	1,40	27,47
5,0	54,62%	46,11± 2,0	461,1	1,59	29,00
10,0	70,19%	57,58±1,4	575,8	1,7	33,87

Fonte: Dados do próprio autor.

Os resultados mostram que a umidade inicial do substrato em 70% foi a melhor dentre as condições testadas, favorecendo *Gongronella butleri* IPS8.2 a produzir uma maior quantidade da enzima em estudo. O pico de produção da xilanase com 70% de umidade também foi observada para

Trichoderma reesei RUTC-30, no meio farelo de trigo (1.021,7 UI g⁻¹ substrato) (ALMEIDA, 2012). A umidade inicial exerce influência sobre o crescimento dos microrganismos, sendo que, a umidade ótima depende da característica do substrato utilizado e das exigências dos microrganismos. No cultivo em estado sólido, tal parâmetro pode variar de 18 a 85%. O aumento excessivo da umidade também é uma condição adversa, pois os materiais sólidos, usados em cultivo sólido, tendem a aumentar o volume com o aumento da umidade, diminuindo o volume dos poros e dificultando as trocas gasosas. Em situações extremas os poros são ocupados por água, prejudicando o desenvolvimento do fungo, devido à diminuição da oxigenação (OLIVEIRA-JUNIOR, 2014).

5.6 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DA XILANASE

A espécie *Gongronella butleri* IPS8.2, foi analisada quanto ao perfil de produção de xilanase, ao longo do tempo de cultivo sólido, no substrato que havia apresentado um maior potencial de produção xilanolítica. Segundo Sooch e Kauldhar (2013), vários fatores influenciam a produção máxima enzimática, tais como fontes de carbono, fontes de nitrogênio, elementos traços, pH, condições de agitação/estacionárias, temperatura e tempo de incubação. Para que um processo biotecnológico seja viável economicamente, este último fator deve ser estudado.

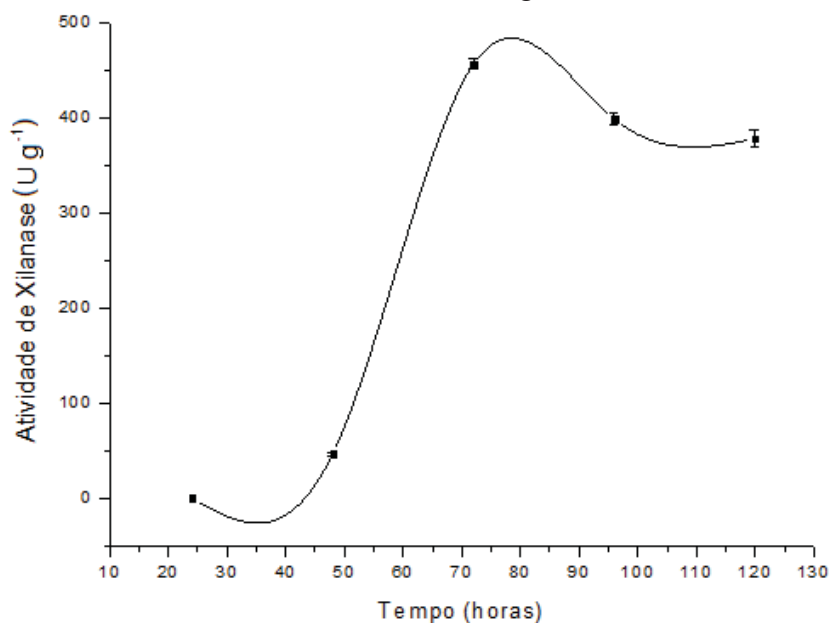
A cada 24 horas amostras, em triplicata, foram retiradas e os resultados obtidos, para a atividade xilanolítica, encontram-se apresentados na Figura 22. A produção de xilanase, por *Gongronella butleri* IPS8.2, alcançou sua melhor produção em 72 horas de cultivo, 456,2 U g⁻¹ (45,62 U mL⁻¹). Após esse período houve uma redução na atividade xilanolítica.

Resultados semelhantes aos encontrados por Ahmad et al. (2009) para a produção de xilanase pela espécie *Aspergillus niger*, utilizando o mesmo substrato e temperatura em estudo. Suleman et al. (2016), observou o pico de produção de xilanase (46,7 U mL⁻¹), em 72 horas de cultivo, à 35 °C, também para espécie *Aspergillus niger*.

A diminuição na atividade da xilanase pode estar relacionada a alterações no metabolismo do fungo durante o crescimento contínuo, e juntamente com a limitação do teor de nutrientes, poderiam resultar em morte celular e, posteriormente, a

desnaturação de enzimas e redução da atividade das enzimas (BON et al., 2008). Outro motivo possível para diminuição da enzimática é a secreção de proteases que agem desnaturando a enzima, através de hidrólise de ligações peptídicas entre aminoácidos (BEDADE et al., 2017).

Figura 22 - Perfil de produção de xilanase do fungo *Gongronella butleri* IPS8.2 cultivado em estado sólido, utilizando farelo de trigo a 30°C.



Fonte: Dados do próprio autor.

5.7 EFEITOS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE A ATIVIDADE DA XILANASE

As xilanases têm sido empregadas em diversas aplicações biotecnológicas, como a bioconversão de material lignocelulósico para a produção de bioetanol e branqueamento de celulose na indústria de fabricação de papel. No entanto, nestes processos podem ser gerados compostos mono ou polifenólicos derivados da lignina, que atuam como inibidores de xilanase por isso, avaliou-se o efeito desses compostos sobre a atividade xilanolítica da solução enzimática bruta produzida por *Gongronella butleri* IPS8.2, os resultados estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12 - Efeito de compostos fenólicos na concentração de 10 mmol L⁻¹ sobre a atividade relativa (%) de xilanases presente em extrato bruto produzido pelo fungo *Gongronella butleri* IPS8.2.

Compostos Fenólicos	Atividade Relativa (%)		
	10 minutos	24 horas	48 horas
Tânico	41,1±0,2	31,2±0,3	21,0±0,2
Cumárico	88,6±0,2	90,9±0,2	96,1±0,3
Gálico	68,46±0,5	78,2±0,3	83,2±0,5
Ferúlico	93,3±0,5	83,1±0,2	97,4±0,1
Hidroxibenzóico	92,6±0,7	96,3±0,5	96,0±1,3
Vanílico	108,0±0,3	97,6±0,5	86,5±1
Vanilina	89,6±0,2	85,1±0,2	91,4±1
Siringico	92,8±0,5	90,2±0,3	95,3±0,8
Siringaldeido	93,3±0,3	87,0±0,1	73,4±0,4
Controle	100±0,6	100±0,4	100±1,4

Fonte: Dados do próprio autor.

Dentre os compostos fenólicos, o ácido tânico foi altamente inibidor. Silva et al. (2015), verificaram a ação inibidora do ácido tânico, de 56% na atividade da xilanase purificada, produzida por *Emmericella nidulans*. Este mesmo composto inibiu fortemente as atividades de CMCase, atividade de papel de filtro (FPAse) e β -glicosidase de *Trichoderma reesei*, promovendo perda contínua de atividade por desativação dependente do tempo (XIMENES et al., 2011). Segundo Scalbert (1991), o efeito inibitório de taninos já foi identificado para diversas enzimas microbianas (celulases, pectinases, xilanases, peroxidases, lacases e glicosiltransferases).

Os taninos são polifenóis hidrossolúveis que apresentam característica adstringente (capacidade de se ligar a outras moléculas) e, por isso, são capazes de precipitar proteínas (KAWAMOTO; MIZUTANI; NAKATSUBO, 1997; DUODU et al., 2003). Por serem fenólicos são muito reativos quimicamente, formam pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares. Um mol de taninos pode ligar-se a doze moles de proteínas (MONTEIRO et al., 2005). São comumente encontradas em plantas herbáceas e lenhosas, podendo estar presente em sementes, frutas, folhas, madeira, cascas e raízes de plantas (HASLAM, 2007).

Os resultados obtidos neste trabalho, assim como dados da literatura, sugerem que o ácido tânico pode ser responsável, pelo menos em parte, pela redução da atividade da xilanase. O ácido gálico foi segundo inibidor mais forte entre os testados, porém, ao deixá-lo por um maior período de incubação a atividade xilanolítica obteve um leve aumento. Ao contrário dos resultados obtidos com ácido vanílico que aumentou a atividade em 10 minutos de incubação e, logo em seguida, diminuiu a atividade residual obtida após o período de 24 horas. Pode-se observar também que, após o período de incubação de 48 horas, além do ácido gálico, os compostos ácido cumárico, ácido ferúlico, hidroxibenzóico e valina elevaram levemente a atividade da enzima. Segundo Kaya; Heitmann e Joyce (2000), a adição de compostos fenólicos, em baixas concentrações, aumentou a atividade xilanolítica, porém, um aumento da concentração dos inibidores levou à inibição enzimática.

Moreira et al. (2013), observaram uma forte inibição pelo ácido 4-hidroxibenzóico e pela vanilina, que desativou por completo a xilanase produzida por *Aspergillus terreus*, resultados que diferem dos encontrados neste estudo. Ainda segundo o mesmo autor, a Xyl2 foi muito resistente a todos os compostos fenólicos testados, onde a enzima não apresentou perda de atividade, mesmo após o período de incubação de 7 dias em temperatura ambiente. O ácido p-cumárico causou 20% de inibição sobre XynA de *E. nidulans* a 50°C e certa desativação após 18h de incubação nesta temperatura. Em contraste, a xilanase XynA de *Clostridium cellulovorans* foi inibida instantaneamente por este composto (MORISSON et al, 2011).

Ao comparar a maioria dos dados obtidos com o controle, pode-se verificar que em grande parte das condições das testados tais compostos fenólicos inibiram a atividade xilanolítica, sugerindo que a concentração de 10 mmol L⁻¹, foi alta. Provavelmente a heterogeneidade do extrato enzimático bruto não só impede a queda total da atividade xilanolítica como eleva a atividade de alguns dos compostos. A comparação dos resultados deste trabalho com a literatura mostra que o efeito de compostos fenólicos sobre xilanases varia de acordo com as enzimas, os compostos testados, as concentrações e as temperaturas testadas, podendo haver inibição, desativação, manutenção ou ativação da atividade.

5.8 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

Anteriormente ao processo de purificação parcial da xilanase, foi avaliado o perfil de produção de diferentes enzimas pelo fungo *Gongronella butleri* IPS8.2 em farelo de trigo, a 72 horas de cultivo sólido, com 70% de umidade do substrato, usando água destilada para umidificar o substrato. Após a caracterização do extrato bruto, para a xilanase descrita no Item 14.1.4, as reações para xilanase, CMCase e avicelase foram determinadas a 45 °C. Os resultados das diferentes atividades enzimáticas encontram-se apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Produção enzimática pela espécie *Gongronella butleri* IPS8.2, em 72 horas de cultivo sólido, em farelo de trigo.

	Atividade		Proteína (mg mL ⁻¹)	Atividade Específica (U mg ⁻¹)
	(U mL ⁻¹)	(U.g ⁻¹)		
CMCase	1,98	19,8	1,44	1,37
Avicelase	4,98	49,8	1,44	3,45
Amilase	5,09	50,9	1,44	3,53
β-glicosidase	0,98	9,8	1,44	0,68
Xilanase	113,02	1.130,2	1,44	78,49

Fonte: Dados do próprio autor.

Os dados das atividades enzimáticas, confirmaram que o melhor resultado de produção enzimática foi para enzima xilanase, nas condições de cultivo adotadas nesse trabalho.

5.9 PURIFICAÇÃO

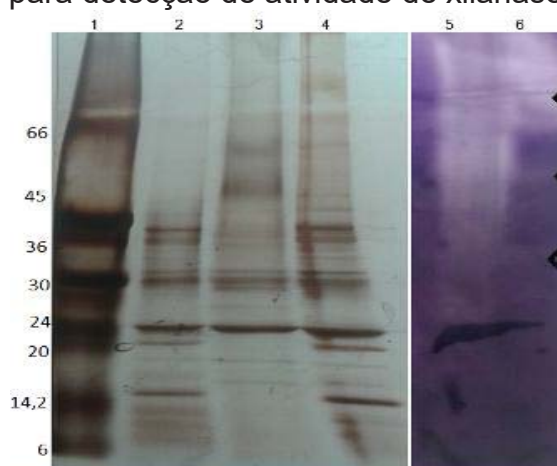
Previamente às tentativas de cromatografias, a amostra bruta foi concentrada por liofilização e analisada quanto ao seu perfil protéico em SDS-PAGE, assim como quanto ao seu perfil de xilanasas pelo zimograma (Figura 23). Também foi verificada a atividade da xilanase antes de concentrada (113,02 U mL⁻¹).

A Figura 23 apresenta, no perfil gel de SDS-PAGE, em sua coluna 2 o extrato enzimático bruto com tampão de amostra na presença de SDS, anterior ao processo de concentração. Em sua coluna 3 e 4 temos o extrato enzimático bruto com tampão de amostra SDS, concentrados sem fervura e com fervura, respectivamente. No

zimograma, na coluna 5 temos a amostra concentrada e na 6 a amostra não concentrada, ambas produzidas pelo fungo *Gongronella butleri* IPS8.2.

O fungo *Gongronella butleri* IPS8.2 produz provavelmente uma multiplicidade de formas de xilanases, a presença de rastro também foi observada numa segunda tentativa de zimograma (Figura 24). Entretanto, para confirmação, seria necessário a utilização de outras técnicas como a espectrometria de massa.

Figura 23 - À esquerda temos o Perfil Gel de SDS-PAGE. À direita temos o Zimograma específico para detecção de atividade de xilanase.



Fonte: Dados do próprio autor.

Figura 24 - Gel zimograma à 10% coluna 1 e 3 corresponde a amostra concentradas por liofilização, coluna 2 solução enzimática bruta sem concentrar.

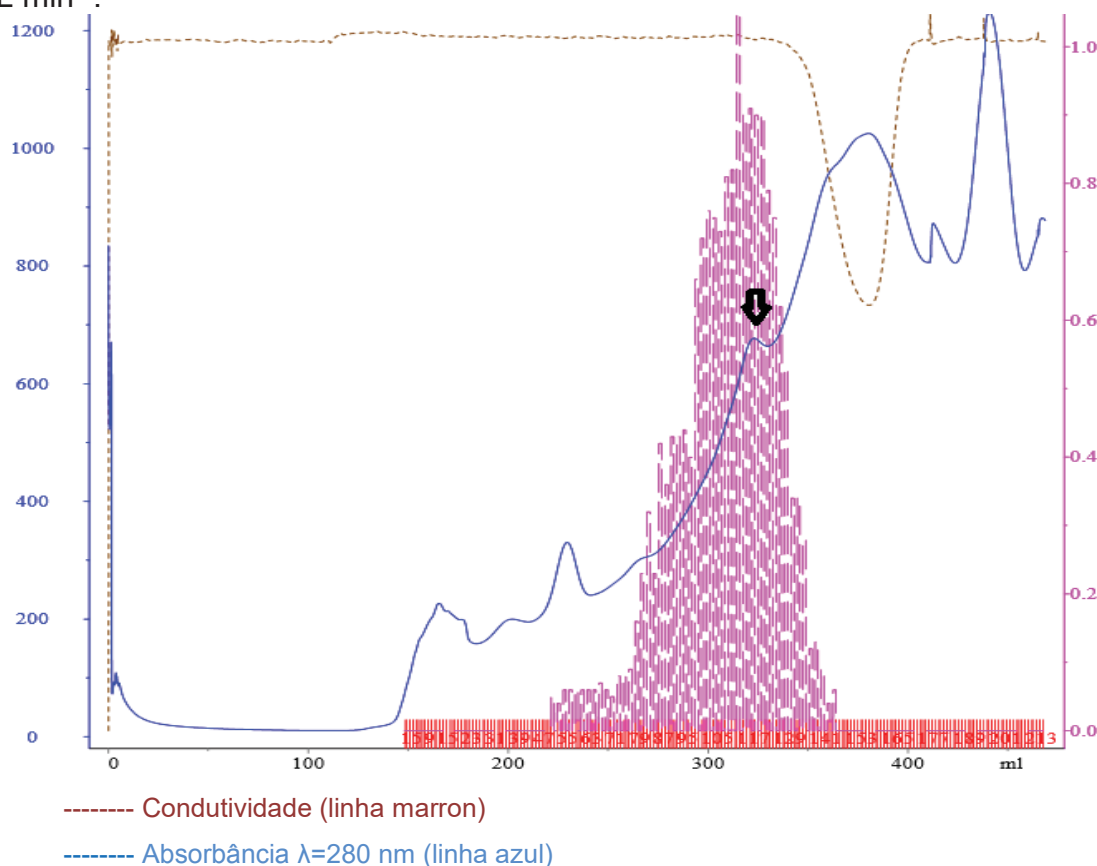


Fonte: Dados do próprio autor.

Numerosos fungos filamentosos exibem alta degradação de xilana, estes apresentam múltiplas xilanases, como o *Aspergillus ochraceus*, com pelo menos três xilanases (MICHELIN et al., 2014), *Penicillium oxalicum* GZ-2, com oito xilanases (LIAO et al., 2015), *Trichoderma reesei*, com seis xilanases (BIELY et al., 2014) e o fungo xilanolítico *Talaromyces versatilis*, com quatro xilanases de GH11, com várias propriedades (LAFOND et al., 2014).

Para a espécie em estudo, nenhum trabalho foi descrito relatando a multiplicidade de xilanases. Contudo, a presença de uma banda no início do gel revelou a presença de uma provável isoforma com alto massa molecular, o que motivou buscar a primeira tentativa de purificação da xilanase, pelo fracionamento do extrato enzimático bruto em uma coluna cromatográfica de filtração em gel, utilizando a coluna "Sephacryl™ S-100", conforme protocolo do Item 4.12.2. O perfil desta eluição está representado na Figura 25.

Figura 25 - Perfil da cromatografia do extrato enzimático de *Gongronella butleri* IPS8.2 proveniente da concentração por liofilização, e aplicada em coluna de filtração em gel "Sephacryl™ S-100" Vo de aproximadamente 150 mL e fluxo de 0,7 mL min⁻¹.

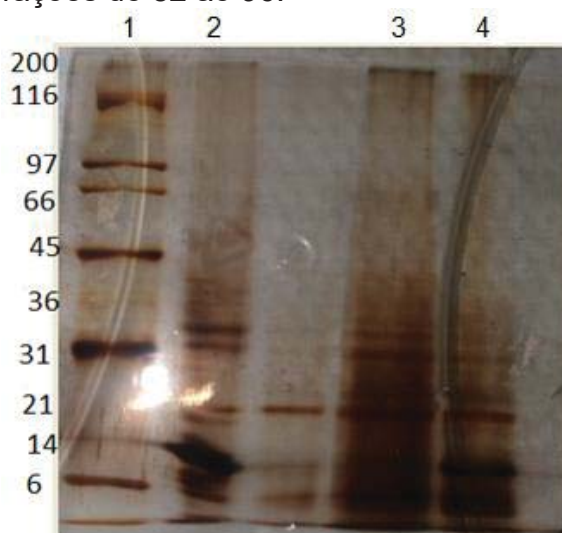


Fonte: Dados do próprio autor.

A linha azul representa os valores de absorbância em 280 nm e a linha rosa os valores em 540 nm, após quantificação de açúcares redutores resultantes da atividade enzimática. Na Figura 25, observa-se um pico de proteína, que correspondeu ao pico de atividade de xilanase dos tubos 113 ao 128. Entretanto, uma baixa atividade xilanolítica foi verificada a partir do tubo 82. Os resultados permitem concluir que, houve interação das xilanases com resina e que não houve separação das mesmas, não atingindo o objetivo de separar a proteína de alta massa molecular. O que difere do esperado, pois na cromatografia de filtração em gel têm-se a separação das proteínas com base no seu tamanho.

A coluna é constituída por uma matriz de pequenas esferas porosas. O esperado era que as moléculas com alta massa molecular fossem eluídas primeiramente, em comparação as de baixa massa molecular (DENNISON, 2003). Este resultado pode ser confirmado pela análise do gel (Figura 26) observou-se a presença tanto de proteínas de alta massa molecular quanto as de baixa massa molecular, ao longo de todas as frações coletadas nesta coluna cromatográfica.

Figura 26 - Gel SDS-PAGE a 10% das frações coletadas na gel filtração S100. Na coluna 1 encontra se o marcador, já a coluna 2 corresponde as junções dos tubos 98 ao 113, já na coluna 3 é possível visualizar a agrupamentos do tubos do 114 ao 128 e na 4 observa-se as frações do 82 ao 96.

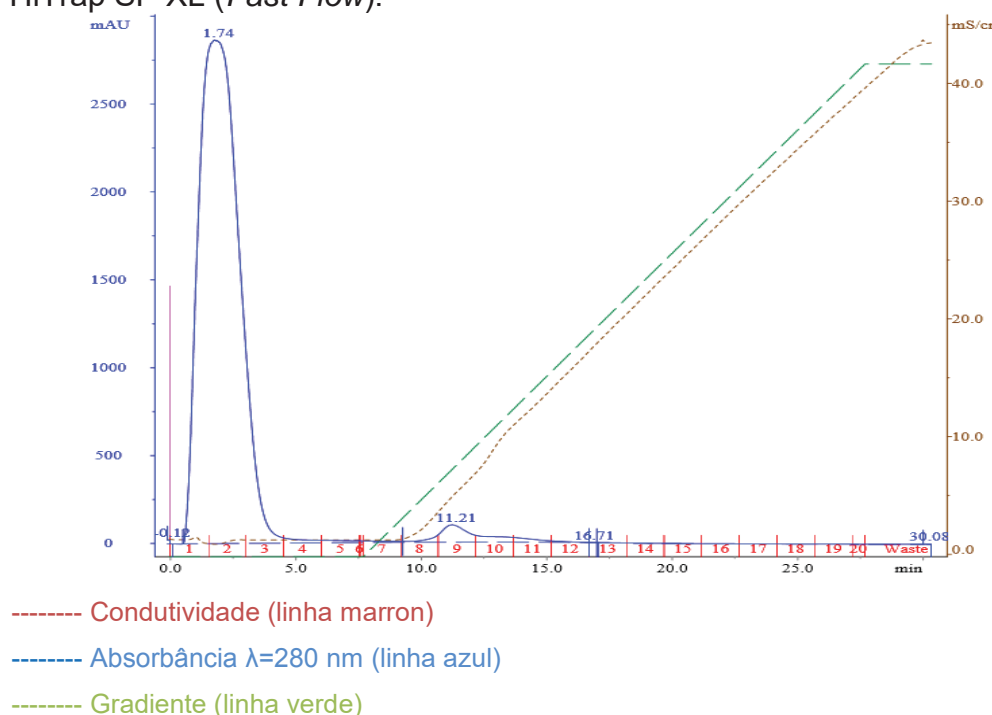


Fonte: Dados do próprio autor.

Uma vez que não foi obtido êxito com a coluna de filtração em gel Sephacril S-100 no fracionamento das proteínas, decidiu-se testar uma coluna de troca iônica

com o objetivo de purificar a xilanase. Previamente ao teste de purificação, foi estimado o pI através de uma focalização isoéletrica em gel de agarose, cujo resultado encontrado foi um pI de 6,2. O pI é o valor de pH onde uma proteína apresenta carga elétrica líquida igual a zero. Nas xilanases, o pI varia entre uma faixa de 3 a 10 (KULKARNI et al., 1999). Acima do pI as proteínas apresentam carga negativa, abaixo do pI apresentam carga positiva. Na primeira tentativa, de purificação por troca iônica, utilizou-se a coluna HiTrap Sepharose SP (*Fast Flow*). O perfil da cromatografia pode ser visualizado pela Figura 27. Utilizou-se como tampão de eluição, o tampão citrato a 20 mmol L^{-1} no pH 3,5. Já no extrato enzimático liofilizado ressuspendido, foi usado um tampão de citrato a 20 mmol L^{-1} e pH 3,5, aplicado à coluna seguindo o protocolo descrito no Item 4.12.3.

Figura 27 - Perfil da cromatografia do extrato enzimático de *Gongronella butleri* IPS8.2 proveniente da concentração por liofilização, e aplicada em coluna de troca iônica HiTrap SP XL (*Fast Flow*).

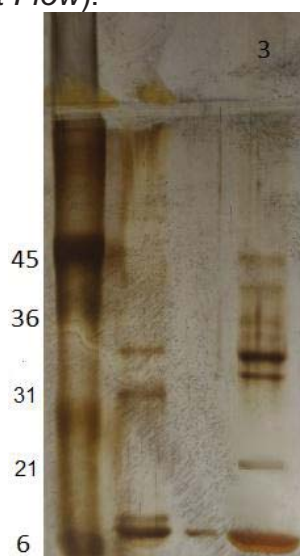


Fonte: Dados do próprio autor.

Observam-se dois picos de proteínas totais, sendo que o segundo pico coincide com a atividade xilanolítica nos tubos 8 e 9. Este resultado demonstra que as enzimas xilanolíticas se ligaram à resina, e saíram bem no início do gradiente linear. A amostra deste fracionamento, com atividade xilanolítica, foi concentrada

com TCA e aplicadas em um gel desnaturante de poliacrilamida (Figura 28), com o objetivo de se analisar a eficiência de separação das proteínas. Pela análise do gel, observou-se que não houve separação da xilanase das demais proteínas, podendo haver mais de um tipo por tubo, com atividade. Foram realizadas várias tentativas de zimograma, porém os géis não proporcionaram bons resultados. Além do gradiente linear, testou-se o gradiente escalonado. Ambos os resultados, demonstram que a utilização desta coluna não foi eficiente para a purificação das xilanase.

Figura 28 - Gel SDS-PAGE 10% coluna 3 corresponde as junção da amostras 7 e 8 com atividade xílanolítica concentradas com TCA, coletadas na cromatografia de troca iônica HiTrap SP XL (*Fast Flow*).



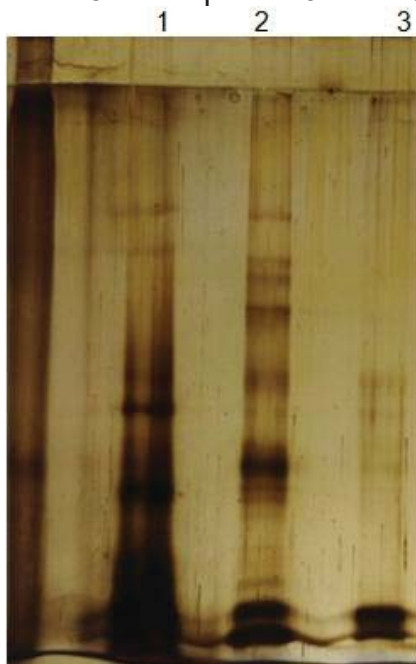
Fonte: Dados do próprio autor.

Ainda nas fases de testes, ao ser observado uma banda de baixa massa molecular, optou-se investigar se a mesma poderia ser uma xilanase, através de uma cromatografia de filtração em gel, utilizando a resina de Sepharose G-50. As frações eluídas desta cromatografia, com atividade xílanolítica, foram reunidas em grupos que diferiram conforme a eluição, sendo três picos, do 27 à 38, de 39 à 60 e de 61 à 76 (Figura 29).

Pela análise do gel de poliacrilamida SDS-PAGE, foi possível observar a presença de várias proteínas, mostrando que o método utilizado não foi o suficiente para separação das mesmas. Foi realizado um teste que consistiu em, uma primeira etapa, uma cromatografia de troca iônica com a Hitrap SP, num segundo momento, os tubos que corresponderam as frações com atividade xílanolítica foram agrupados

e, posteriormente, aplicados em cromatografia de filtração em gel com a coluna Sepharose G-50, obtendo um único pico de atividade xilanolítica nas frações, que corresponderam aos tubos do 38 ao 48. Através da atividade enzimática foi demonstrado que não houve separação das prováveis isoformas.

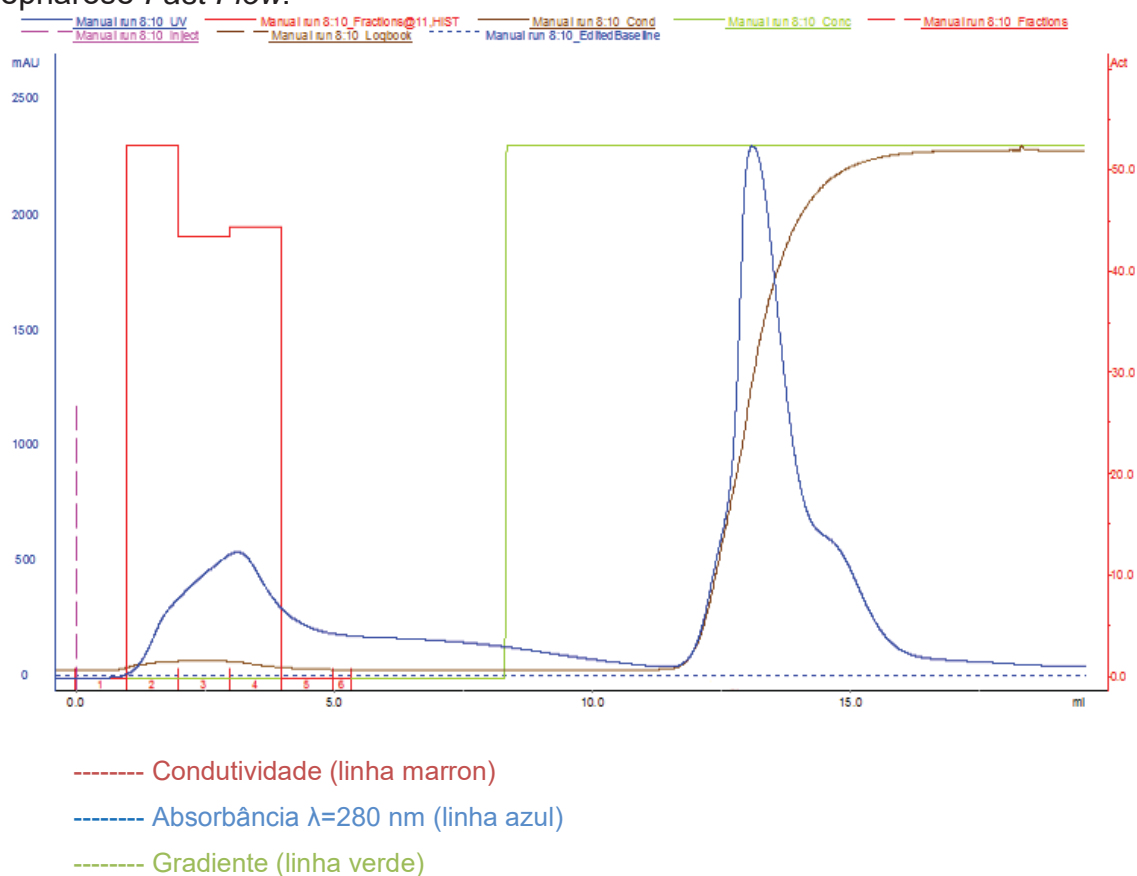
Figura 29 - Gel SDS-PAGE 10% das frações eluídas coletadas na gel filtração G 50. Coluna 1 corresponde as frações agrupadas do tubos 27 ao 37, a coluna 2 corresponde 38 ao 60 e a coluna 3 corresponde 61 ao 76.



Fonte: Dados do próprio autor.

Uma outra tentativa foi adotada para dar continuidade no trabalho, foi a cromatografia de troca aniônica, com a resina Q-Sepharose Fast Flow em pH 8,5. O perfil obtido, do extrato bruto aplicado em coluna encontra-se na Figura 30. Obteve-se dois picos de proteínas totais, observadas pela linha do UV, à λ 280 nm, no primeiro pico (tubos 2, 3 e 4) foi encontrada atividade xilanolítica (Figura 30). Diferentemente do esperado, este resultado demonstra que a(s) xilanase(s) não se ligou(ram) à resina. As amostras iniciais, da cromatografia (tubos do 1 ao 6), foram concentradas por liofilização e aplicadas em um gel desnaturante de poli(acrilamida) (linhas do 1 ao 6), assim como extrato bruto (linha 7), apresentado na Figura 31.

Figura 30 - Perfil da cromatografia do extrato enzimático de *Gongronella butleri* IPS8.2 proveniente da concentração por liofilização e aplicada em coluna Q Sepharose *Fast Flow*.

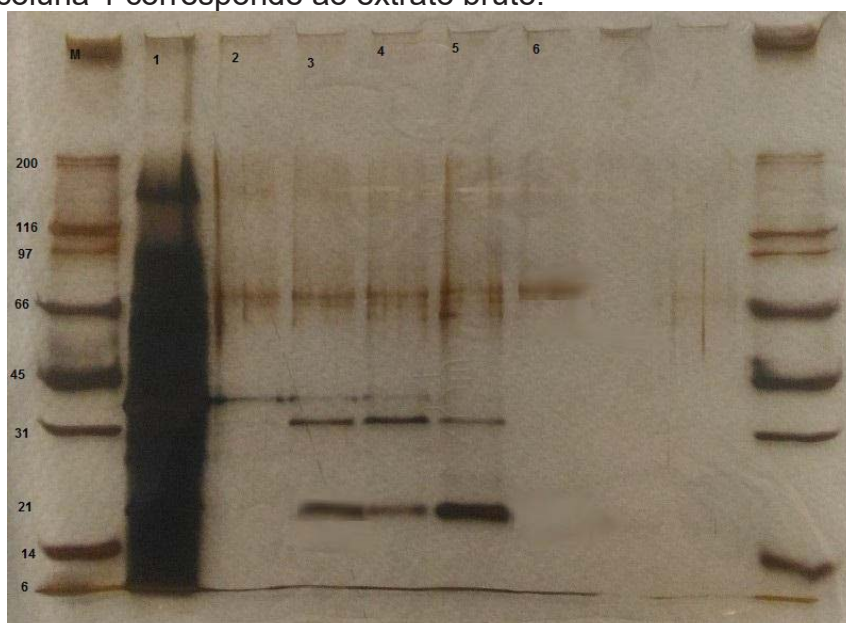


Fonte: Dados do próprio autor.

Ao visualizar o gel SDS-PAGE, da Figura 31, observar-se que a enzima não se encontra totalmente purificada, mas o método utilizado a deixou mais livre de contaminantes, significando a eficiência desse procedimento cromatográfico, sendo este o adotado para purificação parcial da enzima. As colunas 3, 4 e 5 na Figura 31 correspondem aos tubos com atividade de xilanolítica, pode-se observar a presença de bandas de proteínas com massa molecular 38,5, 36 e 22 KDa estimada conforme o gráfico apresentado na Figura 32. Como as proteínas acima de 40 kDa são visualizadas nos tubos sem atividade xilanolítica pode-se afirmar que enzima em estudo possui uma massa molecular abaixo desse valor. Uma baixa massa molecular foram relatadas em literatura para outras espécies de fungos mesofílicos, tais como: *Aspergillus ficuum* AF-98 (35KDa) por Fengxia et al. (2008), *Aspergillus niger* DFR-5 (32KDa) por Pal e Khanum (2011), *Penicillium glabrum* (18,36KDa) por

Knob et al. (2013), *Neosartorya tatenoi* KKU-CLB 3-2-4-1 (20KDa) por Seemakram et al. (2016).

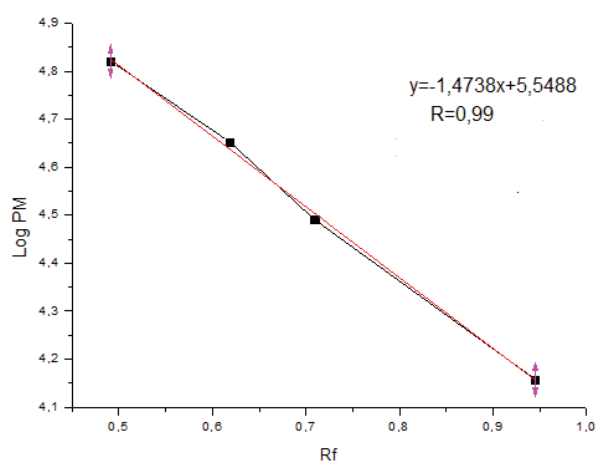
Figura 31 - Gel a 10% SDS-PAGE das frações coletadas na cromatografia de troca aniônica Q Sepharose FF, colunas 3,4 e 5 correspondem as amostras com atividade xilanolítica, coluna 1 corresponde ao extrato bruto.



Nota: Colunas 2 e 6, apresentam a amostra sem atividade xilanolítica. Colunas 3, 4 e 5 amostra com atividade xilanolítica, sendo que a maior atividade foi encontrada na coluna 5. Coluna 1, solução enzimática bruta.

Fonte: Dados do próprio autor.

Figura 32 - Gráfico do logaritmo da massa molecular dos padrões vs. a rf em gel de poliacrilamida.



Fonte: Dados do próprio autor.

Os dados referentes à purificação parcial estão apresentados na Tabela 14. O grau de purificação foi de 4,08 vezes, o rendimento de 20,24% e atividade específica 556,36 U mg⁻¹.

Tabela 14 - Resumo da purificação parcial da xilanase produzida por *Gongronella butleri* IPS8.2.

	Volume (mL)	Proteína		Atividade		Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Grau de Purificação
		(mg/ mL)	(mg/ total)	(U mL ⁻¹)	(U/total)			
Lifolizador	45	0,74	33,3	100,8	4536	136,22	100	1
Q Sepharose FF	15	0,11	1,65	61,2	918	556,36	20,24	4,08

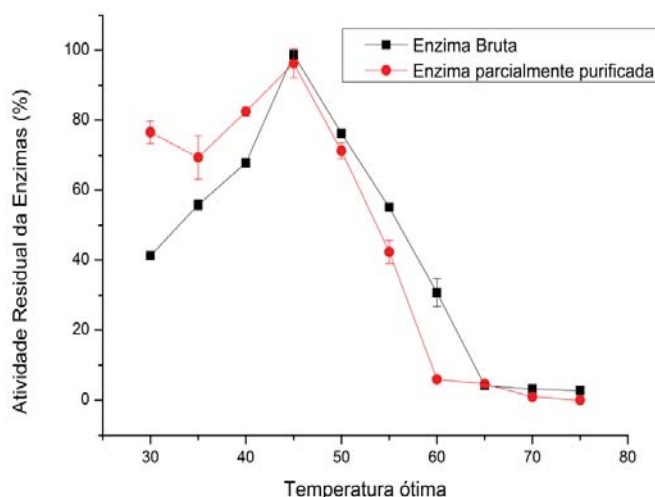
Fonte: Dados do próprio autor.

Yang et al. (2015), purificaram a xilanase de *Aspergillus fumigatus* FC2-2 utilizando cromatografia de troca iônica, numa coluna de Sepharose Hitrap QFF, e obtiveram um fator de purificação de 25,5 e um rendimento de 13,9%. Terrone et al. (2018), para purificar a xilanase de *Penicillium chrysogenum*, utilizaram cromatografia de troca iônica, numa coluna CM Sephadex C-50, e cromatografia de filtração em gel, numa coluna Sephadex G-100, e tiveram como resultados após a cromatografias uma atividade específica de 834,2 U mg⁻¹, rendimento de 31,1% e um fator de purificação de 18,7. Fang et al. (2008) relataram que a purificação da xilanase de *Aspergillus meatus* M34 com o fator purificação de 14,88, rendimento de 25,8% e atividade específica de 245,94 U mg⁻¹.

5.9 TEMPERATURA ÓTIMA E DE ESTABILIDADE

A máxima atividade de xilanase de *Gongronella butleri* IPS8.2 é observada à 45 °C (Figura 33). A xilanase reteve 50% de atividade à 55 °C, no entanto, à 60 °C, a atividade diminuiu rapidamente. O mesmo resultado foi observado para a enzima parcialmente purificada (Figura 33). Microorganismos mesofílicos apresentam suas enzimas com atividade ótima na faixa de 40 a 60 °C (LEE et al., 2009). Geralmente, a temperatura ótima para a maioria das xilanases fúngicas encontram-se entre 50 a 65 °C (SANDRIM et al., 2005; BETINI et al., 2009; SHRIVASTAVA et al., 2011; KAR et al., 2013).

Figura 33 - Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade xilanolítica em extrato bruto e parcialmente purificado de *Gongronella butleri* IPS8.2.



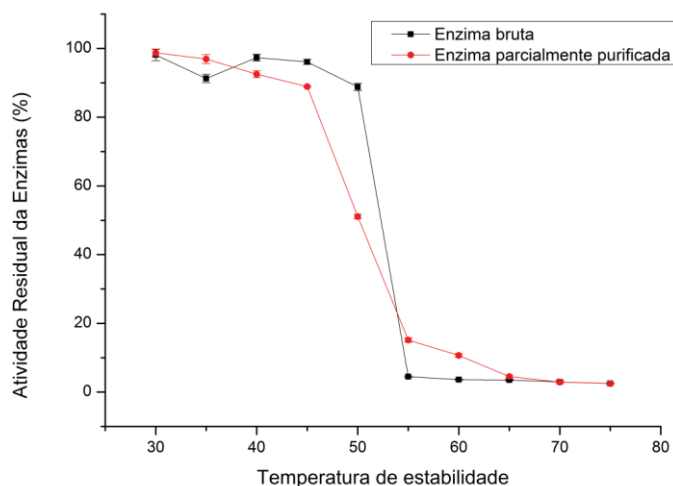
Fonte: Dados do próprio autor.

Shah e Madamwar (2005) obtiveram uma temperatura ótima de 50 °C, para xilanase parcialmente purificada, do fungo *Aspergillus foetidus*. A mesma temperatura ótima foi relatada por Lee et al. (2015), para xilanase purificada de *Penicillium rolfsii* c3-2.

Fengxia et al. (2008) purificaram e caracterizaram a xilanase, produzida por *Aspergillus ficuum* AF-98, encontrando a temperatura ótima de 45 °C, esse resultado foi semelhante ao encontrado nesse estudo.

A termoestabilidade pode ser definida como a retenção da atividade após o aquecimento de um extrato enzimático, a uma temperatura selecionada durante um período de tempo prolongado (VIKARI et al., 2007). O estudo da termostabilidade mostrou que enzima se manteve estável até 50 °C, mantendo até mais de 80% da atividade residual na solução enzimática bruta. Na xilanase parcialmente purificada, verificou-se uma redução de estabilidade, quando comparado a xilanase bruta, obtendo 50% de atividade residual à 50 °C (Figura 34). Uma baixa termoestabilidade, de 40 °C, foi observada por Anga et al. (2013), ao estudar a xilanase produzida por *Aspergillus fumigatus* SK1. No entanto, Jain et al. (2015) encontrou uma estabilidade de 70 °C para a xilanase produzida por *T. aurantiacus* RCKK.

Figura 34 - Efeito da estabilidade de temperatura na atividade xilanolítica em extrato bruto e parcialmente purificado de *Gongronella butleri* IPS8.2, à 45 °C e pH 5,5.



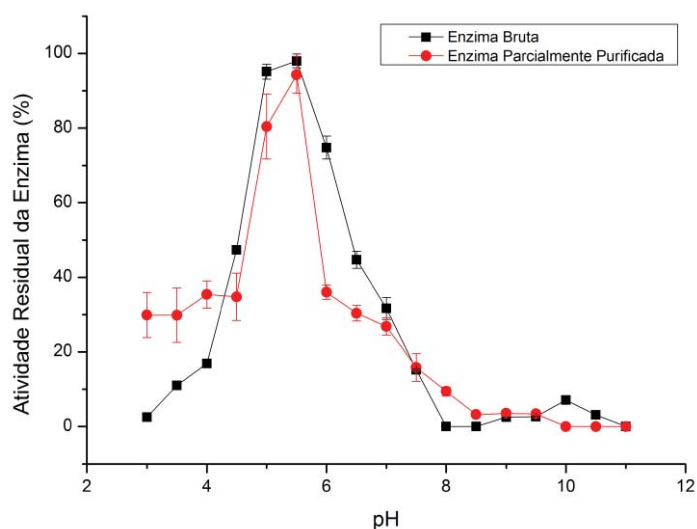
Fonte: Dados do próprio autor.

Gupta et al. (2014) verificaram uma temperatura ótima de 70 °C para a xilanase produzida pelo fungo *Melanocarpus albomyces*, entretanto, esta enzima mostrou termoestabilidade somente até 55 °C.

5.10 pH ÓTIMO E DE ESTABILIDADE

A análise do efeito do pH na atividade enzimática da xilanase (Figura 35), mostrou que a xilanase bruta, apresenta um pH ótimo na faixa de 5,0 a 5,5, sendo sua maior atividade em pH 5,5. No pH 6 a enzima conseguiu manter mais de 50% de atividade residual, a partir desse ponto houve queda na atividade xilanolítica, tendo um pequeno aumento no pH 10. A enzima parcialmente purificada apresentou um pH ótimo na faixa de 3 a 5,5, sendo o ótimo alcançado no pH 5,5, após este pH a enzima em estudo não conseguiu reter mais 50% de atividade residual, zerando a atividade a partir do pH 10.

Figura 35 - Efeito do pH na atividade da xilanase bruta e parcialmente purificada obtida da espécie *Gongronela butleri* IPS8.2 cultivado em farelo de trigo sob cultivo sólido.



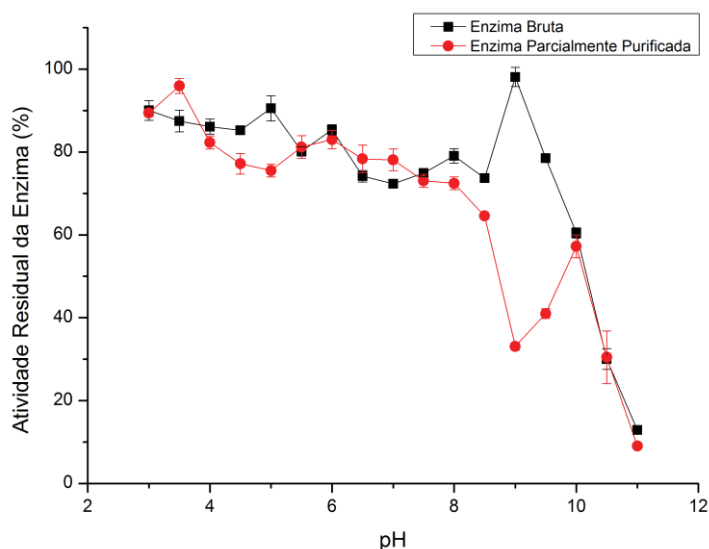
Fonte: Dados do próprio autor.

Xilanases de origem fúngica são mais ativas em pH oscilando entre 3,5 e 5,5, mas é bastante estável ao longo de uma ampla faixa de pH (3,0-10,0) (MURTHY; NAIDU, 2012; WONG et al., 1988). Irfan e Syed (2012) determinaram o pH ótimo de 5,0 para xilanases produzidas por *T. viride*. O mesmo resultado foi observado para xilanases de *T. harzianum*, realizado por Ahmed et al. (2012). A mesma faixa de pH ótimo, encontrada em estudo, foi observada por Masui et al. (2012), para a xilanase produzida pela espécie *Humicola brevis* var. *Thermoidea* quando cultivada em estado sólido, utilizando o farelo de trigo como substrato.

As enzimas, geralmente, apresentam atividade máxima em determinado pH. O pH pode influenciar diretamente a atividade enzimática por meio de mudanças nas cargas de aminoácidos, como aqueles situados no sítio ativo da enzima, ou nos sítios de ligação, acarretando em maior ou menor afinidade da enzima para com o substrato (LEHNINGER et al., 1995). Além dos efeitos puramente iônicos, valores baixos ou altos de pH podem causar desnaturação considerável e conseqüentemente, inativação da proteína enzimática. Ademais, uma vez que muitos substratos têm caráter iônico (por exemplo, ATP, NAD⁺, aminoácidos e CoASH), o sítio ativo da enzima pode requerer espécies iônicas determinadas para atingir atividade ótima. Esses efeitos são, provavelmente, os principais determinantes de uma típica relação atividade enzimática-pH (QUERIDO, 2002).

O perfil de estabilidade, com relação ao pH, sobre a atividade da xilanase bruta está representado na Figura 36. Observou-se uma estabilidade superior a 70% no intervalo de pH de 4 a 9,5, e estabilidade inferior 30% no intervalo de pH de 10,5 à 11. A enzima bruta, produzida por *Gongronella butleri* IPS8.2, apresenta-se estável em uma ampla faixa. Já a xilanase parcialmente purificada pode-se observar se manteve estável no intervalo de pH de 3 a 8. Foram observadas quedas de estabilidade nos pH 9 e 9,5. Pal e Khanum (2011) encontraram uma faixa estreita de estabilidade de pH (4,0 à 6,5) para xilanase produzida por *Aspergillus niger* DFR-5, de modo similar ao atual estudo uma ampla faixa de estabilidade de pH (4 à 10) foi encontrada por Oliveira et al. (2010) para fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. A xilanase bruta e a parcialmente purificada foram caracterizadas à 45 °C no pH 5,5.

Figura 36 - Efeito da estabilidade de pH na atividade da xilanase bruta e parcialmente purificada obtida da espécie *Gongronella butleri* IPS 8.2 cultivado em farelo de trigo sob cultivo estado sólido.



Fonte: Dados do próprio autor.

5.11 EFEITO DE ÍONS E OUTROS COMPOSTOS NA ATIVIDADE DA XILANASE BRUTA E PARCIALMENTE PURIFICADA

O efeito de diferentes substâncias e íons metálicos sobre a atividade da xilanase bruta e parcialmente purificada, foi avaliado em reação contendo como substrato xilana Beechwood à 1% e pH de 5,5 à 45 °C.

Como pode-se observar na Tabela 15, as xilanases sofreram inibição na presença dos íons Cu^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+} , este efeito foi mais elevado com aumento da concentração molar. O íon Cu^{2+} é conhecido por ser um forte inibidor das xilanases (ZHANG et al., 2007; MAITAN-ALFENAS et al., 2016). A diminuição da atividade por Cu^{2+} , também foi verificada com a xilanase de *Penicillium janczewskii*, reduzindo-a a níveis não detectáveis nas condições de ensaio, enquanto que Na^{+} aumentou a atividade enzimática da xilanase (TERRASAN et al., 2016), resultados semelhantes ao encontrado nesse trabalho. A inibição pelo íon Hg^{2+} aparenta ser uma propriedade geral das xilanases, devido a oxidação de resíduos específicos, contendo grupo sulfidríla, como a cisteína, reduzindo sua atividade (LIAO et al., 2014). A supressão pelo Hg^{2+} foi semelhante aos resultados encontrados para xilanase em literatura (FENGXIA et al. 2008; YANG et al. 2010; SORGATTO et al. 2012).

A forte supressão pelo Ag^{+} , do composto nitrato de prata, também revelou a presença de resíduos de cisteína, perto do sítio ativo da enzima, onde sua interação com estes aminoácidos foi tão forte que promoveu inibição da atividade da enzima (GUPTA et al., 2014). Observações semelhantes também foram relatadas para outras xilanases (BEG et al., 2001; DOBREV; ZHEKOVA 2012; SORGATTO et al. 2012; GUPTA et al., 2014) o que difere do resultado encontrado para xilanase produzida por *Neosartorya tatenoi* KKU-CLB-3-2-4-1 (SEEMAKRAM et al., 2016).

Quase um terço dos processos, mediados por enzimas, necessita dos cofatores para exercer sua atividade catalítica. Quando o íon metálico é necessário para elevar a atividade da enzima é atribuído a ele o papel de cofator (SISSI; PALUMBO, 2009). O extrato bruto enzimático apresentou aumento da atividade na presença dos íons Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{2+} , Co^{+2} , Na^{+} , NH_4^{+} . A enzima parcialmente purificada foi ativada na presença dos mesmos íons, exceto pelo íon Mn^{+2} . O íon que mais ativou a xilanase parcialmente purificada foi o Ca^{+2} , este íon também elevou a atividade de duas xilanases purificadas provenientes do fungo *Penicillium sclerotiorum* em 28,7 e 22% da atividade controle (KNOB; CARMONA, 2010). Semelhante ao presente estudo, Murthy e Nadu (2012) observaram efeito positivo na atividade xilanolítica ao utilizar os efetores Mg^{2+} , Ca^{+2} , Zn^{2+} , Co^{+2} e EDTA.

Tabela 15 - Efeito dos íons e reagentes na atividade da xilanase bruta obtida de *Gongronella butleri* IPS 8.2.

Efetor	Atividade Residual (%)			
	Xilanase Bruta		Xilanase Parcialmente Purificada	
	5 mmol L ⁻¹	10 mmol L ⁻¹	5 mmol L ⁻¹	10 mmol L ⁻¹
CONTROLE	100,0 ±0,04	100,0 ±0,02	100,0 ± 0,06	100,0 ±0,06
CuSO ₄	36,8 ±0,14	32,7 ±0,02	13,4±0,01	8,6 ±0,05
CuCl ₂	65,0 ±0,02	16,08 ±0,02	15,3 ±0,06	10,6 ±0,02
FeSO ₄	126,4 ±0,09	135,2 ±0,02	110,8±0,06	126,2 ±0,08
CoCl ₂	101,7 ±0,04	153,7 ±0,01	118,1 ±0,01	147,6 ±0,01
CaCl ₂	123,4 ±0,14	137,9 ±0,40	112,1 ±0,07	170,5 ±0,07
HgCl ₂	45,1 ±0,05	38,8 ±0,07	72,6 ±0,08	85,01 ±0,26
ZnCl ₂	97,2 ±0,03	131,4 ±0,03	103,1±0,01	78,2±0,16
NH ₄ Cl	107,1 ±0,01	147,9 ±0,01	113,7±0,03	92,8±0,10
NaCl	109,6 ±0,07	130,6 ±0,05	110,5±0,08	139,7±0,07
MnSO ₄	159,4 ±0,01	130,4 ±0,02	97,3±0,01	95,1±0,6
MgSO ₄	107,7 ±0,08	134,8 ±0,05	111,6±0,05	161,5±0,06
ZnSO ₄	138,4 ±0,02	150,9±0,03	110,8±0,05	127,5±0,07
(NH ₄) ₂ SO ₄	101,1 ±0,01	138,6 ±0,04	118,5±0,07	137,0±0,05
AgNO ₃	2,4 ±0,01	1,05 ±0,01	0	0
DTT	119,8 ±0,10	132,8 ±0,10	120,6±0,03	155,5±0,05
EDTA	102,7 ±0,05	136,4 ±0,02	113,1±0,01	149,8±0,01
TRITON	112,9 ±0,01	117,1±0,05	117,8±0,01	141,3±0,04
SDS	93,40 ±0,01	99,0 ±0,06	103,5±0,04	95,1±0,01

Fonte: Dados do próprio autor.

Nesse estudo, a xilanase bruta foi fracamente inibida pelo SDS e ativada pelo Triton. A ação de SDS, provavelmente, não afetou a integridade da estrutura tridimensional da enzima que é fundamental para a sua atividade catalítica, pode-se observar que o SDS, aumentou a atividade da xilanase parcialmente purificada, na concentração à 5 mmol L⁻¹. Resultado este que se difere das maioria dos trabalhos encontrados em literatura (DUARTE et al., 2012; MILANEZI et al., 2012; MAITAN-ALFENAS et al., 2016).

O DTT aumentou a atividade de xilanase, o que pode ser explicado pela prevenção da oxidação de grupos sulfidrilo na presença deste agente ou pela redução de ligações dissulfeto, restaurando sua estrutura nativa em alguma região

específica ou mesmo do sitio catalítico (SILVA; TERRASAN; CARMONA, 2015). O agente quelante EDTA mostrou efeitos estimuladores sobre a atividade da xilanase, resultado semelhante aos encontrados por Gupta et al. (2014). A elevação da atividade da xilanase observada na presença de EDTA sugere que esta enzima não é uma metaloenzima, pois a diminuição na atividade enzimática sugere que a mesma pode solicitar íon metálico como cofator (TERRASAN et al., 2016).

6 CONCLUSÕES

Os isolados em estudo apresentam resultados promissores, nas condições estabelecidas, sendo possível destacar alguns e selecionar o isolado IPS 8.2 para identificação pela análise da sequência do rDNA por ITSs.

Em relação ao fungo *Gongronella butleri* IPS8.2, espécie estudada neste trabalho, pode-se verificar que o cultivo em estado sólido se mostrou mais eficaz na produção de xilanases. A utilização de diferentes substratos lignocelulósicos, a fim de avaliar o efeito na produção de xilanase, não sobrepõe-se à utilização primordial do farelo de trigo como substrato. Com a otimização do meio foi possível melhorar a produção xilanolítica. As xilanases bruta e parcialmente purificada se mostraram moderadamente termoresistentes (faixa ótima à 45 °C), não sendo indicadas para processos biotecnológicos que demandam altas temperaturas. O pH ótimo ficou dentro da faixa esperada para espécies fúngicas, entre 5,0-5,5. Dentre os compostos fenólicos, o ácido tânico apresentou maior efeito de inibição sobre a atividade da xilanase bruta. A enzima parcialmente purificada apresentou uma estabilidade de temperatura e uma faixa de estabilidade pH inferiores à amostra bruta, nas condições analisadas. A maioria dos íons testados não inibiram a xilanase bruta e a parcialmente purificada. Para ambas as condições testadas, o Ag⁺ foi o que proporcionou maior diminuição na atividade xilanolítica. Dentre os agentes modificadores testados, foi observado influências positivas na xilanase bruta e na parcialmente purificada. O único agente que proporcionou leve inibição foi o SDS, contudo, o mesmo ativou a xilanase parcialmente purificada na concentração de 5 mmol L⁻¹.

Para trabalhos futuros sugere-se avaliar o aumento da umidade inicial no CES de outros substratos, uma vez que se verificou aumento da produção de xilanases quando a umidade inicial passou de 54% para 70% no CES de *Gongronella butleri* IPS8.2 em farelo de trigo, e esse aumento da umidade não foi testado para os outros substratos analisados. Em farelo de trigo avaliar uma umidade superior a 70%, pois não houve queda na produção da xilanase. Analisar o CSm e a otimização do CES com inóculo em esporo. Com relação à purificação o ideal seria explorar outras técnicas além das utilizadas, uma vez que os dados apresentados nesse trabalho, sugerem que o fungo *Gongronella butleri* IPS8.2 produz

multiplicidade de formas de xilanases, não podendo se afirmar que são isoformas. Podendo, inclusive, se tratar de diferentes graus ou tipos de glicosilação, o que dificultou o processo de purificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDELA, I. R. et al. Production and optimization of xylanase from *Penicillium* species in solid-state fermentation. **International Journal of Recent Biotechnology**, [S.1.], v. 3, p. 15-21, 2015.

AHMAD, Z et al. Effect of wheat bran concentration on xylanase biosynthesis by *Aspergillus niger*. **International Journal of Agriculture Biology**, Faisalabad, v. 11, p. 571-576, 2009. Disponível em < http://www.fsublishers.org/PUBLISHED_PAPERS/11644_..PDF>. Acesso em: 15 abr. 2018.

AHMAD, Z. et al. Effect of *Aspergillus niger* xylanase on dough characteristics and bread quality attributes. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 51, p. 2445-2453, 2014.

AHMED, S.; IMDAD S.S.; JAMIL, A. Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 15, p. 1-8, 2012.

AJIJOLAKEWU, A. K. Optimization of production conditions for xylanase production by newly isolated strain *Aspergillus niger* through solid state fermentation of oil palm empty fruit bunches. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdam, v. 11, p. 239-247, 2017.

ALMEIDA, M. C. O. **Indução de celulases e xilanase por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variable* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos**. 2012. 149 f. Dissertação mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico.

ÁLVAREZ-CERVANTES, J. et al. Phylogenetic analysis of β -xylanase SRXL1 of *Sporisorium reilianum* and its relationship with families (GH10 and GH11) of Ascomycetes and Basidiomycetes. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 24010, 2016.

ALVES, E. D. et al. Estudo do processo de obtenção celulose kraft com ênfase no forno de cal. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 16, n. 26, p. 101-220, 2015.

ALVES, T. S. et al. Biomassa e atividade microbiana de solo sob vegetação nativa e diferentes sistemas de manejos. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 33, p. 341-347, 2011.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

ANDERSEN, N. **Enzymatic hydrolysis of cellulose**: Experimental and modeling studies. Ph.D thesis, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, Copenhagen, 2007.

ANDRADE-LINARES, D. R.; VERESOGLOU, S.D.; RILLIG, M.C. Temperature priming and memory in soil filamentous fungi. **Fungal Ecology**, London, v. 21, p. 10-15, 2015.

ANGA, S. K. et al. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 48 p. 1293–1302, 2013.

ANWAR, Z.; GULFRAZB,M.; IRSHADA, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, Amsterdam, v. 7, p. 163-173, 2014.

AMARO-REYES, A et al. Homologue expression of a fungal endo-1,4- β -xylanase using submerged and solid substrate fermentations. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, p. 1760-1767, 2011.

ARAKI, T.; HASHIKAWA, S.; MORISHITA, T. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the new gene encoding β -1,3-xylanase from a *Marine bacterium*, *Vibrio sp.* strain XY-214. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 1741-1743, 2000.

BABU, A. G. et al. New record of *Gongronella butleri* Isolated in Korea. **Microbiology**, Seoul, v. 43, p. 166-169, 2015.

BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Purification, characterization, gene cloning and expression of GH-10 xylanase (*Penicillium citrinum* isolate HZN13). **3 Biotech**, Heidelberg, v. 6, p. 169, 2016.

BAJAJ, B. K.; MANHAS, K. Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* p11(c) with potential for fruit juice and bakery industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdam, v. 1, p. 330-337, 2012.

BAJPAI, P. **Xylanolytic Enzymes**, 1ed. EUA: Academic express, 2014.

BARRIOS-GONZALEZ J. Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, London, v. 47, p. 175–85, 2012.

BEDADE, D. et al. Extracellular xylanase production from a new xylanase producer *Tuber maculatum* mycelium under submerged fermentation and its characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdam, v. 11, p. 288-293, 2017.

BEDFORD, M. R. Factors affecting response of wheat based diets to enzyme supplementation. **Recent Advances in Animal Nutrition in Australia**, Brisbane, v. 11, p. 1-7, 1997.

BEG, Q. K. et al. Microbial xylanases and their industrial applications. **Microbiology Biotechnology**, Berlim, v. 56, p. 326–338, 2001.

BERG, J. M. ; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5. ed. New York: W H Freeman, 2002.

BETINI, J. H. A. et al. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 32, p. 819-824, 2009.

BIELY P. et al. Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 57, p.151–166, 1997.

BIELY P. et al. *Trichoderma reesei* XYN VI-a novel appendage-dependent eukaryotic glucuronoxylan hydrolase. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 281, p. 3894–3903, 2014.

BOERJAN, W.; RALPH, J.;BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 519–46, 2003.

BON, E. P. S. et al. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008.

BOONCHUAY, P. An integrated process for xylooligosaccharide and bioethanol production from corncob. **Bioresource Technology**, Essex, v. 256, p. 399–407, 2018.

BOONRUNG, S. et al. Purification and characterization of low molecular weight extreme alkaline xylanase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* BF1-7. **Mycoscience**, Tokio, v. 57 p. 408-416, 2016.

BRIENZO, M.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A.M. Xylooligosaccharides production from alkali-pretreated sugarcane bagasse using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Clifton, n. 162, v. 1195-205, 2010.

BUTARDO, V. M.; SREENIVASULU, N. Tailoring grain storage reserves for a healthier rice diet and its Comparative Status with Other Cereals. **International Review of Cell and MolecularBiology**, New York, v. 323, p. 42-43, 2016.

BUTT, M. S. et al. Xylanases and their applications in baking industry. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v. 46, p. 22–31, 2008.

CARVALHO, E. A. et al. Thermoresistant xylanases from *Trichoderma stromaticum*: application in bread making and manufacturing xylo-oligosaccharides **Food Chemistry**, London, v. 221, p. 1499–1506, 2017.

CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D.M.G. Multivariate optimization and supplementation strategies for the simultaneous production of amylases, cellulases, xylanases, and proteases by *Aspergillus awamori* under solid-state fermentation conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 175, p. 1588-1602, 2015.

CANALS, A. et al. Structure of xylanase Xys1 from *Streptomyces halstedii*. **Acta Crystallographica**: section D, Copenhagen, v. 59, p. 1447-1453, 2003.

CASTRO, A. M.; PEREIRA J. R, Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CAVALHEIRO, G. F. Catalytic properties of amylolytic enzymes produced by *Gongronella butleri* using agroindustrial residues on solid-state fermentation. **Biomed Research International**, [S. l.], v. 2017, p. 1-8, 2017.

CHAKDAR, H. et al. Bacterial xylanases: biology to biotechnology. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 6, p. 2-15, 2016.

CHANWICHA, N. et al. Purification and characterization of alkaline xylanase from *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* KKU-PN-I2-1 cultivated by solid state fermentation. **Mycoscience**, Tokyo, v. 56, n. 3, p. 309-318, 2015.

CHAPLA, D. et al. Utilization of agroindustrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 49, p. 361–369, 2010.

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

CHAVEZ, R.; BULL, P. e EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 123, n. 4, p. 413-433, 2006.

CHEN, Y. W. et al. Easy fabrication of highly thermal-stable cellulose nanocrystals using $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ catalytic hydrolysis system: a feasibility study from macro to nano-dimensions. **Materials**, Basel, v. 10, p. 2-24, 2017.

CHMELOVÁ, D.; ONDREJOVIC, M. Determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during pretreatment of different biomass sources. **Biotechnology and Food Sciences**, Lodz, v. 1, n. 4, p. 1168-1178, 2012.

CHUTANI, P.; SHARMA, K. K. Biochemical evaluation of xylanases from various filamentous fungi and their application for the deinking of ozone treated newspaper pulp. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 127, p. 54-63, 2015.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 1, p. 3-23, 2005.

CONTE, A. J. et al. Efeito da fitase e xilanase sobre o desempenho e as características ósseas de frangos de corte alimentados com dietas contendo farelo de arroz. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 5, p. 1147-1156, 2003.

CORREIA, M. A. S. et al. Structure and function of an arabinoxylan-specific xylanase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 286, p. 22510–22520, 2011.

CUNHA, L. et al. Optimization of xylanase production from *Aspergillus foetidus* in soybean residue. **Enzyme Research**, London, v. 2018, p. 1-7, 2018.

CUNICO, M. W. M. et al. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 9, p. 23-31, 2008.

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, Philadelphia, v. 3, n. 9, p. 853-859, 1995.

DENISENKO, Y. A. Site-directed mutagenesis of GH10 xylanase a from *Penicillium canescens* for determining factors affecting the enzyme thermostability. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 104, p. 665-671, 2017.

DENNISON, C. **A guide to protein isolation**. Amesterdan: Springer, 2003.

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

DOBREV, G.; ZHEKOVA, B. Purification and characterization of endoxylanase xln-2 from *Aspergillus niger* B03. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 36, p. 7-12, 2012.

DRISS, D. et al. Purification and properties of a thermostable xylanase GH 11 from *Penicillium occitanis* Pol6. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 168, p. 851–863, 2012.

DUARTE, G. C. et al. Use of residual biomass from the textile industry as carbon source for production of a low molecular weight xylanase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Sciences**, Basel, v. 2, n. 4, p. 754-772, 2012.

DUODU, K. G. et al. Factors affecting sorghum protein digestibility. **Journal of cereal science**, London, v. 38, p. 117-131, 2003.

DUTRA-MOLINO, J. V. et al. Biomolecules extracted by atps: practical examples. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, cidade do México, v. 13, p. 359-377, 2014.

EBRINGEROVÁ, A. structural diversity and application potential of hemicelluloses. **Macromolecular symposia**, Heidelberg, v. 232, p. 1-12, 2005.

ELEGBEDE, J. A.; LATEEF. A. Valorization of corn-cob by fungal isolates for production of xylanase in submerged and solid state fermentation media and potential biotechnological applications. **Waste and Biomass Valorization**, Dordrecht, v. 175, n. 3, p. 1-15, 2017.

ERGUN, S. O.; UREK, R. O. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. **Annals of agrarian science**, Amsterdam, v. 15, p. 273-277, 2017.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul: 2010.

FAN, G. et al. Characterization of a highly thermostable glycoside hydrolase family 10 xylanase from *Malbranchea cinnamomea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 70, p. 482-489, 2014.

FANG, U. Y. et al. Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. **Process Biochemistry**, London, v. 43, p. 49-55, 2008.

FANG, W. Characterization of a novel β -glucosidase from *Gongronella sp.* w5 and its application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 62, n. 48, p. 11688–11695, 2014.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 52, p. 179-188, 2015.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FENGXIA, L. et al. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 5938–5941, 2008.

FERREIRA, J. A et al. Zygomycetes-based biorefinery: present status and future prospects. **Bioresource Technology**, Essex, v. 135 p. 523–532, 2013.

FESTUCCI-BUSELLI et al., Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 19, p. 1-13, 2007.

FORTKAMP, D.; KNOB, A. High xylanase production by *Trichoderma viride* using pineapple peel as substrate and its application in pulp biobleaching. **Africa Journal Biotechnology**, Nairobi, v. 13, n. 22, p. 2248-2259, 2014.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biociência**: ciência e desenvolvimento, v. 14, p. 12-16, 2000.

FUWA, H. A. new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 41, p. 583-603, 1954.

GAAVILIGHI, H. A. et al. Effect of selected hydrocolloids on bread staling as evaluated by DSC and XRD. **Journal of Food Technology**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 185–188, 2006.

GAFFNEY, M.; DOYLE, S.; MURPHY, R. Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in solid state fermentation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 73, p. 2640–2644, 2009.

GANGWAR, A. K.; PRAKASH, N.T.; PRAKASH, R. Applicability of microbial xylanases in paper pulp bleaching: A review. **BioResources**, Raleigh, v. 9, n. 2, p. 3733-3754, 2014.

GARCIA-KIRCHNER, O. et al. Submerged fermentation with two filamentous fungi for cellulolytic and xylanolytic enzyme production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 98, p. 1105-1114, 2002.

GHOSHAL, G.; SHIVARE, U. S.; BANERJEE, U. C. Thermo-mechanical and microstructural properties of xylanase containing whole wheat bread. **Food Science and Human Wellness**, Amsterdam, v. 5, p. 219-229, 2016.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GREEN A.A; HUGHES WL. Protein solubility on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. **Methods in Enzymology**, New York, v. 1, p. 67–90, 1955.

GRUBER, K. et al. Thermophilic xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: high resolution x-ray structure and modeling studies. **Biochemistry**, Easton, v. 37, p. 13475-13485, 1998

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 474-480, 2006.

GUIMARÃES, N. C. A et al. Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substract. **Springer Plus**, Cham, v. 2, p. 380, 2013.

GULERIA, S. et al. Mutagenesis of *Cellulosimicrobium sp.* CKMX1 for hyperproduction of xylanase in solid state fermentation of apple pomace. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, Bangalore, v. 85, p. 241–252, 2015.

GULERIA, S. et al. Optimization of cultural conditions for cellulase-free xylanase production by mutant strain of alkalophilic *Cellulosimicrobium sp.* CKMX1 in submerged fermentation. **Applied Biology Research**, New Delhi, v. 15, p. 137-144, 2013.

GUPTA G.; VIKRAM, S.; RAJINDER K. G. Thermal stability and thermodynamics of xylanase from *Melanocarpus albomyces* in presence of polyols and salts. **BioResources**, Raleigh, v. 9, n. 4, p. 5801-5816, 2014.

GUPTA, P.; SAMANT, K.; SAHU, A. Isolation of cellulose degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. **International Journal of Microbiology**, Cairo, v. 2012, p. 1-5, 2012.

GUPTA, V. Production of thermo-alkali-stable laccase and xylanase by co-culturing of *Bacillus* sp. and *B. halodurans* for biobleaching of kraft pulp and deinking of waste paper. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 38, p. 947-956, 2015.

HALTRICH, D. et al. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, Essex, v. 58, p. 137-161, 1996.

HAQUE, M. A.; SHAMS-UD-DIN, M.; HAQUE, A. The effect of aqueous extracted wheat bran on the baking quality of biscuit. **Internacional Journal of Food Science Technology**, v. 37, p. 453–462, 2002.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 48, p. 422-427, 1972.

HASLAM, E. Vegetable tannins: lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 68, p. 2713-2721, 2007.

HASUNUMA, T. et al. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. **Bioresource Technology**, Essex, v. 135, p. 513–522, 2012.

HEINEN, P. R et al. Xylanase from *Fusarium heterosporum*: properties and influence of thiol compounds on xylanase activity. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 13, n. 9, p. 1047-1055, 2014.

HEINEN, P. R. GH11 xylanase from *Aspergillus tamaritii* kita: purification by one-step chromatography and xylooligosaccharides hydrolysis monitored in real-time by mass spectrometry. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 108, p. 291-299, 2018.

HO, L. H. *Aspergillus* xylanases. **Journal of Advances in Microbiology**, [S. 1.], v. 5, p. 1-12, 2017.

HO, L. H. Batch submerged fermentation in shake flask culture and bioreactor: influence of different agricultural residuals as the substrate on the optimization of xylanase production by *Bacillus subtilis* and *Aspergillus brasiliensis*. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, [S. 1.], v. 1, p. 2-9, 2016.

HO, L. H.; LAU, L.Y. Bioprocessing of agricultural wastes as optimised carbon source and optimisation of growth conditions for xylanase production by *Aspergillus brasiliensis* in agitated solid state fermentation (Ssf). **Biodiversity, Bioprospecting and Development**, [S. 1.], v. 1, p. 125, 2014.

HORN, S. V. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, p. 1-12, 2012.

IBARRA, D. et al. Combination of alkaline and enzymatic treatments as a process for upgrading sisal paper-grade pulp to dissolving-grade pulp. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 7416-7423, 2010.

IRFAN, M.; SYED, Q. Partial purification and characterization of xylanase from *Trichoderma viride* produced under SSF. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, San Marcos, v. 5, p. 7-11, 2012.

IRFAN, M.; NADEEM, M.; SYED, Q., One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IR05 in solid-state fermentation **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, Amsterdam, v. 7, p. 317-326, 2014.

IZIDORO, S. C.; KNOB, A. Production of xylanases by an *Aspergillus niger* strain in wastes grain. **Acta Scientiarum: biological sciences**, Maringá, v. 36, n. 3, p. 313-319, 2014.

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

JAIN, I.; KUMAR, I.; SATYANARAYANA, I. Xylooligosaccharides: an economical prebiotic from agroresidues and their health benefits. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 53, p. 131-142, 2015.

JAIN, K. K. et al. Production of thermostable hydrolases (cellulases and xylanase) from *Thermoascus aurantiacus* RCKK: a potential fungus. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 38, p. 787-796, 2015.

JIANG, Z. et al. Improvement of the bread making quality of wheat flour by the hyperthermophilic xylanase from *Thermotoga maritima*. **Food Research International**, Barking, v. 38, p. 37-43, 2005.

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

KALIM, B.; BÖHRINGER, N.; ALI, N.; SCHÄBERLE, F. T. Xylanases—from microbial origin to industrial application. **British Biotechnology Journal**, Gurgaon, v. 7 p. 1-20, 2015.

KAPILAN, R.; ARASARATNAM, V. Industrial applications of bacterial xylanases: a review. **Middle-East Journal of Scientific Research**, Deira, v. 25, p. 79-89, 2017.

KAR, S. et al. Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 36, p. 57-68, 2013.

KAUSHIK P.; MISHRA, A.; MALIK, A. Dual application of agricultural residues for xylanase production and dye removal through solid state fermentation international. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 96 p. 1-8, 2014.

KAWAMOTO, H.; MIZUTANI, K.; NAKATSUBO, F.; Binding nature and desnaturation of protein during interaction with galloylglucose. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 46, p. 473-478, 1997.

KAYA, F.; HEITMANN, J. A.; JOYCE, T. W. Influence of lignin and its degradation products on enzymatic hydrolysis of xylan. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 80, p. 241-247, 2000.

KIM, M.; DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 38, p. 803-807, 2011.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A Conservação do cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 147-154, 2005.

KNOB, A. et al. Agro-residues as alternative for xylanase production by filamentous fungi. **BioResource**, Raleigh, v. 9, p. 5738-5773, 2014.

KNOB, A. Production, purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate. **Biomed Research International**, [S. I.], v. 2013, p. 1-8, 2013.

KNOB, A.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: a novel acidophilic xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 162, n. 2, p. 429-443, 2010.

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

KOMIYA, D. Crystal structure and substrate specificity modification of acetyl xylan esterase from *Aspergillus luchuensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 83 p. 1-13, 2017.

KOZLOVA, L. V.; MIKSHINA, P. V.; GORSHKOVA, T. A. Glucuronoarabinoxylan extracted by treatment with endoxylanase from different zones of growing maize root. **Biochemistry**, Easton, v. 77, p. 395-403, 2012.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 411-456, 1999.

LAFOND, M. et al. Four GH11 xylanases from the xylanolytic fungus *Talaromyces versatilis* act differently on (arabino)xylans. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 98, p. 6339-6352, 2014.

LAFOND, M. et al. GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production. **Microbial Cell Factories**, London, v. 10, p. 4-8, 2011.

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

LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Chemical modification of lignins: towards biobased polymers. **Progress in Polymer Science**, Elmsford, v. 39, p. 1266–1290, 2014.

LEE, J.-W. et al. Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 107, n. 1, p. 33-37, 2009.

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

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. 3.ed. São Paulo: SARVIER, 2000.

LI, H. et al. The hydrolytic efficiency and synergistic action of recombinant xylan-degrading enzymes on xylan isolated from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 175, p. 199–206, 2017.

LI, K. et al. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 27, n. 1/2, p. 89-94, 2000.

LIAO, H. et al. Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Bioresource Technology**, Essex, v. 123, p. 117-124, 2012.

LIAO, H. et al. Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Scientific Reports**, London, v. 5, p. 12631, 2015.

LIAO, H. et al. A new acidophilic endo- β -1,4-xylanase from *Penicillium oxalicum*: cloning, purification, and insights into the influence of metal ions on xylanase activity. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 41, p. 1071–1083, 2014.

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

LÓPEZ, A. M. Q.; SILVA, A. L. S. S.; SANTOS, E. C. L. The fungal ability for biobleaching/biopulping/bioremediation of lignin-like compounds of agro-industrial raw material. **Química Nova**, São Paulo, v. 40, p. 916-931, 2017.

LUCENA-NETO, S. A.; FERREIRA-FILHO, E. G. Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea* var. *Thermoidea*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, p. 86-90, 2004.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, n. 3, p. 506–557, 2002.

MAHALAKSHMI, M.; JAYALAKSHMI, S. Amylase, cellulase and xylanase production from a novel bacterial isolate *Achromobacter xylosoxidans* isolated from marine environment. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, Namakkal, v. 1, p. 230-233, 2016.

MAITAN-ALFENAS, G. P. et al. Characterization and biotechnological application of recombinant xylanases from *Aspergillus nidulans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 91, p. 60–67, 2016.

MARTINS, A. S. et al. Consumo e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com enzimas fibrolíticas. **Revista Brasileira de Zootecnia= Brazilian Journal of Animal Science**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 2118-2124, 2006.

MASUI, D. C. et al. Production of a xylose-stimulated β -glucosidase and a cellulase free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var. *Thermoidea* under solid state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 28, p. 2689–2701, 2012.

MEDEIROS, R. G. et al. Application of xylanases from amazon forest fungal species in bleaching of eucalyptus kraft pulps. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 2, p. 231-238, 2007.

MENDES, I. C. et al. Biological functioning of brazilian cerrado soils under different vegetation types. **Plant and Soil**, The Hague, v. 359, p. 183–195, 2012.

MENEZES, B. S.; ROSSI, D. M.; AYUB, M. A. Z. Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 33, n. 3, p. 58, 2017.

MERALI, Z. et al. Characterization of cell wall components of wheat bran following hydrothermal pretreatment and fractionation. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 8, p. 2-13, 2015.

MICHELIN, M. et al. Purification and biochemical properties of multiple xylanases from *Aspergillus ochraceus* tolerant to Hg^{2+} ion and a wide range of pH. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 174, p. 206–220, 2014.

MILANEZI, N. V. G. et al. Isolation and characterization of a xylan-degrading enzyme from *Aspergillus niger* van Tieghem LPM 93 with potential for industrial applications. **BioEnergy Research**, New York, v. 5, p. 363–371, 2012.

MILLATIA, R. et al. 2nd generation ethanol by Zygomycetes fungi at elevated temperature. **Energy Procedia**, Amsterdam, v. 52, p. 104–109, 2014.

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

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOREIRA, L. R. S. M. et al. Two β xylanases from *Aspergillus terreus*: characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 60, p. 46-52, 2013.

MORETTI, M. M. S. et al. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 1062-1071, 2012.

MORISSON, D.; VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I. The effect of alcohols, lignin and phenolic compounds on the enzyme activity of *Clostridium cellulovorans* XynA. **Bioresources**, Raleigh, v. 6, n. 3, p. 3132–3141, 2011.

MOUKOULI, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cloning and optimized expression of a GH-11 xylanase from *Fusarium oxysporum* in *Pichia pastoris*. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 28, p. 369-374, 2011.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. **Food and Bio-process Technology**, New York, v. 5, p. 657-664, 2012.

NAGAR, S.; MITTAL, A.; GUPTA, V. K. Two way strategy for utilizing agricultural waste 'wheat bran' for production and immobilization of xylanase. **Journal of Innovative Biology**, [S. I.], v. 1, p. 035-044, 2014.

NAIDU, D. S. et al. Bio-based products from xylan: a review. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 179, p. 28–41, 2018.

NAIR, S. G.; SINDHU, R.; SHASHIDHAR, S. Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. **African Journal of Microbiology Research**, [S. I.], v. 2, p. 082-086, 2008.

NORGREN, M.; EDLUND, K. Lignin: recent advances and emerging applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, London, v. 19, p. 409-416, 2014.

NOVAES, C. G. et al. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfícies de resposta: - parte I: variáveis de processo. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 9, p. 3, 2017.

OGEDA, T. L.; E PETRI, D. F. S Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OKAZAKI, F. Expression, crystallization and preliminary x-ray diffraction studies of thermostable b-1,3-xylanase from *Thermotoga neapolitana* strain DSM 4359. **Acta Crystallographica**, Copenhagen, v. 67, p. 779–781, 2011.

OLIVEIRA, D. S. et al. Production of crude xylanase from *Thermoascus Aurantiacus* CBMAI 756 aiming the baking process. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 75, n. 7, p. C588-C594, 2010.

OLIVEIRA JÚNIOR, S. D. **Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substrato**. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande de Norte, Natal, Rio Grande de Norte, 2014.

PAËS, G.; BERRIN, J. G.; BEAUGRAND. J. A GH11 xylanases: structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, p. 564–592, 2012.

PAL, A.; KHANUM, F. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. **Process Biochemistry**, London, v. 46, p. 879-887, 2011.

PALAVESAM, A. Investigation on lignocellulosic saccharification and characterization of haloalkaline solvent tolerant endo-1,4 β -D-xylanase from *Halomonas meridiana* APCMST-KS4. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdam, v. 4, p. 761–766, 2015.

PANDEY, A. K.; EDGARD, G. NEGI, S. Optimization of concomitant production of cellulase and xylanase from *Rhizopus oryzae* sn5 through evop-factorial design technique and application in sorghum stover based bioethanol production. **Renewable Energy**, Oxford, v. 98, p. 51-56, 2016.

PENG, F. et al. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, p. 879–903, 2012.

PEREIRA, H.; GRAÇA, J.; RODRIGUES, J. C. Wood chemistry in relation to quality. In: **Wood quality and its biological basis**. Oxford: Ed. Barnett J. R.; Jeronimidis G. CRC Press, 2003. p. 53-86.

POINTNER, M. et al. Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels. **Agronomy Research**, Tartu, v. 12, p. 391–396, 2014.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties e industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 67, p. 577-591, 2005.

POLIZELI, M. L. T. M.; NOGUEIRA-PEIXOTO, S. C., SILVA, T. M. et al. Gel electrophoresis. In: **Gel electrophoresis for investigating enzymes with biotechnological application**. EUA: Sameh Magdeldin, 2012. p. 98-109.

POLLET, A. et al. Functional analysis of glycoside hydrolase family 8 xylanases shows narrow but distinct substrate specificities and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, p. 2125–2135, 2010.

PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and indentification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v. 65, n. 4, p. 463-467, 1987.

PU, Y. P. et al. Challenges of the utilization of wood polymers: how can they be overcome? **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, p. 1525–1536, 2011.

QUERIDO, A. L. S. **Purificação parcial e caracterização da xilanase produzida por *Penicillium expansum***. 2002. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2010.

RAGAUSKAS, A. J. et al. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. **Science**, Washington, v. 16, n. 344, p. 6185, 2014.

RAMIRES, E. C. **Biocompósitos a partir de matrizes poliméricas baseadas em lignina, tanino e glixal reforçadas com fibra naturais**. 2010. 277 f. Tese (Doutorado Engenharia Química) Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biology of plants**. New York: Worth Publ., 2001.

RETORE, M. et al. Efeito da fibra de coprodutos agroindustriais e sua avaliação nutricional para coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia= Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, Belo Horizonte, v. 62, n. 5, p. 1232-1240, 2010.

RIBEIRO, L. F. C. A novel thermostable xylanase GH10 from *Malbranchea pulchella* expressed in *Aspergillus nidulans* with potential applications in biotechnology. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 7, p. 115, 2014.

ROY, S. et al. Novel xylanases from *Simplicillium obclavatum* MTCC 9604: comparative analysis of production, purification and characterization of enzyme from submerged and solid state fermentation. **Springer plus**, Cham, v. 2, p. 382, 2013.

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

SAHA, S. P.; GHOSH, S. Optimization of xylanase production by *Penicillium citrinum* xym2 and application in saccharification of agro-residues. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdam, v. 3, p. 188-196, 2014.

SAINZ-POLO, M. A. et al. Structural analysis of glucuronoxylan-specific xyn30D and its attached CBM35 domain gives insights into the role of modularity in specificity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 31088-31101, 2014.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, p. 185-194, 2009.

SANDRIM, V. C. et al. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 1823–1828, 2005.

SANTOS, F. R. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 56-62, 2014.

SANTOS, F. R. S. et al. Production and characterization of β -glucosidase from *Gongronella butleri* by solid-state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 15, p. 633-641, 2016.

SANTOS, L. F.; ISHII, P. L. Xilanases: principais metodologias e parâmetros cinéticos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 2, n. 2, p. 7-15, 2011.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 30, n. 12. p. 3875-3883, 1991.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 263-289, 2010

SEEMAKRAM, W. et al. Purification and characterization of low molecular weight alkaline xylanase from *Neosartorya tatenoi* kku-clb-3-2-4-1. **Mycoscience**, Tokyo, v. 57, p. 326-333, 2016.

SENNA, S. N. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de xilanases e celulasas utilizando resíduos agroindústrias**. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2014.

SHAH, A. R.; AND MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 1763-1771, 2005.

SHAHRESTANI, H. Enzymatic clarification of fruit juices using xylanase immobilized on 1,3,5-triazine-functionalized silica-encapsulated magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 109, p. 51-58, 2016.

SHARMA, A. et al. Xylanase and laccase based enzymatic kraft pulp bleaching reduces adsorbable organic halogen (AOX) in bleach effluents: a pilot scale study. **Bioresource Technology**, Essex, v. 169, p. 96-102, 2014.

SHARMA, H. P.; PATEL, H.; SHARMA, S. Enzymatic extraction and clarification of juice from various fruits:-a review. **Trends in Post Harvest Technology**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 01-14, 2014.

SHIMIZU, K., 2001. Chemistry of hemicelluloses. In: **Wood and cellulosic chemistry**. New York: 2 ed. D.N.-S. Hon, N. Shiraishi, Marcel Dekker Inc, 2001. p. 177-214.

TORTORA, G.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 8 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2012.

SHRIVASTAVA, S.; SHUKLA, P.; MUKHOPADHYAY, K. Purification and preliminary characterization of a xylanase from *Thermomyces lanuginosus* strain SS-8. **3 Biotech**, Heidelberg, v. 1, p. 255–259, 2011.

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

SILVA, C. O. G. et al. GH11 xylanase from *Emericella nidulans* with low sensitivity to inhibition by ethanol and lignocellulose-derived phenolic compounds. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 362, p. 1-8, 2015.

SILVA, N. F. S et al. Improvement in the bleaching of kraft pulp with xylanase from *Penicillium crustosum* FP 11 isolated from the atlantic forest. **Biocatalysis and Biotransformation**, Amsterdam, v. 34, p. 119-127, 2016.

SILVA, D. F. Evaluation of different biological and chemical treatments in agroindustrial residues for the production of fungal glucanases and xylanases. **Process Biochemistry**, London, v. 67, p. 29-37, 2018.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SILVA, S. S. et al. R.B. Extração e caracterização de xilanas de sabugos de milho. **Polímeros: ciência e tecnologia**, São Carlos, v. 98, p. 25-33, 1998..

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass: – an overview. **Bioresource Technology**, Essex, v. 199, p. 76-82, 2016.

SINGH, R.; KAPOOR, V.; KUMAR, V. Utilization of agro-industrial wastes for the simultaneous production of amylase and xylanase by thermophilic Actinomycetes. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, p. 1545-1552, 2012.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, Heidelberg, v. 6, p. 174, 2016.

SINGHANIAA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, p. 13-18, 2009.

SIQUEIRA, F. G.; E.X.FERREIRA. FILHO, E. X. Plant cell wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, [S. l.], v. 7, p. 54-60, 2010.

SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulosic bionanocomposites: a review of preparation, properties and applications. **Polymers**, [S. l.], v. 2, p. 728-765, 2010.

SISSI, C.; PALUMBO, M. Effects of magnesium and related divalent metal ions in topoisomerase structure and function. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, p. 702-711, 2009.

SOCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, Amsterdam, v. 2. p. 1-20, 2017.

SOOCH, B. S; KAULDHAR, B. S. Influence of multiple bioprocess parameters on production of lipase from *Pseudomonas sp.* BWS-5. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, p. 711-721, 2013.

SOREK, N. et al. The implications of lignocellulosic biomass chemical composition for the production of advanced biofuels. **BioScience**, Washington, v. 64, p. 192-201, 2014.

SORGATTO, M. et al. Purification and characterization of an extracellular xylanase produced by the endophytic fungus, *Aspergillus terreus*, grown in submerged fermentation. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, p. 8076-8084, 2012.

SRIDEVI. A. Biocatalytic activity of *Aspergillus niger* xylanase in paper pulp biobleaching. **3 Biotech**, Heidelberg, v. 6, p. 3-7, 2016.

STROPARO, E. C. et al. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 33, p. 2267-2278, 2012.

SUBRAMANIYAM, R.; AND VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of Science and Nature**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 480-486, 2012.

- SULEMAN, M. Production and characterization of xylanase from *Aspergillus niger* using wheat bran, corn cobs, and sugar cane bagasse as carbon sources with different concentrations. **Journal of Bioresource Management**, Dayton, v. 3, p. 1-10, 2016. DE1 1
- SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, Essex, v. 199, p. 49–58, 2016.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
- TAKAHASHI, Y.; KAWABATA, H.; MURAKAMI, S. Analysis of functional xylanases in xylan degradation by *Aspergillus niger* E-1 and characterization of the GH family 10 xylanase XynVII. **SpringerPlus**, Cham, v. 2, p. 447, 2013.
- TAN, S. C. et al. The chitosan yield of Zygomycetes at their optimum harvesting time. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 30 p. 239-242, 1996.
- TAVERNARI, F. C. et al. Polissacarídeo não-amiláceo solúvel na dieta de suínos e aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, v. 5, p. 673–689, 2008.
- TERRASAN, C. R. F.; GUIBAN, J. M.; CARMONA, E. C. Xylanase and β -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: purification, characterization and hydrolysis of substrates. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 54-62, 2016.
- TERRONE, C. C. et al., Agroindustrial biomass for xylanase production by *Penicillium chrysogenum*: purification, biochemical properties and hydrolysis of hemicelluloses. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 33, p. 39-45, 2018.
- THAKUR, V. K; THAKUR, M. K. Recent advances in green hydrogels from lignin: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 72, p. 834–847, 2015.
- TORTORA, G.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 8 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2012.
- UDAY, U. S. P et al. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 82 p. 1041–1054, 2016.
- URBANIKOVA, L. et al. Structural basis for substrate recognition by *Erwinia chrysanthemi* GH30 glucuronoxylanase. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 278, p. 2105-2116, 2011.
- VALENZUELA, S. V. et al. The glycoside hydrolase family 8 reducing-end xylose releasing exo-oligoxylanase rex8A from *Paenibacillus barcinonensis* BP-23 is active on branched xylooligosaccharides. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 82, p. 5116-5124, 2016.

VENTORIM, R. Z. Impact of the removal of N-terminal non-structured amino acids on activity and stability of xylanases from *Orpinomyces* sp. PC-2. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 106, p. 312–319, 2018.

VIKARI, L. et al. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Berlin, v. 108, p. 121–145, 2007.

VITCOSQUE, G. L. et al. The functional properties of a xyloglucanase (GH12) of *Aspergillus terreus* expressed in *Aspergillus nidulans* may increase performance of biomass degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 100, p. 9133-9144, 2016.

WALIA, A. et al. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotechnology**, Heidelberg, v. 7, p. 2-12, 2017.

WALIA, A. et al. Improvement for enhanced xylanase production by *Cellulosimicrobium cellulans* CKMX1 using central composite design of response surface methodology and its application in biobleaching. **3 Biotechnology**, Heidelberg, v. 5, p. 1053–1066, 2015a.

WALIA, A. et al. Modification in the properties of paper by using cellulase-free xylanase produced from alkalophilic *Cellulosimicrobium cellulans* CKMX1 in biobleaching of wheat straw pulp. **Canadian Journal of Microbiology= Revue canadienne de microbiologie**, Ottawa, v. 61, p. 1-11, 2015b.

WAN, Q. et al. Direct determination of protonation states and visualization of hydrogen bonding in a glycoside hydrolase with neutron crystallography. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 112, p. 12384–12389, 2015.

WINGFIELD, P. T. Protein precipitation using ammonium sulfate. **Current Protocols in Protein Science**, New York, v. 3 p. 2-10, 2016.

WONG, D. W. S.; CHAN, V. J.; BATT, S. B. Cloning and characterization of a novel exo- α -1,5-L-arabinanase gene and the enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 79, p. 941–949, 2008.

WONG, K. K. Y. ; TAN, L. U. L.; SADDLER J. N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms, functions and applications. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 52 n. 3 p. 305-317, 1988.

XIMENES, E. et al. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 48, p. 54-60, 2011.

YANG, Q. et al. Identification of three important amino acid residues of xylanase AfxynA from *Aspergillus fumigatus* for enzyme activity and formation of xylobiose as the major product. **Process Biochemistry**, London, v. 50, p. 571-581, 2015.

YANG, X et al. Two xylose-tolerant gh43 bifunctional β -xylosidase/ α -arabinosidases and one gh11 xylanase from *Humicola insolens* and their synergy in the degradation of xylan. **Food Chemistry**, London, v. 148, p. 381-387, 2014.

YANG, Y. et al. Purification and characterization of an extracellular xylanase from *Aspergillus niger* C3486. *African Journal of Microbiology Research*, [S. l.], v. 4, p. 2249-2256, 2010.

YEGIN, S. Single-step purification and characterization of an extreme halophilic, ethanol tolerant and acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* nr1 y-2311-1 with application potential in the food industry. **Food Chemistry**, London, v. 221, p. 67-75, 2017.

YEOMAN, C. J. et al. Chapter 1. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 70, p. 1-55, 2010.

ZANGH, P.; LYND, R. L. Toward and aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplex cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 8, n. 7, p. 797-824, 2004.

ZANUNCIO, A. J.V. ; COLODETTE, J. L. Teores de lignina e ácidos urônicos na madeira e polpa celulósica de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 2, p. 341-347, 2011.

ZHANG, G. M. et al. Molecular cloning and heterologous expression of a new xylanase gene from *Plectosphaerella cucumerina*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, p. 339–346, 2007.

ZHANG, H; SANG, Q. Production and extraction optimization of xylanase and β -mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 97, p. 101-110, 2015.

ZHANG, Y. et al. Structure features of GH10 xylanase from *Caldicellulosiruptor bescii*: implication for its thermophilic adaptation and substrate binding preference. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Shanghai, v. 48, n. 10, p. 948–957, 2016.

ZHOU, X. et al. A critical review on hemicellulose pyrolysis. **Energy Technology**, Stockholm, v. 5, p. 52–79, 2016.

ZIMBARDI, A. L. R. L. et al. Optimization of β -glucosidase, β -xylosidase and xylanase production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, p. 2875-2902, 2013.