



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Jéssica de Araújo Zanoni

Produção, isolamento e caracterização bioquímica de xilanases
produzidas pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* por cultivo em
estado sólido

São José do Rio Preto
2017

Jéssica de Araújo Zanoni

Produção, isolamento e caracterização bioquímica de xilanases
produzidas pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* por cultivo em
estado sólido

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre 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.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla
Rodriguez

Coorientadora: Profa. Dra. Eleni Gomes

São José do Rio Preto
2017

Zanoni, Jéssica de Araujo.

Produção, isolamento e caracterização bioquímica de xilanases produzidas pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* por cultivo em estado sólido / Jéssica de Araujo Zanoni. -- São José do Rio Preto, 2017

98 f. : il., tabs.

Orientador: Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

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

1. Microbiologia industrial. 2. Enzimas de fungos - Aplicações industriais. 3. Xilanases. 4. Fungos termofílicos. 5. Bioquímica. 6. Termodinâmica. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 663.15

Jéssica de Araujo Zanoni

Produção, isolamento e caracterização bioquímica de xilanases
produzidas pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* por cultivo em
estado sólido

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre 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.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas / UNESP – São José do
Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP – São Paulo

Dr. Luciano Takeshi Kishi
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / UNESP - Jaboticabal

São José do Rio Preto
2017

Agradecimentos

Ao meu orientador, professor Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez pela oportunidade, orientação, paciência e confiança em meu trabalho.

A minha co-orientadora, professora Eleni Gomes, pela disponibilidade e apoio ao meu trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Gabi, Emily, Camila, Vanessa, Sirlene, Júlia, André e Flávio, pela companhia diária e os momentos de conversas compartilhando bons resultados e resultados frustrados.

Aos queridos alunos que iniciaram no laboratório acompanhando minhas atividades e me ajudando no desenvolvimento de algumas delas, Matheus, Isa, Priscila e Guilherme.

Aos colegas do grupo IPBEN, em especial Bel, Diego, Josi, Pedro, Carol e Olavo, por compartilharem suas experiências e conhecimentos.

A Eliani do laboratório didático, por sempre me ajudou quando precisei.

A minha mãe, que sempre me apoiou e me incentivou a aprender sempre mais. Serei eternamente grata por seus esforços em me encorajar.

A minha irmã, por sempre acreditou em mim e me fazer acreditar em mim mesma.

Ao meu pai, que de onde estiver eu sei que sempre olhou e cuidou de mim.

Aos meus familiares pelas orações e amor, e aos amigos queridos pelo apoio.

Ao meu querido Daniel por seu carinho e total apoio, cujo companheirismo, amizade, paciência, compreensão, amor, e alegria, foram essenciais para concretização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo auxílio financeiro.

“O conhecimento é uma ferramenta, e como todas as ferramentas, o seu impacto está nas mãos de quem o usa. “

Dan Brown

RESUMO

O complexo enzimático xilanolítico é responsável por hidrolisar as ligações glicosídicas entre os monômeros constituintes da xilana, sendo esta um polissacarídeo presente na porção hemicelulolítica das paredes celulares vegetais, e suas enzimas se destacam pelas diversas aplicações industriais. O objetivo do projeto foi efetuar a caracterização e isolamento das xilanases produzidas pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* em cultivo em estado sólido. Foram realizados ensaios para avaliar os efeitos do pH, da temperatura, de diversas substâncias químicas, cátions e compostos fenólicos na atividade enzimática. A estimativa da massa molecular foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e por cromatografia de filtração em gel em resina Sephadex G-75. Como valor ótimo para o extrato enzimático bruto obteve-se 5,5 e 7,0 para o pH, e 80°C para a temperatura ótima em incubação de 4 minutos. Em relação à estabilidade do extrato bruto, os maiores valores ocorreram entre as faixas de pH de 4 a 5,5, e 50°C para temperatura. Todos os reagentes testados apresentaram diminuição da atividade enzimática sobre o extrato bruto, por outro lado, o agente quelante EDTA aumentou 4%. Os cátions testados aumentaram (Na^+ , K^+ , Cd^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+}) ou diminuíram (Zn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Ba^{2+} , Li^+ , Co^{2+} , Cr^{3+} e Cu^{2+}) a atividade. Em relação aos compostos fenólicos, somente o ácido tânico induziu decréscimo da atividade xilanolítica do extrato bruto. O pI foi estimado em 6,5 por focalização isoelétrica em gel de agarose. A massa molecular das isoformas por filtração em gel não pôde ser estimada devido a uma interação inespecífica da xilanase de maior massa molecular com a resina Sephadex. Pela análise de SDS-PAGE é possível observar que todas as isoformas se encontram abaixo de 45 kDa. Na análise por zimografia observou-se a presença de quatro xilanases, que foram isoladas pela extração do gel de poliacrilamida. Todas se mostraram mais ativas em pH 5,5 quando comparadas em pH 7,0. Avaliaram-se os parâmetros termodinâmicos da xilanase isolada C, que demonstrou mais de 6 horas à 80°C como tempo de meia vida, e elevada resistência estrutural à desnaturação térmica quando avaliados os resultados de entropia, energia de ativação e entalpia.

Palavras-chave: Xilanases. *Rasamsonia emersonii*. Caracterização bioquímica. Termodinâmica.

ABSTRACT

The xylanolytic enzyme complex is responsible for hydrolyzing glycosidic bonds between the monomers of xylan, being a polysaccharide present of the hemicellulolitic in plant walls. These enzymes standing out because have many industrial applications. The objective of this investigation was to characterize and isolate the xylanases present in the crude extract produced by the thermophilic fungus *Rasamsonia emersonii* in solid state cultivation. Tests were performed to evaluate the effects of pH, temperature, various chemicals and cations on enzymatic activity, determining optimal conditions and stability of the enzymes. The molecular weight estimation was performed by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and gel filtration chromatography on Sephadex G-75 resin. Optimum pH values obtained were 5.5 and 7.0 and 80°C for the optimum temperature for a 4 minutes incubation for the crude enzyme extract. Regarding the stability of the crude extract, the highest values occurred between the ranges of 4 to 5.5 for pH, and 50°C for thermal stability. All the reagents tested showed enzymatic inhibition on the crude extract, on the other hand, the chelating agent EDTA increased enzyme activity by 4%. The tested cations increased (Na^+ , K^+ , Cd^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+}) or decreased (Zn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Ba^{2+} , Li^+ , Co^{2+} , Cr^{3+} and Cu^{2+}) activity. In relation to the phenolic compounds, only tannic acid induced a decrease in the xylanolytic activity of the crude extract. The pI was estimated to be around 6.5 by isoelectric focusing on agarose gel. The molecular mass of the isoforms by gel filtration could not be estimated due to a non-specific interaction of the higher molecular weight xylanase with the Sephadex gel filtration chromatography resin. By SDS-PAGE analysis it is possible to observe that all isoforms are of low molecular mass, below 45 kDa. In the electrophoretic analysis by zymography it was possible to observe the presence of four xylanases, which were isolated by extracting the enzymes from the polyacrylamide gel. All isolated xylanases were more active at pH 5.5 when compared to activities at pH 7.0. The thermodynamic parameters of the xylanase isolated C were evaluated, showing high values of half life, more than 6 hours at 80°C, and high structural resistance to thermal denaturation when the results of entropy, activation energy and enthalpy were evaluated.

Keywords: Xylanase. *Rasamsonia emersonii*. Biochemical characterization. Thermodynamic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Relação entre temperatura e crescimento de microrganismos de diferentes classes térmicas. (MADIGAN et al., 2010)	19
Figura 2.	Ligações de hidrogênio presentes nas regiões cristalinas da fibra de celulose. (SANTOS et al., 2012)	24
Figura 3.	Representação esquemática de algumas das ligações entre carbono (vermelho) e ligações ésteres (azul) entre os fenilpropanóides constituintes da lignina de eucalipto. Adaptado (SANTOS et al., 2012)	25
Figura 4.	Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses. (Rabelo, 2010 <i>apud</i> Fengel e Wegener, 1989)	26
Figura 5.	Componentes extraídos da hemicelulose e produtos alvos de estudos. (SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALES, 2001)	27
Figura 6.	Figura 7. Representação esquemática das principais enzimas envolvidas no processo de degradação da xilana. Adaptado (Beg et al., 2001)	29
Figura 7.	Curva de produção de xilanase pelo fungo termofílico <i>R. emersonii</i> por cultivo em estado sólido a 55°C. A barra representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.	49
Figura 8.	Atividade enzimática de xilanases de <i>R. emersonii</i> após 24 horas em variadas temperaturas de armazenamento na presença e na ausência de 50% de glicerol. A barra representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.	52
Figura 9.	Velocidade inicial de reação das xilanases produzidas pelo fungo termofílico <i>R. emersonii</i> para determinação do tempo de incubação. O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.	54
Figura 10.	Efeito do pH sobre a atividade xilanolítica. Estabilidade em relação ao pH e pH ótimo. O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.	56
Figura 11.	Zimograma de xilanases presentes no extrato enzimático bruto produzido pelo fungo <i>R. emersonii</i> . O gel foi corado com 0,1% de vermelho Congo e escorado com NaCl 1 mol L ⁻¹ . As bandas claras evidenciam a presença de xilanase.	57

Figura 12.	Efeito do pH sobre a atividade para xilanases produzidas pelo fungo <i>R. emersonii</i> , isoladas por eletroforese em gel de poliacrilamida.	59
Figura 13.	Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade xilanólítica de <i>R. emersonii</i> . Os ensaios foram executados em tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,5 com 1 % (m/v) de xilana. O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.	60
Figura 14.	Efeito da temperatura de pré-incubação em diversos tempos sobre a atividade xilanólítica. O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.	71
Figura 15.	Teste de estabilidade de Selwyn para xilanases presente em extrato enzimático produzido pelo fungo termofílico <i>R. emersonii</i> . As curvas dos diferentes fatores de diluição estão representados por 2 (■), 5 (●) e 10 (▲). O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.	72
Figura 16.	Gel de SDS-PAGE (gel de corrida a 10% e gel de empilhamento a 5 % de poliacrilamida) a coluna 1 corresponde aos marcadores de massa molecular <i>Low Range</i> (6,5 – 66 kDa), a segunda coluna corresponde ao extrato enzimático bruto com tampão de amostra na presença de SDS e sem exposição à fervura, e a terceira coluna corresponde ao extrato enzimático bruto em tampão de amostra com SDS e exposta a +/- 5 minutos de fervura (100°C) antes de ser aplicado ao gel.	73
Figura 17.	Gráfico de Fischer do logaritmo da massa molecular dos padrões em função da Migração relativa em gel de poliacrilamida.	75
Figura 18.	Gráfico de Fischer (DENNISON, 2003) do logaritmo da massa molecular dos padrões vs. o coeficiente de partição Kav obtido por cromatografia de filtração em gel com resina Sephadex G-75.	76
Figura 19.	Perfil de eluição na filtração em gel do extrato enzimático de <i>R. emersonii</i> aplicado a uma coluna GE XK-16/100 com Sephadex G-75 operada em sistema <i>Äkta Purifier</i> . A linha azul representa os valores de absorbância em 280 nm, e a linha rosa os valores de absorbância em 540 nm após quantificação de açúcares redutores resultantes da atividade enzimática.	77
Figura 20.	Zimograma das frações de eluição da cromatografia de filtração em gel, em gel de poliacrilamida, corado com 0,1% (m/v) de vermelho congo, e descorado com NaCl 1 mol.L ⁻¹ . Os números representam os tubos analisados das frações coletadas.	79

Figura 21.	Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (E_a) e temperatura ótima da xilanase C isolada.	82
Figura 22.	Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura na atividade da Xilanase C isolada.	83
Figura 23.	Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica (E_{a_d}) da Xilanase C isolada.	84
Figura 24.	Temperatura de fusão da xilanase C isolada produzida pelo fungo termofílico <i>R. emersonii</i> por cultivo em estado sólido. A temperatura de fusão é considerada a temperatura na qual a atividade da enzima cai pela metade do seu máximo.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Técnicas de purificação de xilanases a partir de microrganismos e o tipo de cultivo utilizado para produção enzimática.	33
Tabela 2.	Efeito de substâncias químicas na concentração de 10 mmol L ⁻¹ sobre a atividade de xilanases presentes em extrato bruto produzido pelo fungo termofílico <i>R. emersonii</i> . (*) diferença significativa em relação ao controle, pelo teste t de Student para amostras independentes.	62
Tabela 3.	Efeito de íons clorados na concentração de 10 mmol L ⁻¹ sobre a atividade de xilanases presente em extrato bruto produzido pelo fungo termofílico <i>R. emersonii</i> . (*) diferença significativa em relação ao controle, pelo teste t de Student para amostras independentes.	66
Tabela 4.	Efeito de compostos fenólicos na concentração de 10 mmol L ⁻¹ sobre a atividade de xilanases presente em extrato bruto produzido pelo fungo termofílico <i>R. emersonii</i> . (*) diferença significativa em relação ao controle, pelo teste t de Student para amostras independentes.	68
Tabela 5.	Análise da atividade das xilanases produzidas pelo fungo termofílico <i>R. emersonii</i> sobre diferentes substratos. ND: não detectada.	80
Tabela 6.	Coeficientes de temperatura (Q ₁₀) da xilanase C estimados com base no Gráfico de Arrhenius.	82
Tabela 7.	Parâmetros termodinâmicos da termo inativação irreversível da Xilanase C isolada.	84

ABREVIATÖES

Asn	Asparagina
CES	Cultivo em Estado Sólido
CMC	Carboximetilcelulose
CSm	Cultivo Submerso
D.P.	Desvio padrão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
DSM	<i>DSM Food Specialties</i>
DTT	Ditiotreitol
Ea	Energia de ativação (K J mole ⁻¹)
Ea _(d)	Energia de ativação da desnaturação (K J mole ⁻¹)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Glu	Glutamato
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
<i>h</i>	Constante de Planck (J s)
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência (<i>High performance liquid chromatography</i>)
K	Unidade básica da temperatura termodinâmica (°C + 273,15)
<i>k_d</i>	Taxa de primeira ordem da inativação térmica (minuto ⁻¹)
<i>K_b</i>	Contante de Boltzmann (J K ⁻¹)
Kav	Coeficiente de distribuição em cromatografia
kDa	Quilodalton
ln	Logaritmo natural
log	Logaritmo decimal
MES	Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico
MWCO	Molecular weight cut-off (kDa)
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto ou pH isoeletrico

pNPG	p-nitrofenil- α -D-glicopiranosideo
pNPX	p-nitrofenil- β -D-xilanopiranosideo
Q_{10}	Coeficiente de temperatura
R	Constante universal dos gases ($\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$)
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
$T_{1/2}$	Tempo de meia vida (minutos)
T	Temperatura absoluta em Kelvin
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
V_e	Volume de eluição (mL)
V_o	Volume de exclusão (mL)
V_t	Volume total (mL)
Xil A	Xilanase A
Xil B	Xilanase B
Xil C	Xilanase C
Xil D	Xilanase D
xg	Força centrífuga relativa
ΔH_d	Entalpia de ativação da desnaturação térmica (K J mole^{-1})
ΔG_d	Energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica (K J mole^{-1})
ΔS_d	Entropia de ativação da desnaturação térmica (K J mole^{-1})

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1.	Microbiologia industrial	19
2.2.	Microrganismos termofílicos	19
2.3.	Reino Fungi	21
2.4.	<i>Rasamsonia emersonii</i>	22
2.5.	Resíduos agroindustriais	23
2.5.1.	Biomassa lignocelulósica	24
2.5.1.1.	Celulose	24
2.5.1.2.	Lignina	25
2.5.1.3.	Hemicelulose	26
2.5.1.3.1.	Bioconversão da hemicelulose	28
2.6.	Xilanases	29
2.7.	Produção de enzimas	31
2.8.	Purificação de enzimas	33
3.	JUSTIFICATIVA	35
4.	OBJETIVOS	36
5.	MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1.	Pré- inóculo	37
5.2.	Cultivo em Estado Sólido (CES)	37
5.3.	Extração e Clarificação	37
5.4.	Ensaio enzimático	38
5.4.1.	Quantificação de açúcares redutores	38
5.4.1.1.	Ensaio enzimático em tubos de ensaio	38
5.4.1.2.	Ensaio enzimático em microplacas	39
5.4.2.	Determinação de β-xilanases e β-glicosidases	39
5.5.	Determinação do tempo de incubação	40
5.6.	Determinação do pH ótimo	40
5.7.	Determinação da Temperatura ótima	40
5.8.	Estabilidade em relação ao pH	40
5.9.	Estabilidade térmica	41
5.10.	Avaliação das melhores condições de armazenamento	41
5.11.	Efeito de íons e reagentes sobre a atividade xilanolítica	41

5.12.	Efeito de compostos fenólicos sobre a atividade xilanolítica	42
5.13.	Determinação do ponto isoelétrico	42
5.14.	Teste de inativação de Selwyn	43
5.15.	Análises eletroforéticas: SDS-PAGE	43
5.16.	Análises eletroforéticas: Zimograma	44
5.17.	Estimativa da massa molecular em condições não desnaturantes	44
5.18.	Isolamento de xilanases presentes no extrato enzimático bruto	45
5.19.	Substrato específico de catálise	45
5.20.	Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível	46
5.20.1.	Caracterização quanto à temperatura ótima	46
5.20.1.1.	Cálculo da energia de ativação	46
5.20.1.2.	Cálculo do coeficiente da temperatura	47
5.20.2.	Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível	47
5.20.2.1.	Tempo de meia vida	47
5.20.2.2.	Energia de ativação da desnaturação térmica	48
5.20.2.3.	Entalpia de ativação da desnaturação térmica ΔH_D (K J mole ⁻¹)	48
5.20.2.4.	Energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica ΔG_D (K J mole ⁻¹)	48
5.20.2.5.	Entropia de ativação da desnaturação térmica ΔS_D (K J mole ⁻¹)	49
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6.1.	Curva de produção: Cultivo em Estado Sólido	50
6.2.	Determinação das condições de armazenamento	52
6.3.	Determinação do tempo de incubação	54
6.4.	Avaliação dos efeitos de pH sobre a atividade xilanolítica: pH ótimo e estabilidade de pH	56
6.5.	Avaliação dos efeitos da temperatura sobre a atividade xilanolítica: Temperatura ótima e estabilidade térmica	59
6.6.	Efeito de íons e reagentes sobre a atividade xilanolítica	62
6.7.	Efeito de compostos fenólicos sobre a atividade xilanolítica	68
6.8.	Determinação do ponto isoelétrico	70
6.9.	Teste de estabilidade de Selwyn	71
6.10.	Estimativa da Massa Molecular em condições desnaturantes	72
6.11.	Estimativa da massa molecular em condições não desnaturantes	75
6.12.	pH ótimo de catálise para as xilanases isoladas	79

6.13. Análise da atividade xilanolítica das xilanases isoladas sobre diferentes substratos	81
6.14. Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível	82
7. CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1. INTRODUÇÃO

O clima do planeta vem sofrendo alterações perceptíveis que aparentemente são explicáveis pelo fenômeno denominado “aquecimento global” devido à contínua e crescente liberação de carbono fóssil na atmosfera, em particular a partir da Revolução Industrial, no século XIX. A comunidade internacional tem mostrado, em face dessa realidade, uma preocupação cada vez maior com o uso de energia limpa e/ou renovável, conceito amplo no qual se enquadram os biocombustíveis, e dentro destes o bioetanol ou etanol de segunda geração. Sua obtenção é possível através da fermentação de açúcares liberados pela ação de enzimas a partir de resíduos vegetais (MENDONÇA, 2015; ROSSET; PORTO, 2015).

O termo “material lignocelulósico” refere-se à constituição da parede celular vegetal, a qual é composta por fibrilas de celulose envoltas por uma espécie de camada protetora de hemicelulose e lignina, ligadas covalentemente de forma a garantir rigidez à parede celular e maior resistência à degradação microbiana (JEFFRIES, 1991).

A celulose é o principal e mais abundante constituinte da parede vegetal, considerada um homopolissacarídeo por ser formada por repetidas unidades de D-glicose com ligações glicosídicas β -1,4 entre si.

O segundo polissacarídeo mais abundante na parede celular vegetal é a hemicelulose, sendo composta por diferentes monômeros, incluindo pentoses (D-xilose, L-arabinopiranosose, L-arabinofuranose), hexoses (D-glicose, D-manose, D-galactose), ácidos hexurônicos (D-glicurônico, D-4-O-Metilglicurônico, D-galacturônico) e desoxi-hexoses (L-ramnose e L-fucose) (RABELO, 2010) ligados entre si, resultando em um heteropolissacarídeo com ramificações.

Sendo a xilana o principal constituinte das hemiceluloses, as enzimas capazes de degradar esse polissacarídeo são conhecidas como xilanases, que hidrolisam as ligações glicosídicas β (1-4) presentes na cadeia da xilana produzindo xilo-oligossacarídeos, os quais são convertidos em xilose pelas β -xilosidases (POLIZELI et al., 2005).

Porém devido à heterogeneidade e complexidade estrutural da xilana, que contém resíduos de β -D-xilopiranosídeo unidos por ligações glicosídicas β -1-4, e geralmente associados a outros açúcares, formando glicuronoxilanas,

glicuronoarabinosilanas, glicomananas, arabinogalactanas e galactoglicomananas, sua completa hidrólise requer uma ampla variedade de enzimas agindo sinergicamente para realizar a conversão em unidades de seus dissacarídeos e monossacarídeos constituintes (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999).

As enzimas do complexo xilanolítico vêm sendo amplamente utilizadas pela indústria em diferentes processos. Por exemplo, na indústria papelreira são adotadas na etapa de branqueamento em substituição ao cloro, pois promovem a remoção da xilana ligada ao complexo lignina-carboidrato facilitando assim a lixiviação da lignina (NIEHAUS et al., 1999).

Também são empregadas na produção de cerveja, no pré-tratamento da arabinosilana encontrada no substrato, diminuindo a viscosidade da bebida e facilitando o processo de filtração. Outra utilização industrial das endoxilanas é na produção do pão, ao aumentarem o volume do produto, tornando a massa macia e solta (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

Recentemente a utilização de enzimas degradadoras do complexo lignocelulósico foi adotada na sacarificação da biomassa vegetal com a finalidade de promoverem a liberação de monômeros de carboidratos para serem assimilados por leveduras na produção do etanol de segunda geração.

Industrialmente as xilanas são produzidas por fungos filamentosos em cultivo submerso (KLIONSKY et al., 2016) ou por cultivo em substrato sólido. Estas enzimas possuem temperaturas ótimas entre 60 e 80 °C sem perderem sua estabilidade e demonstram maior atividade em pH ácido (BAJPAI, 2014).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microbiologia industrial

Além dos benefícios proporcionados pelos microrganismos que acontecem naturalmente na natureza, existe a possibilidade de aperfeiçoar esses organismos de maneira a usar seu metabolismo em larga escala com a finalidade de obtenção de produtos, aceleração ou melhoramento de processos industriais (MADIGAN et al., 2010).

O uso de microrganismos em processos industriais teve início nos primórdios da civilização com a fermentação alcoólica para obtenção de cervejas e vinhos, e desde então se intensificaram os estudos a respeito dos microrganismos, que obtiveram grande avanço, como a descoberta de antibióticos (a penicilina em 1928 pelo bacteriologista escocês Alexander Fleming) e a possibilidade de obter substâncias de elevado valor agregado pela fermentação de substratos ricos em carboidratos e de baixo custo, processo descoberto por Chaim Weizmann (DOLEZALKOVA et al., 2016) e atualmente utilizado para a produção de diversas substâncias químicas.

De fato, atualmente o uso de microrganismos é rotineiro em processos industriais nos mais variáveis campos, na produção de bebidas alcoólicas (vinhos e cervejas), na produção de combustíveis (etanol), nas indústrias farmacêuticas (antibióticos, enzimas) e alimentares (aditivos como aminoácidos), em insumos químicos (ácidos e solventes), podendo ser empregadas suas células ou produtos do seu metabolismo.

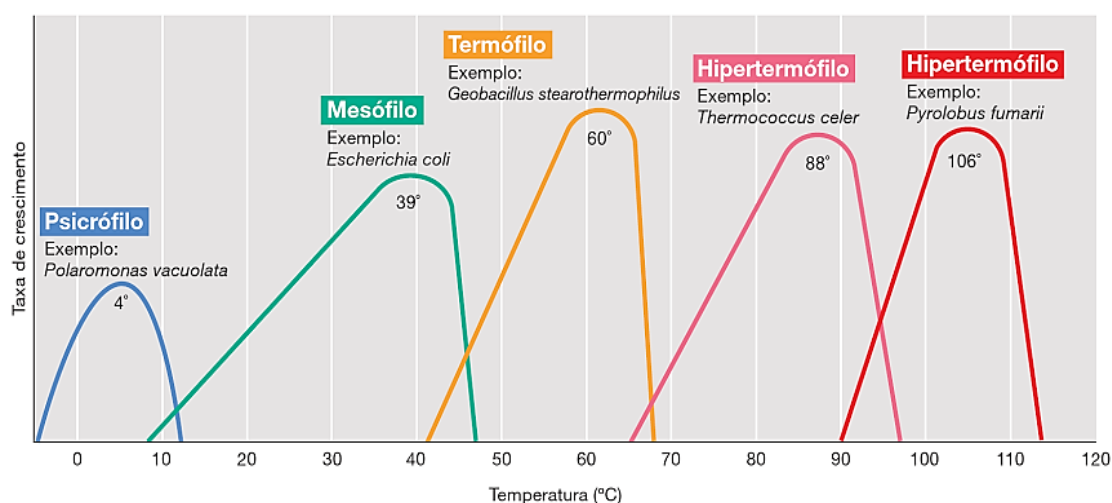
2.2. Microrganismos termofílicos

São vários os fatores que afetam o crescimento de microrganismos, como pH, temperatura, oxigênio, atividade de água, luz, e a capacidade de crescer e se desenvolver nessas diferentes condições é utilizada como uma maneira de classificá-los. Dentre os fatores que afetam o crescimento microbiano a temperatura é um dos mais interessantes, pois é possível encontrar microrganismos em extremos de temperatura, seja no gelo glacial ou nas águas ferventes de fontes termais.

Os microrganismos podem ser classificados utilizando como critério a sua temperatura ótima de crescimento, sendo psicrófilos, mesófilos, termófilos e hipertermófilos, como ilustrado na figura 1.

A temperatura ótima de crescimento de um microrganismo corresponde àquela na qual as reações metabólicas se encontram favorecidas e acontecem com maior velocidade, proporcionando maior aumento na velocidade de crescimento e reprodução das células. Contudo, acima da temperatura favorável alguns componentes celulares podem sofrer danos severos como é o caso das proteínas, que podem se desnaturar de forma irreversível, levando à morte celular, enquanto que em temperaturas menores do que a faixa favorável se encontram em um ritmo de desenvolvimento celular lento ou estacionário (MADIGAN et al., 2010)

Figura 1. Relação entre temperatura e crescimento de microrganismos de diferentes classes térmicas.



Fonte: Microbiologia de Brock 12ª Edição (MADIGAN et al., 2010).

Os microrganismos termofílicos apresentam uma importante fonte de estudos devido ao seu comportamento e de seus metabólitos em relação a elevadas temperaturas.

Esses organismos apresentam características diferenciadas para possibilitar seu metabolismo em altas temperaturas: a primeira é a constituição de sua membrana citoplasmática, que diferente dos organismos mesofílicos, é composta por ácidos graxos saturados que garantem a hidrofobicidade, permitindo maior

fluidez da membrana, sem que perca a integridade física da célula. A segunda característica é a produção de enzimas especializadas em promover o superenovelamento positivo do DNA, que consiste no enovelamento das duas fitas de DNA no mesmo sentido, objetivando evitar danos ao material genético celular (GOMES; et al., 2007).

As enzimas responsáveis por esse evento são as topoisomerases, que nos eucariotos se encontram ligadas à extremidade 3' da cadeia de DNA, enquanto que em bactérias e archeas se encontram na extremidade 5' (ISHINO; NARUMI, 2015).

Uma terceira característica é a composição dos nucleotídeos desses organismos, que quando comparados por genômica a organismos mesofílicos, apresentam maiores proporções de purinas, o que pode estar relacionado à elevada estabilidade do RNA mensageiro e consequentemente a mudanças nas sequências de aminoácidos encontrados nas proteínas (SINGER; HICKEY, 2003).

2.3. Reino Fungi

O reino Fungi pertence ao domínio eucarioto e se assemelha por um lado aos animais pelo seu metabolismo heterotrófico, estrutura e organização de suas células, e por outro às plantas devido ao seu crescimento imobilizado no substrato, além de possuírem paredes celulares compostas por polissacarídeos, diferenciando-se pela presença de quitina na maioria das espécies fúngicas (MADIGAN et al., 2010).

A distribuição desses microrganismos no meio ambiente é variada devido à condição de simbiose entre espécies de fungos e algumas espécies de plantas e animais, porém a grande maioria das espécies pode ser encontrada em solos e em materiais em decomposição, participando do ciclo do carbono fixado pelas plantas durante a fotossíntese, utilizando-o em suas vias metabólicas para obtenção de energia e crescimento (PEAY; KENNEDY; TALBOT, 2016), e liberando gás carbônico na atmosfera para ser fixado novamente nas plantas pela fotossíntese em compostos hidrocarbonados tais como: amido, hemicelulose, celulose, lignina, proteínas, ácidos nucleicos, entre outros (PULROLNIK, 2009).

A assimilação do carbono fixado nas plantas pelos fungos só é possível devido a proteínas com ações catalíticas: as enzimas. Elas hidrolisam o material

lignocelulósico, agindo sobre ligações químicas que ocorrem entre as porções dos polissacarídeos e liberando os açúcares menores que os compõem.

Os fungos se destacam como produtores de enzimas, sendo mais vantajosos em relação às bactérias, pois podem secretar as enzimas que degradam o substrato sobre o qual crescem para o meio extracelular (ORLANDELLI et al., 2012), o que facilita o seu processo de extração, uma vez que não é necessária a lise celular como no caso das bactérias. Na maioria dos casos, essas enzimas são glicosiladas, o que é considerado em geral como um fator que aumenta a estabilidade, embora existam exceções (SUTTHIRAK; DHARMSTHITI; LERTSIRI, 2005; WANG et al., 1996). Outro fator vantajoso da utilização de fungos é a sua imensa biodiversidade, que constitui um nicho para a investigação de novas enzimas.

Os fungos filamentosos apresentam uma importante característica morfológica na produção e excreção de enzimas extracelulares, pois o crescimento micelial permite maior superfície de contato com o substrato a ser degradado e consequentemente maior perímetro colonizado pelo fungo, que ao longo do micélio pode apresentar hifas secretoras (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000). Sendo assim, temos maior capacidade de degradação do substrato e maior excreção de enzimas extracelulares, contribuindo para o crescimento fúngico.

2.4. *Rasamsonia emersonii*

A espécie utilizada neste projeto é um fungo filamentoso, antes conhecida como *Talaromyces emersonii*, *Penicilinium emersonii* ou *Geosmithia emersonii* (GRAS notice 000479). Foi isolado inicialmente por J. Houbraken e colaboradores na Itália e publicado *online* em 2011 no jornal *Antonie van Leeuwenhoek* (HOUBRAKEN; SPIERENBURG; FRISVAD, 2012).

A classificação desta espécie segue a ordem: Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Trichocomaceae, *Rasamsonia* (MYCOBANK, 2016).

Seu ciclo reprodutivo pode ocorrer tanto na forma assexuada com a formação de esporos assexuais em conidióforos e disseminação dos conídios para futura germinação, ou sexualmente pela fusão de núcleos de células diferentes que sofrem posterior meiose e mitose originando ascósporos resistentes (esporos

sexuais) no interior de estruturas fechadas (ascos) (MADIGAN et al., 2010). Fungos que realizam apenas reprodução assexuada recebem o nome de anamorfos, enquanto que a forma de reprodução sexuada desenvolvida por cariogamia recebe o nome de teleomorfa. Por tanto *Talaromyces emersonii* é o estado teleomorfo de *Penicilinium emersonii*.

Esta espécie de fungo é classificada como termofílico e termotolerante, pois apresenta crescimento ótimo em temperaturas entre 45 e 50°C, podendo apresentar crescimento máximo em temperaturas de 55°C (HOUBRAKEN; SPIERENBURG; FRISVAD. 2012). Suas colônias se apresentam em coloração esbranquiçada quando jovens e tornam-se laranjas em tons amarronzados quando velhas, sendo o verso da colônia de cor marrom. A produção de esporos é ausente nas condições ótimas de crescimento, porém em temperaturas inferiores (37°C) podem apresentar pequeno crescimento e produzir esporos como mecanismo de resistência (HOUBRAKEN; SPIERENBURG; FRISVAD. 2012).

A distribuição desta espécie no ambiente é comum, porém não cresce a 25°C, sendo geralmente isolada a partir de solos superficiais, material lignocelulósico em decomposição ou por contaminação em placas de Petri de outras colônias (HOUBRAKEN; SPIERENBURG; FRISVAD. 2012).

Essa espécie é muito conhecida por sua elevada capacidade de produção de enzimas do complexo lignocelulósico; desperta interesse pela considerável quantidade de enzimas extracelulares produzidas (WATERS et al., 2010) e por possuir status de fungo não patogênico como descrito pela empresa DSM (*DSM Food Specialties*) e ser considerado GRAS (Generally Recognized as Safe) segundo nota publicada pela FDA (Food and Drug Administration) em 2014, o que possibilita a utilização destes fungos e seus metabólitos para fins alimentícios e biotecnológicos.

2.5. Resíduos agroindustriais

Nas ultimas décadas intensificou-se a preocupação com a sustentabilidade ambiental e os efeitos negativos provocados pela exacerbada produção de resíduos industriais e agroindustriais. O aumento do consumo de produtos industrializados provoca diretamente a elevação da produção, gerando empregos e novas oportunidades, porém em contrapartida aumenta também a produção de resíduos,

que necessitam de tratamento antes de retornarem ao meio ambiente ou podem ser empregados como matéria-prima para novos produtos.

Dentre esses resíduos encontra-se a biomassa lignocelulósica, que é considerada o material mais abundante do planeta (RABELO, 2010; SHAHEEN et al., 2013), sendo composta principalmente por celuloses, hemiceluloses e lignina. A abundância de celulose fez com que esse material torna-se alvo de interesse das indústrias como matéria-prima na produção de produtos como o etanol.

2.5.1. Biomassa lignocelulósica

A composição da parede celular vegetal compreende diversos tipos de carboidratos interligados de modo a garantir a sustentabilidade da planta, sendo a celulose o carboidrato mais abundante da parede vegetal seguido pela hemicelulose. Uma fração não carboidrato, a lignina, é observada como sendo responsável por garantir a sustentação da parede celular vegetal. A composição desse material é variável dependendo do tipo de planta, estágio de crescimento e parte da planta analisada (OGEDA; PETRI, 2010).

As características estruturais desse material o tornam interessante para ser utilizada como substrato na obtenção de energia, produção de combustíveis e enzimas celulolíticas, principalmente pela possibilidade de aproveitamento de seus resíduos, aumentando a produtividade sem necessidade de aumentar a área de cultivo já destinada ao etanol de primeira geração (SANTOS et al., 2012).

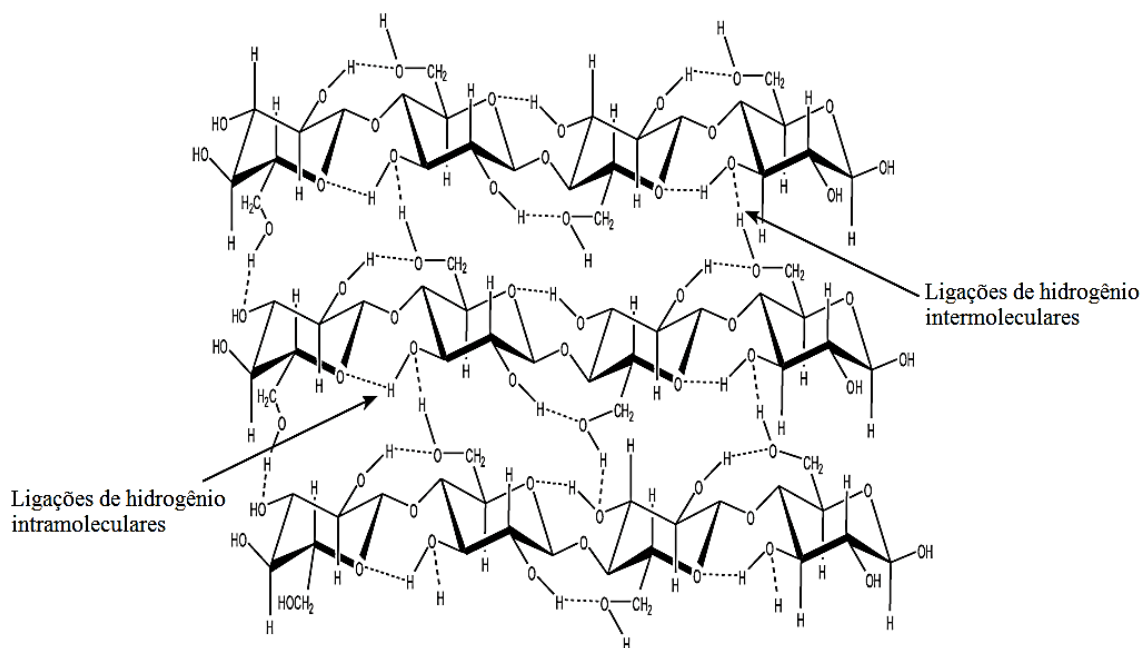
2.5.1.1. Celulose

Conhecida por ser o carboidrato mais abundante presente na parede celular vegetal, a celulose é formada por resíduos de D-glicose na forma piranósica unidos por ligações glicosídicas β -1,4, originando um homopolissacarídeo livre de ramificações.

As frações de celulose se depositam no interior da fibra vegetal, e se apresentam em duas regiões diferentes. A primeira é uma região cristalina, com propriedades mais organizadas onde unidades repetidas de glicose na forma do dissacarídeo celobiose estabelecem ligações de hidrogênio a partir de suas hidroxilas livres, o que garante a cristalização das fibrilas de celulose. Isso confere

resistência à degradação do polímero e insolubilidade do mesmo em água e grande parte dos solventes orgânicos. Por outro lado, a região amorfa é a forma menos ordenada do polímero de celulose, e, portanto a mais suscetível à degradação (ROSA, 2012). A figura 2 representa a cadeia de celulose e as ligações de hidrogênio presentes nas regiões cristalinas.

Figura 2. Ligações de hidrogênio presentes nas regiões cristalinas da fibra de celulose.

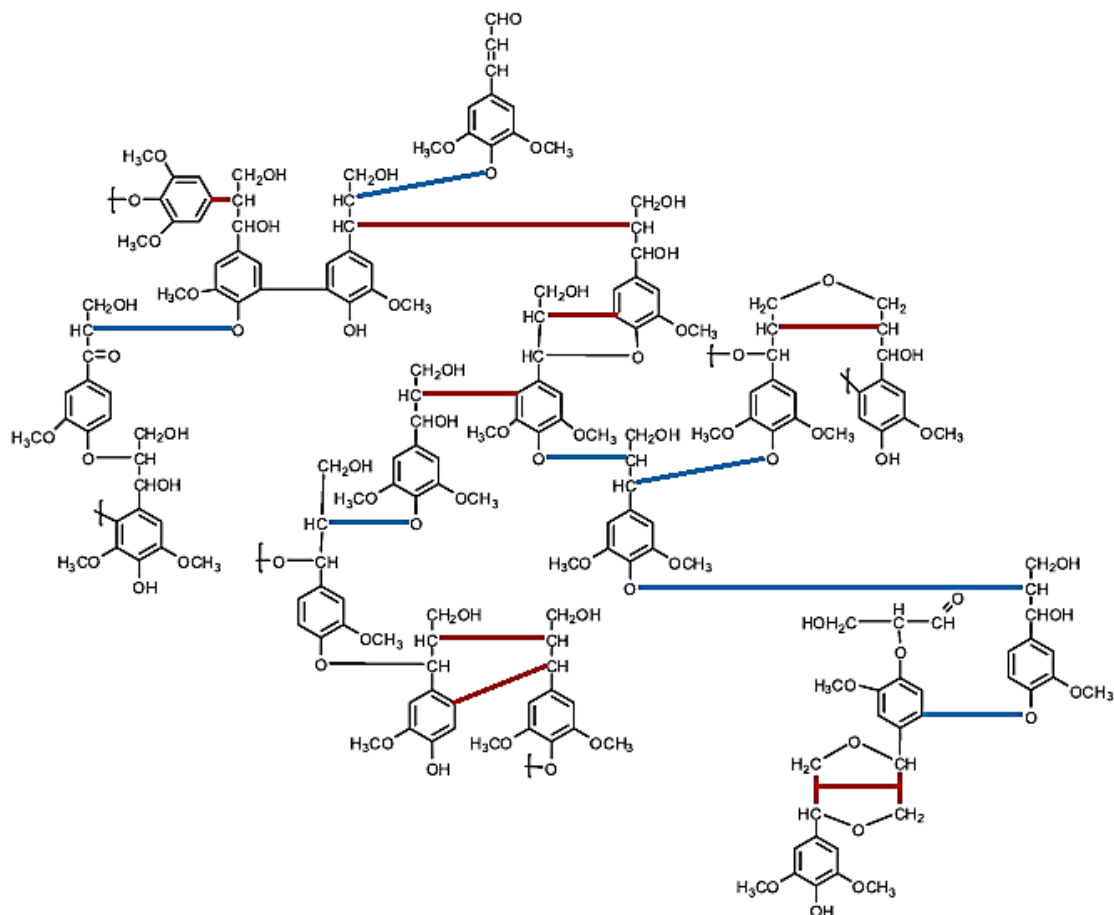


Fonte: (SANTOS et al., 2012).

2.5.1.2. Lignina

É a porção mais externa na parede celular vegetal, responsável pela junção entre as frações de celulose e hemicelulose, por ligações covalentes que garantem a sustentabilidade e rigidez da fibra vegetal. É formada por unidades de fenilpropanóides (ácido sinapílico, ácido coniferílico, e ácido p-cumárico) interligados entre si por ligações entre carbonos e ligações tipo éster (Figura 3) (PENG et al., 2012).

Figura 3. Representação esquemática de algumas das ligações entre carbonos (vermelho) e ligações ésteres (azul) entre os fenilpropanóides constituintes da lignina de eucalipto.

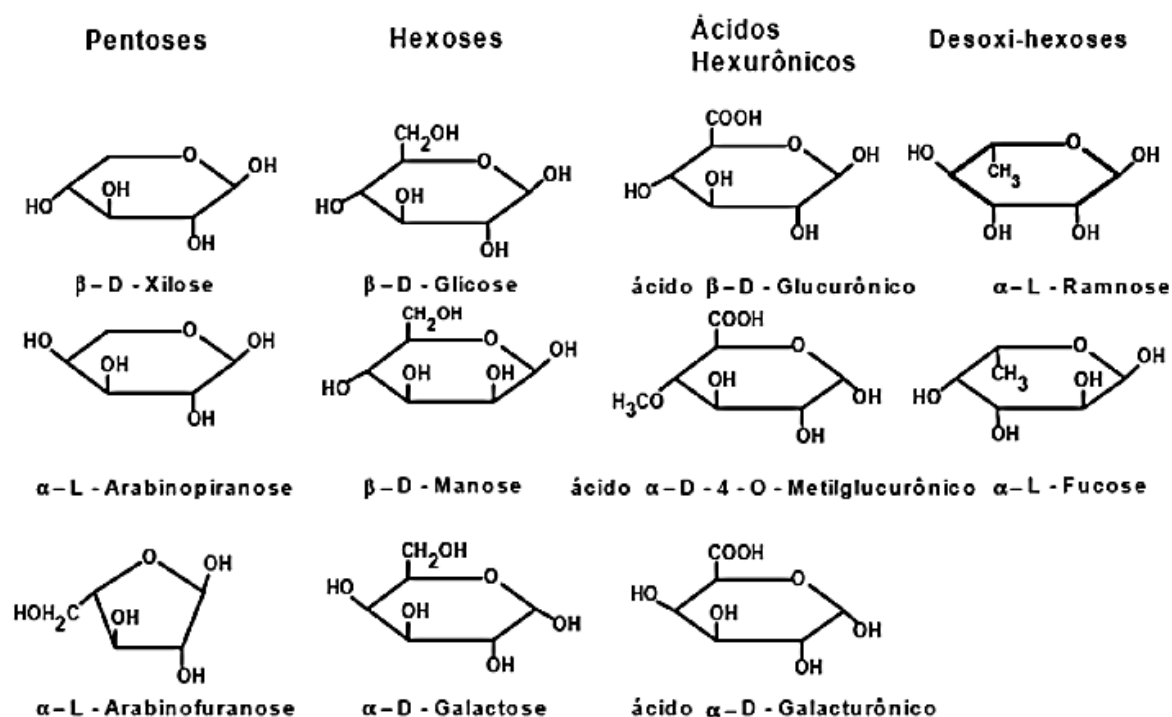


Fonte: Adaptado (SANTOS et al., 2012).

2.5.1.3. Hemicelulose

A hemicelulose é composta por monossacarídeos como pentoses, hexoses, ácidos hexourônicos e desoxi-hexoses (Figura 4) ligados entre si formando polissacarídeos, os quais são classificados de acordo com o resíduo de açúcar mais abundante presente no esqueleto da fibra vegetal: xilanas, arabinoxilanas, glicanas, glicuronoxilanas, xilanoglucanas, β -glicanas, mananas, glicomananas, galactomananas, galactoglicomananas (OGEDA; PETRI, 2010), e no conjunto recebem esse nome por estarem diretamente ligadas à celulose (SILVA et al., 1998).

Figura 4. Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses.



Fonte: Fengel e Wegener, 1989 *apud* Rabelo, 2010.

Dentre as hemiceluloses a xilana é o polissacarídeo natural mais abundante. Apresentam em sua cadeia principal unidades de D-xilose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, e cadeias laterais contendo resíduos de L-arabinose, ácidos urônicos e diferentes carboidratos (SILVA et al., 1998).

As hemiceluloses possuem diferentes funções, assim como a celulose, também podem fornecer rigidez à fibra vegetal, pois xiloglicanas, arabinoxilanas e glicuronoxilanas, se ligam à celulose por ligações de hidrogênio e de forma covalente com a lignina, resultando na adequada estruturação da parede vegetal. As mananas são dispostas para armazenar sementes, e por isso não são encontradas em todas as espécies vegetais. As demais hemiceluloses apresentam função de fornecer energia extracelular, armazenar produtos e reter água (OGEDA; PETRI, 2010).

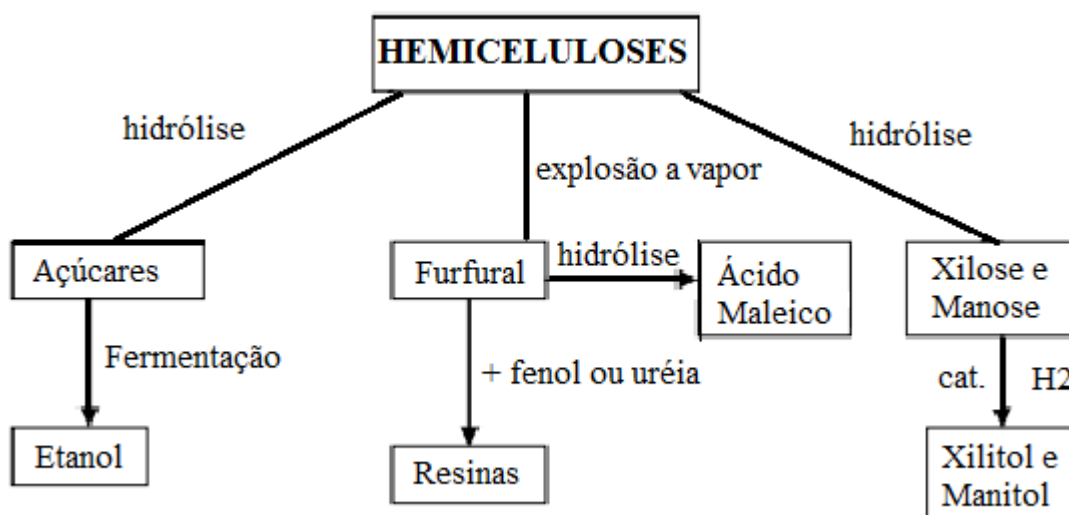
2.5.1.3.1. Bioconversão da hemicelulose

Devido às diversas características estruturais e funcionais, as hemiceluloses se tornam resíduos industriais atraentes para serem reutilizados para outras finalidades. Pelizer e colaboradores destacam a redução do impacto ambiental relacionado à utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos, e demonstram a capacidade de incrementação proteica em ração animal partindo da utilização do bagaço de cana-de-açúcar para produção de *Spirulina platensis*, (uma cianobactéria utilizada na complementação alimentar) (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007).

Schuchardt e colaboradores mostraram a substituição do petróleo como matéria prima por biomassa na obtenção de diversos produtos químicos, e relacionaram a utilização da hemicelulose para produção de produtos específicos (Figura 5) (SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001).

As hemiceluloses podem sofrer hidrólise, liberando açúcares como D-xilose e β -D-glicose a serem usados na fermentação para obtenção de etanol, ou na síntese de adoçantes suaves como xilitol e manitol (CANILHA et al., 2013).

Figura 5. Componentes extraídos da hemicelulose e produtos alvos de estudos.



Fonte: (SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001)

A hidrólise desse material objetiva efetuar a quebra dos polissacarídeos resultando na liberação dos açúcares que os compõem o que pode acontecer por duas abordagens: a hidrólise química ou enzimática.

No caso da hidrólise química utiliza-se um agente hidrolisante, geralmente um ácido, sendo o mais comum o ácido sulfúrico.

Já a hidrólise enzimática reproduz o processo que ocorre na natureza, onde as enzimas de microrganismos clivam ligações específicas das fibras de celulose, hemicelulose e lignina, liberando os monômeros de açúcares que são utilizados pelos microrganismos como fontes de carbono para suas vias metabólicas (BASTOS, 2007).

2.6. Xilanases

As xilanases são enzimas que agem sobre as xilanas constituintes das hemiceluloses da parede vegetal, sendo os fungos filamentosos um dos principais produtores dessa enzima, seguidos por macromicetos, bactérias, algas marinhas e algumas sementes de plantas em estado de germinação (BASTAWDE, 1992).

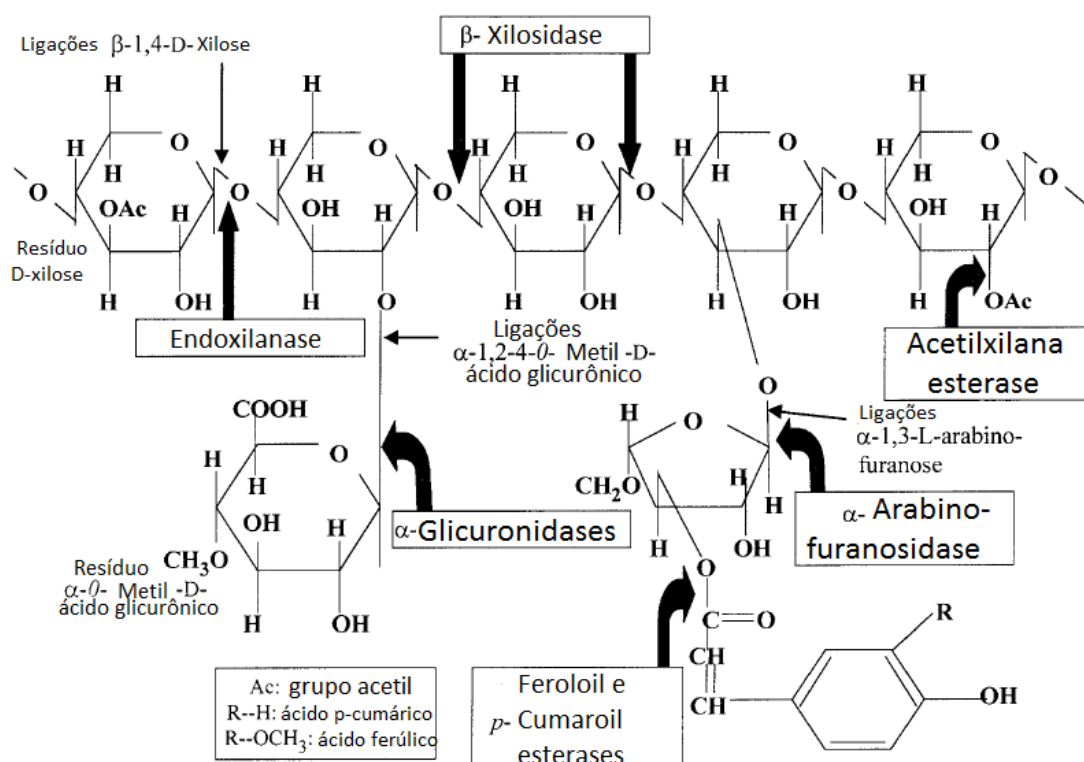
A degradação da xilana envolve um consórcio de enzimas denominado “complexo xilanolítico” (figura 6). Fazem parte do mesmo todas as enzimas associadas à hidrólise das ligações glicosídicas, liberando monômeros de D-xilose e demais que compõem aquele polissacarídeo (SÁ-PEREIRA et al., 2003).

As endo-1,4- β -xilanases (E.C 3.2.1.8) são responsáveis por realizar a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo β entre os carbonos 1 e 4 dos monômeros de xilose, já as endo-1,3- β -xilanases (E.C 3.2.1.32) hidrolisam de forma randômica as ligações β entre os carbonos 1 e 3 das cadeias de xilana. As exo-1,4- β -xilosidases (E.C. 3.2.1.37) e as exo-1,3- β -xilosidases (E.C. 3.2.1.72) hidrolisam as ligações β entre os carbonos 1 e 3 ou 4 dos resíduos de xilose do terminal não redutor da cadeia de xilana (NC-IUBMB, 2010).

Existem também as enzimas acessórias, que são responsáveis por hidrolisar as ligações das ramificações da cadeia de xilana, como as acetilxilana esterases (E.C. 3.1.1.72) responsáveis por promover a desatilação da cadeia de xilana e de xilo-oligossacarídeos; feruloil e cumaroil esterases (E.C. 3.1.1.73) que catalisam a hidrólise dos ácidos ferúlicos e cumáricos ligados à arabinofuranose; as α -L-arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55) hidrolisam as ligações alfa entre os carbonos

1,3 e ou 1,5 dos terminais não redutores de α -L-arabinofuranosídeo, liberando α -L-arabinofuranosil; α -D-glicuronidasas (E.C. 3.2.1.131) são necessárias para hidrolisar as ligações alfa entre os carbonos 1 e 2 dos resíduos de ácido glicurônicos; enquanto as glicuronoarabinoxilana endo-1,4- β -xilanasas (E.C. 3.2.1.136) realizam a hidrólise das ligações β entre os carbonos 1 e 4 dos resíduos de D-xilose e algumas glicuronoarabinoxilanas (NC-IUBMB, 2010).

Figura 6. Representação esquemática das principais enzimas envolvidas no processo de degradação da xilana.



Fonte: Adaptado (BEG et al., 2001).

O interesse sobre essas enzimas aumentou nas últimas décadas, principalmente pela capacidade de remover a hemicelulose das polpas de celulose, sendo aplicadas na indústria em substituição ao cloro para promover o branqueamento da polpa de celulose na fabricação de papel (GANGWAR; PRAKASH; PRAKASH, 2014). Além disso, muitos outros processos podem ser incrementados com a utilização dessas enzimas em substituição aos processos químicos convencionais, como é o caso da liberação de monômeros de xilose para a

fermentação de leveduras e produção do adoçante não cariogênico xilitol (TAMANINI; HAULY, 2004).

A associação dessas hemiceluloses com enzimas celulolíticas também é eficientemente estudada para hidrólise de resíduos agroindustriais, visando a liberação de monossacarídeos para fermentação a etanol de segunda geração (GOMES et al., 2014).

As xilanases também são utilizadas na complementação alimentar de animais como frangos, pois degradam ingredientes que não fornecem muitos nutrientes às aves, uma vez que elas não possuem essas enzimas em seu aparelho digestivo, possibilitando a utilização de novas fontes de alimentos (CAMPESTRINI; SILVA; APPELT, 2005).

A classificação enzimática atual baseada na análise dos domínios catalíticos e nas semelhanças das sequências de aminoácidos consta na página da internet *CAZypedia (carbohydrate-active enzymes)* e considera as xilanases pertencentes às famílias 10 e 11 de glicosídeo hidrolases, embora outras famílias também apresentem atividade xilanolítica como de número 5, 7, 8, 43.

A família 10 envolve as xilanases com capacidade de hidrolisar as ligações β -1,4 (endoxilanases) e algumas também β -1,3, podendo as primeiras agir sobre as aril-celobiosídeos, mas não sobre a celulose. Apresentam glutamatos como resíduos catalíticos, um deles participando como nucleófilo e o outro no mecanismo ácido-básico geral, e uma asparagina (Asn) vizinha a este Glu, que é responsável por realizar ligações de hidrogênio com o substrato. Por outro lado, as xilanases da família 11 hidrolisam as ligações tipo β -1,4, apresentando mecanismo semelhante porém sem a Asn.

2.7. Produção de enzimas

Enzimas fúngicas para fins biotecnológicos podem ser produzidas de duas maneiras principais, por cultivo em estado sólido (CES) ou por cultivo submerso (CSm), ambos apresentam vantagens e desvantagens que serão apresentadas em seguida.

O CSm é o mais popular e comumente utilizado pela indústria para obtenção de enzimas fúngicas (LIMA et al., 2003), e se caracteriza pela enorme quantidade de água livre presente no meio de cultura, uma vez que é utilizado 2% de substrato

seco (SCHOLL et al., 2015). Apresenta vantagem em relação ao controle dos parâmetros do processo, como pH, temperatura, e é mais fácil de ser reproduzido em escala industrial, porém em relação a cultivo de fungos filamentosos, esse processo não apresenta tantas vantagens, uma vez que é necessário agitar o meio de cultivo para promover a aeração necessária ao crescimento do fungo, e a agitação constante durante o crescimento do micélio pode causar alterações na morfologia dos fungos, além de aumentar os custos (CUI; VAN DER LANS; LUYBEN, 1998).

Alterações morfológicas modificam as propriedades do microrganismo, podem alterar seu metabolismo e a produção do metabólito de interesse. No caso das enzimas, a alteração se dá na quantidade de enzima excretada, uma vez que as hifas podem se aglomerar formando pellets, o que impede que as hifas secretoras, caso estejam no interior do pellet, consigam secretar as enzimas para o meio extracelular e portanto as enzimas ficam retidas (CUI; VAN DER LANS; LUYBEN, 1997).

O CES é realizado com baixa atividade de água, sendo garantida apenas a umidade necessária ao crescimento fúngico, o que diminui o risco de contaminação por bactérias, porém esse fator dificulta a possibilidade de controle dos parâmetros do processo (RAIMBAULT; ALAZARD, 1980), o material é incubado e o produto é recuperado somente no final do cultivo.

Várias vantagens podem ser atribuídas ao CES, pois não necessita de grande quantidade de água, sendo capaz de resultar em produtos mais concentrados. O substrato sólido proporciona melhores condições de crescimento micelial e se assemelha ao hábitat natural dos fungos, necessitando de baixa demanda energética (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004). Para assegurar a aeração do meio não é feita agitação como no caso do CSm, porém deve ser assegurada uma grande superfície de contato do fungo com o substrato. Isso torna o processo desvantajoso quando se emprega essa técnica em escala industrial, pois seria necessária uma enorme área, para proporcionar as condições adequadas.

2.8. Purificação de enzimas

As enzimas são responsáveis pela catálise de reações específicas em sistemas biológicos, e interessantes fontes de estudo, pois participam de reações químicas diminuindo significativamente o tempo de reação, apresentam elevada seletividade, são biodegradáveis, funcionam em condições suaves de reação, não liberam produtos indesejáveis, podem ser modificadas seletivamente por engenharia de proteínas e podem ser reutilizadas se imobilizadas.

Extratos enzimáticos fúngicos apresentam um complexo de enzimas extracelulares que podem ou não serem alvos de estudos em projetos acadêmicos. Em trabalhos que envolvem a aplicação prática não se justifica em muitos casos tentar investir em processos de isolamento e caracterização das enzimas, pois isso aumenta o custo da sua aplicação. Contudo, se o projeto tem por objetivo analisar de forma mais profunda as relações entre estrutura e função de enzimas e eventualmente promover alterações pontuais através de engenharia de proteínas, geralmente se objetiva extrair apenas uma determinada enzima de todo o complexo, a fim de conhecer suas propriedades específicas; para isso é necessário submeter esse extrato enzimático às diferentes alternativas de purificação, a fim de se obter enzimas puras.

Existem várias técnicas de purificação de proteínas (a maioria absoluta das enzimas são proteicas), porém quando se trata de enzimas é necessário maior controle dessas técnicas a fim de garantir a sua atividade. Para tanto é necessário chegar à enzima purificada com o menor número de passos de purificação, menor concentração de proteínas contaminantes e maior valor de atividade específica, objetivando o menor custo do processo. No caso das xilanases as principais técnicas de purificação adotadas são a precipitação salina com sulfato de amônio, a cromatografia de filtração em gel e a cromatografia de troca iônica (não necessariamente nessa ordem) (DOS SANTOS; ISHII, 2011).

A Tabela 1 mostra exemplos de estratégias de purificação relatadas na literatura e utilizadas para isolamento de xilanases.

Tabela 1. Exemplos de técnicas de purificação de xilanases fúngicas, microrganismo produtor e tipo de cultivo utilizado.

Microrganismo	Cultivo	Estratégias de Purificação	Rendimento (%)	Fator de Purificação	Referência
<i>Aspergillus oryzae</i> DSM 1863	Submerso	Exclusão molecular (Sephadex G-200); Troca iônica (DEAE-celulose)	28	11	(DO; NGUYEN; NGUYEN, 2017)
<i>Thielaviopsis basicola</i>	Submerso	Precipitação Salina S_2SO_4 (Sulfato de amônio) 60%; Ultrafiltração; Troca iônica (DEAE-Sephadex); Exclusão molecular (Sephacril S-200)	33	19,7	(GOLUGURI et al., 2016)
<i>Chrysosporthe cubensis</i>	Submerso	Troca iônica (Q Sepharose); Exclusão molecular (Sephacril S-200)	13,4 e 1,3	1,2 e 1,4	(GOMES et al., 2016)
<i>Thermoascus aurantiacus</i> KCU-PN-I2-1	Sólido	Precipitação Salina S_2SO_4 (Sulfato de amônio) 20%; Exclusão molecular (Sephadex G-100); Troca iônica (DEAE-cellulose C545).	2,3	14,5	(CHANWICH A et al., 2015)
<i>Remersonia thermophila</i> CBS 540.69	Submerso	Exclusão molecular (Superdex 16/60); Troca catiônica (CM52); Concentração por centrifugação (MWCO 3 kDa)	1,37	1,35	(MCPHILLIP S et al., 2014)
<i>Malbranchea cinnamomea</i>	Sólido	Precipitação Salina S_2SO_4 (Sulfato de amônio) 60-80%; Troca iônica (Q Sepharose); Exclusão molecular (Superdex 75)	0,28	5,9	(FAN et al., 2014)

Fonte: Autoria própria.

3. JUSTIFICATIVA

A busca constante por fontes renováveis de energia e o desenvolvimento científico e industrial aliado ao anseio de utilizar tecnologias mais eficientes e sustentáveis impulsionaram a incorporação de enzimas nos processos industriais e consequentemente os estudos quanto à utilização das mesmas na degradação de biomassa e materiais lignocelulósicos residuais para a produção de bioetanol e outros produtos de valor agregado.

O desenvolvimento do presente trabalho torna-se importante a partir da grande quantidade de xilana presente nas hemiceluloses das paredes vegetais, formando estruturas que dificultam o acesso às fibras de celulose para a obtenção de carboidratos fermentáveis. Partindo desse princípio faz-se necessário a pesquisa sobre enzimas capazes de degradar a xilana, para aperfeiçoamento de processos biotecnológicos, sendo a purificação um processo essencial para avaliar as características de uma enzima. Após a obtenção da enzima isolada do complexo enzimático é possível estudar de maneira mais aprofundada sua estrutura e função.

A espécie escolhida, *Rasamsonia emersonii* S10, foi isolada em um projeto anterior desenvolvido pela mestra Izabel Zaparoli Rosa (ROSA, 2014), sobre o Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar, apontou dentre as cinco espécies selecionadas, *Thermomyces lanuginosus* S1, *T. lanuginosus* S3, *Rasamsonia emersonii* S10, *T. lanuginosus* FZI e *Rasamsonia emersonii* BC, em função da capacidade de crescimento a 60°C, que o cultivo de *Rasamsonia emersonii* S10 apresentou os maiores valores de atividade xilanolítica. Em virtude disso essa espécie foi utilizada no presente trabalho como produtor de xilanase.

4. OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente projeto teve como objetivo analisar as propriedades das xilanases produzidas em cultivo em estado sólido pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* no extrato enzimático bruto e isolar as enzimas para efetuar sua caracterização.

Objetivos específicos

Identificação do perfil de expressão (uma enzima ou isoformas) de xilanase produzidas pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* nas condições de cultivo utilizadas no projeto.

Realizar a caracterização bioquímica funcional e estrutural da atividade xilanolítica do extrato enzimático, efeitos do pH e a temperatura sobre a atividade e estabilidade, efeito de íons e diversas substâncias na atividade e a estabilidade, parâmetros cinéticos aparentes, determinação da massa molecular em condições nativas e desnaturantes e do pH isoelétrico (pI).

Analisar a termodinâmica da desnaturação irreversível das enzimas isoladas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Pré- inóculo

Os fungos foram inoculados em meio com 65 g L⁻¹ de Sabouraud Dextrose Agar em pH 5,0, distribuído em volumes de 30 mL em placas de Petri, sendo os fungos incubados em incubadora a 55 °C até completa colonização da superfície do ágar, a que ocorreu em 72 horas. Na sequência foram cortados discos de 1 cm de diâmetro com o auxílio de tubos de ensaio de vidro.

5.2. Cultivo em Estado Sólido (CES)

Os substratos foram triturados em moinho de facas (exceto o farelo de trigo), peneirados para seleção de partículas de 1 a 3 mm, lavados em água destilada e secos a 65 °C.

Sacos de polipropileno foram adaptados para proporcionar as condições necessárias ao cultivo, sendo os discos de ágar colonizados cultivados em 5 g de uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e palha de milho (1:1:1 m/m). A esta mistura adicionaram-se 20 mL de solução nutriente (proporcionando uma umidade inicial de cerca de 70%) composta pelas seguintes substâncias, em g L⁻¹: (NH₄)₂SO₄ (3,5); KH₂PO₄ (3,0); MgSO₄ · 7H₂O (0,5); CaCl₂ (0,5), Tween 80 (10,0), sendo o pH ajustado para 5,0. O cultivo ocorreu em incubadora com temperatura ajustada para 55 °C durante 13 dias.

O perfil ou curva de produção foi feito com amostras retiradas a cada 24 horas decorridas do início do cultivo, fazendo o ensaio enzimático conforme descrito no item 5.5.

5.3. Extração e Clarificação

Após atingir o tempo de cultivo com atividade máxima retirou-se uma amostra da incubadora e a extração enzimática foi feita acrescentando 50 mL de água destilada (1:10 m/v) ao material cultivado, que permaneceu sob agitação em agitador orbital a 150 rpm por 40 minutos, sendo então filtrado primeiramente em

gaze e posteriormente a vácuo em filtros de membrana de nylon com poros de 0,45 μm .

O extrato foi clarificado por centrifugação a 10.000 $\times g$ a 4 °C durante 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado como homogeneizado (extrato enzimático bruto), e posteriormente armazenado em congelador a -80 °C.

5.4. Ensaio enzimático

Os ensaios enzimáticos foram sempre feitos em triplicata, fazendo o cálculo da média e desvio padrão pela planilha Excel (Microsoft). O teste “t” de Student para amostras independentes foi executado usando o programa QtiPlot versão 0.9.8.9 para Linux (© Ion Vasilief), adotando $p < 0,05$ para considerar as diferenças como sendo significativas.

5.4.1. Quantificação de açúcares redutores

A atividade enzimática foi quantificada através do produto liberado por intervalo de tempo ($d[P]/dt$) utilizando o método de dosagem de açúcares redutores (MILLER, 1959), que usa o DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico). A reta de calibração foi confeccionada com D-xilose.

5.4.1.1. Ensaio enzimático em tubos de ensaio

Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata, misturando 225 μL de substrato (tampão acetato de sódio 0,1 mol L^{-1} pH 5,5 + substrato na concentração de 1% (m/v) (xilana *Beechwood*; xilana *oat spelt*) e 4% (m/v) de (CMC) e 25 μL da solução enzimática bruta. A mistura foi incubada em tubos de ensaio e colocados em banho a 50 °C por 10 minutos, interrompendo a reação enzimática pela adição de 250 μL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). Na sequência os tubos eram colocados por 5 minutos em banho fervente realizando em seguida o resfriamento em bacia de gelo. Após o resfriamento eram adicionados 2 mL de água ultrapura, a mistura feita em vórtex, e a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm contra um branco (nove partes de água ultrapura para uma parte de DNS).

Um tubo controle também era feito para eliminar qualquer absorção de luz a 540 nm que não fosse dos açúcares redutores liberados pela ação da enzima. Para isso as mesmas quantidades de reagentes eram adicionadas em tubos de ensaio seguindo a ordem: primeiro a amostra enzimática, posteriormente o reagente DNS e por fim tampão de substrato, sendo submetidos a banho fervente por 5 minutos, resfriados em banho de gelo e completado o volume de 2,5 mL com água ultrapura.

Uma unidade de atividade enzimática é a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio, seguindo a definição da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, IUBMB (NC-IUB, 1979).

5.4.1.2. Ensaio enzimático em microplacas

Para realização do ensaio em microplaca utilizou-se uma mistura de 90 μL de tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 5,5 acrescido de substrato e 10 μL de solução de enzima. As placas foram incubadas a 80 °C, por 10 min em termociclador MJ Research PTC200 (GARFIN, 2009), seguida por resfriamento a 4 °C. Para paralisar a reação foram adicionados 100 μL de solução de DNS e aquecida novamente a 95 °C por 10 min, seguida de resfriamento a 4 °C. A absorbância foi medida a 540 nm usando leitor de microplaca em espectrofotômetro UV-VIS (Spectra max – PLUS 384®).

5.4.2. Determinação de β -xilanases e β -glicosidases

A atividade de enzimas com características de beta xilanases e beta glicosidases foi determinada de acordo com Iembo e colaboradores (IEMBO et al., 2002) com algumas adaptações para realização do ensaio em microplacas, sendo 10 μL da amostra enzimática adicionados a 40 μL de tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 5,5 e 50 μL do substrato sintético (pNPX ou pNPG) a 4 mmol L^{-1} , a mistura foi incubada a 50 °C por 10 minutos no termociclador descrito anteriormente, seguida por resfriamento a 4 °C, e adicionados 100 μL de carbonato de sódio 2 mol L^{-1} para paralisação da reação. A leitura da absorbância foi feita a 410 nm.

5.5. Determinação do tempo de incubação

O tempo de incubação da reação enzimática durante o qual seria obtida uma relação linear da liberação de produto em função do tempo (para determinação da taxa inicial de reação V_0) foi determinado seguindo os procedimentos descritos acima realizando variações no tempo de incubação da reação enzimática entre 1 e 10 minutos.

5.6. Determinação do pH ótimo

Para este experimento a atividade xilanolítica foi avaliada incubando-se 25 μL da solução enzimática bruta em 225 μL de suspensão de xilana a 1 % em diferentes valores de pH, a 50 °C por 10 minutos. Os seguintes tampões ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foram utilizados, para assegurar uma capacidade tamponante adequada: Citrato (pH 3,0 e 3,5), Acetato (pH 4, 4,5, 5,0 e 5,5), MES (pH 6,0, 6,5 e 7,0), Tris (pH 7,5 e 8,0) e Glicina (pH 8,5, 9,0 e 9,5). O pH dos tampões foi eventualmente ajustado para corrigir o efeito de deslocamento do pKa em função da temperatura, seguindo valores tabelados (APPLICHEM, 2008) e o produto da reação quantificado como descrito acima.

5.7. Determinação da Temperatura ótima

A atividade de xilanase foi testada por ensaio enzimático em função das variações da temperatura a intervalos de 10°C entre 30 e 90°C nas condições de pH ótimo.

5.8. Estabilidade em relação ao pH

Para determinar a estabilidade das enzimas em relação ao pH, um volume final de um mL do extrato bruto devidamente diluído em tampão com pH específico na proporção de 1:1 (v/v), foi incubado por 24 horas a 24 °C em soluções tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (sendo essas as mesmas utilizadas no teste de pH ótimo, porém sem a adição de 1 % de xilana *Beechwood*). Após o período de incubação, a atividade enzimática foi mensurada pelo ensaio enzimático na condição de pH ótimo

determinada anteriormente. A atividade residual foi comparada ao controle feito por um volume de solução enzimática acrescido de um volume de água ultrapura, incubados por 24 horas e mensurada sua atividade total. O cálculo foi feito como descrito na equação 1.

5.9. Estabilidade térmica

Avaliou-se a estabilidade térmica incubando o extrato bruto na ausência do substrato por seis tempos diferentes (2, 5, 10, 20, 30 e 40 minutos), em temperaturas entre 30 e 90°C, seguida da determinação da atividade residual (equação 1) pelo ensaio enzimático nas condições ótimas de pH.

5.10. Avaliação das melhores condições de armazenamento

O extrato enzimático bruto foi armazenado em diferentes temperaturas, por 24 horas na presença e ausência de glicerol 50%. Para temperaturas negativas, em que as amostras sofreram o efeito de congelamento, o descongelamento foi feito por imersão das amostras em água à temperatura ambiente (+/- 25 °C).

A atividade enzimática foi mensurada antes (atividade inicial) e depois do armazenamento (atividade final) e a partir da atividade relativa (equação 1) foi identificada a melhor condição de estocagem do extrato enzimático bruto, a fim de garantir a estabilidade enzimática.

Equação 1:

$$\frac{Atividade\ final}{Atividade\ inicial} \times 100 = Atividade\ relativa\ (\%)$$

5.11. Efeito de íons e reagentes sobre a atividade xilanolítica

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.

Assim sendo, o homogeneizado foi submetido a uma resina de troca iônica mista (*Mixed Bed Resin*), que retém cátions e ânions. A seguir a amostra foi utilizada para testar o efeito de vários cátions na forma de sais de cloro na atividade enzimática através da adição individual de ZnCl_2 , AlCl_3 , NaCl , FeCl_3 , MnCl_2 , KCl , MgCl_2 , NiCl_2 , BaCl_2 , LiCl , CoCl_2 , CdCl_2 , CrCl_3 , SrCl_2 , CuCl_2 , CaCl_2 , além de tensoativos (Triton, Dodecil sulfato de sódio (SDS), Tween,), reagentes para cisteínas (Ditiotreitol (DTT)) e serinas (fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF)), solventes (etanol, acetona, isopropanol) e polímeros (polietilenoglicol 3.350 mol) seguindo os procedimentos já aplicados a outras enzimas (POLIZELLI; FACCHINI; BONILLA-RODRIGUEZ, 2013). A solução enzimática foi submetida à presença da substância química a ser testada na concentração final de 10 mmol L^{-1} , e a partir dessa mistura realizou-se o ensaio enzimático.

5.12. Efeito de compostos fenólicos sobre a atividade xilanolítica

A inibição foi avaliada pela determinação da atividade xilanolítica na presença de 10 mmol L^{-1} dos seguintes compostos: ácido tânico, ácido p-Cumárico, ácido sirínico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, vanilina, ácido vanílico, siringaldeído. Para isso, o extrato enzimático foi submetido à presença do composto fenólico por três diferentes tempos, 10 minutos, 24 e 48 horas, para posterior dosagem da atividade enzimática.

5.13. Determinação do ponto isoelétrico

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 $10 \times 6,25 \text{ cm}$, $0,22 \text{ g}$ de agarose foram dissolvidos em $13,2 \text{ mL}$ de água destilada e a solução foi aquecida em Banho-Maria a 50°C até completa diluição do ágar. Na sequência acrescentou-se $1,6 \text{ mL}$ 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 1 mol L^{-1} (solução anódica) e NaOH 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 min a 5 mA. Na sequência 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 amperagem para 8 mA e a corrida decorreu por mais 40 min.

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 os tubos nos quais foi encontrada atividade enzimática, foi medido o pH, sendo este estimado como o pI das xilanases presentes no extrato enzimático bruto.

5.14. Teste de inativação de Selwyn

Os ensaios enzimáticos foram realizados com a finalidade de avaliar a estabilidade da enzima em relação a diluição durante o ensaio, baseados na proposta de Selwyn (SELWYN, 1965). A amostra enzimática foi diluída duas, cinco e dez vezes, variando o tempo de reação (2, 6, 10, 14, 18, 22, 30 40 e 60 minutos). O gráfico de Selwyn foi confeccionado pelo produto da reação versus o tempo de incubação multiplicado pela concentração de enzima. O valor da concentração de produto é determinado pelo produto do tempo e da concentração de enzima. Sendo assim, o conjunto de curvas de progresso da reação devem se sobrepor se a enzima for estável.

5.15. Análises eletroforéticas: SDS-PAGE

O perfil de proteínas foi analisado por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (RHODES; BOSSIO; LAUE, 2009) (SEE; JACKOWSKI, 1990). O gel de corrida preparado na concentração de 10 % com o gel de empilhamento a 5 %, o tampão de corrida utilizado foi Tris-Glicina (pH 8,3). Na preparação da amostra utilizou-se a proporção de 1:1 (v/v) de solução enzimática mais tampão de amostra contendo azul de bromofenol 0,1%, glicerol 20% e SDS 10%, para serem aplicadas nos poços do gel. Como método de coloração do gel adotou-se nitrato de prata (CHEVALLET; LUCHE;

RABILLOUD, 2006). Utilizaram-se 5 μL da mistura dos marcadores de massa molecular *Low range* 6,5 – 66,0 kDa (Sigma-Aldrich).

A massa molecular da(s) xilanase(s) foi estimada em comparação com padrões de proteínas globulares de massa conhecida, através da confecção de um gráfico de Fischer (DENNISON, 2003) do logaritmo da massa molecular vs. a migração relativa no gel (distância percorrida pela banda em relação à migração do azul de bromofenol, representando este a máxima migração).

5.16. Análises eletroforéticas: Zimograma

O zimograma baseou-se no protocolo estabelecido por Polizeli e colaboradores (POLIZELI et al., 2012), porém foram adicionadas algumas modificações de acordo com Liao e colaboradores (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 proteica, sendo posteriormente incubado em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,5. Após 15 minutos trocou-se a solução por tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,5 enriquecido com 1% (m/v) do substrato xilana *Beechwood*, permanecendo a 50 °C por mais 30 minutos. A coloração foi feita em temperatura ambiente com 0,1% (m/v) de vermelho Congo durante 1 hora e a descoloração foi feita com NaCl 1 mol L⁻¹ até o aparecimento de bandas claras. Para dar o efeito de contraste ao gel e possibilitar melhor visualização acrescentou-se gotas de HCl 0,1 mol L⁻¹.

5.17. Estimativa da massa molecular em condições não desnaturantes

A massa molecular das enzimas foi estimada em condições não desnaturantes por cromatografia de filtração em gel (exclusão molecular), usando uma coluna XK-16 (*GE Life Sciences*) empacotada com 189 mL de resina Sephadex G-75 Sigma-Aldrich® de granulometria média, onde padrões de proteínas globulares (Soroalbumina Bovina 66 kDa, Ovoalbumina 44,2 kDa, Anidrase Carbônica 29 kDa, Mioglobina 17 kDa, Citocromo c 12 kDa) foram eluídos por um fluxo volumétrico de 11,8 mL h⁻¹ (fluxo linear de 5,9 cm h⁻¹) de tampão Tris-HCl 0,02 mol L⁻¹ pH 7,5 com 0,1 mol. L⁻¹ de NaCl. Foi confeccionado um gráfico do logaritmo da massa molecular em função do coeficiente de partição KaV.

5.18. Isolamento de xilanases presentes no extrato enzimático bruto

Ao longo do projeto foram feitas várias tentativas de isolamento das xilanases presentes no extrato enzimático por métodos de precipitação e cromatografia (de exclusão molecular, de troca iônica, hidrofóbica e de afinidade), porém sem resultados satisfatórios. Optamos, assim, por extrair as xilanases presentes no extrato enzimático bruto produzido pelo fungo *R. emersonii* após eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo o gel de separação confeccionado com uma concentração de 10% de poliacrilamida e o gel de empilhamento a 5%. Essa estratégia foi usada em outro projeto para isolamento de uma lipase vegetal (POLIZELLI et al., 2008).

Após a corrida o gel foi incubado em solução de 1 % de triton x-100, para remoção do SDS proveniente da preparação do gel e do tampão de corrida utilizado, seguindo para uma lavagem com tampão acetato pH 5,5 0,1 mol L⁻¹. Para determinar a região onde se encontravam as isoformas, uma parte do gel foi corada seguindo a metodologia de zimograma (item 5.16), enquanto que a outra parte permaneceu em tampão acetato. Ao final da coloração ambas as partes foram colocadas lado a lado, cortando-se tiras horizontais do gel sem coloração, correspondentes às isoformas identificadas no gel corado.

A extração das enzimas das tiras do gel ocorreu por adição de 1 mL de tampão acetato pH 5,5 0,1 mol L⁻¹ e trituração com bastão de vidro, deixando em repouso por aproximadamente dois minutos e retirando o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta. A pureza das frações foi verificada por uma nova análise eletroforética.

5.19. Substrato específico de catálise

A especificidade pelo substrato das isoformas isoladas foi determinada avaliando-se a atividade enzimática na presença de 4 mmol L⁻¹ de pNPG e pNPX, 4% de CMC, 1% de xilana *beechwood* e xilana *oat spelt* em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,5.

5.20. Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível

Os procedimentos seguiram as linhas gerais propostas por autores que analisaram a desnaturação térmica de enzimas (SAQIB et al., 2012; SAQIB et al., 2010; SIDDIQUI et al., 1997).

5.20.1. Caracterização quanto à temperatura ótima

A caracterização da temperatura ótima da xilanase isolada (denominada C) foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em microplaca (item 5.5.1.2.) variando a temperatura de incubação da amostra enzimática com o substrato xilana *beechwood* 1%, em 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 95 °C durante 10 minutos. A partir dos resultados obtidos foi confeccionado o gráfico de Arrhenius: logaritmo natural (ln) da atividade em U mL⁻¹ vs. 1000/T (onde T corresponde à temperatura absoluta em Kelvin: °C + 273,15), sendo a interseção no eixo x do encontro das linhas ascendentes e descendentes utilizado para calcular o valor de temperatura ótima.

Equação 2:

$$T(^{\circ}\text{C}) = \left(\frac{1000}{x}\right) - 273,15$$

5.20.1.1. Cálculo da energia de ativação

A energia de ativação da enzima (Ea) foi calculada pelo ajuste linear da porção descendente do gráfico de Arrhenius utilizando o valor de inclinação da reta multiplicado pela constante universal dos gases ($R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$).

Equação 3:

$$Ea = -(inclinação \cdot R)$$

5.20.1.2. Cálculo do coeficiente da temperatura

O coeficiente da temperatura foi calculado utilizando os valores de E_a e diversas temperaturas, a partir da equação a seguir, na qual $\ln$ se refere ao logaritmo natural:

Equação 4:

$$\ln Q_{10} = \frac{(E_a \cdot 10)}{R \cdot T^2}$$

5.20.2. Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível

Para calcular o efeito da temperatura sobre a desnaturação irreversível, a enzima foi incubada em diferentes temperaturas (50, 60, 70, 80 e 90°C) variando o tempo de incubação (15, 30, 60, 120 e 150 minutos), sendo posteriormente colocada em banho de gelo, permanecendo *overnight* a 4°C para restabelecimento de qualquer desdobramento reversível nas estruturas secundárias e terciárias (SAQUIB et al., 2010). A atividade xilanolítica foi determinada e comparada com uma amostra não exposta à incubação térmica (atividade residual).

Com os valores obtidos pelos procedimentos acima descritos foi confeccionado um gráfico do logaritmo natural da atividade residual no eixo y e o tempo de incubação térmica no eixo x. Aplicando-se a regressão linear sobre as retas, foi obtido o valor da inclinação, que corresponde a $-k_d$ (min^{-1}) (taxa de primeira ordem da inativação térmica).

5.20.2.1. Tempo de meia vida

O tempo de meia vida das xilanases em extrato enzimático bruto e da xilanase C foi calculado para todas as temperaturas testadas na desnaturação térmica irreversível, por meio da seguinte equação:

Equação 5:

$$T_{1/2} = \ln \frac{2}{k_d} = \frac{0,693}{k_d}$$

5.20.2.2. Energia de ativação da desnaturação térmica

Para calcular a energia de ativação da desnaturação térmica (K J mole^{-1}), foi construído um gráfico do logaritmo natural do k_d obtido anteriormente no eixo y vs. $1000/T$ (T corresponde à temperatura absoluta em Kelvin), e aplicou-se a regressão linear, sendo a inclinação da curva multiplicada pela constante universal dos gases ($R = 8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) na equação:

Equação 6:

$$E_{a(d)} = -(inclinação.R)$$

5.20.2.3. Entalpia de ativação da desnaturação térmica ΔH_D (K J mole^{-1})

Calculou-se a entalpia de ativação da desnaturação térmica seguindo a equação:

Equação 7:

$$\Delta H_D = E_{a(d)} - R.T$$

5.20.2.4. Energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica ΔG_D (K J mole^{-1})

A energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica foi calculada seguindo a equação 8.

Equação 8:

$$\Delta G_D = -R.T \times \ln \left(\frac{k_d \times h}{k_b \times T} \right)$$

k_b : Constante de Boltzmann = $1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$

h : Constante de Planck = $6,63 \times 10^{-34} \text{ J s}$

5.20.2.5. Entropia de ativação da desnaturação térmica ΔS_D (K J mole⁻¹)

Para calcular a entropia de ativação da desnaturação são necessários os valores de ΔH_D e ΔG_D calculados anteriormente e aplicados na equação:

Equação 9:

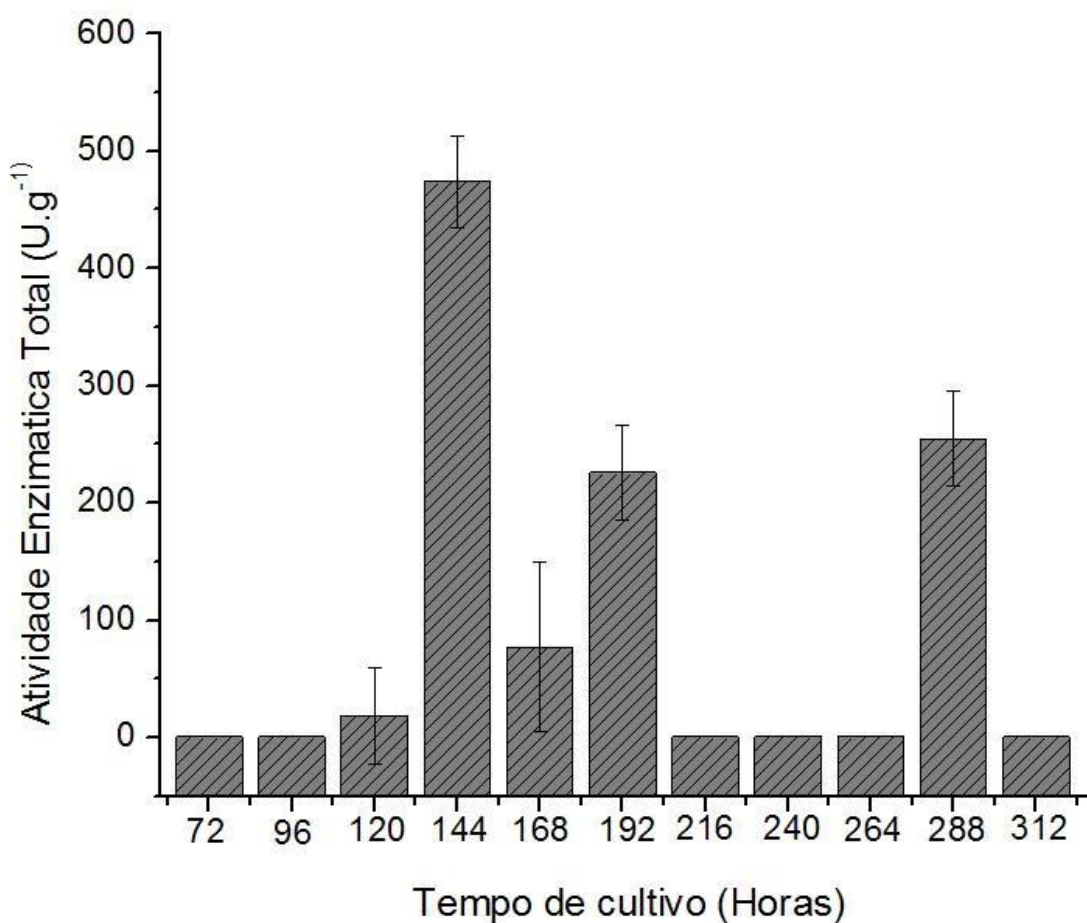
$$\Delta S_D = \frac{(\Delta H_D - \Delta G_D)}{T}$$

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Curva de produção: Cultivo em Estado Sólido

As amostras foram retiradas a cada 24 horas decorridas de 72 horas do início do cultivo. A maior produção de xilanase pelo fungo termofílico *R. emersonii* ocorreu em 144 horas de cultivo em estado sólido em BOD a 55°C, apresentando 405,72 U.g⁻¹ (Unidades de enzima por grama de substrato), sendo esse o padrão utilizado para produzir maiores volumes de extrato bruto para realização dos demais ensaios (Figura 7).

Figura 7. Curva de produção de xilanase pelo fungo termofílico *R. emersonii* por cultivo em estado sólido a 55 °C. A barra representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



Fonte: Autoria própria.

Ao analisarmos a composição química dos substratos utilizados para induzir a produção de xilanases, podemos concluir que a associação de diferentes substratos como o bagaço de cana-de-açúcar, a palha do milho e o farelo de trigo, se mostra efetiva, devido à **heterogeneidade da composição** a qual foi submetido o fungo.

A palha do milho é um resíduo disponível em grande quantidade, e potencial para utilização em processos industriais. Estudos mostram que a palha de milho apresenta maiores valores de xilana e menos proteína em relação ao talo da planta, sendo 26,8% de xilana na palha contra 19,4% de xilana no talo, 1,2% de proteína na palha e 3,4% de proteína no talo (PORDESIMO et al., 2005).

O bagaço da cana-de-açúcar é um importante resíduo agro industrial, sendo considerado coproduto na obtenção de produtos com valor agregado devido à sua composição química característica, que apresenta-se rica em celulose, hemicelulose e lignina, enquanto que os valores de cinzas totais é menor (1,0 – 5,5%) se comparado a outros materiais como palha de arroz (17,5%) e palha de trigo (11,0%) (CANILHA et al., 2013).

Essas peculiaridades tornam o bagaço de cana-de-açúcar um substrato atraente para cultivo de microrganismos produtores de enzimas lignocelulolíticas, pois a presença de celulose favorece o crescimento, principalmente dos fungos, em tempos menores, enquanto que a hemicelulose induz a produção da enzima de interesse do trabalho, as xilanases. Já a presença de lignina favorece a produção de enzimas ligninolíticas, que não são alvo do trabalho, porém são essenciais para que o fungo consiga ter acesso à hemicelulose.

Muitos estudos utilizam farelo de trigo como substrato para produção de biomassa ou metabólitos como enzimas por ser rico em amido, sendo um ótimo indutor de amilases, porém os oligossacarídeos presentes em sua composição se mostram eficientes na indução da produção de celulasas e hemicelulasas (SUN et al., 2008).

Em cultivo em estado sólido utilizando o fungo termofílico *Thermoascus lanuginosus* com farelo de trigo como substrato, Alam e colaboradores obtiveram após 7 dias de cultivo a 55°C o valor de 1.899,6 U.g⁻¹ de xilanase. Já em cultivo com bagaço de cana-de-açúcar nas mesmas condições, os valores foram de 824.5 U.g⁻¹ para o fungo *Thermomyces lanuginosus*, e de 292,6 U.g⁻¹ *Thermoascus aurantiacus* (ALAM et al., 1994).

Ao comparar a produção de xilanase em cultivo submerso pelo fungo *Penicillium decumbens* em diferentes concentrações de farelo de trigo e amido de trigo, Sun e colaboradores observaram um aumento na produção enzimática consequente do aumento de farelo de trigo em relação ao amido de trigo (SUN et al., 2008).

Devido à **heterogeneidade da composição** a qual foi submetido o fungo, pode-se explicar a queda na quantidade de xilanases observada em 168 horas de cultivo em comparação aos valores de 144 e 192 horas, assim como relatado por Alam e colaboradores, onde a produção de xilanases por *Thermoascus lanuginosus* apresentou uma queda do quarto dia de cultivo para o sétimo dia, quando utilizados os substratos de farelo de arroz (424,7 U para 404,0 U), polpa de sulfito (403,9 U para 397,7 U), serragem (457,8 U para 397,7 U) e palha de arroz (277,6 U para 261,0 U) (ALAM et al., 1994).

6.2. Determinação das condições de armazenamento

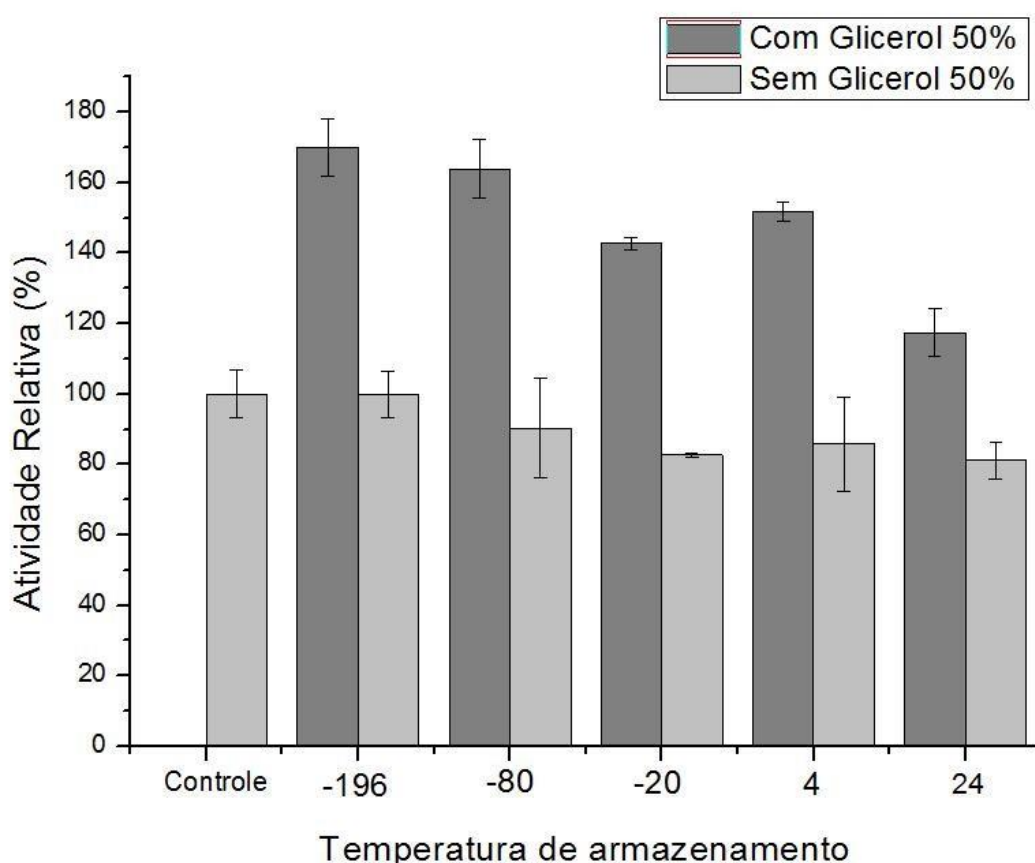
Ao determinar as melhores condições de armazenamento do extrato enzimático foi possível observar que em todas as condições de temperatura avaliadas na presença de 50% de glicerol aumentou significativamente a atividade das xilanases após 24 horas em relação ao controle (figura 9). Tanto na ausência como na presença de glicerol as duas melhores condições de armazenamento foram em nitrogênio líquido a -196°C que manteve 99% da atividade enzimática na ausência e 170% na presença de 50% de glicerol, e em freezer -80°C que manteve 90,2% na ausência e 163,8% na presença de glicerol 50%.

As temperaturas de -20°C e 4°C mostraram praticamente a mesma eficiência em manter a atividade das xilanases em estudo, sendo na ausência de glicerol com 82,7% e 85,7%, e na presença de glicerol 50% com 142,6% e 151,7% consecutivos. Em relação a temperatura ambiente do laboratório (variação entre 25-30°C) a enzima se manteve estável em 80% de atividade na ausência de glicerol e 117,3% na presença de glicerol 50% após 24 horas.

Saber qual a melhor condição para armazenar cada enzima em especial é importante para garantir a estabilidade da atividade enzimática pelo maior período de tempo. É possível observar que quanto mais rápido for o congelamento da

amostra, maior a chance de manter a atividade enzimática preservada (BHATNAGAR; BOGNER; PIKAL, 2007).

Figura 8. Atividade enzimática de xilanases em extrato enzimático bruto produzido pelo fungo termofílico *R. emersonii* após 24 horas em variadas temperaturas de armazenamento na presença e na ausência de 50% de glicerol. A barra representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



Fonte: Autoria própria.

As enzimas podem perder sua capacidade catalítica por alterações estruturais, que podem ser reversíveis ou irreversíveis, sendo o estado nativo aquele, no qual a molécula se encontra biologicamente ativa, e o estado desenovelado, aquele onde a molécula sofreu alteração do seu estado nativo e consequentemente alteração na sua capacidade catalítica (VOET; VOET, 2006).

É conhecido o efeito de osmólitos sobre a estabilidade conformacional de proteínas em situações adversas de estresse celular (VIANA; FILHO; PENHA-SILVA, 2006), sendo o glicerol um osmólito classificado como poli álcool, juntamente

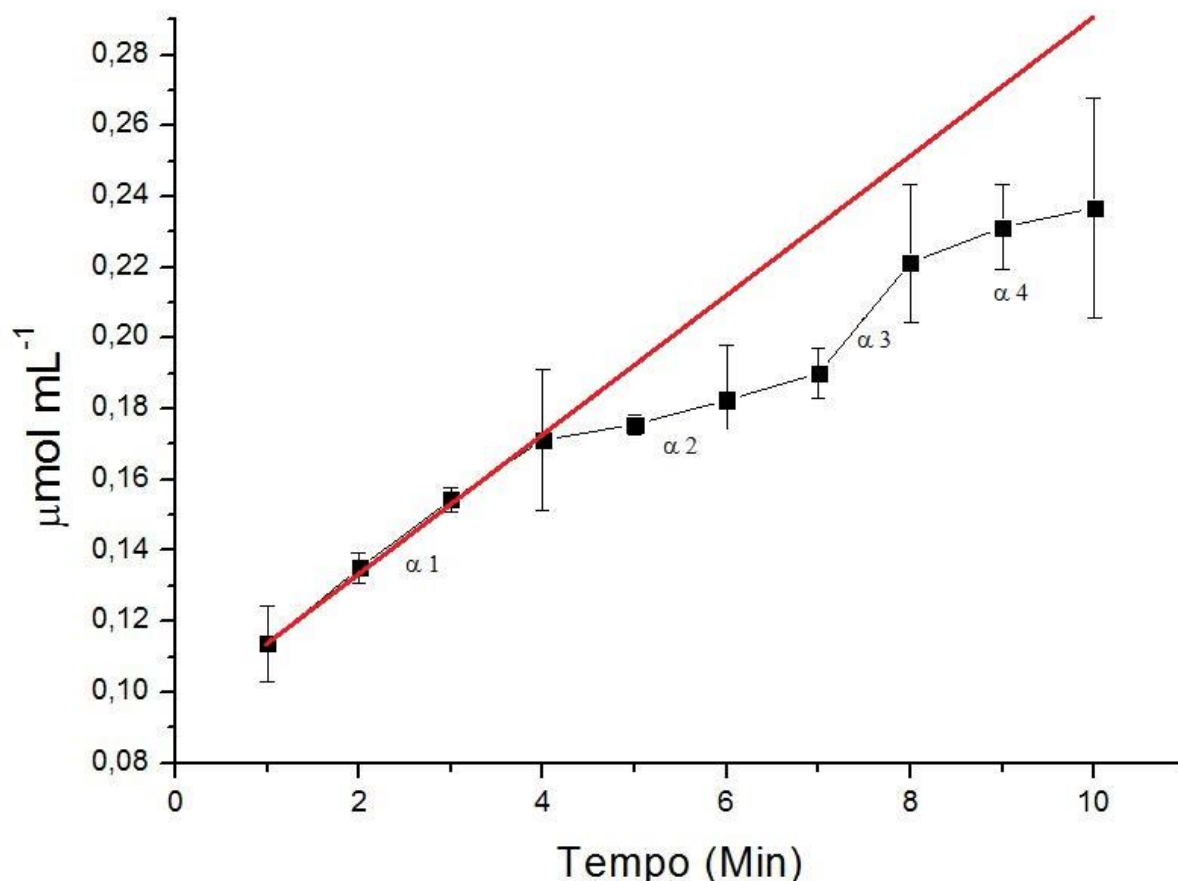
com o sorbitol, ele atua no equilíbrio entre os estados de uma proteína, aumentando o conteúdo energético em ambos os sentidos, porém em proporções diferentes. O glicerol favorece o dobramento da proteína, tornando a cadeia polipeptídica mais compacta e menos flexível, uma vez que, ele atua deslocando o equilíbrio da reação para o estado menos energético (BHATNAGAR; BOGNER; PIKAL, 2007).

A interação da enzima com o osmólito não é favorável para sua função, por isso eles são excluídos da superfície da proteína, onde ocorre a formação de uma camada de hidratação, formada por várias moléculas de água altamente organizadas e menos flexíveis que as demais. Sendo assim o estado desenovelado apresenta maior superfície de contato da cadeia polipeptídica com as moléculas de água, resultando em uma camada de hidratação maior, que necessitará de mais energia para estabilização, por essa razão o glicerol irá atuar deslocando o equilíbrio da reação no sentido do estado nativo, elevando assim os níveis de atividade enzimática (QU; BOLEN; BOLEN. 1998).

6.3. Determinação do tempo de incubação

O tempo de incubação é o primeiro ensaio a ser realizado quando se estuda uma enzima, no qual determina-se a quantidade de produto que é formado enquanto o substrato é consumido em função do tempo. À medida que aumenta o tempo de reação mais substrato é consumido e a liberação do produto segue um aumento linear, até um ponto em que a inclinação diminui devido ao decréscimo da velocidade de reação, decorrente de vários fatores tais como a disponibilidade de substrato, eventual reversibilidade da reação ou instabilidade da enzima. Esse tempo limite no qual se verifica a linearidade é o tempo máximo de incubação a partir do qual é determinada a taxa inicial ou velocidade inicial da reação. Após esse tempo a diminuição do declive da curva continua até chegar em um ponto onde se tornará zero, isso significa que as reações reversas encontram-se em equilíbrio (DENNISON, 2003).

Figura 9. Velocidade inicial de reação das xilanases em extrato enzimático bruto produzido pelo fungo termofílico *R. emersonii* para determinação do tempo de incubação. O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



Fonte: Autoria própria.

As xilanases alvos do presente estudo apresentaram linearidade na taxa de reação entre 1 e 4 minutos, e após esse período é possível observar que a inclinação da reta de atividade enzimática diminui ($\alpha 1$ maior que $\alpha 2$ e $\alpha 4$), em contrapartida de 7 a 8 minutos a inclinação volta a aumentar ($\alpha 3$), porém não se encontra dentro da reta “imaginária” seguindo a inclinação de $\alpha 1$.

Embora a interseção no eixo y possa sugerir que um tempo menor de incubação pudesse ser mais adequado, dois fatores tornariam impraticável diminuirmos o tempo: o sinal medido (absorbância) que ficaria muito baixo e próximo do “ruído” do espectrofotômetro, e devemos considerar ainda a heterogeneidade do substrato, que provavelmente mostraria interferências nesse intervalo menor no que se refere à replicabilidade.

6.4. Avaliação dos efeitos de pH sobre a atividade xilanolítica: pH ótimo e estabilidade de pH

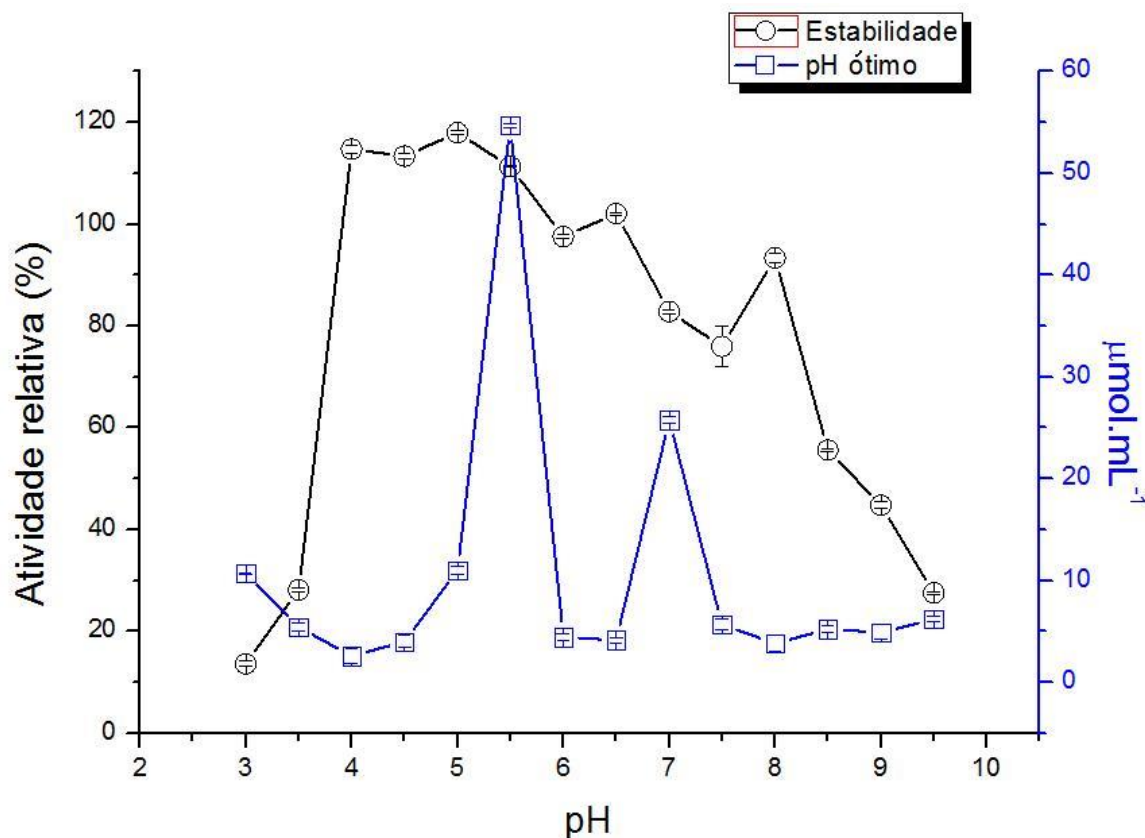
O efeito da variação de pH sobre a atividade enzimática decorre principalmente de alterações na estrutura tridimensional dessas moléculas, pelo efeito que o pH induz sobre os grupos ionizáveis dos aminoácidos presentes na estrutura das enzimas e dos resíduos do sítio ativo (catalíticos e de posicionamento).

A ionização de grupos ionizáveis expostos ao meio altera a carga desses grupos, fazendo com que estes percam ou ganhem capacidade de interagir ionicamente com outros grupos, alterando a estrutura tridimensional de modo a favorecer ou desfavorecer o domínio catalítico a receber o substrato (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008).

Dentro da faixa de valores de pH estudada a maior atividade xilanolítica ocorreu em dois valores: 5,5 e 7,0 (figura 10), o que sugeriu a presença de mais de uma isoforma no extrato enzimático produzido pelo fungo *Rasamsonia emersonii*. Essa suposição foi confirmada por zimograma (figura 11), nos quais foi possível visualizar 4 bandas de xilanases.

Em relação à estabilidade frente às variações de pH (figura 10), os tampões utilizados para incubar a amostra durante 24 horas não continham xilana. Após o tempo estabelecido a atividade xilanolítica foi quantificada e observou-se que a enzima manteve atividades acima de 70% entre os valores de pH de 4 a 8, sendo valores maiores que 100% de 4 a 5,5.

Figura 10. Efeito do pH sobre a atividade xilanolítica em extrato enzimático bruto produzido pelo fungo termofílico *R. emersonii*. Estabilidade em relação ao pH e pH ótimo. O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



Fonte: Autoria própria.

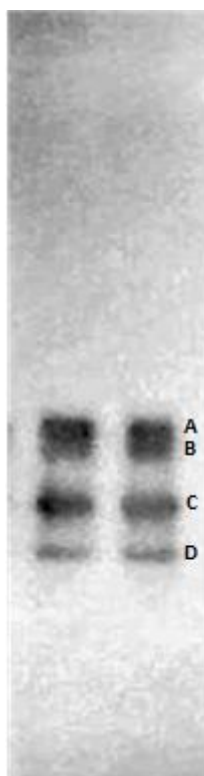
Os resultados observados corroboram com os descritos por SILVA e colaboradores, que obtiveram pH ótimo de 5,5 para xilanase produzida pelo fungo mesofílico *Aspergillus fumigatus* em cultivo em estado sólido a 45°C durante 7 dias (SILVA et al., 1999). Em 1992 Tuohy e Coughlan avaliaram as características das xilanases produzidas pelo fungo *Rasamsonia emersonii*, na época classificado como *Talaromyces emersonii*, e descreveram o pH ótimo para atividade xilanolítica sendo 5,5 (TUOHY; COUGHLAN, 1992).

É difícil realizar uma comparação entre valores ótimos de pH para enzimas, embora da mesma classe, pois é necessário levar em consideração os aminoácidos presentes na estrutura primária das enzimas e que constituem resíduos catalíticos e de posicionamento, os quais poderiam sofrer o efeito de ionização sobre seus grupos funcionais expostos, e a composição química de cada tampão, que pode

alterar a força iônica do meio, por exemplo, afetando diretamente a atividade enzimática.

Para tentar eliminar a interferência da composição química dos tampões, muitos autores escolhem realizar o teste utilizando o tampão de McIlvaine (GOMES et al., 2016; GONÇALVES et al., 2012), porém no presente trabalho foi observada baixa solubilidade da xilana nesse tampão, não conferindo confiabilidade ao ensaio enzimático.

Figura 11. Zimograma de xilanases presentes no extrato enzimático bruto produzido pelo fungo *R. emersonii*. O gel foi corado com 0,1% de vermelho Congo e descorado com NaCl 1 mol L⁻¹. As bandas escuras evidenciam a presença de xilanase e as letras (A, B, C e D) identificam as possíveis isoformas da enzima (a imagem foi transformada de colorida para tons de cinza, depois no seu negativo e o contraste tornado mais evidente usando o software livre GIMP versão 2.8.10).



Fonte: Autoria própria.

Sapag e colaboradores em 2002 (SAPAG et al., 2002) analisaram as sequências de oitenta e duas endoxilanases pertencentes à família 11 de glicosídeo hidrolases, obtidas de diferentes fontes, sendo a maioria de microrganismos, e

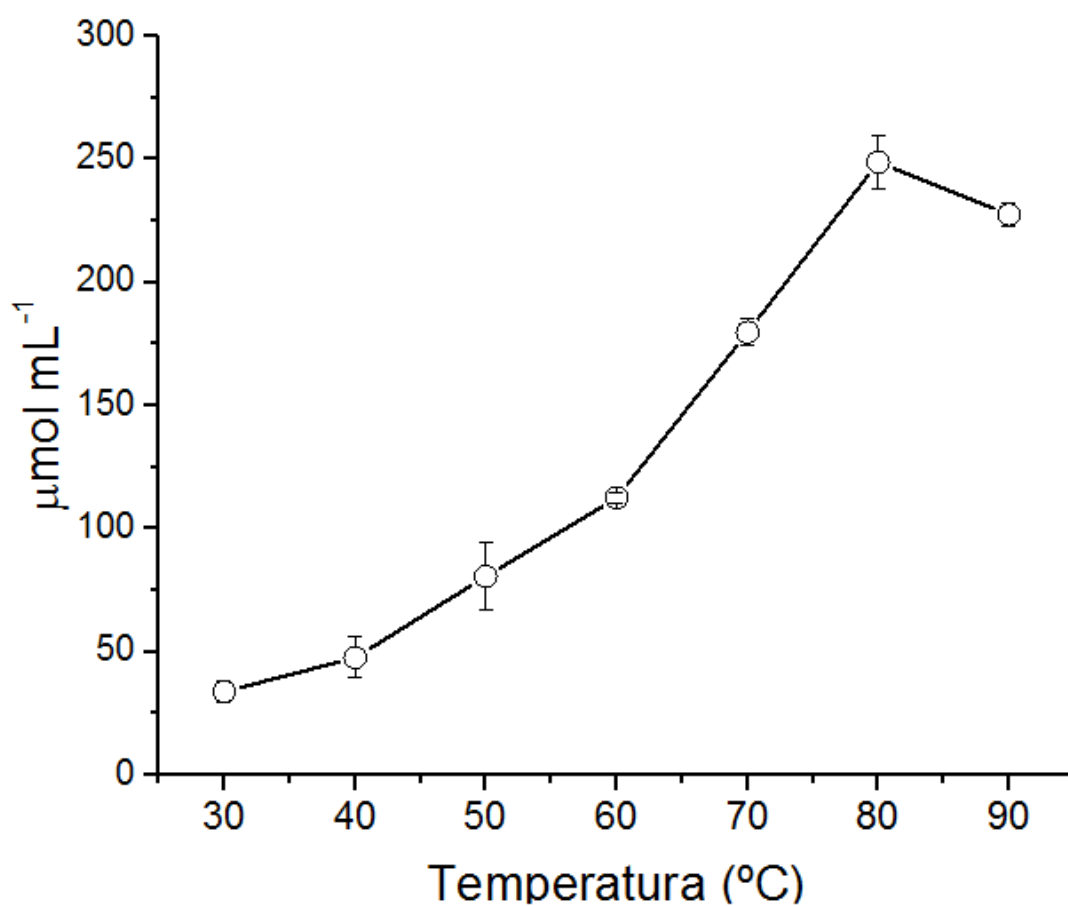
relataram que as xilanases que apresentam pH ótimo em faixas alcalinas, possuem um resíduo de asparagina na posição 100, enquanto que as enzimas cujo pH ótimo se encontra na faixa ácida, possuem um ácido aspártico na mesma posição.

6.5. Avaliação dos efeitos da temperatura sobre a atividade xilanolítica: Temperatura ótima e estabilidade térmica

Em relação ao efeito da temperatura de incubação, ao realizar a reação por 4 minutos, foi possível observar um aumento exponencial na atividade enzimática até 80°C (temperatura com maior valor de atividade), e uma leve queda desse valor a 90°C (Figura 12).

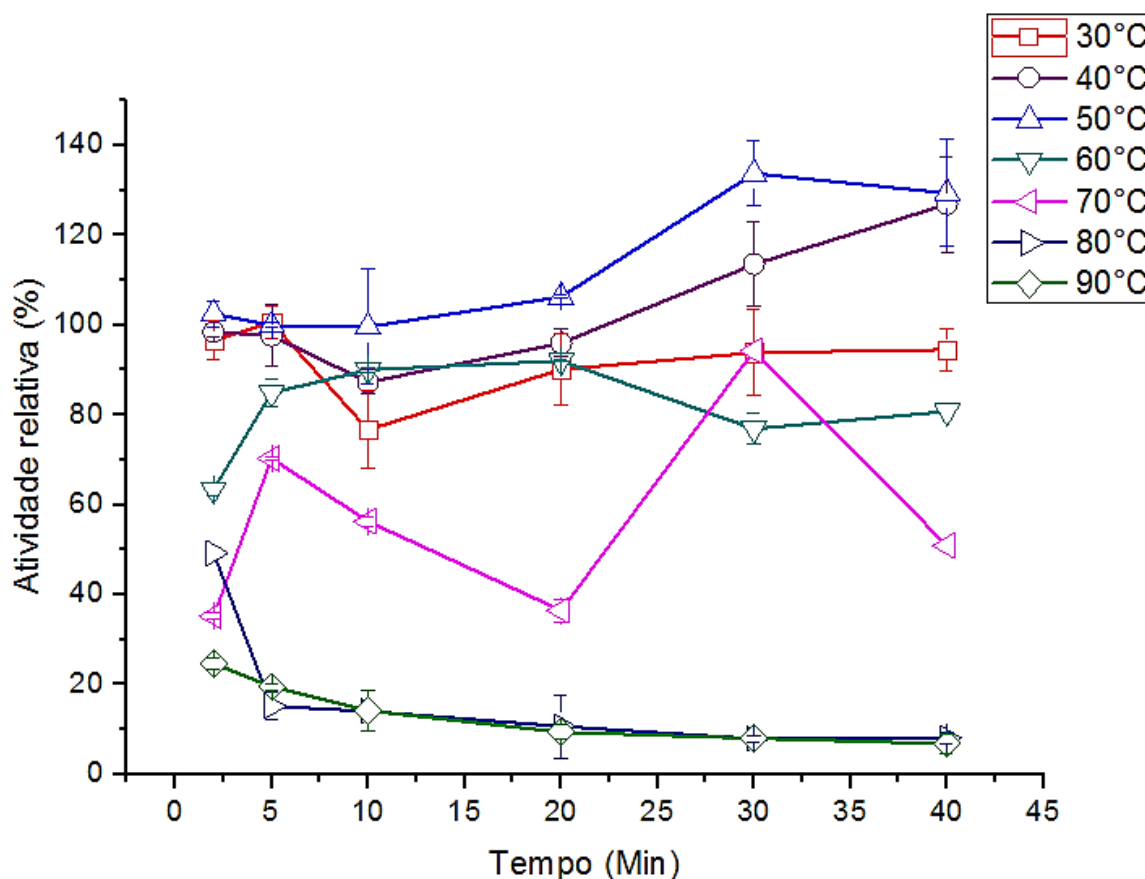
Ao realizar o teste de estabilidade térmica, incubando o extrato bruto na ausência de substrato por diferentes intervalos de tempos nas mesmas temperaturas avaliadas anteriormente, para posterior realização do ensaio enzimático, observou-se que as melhores temperaturas foram de 40 e 50°C com valores maiores de 100% da atividade relativa para as amostras incubadas a essa temperatura por 30 e 40 minutos (Figura 13).

Figura 12. Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade xilanolítica em extrato enzimático bruto produzido pelo fungo termofílico *R. emersonii*. Os ensaios foram executados em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,5 com 1% (m/v) de xilana. O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



Fonte: Autoria própria.

Figura 13. Efeito da temperatura de pré-incubação em diversos tempos sobre a atividade xilanolítica em extrato enzimático bruto produzido pelo fungo termofílico *R. emersonii*. O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



Fonte: Autoria própria.

Esses resultados demonstram que a enzima necessita de altas temperaturas para alcançar seu máximo de atividade catalítica, porém as xilanases produzidas pelo fungo em estudo não apresentam boa estabilidade quando expostas a temperaturas acima de 70° C, como foi relatado em 2013 por uma notificação publicada no GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (GRN nº479, 2013), em que as atividades das enzimas produzidas pelo fungo *Rasamsonia emersonii* sofrem desnaturação a altas temperaturas e são inativadas em estado de fervura.

No presente estudo foi possível perceber o efeito protetor do substrato em relação à enzima, pois o complexo enzima-substrato quando exposto a elevadas temperaturas mostrou maior liberação de produto, isso se explica pelo fato de que ao se ligarem ao substrato as enzimas tendem a sofrer mudanças na sua estrutura

inicial, devido às interações não covalentes que ocorrem entre o sítio ativo da enzima e o substrato; essas ligações são do mesmo tipo que ocorrem durante o processo de enovelamento das proteínas e que asseguram sua estabilidade (VOET; VOET, 2006), e neste caso a ligação do substrato restringe a liberdade conformacional da enzima, tornando-a menos propensa à desnaturação.

Tuohy e Coughlan obtiveram o mesmo valor de temperatura ótima para o extrato bruto produzido pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* (na época ainda classificado como *Talaromyces emersonii*) (TUOHY; COUGHLAN, 1992). Gomes em 2014 também apresentou 80°C como temperatura ótima para uma xilanase produzida pelo fungo *Chrysosporthe cubensis*, e decréscimo da atividade xilanolítica em valores de temperatura acima de 80°C, sendo os maiores valores de atividade durante a estabilidade térmica na faixa de temperatura entre 65 e 80°C (GOMES, 2014).

A figura 13 indica que o extrato enzimático poderia suportar mais tempo nas temperaturas de 40 e 50 °C, pois os níveis de atividade residual após 40 minutos de incubação nessas temperaturas se encontram acima de 100%, diferentemente das demais temperaturas avaliadas. Por esse motivo avaliou-se o tempo de meia vida do extrato bruto nas temperaturas de 40 e 50°C, obtendo-se os valores de 16 e 23 horas respectivamente. Esses valores são superiores aos relatados por Vasconcellos e colaboradores em 2015, onde a xilanase produzida em cultivo combinado (sólido e posterior enriquecimento com meio de cultivo, tornando-se submerso) por uma espécie de *Trichoderma*, apresentou tempo de meia vida de 158 minutos a 50°C (VASCONCELLOS et al., 2015).

A elevação da atividade após 20 minutos apresentada em 70°C também pode ser observada nas temperaturas de 30, 40 e 50°C, porém não tão expressiva e sem quebra brusca em 40 minutos, para eliminar hipótese de erro experimental a análise foi repetida diversas vezes na temperatura de 70°C e todas as repetições mostraram o mesmo resultado.

6.6. Efeito de íons e reagentes sobre a atividade xilanolítica

É fundamental conhecer quais substâncias são capazes de exercer efeito de elevar ou diminuir a atividade enzimática, dessa forma é possível planejar com maior

eficiência o processo no qual se deseja aplicar a enzima, de modo a garantir a maior eficiência catalítica.

Aproximadamente um terço das enzimas conhecidas precisa de cofatores para sua ação catalítica, sendo estes em muitos casos cátions mono ou divalentes (VOET; VOET, 2006). Quando a presença de um desses íons eleva a atividade enzimática costuma se atribuir a ele um papel fisiológico como cofator.

Em relação ao efeito de substâncias químicas (Tabela 2) a atividade enzimática das xilanases presente no extrato bruto produzido pelo fungo *R. emersonii* diminuiu de forma significativa com todas as substâncias testadas. A atividade se mostrou extremamente sensível à presença de 10 mmol L⁻¹ do detergente SDS, sendo reduzida a 3,5% da sua atividade inicial, já na presença de polietilenoglicol a redução foi de 30,9%. Triton X-100 foi capaz de manter 71,1% de capacidade catalítica, enquanto que DTT e PMSF mantiveram 77,8% e 78,5% respectivamente. Acetona e Etanol também não diminuíram drasticamente a atividade xilanolítica, mantendo-a em 83,6% para acetona e 86,1% para etanol. O efeito foi ainda menor na presença de isopropanol, mantendo 90,2% de atividade residual.

Tabela 2: Efeito de substâncias químicas na concentração de 10 mmol L⁻¹ sobre a atividade residual percentual (média $\pm$ D.P.) de xilanases presentes em extrato enzimático produzido pelo fungo termofílico *R. emersonii*. (*) Diferença significativa em relação ao controle, pelo teste t de Student para amostras independentes.

	Ativ. Res. (%)	$\pm$ DP
SDS	3,52*	0,01
PEG	69,13*	0,05
Triton	71,11*	0,02
DTT	77,81*	0,01
PMSF	78,47*	0,04
Acetona	83,62*	0,03
Etanol	86,13*	0,02
Isopropanol	90,18*	0,07
EDTA	104,08*	0,02
Controle	100,00	0,11

Fonte: Autoria própria.

O decréscimo da atividade induzido pelo SDS também foi relatado para xilanases produzidas pelo fungo *Streptomyces actuosus* cultivado em farelo de arroz (WANG; et al., 2003), e para xilanases purificadas de *Aspergillus aculeatus* (FUJIMOTO et al., 1995). O SDS é um detergente aniônico e apresenta uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. A porção hidrofóbica do SDS se liga às proteínas em uma proporção de uma molécula de detergente para cada dois resíduos de aminoácidos, assim as ligações hidrofóbicas das proteínas são desestabilizadas e estas perdem sua estrutura tridimensional, enquanto que a porção hidrofílica do tensoativo apresenta elevada carga negativa, que passa a ser predominante na superfície da proteína e leva ao desenovelamento da proteína devido à repulsão eletrostática (VOET; VOET, 2006), dessa forma as enzimas perdem suas características estruturais e consequentemente sua capacidade catalítica.

O PEG é um polímero hidrofílico e solúvel em água, usado em técnicas de precipitação de proteínas por floculação, pois suas moléculas sequestram a água disponível no meio forçando as proteínas a precipitarem, sendo assim acredita-se que proteínas maiores tendem a precipitar mais rápido que proteínas menores (DENNISON, 2003). GILDS e SWAIN avaliaram o efeito desse polímero na proteção de celulasas frente aos efeitos inibitórios de taninos, e observaram que, diferente dos detergentes não iônicos, a atividade da enzima não era recuperada na presença do polietilenoglicol (GOLDSTEIN; SWAIN, 1965).

O Triton é um detergente não iônico, ou seja, não apresenta grupamento hidrofílico carregado, é utilizado na extração de proteínas de membrana, pois interage mais fortemente com lipídeos do que com proteínas, desestabilizando a membrana lipoproteica e facilitando a extração das proteínas (BHAIRI; MOHAN, 2007). Por essa razão não é considerado agente desnaturante, uma vez que não afeta a estrutura e a carga da proteína, e podem apresentar efeito de elevação da atividade enzimática, como no caso da xilanase obtida de *Geobacillus sp* que teve atividade residual de aproximadamente 115% na presença de 10 mmol L⁻¹ de triton x-100 (BIN; ZHAO; XIE, 2012), porém, assim como no presente trabalho, o efeito de diminuição da atividade xilanolítica foi observado para uma xilanase parcialmente purificada de *Simplicillium obclavatum*, onde a redução da

atividade foi de 37% na presença de 6 mmol L⁻¹ de triton x-100 (ROY et al., 2013).

A redução das ligações dissulfeto em resíduos de cisteínas em proteínas é feita em geral por reagentes redutores tiólicos como o DTT (ROCHA et al., 2005) que ao clivarem as ligações dissulfeto (-S-S-) desestabilizam a estrutura tridimensional das proteínas. A presença de DTT em concentrações relativamente baixas (menos de 60 mM) pode melhorar o desenvolvimento de proteases (SILVA, 2011), sendo assim o DTT pode diminuir a atividade xilanolítica por duas maneiras, alterando a estrutura tridimensional das enzimas, ou ativando proteases que poderiam degradar as proteínas do complexo enzimático, e no caso das xilanases foi observado um decréscimo da atividade, assim como para β -xilosidade de *P. janczewskii* (TERRASAN; GUIBAN; CARMONA, 2016), e para endo-xilanase de *Talaromyces thermophilus* (MAALEJ et al., 2009).

A presença de mais de uma xilanase no extrato enzimático dificulta a interpretação do resultado apresentado para o efeito de PMSF, considerando que esse é um agente usado como inibidor de serino proteases; sua presença na reação de atividade enzimática iria inibir a ação da enzima que apresentasse em seu sítio ativo resíduos de aminoácidos de serina (SERRANO; MAROUN, 2005). Foi possível observar uma redução da atividade enzimática de 21,5%, porém xilanases não contêm serinas como resíduos catalíticos, e sim resíduos ácidos (BAZZI et al., 2016).

Uma suposição que pode ser adotada para esse resultado, é que os resíduos de serina inibidos por PMSF podem se encontrar próximos e não necessariamente na região do sítio ativo da enzima. Restrição na atividade xilanolítica por PMSF também foi relatada em xilanase de *Penicillium janczewskii*, onde a inibição da atividade enzimática foi de 44,5% na presença de 10 mmol L⁻¹ de PMSF (TERRASAN et al., 2016).

A atividade enzimática em solventes orgânicos é alterada devido à interação de mais uma fase ao sistema além da fase aquosa (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004), sendo também agentes desnaturantes ao promoverem alterações na constante dielétrica do meio e interagirem com resíduos dos bolsões hidrofóbicos da proteína. A análise detalhada do efeito de álcoois como o metanol e o trifluoroetanol mostra a indução do estado terciário

parcialmente desnaturado denominado “glóbulo derretido” (JAENICKE, 1996) enquanto simultaneamente estabilizam algumas estruturas secundárias tais como alfa hélices e folhas beta (YU et al., 2016).

Como enzimas xilanolíticas necessitam de água para realizar o processo de hidrólise, ao incorporar mais uma fase à reação enzimática, o acesso das enzimas a água seria desfavorecido e a atividade enzimática reduzida, como observado para as xilanases produzidas por *Rasamsonia emersonii* no presente estudo, que manteve mais de 80% de atividade na presença de 10 mmol L⁻¹ dos solventes orgânicos, etanol, acetona e isopropanol.

A discreta elevação da atividade observada na presença de EDTA sugere que as enzimas não são metaloenzimas, pois quando ocorre diminuição da atividade isso sugere a necessidade de cofator (TERRASAN et al., 2016).

Tabela 3: Efeito de íons clorados na concentração de 10 mmol L⁻¹ sobre a atividade de xilanases (média ± D.P.) presentes no extrato enzimático produzido pelo fungo termofílico *R. emersonii*. (*) Diferença significativa em relação ao controle, pelo teste t de Student para amostras independentes.

	Ativ. Res. (%)	± D.P.
CaCl₂	130,63*	0,04
NaCl	124,36*	0,78
KCl	117,75*	2,89
CdCl₂	114,22*	0,91
SrCl₂	114,19*	6,49
LiCl	95,72*	3,43
FeCl₃	93,60*	4,25
MnCl₂	91,89*	2,16
AlCl₃	89,29*	0,88
BaCl₂	87,60*	3,57
ZnCl₂	71,35*	2,40
CoCl₂	69,50*	0,86
NiCl₂	50,52*	4,61
MgCl₂	48,19*	0,12
CrCl₃	23,50*	0,88
CuCl₂	2,70*	1,64
Controle	100,00	0,04

Fonte: Autoria própria.

Apesar da observação anterior, alguns íons promoveram aumento da atividade enzimática, enquanto que outros provocaram sua diminuição.

O efeito dos íons no sentido mais geral e não apenas relacionado aos cátions metálicos sobre a atividade enzimática pode ser explicado por três mecanismos diferentes, primeiro sendo o íon o próprio substrato enzimático, segundo o íon agindo como cofator ou cossustrato e auxiliando a atividade catalítica, e terceiro o íon como parte da estrutura enzimática, mas sem efeito

direto na função catalítica (BAUDUIN et al., 2004). No último exemplo temos íons que afetam as propriedades catalíticas por induzirem alterações conformacionais, como é o exemplo da trombina, a qual é ativada alostericamente pelo íon Na^+ (DI CERA, 2008).

Outro efeito dos íons foi descrito por Hofmeister, que observou seu efeito na precipitação de proteínas, por modificações na estrutura da água devido a interações de caráter caotrópico ou cosmotrópico (HOFMEISTER, 1888). Porém a ordem de ativação e inibição dos íons obtidas no presente estudo, não é a mesma ordem de estabilização e desestabilização das séries de Hofmeister.

A diminuição da atividade por Cu também aconteceu com a xilanase de *Penicillium janczewskii*, reduzindo-a a níveis não detectáveis nas condições de ensaio enquanto que Na aumentou em 15,7% a atividade enzimática nas mesmas condições (TERRASAN et al., 2016).

O cálcio também aumentou a atividade para as duas xilanases purificadas provenientes do fungo *Penicillium sclerotiorum* em 28,7 e 22% da atividade controle (KNOB; CARMONA, 2010).

Se pensarmos que o metal não necessariamente participa da ação da enzima por ligação ao sítio ativo, porém poderia alterar sua conformação por interação com outras partes da proteína, isso explicaria por que a atividade enzimática não é nula na ausência do cátion. A enzima estaria na forma ativa, porém com atividade menor do que a conformação que seria induzida pela ligação do íon.

6.7. Efeito de compostos fenólicos sobre a atividade xilanolítica

Compostos fenólicos são formados por hidroxilas ligadas a hidrocarbonetos aromáticos, fazem parte da estrutura da lignina (figura 4) e são liberados durante o pré-tratamento térmico e ácido da biomassa lignocelulósica, sendo conhecidos como inibidores da ação enzimática e do crescimento de microrganismos fermentadores (SEWALT; GLASSER; BEAUCHEMIN, 1997; TEJIRIAN; XU, 2010), por isso, avaliou-se o efeito desses compostos sobre a atividade xilanolítica do extrato enzimático bruto produzido pelo fungo *Rasamsonia emersonii*, os resultados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Efeito de compostos fenólicos na concentração de 10 mmol L⁻¹ sobre a atividade relativa (%) de xilanases presente em extrato enzimático bruto produzido pelo fungo termofílico *R. emersonii*. (*) diferença significativa em relação ao controle, pelo teste t de Student para amostras independentes.

	10 minutos		24 horas		48 horas	
	%	DP	%	DP	%	DP
Tânico	7,02 *	0,80	12,59 *	0,35	20,00 *	4,52
Cumárico	120,83 *	3,28	111,07	2,35	118,47	1,08
Gálico	94,77	3,89	110,77	4,39	120,95	3,82
Ferúlico	119,58 *	2,15	109,66	2,38	116,4	1,80
Hidroxibenzoico	109,68	4,30	110,54	6,05	113,84	2,00
Vanílico	114,60 *	5,55	109,82	2,68	115,72	3,45
Vanilina	110,68 *	1,88	98,72 *	0,48	107,76	3,28
Siríngico	123,64 *	5,14	111,15	1,32	111,85	0,21
Siringaldeído	115,21 *	5,51	111,31 *	1,67	118,96	2,41
Controle	100	6,28	100	7,62	100	4,61

Fonte: Autoria própria.

Com exceção do ácido tânico, a maioria dos compostos fenólicos avaliados em 10 minutos de tratamento elevaram os níveis de atividade em comparação ao controle, porém ao aumentar o tempo de tratamento da amostra enzimática com o composto fenólico, o diferença da atividade não se tornou significativa em relação ao controle, contrariando os resultados encontrados na literatura, onde efeitos de inibição enzimática por esses compostos são descritos para xilanases purificadas. Na maioria dos casos não há mudança perceptível na atividade em função do tempo de exposição ao composto fenólico. Contudo, é interessante ressaltar que na presença do ácido tânico parece haver uma tendência à diminuição do efeito conforme aumentou o tempo.

Provavelmente a heterogeneidade do extrato enzimático bruto impede a queda da atividade xilanolítica, tornando esse material favorável para ser utilizado no processo de hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica. Sharma e colaboradores apontaram a existência de enzimas fenolíticas associadas ao metabolismo fúngico de degradação da lignina, ao cultivarem

Aspergillus japonicus na presença de compostos fenólicos, avaliando o desenvolvimento da biomassa fúngicas e a inibição de enzimas hemicelulolíticas (SHARMA et al., 1985).

Boukari e colaboradores em 2011 avaliaram o mecanismo de inibição de compostos fenólicos sobre uma endo- β -1,4-xilanase purificada de *T. xylinolyticus*, e concluíram que a inibição ocorre devido interações podem incluir o empilhamento de anéis aromáticos hidrofóbicos (entre compostos fenólicos e cadeias laterais de triptofanilo) e / ou interações de hidrogénio entre os seus grupos funcionais (COOH, OH) e os resíduos de aminoácidos básicos, sendo que essa interação não ocorre na região catalítica da enzima, caracterizando uma inibição não competitiva (BOUKARI et al., 2011).

Nesse contexto, a expressiva diminuição da atividade xilanolítica pelo ácido tânico poderia ser explicada pelo elevado tamanho da molécula do ácido, (nove moléculas de ácido gálico ligadas a uma molécula de glicose) que apresentaria maior interação com a estrutura da enzima, modificando sua conformação nativa e alterando assim a região catalítica. Da mesma maneira, pode-se explicar a elevação dos níveis de atividade enzimática, uma vez que modificando sua estrutura, pode-se tornar a região catalítica mais acessível ao substrato do que na sua conformação nativa.

6.8. Determinação do ponto isoelétrico

O ponto isoelétrico de xilanases varia entre uma faixa de 3 a 10 (KULKARNI et al., 1999), enquanto para as xilanases presentes no extrato enzimático bruto produzido pelo fungo *R. emersonii* o pI foi estimado em 6.5 por eletroforese em gel de agarose, resultado muito semelhante ao da xilanase de *Aspergillus niger* caracterizada em 1981 de 20,8 kDa, que apresentou pI de 6,7 (FREDERICK et al., 1981), o mesmo pI foi relatado para uma xilanase purificada de *Aspergillus kawachii* de 35 kDa (ITO et al., 1992).

As xilanases foram classificadas por Wong e colaboradores em 1988 em dois grupos, baseando-se nas características de massa molecular e ponto isoelétrico (WONG; TAN; SADDLER, 1988), sendo o primeiro grupo formado por enzimas de alta massa molecular e ponto isoelétrico ácidos, agrupadas na família 10, e o segundo grupo agrupado na família 11, caracterizadas pela baixa

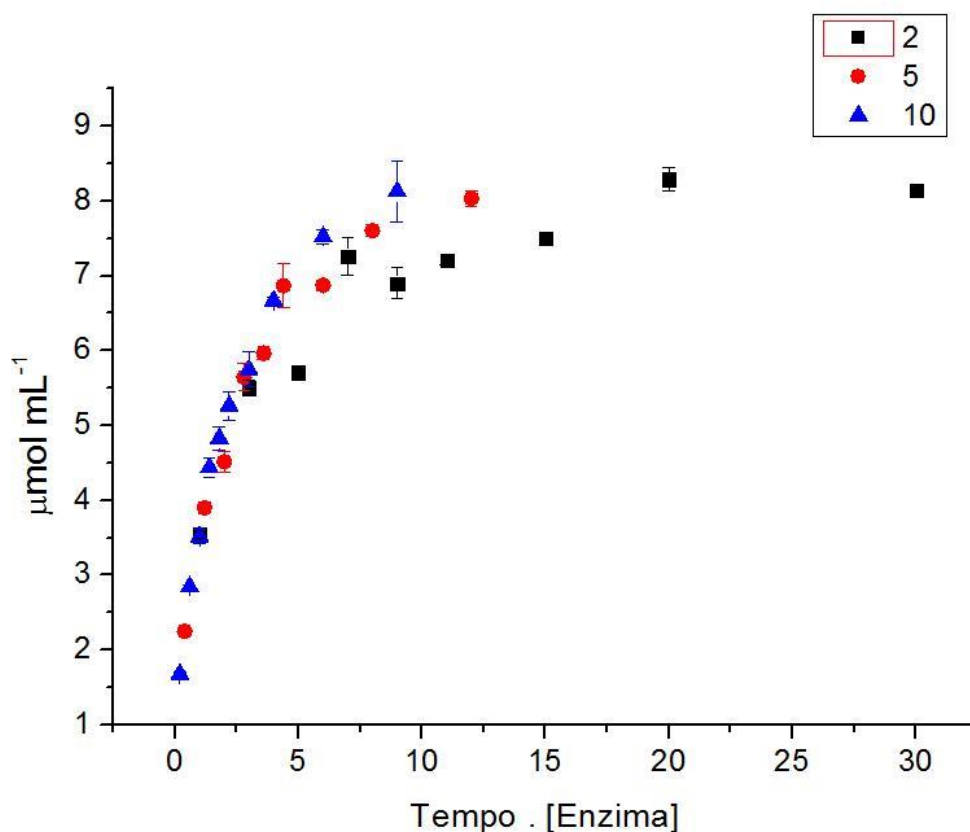
massa molecular e valores alcalinos como ponto isoelétrico. Em 2002 essa classificação passou a levar em consideração a estrutura e mecanismo de catálise das enzimas (SAPAG et al., 2002).

6.9. Teste de estabilidade de Selwyn

Geralmente as enzimas se apresentam mais instáveis em baixas concentrações do que em concentrações maiores, porém no caso das xilanases avaliadas a partir do extrato enzimático bruto produzido pelo fungo *R. emersonii*, a maior estabilidade se mostrou em maiores diluições.

De acordo com Selwyn, isso pode ser explicado por duas causas, primeiro pelo efeito protetor do substrato sobre a enzima, pois em maiores diluições a enzima se encontra com maior superfície de contato com o substrato do que em diluições mais concentradas, segundo pelo efeito inibidor de algum dos produtos da reação sobre as enzimas, seja por inibição competitiva (quando o inibidor se liga ao sítio ativo da enzima) ou não competitiva (quando o inibidor reage com um sítio de ligação da enzima que não seja o sítio ativo) (SELWYN, 1965).

Figura 14. Teste de estabilidade de Selwyn para xilanases presentes em extrato enzimático bruto produzido pelo fungo termofílico *R. emersonii*. As curvas dos diferentes fatores de diluição estão representados por 2 (■), 5 (●) e 10 (▲). O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.

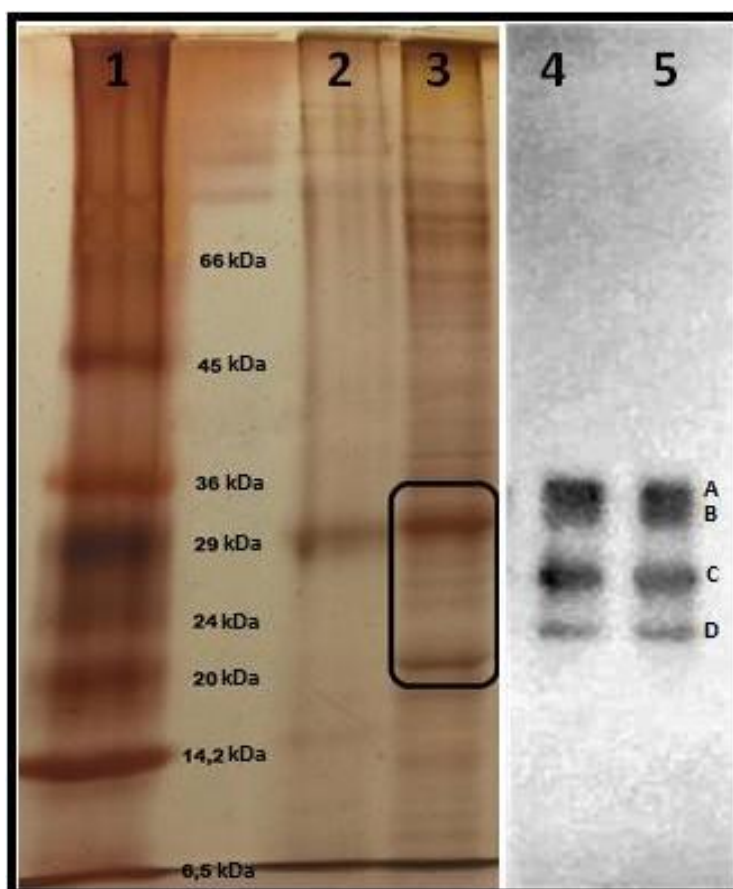


Fonte: Autoria própria.

6.10. Estimativa da Massa Molecular em condições desnaturantes

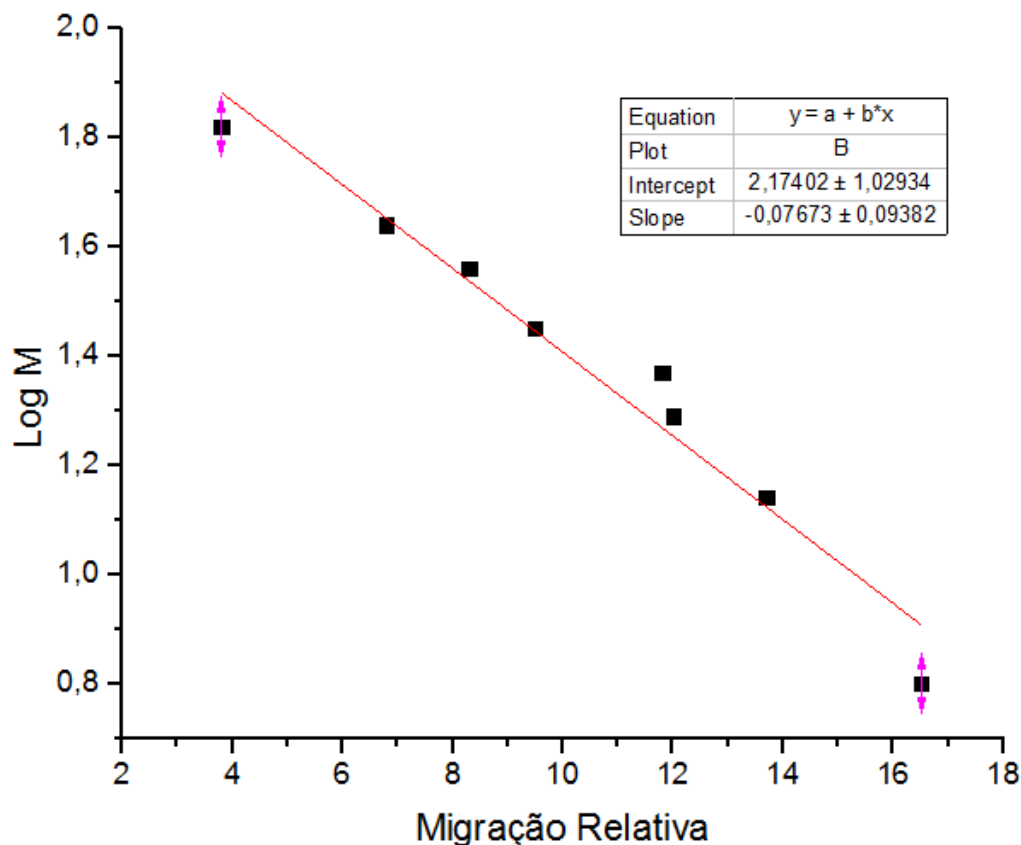
Com base nos resultados obtidos a partir da técnica de eletroforese SDS-PAGE (Figura 15) foi confeccionado um gráfico da migração relativa no gel de poliacrilamida x Log Massa Molecular (Figura 18) e por meio da regressão linear obteve-se a seguinte equação da reta $y = 2,17402 + (-0,07673 * x)$, onde x corresponde à migração relativa no gel e y o log da massa molecular.

Figura 15. Análises eletroforéticas. Gel de SDS-PAGE (gel de corrida a 10% e gel de empilhamento a 5% de poliacrilamida). A coluna 1 corresponde aos marcadores de massa molecular *Low Range* (6,5 – 66 kDa), a coluna 2 corresponde ao extrato enzimático bruto com tampão de amostra na presença de SDS e sem exposição à fervura, a coluna 3 corresponde ao extrato enzimático bruto em tampão de amostra com SDS e exposta a +/- 5 minutos de fervura antes de ser aplicado ao gel. As colunas 4 e 5 correspondem a análise de eletroforese por zimografia, na coluna 5 as possíveis isoformas estão identificadas pelas letras A, B, C e D.



Fonte: Autoria própria.

Figura 16. Gráfico de Fischer (DENNISON, 2003) do logaritmo da massa molecular dos padrões vs. a migração relativa em gel de poliacrilamida.



Fonte: Autoria própria.

Observa-se que a região destacada na coluna 3 melhor se assemelha ao perfil de bandas aparentes na técnica de zimografia visto na figura 12. Devido à heterogeneidade proteica do extrato enzimático bruto é difícil estabelecer com exatidão qual banda observada em SDS-PAGE corresponde à mesma banda aparente em zimografia. Por essa razão concluímos que as xilanases do fungo *Rasamsonia emersonii* se encontram na faixa abaixo de 45 e acima de 14,2 kDa. Para tentar confirmar essa estimativa a massa molecular dessas enzimas também foi avaliada em condições não desnaturantes por cromatografia de filtração em gel.

6.11. Estimativa da massa molecular em condições não desnaturantes

Ao passar os padrões de massa molecular (m)¹ por uma coluna de filtração em gel empacotada com a resina Sephadex G-75 foi possível obter os valores referentes ao volume morto ou de exclusão da coluna (V_o) de 61,06 mL, o volume total (V_t) de 187,83 mL, e o volume de eluição (V_e) de cada proteína com massa molecular conhecida. Para confecção do gráfico do coeficiente de partição K_{av} vs. o $\log m$, os valores de K_{av} foram calculados pela equação 10.

Equação 10:

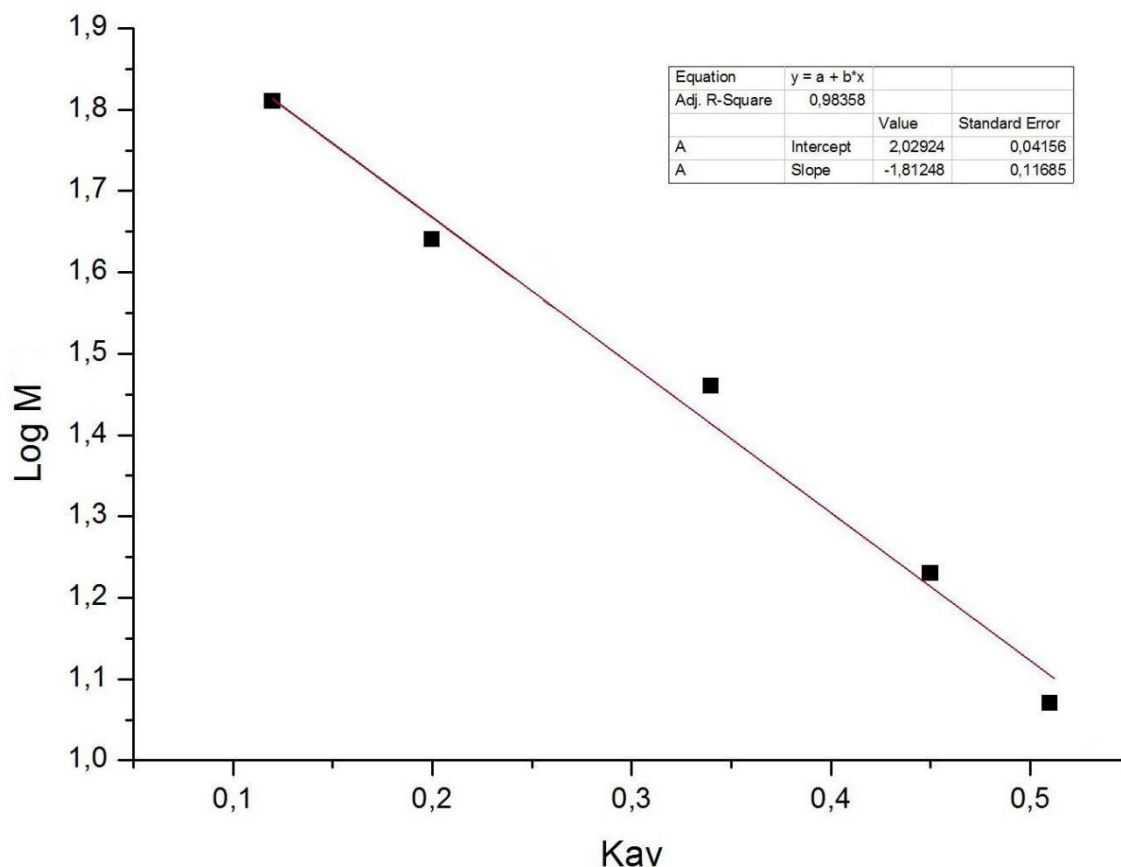
$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

A partir dos valores de K_{av} foi confeccionado um gráfico, sendo o eixo y compreendendo os valores de Log da massa molecular dos padrões utilizados, e o eixo x os valores de K_{av} calculados, obtendo a seguinte equação da reta:

$$y = 2,02924 + (-1,81248 * x).$$

¹ Seguindo a recomendação do *Journal of Biological Chemistry*; a massa molecular (símbolo m) é expressa em daltons (Da), sendo um dalton equivalente a 1/12 da massa do carbono 12 (<http://www.jbc.org/site/misc/itoa.T1.xhtml>).

Figura 17. Gráfico de Fischer (DENNISON, 2003) do logaritmo da massa molecular dos padrões vs. o coeficiente de partição K_{av} obtido por cromatografia de filtração em gel com resina Sephadex G-75.



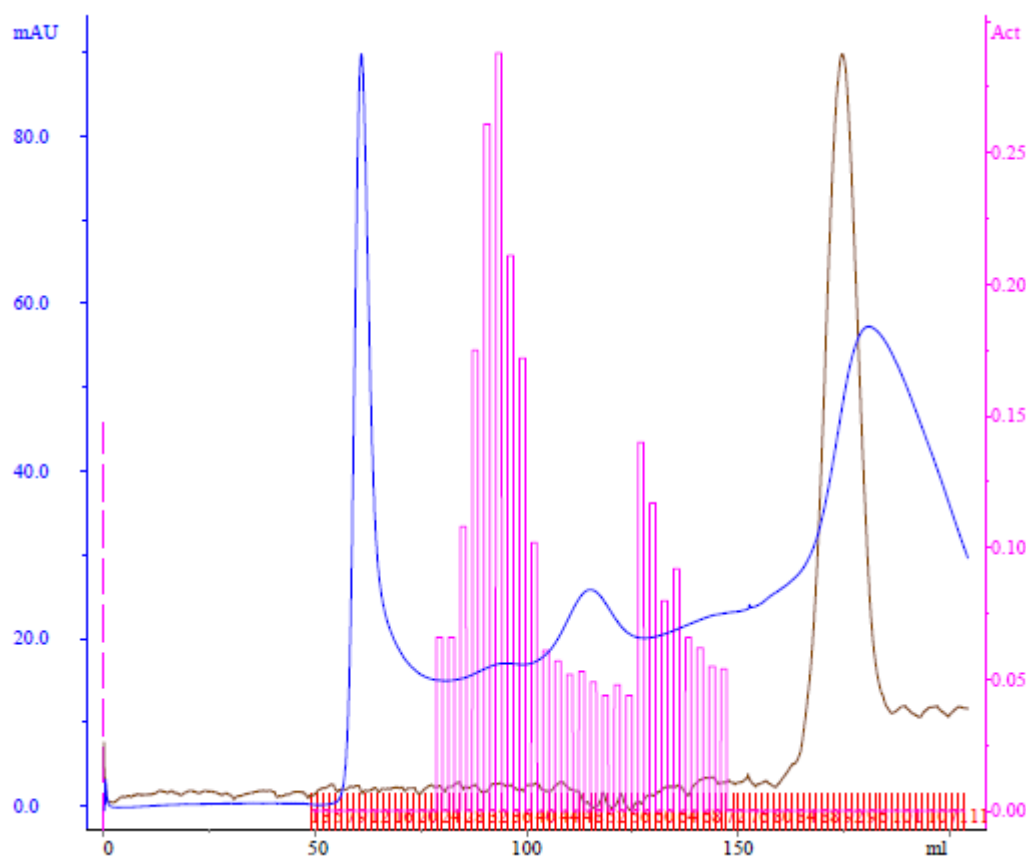
Fonte: Autoria própria.

O extrato enzimático bruto foi submetido a uma precipitação salina com sulfato de amônio atingindo 50% de saturação, a fim de concentrar as enzimas xilanolíticas para serem aplicadas na cromatografia de filtração em gel, resultando em um precipitado de aproximadamente 1 mL, que foi ressuspendido em mais 2 mL de tampão Tris-HCl $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,5 com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl, e centrifugado para remoção de partículas em suspensão que causam a turbidez da amostra, e 2 mL foram aplicados a coluna de cromatografia e eluídos nas mesmas condições que os padrões de massa molecular. Foram coletadas amostras de 1,5 mL a partir de 50 mL decorridos da corrida cromatográfica, sendo essas frações submetidas à dosagem da atividade enzimática.

A dosagem enzimática das frações coletadas da cromatografia apresentaram dois picos de atividade (Figura 18), sugerindo a separação pelo

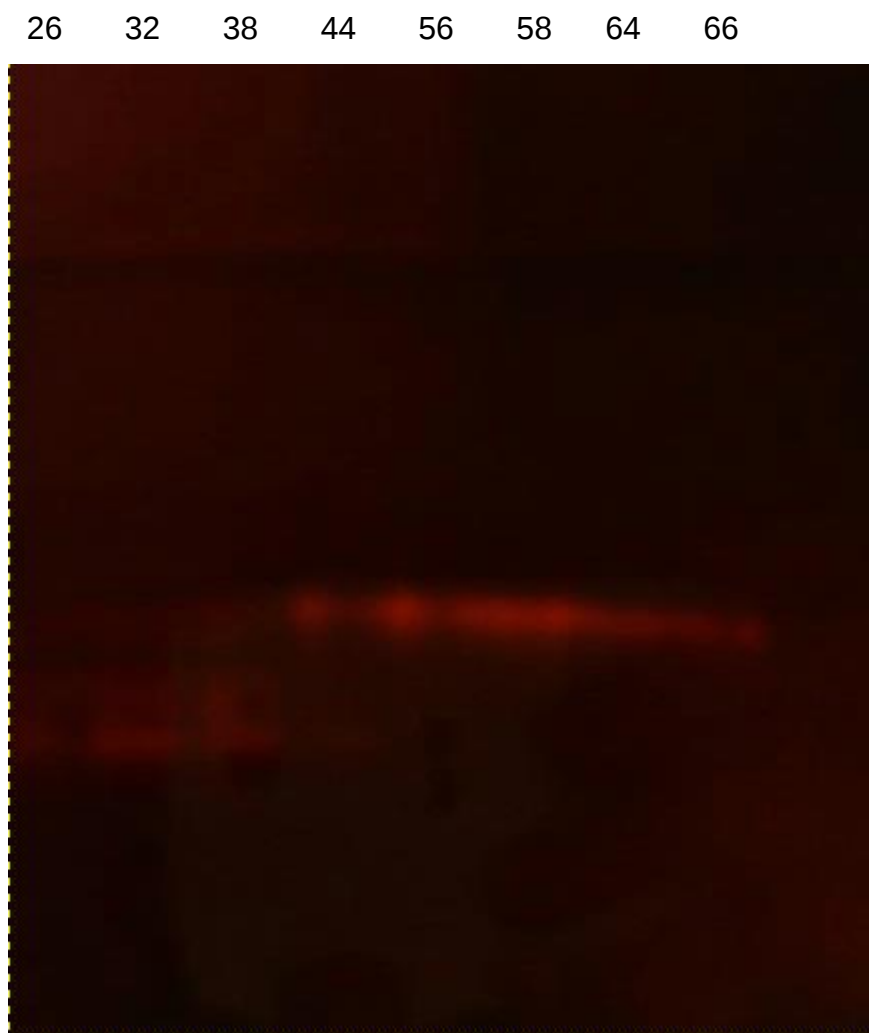
menos parcial das xilanases presentes no extrato enzimático bruto. Para confirmar ou não a separação as frações foram submetidas à análise eletroforéticas pela técnica de zimograma (Figura 19).

Figura 18. Perfil de eluição na filtração em gel do extrato enzimático de *R. emersonii* aplicado a uma coluna GE XK-16/100 com Sephadex G-75 operada em sistema *Äkta Purifier*. A linha azul representa os valores de absorbância em 280 nm, e a linha rosa os valores de absorbância em 540 nm após quantificação de açúcares redutores resultantes da atividade enzimática.



Fonte: Autoria própria.

Figura 19. Zimograma das frações de eluição da cromatografia de filtração em gel, em gel de poliacrilamida, corado com 0,1% (m/v) de vermelho congo, e descorado com NaCl 1 mol. L⁻¹. Os números representam os tubos analisados das frações coletadas.



Fonte: Autoria própria.

É possível observar que houve sim separação das isoformas presentes no extrato enzimático bruto após cromatografia de filtração em gel, porém foi obtido um perfil incomum. Ao analisar o perfil de eluição de proteínas através da coluna de filtração em gel, espera-se que as proteínas maiores sejam eluídas primeiro, seguidas pelas proteínas menores, porém a análise eletroforética das frações eluídas mostrou que a xilanase de maior massa molecular, em gel de poliacrilamida, provavelmente interagiu de forma inespecífica com a matriz da

resina cromatográfica e continuou sendo eluída, após a eluição das isoformas de menor massa molecular. Por outro lado a xilanase de menor massa molecular aparece ao longo de todo o perfil, o que também é inesperado; ela não deveria aparecer na mesma proporção nas primeiras amostras, nas quais eluem as enzimas maiores.

Para eletroforese em gel de poliacrilamida, a malha resultante da polimerização da acrilamida, juntamente com a corrente elétrica aplicada sobre as amostras, favorece a migração mais rápida de proteínas menores pelo gel (BOYER, 2012), sendo assim as proteínas maiores se encontram na parte superior do gel de separação e as proteínas menores abaixo.

Ao contrário do que ocorre na eletroforese em gel de poliacrilamida, a cromatografia de filtração em gel, ou cromatografia de exclusão molecular, é feita em uma matriz cromatográfica composta por microesferas de poros de diversos tamanhos dentro de uma faixa informada pelo fabricante. Ao percorrer o leito da resina, as proteínas menores entram nos poros menores das esferas e demoram mais tempo para chegar ao final da coluna, enquanto que as proteínas maiores passam diretamente sem interação ou com pouca interação com os poros, e chegam primeiro ao final da coluna (DENNISON, 2003); por essa razão também é denominada como “peneira invertida”.

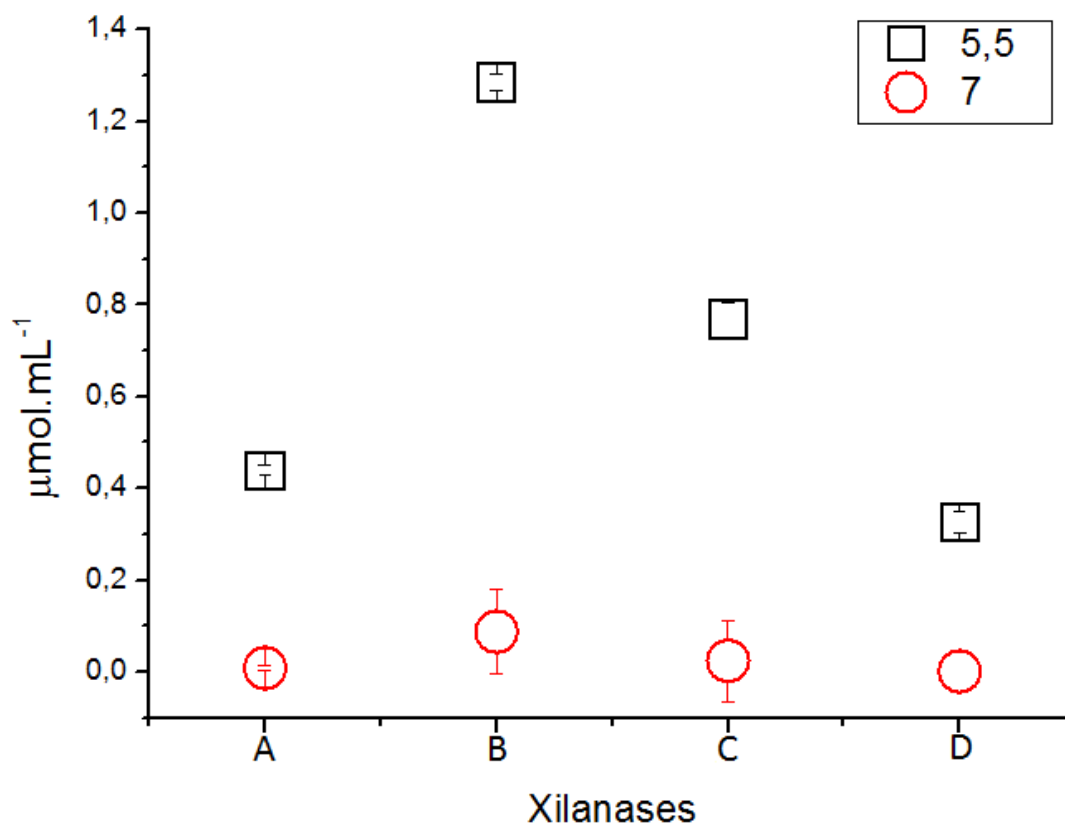
Em virtude de termos obtido frações com misturas das diversas xilanases, não foi possível estimarmos a massa molecular de cada uma por filtração em gel.

6.12. pH ótimo de catálise para as xilanases isoladas

Conforme antes escrito, as tentativas de purificação das xilanases por diversos métodos falharam, em virtude do qual optamos por fazer o isolamento das enzimas pela extração do gel de poliacrilamida. As frações extraídas foram nomeadas de Xilanases A, B, C e D conforme indicado na figura 11.

As isoformas identificadas foram submetidas à dosagem da atividade enzimática nos dois valores de pH com maior atividade xilanólítica observados para o extrato enzimático bruto. Os valores estão representados na figura 20.

Figura 20. Efeito do pH sobre a atividade para xilanases produzidas pelo fungo *R. emersonii*, isoladas por eletroforese em gel de poliacrilamida. O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



Fonte: Autoria própria.

Embora a figura 11 indique que, possivelmente alguma das xilanases presentes no extrato enzimático bruto, apresente melhor desempenho catalítico em pH 7, os ensaios nesse pH com as enzimas isoladas se mostraram apenas 1,9; 6,7; 3,1 e 0,4 % quando comparados com os resultados dos ensaios em pH de 5,5 para as xilanases A, B, C e D, respectivamente. Podemos especular que outra(s) enzima(s) do complexo xilanolítico estivessem presente(s) no extrato, com atividade sinérgica com as xilanases isoladas tenha sido responsável(is) pelo resultado em pH 7,0, uma vez que não estaria(m) presente(s) no ensaio enzimático das quatro frações isoladas.

6.13. Análise da atividade xilanolítica das xilanases isoladas sobre diferentes substratos

As isoformas identificadas e extraídas do gel de poliacrilamida foram submetidas à dosagem da atividade enzimática em diferentes substratos sintéticos (pNPG; pNPX) e polímeros naturais (CMC e xilana *Beechwood* e xilana *oat spelt*) com a finalidade de determinar sobre qual substrato as enzimas apresentam melhor desempenho.

Tabela 5. Análise da atividade das xilanases produzidas pelo fungo termofílico *R. emersonii* e isoladas por eletroforese em gel de poliacrilamida, sobre diferentes substratos. ND: não detectada.

	Xil A		Xil B		Xil C		Xil D	
	U/mL	DP	U/mL	DP	U/mL	DP	U/mL	DP
pNPG 4mmol L⁻¹	ND	0	ND	0	ND	0	ND	0
pNPX 4 mmol L⁻¹	ND	0	0,72	0,096	ND	0	ND	0
CMC 4%	ND	0	ND	0	ND	0	ND	0
Xilana <i>Beechwood</i> 1%	34,68	3,74	173,25	4,72	70,87	2,50	4,86	3,31
Xilana <i>oat</i> <i>spelt</i> 1%	35,14	2,16	78,10	2,75	56,11	3,90	10,44	2,57

Fonte: Autoria própria.

Não foi detectada atividade das enzimas isoladas sobre os substratos glicosídicos, CMC e pNPG, revelando que as xilanases produzidas por *R. emersonii* não são capazes de reconhecer resíduos de glicose para efetuar a quebra da ligação glicosídica, restringindo sua especificidade com o carboidrato constituinte da cadeia das xilanas.

A hidrólise da xilana é influenciada pelo tamanho da cadeia e pela quantidade de ramificações (GONÇALVES et al., 2012), sendo assim, a

diferença estrutural entre as xilanas *Beechwood* e *oat spelt* se baseia nos resíduos de monossacarídeos presentes na cadeia de cada polímero.

De acordo com as especificações do fabricante (Sigma-Aldrich) a xilana de *Beechwood* é composta de 90% de resíduos de xilose unidos por ligações glicosídicas β -1,4 enquanto que a xilana de *oat spelt* contém a partir de 70% de resíduos de xilose, aproximadamente 10% de arabinose e 15% de glicose.

Os substratos sintéticos pNPX e pNPG são formados por uma molécula de xilose ou glicose, respectivamente, unidas por ligações do tipo β , 1-4 com um grupo *p*-nitrofenil, dessa forma as enzimas capazes de hidrolisar esse substrato reconhecem o monossacarídeo e clivam a ligação liberando o *p*-nitrofenol, que por sua vez reage com o carbonato de sódio produzindo uma cor de amarelo a verde, cuja absorbância pode ser medida por espectrofotometria a 410 nm.

A xilanase B foi a única que apresentou atividade embora baixa, para hidrolisar o substrato sintético, se mostrando muito mais ativa sobre a xilana de *Beechwood* em comparação à xilana *oat spelt* e o substrato sintético pNPX, assim como a xilanase C, que não apresentou resultados detectáveis sobre pNPX, porém teve bons resultados sobre os polímeros naturais. Para as xilanases A e D não houve diferença significativa entre ambas as xilanas, e não apresentaram atividade sobre o substrato sintético pNPX.

A falta de ação catalítica sobre o substrato sintético para xilanases, pNPX, e o bom desempenho das enzimas em estudo sobre os polímeros indica a capacidade das enzimas em clivar as ligações glicosídicas na cadeia do polímero, liberando os resíduos de monossacarídeos, característica de endoxilanases.

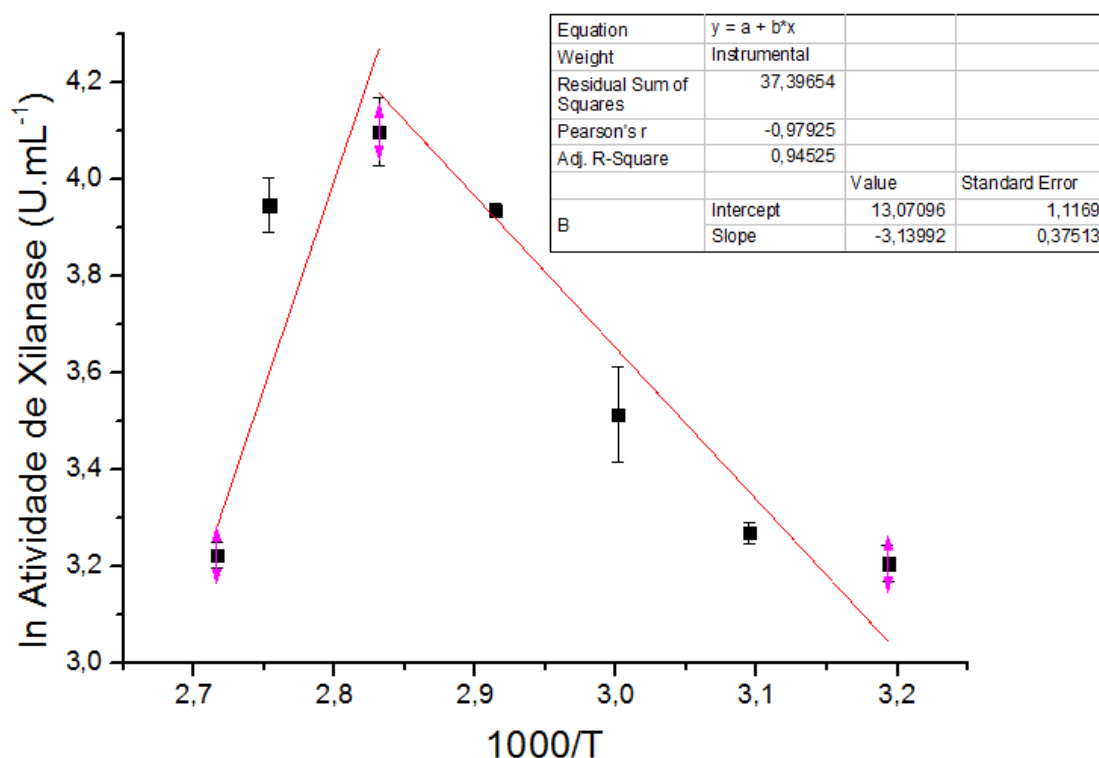
Os bons resultados de catalise apresentados pela xilanase C, aliados à sua diferença de massa molecular em relação as demais xilanases, o que possibilita maior confiabilidade ao protocolo de isolamento das enzimas pela extração do gel de poliacrilamida, fizeram com que essa enzima fosse a escolhida para determinação dos parâmetros termodinâmicos.

6.14. Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível

A partir da interseção no eixo x do ponto de encontro entre as porções ascendente e descendente do gráfico de Arrhenius foi possível calcular a

temperatura ótima (equação 2) de catálise enzimática, que no caso da xilanase C isolada no presente trabalho, foi de 80°C. A energia de ativação da enzima (equação 3) foi calculada em 26,10 kJ.mol⁻¹. Os coeficientes de cada temperatura Q₁₀ (equação 4) estão apresentados na tabela 6.

Figura 21. Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (Ea) e temperatura ótima da xilanase C isolada.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 6. Coeficientes de temperatura (Q₁₀) da xilanase C estimados com base no Gráfico de Arrhenius.

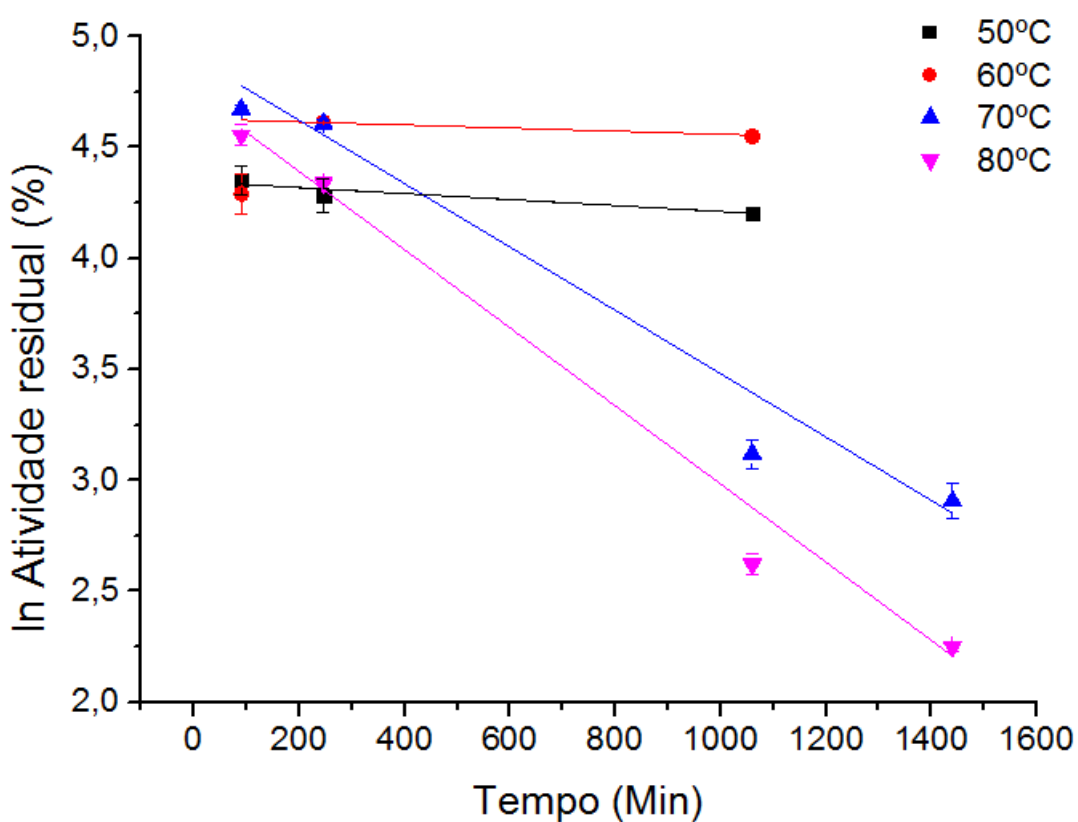
Temperatura (°C)	Temperatura (K)	Q ₁₀
50	313,15	1,35
60	323,15	1,33
70	333,15	1,31
80	343,15	1,29
90	353,15	1,27
95	363,15	1,26

Fonte: Autoria própria.

No caso da xilanase C o Q_{10} estimado para as temperaturas avaliadas decresce com o aumento da temperatura, tornando evidente o progressivo efeito desnaturante.

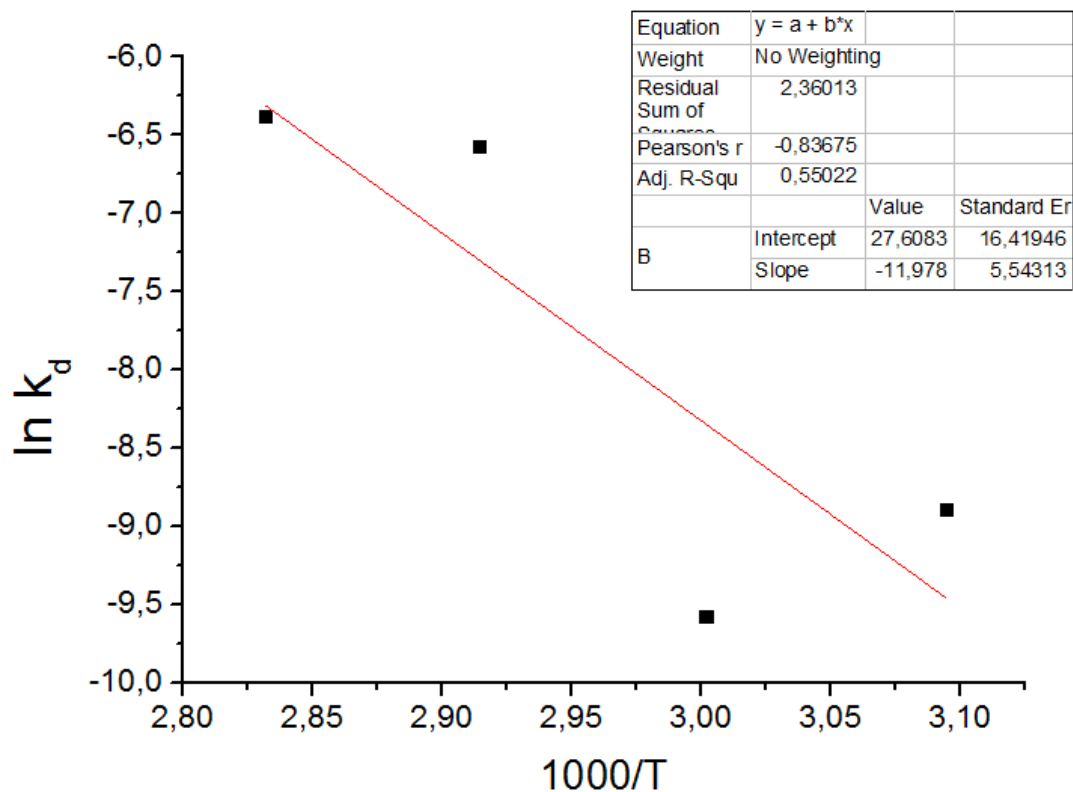
A figura 23 representa o efeito da temperatura na desnaturação irreversível, sendo usada para cálculo da constante k_d para cada temperatura.

Figura 22. Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura na atividade da Xilanase C isolada.



Fonte: Autoria própria.

Figura 23. Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica (E_{ad}) da Xilanase C isolada.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 7. Parâmetros termodinâmicos da termo inativação irreversível da Xilanase C isolada.

Temp. (°C)	Temp. (K)	k_d (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	ΔH_d (K J mole ⁻¹)	ΔG_d (K J mole ⁻¹)	ΔS_d (K J mole ⁻¹)
50	323,15	0,0001	5056	96,88	103,25	-19,69
60	333,15	0,0004	1670	96,80	103,46	-19,98
70	343,15	0,0014	495	96,71	103,19	-18,81
80	353,15	0,0017	408	96,63	105,61	-25,38

Fonte: Autoria própria.

Os elevados tempos de meia vida (equação 5) apresentados pela xilanase C se diferem aos encontrados para a xilanase purificada de *Fusarium oxysporum* por Silvana R. Pires, que apresentou valores de meia vida de 26 horas a 50°C, decrescendo rapidamente com o aumento da temperatura, caindo

para 0,48 horas a 60°C (PIRES, 2013). Se tomarmos como referência a $t_{1/2}$ da xilanase C a 50 °C, ela diminui aproximadamente 3 vezes a 60, dez vezes a 70 e 12 vezes a 80 °C.

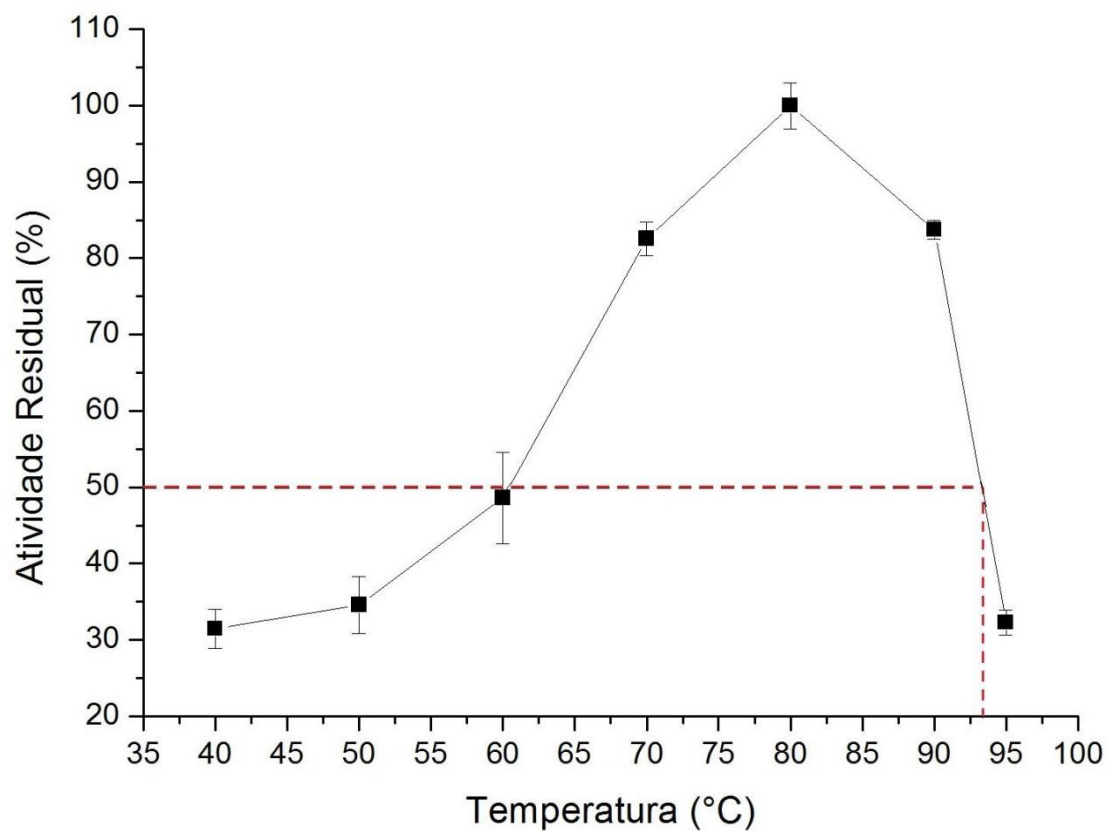
A entalpia de ativação da desnaturação térmica (ΔH_d) (equação 7) representa a quantidade de calor envolvida na quebra de 1 mol de ligações não covalentes durante o processo de desnaturação da enzima. No caso da xilanase C esse parâmetro não apresentou variação significativa em relação ao aumento da temperatura, indicando resistência estrutural da enzima frente a variações da mesma.

Os altos valores de energia livre (ΔG_d) (equação 8) confirmam a resistência da xilanase C em relação à desnaturação térmica, uma vez que esse parâmetro indica se a reação, no caso a desnaturação da enzima, ocorre espontaneamente (valores negativos de ΔG_d) ou necessita de energia para ser realizada. Observa-se que em 80°C tem-se o maior valor de ΔG_d , sendo essa a temperatura ótima de ação da xilanase C, a enzima apresenta mais resistência a ser desnaturada nessa temperatura do que a 70°C, diferentemente de (COBOS; ESTRADA, 2003), em que a energia livre decresce com o aumento da temperatura, caracterizando a sensibilidade da xilanase estudada por elas frente a temperaturas mais brandas.

Valores negativos de entropia (ΔS_d) (equação 9) revelam a resistência para que ocorra a reação de desnaturação, fato confirmado pelos valores de energia livre (ΔG_d) encontrados para a xilanase C, pois com o aumento da temperatura e o enfraquecimento das interações polares, as interações hidrofóbicas são fortalecidas (SIDDIQUI et al., 1997) garantindo resistência da enzima à desnaturação.

Avaliou-se também a temperatura de fusão apresentada pela xilanase C, como mostrado na figura 25. A temperatura de fusão é considerada a temperatura na qual a atividade da enzima cai pela metade do seu máximo (SAQIBI, 2012), no caso da xilanase C isolada, o máximo de atividade ocorreu em 80°C, e caiu para 50% desse valor em pouco menos de 93°C, sendo essa a temperatura de fusão da enzima.

Figura 24. Temperatura de fusão da xilanase C isolada produzida pelo fungo termofílico *R. emersonii* por cultivo em estado sólido. A temperatura de fusão é considerada a temperatura na qual a atividade da enzima cai pela metade do seu máximo.



Fonte: Autoria própria.

7. CONCLUSÕES

As diversas xilanases presentes no extrato bruto produzido pelo fungo termofílico *R. emersonii* apresentaram um melhor perfil de atividade em valores de pH de ácidos a neutros. Não podemos afirmar se tratarem de isoformas por não possuímos a sua sequência, podendo inclusive se tratar de diferentes graus ou tipos de glicosilação, pois provavelmente são glicoproteínas, todas de baixa massa molecular, abaixo de 45 kDa.

O pH isoeletrico das xilanases presentes no extrato enzimático bruto foi estimado em 6,5.

Em relação aos efeitos da temperatura sobre essas enzimas, tanto o complexo enzimático, quanto à xilanase C isolada, se mostraram resistentes à temperatura, com elevados tempos de meia vida em diversas temperaturas e temperatura ótima de 80°C.

Diversos reagentes testados provocaram a diminuição em menor ou maior grau da atividade enzimática do extrato bruto. Por outro lado, o agente quelante EDTA aumentou a atividade enzimática em 4%, e parte dos íons testados causou aumento da atividade, enquanto outros seu decréscimo.

Em relação aos compostos fenólicos, que podem ser liberados durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, somente o ácido tânico apresentou inibição sobre a atividade xilanolítica do extrato bruto, os demais fenólicos elevaram a atividade enzimática em relação à amostra que não foi exposta aos compostos fenólicos, o que constitui uma característica importante para seu uso eventual na degradação da hemicelulose de resíduos lignocelulósicos pré-tratados e que justifica a continuidade do projeto.

Os parâmetros termodinâmicos (ΔH_d , ΔG_d , ΔS_d) avaliados para a xilanase isolada denominada C, mostraram elevada resistência estrutural da enzima frente a desnaturação térmica irreversível.

A xilanase C isolada também apresentou elevado valor de temperatura de fusão, aproximadamente 93°C, sendo essa a temperatura necessária para que a enzima perca 50% do seu máximo de atividade catalítica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, M.; GOMES, I.; MOHIUDDIN, G.; HOQ, M. M. Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 4, p. 298-302, 1994.

APPLICHEM. Biological Buffers. **APPLICHEM**: 18 p. 2008.

BAJPAI, P. Xylanolytic Enzymes. **Academic Press**, 2014. ISBN 9780128010204.

BASTAWDE, K. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 353-368, 1992.

BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, 2007.

BAUDUIN, P.; RENONCOURT, A.; TOURAND, D.; KUNZ, W.; NINHAM, B. W.; Hofmeister effect on enzymatic catalysis and colloidal structures. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9, n. 1–2, p. 43-47, 8// 2004.

BAZZI, A. M.; RABAAN, A. A.; FAWARAH, M. M.; AL-TAWFIQ, J. A. Direct identification and susceptibility testing of positive blood cultures using high speed cold centrifugation and Vitek II system. **J Infect Public Health**, Jun 13 2016.

BEG, Q.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 326-338, 2001.

BHAIRI, S. M.; MOHAN, C. Detergents: a guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry. San Diego, CA USACalbiochem, **EMD Biosciences**, v. 200, 2007.

BHATNAGAR, B. S.; BOGNER, R. H.; PIKAL, M. J. Protein Stability During Freezing: Separation of Stresses and Mechanisms of Protein Stabilization. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 12, n. 5, p. 505-523, 2007/01/01, 2007.

BIN, L.; ZHAO, C.; XIE, L. H. characterization of a Recombinant Thermostable Xylanase from Hot Spring *Thermophilic Geobacillus* sp. TC-W7. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1388-1394, 2012.

BOUKARI, I.; O'DONOHUE, M.; RÉMOND, C.; CHABBERT, B. Probing a family GH11 endo- β -1, 4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3, p. 130-138, 2011.

BOYER, R. F. Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques. **Prentice Hall**, 2012. ISBN 9780136043027.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V.; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 6, p. 254-267, 2005.

CANILHA, L.; RODRIGUES, R. C. L. B.; ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T.; FELIPE, M. D. G. A.; SILVA, S. S. Bioconversion of hemicellulose from sugarcane biomass into sustainable products. **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-Techniques, applications and commercialization**, p. 15-45, 2013.

Cazypedia. Glycoside Hydrolase family classification. Disponível em <<http://www.cazy.org/glycoside-hydrolases.html>> Acesso em 30 de outubro de 2016.

CHANWICHA, N.; KATEKAEW, S.; AIMI, T.; BOONLUE, S. Purification and characterization of alkaline xylanase from *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* KKU-PN-I2-1 cultivated by solid-state fermentation. **Mycoscience**, v. 56, n. 3, p. 309-318, 2015.

CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, p. 1852-1858, 2006.

COBOS, A.; ESTRADA, P. Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p. 810-818, 11/5/ 2003.

CUI, Y.; VAN DER LANS, R.; LUYBEN, K. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55, n. 5, p. 715-726, 1997.

_____. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 4, p. 409-419, 1998.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, D. G. M.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DAMINELI, A.; DAMINELI, D. S. C. Origens da vida. **Estudos Avançados**, v. 21, p. 263-284, 2007.

DENNISON, C. A Guide to Protein Isolation. **Springer Netherlands**, 2003. 249 ISBN 978-90-481-6266-6.

DI CERA, E. Thrombin. **Molecular aspects of medicine**, v. 29, n. 4, p. 203-254, 2008.

DO, T. T.; NGUYEN, S. L. T.; NGUYEN, T. T. Purification and evaluation for effects of temperature on extracellular xylanase activity from *Aspergillus oryzae* DSM 1863. **Journal of Vietnamese Environment**, v. 8, n. 1, p. 9-13, 2017.

DOLEZALKOVA, M.; SEMBER, A.; MAREC, F.; RAB, P.; PLOTNER, J.; CHOLEVA, L. Is premeiotic genome elimination an exclusive mechanism for hemiclinal reproduction in hybrid males of the genus *Pelophylax*? **BMC Genet**, v. 17, n. 1, p. 100, 2016.

DOS SANTOS, L. F.; ISHII, P. L. Xilanases: Principais Metodologias e Parâmetros Cinéticos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 2, 2011.

FAN, G.; YANG, S.; YAN, Q.; GUO, Y.; LI, Y.; JIANG, Z. Characterization of a highly thermostable glycoside hydrolase family 10 xylanase from *Malbranchea cinnamomea*. **International journal of biological macromolecules**, v. 70, p. 482-489, 2014.

FREDERICK, M. M.; FREDERICK, J. R.; FRATZKE, A. R.; REILLY, P.J. Purification and characterization of a xylobiose- and xylose-producing endo-xylanase from *Aspergillus niger*. **Carbohydrate Research**, v. 97, n. 1, p. 87-103, 1981/11/02 1981.

FUJIMOTO, H.; OOI, T.; WANG, S-S.; TAKIZAWA, T.; HIDAKA, H.; MURAO, S.; ARAI, M. Purification and Properties of Three Xylanases from *Aspergillus aculeatus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 3, p. 538-540, 1995/01/01 1995.

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

GARFIN, D. E. One-dimensional gel electrophoresis. **Methods Enzymol**, v. 463, p. 497-513, 2009.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17-48, 2000/01/01 2000.

GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T. The inhibition of enzymes by tannins. **Phytochemistry**, v. 4, n. 1, p. 185-192, 1965/02/01 1965.

GOLUGURI, B. R.; THULLURI, C.; ADDEPALLY, U.; SHETTY, P. R. Novel alkali-thermostable xylanase from *Thielaviopsis basicola* (MTCC 1467): Purification and kinetic characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 82, p. 823-829, 2016.

GOMES, E.; GUES, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Thermostable enzymes: sources, production and industrial applications. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GOMES, K. S.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; ANDRADE, L. G. A.; FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; ALFENAS, A. C.; REZENDE, S. T. Purification and Characterization of Xylanases from the Fungus *Chrysosporthe cubensis* for Production of Xylooligosaccharides and Fermentable Sugars. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-13, 2016.

GOMES. Purificação e Caracterização de Xilanases do Fungo *Chrysosporthe cubensis* e Utilização na Hidrólise de Bagaço de Cana-de-açúcar. 2014. 59 (Master). **Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa, Brazil.

GOMES; ALBUQUERQUE, T. L.; JUNIOR, J. E. M.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. PRODUÇÃO DE XILITOL E ETANOL A PARTIR DE

HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE BAGAÇO DE CAJU. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 683-688, 2014.

GOMEZ, R. J. H. C. Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por *pachysolen tannophilus*. **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**, 1985.

GONÇALVES, T.; DAMASIO, A. R. L.; SEGATO, F.; ALVAREZ, T. M.; BRAGATTO, J.; BRENELLI, L. B.; CITADINI, A. P. S.; MURAKAMI, M. T.; RULLER, R.; LEME, A. F. P.; Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. **Bioresource technology**, v. 119, p. 293-299, 2012.

GRN nº479. GRAS Notification for Beta-Glucanase, Cellulase, and Xylanase from *Talaromyces emersonii*. Disponível em <<https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm370440.pdf>> Acesso 30 de março de 2015.

HOFMEISTER, F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. **Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 25, n. 1, p. 1-30, 1888.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.

HOUBRAKEN, J.; SPIERENBURG, H.; FRISVAD, J. C. Rasamsonia, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 2, p. 403-21, Feb 2012.

IEMBO, T.; DA-SILVA, R.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E. Production, characterization and properties of beta-glucosidase and beta-xylosidase from a strain of *Aureobasidium* sp. **Prikl Biokhim Mikrobiol**, v. 38, n. 6, p. 639-43, Nov-Dec 2002.

ISHINO, Y.; NARUMI, I. DNA repair in hyperthermophilic and hyperradioresistant microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 25, p. 103-112, 6// 2015.

ITO, K.; OGASAWARA, H.; SUGIMOTO, T.; ISHIKAMA, T. Purification and Properties of Acid Stable Xylanases from *Aspergillus kawachii*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n. 4, p. 547-550, 1992/01/01 1992.

JAENICKE, R. How do proteins acquire their three-dimensional structure and stability? **Naturwissenschaften**, v. 83, n. 12, p. 544-54, Dec 1996.

JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. In: (Ed.). **Physiology of Biodegradative Microorganisms**: Springer, p.163-176, 1991..

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

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiol Rev**, v. 23, n. 4, p. 411-56, Jul 1999.

LIAO, H.; XU, C.; TAN, S.; WEI, Z.; LING, N.; YU, G.; RAZA, W.; ZHANG, R.; SHEN, Q.; XU, Y. Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Bioresource technology**, v. 123, p. 117-124, 2012.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M. I. M.; MITCHELL, D. A.; RAMMOS, L. P.; FONANA, J. D. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 105-110, 2003.

MAALEJ, I.; BELHAJ, I.; MASMOUDI, N. F.; BELGHITH, H. Highly Thermostable Xylanase of the Thermophilic Fungus *Talaromyces thermophilus*: Purification and Characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, n. 1, p. 200-212, 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D.P. Microbiologia de Brock. Porto Alegre, Brasil.: **Editora Artmed**, 2010.

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

MENDONÇA, F. Aquecimento global e saúde: uma perspectiva geográfica—notas introdutórias. **Terra Livre**, v. 1, n. 20, p. 205-221, 2015.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NC-IUB. Units of Enzyme Activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 97, n. 2, p. 319-320, 1979.

NC-IUBMB. The Enzyme List Class 3 — Hydrolases. **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology**. September 2010. Disponível em < <http://www.enzyme-database.org/downloads/ec3.pdf> > Acesso em 14 de maio de 2016.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry. **Macmillan**, 2008. ISBN 071677108X.

NIEHAUS, F.; BERTOLDO, C.; KAHLER, M.; ANTRANIKIAN, G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 51, n. 6, p. 711-729, 1999.

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

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.

PEAY, K. G.; KENNEDY, P. G.; TALBOT, J. M. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 434-447, 2016.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. D. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.

PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R-C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 4, p. 879-903, 2012.

PIRES, S. R. Enzimas celulolíticas fúngicas e aplicação no branqueamento de polpa Kraft e na sacarificação de biomassa lignocelulósica. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**, 2013.

POLIZELI, M. L.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; DA SILVA, T. M.; MALLER, A.; CABRAL, H. Gel Electrophoresis for Investigating Enzymes with Biotechnological Application. In: MAGDELDIN, S. (Ed.). **Gel Electrophoresis - Advanced Techniques: Intech**, 2012. p.97-110. ISBN 978-953-51-0457-5.

POLIZELI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 67, n. 5, p. 577-91, Jun 2005.

POLIZELLI, P. P.; FACCHINI, F. D.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Stability of a Lipase Extracted from Seeds of *Pachira aquatica* in Commercial Detergents and Application Tests in Poultry Wastewater Pretreatment and Fat Particle Hydrolysis. **Enzyme Res**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

POLIZELLI, P. P.; FACCHINI, F. D.; CABRAL, H.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. A new lipase isolated from oleaginous seeds from *Pachira aquatica* (Bombacaceae). **Appl Biochem Biotechnol**, v. 150, n. 3, p. 233-42, Sep 2008.

PORDESIMO, L. O.; HAMES, B. R.; SOKHANSANJ, S.; EDENS, W. C. Variation in corn stover composition and energy content with crop maturity. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, n. 4, p. 366-374, 2005.

PULROLNIK, K. Transformações do carbon no solo. **Embrapa Cerrado**. 36 p. (Documentos/ Embrapa Cerrado ISSN 1517-5111, ISSN Online 2176-5081; 264). Planaltina, DF, Julho de 2009.

QU, Y.; BOLEN, C. L.; BOLEN, D. W. Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 16, p. 9268-9273, 1998.

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. **Universidade Estadual de Campinas**. Faculdade de Engenharia Química

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **European journal of applied microbiology and biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 199-209, 1980.

RHODES, D. G.; BOSSIO, R. E.; LAUE, T. M. Determination of size, molecular weight, and presence of subunits. **Methods Enzymol**, v. 463, p. 691-723, 2009.

ROCHA, T. L.; DA COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; DA SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico**, 2005.

ROSA, I. Z. Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulases, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. **Universidade Estadual Paulista**, 2014.

ROSA, S. M. L. Isolamento de nanocristais de celulose de resíduos agrícolas e emprego em nanocompósitos de polipropileno. **UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**, 2012.

ROSSET, I. G.; PORTO, A. L. Catálise Enzimática: Transesterificação do Óleo de Soja e Esterificação do Ácido Oleico via Lipases. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, n. 2, 2015.

ROY, S.; DUTTA, T.; SARKAR, T. S.; GHOSH, S. Novel xylanases from *Simplicillium obclavatum* MTCC 9604: comparative analysis of production, purification and characterization of enzyme from submerged and solid state fermentation. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 382, 2013.

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

SAPAG, A.; WOUTERS, J.; LAMBERT, C.; LOANNES, P.; EYZAGUIRRE, J.; DIPIEREUX, E. The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. **Journal of Biotechnology**, v. 95, n. 2, p. 109-131, 5/9/ 2002.

SÁ-PEREIRA, P.; PAVEIA, H.; COSTA-FERREIRA, M.; AIRES-BARROS, M. R. A new look at xylanases. **Molecular biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 257-281, 2003.

SAQIB, A. A. N.; FAROOQ, A.; IQBAL, M.; HASSAN, J. U.; HAYAT, U.; BAIG, S. A Thermostable Crude Endoglucanase Produced by *Aspergillus fumigatus* in a Novel Solid State Fermentation Process Using Isolated Free Water. **Enzyme Res**, v. 2012, p. 196853, 2012.

SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 641-646, 5// 2010.

SCHOLL, A. L.; MENEGOL, D.; PITARELO, A. P.; FONTANA, R. C.; FILHO, A. Z.; RAMOS, L. P.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) pretreated via steam explosion as a carbon source for cellulases and xylanases in submerged cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 280-291, 8// 2015.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. A INDÚSTRIA PETROQUÍMICA NO PRÓXIMO SÉCULO: COMO SUBSTITUIR O PETRÓLEO COMO MATÉRIA-PRIMA? **Quim. Nova**, v. 24, n. 2, p. 247-251, 2001.

SEE, Y. P.; JACKOWSKI, G. Estimating molecular weight of polypeptides by SDS gel electrophoresis. In: (Ed.). Protein Structure: **A practical approach**. Oxford: IRL Press, 1990. p.1-22.

SELWYN, M. J. A simple test for inactivation of an enzyme during assay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*, v. 105, n. 1, p. 193-195, 1965/01/01 1965.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115-1132, 6/15/ 2005.

SEWALT, V.; GLASSER, W.; BEAUCHEMIN, K. Lignin impact on fiber degradation. 3. Reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1823-1828, 1997.

SHAHEEN, M.; CHOI, M.; ANG, W.; ZHAO, Y.; XING, J.; YANG, R.; XING, J.; ZHANG, J.; CHEN, J. Application of low-intensity pulsed ultrasound to increase bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 57, p. 462-468, 9// 2013.

SHARMA, A.; MILSTEIN, O.; VERED, Y.; GRESEL, J.; FLOWER, H. M. Effects of aromatic compounds on hemicellulose-degrading enzymes in *Aspergillus japonicus*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 27, n. 8, p. 1095-1101, 1985.

SIDDIQUI, K.; NAJMUS, S. A.; RASHID, M. H.; RAJOKA, M. H. Thermostabilization of carboxymethylcellulase from *Aspergillus niger* by carboxyl group modification. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 4, p. 325-330, 1997/04/01 1997.

SILVA, C. H. C. E. et al. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 114-119, 1999.

SILVA, S. S.; CARVALHO, R. R.; FONSECA, J. L. C.; GARCIA, R. B. Extração e caracterização de xilanas de sabugos de milho. **Polímeros**, v. 8, p. 25-33, 1998.

SILVA, R. R. D. Fermentação, purificação e caracterização da protease produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Universidade Estadual Paulista**, 2011.

SINGER, G. A. C.; HICKEY, D. A. Thermophilic prokaryotes have characteristic patterns of codon usage, amino acid composition and nucleotide content. **Gene**, v. 317, p. 39-47, 10/23/ 2003.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-64, 2002/01/01 2002.

SUN, X.; LIU, Z.; QU, Y.; LI, X. The Effects of Wheat Bran Composition on the Production of Biomass-Hydrolyzing Enzymes by *Penicillium decumbens*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, n. 1, p. 119-128, 2008.

SUTTHIRAK, P.; DHARMSTHITI, S.; LERTSIRI, S. Effect of glycation on stability and kinetic parameters of thermostable glucoamylase from *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2821-2826, 2005.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. D. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315-330, 2004.

TEJIRIAN, A.; XU, F. Inhibition of cellulase-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 23, p. 7673-82, Dec 2010.

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, 9// 2016.

TUOHY, M. G.; COUGHLAN, M. P. Production of thermostable xylan-degrading enzymes by *Talaromyces emersonii*. **Bioresource Technology**, v. 39, n. 2, p. 131-137, 1992.

VASCONCELLOS, V.; FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; GIORDANA, R. L. C.; TARDIOLI, P. W.; FARINAS, C. S. ESTUDO COMPARATIVO DA TERMOESTABILIDADE DE ENZIMAS PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS EM CULTIVO SUBMERSO E COMBINADO. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 1706-1713, 2015.

VIANA, Y. A.; FILHO, M. D. S. G.; PENHA-SILVA, N. Estabilização de proteínas por osmólitos. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 2, 2006.

VOET, D.; VOET, J. G. Bioquímica. **Ed. Médica Panamericana**, 2006. ISBN 9500623013.

WANG, C.; EUFEMI, M.; TURANO, C.; GIARTOSIO, A. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. **Biochemistry**, v. 35, n. 23, p. 7299-7307, 1996.

WANG, S. L.; HORNG, Y. Y.; LUNG, S. I.; CHINGZU, C. A.; TEISH, C. W.; CHIEH, W. W.; DER, C. Y. Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 7, p. 917-925, 12/2/ 2003.

WATERS, D. M.; MURRAY, P. G.; RYAN, L. A.; ARENDT, E. K.; TUOHY, M. G. *Talaromyces emersonii* Thermostable Enzyme Systems and Their Applications in Wheat Baking Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7415-7422, 2010/06/23 2010.

WONG, K.; TAN, L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological reviews**, v. 52, n. 3, p. 305, 1988.

YU, Y.; WANG, J.; SHAO, Q.; SHI, J.; ZHU, W. The effects of organic solvents on the folding pathway and associated thermodynamics of proteins: a microscopic view. **Scientific reports**, v. 6, 2016.