

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUANA LIMA DA CUNHA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA DE UMA
XILANASE DE *ASPERGILLUS FOETIDUS***

BRASÍLIA

2016

LUANA LIMA DA CUNHA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA DE UMA
XILANASE DE *ASPERGILLUS FOETIDUS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

BRASÍLIA

2016

LUANA LIMA DA CUNHA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA DE UMA
XILANASE DE *ASPERGILLUS FOETIDUS*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 04 de março de 2016.

Banca examinadora

Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

Universidade de Brasília (UnB)

Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas

Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Universidade de Brasília (UnB)

À minha mãe e aos meus irmãos, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães, por ter me recebido e me incentivado durante os dois anos de mestrado. Você foi uma referência profissional e pessoal para o meu crescimento. Obrigada por estar ao meu lado e acreditar em mim!

Ao prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho pela disponibilidade e atenção na resolução de dúvidas que surgiram durante a pesquisa. Pelo auxílio com os experimentos de cinética enzimática e de hidrólise.

À profa. Dra. Sonia Maria de Freitas, pelos ensinamentos, paciência e oportunidade. Pelo auxílio nos experimentos de termodinâmica e de análise estrutural da xilanase.

Ao prof. Dr. Thomas Christopher Rhys Williams, pelo auxílio no trabalho com o HPLC.

A todos os professores do mestrado que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e toda sua equipe pela competência no suporte de nossas necessidades acadêmicas.

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

A CAPES, CNPq, FAPDF, Finep, CT-Infra pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

À Dra. Amanda Araújo Souza, pelos ensinamentos e vivências compartilhadas. Pelo auxílio nos experimentos de análise estrutural da xilanase e discussão dos resultados.

À Dra. Leonora Rios de Souza Moreira e à Débora Lo Sciuto pelo auxílio nos experimentos de hidrólise e discussão dos resultados, pela paciência, disposição e ensinamentos.

Ao Dr. Kleber Barros, pela disponibilidade e pelo auxílio na análise dos experimentos de planejamento fatorial.

Ao Helder Andrey Rocha Gomes pelo ensinamento da técnica de ultrafiltração e pelas conversas que contribuíram para este trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia – IB, que contribuíram de alguma forma para este trabalho.

Às técnicas Michelle e Patrícia pelo apoio, carinho e ajuda, por tornarem os momentos no laboratório muito mais agradáveis.

À amiga Raquel, pela amizade, companheirismo e pelos momentos que passamos juntas. Só nós sabemos o que passamos e o quanto conversamos nesse momento juntas. Você foi meu apoio e inspiração durante o mestrado.

Aos meus colegas do Laboratório de Produtos Naturais: Amanda, Carol, Catarina, Cristian, Dani, Diegue, Gabi, Larizza, Lorena, Marcela, Marline, Márcia, Michelle, Patrícia, Paula, Pedro, Raquel, Renata, Samuel, Yuri e Clara. Agradeço pela amizade, momentos divertidos, pelos ensinamentos, pelas confraternizações e por terem me acolhido no grupo.

A todos os meus amigos e amigas. Obrigada pelo apoio, compreensão, suporte e palavras de incentivo.

À minha família, pelo amor e incentivo em todas as etapas da minha vida. Especialmente à minha mãe Noeldina e meus irmãos, Ana Rita e Rodrigo, que não hesitaram em me apoiar neste projeto.

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

“A ciência será sempre uma busca, jamais um descobrimento real. É uma viagem e nunca uma chegada.”

Karl Popper

RESUMO

CUNHA, Luana Lima. **PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA DE UMA XILANASE DE *ASPERGILLUS FOETIDUS***. Brasília, 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

A casca de soja é um resíduo agroindustrial com elevado teor de holocelulose, sendo uma fonte de carbono economicamente viável para microrganismos produzirem enzimas de xilanases de aplicação industrial. Entre esses microrganismos estão os fungos filamentosos, eficientes produtores de xilanases, enzimas que apresentam diversas aplicações biotecnológicas, incluindo branqueamento do papel, aditivos em rações animais, produção de sucos, pães, entre outras. No presente estudo, uma xilanase (Xyl) do fungo *Aspergillus foetidus* crescido em casca de soja foi purificada e caracterizada visando o potencial biotecnológico da Xyl e o aproveitamento do resíduo. A curva de indução enzimática do fungo indicou alta atividade de xilanase a partir do segundo dia, mantendo-se constante ao longo de 20 dias. A otimização das condições de cultivo, utilizando MSR, levou a produção máxima de xilanase de 13,98 U/mL. Uma xilanase foi purificada com massa molecular estimada de 14,19 kDa. A Xyl teve sua maior atividade a 50°C e pH 5,0. A meia-vida da Xyl a 30°C e a 50°C foi de 8 dias 16 horas e 7h 36min, respectivamente. A enzima foi ativada por Mg^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , K^+ e Na^+ e inibida por Mn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} e SDS. Os valores de K_m e $V_{máx}$ encontrados a 50°C foram 26,32 mg/mL e 68,45 U/mL, respectivamente. Os valores dos parâmetros termodinâmicos estimados para a reação da Xyl com o substrato foram $\Delta G = -17,56 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta H = -29,94 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta S = -31,47 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ e $E_a = 33,87 \text{ kJmol}^{-1}$. A hidrólise da xilana por Xyl liberou xilose, xilobiose (maior quantidade) e xilotriose indicando um mecanismo de ação do tipo “exo”. A influência do pH e temperatura sobre as estruturas secundárias e terciárias da Xyl foram analisados por espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular. Os resultados mostraram que as perturbações de pH e temperatura afetam a estabilidade da Xyl, mas não sua estrutura secundária. Os resultados encontrados no trabalho sugerem que a Xyl pertença à família GH11.

Palavras-chave: Xilanase, *Aspergillus foetidus*, casca de soja, termodinâmica, purificação, planejamento fatorial, hidrólise enzimática.

ABSTRACT

CUNHA, Luana Lima. **PURIFICATION AND BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL CHARACTERIZATION OF A XYLANASE FROM *ASPERGILLUS FOETIDUS*.**

Brasília, 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

Soybean hulls are an agro-industrial residue high in holocelulose which is a source of carbon with economic viability used by microorganisms to produce xylanolytic enzymes with application to industries. The filamentous fungi are an effective microorganism producer of xylanase, enzymes that with many biotechnological uses including paper bleaching, animal feed additives, production of juices, bread, among others. In this study, a xylanase (Xyl) produced by *Aspergillus foetidus* grown on soybean hulls was purified and characterized aiming the biotechnological potential of Xyl and residues utilization. The enzyme induction curve of the fungus indicated high xylanolytic activity from the second day and it remained constant throughout 20 days. The optimization of culture conditions using the response surface methodology led to a maximum xylanase production of 13.98 U/mL. A xylanase was purified with an estimated molecular weight of 14.19 kDa. The enzyme had its highest activity at 50°C and pH 5.0. The Xyl half-life at 30°C and 50°C was 8 days and 6 hours and 7h36min, respectively. The enzyme was activated by Mg⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, K⁺ e Na⁺ e inhibited by Mn²⁺, Co²⁺, Fe²⁺ e SDS. The enzyme gave a Michaelis-Menten constant (K_m) 26.32 mg/mL and maximum reaction (V_{max}) 68.45 U/mL. The thermodynamic parameters for the hydrolysis of birch wood xylan were estimated at $\Delta G = -17.56 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta H = -29.94 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta S = -31.47 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ and $E_a = 33,87 \text{ kJmol}^{-1}$. The hydrolysis of xylan by Xyl produced xylose, xylobiose (in a larger amount) and xylotriose indicating an action mechanism of “exo” mode. The influence of pH and temperature on the secondary structure of Xyl were analyzed by fluorescence spectroscopy and circular dichroism. The results showed that pH and temperature disturbances affect only Xyl stability. The results of the current work suggest that Xyl may be classified as GH11 family.

Keywords: Xylanase, *Aspergillus foetidus*, thermodynamics, purification, factorial design, enzymatic hydrolyses.

Lista de Figuras

Figura 1 - Mecanismo geral de glicosidases para (a) inversão da β -glicosidase e (b) retenção da β -glicosidase.	22
Figura 2 - Representação do domínio catalítico das glicosil hidrolases (GHs) da Família 10 – Estrutura de uma xilanase de <i>Trichoderma reesei</i>	24
Figura 3 - Representação do domínio catalítico das glicosil hidrolases (GHs) da Família 11 - Estrutura de uma xilanase expressa por <i>Escherichia coli</i>	25
Figura 4 - Estrutura de um fragmento da cadeia de celulose.....	39
Figura 5 – Estrutura esquemática representando as regiões cristalina e amorfa da celulose.....	40
Figura 6 – Açúcares que compõem as unidades de hemicelulose.....	41
Figura 7 – Ilustração da estrutura química da xilana com os possíveis substituintes. “Fer” representa a esterificação com o ácido ferúlico.....	42
Figura 8 – Estrutura da xilana e locais de ataque de enzimas xilanolíticas.....	44
Figura 9 – Estrutura proposta para a macromolécula de lignina de <i>Eucalyptus grandis</i> por Nimz, H. 1974.....	47
Figura 10 - Esquema de purificação da xilanase obtida do cultivo de <i>Aspergillus foetidus</i> (Xyl).	58
Figura 11 - Curva de indução da atividade de xilanase de <i>Aspergillus foetidus</i> em meio líquido contendo casca de soja 2% ao longo de 20 dias. Cultivo em shaker, 120 rpm, 28°C.....	70
Figura 12 - Gráfico de superfície resposta da xilanase em função das variáveis temperatura (°C) e pH para o planejamento fatorial 1 (FD1).....	76
Figura 13 - Gráfico de superfície resposta da xilanase em função das variáveis temperatura (°C) e pH para o planejamento fatorial 2 (FD2).....	78

Figura 14 – (a) Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12% do extrato bruto (3), ultrafiltrado membrana 100 kDa (4), concentrado membrana 30 kDa (5) e ultrafiltrado membrana 30 kDa (Xyl) (6). Na linha 1, está representado a massa molecular (em kDa) dos marcadores moleculares (2) (LMW Kit, GE Healthcare Life Sciences) utilizados. (b) Zimograma da xilanase purificada (Xyl).....	81
Figura 15 - Efeito da temperatura na atividade de xilanase da enzima purificada de <i>Aspergillus foetidus</i>	82
Figura 16 - Efeito do pH na atividade da xilanase purificada. Intervalo de pH entre 1 a 2, tampão HCl-cloreto de sódio; pH 3 a 5, tampão acetato de sódio; pH de 6 a 7, tampão fosfato de sódio; pH de 8 a 9, tampão Tris-HCl.....	84
Figura 17 - Termoestabilidade da atividade de xilanase nas temperaturas de 30°C e 50°C.	85
Figura 18 - Gráfico de van't Hoff para a xilanase purificada obtida de <i>Aspergillus foetidus</i> . Ka: constante de afinidade e T: temperatura em Kelvin.	93
Figura 19 - Gráfico de Arrhenius para a xilanase purificada obtida de <i>Aspergillus foetidus</i> . V _{máx} : Velocidade máxima da reação e T: temperatura em Kelvin.....	96
Figura 20 - Hidrólise da xilana de bétula pela Xyl. Açúcares redutores avaliados por DNS.....	97
Figura 21 - Hidrólise da xilana de bétula pela Xyl. Açúcares redutores avaliados por orcinol-férrico a 660 nm (pentose).....	99
Figura 22 - Hidrólise da xilana de bétula pela Xyl. Açúcares redutores avaliados por orcinol-férrico a 520 nm (hexose).....	99
Figura 23 - Liberação de xilooligossacarídeos durante a hidrólise da fração solúvel da xilana de bétula em função do tempo.....	100
Figura 24 - Liberação de xilooligossacarídeos durante a hidrólise da fração insolúvel da xilana de bétula em função do tempo.....	101

Figura 25 - Detecção por CLAE dos produtos formados pela hidrólise da xilana de bétula, com 12 horas de incubação, pela enzima Xyl. Xilose (1), xilobiose (2) e xilotriose (3).....	102
Figura 26 – Espectro de emissão de fluorescência da Xyl em tampão acetato 3 mM pH 5,0, tampão Tris-HCl 3 mM pH 7,0 e 9,0.	103
Figura 27 – Espectros de dicroísmo circular na região distante do ultravioleta da Xyl em tampão acetato 3 mM pH 5,0 e em temperaturas variando de 5 a 95°C.....	105
Figura 28 - Espectros de dicroísmo circular na região distante do ultravioleta da Xyl em tampão Tris-HCl 3 mM pH 7,0 e em temperaturas variando de 25 a 95°C.	106
Figura 29 - Espectros de dicroísmo circular na região distante do ultravioleta da Xyl em tampão Tris-HCl 3 mM pH 9,0 e em temperaturas variando de 25 a 90°C.	106
Figura 30 – Espectro de dicroísmo circular na região distante do ultravioleta da Xyl em pHs 5,0; 7,0; 9,0 na temperatura de 25°C.....	107
Figura 31 – Perfil da desnaturação térmica da Xyl em pHs 5,0; 7,0 e 9,0. A Xyl foi submetida a um gradiente de temperatura (1°C.min ⁻¹) em tampão acetato de sódio 3 mM pH 5,0 e em tampão Tris-HCl 3 mM pH 7,0 e 9,0 com constante monitoramento da elipticidade a 208 nm.	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial para a produção de xilanases FD1 e FD2.	57
Tabela 2 - Resultados obtidos do planejamento fatorial 2 ³ utilizando as variáveis independentes pH, temperatura e agitação.	72
Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão 1.....	73
Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão 2.....	74
Tabela 5 - Resumo das etapas de purificação de Xyl produzida por <i>Aspergillus foetidus</i> cultivado em casca de soja 1% como fonte de carbono.	80
Tabela 6 - Características físico-químicas descritas para xilanases purificadas, produzidas por fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	83
Tabela 7 - Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade da xilanase purificada de <i>Aspergillus foetidus</i> a partir do cultivo submerso com casca de soja 1%.....	87
Tabela 8 - Efeito de reagentes modificadores de aminoácidos e aminoácidos na atividade da xilanase purificada de <i>Aspergillus foetidus</i> a partir do cultivo submerso com casca de soja 1%.	88
Tabela 9 - Especificidade do substrato da xilanase purificada de <i>Aspergillus foetidus</i>	90
Tabela 10 - Variáveis para cálculo dos parâmetros termodinâmicos.	92
Tabela 11 - Parâmetros termodinâmicos da xilanase purificada obtida de <i>Aspergillus foetidus</i>	93
Tabela 12 – Comparação das porcentagens de estrutura secundária da Xyl nos pHs 5,0; 7,0; 9,0 na temperatura de 25°C.	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
GH	Glicosil Hidrolase
XOS	Xilooligossacarídeos
PHK	Processo Kraft
USDA	Banco de Dados Nacional de Nutrientes de Referência Padrão
PNA	Polissacarídeos não amiláceos
pl	Ponto Isoelétrico
pH	Potencial Hidrogeniônico
BDA	Batata-dextrose-ágar
rpm	Rotações por minuto
EB	Extrato bruto
CMC	Carboximetil celulose
DNS	Ácido dinitrosalicílico
U	Unidade Internacional
FPase	Celulase total
ρ NPX	ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo
ρ NPG	ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo
ρ NPM	ρ -nitrofenil- β -D-manopiranosídeo
ρ NPA	ρ -nitrofenil- β -D-arabinopiranosídeo
ANOVA	Análise de variância
MSR	Análise de superfície resposta
Xyl	Xilanase purificada do fungo filamentoso <i>Aspergillus foetidus</i>
TCA	Ácido tricloroacético
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida
k_m	Constante de Michaelis-Menten
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidade máxima da reação
K_a	Constante de afinidade
R	Constante dos gases
T	Temperatura absoluta (K)
ΔH	Varição de entalpia
ΔS	Varição de entropia
ΔG	Varição de energia livre

Ea	Energia de ativação
A	Constante de Arrhenius
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
CLAE	Cromatografia líquida de alta pressão
R ²	Coefficiente de determinação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	Xilanase	21
2.1.1	Regulação da síntese de xilanases	26
2.2	Aplicabilidade xilanase	27
2.2.1	Produção de xilooligossacarídeo	28
2.2.2	Indústrias de polpa e papel	30
2.2.3	Clarificação de sucos	32
2.2.4	Indústria de panificação	34
2.2.5	Alimentação animal	36
2.3	Resíduo lignocelulósico – casca de soja	38
2.3.1	Celulose	39
2.3.2	Hemicelulose	40
2.3.2.1	Xilana	42
2.3.2.2	Enzimas envolvidas na degradação da xilana	43
2.3.3	Lignina	46
2.4	Fungos Filamentosos	48
2.5	Purificação e Caracterização de Xilanases	50
3	OBJETIVOS	52
3.1	Objetivo geral	52
3.2	Objetivos específicos	52
4	MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1	Origem dos reagentes	53
4.2	Resíduo Agroindustrial	53

4.2.1	Origem do Resíduo Lignocelulósico	53
4.2.2	Pré-tratamento.....	53
4.3	Manutenção e cultivo do microrganismo	54
4.4	Determinação da quantidade de proteínas	55
4.5	Determinação da atividade enzimática.....	55
4.5.1	Atividade de xilanase, CM-celulase e mananase	55
4.5.2	Atividade de celulase total	56
4.5.3	Atividade em substratos sintéticos.....	56
4.6	Determinação das condições ótimas de atividade quanto ao pH, temperatura e agitação em shaker por análise de superfície resposta	56
4.7	Purificação da xilanase	58
4.8	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	58
4.9	Coloração com azul de coomasie	59
4.10	Determinação da atividade de xilanase em gel de poliacrilamida	59
4.11	Caracterização da amostra de xilanase purificada	60
4.11.1	Efeito da temperatura na atividade xilanolítica	60
4.11.2	Efeito do pH na atividade xilanolítica	60
4.11.3	Termoestabilidade e cálculo da meia vida da xilanase	61
4.11.4	Determinação dos parâmetros cinéticos	61
4.11.5	Determinação dos parâmetros termodinâmicos	62
4.11.6	Determinação da Energia de ativação	62
4.11.7	Efeito de íons metálicos, agentes modificadores de aminoácidos e aminoácidos	63
4.11.8	Preparo das frações solúvel e insolúvel da xilana de bétula (birchwood)	64
4.11.9	Hidrólise enzimática da xilana de bétula (frações solúvel e insolúvel).....	64
4.11.10	Dosagem de açúcares redutores totais.....	64

4.11.11	Dosagem de pentoses e hexoses livres pelo método do orcinol-férrico.....	65
4.11.12	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da hidrólise enzimática das frações de xilana	65
4.11.13	Análise estrutural da Xyl.....	66
4.11.13.1	Espectroscopia de fluorescência.....	67
4.11.13.2	Dicroísmo circular	68
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1	Curva de Indução Enzimática	70
5.2	Determinação das condições ótimas de atividade quanto ao pH, temperatura e agitação por análise de superfície resposta.....	72
5.2.1	Xilanase FD1	75
5.2.2	Xilanase FD2	77
5.3	Purificação Xilanase.....	79
5.4	Caracterização enzimática da Xyl	82
5.4.1	Efeito da temperatura na atividade da Xyl	82
5.4.2	Efeito do pH na atividade de Xyl.....	84
5.4.3	Termoestabilidade e tempo de meia-vida da Xyl.....	85
5.4.4	Efeito de íons e agentes modificadores.....	86
5.4.5	Especificidade aos substratos	90
5.4.6	Parâmetros cinéticos	91
5.4.7	Parâmetros termodinâmicos	91
5.4.8	Energia de Ativação.....	95
5.4.9	Hidrólise da xilana de bétula por Xyl.....	97
5.4.10	Análise estrutural da Xyl.....	103
5.4.10.1	Monitoramento por fluorescência	103
5.4.10.2	Monitoramento por Dicroísmo Circular.....	104

6	CONCLUSÃO	110
7	PERSPECTIVAS	111
8	REFERÊNCIAS	112

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo. O processamento das sementes gera uma grande quantidade de resíduos que, em sua grande maioria, são descartados no meio ambiente (Heck, Hertz e Ayub, 2002). O descarte inadequado do resíduo pode levar a sérios problemas ambientais. Muitos estudos foram desenvolvidos, agregando valor ao resíduo e gerando produtos como o etanol, enzimas, ácidos orgânicos, metabólitos secundários, entre outros (Heck, Hertz e Ayub, 2002; Soccol e Vandenberghe, 2003; Siqueira *et al.*, 2010).

A hemicelulose é o segundo maior constituinte dos resíduos lignocelulósicos, sendo a xilana o maior constituinte desta fração. As endo-xilanases (EC 3.2.1.8) são essenciais para a despolimerização da xilana. Um grande número de bactérias e fungos produzem xilanases, sendo os fungos filamentosos produtores desta enzima do ponto de vista industrial. As preparações comerciais de xilanases, obtidas em escala industriais são, principalmente, de fungos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* (Michelin *et al.*, 2010).

Estes microrganismos liberam a enzima extracelularmente, apresentando alto rendimento quando comparado com xilanases de leveduras e bactérias. Os fungos filamentosos também são capazes de produzirem enzimas auxiliares para o processo de despolimerização da xilana. No entanto, as xilanases fúngicas, geralmente, estão associadas com a produção concomitante de celulasas (Heck, Hertz e Ayub, 2002; Shah e Madamwar, 2005).

As xilanases são enzimas importantes pelo seu potencial biotecnológico em vários processos industriais como na panificação, na ração animal, branqueamento da polpa de celulose, clarificação de sucos e vinhos, produção de xilitol e etanol (Seyis e Aksoz, 2005; Shah e Madamwar, 2005; Pal e Khanum, 2011).

A caracterização das enzimas xilanolíticas é fundamental para a aplicação biotecnológica destas. O custo da enzima é um dos principais fatores que influencia na onerosidade dos processos. A redução no custo, pode ser alcançado pela otimização dos processos de produção e purificação da enzima (Shah e Madamwar, 2005).

O grau de pureza da enzima será determinado pela sua aplicabilidade, por exemplo, nas indústrias de detergentes e branqueamento da celulose, a amostra não precisa de um alto grau de pureza, influenciando em um menor custo do processo. No entanto, a utilização de enzimas semipurificadas ou purificadas no processo, em comparação com os extratos brutos potencializa a eficiência do processo e rendimento (Shah e Madamwar, 2005).

Nas aplicações industriais, as enzimas devem, idealmente, serem tolerantes a diversos fatores físico-químicos como pH, temperatura, íons metálicos, e apresentarem alta eficiência catalítica, e baixo custo de produção. O conhecimento destas propriedades das enzimas é importante para otimizar e reduzir os custos do processo. Por isso, estudos que buscam a identificação e purificação de novas xilanases são constantes (Bokhari, Latif e Rajoka, 2009).

Face ao exposto, o conhecimento da produção e caracterização de xilanases produzidas por *Aspergillus foetidus* contribuirá na aplicação da xilanase em processos biotecnológicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 XILANASE

As xilanases são glicosidasas (hidrolases O-glicosídicas, EC 3.2.1.x) que catalisam a endohidrólise das ligações 1,4- β -D-xilosídicas na xilana. Elas são um largo grupo de enzimas envolvidas na produção de xilose. Este açúcar é fonte de carbono primário para o metabolismo celular e é utilizado por patógenos na infecção da parede celular de plantas. Essas enzimas são produzidas por vários organismos incluindo bactéria, algas, fungos, protozoários, gastrópodes e artrópodes (Collins, Gerday e Feller, 2005).

As xilanases foram relatadas pela primeira vez em 1955, sendo originalmente denominadas pentosanases. Posteriormente, foram reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) em 1961 quando foram classificadas como EC 3.2.1.8. O nome químico é endo-1,4- β -xilanase, mas comumente chamada por sinônimos que incluem xilanase, endo-xilanase, 1,4- β -D-xilana-xilanhidrolase, endo-1,4- β -D-xilanase, β -1,4-xilanase e β -xilanase (Collins, Gerday e Feller, 2005).

A IUBMB determina a nomenclatura das glicosil hidrolases (GHs) baseado na especificidade ao substrato e às vezes no mecanismo molecular (Lombard *et al.*). A classificação das GHs está dividida em 135 famílias, baseado na similaridade da sequência de aminoácidos (Lombard *et al.*; Davies e Henrissat, 1995; Rye e Withers, 2000). Considerando que a estrutura e mecanismo molecular da enzima estão relacionados com a sua estrutura primária, o sistema de classificação reflete as características estruturais e de mecanismo das enzimas (Collins, Gerday e Feller, 2005).

As GHs (EC 3.2.1.-) compreendem um grupo muito difundido de enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas em dois ou mais carboidratos ou em um carboidrato e uma porção de não carboidrato (Lombard *et al.*). A hidrólise enzimática das ligações glicosídicas ocorre, de uma maneira geral, pela catálise ácida que

requer dois resíduos: um doador de próton e um nucleófilo/base (Davies e Henrissat, 1995).

A hidrólise pode acontecer por dois mecanismos: a inversão da configuração anomérica ou a retenção. Ambos os mecanismos (Figura 1) envolvem um estado de transição com o íon oxicarbono e duas moléculas de ácido carboxílico no sítio ativo (Davies e Henrissat, 1995; Rye e Withers, 2000).

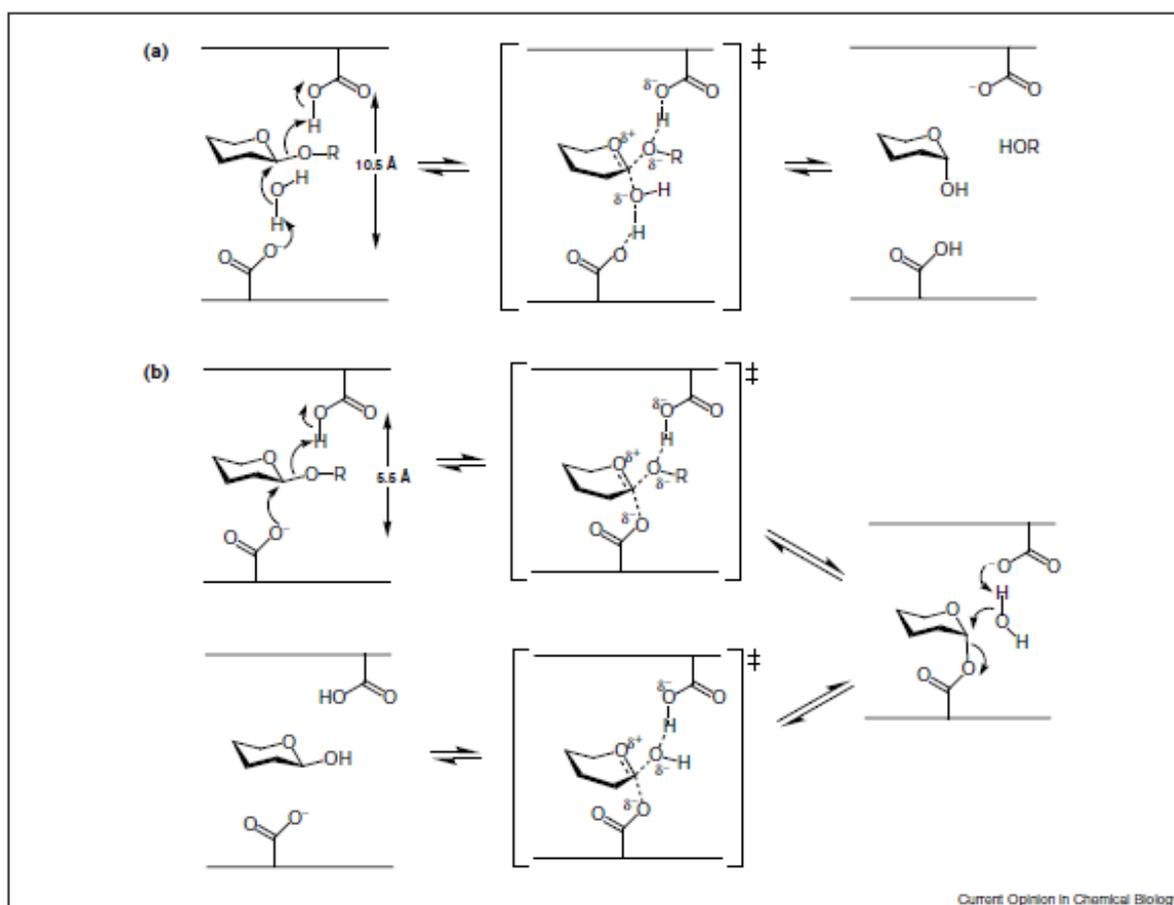


Figura 1 - Mecanismo geral de glicosidases para (a) inversão da β -glicosidase e (b) retenção da β -glicosidase.

Fonte: Rye e Withers, 2000, p. 574.

Nas enzimas de inversão, os dois resíduos estão localizados a aproximadamente 10 \AA ($\pm 2 \text{ \AA}$) e a reação acontece de forma que uma molécula de ácido carboxílico atua como o nucleófilo e a outra molécula do ácido atua como o doador de próton (Davies e Henrissat, 1995; Rye e Withers, 2000). Nas enzimas de

retenção, os dois resíduos do ácido carboxílico estão a aproximadamente 5 Å e a reação ocorre por um deslocamento duplo (Davies e Henrissat, 1995; Rye e Withers, 2000).

As GHs apresentam vários mecanismos para diminuir a barreira de energia da reação de hidrólise, como a distorção do substrato na conformação do tipo “sofá” ou “cadeira”. Acredita-se que a protonação da ligação glicosídica é acompanhada de um alongamento da ligação (Davies e Henrissat, 1995).

Considerando esse sistema de classificação, as xilanases (EC 3.2.1.8) normalmente são classificadas em duas famílias de GHs: Família 10 (F) e Família 11(G) (Jeffries, 1996), mas enzimas com atividade xilanolítica também são encontradas em outras famílias, como 5, 7, 8, 9, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 e 62, o que pode ser explicado pela presença de enzimas bifuncionais, ou seja, que apresentem dois domínios catalíticos, ou enzimas que apresentam atividade xilanolítica residual (Collins, Gerday e Feller, 2005; Uday *et al.*, 2016).

A Família 10 consiste em endo-1,4- β -xilanases, endo-1,3- β -xilanases (enzimas encontradas principalmente na parede celular de algas) e celobiohidrolases. A primeira enzima representa o maior constituinte dessa família e, estudos demonstraram que as endo-1,4- β -xilanases podem apresentar especificidade para outros substratos além da xilana, como em substratos de celulose com baixa massa molecular. Com isso, a substituição de um ou dois resíduos de xilose por glicose é normalmente tolerada por xilanases dessa família, o que resulta, no entanto, em uma diminuição da eficiência catalítica (Collins, Gerday e Feller, 2005).

A análise estrutural e cinética da atividade da xilanase sobre vários xilooligossacarídeos indicou que as xilanases dessa família apresentam 4 ou 5 sítios de ligação ao substrato. O domínio catalítico de xilanases da família 10 é cilíndrico com configuração barril (α/β)₈, o domínio finaliza com uma extremidade mais estreita próxima da terminação carboxil da extremidade β (Figura 2). Em geral, xilanases da família 10 tem alto peso molecular, baixo pI e os oligossacarídeos decorrentes das reações de hidrólise apresentam baixo grau de polimerização (Jeffries, 1996; Collins, Gerday e Feller, 2005).

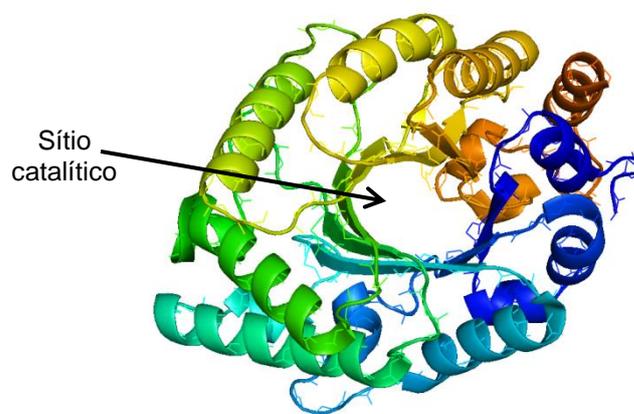


Figura 2 - Representação do domínio catalítico das glicosil hidrolases (GHs) da Família 10 – Estrutura de uma xilanase de *Trichoderma reesei*.

Fonte: Stogios *et al.*, 2015. (PDB ID: 4XUY)

Os estudos de hidrólise demonstraram que a maioria das xilanases dessa família são específicas para a ligação xilosídica na porção não redutora do resíduo substituído ou a ligação 1,3- β , mas só podem clivar após a terceira ligação do resíduo substituído ou da segunda ligação 1,3- β . Isso indica que os subsítios da porção não-redutora são mais específicos do que aqueles do lado redutor do sítio de clivagem (Collins, Gerday e Feller, 2005).

Por outro lado, os domínios catalíticos de enzimas da família 11 são formados principalmente de folhas β torcidas que protegem o sítio catalítico (Figura 3). Além dos domínios catalíticos, as xilanases também podem apresentar domínios não catalíticos, que são mais comuns em xilanases da família 11. Esses domínios são responsáveis por modular as funções catalíticas da enzima (Jeffries, 1996).

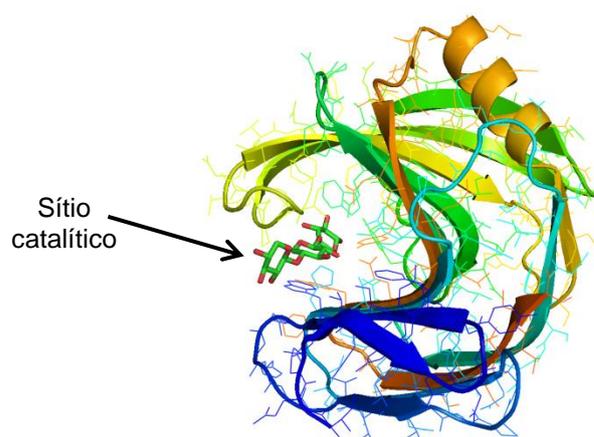


Figura 3 - Representação do domínio catalítico das glicosil hidrolases (GHs) da Família 11 - Estrutura de uma xilanase expressa por *Escherichia coli*.

Fonte: Dumon *et al.*, 2008. (PDB ID: 4HK9)

Em contraste, com outras famílias, a família 11 é monoespecífica, ou seja, consiste somente de xilanases. As enzimas dessa família são chamadas de “xilanases verdadeiras”, pois são exclusivamente ativas em substratos que contem o resíduo D-xilose. Como resultado, as enzimas têm menor versatilidade catalítica e os produtos hidrolisados podem, posteriormente, serem hidrolisados por enzimas da família 10. As enzimas da família 11 são geralmente caracterizadas por um alto valor de pI , baixo peso molecular e uma estrutura de folhas β (Collins, Gerday e Feller, 2005).

O mecanismo de ação das xilanases é pela retenção da configuração anomérica. Neste mecanismo, o oxigênio glicosídico é protonado pelo catalisador ácido (AH) e o nucleófilo para o aglicon é dado pela base B^- . A enzima glicosil é hidrolisada pela molécula de água e uma segunda substituição nucleofilica no

carbono anomérico forma um produto com a mesma estereoquímica do substrato (Figura 1(b)) (Davies e Henrissat, 1995).

2.1.1 Regulação da síntese de xilanases

Em geral, a indução de xilanases é um fenômeno complexo e o nível da sua resposta varia com o organismo. Um indutor para produção máxima de xilanase em uma espécie pode ser um inibidor da atividade em outra espécie (Kulkarni, Shendye e Rao, 1999).

Os fragmentos de xilana, como xilose, xilobiose e xilooligossacarídeos, tem um papel importante na regulação da biossíntese de xilanases. Essas moléculas são liberadas da xilana pela ação de xilanases constitutivas que são produzidas em pequenas quantidades. Os produtos da hidrólise da xilana liberados induzem a produção de xilanases por diferentes métodos (Kulkarni, Shendye e Rao, 1999; Subramaniyan e Prema, 2002).

A xilose, por ser uma pequena molécula de pentose, facilmente entra nas células de bactérias e fungos e induz a produção de xilanases. A indução pelas moléculas maiores pode ser explicada pela transposição direta na matriz celular onde essas moléculas são degradadas por β -xilosidases intracelulares liberando os resíduos de xilose. Outra possibilidade é que esses oligômeros são hidrolisados em monômeros durante o processo de transposição da membrana celular para a matriz celular pela ação de transportadores hidrolíticos capazes de clivar a ligação β -1,4 (Subramaniyan e Prema, 2002).

Um fenômeno bem reportado na literatura é a repressão catabólica por glicose na biossíntese de xilanase. Se esse açúcar está presente no meio, observa-se a repressão da síntese de enzimas catabólicas que pode acontecer pela repressão direta do gene de transcrição e indiretamente pela repressão do ativador transcriptacional. A síntese da enzima também é reprimida na presença de fontes de carbono facilmente metabolizadas, sugerindo que a síntese da enzima é controlada por reguladores no estado de transição e repressão catabólica (Kulkarni, Shendye e Rao, 1999; Subramaniyan e Prema, 2002).

2.2 APLICABILIDADE XILANASE

As enzimas são encontradas na natureza e vem sendo usadas desde muito tempo na fabricação de produtos alimentícios, como queijo, cerveja, vinho e vinagre; na fabricação de mercadorias como couro, índigo e linho. No entanto, esses produtos biotecnológicos eram produzidos por meio de técnicas artesanais, desconhecendo-se, por conseguinte, os mecanismos envolvidos nos processos de fabricação. A partir do século XVII, iniciaram os estudos da biotecnologia possibilitando o avanço da ciência e aplicabilidade das enzimas purificadas em processos industriais (Kirk, Borchert e Fuglsang, 2002; Vitolo *et al.*, 2015).

O desenvolvimento dos processos de fermentação e avanços da biotecnologia permitiu a produção, purificação e caracterização de enzimas e sua aplicação, inclusive em larga escala. Este desenvolvimento viabilizou a introdução das enzimas em processos e produtos industriais, como, indústrias têxteis e alimentícias. Adicionalmente, com esses avanços também foi possível adaptar estas moléculas a novas condições do processo, o que expandiu o uso industrial de enzimas (Kirk, Borchert e Fuglsang, 2002). Desta forma, as enzimas são atualmente utilizadas para diversas aplicações variando desde a manufatura para produção industrial de diversos produtos até o uso terapêutico e de diagnóstico (Subramaniyan e Prema, 2002).

A grande maioria das enzimas usadas industrialmente são aquelas com ação hidrolítica, sendo usadas para degradação de várias substâncias naturais. As proteases, devido seu extensivo uso em indústrias de detergentes e de laticínios, representam o maior grupo de enzimas usadas industrialmente. Em segundo lugar, vêm as glicosidases que são utilizadas nas indústrias têxteis, alimentícias, de detergentes, entre outras (Kirk, Borchert e Fuglsang, 2002).

O mercado global de enzimas industriais é crescente, chegando em 2014 a USD 4,2178 bilhões (Companies and Markets, 2015). As xilanases juntamente com as celulasas e pectinases representam 20% desse mercado (Polizeli *et al.*, 2005; Harris e Ramalingam, 2010).

O grande interesse nas xilanases é sua potencial aplicação em vários processos industriais. A enzima começou a ser aplicada em 1980, inicialmente em preparações de rações para animais e posteriormente nas indústrias alimentícias, têxteis e de papel (Viikari *et al.*, 1986; Buchert *et al.*, 1994; Polizeli *et al.*, 2005; Harris e Ramalingam, 2010).

A demanda do mercado por novas tecnologias aliadas ao baixo custo e alta produtividade do processo, cria um fluxo contínuo na identificação de novos produtores de enzimas e na busca por novas aplicações enzimáticas (Companies and Markets, 2015).

2.2.1 Produção de xilooligossacarídeo

Os xilooligossacarídeos (XOS) são definidos como oligômeros compostos entre duas e seis unidades de xilose unidos entre si por ligações β -1,4-xilosídicas. A nomenclatura é determinada pelo número de unidades monossacarídicas que formam os XOS, desta forma, xilobiose (dois monômeros), xilotriose (três monômeros), xilotetraose (quatro monômeros), xilopentaose (cinco monômeros) e xilohexaose (seis monômeros) (Kumar e Satyanarayana, 2011; Samanta *et al.*, 2015).

Esses oligossacarídeos têm muitas propriedades funcionais atraindo grande interesse para sua utilização em diversos campos, incluindo farmacêutico, aplicação na agricultura e em ração animal. A sua função mais importante, no entanto, está relacionada às aplicações na indústria de alimentos devido seu potencial efeito prebiótico (Vázquez *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2011). Outros estudos já reportaram os efeitos imunoestimulantes, propriedades antioxidante, antialérgica, anti-infecciosa e anti-inflamatória dos XOS (Meyer *et al.*, 2015).

Além dos efeitos benéficos para saúde, os XOS também são interessantes pelas suas propriedades físico-químicas; eles apresentam moderado efeito adoçante, um odor aceitável, não são carcinogênicos, tem baixo valor calórico e são estáveis em uma ampla faixa de valores de pH (2,5 - 8,0), mesmo nos baixos valores de pH do suco gástrico, e em temperaturas acima de 100°C. Enquanto XOS tem

esse comportamento, outros oligossacarídeos podem ser hidrolisados, resultando em perda nutricional e de propriedades físico-químicas quando submetidos a valores de pH ácido, altas temperaturas por curtos períodos ou quando estocado à temperatura ambiente por um longo período. Essas propriedades tornam os XOS desejáveis para incorporação em diversos produtos alimentícios como leite de soja, bebidas não alcoólicas, produtos lácteos e doces (Meyer *et al.*, 2015).

Os XOS apresentam outras vantagens quando comparados com outros oligossacarídeos: não são tóxicos nem metabolizados pelo sistema digestivo humano; são persistentes a região distal do colón minimizando doenças crônicas de colón; auxiliam na função intestinal, absorção de cálcio e metabolismo de lipídeos (Yang *et al.*, 2011). No entanto, os XOS têm maior custo de produção e isso dificulta o rápido desenvolvimento no mercado, sendo necessário melhorias na tecnologia do processo (Vázquez *et al.*, 2000).

Na maioria dos processos de hidrólise, a xilana deve ser convertida em xilose ou xilooligossacarídeo, o que pode ocorrer por um método químico, enzimático, uma combinação dos dois métodos ou pela auto-hidrólise da xilana. O método químico caracteriza-se pela hidrólise ácida da xilana produzindo os XOS. O método enzimático, por sua vez, é decorrente da catálise da xilana por enzimas xilanolíticas, que incluem as xilanases, β -xilosidases e acetilesterases. As xilanases catalisam a hidrólise aleatória da xilana formando XOS, as β -xilosidases liberam resíduos de xilose com extremidades não redutoras de XOS e as acetilesterases removem os resíduos acetil da cadeia principal da xilana (Yang, Yang e Liu, 2007; Samanta *et al.*, 2015). Por fim, a auto-hidrólise é o processo em que a xilana é colocada em contato com a água em condições controladas de pressão e temperatura resultando na despolimerização catalítica da xilana à XOS e xilose (Samanta *et al.*, 2015).

O método enzimático é vantajoso quando comparado aos demais, pois não gera subprodutos indesejáveis e não requer equipamentos especializados (Yang *et al.*, 2011). No entanto, o desenvolvimento de bioprocessos econômicos usando xilanases para produção de XOS é necessário. Vários microrganismos conhecidos como produtores de enzimas xilanolíticas são promissores para sua aplicação no desenvolvimento de novos processos (Meyer *et al.*, 2015).

2.2.2 Indústrias de polpa e papel

A demanda por estratégias alternativas na agricultura que direcionem os processos que são focados somente na produção de alimentos para aqueles que também supram a necessidade de outros setores da indústria, como as indústrias de papel e celulose vêm crescendo nos últimos anos (Ibarra *et al.*, 2010).

O primeiro produto derivado de celulose comercializado foi a fibra de celulose, Rayon[®]. Para obtenção desse produto, a polpa de celulose é tratada com dissulfeto de carbono (CS₂) na presença de uma base para produzir a goma xantana, matéria-prima para produção da fibra e de outros produtos derivados de celulose (Ibarra *et al.*, 2010).

A adição da base praticamente provoca o rompimento entre as ligações de hidrogênio entre as cadeias. Tal fenômeno leva a dissolução da celulose e os compostos que o geram são considerados como solventes da celulose (Klock e Andrade, 2005).

A polpa de celulose geralmente é composta por celulose (90-99%), hemicelulose (2-4%) e traços residuais de lignina, minerais, etc. As hemiceluloses são consideradas impurezas para o processo de branqueamento da polpa por afetar a capacidade de filtração no processo de produção da fibra, por alterar as propriedades dos produtos finais de celulose, como a força da fibra, por aumentar o uso de compostos químicos, entre outros (Gübitz *et al.*, 1997; Ibarra *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2015).

O método mais utilizado para o processamento da polpa de celulose é o processo kraft ou sulfato (PHK) (Ibarra *et al.*, 2010). No Brasil, cerca de 81% da madeira é processada por esse método (Castro, 2009). Nesse método, a polpa é colocada em contato com Na₂S/NaOH a 170°C, por 2 horas para seu cozimento, resultando na degradação e solubilização da lignina (Subramaniyan e Prema, 2002).

A polpa obtida tem uma coloração que varia de marrom a cinza. Essa diferença de tonalidade depende do teor de lignina residual e de derivados de lignina presente na polpa, que pode ser de até 5% dependendo do grau de cozimento efetuado no processo (Subramaniyan e Prema, 2002; Castro, 2009). Para ocorrer o

branqueamento da celulose, toda a lignina deve ser removida. Nessa remoção os processos químicos são mais efetivos que os mecânicos, devido às ligações covalentes da lignina na hemicelulose e, às vezes, nas fibras de celulose (Subramaniyan e Prema, 2002).

O processo de branqueamento envolve a destruição, alteração ou solubilização da lignina, material orgânico colorido e outros resíduos indesejáveis na fibra. Convencionalmente, o método de branqueamento mais utilizado é com o agente oxidante, cloro. Geralmente, duas etapas oxidantes em meio ácido são intercaladas por uma etapa de extração alcalina resultando na conversão da lignina em produtos solúveis em água ou em base (Subramaniyan e Prema, 2002; Azevedo, 2011).

A celulose obtida através do método citado acima apresenta alguns inconvenientes relacionados à qualidade final do produto ou a poluição que eles geram. Os efluentes que são produzidos durante o branqueamento da polpa são os principais contribuintes para a poluição da água. Além disso, o processo de polpação implica em custos maiores do que os custos dos processos alcalinos em termos de consumo químico, taxa de produção e estoque (Subramaniyan e Prema, 2002; Beltramino *et al.*, 2015).

O impacto ambiental causado pelo cloro levou a eliminação progressiva desse composto no processo de branqueamento devido à formação de dioxinas e compostos organoclorados não biodegradáveis. Diversos métodos têm sido estudados para eliminação seletiva da hemicelulose da polpa alcalina, como estudos para procedimentos totalmente livres de cloro (Beltramino *et al.*, 2015).

Nesse contexto, a hidrólise enzimática de diferentes componentes de lignocelulose tem atraído atenção especial pelo seu potencial como “processo verde” contribuindo para redução do uso de reagentes com cloro (Nogueira *et al.*, 2009; Beltramino *et al.*, 2015). Em vários lugares do mundo, as xilanases já são utilizadas no processo de branqueamento.

A Pulpzyme HA[®] da Novo Nordisk A/S foi a primeira enzima comercial disponível para uso no processo de branqueamento da polpa de madeira. A enzima foi obtida de uma cepa de *Trichoderma reesei* sendo utilizada para reduzir a

dosagem de cloro ativo e dioxinas. No Canadá, maior produtor de polpa, mais de 10% do branqueamento da polpa é feito utilizando xilanases (Dhiman, Sharma e Battan, 2008).

A utilização de enzimas facilita o branqueamento da polpa de celulose. O principal objetivo para aplicação de métodos biotecnológicos no branqueamento é encontrar um agente que remova a hemicelulose sem degradar a celulose. As xilanases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas da cadeia de xilana, diminuindo o grau de polimerização do substrato. Como resultado do tratamento enzimático, a polpa se torna mais acessível para oxidação pelos agentes químicos e ocorre a hidrólise enzimática de resíduos não dissolvidos de hemicelulose por endoxilanases (Subramaniyan e Prema, 2002). Desta forma, a polpa de celulose fica mais acessível aos reagentes de branqueamento, facilitando a eliminação da lignina pela remoção do complexo lignina-carboidrato (LCC) no processo de extração alcalina subsequente (Nogueira *et al.*, 2009).

Portanto, as xilanases são de grande importância para indústrias de papel e celulose porque a hidrólise da xilana facilita a liberação de lignina da polpa de celulose e reduz a quantidade de cloro como agente branqueador (Subramaniyan e Prema, 2002).

2.2.3 Clarificação de sucos

As indústrias de sucos representam uma parte significativa do mercado de enzimas. Os sucos de frutas tropicais se tornaram importantes devido ao aumento do consumo de sucos como uma alternativa para as bebidas contendo cafeína como café, chá ou bebidas gaseificadas não alcoólicas (Lee *et al.*, 2006).

Em 1930, quando a produção de sucos cítricos começou, o rendimento do processo era baixo devido a problemas de filtração resultando em sucos de maior turbidez. O conhecimento crescente sobre os constituintes químicos das frutas e o uso de enzimas ajudou a solucionar esse problema (Polizeli *et al.*, 2005).

A turbidez e viscosidade dos sucos são causadas principalmente pela presença de polissacarídeos como pectina, amido, hemicelulose e lignina. A pectina dificulta o processo de clarificação por causa da estrutura molecular da fibra. Paralelamente, o baixo rendimento do processo também está associado a dificuldades de pasteurização e concentração do suco de coloração escura levando a uma baixa aceitabilidade do produto final. Desta forma, a clarificação dos sucos é importante antes de sua comercialização. Vários pesquisadores reportaram o processo de despectinização usando pectinases que eficientemente clarificaram os sucos de frutas (Bajaj e Manhas, 2012; Kumar *et al.*, 2014).

As enzimas são utilizadas para obter ótima clarificação do suco, rendimento e qualidade do produto. Pectinases, celulases e hemicelulases são usadas industrialmente para clarificar e melhorar o rendimento do processo com uma qualidade final do suco. Muitos relatos estão disponíveis sobre o uso de pectinases para clarificação do suco, mas relatos sobre xilanase são escassos (Lee *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2014).

As pectinases hidrolisam a pectina e formam um complexo pectina-proteína para flocular. O suco de frutas resultante tem menor quantidade de pectina e menor viscosidade, facilitando o processo de filtração. Durante a filtração a pectina leva à obstrução dos poros da membrana e conseqüentemente um declínio no fluxo de filtração. Para solucionar esse problema, os pré-tratamentos enzimáticos que degradam pectina vem sendo investigados com o objetivo de aumentar o fluxo de permeação da microfiltração, ultrafiltração e osmose reversa de sucos de frutas ou outros líquidos que contenham pectina (Lee *et al.*, 2006; Bajaj e Manhas, 2012; Kumar *et al.*, 2014).

A maioria das frutas é rica em pectina, mas frutas como o abacaxi, tomate e maçã contém uma quantidade considerável de hemicelulose. De acordo com o banco de dados Nacional de Nutrientes de Referência Padrão (USDA), maçã (13,8%), abacaxi (13,1%) e tomate (4,0%) apresentam grandes quantidades de hemiceluloses. E uma vez que, a maior porção da hemicelulose é composta de xilana, estudos testam a aplicação de xilanases no processo de clarificação de sucos (Nagar, Mittal e Gupta, 2012; USDA National Nutrient Database, 2015).

A turbidez do suco, nesse caso, é devido à presença de hemiceluloses não hidrolisadas. No decorrer da clarificação do suco utilizando xilanases, a quantidade de hemicelulose vai diminuindo e conseqüentemente reduz a turbidez dos sucos, bem como sua viscosidade (Nagar, Mittal e Gupta, 2012).

Na maioria dos estudos as xilanases estão na sua forma livre. O uso industrial da enzima livre pode, no entanto ser limitada pelos altos custos e instabilidade estrutural da enzima, sendo necessário mais estudos para otimização do processo (Kumar *et al.*, 2014).

2.2.4 Indústria de panificação

Pães são os produtos obtidos da farinha de trigo e ou outras farinhas, adicionados de líquido, resultantes do processo de fermentação ou não e cocção, podendo conter outros ingredientes, desde que não descaracterizem os produtos. Podem apresentar cobertura, recheio, formato e textura diversos (Brasil, 2005).

Basicamente, o pão é composto de farinha de trigo, água, fermento biológico e sal (cloreto de sódio). Mas outros componentes são adicionados em pequena quantidade para melhorar as características da massa durante o processamento e do produto final. Estes componentes são gordura vegetal, açúcares, emulsificantes, agentes oxidantes e enzimas (Brasil, 2000).

A farinha de trigo é o principal ingrediente da massa de pão. Os diferentes tipos de farinha são utilizados de acordo com as características desejadas em uma massa. A farinha de trigo indicada para uso em panificação é a do tipo forte ou especial, por ser rica em proteínas de ótima qualidade e formadora de glúten, o que resultará em uma massa de boa consistência (Singer, 2006).

O glúten é um complexo proteico formado pelas gluteninas e gliadinas. Na farinha, essas proteínas formam agregados proteicos estáveis, mas quando a farinha é misturada com água, esses agregados são destruídos, formando pequenas unidades com seus grupos reativos mais expostos. Esses grupos se rearranjam e formam uma rede com propriedades visco elástica (Aquino, 2012).

O principal carboidrato na farinha de trigo é o amido, responsável por aproximadamente 65% da sua composição. O amido é importante para formação do miolo e como fonte de açúcar, após sua quebra por amilases, tornando-se substrato para a levedura durante a fermentação. Os demais polissacarídeos presentes na farinha são as pentosanas, responsáveis por 2 a 2,5% da farinha (Stauffer, 1990).

A água é absorvida por proteínas, grânulos de amido e pentosanas da farinha. A quantidade de água que é absorvida depende da qualidade da farinha de trigo. A água que não é absorvida permanece como água livre (Matuda, 2004).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada como fermento em panificação levando ao crescimento da massa. A gordura é adicionada para reduzir a taxa de endurecimento dos pães. O sal interage na formação da rede de glúten e controla a fermentação devido ao efeito osmótico na célula da levedura, porém sua função mais importante é a de fornecer sabor (Matuda, 2004).

Os emulsificantes são utilizados a fim de minimizar o envelhecimento dos pães, melhorar o manuseio e a força da massa. Apresentam propriedades lipolíticas e hidrolíticas, reduzindo a tensão interfacial entre fases que normalmente não se misturam. Geralmente, os emulsificantes utilizados na panificação atuam pela formação de complexos com o amido, favorecendo a maciez do miolo e prevenindo o envelhecimento ou atuam interagindo com as proteínas, aumentando a habilidade do glúten (Matuda, 2004).

A contribuição dos agentes oxidantes na panificação é dada principalmente pelo fortalecimento da matriz de glúten para resistir o estresse do batimento rápido. O resultado é a melhoria de características reológicas da massa durante o seu processamento e do produto final (Matuda, 2004; Aquino, 2012).

A potencial aplicação de xilanases na panificação é principalmente por melhorar a qualidade do pão. A enzima pode ser efetivamente substituída pelos aditivos usuais como os emulsificantes e oxidantes. No entanto, para melhores resultados as enzimas devem ser usadas em seus níveis ótimos e uma alta dosagem pode levar a efeitos adversos no produto final (Romanowska, Polak e Bielecki, 2006; Butt *et al.*, 2008).

Durante o processo de panificação, as xilanases, e outras hemicelulases, clivam a hemicelulose da farinha de trigo, ajudando na redistribuição da água e tornando a massa mais macia. Além disso, as xilanases atrasam a formação do miolo, permitindo o crescimento da massa. O resultado do processo são pães com maiores volumes, melhor absorção da água e melhoramento da resistência para fermentação (Polizeli *et al.*, 2005; Butt *et al.*, 2008).

Durante o processo de mistura (energia mecânica), o glúten é formado. A adição de xilanases nessa etapa pode afetar a formação do glúten, pois a enzima age, principalmente, na etapa de rearranjo das proteínas do glúten levando a quebra da sua estrutura, afetando o rendimento de glúten e suas propriedades reológicas (Butt *et al.*, 2008).

O aumento do volume do pão pelas xilanases pode ser explicado pela hidrólise das frações de hemicelulose insolúveis, principalmente arabinoxilana, liberando pequenos oligossacarídeos que absorverão muito menos água. Inicialmente, a ação das xilanases leva a formação de fragmentos solúveis em água, o que reflete no aumento da viscosidade, em seguida a viscosidade diminui por causa dos oligômeros menores, xilobiase e xilose, que são liberados pela hidrólise posteriormente. A maciez do pão é um efeito indireto da quebra de arabinoxilanas devido à liberação de água (Polizeli *et al.*, 2005; Romanowska, Polak e Bielecki, 2006; Butt *et al.*, 2008).

2.2.5 Alimentação animal

Os aditivos enzimáticos adicionados nas rações para alimentação animal não possuem função nutricional direta, mas auxiliam o processo digestivo melhorando a digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta. Esses aditivos têm sido incorporados aos alimentos dos animais com o propósito de melhorar o desempenho e rentabilidade das rações, que está relacionado com o valor nutritivo dos ingredientes disponíveis (Bedford *et al.*, 1997; Dillon *et al.*, 2015).

As enzimas usadas nas rações animais podem ser divididas em dois tipos, aquelas destinadas a complementar quantitativamente as próprias enzimas

digestórias endógenas dos animais (proteases, amilases, fitases) e aquelas que os animais não podem sintetizar ou sintetizam em pequena quantidade (β -glucanases, xilanases, α -galactosidades) (Campestrini, Silva e Appelt, 2005).

A adição das enzimas exógenas nas dietas dos animais visa diminuir a viscosidade dos componentes nutricionais das rações, como os polissacarídeos não-solúveis; facilitar a disponibilidade de nutrientes pouco acessíveis, como a aleurona em cereais; e diminuir a poluição ambiental pela excreção fecal de nitrogênio e fósforo. A adição de enzimas diminui a capacidade dos animais utilizarem esses nutrientes (Bedford *et al.*, 1997; Campestrini, Silva e Appelt, 2005; Polizeli *et al.*, 2005).

As xilanases, celulasas e glucanases são as principais enzimas para degradação de polissacarídeos não amiláceos (PNA), que não são sintetizados pelos não-ruminantes. As aves são capazes de produzir algumas enzimas digestivas para degradação do amido e proteínas, porém, elas não produzem as enzimas necessárias para degradação da fibra. A fibra dificulta a digestão, impedindo que as enzimas digestivas endógenas atinjam o substrato alvo dos alimentos (Campestrini, Silva e Appelt, 2005).

As xilanases hidrolisam a arabinoxilana, que representa 50 – 80% dos PNA presentes nos cereais reduzindo a viscosidade da matéria-prima. Como resultado, os animais têm uma melhor digestão dos nutrientes e uso da energia (Polizeli *et al.*, 2005; Dhiman, Sharma e Battan, 2008; Dillon *et al.*, 2015).

2.3 RESÍDUO LIGNOCELULÓSICO – CASCA DE SOJA

Os resíduos orgânicos provindos da agricultura são fontes ricas de celulose, hemicelulose e lignina na proporção de 4:3:3, mas as porcentagens exatas desses componentes variam de acordo com a fonte (Heck, Hertz e Ayub, 2002).

Os materiais lignocelulósicos estão largamente disponíveis na natureza e são recursos renováveis, justificando a importância e interesse em estudos para o uso desses materiais em diversas indústrias (Seyis e Aksoz, 2005).

A economia brasileira é uma das que mais são baseadas em importação agrícola no mundo, produzindo café, cana-de-açúcar, soja, mandioca, frutas, entre outros. O resultado dessa alta produção é a geração de grandes quantidades de resíduos que causam graves problemas ambientais (Soccol e Vandenberghe, 2003).

Considerando a cultura da soja (*Glycine max*), o Brasil é o segundo maior produtor do mundo com produtividade média de 3.011 kg/ha. A cultura alcançou na safra de 2014/2015 a produção de 95,070 milhões de toneladas do grão (Embrapa, 2016). O processamento industrial das sementes, para obter a proteína isolada, gera uma grande quantidade de resíduos fibrosos, dentre eles a casca do grão da soja. Esse material é composto principalmente de celulose (51,9%), hemicelulose (10,4%) e lignina (9,4%) (Siqueira *et al.*, 2010).

Estudos estimam que aproximadamente 20 milhões de toneladas/ano de casca de soja têm sido produzidos mundialmente (Salihu, Bala e Olagunju, 2015). Parte do resíduo é vendido sem alterações, ou são compactados e utilizados para complementar à alimentação animal e o restante é descartado no meio-ambiente (Mielenz, Bardsley e Wyman, 2009). Apesar de o resíduo ter pouco valor econômico agregado é uma rica fonte nutricional para microrganismos (Hayashi *et al.*, 1992).

Há alguns anos, muitos estudos vem sendo realizados para uma utilização eficiente e que gerem valor aos resíduos agroindustriais, como, polpa e casca de café, casca de mandioca, mandioca, bagaço de cana, polpa de beterraba, bagaço de maçã, etc. A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos é uma alternativa para substratos, bem como para ajudar a solucionar problemas de

poluição. Os processos biotecnológicos têm contribuído fortemente para a utilização desses resíduos (Soccol e Vandenberghe, 2003; Salihu, Bala e Olagunju, 2015).

2.3.1 Celulose

A celulose, maior fonte renovável de carbono disponível (aproximadamente 150 bilhões de toneladas de material orgânico é foto sintetizado anualmente), é frequentemente encontrada em associação com outros componentes, como hemicelulose, lignina e outros polissacarídeos, o que dificulta o processo de bioconversão (Heck, Hertz e Ayub, 2002).

A celulose é um polímero linear (parte amorfo e parte cristalino) formado exclusivamente por moléculas de anidro-glicose unidas por ligações 1,4- β -D-glicosídicas. Estritamente a celulose é composta por unidades de celobiose que se repetem sempre apresentando o oxigênio que liga os anéis glicosídicos na posição equatorial (Figura 4) (Esposito e Azevedo, 2010).

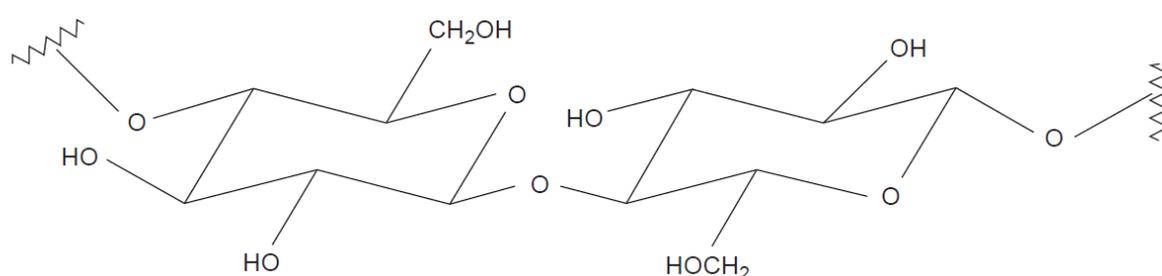


Figura 4 - Estrutura de um fragmento da cadeia de celulose.

Fonte: O'sullivan, 1997, p.175.

Na parede celular de plantas, a celulose é organizada em microfibrilas. A microfibrila é formada pela junção de várias fibrilas, que contém aproximadamente de 30 a 36 cadeias de celulose. O tamanho das fibrilas é desconhecido, mas já foi relatado glicanas contendo 14000 unidades de glicose, correspondendo a uma fibrila de 7 μ m (Somerville *et al.*, 2004; Horn *et al.*, 2012).

As microfibrilas são formadas através de ligações de hidrogênio e interações de van der Waals formadas durante o acoplamento lateral das cadeias de glicano resultando em uma estrutura cristalina contínua, estável e insolúvel (Somerville *et al.*, 2004; Horn *et al.*, 2012). Entretanto, em algumas porções dessa estrutura as cadeias de glicose estão mais fracamente associadas, apresentando fibras menos compactas. Essas regiões caracterizam a porção amorfa do polímero, e apresentam uma maior reatividade quando comparada com a estrutura cristalina (Lynd *et al.*, 2002). A Figura 5 mostra as regiões cristalina e amorfa presentes na microfibrila.

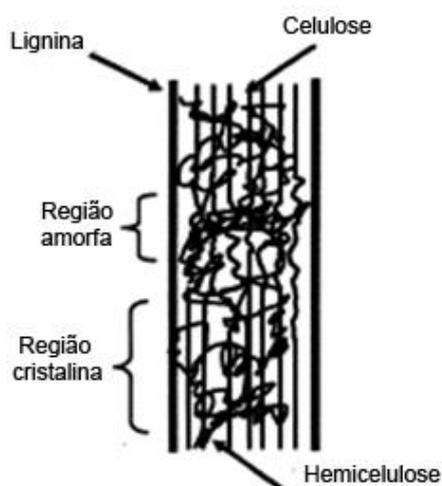


Figura 5 – Estrutura esquemática representando as regiões cristalina e amorfa da celulose.

Fonte: Mosier *et al.*, 2005, p. 674 (adaptado).

2.3.2 Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo constituinte mais abundante em plantas disponível na natureza. É um polímero que fica armazenado nas sementes, assumindo função estrutural na parede celular. Os resíduos agroindustriais contêm em geral 40% de hemicelulose formada por pentoses. Os monômeros de diferentes hemiceluloses são úteis para a produção de diferentes antibióticos, álcoois, ração animal, reagentes químicos e combustíveis (Heck, Hertz e Ayub, 2002).

As hemiceluloses (ou polioses) são compostas pelos açúcares de D-glicose, D-manose e D-galactose (hexoses) e D-xilose e L-arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses. Esses açúcares apresentam-se na forma de polímeros ramificados, de menor massa molecular que a celulose e podem ser homopolímeros (por exemplo: xilana formada por xilose) ou heteropolímeros (exemplo: glicomanana, formada por glicose e manose) (Esposito e Azevedo, 2010).

A Figura 6 mostra as diversas unidades de açúcares que podem se unir por ligações glicosídicas β -1,4 e, ocasionalmente, β -1,3 formando a hemicelulose. A classificação das hemiceluloses é dada pelo principal resíduo de açúcar presente na sua estrutura polimérica (Morais, Nascimento e Melo, 2005; Esposito e Azevedo, 2010).

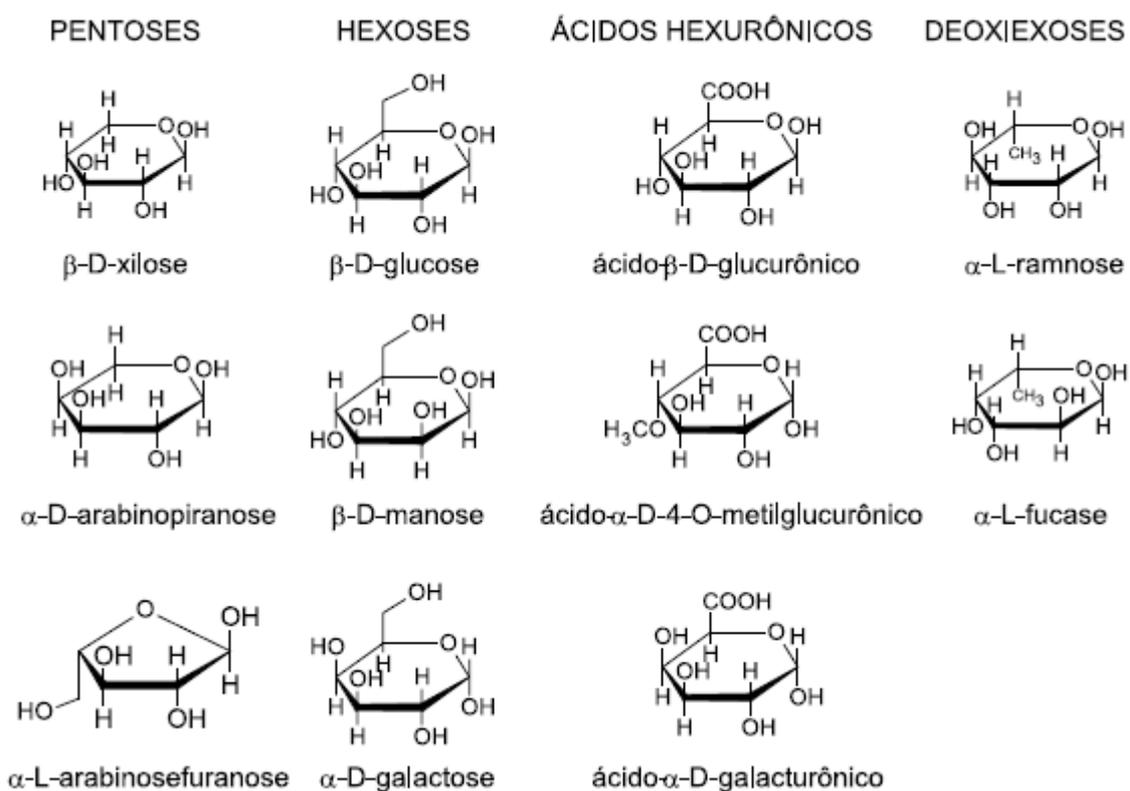


Figura 6 – Açúcares que compõem as unidades de hemicelulose.

Fonte: Moraes, Nascimento e Melo, 2005, p. 463.

2.3.2.1 Xilana

A xilana é o polissacarídeo mais abundante da fração hemicelulósica, representando aproximadamente 35% do peso seco total de monocotiledôneas, sendo que para dicotiledôneas a quantidade de xilana é mínima (Silva *et al.*, 1999; Seyis e Aksoz, 2005). A estrutura molecular básica da xilana é uma cadeia linear ligada por resíduos de β -1,4-D-xilopirranose, que dependendo da origem ou método de extração podem apresentar diferentes ramificações contendo principalmente resíduos acetil, arabinosil e glucuronosil (Silva *et al.*, 1999; Glass *et al.*, 2013).

Baseado nos substituintes comumente encontrados na sua cadeia principal, as xilanas são classificadas como homoxilana, arabinoxilana, glucuronoxilana e glucuronoarabinoxilana (Kulkarni, Shendye e Rao, 1999). A cadeia principal básica e os possíveis grupos substituintes estão apresentados na Figura 7.

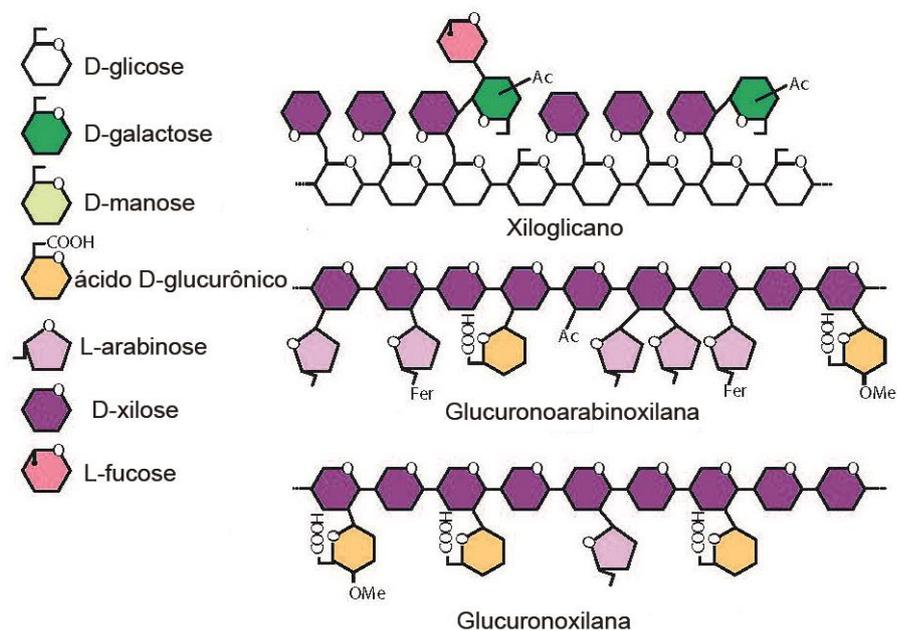


Figura 7 – Ilustração da estrutura química da xilana com os possíveis substituintes. “Fer” representa a esterificação com o ácido ferúlico.

Fonte: Scheller e Ulvskov, 2010, p. 267 (adaptado).

As xilanas originadas de vegetais folhosos (“hardwood”), O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana, consiste de pelo menos 70 resíduos de β -xilopiranosose conectados por ligações β -1,4-glicosídicas. Essa cadeia de xilana é altamente acetilada (a xilana birchwood contém mais de 1 mol de ácido acético por 2 mol de xilose). A presença de grupos acetil é responsável pela solubilidade parcial da xilana em água (Sunna e Antranikian, 1997). Os grupos O-acetil presentes nas posições C-2 e C-3 dos resíduos xilosil diminuem a atividade das xilanases, impedindo a degradação completa de acetilxilana, provavelmente por impedimento estérico. A ação sinérgica de acetilxilana esterases e xilanases é essencial para a hidrólise completa desse tipo de xilana. Estudos também relatam a presença de pequenas quantidades dos ácidos feruloil e p-coumaroil ligados aos resíduos de L-arabinose na posição C-5. E a presença de ligações covalentes entre a lignina e hemicelulose, provavelmente através dos substituintes da xilana. As cadeias laterais determinam a solubilidade, conformação física e reatividade da xilana com outros componentes hemicelulósicos, o que vai determinar o modo e extensão da clivagem enzimática (Kulkarni, Shendye e Rao, 1999).

As xilanas de coníferos (“softwood”) são compostas por arabino-4-O-metilglucuronoxilanas. Apresentam alta quantidade de ácido 4-O-metilglucurônico na posição C-2 e não são acetiladas. Ao invés dos grupos acetil, apresentam unidades de α -L-arabinofuronose na posição C-3 da xilose conectados por ligações α -1,3-glicosídicas. As xilanas “softwood” têm cadeias menores que as xilanas “hardwood” e também são menos ramificadas (Sunna e Antranikian, 1997).

2.3.2.2 *Enzimas envolvidas na degradação da xilana*

A completa clivagem da complexa estrutura de xilana requer a ação combinada de β -xilanases (EC 3.2.1.8) e β -xilosidases (EC 3.2.1.37) com enzimas de desramificação como α -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), acetil xilana esterase (EC 3.1.1.6) e α -glucuronidase (EC 3.2.1) devido à complexidade e heterogeneidade desse substrato (Silva *et al.*, 1999; Collins, Gerday e Feller, 2005). Existe um grande interesse na hidrólise enzimática da xilana devido suas possíveis aplicações como, no auxílio da digestão de animais ruminantes, tratamentos de resíduos,

combustíveis e produtos químicos e fabricação de papel (Silva *et al.*, 1999; Heck, Hertz e Ayub, 2002).

O esquema geral de clivagem da xilana está mostrado na Figura 8.

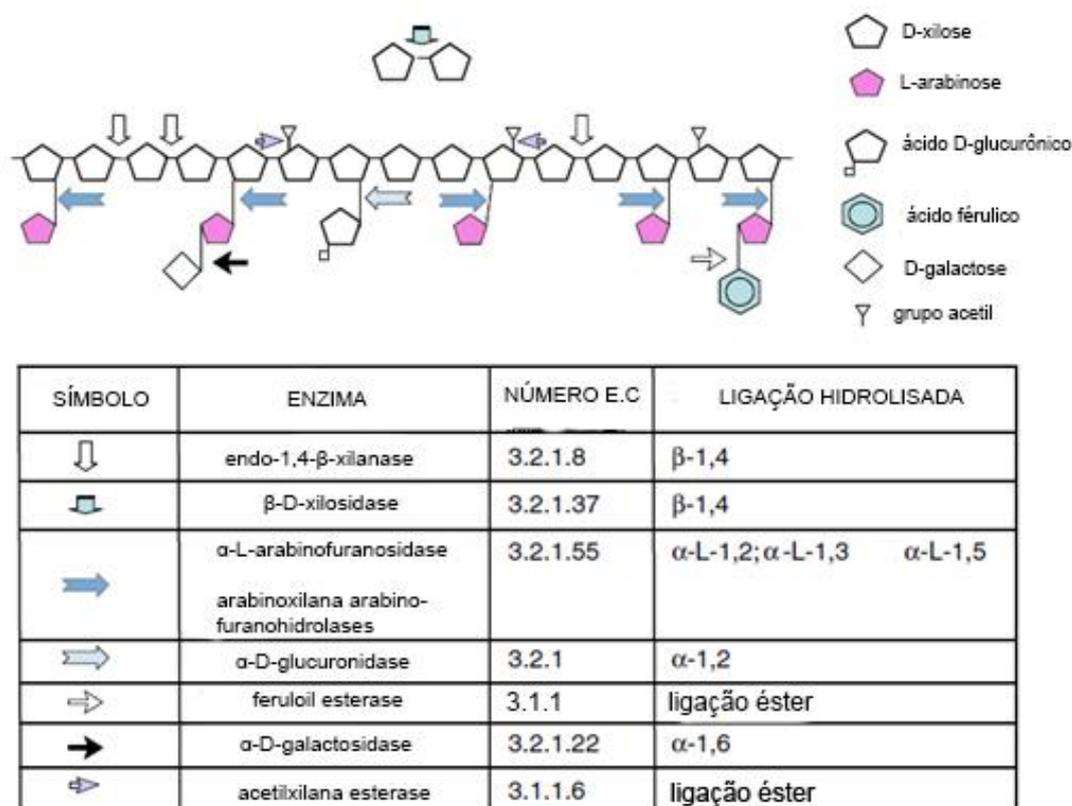


Figura 8 – Estrutura da xilana e locais de ataque de enzimas xilanolíticas.

Fonte: Aro, Pakula e Penttilä, 2005, p. 722 (adaptado).

As β-1,4-endoxilanasases (EC 3.2.1.8) clivam as ligações glicosídicas internas da cadeia principal da heteroxilana, resultando em uma diminuição do grau de polimerização do substrato. Os primeiros produtos formados, durante a hidrólise da xilana, são os xilooligossacarídeos. Com o decorrer da hidrólise, esses oligossacarídeos vão sendo hidrolisados e forma-se xilotriose, xilobiase e xilose (Sunna e Antranikian, 1997; Collins, Gerday e Feller, 2005).

As β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37) são exoglicosidases que hidrolisam pequenos xilooligossacarídeos e xilobiose. A afinidade da enzima para xilooligossacarídeos é inversamente proporcional ao seu grau de polimerização. Após a xilana ser hidrolisada inúmeras vezes por xilanases, as β -D-xilosidases são importantes por hidrolisar os pequenos oligômeros que podem causar a inibição das xilanases, como o β -D-xilopiranosil (Sunna e Antranikian, 1997; Harris e Ramalingam, 2010).

As arabinases podem ser divididas em dois tipos, de ação exo, as α -L-arabinofuronidases (EC 3.2.1.55) e de ação endo, as endo-1,5- α -L-arabinase (EC 3.2.1.99). As primeiras são ativas em p-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeos e nas ramificações arabinanas. Enquanto as arabinases de ação endo são ativas somente nas cadeias lineares de arabinanas. Em geral, durante a liberação de arabinose, a cadeia da xilana não é degradada e não se observa a produção de xilooligossacarídeos. Estudos relatam o sinergismo de xilanases e arabinases durante a hidrólise da xilana, aumentando a produção de xilose, xilobiose e arabinose (Sunna e Antranikian, 1997).

As α -glucuronidases (3.2.1.131) hidrolisam as ligações α -1,2 entre os resíduos do ácido glucurônico e unidades de β -D-xilopiranosil, encontrados na glucuroxilana. A presença de grupos acetil próximo aos substituintes glucuronosil, inibem a ação das glucuronidases e elas somente são ativas em xilooligômeros com grau de polimerização maior que 2 (Sunna e Antranikian, 1997; Harris e Ramalingam, 2010).

As acetilxilana esterases (EC 3.1.1.6) removem os substituintes O-acetil das posições C-2 e C-3 dos resíduos de xilose na acetilxilana. Essas enzimas diminuem a inibição de xilanases por liberarem ácido acético da xilana, formando novos sítios não substituídos na cadeia do polissacarídeo, aumentando a suscetibilidade da xilana para a ação de xilanases (Sunna e Antranikian, 1997).

Os ácidos ferúlico e p-cumárico são ligados na xilana por ligações éster. As esterases de ácido ferúlico (EC 3.1.1.-) clivam as ligações éster entre a cadeia lateral de arabinose e ácido ferúlico na xilana. Semelhantemente, as esterases de ácido p-cumárico (EC 3.1.1.-) clivam a ligação éster entre a arabinose e ácido p-cumárico (Sunna e Antranikian, 1997; Polizeli *et al.*, 2005).

A presença dos sistemas xilanolíticos completos contendo todas essas atividades já foram relatados em fungos, actinomicetos e bactérias. Os nichos ecológicos desses microrganismos são tipicamente ambientes com acúmulo de material de plantas (Collins, Gerday e Feller, 2005).

2.3.3 Lignina

O terceiro maior constituinte da casca do grão da soja é a lignina. Esse complexo confere rigidez e impermeabilidade à membrana. Ao mesmo tempo, que essas características protegem a parede celular da degradação microbiana são uma limitação no processo de conversão da biomassa (Ralph *et al.*, 2004; Vanholme *et al.*, 2010).

A lignina é composta basicamente de unidades de fenilpropano formando uma macromolécula tridimensional e amorfa. O acoplamento das unidades de fenilpropano não ocorre de forma regular e repetitiva. Estes diferentes acoplamentos dão origem a vários tipos de ligação entre as unidades fenilpropano, sendo que as mais abundantes são: β -O-4 e α -O-4 (50-65%), β -5 (6-15%), β -1 (9-15%), 5-5 (2-9%) e β - β (2-5%) (Esposito e Azevedo, 2010).

A terminologia empregada na química da lignina é baseada numa estrutura básica de fenilpropano. Nessa terminologia considera-se, como carbono 1 do anel aromático aquele que está ligado à cadeia propânica. Os carbonos dessa cadeia lateral são, então, denominados respectivamente, de α , β e γ , partindo do carbono ligado ao anel aromático (Brasileiro, Colodette e Piló-Veloso, 2001; Esposito e Azevedo, 2010).

Uma estrutura modelo para a lignina é mostrado na Figura 9.

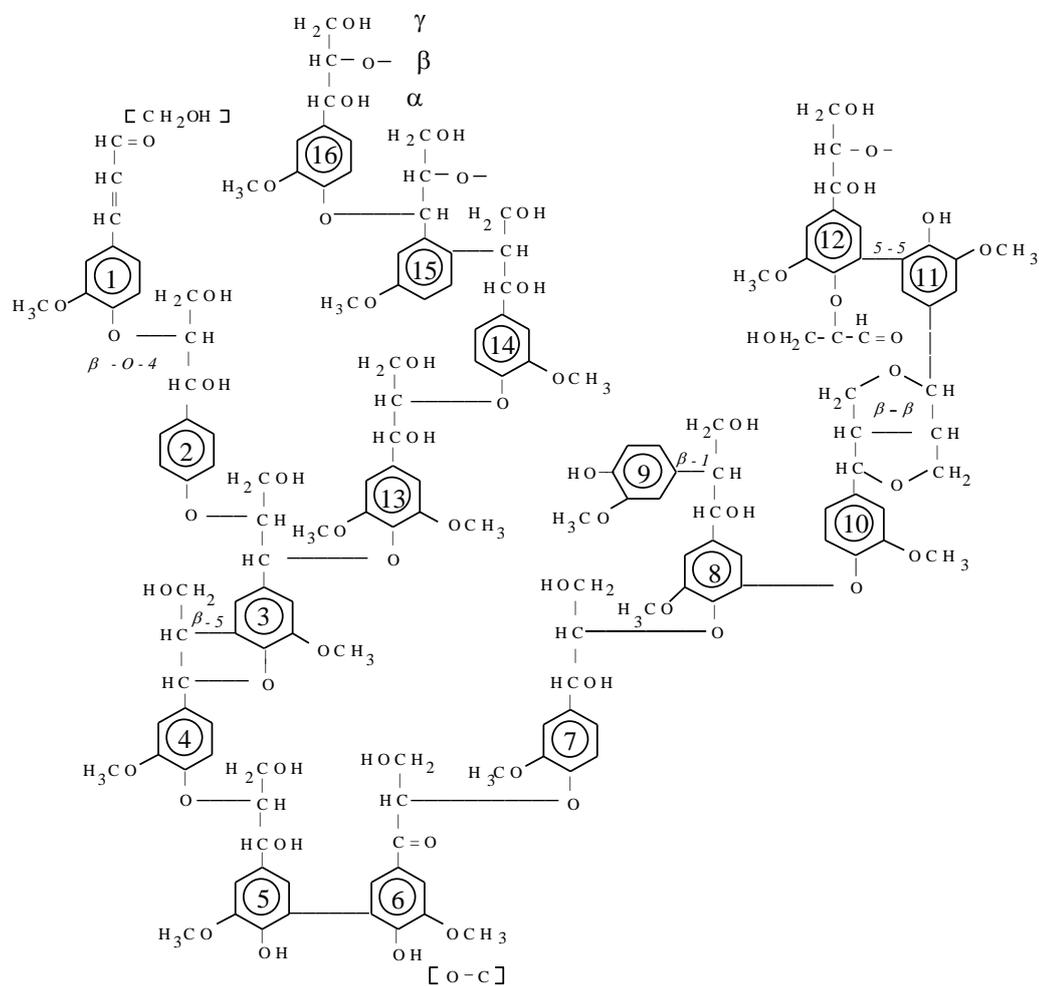


Figura 9 – Estrutura proposta para a macromolécula de lignina de *Eucalyptus grandis* por Nimz, H. 1974.

Fonte: Magalhães, 2005, p. 18.

2.4 FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos são seres eucarióticos altamente eficientes na degradação de uma ampla gama de substratos e constituem um grupo muito grande e heterogêneo encontrado em qualquer nicho ecológico. Estes microrganismos são responsáveis pela produção de importantes ácidos orgânicos, pela produção de fármacos, pelo controle biológico de insetos-pragas da agricultura, pelo controle de inúmeras moléstias que atacam plantas cultivadas, pela produção de etanol e pela produção de enzimas de interesse industrial e de elevado valor econômico, destacando-se as celulases, lacases, xilanases, pectinases e amilases (Esposito e Azevedo, 2010).

Os fungos são capazes de utilizar uma infinidade de substratos para sua nutrição, o que permite sua ubiquidade. Estes microrganismos são hábeis em degradar o material lignocelulósico do resíduo agrícola. Inicialmente, os fungos secretam enzimas extracelulares ao meio que podem degradar as macromoléculas em moléculas pequenas que serão incorporadas e utilizadas nutricionalmente (Kumar, Singh e Singh, 2008).

Os fungos filamentosos, pertencente ao filo *Ascomycota*, são os microrganismos que melhor se adaptam a uma gama de substratos pelo fato de secretarem enzimas extracelulares e por sua forma de crescimento filamentoso. As células alargadas de crescimento apical favorecem a penetração dos fungos filamentosos nos resíduos, facilitando sua utilização como fonte de carbono para produção de enzimas (Suryanarayanan *et al.*, 2009; Esposito e Azevedo, 2010; Moreira *et al.*, 2012).

Os fungos filamentosos apresentam, ainda, uma grande capacidade adaptativa, colonizando diferentes ambientes, com variações de temperatura, umidade, pH, nutrientes, pressão, entre outros (Gomes *et al.*, 2007; Langarica-Fuentes *et al.*, 2014). Além dos fatores de pressão seletiva, as variações filogenéticas (composição de aminoácidos, mecanismos de manutenção e estabilização da estrutura, etc.) também devem ser consideradas para explicar a produção de diferentes enzimas por fungos de uma mesma espécie (Gomes *et al.*, 2007). Em casos de fungos isolados do solo, sabe-se que o tipo do solo também influencia a estrutura das comunidades microbianas, em função do tamanho de

partículas, pH, capacidade de intercâmbio de íons e o conteúdo de matéria orgânica. Uma ampla faixa de fatores controla a estrutura e diversidade das comunidades microbianas no solo, como exemplo, raízes das plantas. As raízes das plantas liberam uma variedade de compostos no entorno, incluindo etileno, carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, polissacarídeos e enzimas, os quais são fatores que vão controlar a estrutura e diversidade de organismos no solo (Garbeva, Van Veen e Van Elsas, 2004).

Fungos do gênero *Aspergillus* têm sido escolhidos para processo de larga escala por serem capazes de produzirem grandes variedades e quantidades de enzimas em meios de baixo custo (Bergquist *et al.*, 2002).

No trabalho de Moreira *et al.* (2012) foram testados diferentes espécies de fungos isolados do solo, incluindo *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*, na degradação de resíduos lignocelulósicos objetivando a produção de enzimas de interesse industrial (Moreira *et al.*, 2012).

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são representados por 838 epítetos (Hu *et al.*, 2011). Dentre estes, *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* são os mais usados industrialmente, principalmente, na indústria farmacêutica e alimentícia para produção de enzimas e ácidos orgânicos, uma vez que fazem parte da seção taxonômica “*Aspergillus Section Nigr*”, que é considerada GRAS (*generally regarded as safe*). O “*Aspergilli black*” é um importante grupo de espécies na biotecnologia. Muitas espécies causam deterioração de alimentos, mas por outro lado, também são usadas na indústria para produzir enzimas hidrolíticas. Eles também são candidatos para manipulação genética nas indústrias de biotecnologia (Taskin e Stratilová, 2008; Hu *et al.*, 2011).

Neste contexto, o *Aspergillus foetidus* pela similaridade que tem a fungos pertencentes aos fungos pertencentes a “*Aspergillus Section Nigr*” está sendo estudado no que tange sua potencial aplicação biotecnológica (Ferracin *et al.*, 2009; Varga *et al.*, 2011). A partir de observações morfológicas, as estirpes tem coloração que varia de marrom escuro a preto, o que é um indicativo de pertencerem a “*Aspergillus Section Nigr*” (Krisana *et al.*, 2005). Além disso, o *Aspergillus foetidus* também foi o fungo escolhido para o trabalho como resultado de estudos anteriores

do grupo de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais em que o *Aspergillus foetidus* foi um bom produtor de xilanases.

2.5 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XILANASES

A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células microbianas ou animais constitui uma etapa complexa do processo, dadas as variadas características dos meios e das biomoléculas de interesse. Em resultado a essa variedade de características, as etapas de purificação são tão ou mais desafiantes que o estudo e o desenvolvimento da etapa de cultivo, pois não há processo de purificação de aplicação geral (Pessoa e Kilikian, 2005).

Vários processos industriais podem ser realizados utilizando células inteiras como fonte de enzimas, mas a eficiência do processo pode ser melhorada usando enzimas purificadas. O critério de seleção e método de purificação depende do uso final. Um alto grau de pureza geralmente não é necessário em alimentos processados, detergentes e na indústria de papel e celulose (Chidi *et al.*, 2008).

Nos estudos, dos últimos cinco anos, de purificação de xilanases obtidas de diferentes cepas de *Aspergillus* sp. encontram-se a aplicação de diversas técnicas de purificação de baixa e alta resolução. As principais técnicas utilizadas nestes trabalhos são ultrafiltração, precipitação com sais, principalmente sulfato de amônio e cromatografia utilizando colunas de gel filtração e de troca iônica.

A ultrafiltração, técnica utilizada neste trabalho, é uma estratégia de purificação de baixa resolução, que é capaz de reter macromoléculas em solução, e sendo, no entanto, permeável a todos os solutos de baixa massa molar. O tamanho do poro define, em princípio, a capacidade seletiva da membrana. Esta técnica vem sendo amplamente utilizada na biotecnologia, em particular, em *downstream*, tanto na purificação quanto na concentração de enzimas e proteínas (Pessoa e Kilikian, 2005).

No trabalho de He *et al.* (2015), foi purificada uma xilanase obtida de *Aspergillus oryzae* com peso molecular de 33,67 kDa utilizando as técnicas de

ultrafiltração e gel filtração. Moreira et al. (2013), também purificou xilanases (24,30 e 23,60 kDa) de *Aspergillus terreus* com estas mesmas técnicas (Moreira et al., 2013; He et al., 2015). Por outro lado, no trabalho de Mellon et al. (2011) para purificação de uma xilanase de *Aspergillus flavus* de 14 kDa foi utilizado somente a técnica de gel filtração (Mellon et al., 2011).

Na literatura encontram-se diversos estudos que utilizam além das técnicas cromatográficas, a precipitação com sais para purificação de xilanase. Como exemplos, Chutani e Sharma (2015) semi-purificaram uma xilanase obtida de *Aspergillus oryzae* por meio desta técnica (Chutani e Sharma, 2015). Yang et al. (2015), no entanto, purificaram uma xilanase de 21 kDa obtida de *Aspergillus fumigatus* utilizando as técnicas de precipitação com sulfato de amônio e cromatografias de troca iônica e de adsorção. Bhushan et al. (2015) e Wakiyama et al. (2010) também purificaram uma xilanase de 35 kDa obtida de *Aspergillus flavus* com as técnicas de precipitação com sulfato de amônio e coluna de gel filtração; e purificaram uma xilanase de 25,10 kDa obtida de *Aspergillus japonicus* utilizando técnicas de precipitação com sulfato de amônio, além das técnicas cromatográficas, respectivamente (Wakiyama et al., 2010; Bhushan et al., 2015).

Posteriormente a purificação enzimática, os estudos de caracterização de enzimas são importantes para entender seu comportamento e entender sua aplicabilidade. Para aplicabilidade na indústria, é importante conhecer a estabilidade térmica e de pH da enzima e outras propriedades como a cinética e termodinâmica da reação. Para as xilanases, em geral, os processos industriais requerem enzimas que sejam estáveis a temperaturas elevadas (Bokhari, Latif e Rajoka, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar a produção, purificar e caracterizar uma xilanase produzida por *Aspergillus foetidus* em casca de soja visando a melhor compreensão de sua importância e função biotecnológica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar a biomassa lignocelulósica do resíduo agroindustrial para o cultivo em meio líquido de *Aspergillus foetidus* e consequente produção de xilanases, visando à aplicação industrial desta enzima;
- Obter a curva de indução enzimática;
- Otimizar o cultivo de *Aspergillus foetidus* pela análise das variáveis independentes: pH, temperatura e rotação;
- Purificar uma xilanase a partir do cultivo de *Aspergillus foetidus* em casca de soja 2% como principal fonte de carbono;
- Caracterização da enzima purificada quanto suas constantes cinéticas, termodinâmicas, temperatura ótima, pH ótimo, inibição por metais e especificidade ao substrato;
- Avaliar o potencial hidrolítico da xilanase pura de *Aspergillus foetidus* sobre as frações solúvel e insolúvel da xilana de bétula;
- Avaliar a estabilidade da estrutura secundária da Xyl por alterações no pH e na temperatura da xilanase.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ORIGEM DOS REAGENTES

Os reagentes de xilana de bétula (birchwood), xilana de faia (beechwood), xilana de aveia (oatspelt), carboximetil-celulose (CM-celulose), pectina e manana foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Os xilooligossacarídeos contendo de uma a seis unidades de D-xilose foram adquiridos da Megazyme Corporation (Wicklow, Ireland). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 RESÍDUO AGROINDUSTRIAL

4.2.1 Origem do resíduo lignocelulósico

A casca do grão da soja é proveniente da Fazenda Três Pinheiros, Planaltina – DF, gentilmente cedida pelo pesquisador Dr. Félix Gonçalves de Siqueira, Embrapa Agroenergia.

4.2.2 Pré-tratamento

O resíduo de soja foi autoclavado a 121°C por 2 horas, com posterior lavagem em água corrente. Após lavagem, o material foi seco a 65°C por 72 horas em estufa, sendo então triturado em moinho de facas (30 mesh) para obtenção de partículas homogêneas (Siqueira *et al.*, 2010).

4.3 MANUTENÇÃO E CULTIVO DO MICRORGANISMO

O fungo *Aspergillus foetidus* foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho da coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília. Fiel Depositário: Coleção de Microrganismos para Controle de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos Biotecnologia, credenciada pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético por meio da Deliberação do CGEN nº 67 publicada no D.O.U. em 13/09/2004, Seção 1, página 53, vinculada ao projeto intitulado – Aplicação de Holocelulases de Fungos Filamentosos em Processos Biotecnológicos, coordenado pelo pesquisador Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, Processo nº 010237/2015-1, Universidade de Brasília.

O isolado foi mantido em meio sólido batata-dextrose-ágar (BDA) contendo (p/v) caldo de batata 0,2%, dextrose 1,0% e ágar 2,0%, com repiques realizados periodicamente. Além disso, encontra-se mantido em criotubos, contendo glicerol 50% (v/v), para conservação em ultrafreezer a -80°C.

O cultivo em meio líquido de *Aspergillus foetidus* foi realizado em frascos do tipo erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio líquido suplementado (m/v) (peptona 0,40%, extrato de levedura 0,40%, KH_2PO_4 0,20%, NaH_2PO_4 0,80%, MgSO_4 0,25%); pH 7 e da fonte de carbono: casca de soja 2% (m/v). Os meios foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

O inóculo foi obtido por meio da raspagem dos esporos da placa de Petri. O material obtido da raspagem foi disperso em solução salina 0,9%, autoclavada. A contagem de esporos da suspensão foi realizada em câmara de Newbauer com auxílio de microscópio óptico.

Para a produção enzimática, alíquotas de suspensão de esporos (1×10^7 esporos/mL) foram inoculadas nos erlenmeyers, na proporção de 1 mL de solução de esporos para cada 50 mL de meio de cultura. O cultivo em meio líquido foi realizado a 28°C e agitação constante de 120 rotações por minuto (rpm) por 7 dias.

Após o cultivo, o meio foi filtrado em funil do tipo Büchner com papel de filtro (Whatman nº1) e armazenado a 4°C, com adição de azida sódica 0,1%. O filtrado, a

partir de agora denominado extrato bruto (EB), foi usado como fonte de xilanases. Para os ensaios da curva de indução enzimática, os cultivos foram incubados por 20 dias com alíquotas retiradas diariamente.

4.4 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford. A reação foi iniciada pela adição de 100 μL de amostra a 1000 μL do reagente de Bradford. Após 5 minutos, a leitura foi realizada a 595 nm. Como padrão utilizou-se albumina de soro bovino (0 – 0,3 mg/mL) (Bradford, 1976).

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.5.1 Atividade de xilanase, CM-celulase e mananase

Para determinação das atividades de xilanase, CM-celulase, e mananase foram incubados 100 μL de substrato (xilana 1%, carboximetil celulose (CMC) 1%, manana 0,5%, respectivamente) e 50 μL da amostra enzimática a 50°C durante 30 minutos (Ferreira, Puls e Coughlan, 1993). Transcorrido o tempo de reação, 300 μL de ácido dinitrosalicílico (DNS) foram adicionados. As soluções com o reagente foram incubadas a 100°C durante 10 minutos (Miller, 1959). Ao final, 1,5 mL de água destilada foram adicionados e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm (Shimadizu). A xilose reduz o DNS formando o produto colorimétrico, que é quantificado a 540 nm. As atividades enzimáticas foram expressas como 1 μmol de açúcar redutor formado por minuto (Unidade Internacional – U) por 1 mL de enzima ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As curvas padrão foram determinadas com soluções de D-xilose, D-glicose e D-manose no intervalo de concentração de 0,01 – 2,0 mg/mL.

4.5.2 Atividade de celulase total

No ensaio para detecção de celulase total (FPase), um pedaço de papel filtro (Whatman n°1) de dimensões 1,0 x 6,0 cm foi incubado por 60 minutos a 50°C com 150 µL de amostra enzimática (Ghose, 1987). Sua atividade foi determinada pelo método DNS (Miller, 1959). A curva padrão foi determinada com solução de glicose no intervalo de concentração de 0,01 – 2,0 mg/mL.

4.5.3 Atividade em substratos sintéticos

Para os experimentos envolvendo p-nitrofenil glicosídeos, as atividades de β-xilosidase, β-glicosidase, β-manosidase e α-arabinofuranosidase foram determinadas com os substratos p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (pNPX), p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (pNPG), p-nitrofenil-β-D-manopiranosídeo (pNPM) e p-nitrofenil-α-D-arabinopiranosídeo (pNPA), respectivamente. A amostra enzimática (100 µL) foi misturada ao substrato (50 µL) e 850 µL de água destilada. A mistura foi incubada por 10 minutos a 50°C e a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de solução de Na₂CO₃ 1,0 M. O produto (pNP) liberado foi quantificado pela leitura da absorbância a 410 nm (Ximenes, Silveira e Ferreira, 1996). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1,0 µmol/L de pNP/minuto/mL.

4.6 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE ATIVIDADE QUANTO AO PH, TEMPERATURA E AGITAÇÃO EM SHAKER POR ANÁLISE DE SUPERFÍCIE RESPOSTA

Para analisar a produção de xilanases por *Aspergillus foetidus* em meio líquido, empregando a casca de soja 2% como fonte de carbono, dois planejamentos fatoriais foram empregados (FD1 e FD2) em relação às variáveis independentes: agitação (X₁), temperatura de incubação (X₂) e pH inicial do meio (X₃). Para ambos, foi empregado um planejamento fatorial 2³ com 3 pontos centrais e pontos axiais

(Tabela 1). A análise de variância (ANOVA) foi realizada pela resposta, atividade xilanólítica (Y).

O programa Design-Expert[®], versão 9.0.6.2 foi utilizado para análise de superfície resposta (MSR) dos dados. Somente os fatores com significância maior ou igual a 5% ($p < 0,05$) foram considerados.

Tabela 1 - Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial para a produção de xilanases FD1 e FD2.

Variáveis independentes	Símbolo	Níveis				
Xilanase FD1		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Agitação (rpm)	X _{1a}	86	100	120	140	154
Temperatura (°C)	X _{2a}	18	22	28	34	38
pH	X _{3a}	3,6	5	7	9	10,3
Xilanase FD2						
Agitação (rpm)	X _{1b}	60	84	120	156	180
Temperatura (°C)	X _{2b}	10	17	28	39	46
pH	X _{3b}	3,6	5	7	9	10,3

Primeiro, foi aplicado um planejamento fatorial 2^3 com pontos centrais e axiais para identificar as melhores condições de cultivo, avaliando a significância das variáveis agitação, X_{1a} (86 - 154 rpm), temperatura de incubação, X_{2a} (18 - 38°C) e pH inicial do meio, X_{3a} (3,6 - 10,3). Em seguida, um novo desenho experimental foi feito para otimizar as condições do primeiro planejamento. As variáveis independentes e os níveis foram rotação, X_{1b} (60 - 180 rpm), temperatura de incubação, X_{2b} (10 - 46°C) e pH inicial do meio, X_{3b} (3,6-10,3). Neste estudo, os níveis altos e baixos foram chamados de +1 e -1, respectivamente, e o ponto central foi chamado de 0.

Para cada planejamento fatorial, 17 ensaios foram realizados.

4.7 PURIFICAÇÃO DA XILANASE

Todos os passos foram realizados em câmara fria (temperatura média: 10°C). O extrato bruto, cultivado em casca de soja como fonte de carbono, foi concentrado aproximadamente 10 vezes por ultrafiltração, usando o sistema Amicon (Amicon Inc., Beverly, MA, 01915, USA), com uma membrana de exclusão molecular de 100 kDa. Alíquotas do ultrafiltrado foram novamente concentradas aproximadamente 10 vezes, pelo mesmo sistema, com uma membrana de exclusão molecular de 30 kDa. A xilanase purificada a partir do ultrafiltrado foi denominada de Xyl (Figura 10).

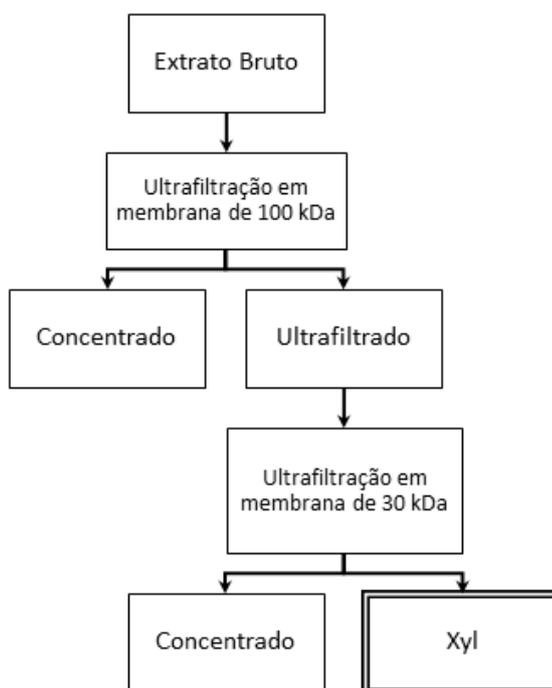


Figura 10 - Esquema de purificação da xilanase obtida do cultivo de *Aspergillus foetidus* (Xyl).

4.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE (SDS-PAGE)

As amostras foram previamente submetidas à precipitação por solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% em água, e incubadas por 30 min a 4°C. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 14000 rpm por 15 min a

4°C. Posteriormente, estas foram lavadas por três vezes, em acetona PA refrigerada, e centrifugadas conforme mencionado anteriormente. As amostras permaneceram à temperatura ambiente por 3 minutos para secagem. Após este período, as mesmas foram ressuspensas em 20 µL de água milli-Q, e, a este volume, foram adicionados 20 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 2%; azul de bromofenol 0,05%; glicerol 20% e β-mercaptoetanol 5%). Em seguida, as amostras foram fervidas por 3 minutos e aplicadas no gel de poliacrilamida 12%. A eletroforese foi realizada em sistema fechado contendo SDS 0,1% (v/v) (Laemmli, 1970). Para cada corrida, foram utilizados 5 µL de marcador de baixo peso molecular, contendo: fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa) (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1% (v/v), pH 8,3), à temperatura ambiente, submetida a 13 mA constante por 90 minutos.

4.9 COLORAÇÃO COM AZUL DE COOMASIE

As bandas protéicas presentes no SDS-PAGE foram visualizadas após a sua incubação por 12 horas à temperatura ambiente, em 0,1 g de azul de Coomassie dissolvido em solução fixadora (45 mL de metanol, 10 mL de ácido acético glacial e 45 mL de água destilada). Após o tempo de incubação na solução corante, o gel foi descorado utilizando a solução fixadora.

4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE XILANASE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Para determinação da atividade de xilanase, a amostra foi aplicada em um gel de poliacrilamida 12% com uma concentração final de xilana oat-spelt 0,1% no gel. Após a corrida de eletroforese, o gel foi incubado em uma solução de triton X-100 2,5%, por uma hora. Em seguida, foi lavado com água deionizada e incubado em

tampão MES/NaOH pH 6,0 por 4 horas a 50°C. Após a remoção deste tampão, adicionou-se uma solução de Vermelho Congo 0,1%. O gel permaneceu incubado por 20 min e após lavado com NaCl 1,0 M até a visualização da banda de xilanase (Teather e Wood, 1982).

4.11 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE XILANASE PURIFICADA

A quantificação das proteínas e os ensaios enzimáticos foram realizados conforme descrito nos itens 4.4 e 4.5, respectivamente. Os ensaios de efeito de temperatura e pH foram feitos conforme mencionado nos itens 4.11.1 e 4.11.2. O ensaio de termoestabilidade da amostra enzimática purificada foi realizado à 30°C e a 50°C. Alíquotas foram retiradas em intervalos determinados para quantificação da atividade enzimática residual da xilanase. A atividade foi expressa como atividade relativa, sendo que 100% de atividade corresponderam à atividade realizada no tempo zero de incubação. Os desvios-padrão foram calculados como percentuais da média para o ensaio correspondente.

4.11.1 Efeito da temperatura na atividade xilanolítica

Foram realizados ensaios enzimáticos de xilanase com a enzima purificada a 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90°C, nas condições previamente descritas (item 4.5.1). O resultado do ensaio de efeito de temperatura foi expresso em atividade relativa, sendo que o valor de 100% de atividade correspondeu à temperatura de maior atividade. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.11.2 Efeito do pH na atividade xilanolítica

A amostra da enzima purificada foi testada quanto à sua atividade xilanolítica a 50°C na presença de diferentes tampões, em uma faixa de pH entre 3,0 – 9,0. Os

seguintes tampões foram usados: acetato de sódio 50 mM (pH 3,0 – 6,0), fosfato de sódio 50 mM (6,0 – 7,0), tris-HCl (7,0 – 9,0). O resultado do ensaio de efeito de pH foi expresso em atividade relativa, sendo que o valor de 100% de atividade correspondeu ao pH de maior atividade. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

4.11.3 Termoestabilidade e cálculo da meia vida da xilanase

A estabilidade térmica da xilanase purificada foi avaliada a 30°C e 50°C. A amostra contendo a enzima pura foi incubada nas temperaturas acima citadas, em tampão acetato de sódio, pH 5,0 por diferentes tempos. Para o ensaio conduzido a 30°C, a atividade residual foi avaliada até 48 horas. Para o ensaio conduzido a 50°C, no entanto, a atividade residual foi avaliada até 12 horas. Após cada tempo, a amostra incubada foi retirada para realizar o ensaio enzimático conforme descrito no item 4.5.1.

Os valores de meia-vida da enzima foram calculados a partir de uma equação exponencial de decaimento, do tipo:

$$y = a \times e^{-bx} \quad (1)$$

4.11.4 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) da amostra enzimática purificada foram determinados para o substrato, xilana de bétula (*birchwood*). O ensaio enzimático foi realizado conforme descrito anteriormente (item 4.5.1), utilizando a xilana de bétula no intervalo de concentração de 0 a 60 mg/mL. A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima da reação ($V_{m\acute{a}x}$) foram determinadas pelo método de regressão não linear Enzfitter (Leatherbarrow, 1999).

4.11.5 Determinação dos parâmetros termodinâmicos

O experimentos foram realizados sob orientação da profa. Dra. Sonia Maria de Freitas.

Os parâmetros termodinâmicos da enzima purificada foram determinados para a reação enzimática com o substrato xilana de bétula (*birchwood*). Os ensaios enzimáticos foram realizados conforme descrito anteriormente (item 4.5.1), usando a xilana de bétula no intervalo de concentração de 0 a 60 mg/mL, nas temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60 e 70°C.

Os parâmetros termodinâmicos obtidos para os ensaios enzimáticos foram calculados conforme as seguintes equações:

$$K_a = 1 + K_m \quad (2)$$

$$R \times \ln K_a = - \Delta H \times (1 + T) + \Delta S \text{ (aproximação de van't Hoff)} \quad (3)$$

$$\Delta G (25^\circ\text{C}) = \Delta H - T \times \Delta S \quad (4)$$

Onde ΔG é a variação de energia livre (kJ mol^{-1}), R é a constante dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$), T é a temperatura correspondente absoluta (K), ΔH é a variação de entalpia (kJ mol^{-1}), K_a é a constante de afinidade (M^{-1}), K_m é a constante de Michaelis-Menten (M) e ΔS é a variação de entropia ($\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$).

4.11.6 Determinação da Energia de ativação

A energia de ativação foi determinada pela equação de Arrhenius conforme descrito no trabalho de Kumar et al. (2013).

$$\ln V_{\text{máx}} = \ln A - (E_a \div RT) \quad (5)$$

Onde, $V_{\text{máx}}$ é a velocidade máxima da reação (U/mL); A é a constante de Arrhenius; E_a é a energia de ativação (kJmol^{-1}); R é a constante dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) e T é a temperatura correspondente absoluta (K) (Kumar e Satyanarayana, 2013).

4.11.7 Efeito de íons metálicos, agentes modificadores de aminoácidos e aminoácidos

O efeito dos íons (Mg^{2+} , Ag^+ , Fe^{3+} , Fe^{4+} , Cu^{4+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , K^+ , Na^+ , Al^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+}) e EDTA sobre a atividade da xilanase purificada foi determinado pela pré-incubação da amostra enzimática com as soluções aquosas dos respectivos íons nas concentrações finais de 1 e de 10 mM.

O efeito dos reagentes modificadores de aminoácidos e dos aminoácidos sobre a atividade da amostra enzimática foi determinado pela pré-incubação da amostra enzimática com soluções dos reagentes, nas concentrações finais de:

- 5 mM: L-triptofano, iodoacetamida e β -mercaptoetanol;
- 20 mM: Dodecil Sulfato de Sódio (SDS).

Os controles foram feitos substituindo-se o volume dos reagentes por água.

O efeito dos íons e dos reagentes foi avaliado pela pré-incubação da amostra por 20 minutos, à temperatura ambiente, e a atividade residual de xilanase foi quantificada com descrito anteriormente (item 4.5.1). A atividade foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% de atividade correspondeu à atividade realizada no tempo zero de incubação. Os desvios-padrão foram calculados como percentuais da média para o ensaio correspondente.

4.11.8 Preparo das frações solúvel e insolúvel da xilana de bétula (birchwood)

Foi pesado 1 g de xilana e então foram adicionados 20 mL de solução NaOH 1,0 M, seguida de agitação por 30 min à temperatura ambiente, na sequência adicionou-se 20 mL de solução de HCl 1,0 M, seguida de agitação por 30 min. A este volume adicionou-se tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 para completar o volume final de 100 mL. As soluções de xilana foram agitadas por mais 30 min à temperatura ambiente, e posteriormente, centrifugadas a 8.500 g por 15 min a 4°C resultando em duas frações: uma solúvel e outra insolúvel. As duas frações foram previamente dialisadas contra água destilada, em sacos de diálise com poros de 10 kDa a 4°C, e liofilizadas (Ferreira, Puls e Coughlan, 1993).

4.11.9 Hidrólise enzimática da xilana de bétula (frações solúvel e insolúvel)

O potencial de hidrólise da xilanase purificada, cultivada em casca de soja foi determinado pela mistura de um volume de amostra enzimática e dois volumes de substrato (10 mg/mL) em tampão acetato de sódio pH 5,0. A mistura da enzima e substrato foi incubada a 30°C, com agitação de 120 rpm, nos tempos de 0, 6, 12, 18, 24, 30, 38 e 48 horas. Os controles foram feitos substituindo-se o volume de enzima ou substrato por tampão acetato de sódio e submetidos às mesmas condições de ensaio. Cada ensaio foi realizado em triplicata experimental. Alíquotas foram retiradas para realização dos ensaios descritos abaixo.

4.11.10 Dosagem de açúcares redutores totais

A quantificação de açúcares redutores totais liberados foi feita pelo método do DNS, conforme descrito no item 4.5. A quantidade de açúcares liberados foi expressa em mg/mL.

4.11.11 Dosagem de pentoses e hexoses livres pelo método do orcinol-férrico

Uma alíquota de 200 µL da mistura de hidrólise foi adicionada a 200 µL do reagente A (TCA 10% (m/v), em água destilada) e a mistura foi incubada em banho-maria a 100°C por 15 min. Em seguida, a mistura foi resfriada, à temperatura ambiente e na sequência foi adicionado 1,2 mL do reagente B (m/v) (sulfato de amônio férrico 1,15% e orcinol 0,2%, diluído em solução de HCl 9,6 M). A mistura resultante foi incubada novamente a 100°C por 20 min e então resfriada à temperatura ambiente. A solução final do ensaio foi diluída 10 vezes em água destilada e submetida às leituras nas absorvâncias de 660 nm (pentoses) e 520 nm (hexoses) (Chaplin e Kennedy, 1994).

Xilose (0,05 – 0,60 mg/mL) e manose (0,075 – 1,0 mg/mL) foram usados como padrões para as conversões de pentoses e hexoses, respectivamente. Os resultados foram expressos em mg de açúcar redutor liberado/mL.

4.11.12 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da hidrólise enzimática das frações de xilana

Os experimentos em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizados no Laboratório de Botânica da Universidade de Brasília, professor responsável Dr. Thomas Williams sob orientação da Doutora Leonora Rios de Souza Moreira e Mestre Débora Sciuto.

Alíquotas de 500 µL foram retiradas dos ensaios e congeladas a -20°C. A análise das amostras foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência de troca aniônica, acoplada a um detector de amperometria pulsada (HPAE-PAD) para a quantificação e identificação dos xilooligossacarídeos liberados durante o ensaio de hidrólise. Os xilooligossacarídeos foram analisados em sistema Dionex ICS 3000 DC *Ion Chromatography* (Termofisher) com utilização de pré-coluna CarboPac Guard e coluna CarboPac PA-100 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) a 20°C. Foram

injetados 10 μ L de amostra com o *auto sampler* AS40 (Dionex). As amostras foram eluídas em solução de hidróxido de sódio 100 mM (Dionex) e solução de acetato de sódio 500 mM (Merck, Darmstadt, Germany) com hidróxido de sódio 100 mM, com fluxo de 0,250 mL/min por 80 minutos. Os xilooligossacarídeos foram identificados e quantificados em detector eletroquímico ED40 (Dionex), sendo os dados analisados pelo programa Chromeleon 6.8 SR8 (Dionex) (Moreira, 2013).

Para a quantificação, foi utilizada uma mistura de xilooligossacarídeos contendo entre uma e seis unidades do monômero D-xilose (X1, xilose; X2, xilobiose; X3, xilotriose; X4, xilotetraose; X5, xilopentaose; X6, xilohexaose; Megazyme Corporation, Wicklow, Ireland).

4.11.13 Análise estrutural da Xyl

Os experimentos para avaliação estrutural da Xyl foram realizados no Laboratório de Biofísica Molecular, UnB sob orientação da Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas e Dra. Amanda Araújo Souza.

A análise estrutural da Xyl foi realizada com a proteína purificada, conforme descrito no item 4.7. O perfil de eluição das proteínas foi acompanhado por medidas das absorvâncias das frações em espectrofotômetro a 280 nm, com concomitante eliminação do corante, oriundo do meio de cultura, por cromatografia de exclusão molecular. A amostra foi eluída por gravidade em coluna PD-10 (13 mL) empacotada com a resina Sephadex G-50 (GE Healthcare Life Sciences) e equilibrada com água MilliQ, sendo coletadas frações de 1 mL por tubo.

- Dessalinização da amostra e concentração

A presença da proteína Xyl foi confirmada por ensaio de atividade de xilanase e dosagem de proteínas conforme descrito nos itens 4.5.1 e 4.4, respectivamente. A amostra obtida na cromatografia de exclusão molecular foi concentrada em Vivaspín 3 kDa, em que a Xyl ficou retida na fração > 3kDa (GE Healthcare Life Sciences).

4.11.13.1 *Espectroscopia de fluorescência*

O experimento foi realizado em espectrofluorímetro JASCO FP-6500 (Jasco Analytical Instruments, Tokio, Japão) acoplado a um sistema de controle de temperatura do tipo Peltier JASCO ETC-273T (Jasco Analytical Instruments, Japão) com circulação de água. O monitoramento dos espectros de emissão de fluorescência foi realizado em temperatura de 25°C, em um intervalo de 300 a 400 nm, utilizando um comprimento de onda de excitação do triptofano de 295 nm. A abertura das fendas de excitação e emissão foi de 5,0 nm cada uma. Os dados foram coletados à velocidade de 200 nm.min⁻¹.

A xilanase purificada (Xyl) foi dissolvida separadamente em tampão acetato de sódio 3 mM pH 5,0 e tampão Tris-HCl 3 mM pH 7,0 e 9,0. Para a determinação da concentração da amostra foi realizado ensaio de Bradford, conforme citado no item 4.4. As medidas foram feitas em cubeta de quartzo de 10 x 2 mm (100 µL). Os espectros foram registrados e tratados utilizando o programa o Spectra Manager (Jasco) e OriginPro.

4.11.13.2 Dicroísmo circular

As análises por dicroísmo circular foram realizadas a partir de espectros obtidos no espectropolarímetro Jasco J-815 (Analytical Instruments, Japão) acoplado a um sistema Peltier (Analytical Instruments, Japão) para controle da temperatura. A leitura dos espectros foi realizada em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm. A média dos espectros obtida a partir de varreduras adquiridas foi considerada para análise dos dados. A contribuição da absorção do tampão registrada na linha de base foi subtraída. A velocidade de coleta dos dados foi de 100 nm.min⁻¹. A formação de ozônio em comprimento de onda distante da região ultravioleta (260 – 190 nm), que pode levar a danos no sistema óptico, foi evitada com fluxo de nitrogênio gasoso contínuo no interior do espectropolarímetro. Os programas utilizados para o registro e tratamento dos dados foram o Spectra Analysis (Jasco, Tokio, Japão) e o OriginPro.

Os dados registrados pelo programa Spectra Manager foram convertidos de miligraus para elipticidade residual molar (θ) usando a seguinte equação:

$$\theta(\text{grau} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}) = (112 \times \alpha) \div (10 \times C \times L) \quad (6)$$

Onde, α é o sinal dicróico em miligraus, C é a concentração da amostra (mg.mL⁻¹) e L é o trajeto óptico (cm) da cubeta utilizada.

A concentração da amostra utilizada foi de 2 µg.mL⁻¹ em tampão acetato de sódio 3 mM pH 5,0 a 25°C. As modificações estruturais da Xyl também foram monitoradas em tampão Tris-HCl 3 mM pH 7,0 e 9,0 a 25°C.

A porcentagem das estruturas secundárias da Xyl em diferentes pHs, foi calculada a partir do ajuste das curvas dicróicas nos comprimentos de onda de 260 a 190 nm a 25°C, utilizando o programa CDNN SpectraDeconvolution (Versão 2.1, bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn; Institut für Biotechnologie, Alemanha).

Os ensaios de desnaturação térmica foram realizados elevando a temperatura de 25°C a 95°C. Os espectros de 260-190 nm foram coletados a cada 10°C,

concomitantemente com a obtenção da curva de desnaturação térmica no comprimento de onda fixo de 208 nm. A voltagem do equipamento foi monitorada para não exceder 700 V.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CURVA DE INDUÇÃO ENZIMÁTICA

O crescimento de fungos e a produção de xilanases são determinados por uma variedade de parâmetros, como a composição, temperatura e pH do meio. Após a escolha do meio de cultura a ser utilizado, a etapa posterior baseia-se no estabelecimento do padrão de crescimento do microrganismo em contato com este meio.

O fungo *Aspergillus foetidus* cresceu em meio líquido suplementado com casca de soja 2% por 20 dias. A curva de indução de *Aspergillus foetidus* crescido em casca de soja está mostrada na Figura 11.

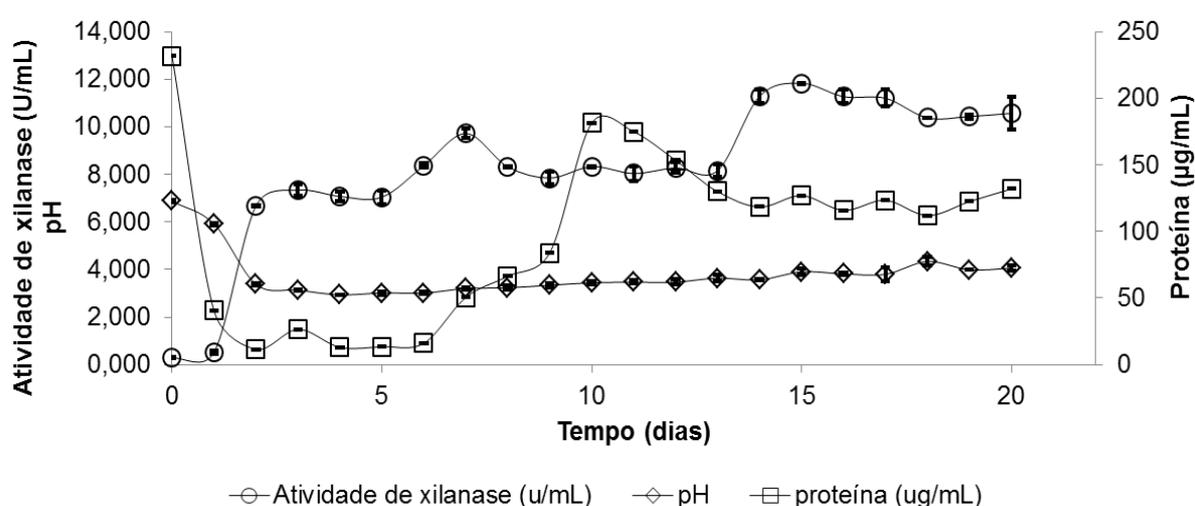


Figura 11 - Curva de indução da atividade de xilanase de *Aspergillus foetidus* em meio líquido contendo casca de soja 2% ao longo de 20 dias. Cultivo em shaker, 120 rpm, 28°C.

A atividade de xilanase foi detectada desde o primeiro dia de cultivo e foi aumentando ao longo dos dias, atingindo um pico de atividade no décimo quinto dia. Um platô de atividade de xilanase foi formado a partir do segundo dia até o 14º dia. No 15º dia (11,84 U/mL) obteve-se a produção máxima de xilanases pelo fungo, formando um novo platô até o final do período analisado.

O perfil de indução foi acompanhado por picos de proteína. A concentração de proteínas diminuiu do primeiro dia até o sétimo dia. A partir do oitavo dia, a quantidade de proteínas aumentou até formar um platô, no 14° dia. A quantidade de proteína máxima ocorreu no 10° dia (181,5 µg/mL). O pH final do meio após atingir o pH 3,3 no segundo dia, manteve-se com valores próximos a este até o final do período de cultivo.

O perfil de indução enzimática sugere um acesso gradual às fibras de hemicelulose, estimulando a liberação gradual das enzimas hidrolíticas para o consumo total do substrato, decorrente das modificações que o substrato sofre durante a sua hidrólise. A presença de açúcares no meio de cultura aparentemente não apresentou efeito inibitório na produção de xilanases, mas pode ter sido a causa da estagnação da produção destas até o 15° dia. É possível, ainda, que o açúcar liberado no meio tenha sido utilizado pelo fungo como fonte de energia, visto que não ocorreu adição de nutrientes ao meio durante o período estudado (Haltrich e Steiner, 1994; Panagiotou e Olsson, 2007; Milanezi *et al.*, 2012).

O perfil proteico encontrado, provavelmente inclui outras enzimas, além das xilanases, que são concomitantemente produzidas e podem estar envolvidas na complexa degradação do substrato (Milanezi *et al.*, 2012). No entanto, para os fins deste trabalho, a atividade de xilanase foi o principal alvo de investigação.

O 7° dia de cultivo (9,72 U/mL) foi estabelecido como o dia de cultivo para crescimento do fungo no meio líquido contendo casca de soja 2%, porque apresentou maior atividade específica (810,41 U/mg) durante o período analisado.

A atividade específica é um parâmetro importante que avalia a atividade enzimática em relação à quantidade total de proteínas presentes na amostra. Em geral, enzimas com alta atividade específica apresentam seu processo de purificação mais facilitado (Gomes, 2014).

Comparando a Xyl com outras xilanases obtidas de *Aspergillus sp.* cultivadas em diferentes resíduos lignocelulósicos, a Xyl possui atividade de xilanase específica superior a xilanases de *Aspergillus fumigatus* (53,1 U/mg – bagaço de cana), (558,3 U/g – soja); *Aspergillus niger* (484,2 U/g – soja) e inferior a xilanases de *Aspergillus fumigatus* (1055,6 U/g – farelo de trigo) e *Aspergillus niger* (1285,0

U/g – farelo de trigo), (1050,0 U/g - farelo de trigo com bagaço de cana) (Delabona *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015).

5.2 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE ATIVIDADE QUANTO AO PH, TEMPERATURA E AGITAÇÃO POR ANÁLISE DE SUPERFÍCIE RESPOSTA

O efeito das variáveis agitação, temperatura e pH sob a atividade de xilanase da amostra - extrato bruto de *Aspergillus foetidus* (EB) crescido em meio líquido suplementado com casca de soja 2% - foi avaliado através de planejamento fatorial com a metodologia de superfície resposta. Na Tabela 2 estão os resultados da atividade de xilanase obtida para os ensaios realizados sob as condições descritas anteriormente (item 4.6).

Os coeficientes do modelo matemático e parâmetros estatísticos estão mostrados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 2 - Resultados obtidos do planejamento fatorial 2^3 utilizando as variáveis independentes pH, temperatura e agitação.

(continua)

Experimento	Níveis			Xilanase FD1	Xilanase FD2
	X_1	X_2	X_3	(U/mL)	(U/mL)
1	-1	-1	-1	8.965	8.423
2	+1	-1	-1	8.525	8.730
3	-1	+1	-1	9.955	11.243
4	+1	+1	-1	10.603	8.512
5	-1	-1	+1	8.979	5.737
6	+1	-1	+1	8.378	3.004

Tabela 2 - Resultados obtidos do planejamento fatorial 2^3 utilizando as variáveis independentes pH, temperatura e rotação.

(conclusão)

Experimento	Níveis			Xilanase FD1	Xilanase FD2
	X_1	X_2	X_3	(U/mL)	(U/mL)
7	-1	+1	+1	0.996	0.806
8	+1	+1	+1	4.783	0.674
9	0	0	0	10.811	13.982
10	0	0	0	13.880	11.506
11	0	0	0	11.709	10.915
12	0	0	-1,68	3.864	3.976
13	0	0	+1,68	1.407	1.358
14	0	-1.68	0	8.571	0.705
15	0	+1.68	0	8.131	1.016
16	-1.68	0	0	7.731	9.480
17	+1.68	0	0	8.447	8.349

Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão 1.

(continua)

FV	SQ	GL	QM	F	p
Modelo 1	167,53	9	18,61	5,87	0,0147
A- Rotação	1,55	1	1,55	0,49	0,5073
B- Temp.	6,27	1	6,27	1,98	0,2027
C- pH	26,56	1	26,56	8,37	0,0232
AB	3,75	1	3,75	1,18	0,3130

Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão 1.

(conclusão)

FV	SQ	GL	QM	F	p
AC	1,11	1	1,11	0,35	0,5730
BC	26,81	1	26,81	8,45	0,0227
A ²	12,81	1	12,81	4,04	0,0844
B ²	10,68	1	10,68	3,37	0,1092
C ²	101,05	1	101,05	31,86	0,0008
Resíduo	22,20	7	3,17		
Falta de ajuste	17,22	5	3,44	1,38	0,4700
Erro puro	4,98	2	2,49		
Total	189,73	16			

1: Modelo de regressão: Atividade de xilanase = - 81,111 + 0,431*A + 1,784*B + 12,937*C + 0,006*A*B + 0,009*A*C - 0,153 *B*C - 0,003*A² - 0,027*B² - 0,748*C²

R² = 0,8830; FV, fonte de variação; SQ, soma de quadrado; GL, grau de Liberdade; QM, quadrado médio. Nível de significância = 95%.

Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão 2.

(continua)

FV	SQ	GL	QM	F	p
Modelo 2	274,80	9	30,53	4,39	0,0319
A- Rotação	3,79	1	3,79	0,55	0,4844
B- Temp.	1,25	1	1,25	0,18	0,6839
C- pH	70,78	1	70,78	10,19	0,0152
AB	0,024	1	0,024	0,007	0,9549
AC	0,024	1	0,024	0,007	0,9545
BC	12,16	1	12,16	1,75	0,2274

Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão 2.

	FV	SQ	GL	QM	F	<i>p</i>
A ²		4,67	1	4,67	0,67	0,4393
B ²		137,41	1	137,41	19,78	0,0030
C ²		91,73	1	91,73	13,20	0,0084
Resíduo		48,63	7	6,95		
Falta de ajuste		43,34	5	8,67	3,27	0,2504
Erro puro		5,30	2	2,65		
Total		323,43	16			

(conclusão)

2: Modelo de regressão: Atividade de xilanase = - 54,322 + 0,113*A + 1,997*B + 10,506*C + 0,000*A*B - 0,001*A*C - 0,0560 *B*C - 0,000*A² - 0,028*B² - 0,713*C²

R² = 0.849; FV, fonte de variação; SQ, soma de quadrado; GL, grau de Liberdade; QM, quadrado médio. Nível de significância = 95%.

5.2.1 Xilanase FD1

No primeiro planejamento fatorial, as variáveis pH, pH² e pH*temperatura (C, C², BC) foram significantes sob a atividade de xilanase ($p < 0,05$). As interações entre as variáveis agitação e pH (AC) não foram significativas ($p > 0,05$). Desta forma, as variáveis agitação e temperatura juntas não apresentam efeito significativo sobre a atividade de xilanase, dentre os níveis testados.

Os dados analisados se enquadraram no modelo quadrático com três pontos centrais. O coeficiente de determinação (R²) calculado foi de 0,88 indicando que 88% da variabilidade na resposta podem ser explicados pelo modelo. Além disso, o valor F calculado (5,87 vezes maior que o valor de F tabelado em um intervalo de 90% de confiança) foi satisfatório para a predição do modelo usado para descrever o gráfico de superfície resposta em função do pH e da temperatura (Figura 12). O maior valor de atividade de xilanase encontrado foi no ponto central do modelo, 120 rpm, pH 7 e 28°C, conforme estimado pelo modelo experimental adotado.

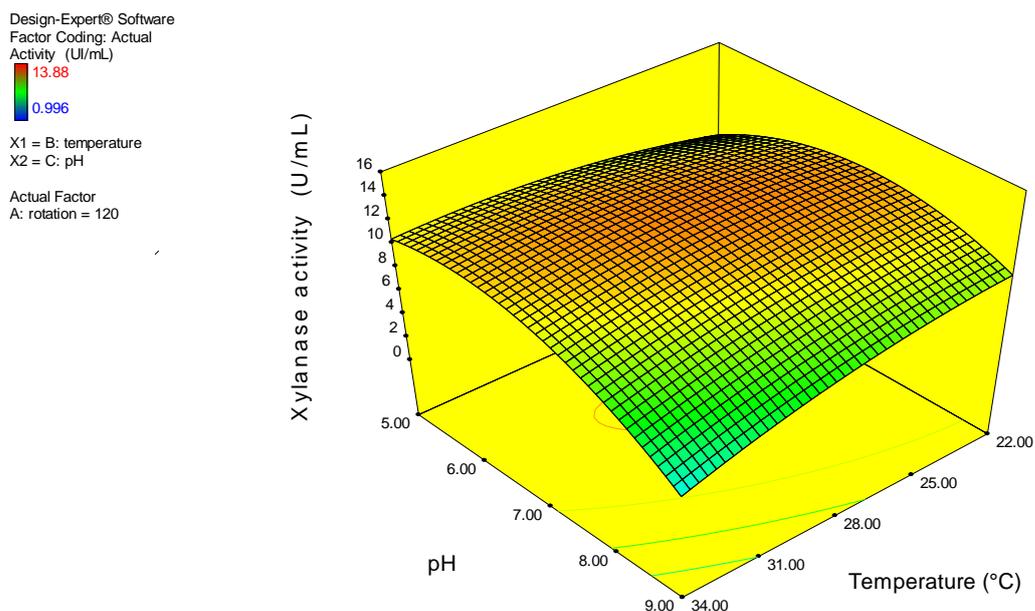


Figura 12 - Gráfico de superfície resposta da xilanase em função das variáveis temperatura (°C) e pH para o planejamento fatorial 1 (FD1).

Outros estudos já reportaram valores ótimos de pH e temperatura para xilanases. Moreira et al. (2013) encontrou valores ótimos de pH e temperatura para xilanases produzidas de *Aspergillus terreus*, 120 rpm, pH 6, 50°C e 120 rpm, pH 5, 45°C. Ang et al. (2013) encontrou uma atividade máxima a 60°C, pH 4 para xilanases de *Aspergillus fumigatus*. A vantagem de utilizar uma metodologia estatística é a definição de uma faixa ótima de temperatura e pH (e não um valor específico), permitindo maior flexibilidade durante o processo de desenvolvimento (Farinas et al., 2010; Ang et al., 2013; Moreira et al., 2013).

A falta de ajuste não apresentou o valor de p significativo. Isto indica que o modelo apresenta acurácia suficiente para prever a atividade de xilanase dentre os níveis das variáveis estudados. A falta de ajuste de 1,38 indica que a falta de ajuste não é significativa em relação ao erro puro, então existe 47% de chance da falta de ajuste ocorrer devido ao ruído (Tabela 3).

De acordo com a Tabela 3, o modelo abaixo é proposto:

$$Y1 = -81,111 + (0,431 \times A) + (1,784 \times B) + (12,937 \times C) + (0,006 \times A \times B) + (0,009 \times A \times C) - (0,153 \times B \times C) - (0,003 \times A \times A) - (0,027 \times B \times B) - (0,748 \times C \times C)$$

(7)

Onde Y1 é a resposta da atividade de xilanase estimada (U/mL); A, B e C são as variáveis independentes agitação, temperatura e pH, respectivamente. A equação em termos do modelo pode ser usada para estimar a resposta de xilanase, considerando o intervalo das variáveis testadas no experimento.

O sinal negativo dos fatores significa que o aumento nesta variável, irá diminuir a resposta. Para a xilanase de *Aspergillus foetidus*, foi constatado que o pH é uma variável positiva, enquanto temperatura*pH e pH² foram negativos. Além disso, a significância da interação entre pH e temperatura mostrou um efeito sinérgico na resposta do modelo. O efeito do pH foi maior que o efeito da temperatura (Tabela 3).

Os resultados são similares aos trabalhos de Farinas et al. (2010) e Singh et al. (2009) na otimização de parâmetros para produção de celulase e xilanase de *Aspergillus niger*, e celulase de *Aspergillus heteromorphus*, respectivamente. As mudanças na temperatura foram menos significativas que mudanças no pH. Conforme o pH varia, a carga do substrato varia (mais aniônico ou catiônico), e afeta a atividade das enzimas estudadas (Singh et al., 2009; Farinas et al., 2010).

5.2.2 Xilanase FD2

No segundo planejamento fatorial, os intervalos de agitação, pH e temperatura foram aumentados em relação ao primeiro planejamento para avaliar um possível efeito significativo das variáveis independentes temperatura e agitação na atividade da xilanase.

O gráfico de superfície resposta está mostrado na Figura 13. O valor de F calculado de 4,39 significa que o modelo é significativo a um alto nível de confiança (Tabela 4). A probabilidade do valor de p foi relativamente baixa ($p < 0,05$), indicando a significância do modelo. O coeficiente de variação ($R^2 = 0,84$) indica uma alta correlação entre os valores tabelados e os valores calculados.

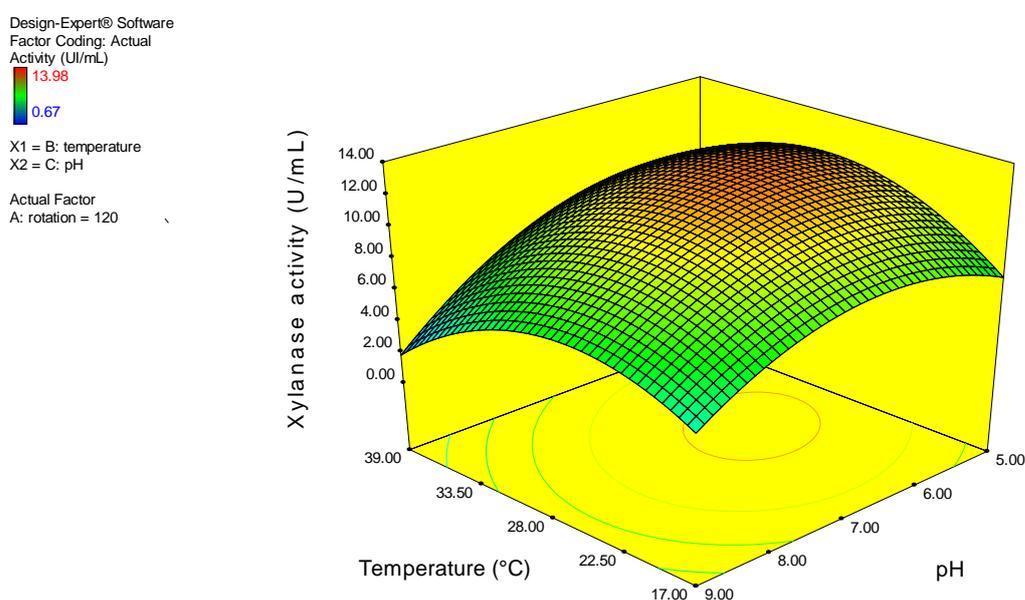


Figura 13 - Gráfico de superfície resposta da xilanase em função das variáveis temperatura (°C) e pH para o planejamento fatorial 2 (FD2).

A falta de ajuste de 3,27 significa que a falta de ajuste não é significativa em relação ao erro puro. Existe 25,04% de chances da falta de ajuste ocorrer. Além disso, as variáveis independentes pH, pH^2 e temperatura² (C , C^2 , B^2) apresentaram efeito significativo na atividade de xilanase. As outras correlações não apresentaram significância ($p > 0,05$) (Tabela 4).

De acordo com a Tabela 4, o modelo abaixo é proposto:

$$Y2 = -54,322 + (0,113 \times A) + (1,997 \times B) + (10,506 \times C) + (0,000 \times A \times B) - (0,001 \times A \times C) - (0,056 \times B \times C) - (0,000 \times A \times A) - (0,028 \times B \times B) - (0,713 \times C \times C)$$

(8)

Onde Y2 é a resposta da atividade de xilanase estimada (U/mL); A, B e C são as variáveis independentes agitação, temperatura e pH, respectivamente. A equação em termos do modelo pode ser usada para estimar a resposta de xilanase, considerando o intervalo das variáveis testadas no experimento.

No segundo modelo, a maior atividade de xilanase foi de 13,98 U/mL (120 rpm, 28°C, pH 7,0). Esta atividade maior que a encontrada no primeiro modelo possivelmente ocorreu por variações biológicas, considerando que o ponto central foi o mesmo para os dois modelos.

As atividades de xilanasas previstas pelo modelo, considerando as melhores condições (120 rpm, 28°C e pH 7,0) para o primeiro e segundo modelo foram 12,028 U/mL e 11,989 U/mL, respectivamente. As diferenças entre os valores reais e os valores teóricos foram muito pequenas, confirmando que os resultados estão de acordo com a metodologia de superfície resposta utilizada para análise dos dados.

5.3 PURIFICAÇÃO XILANASE

Após o período de incubação com a casca de soja em meio líquido por sete dias, a amostra foi filtrada. O filtrado obtido, denominado extrato bruto (EB), foi submetido à ultrafiltração, em câmara fria, com membrana de 100 kDa, visando a separação por massa molecular. A presença de uma atividade de xilanase maior no ultrafiltrado (U100) levou a escolha desta amostra para o próximo passo de purificação. Esta etapa é importante para eliminação de proteínas contaminantes.

Esta etapa de purificação revelou um aumento de quase 2,5 vezes da atividade específica de Xyl em relação ao EB e também aumentou o fator de purificação (Tabela 5). Essa etapa foi importante para eliminar uma grande quantidade de proteínas, mas o perfil proteico mostra a presença de outras bandas, sendo necessárias mais etapas de purificação.

Tabela 5 - Resumo das etapas de purificação de Xyl produzida por *Aspergillus foetidus* cultivado em casca de soja 1% como fonte de carbono.

Etapas da purificação	Proteína (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de Purificação
EB	0,065	10,030	154,533	100,000	1,000
U>100	0,141	13,617	96,574	135,762	0,625
U100	0,020	7,369	366,613	73,467	2,372
U>30	0,035	8,544	244,114	85,184	1,579
U30	0,006	7,120	1196,529	70,987	7,743

Visando uma metodologia de purificação eficiente, em que se pretende maximizar o rendimento e minimizar o número de passos de purificação, o ultrafiltrado da membrana de 100 kDa, foi submetido a uma nova ultrafiltração com uma membrana de 30 kDa.

O ultrafiltrado da membrana de 30 kDa revelou uma xilanase (Xyl) com atividade específica quase 8 vezes maior que o EB e um fator de purificação de 7,743 (Tabela 5).

O rendimento final da purificação foi de 70,99%. A remoção das proteínas, durante o processo de purificação, diminui a população de proteínas contaminantes e aumenta a quantidade das proteínas de interesse e sua capacidade de atuarem plenamente sobre o substrato de origem lignocelulósica, influenciando, desta forma, no rendimento da purificação. O rendimento da purificação de uma xilanase de *Aspergillus foetidus* foi superior a valores reportados em outros trabalhos (Ferreira, Puls e Coughlan, 1993; Ximenes, Silveira e Ferreira, 1996; Ximenes *et al.*, 1999; Milanezi *et al.*, 2012).

A Figura 14 (a) mostra o perfil proteico sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) das etapas de purificação (EB, U100 e Xyl). A eletroforese da Xyl mostrou uma única banda proteica, apresentando massa molecular aparente de aproximadamente 14,19 kDa. O zimograma da amostra também mostra uma única banda de atividade de xilanase (Figura 14 (b)).

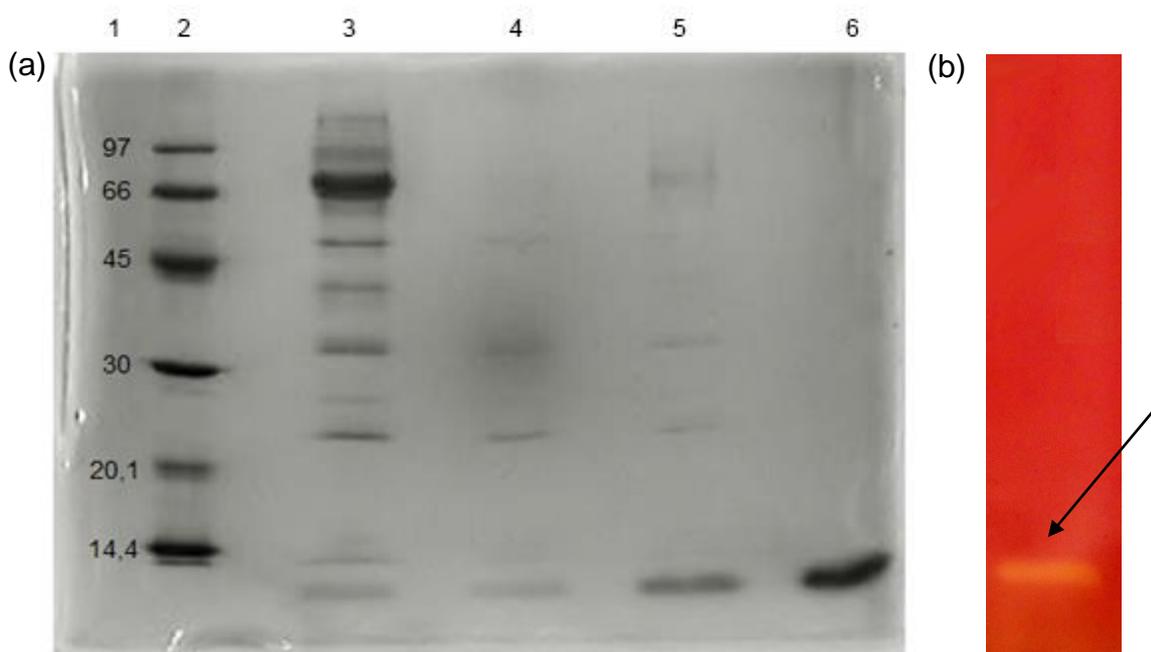


Figura 14 – (a) Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12% do extrato bruto (3), ultrafiltrado membrana 100 kDa (4), concentrado membrana 30 kDa (5) e ultrafiltrado membrana 30 kDa (Xyl) (6). Na linha 1, está representado a massa molecular (em kDa) dos marcadores moleculares (2) (LMW Kit, GE Healthcare Life Sciences) utilizados. (b) Zimograma da xilanase purificada (Xyl).

A massa molecular observada da Xyl está de acordo com o descrito na literatura, em que a maioria das xilanases de bactérias e fungos apresentam massa molecular na faixa de 8,5 – 85,0 kDa (Ximenes, Silveira e Ferreira, 1996; Ximenes *et al.*, 1999; Afzal *et al.*, 2005; Milanezi *et al.*, 2012) .

Xilanases de baixa massa molecular podem ser aplicadas nas etapas de branqueamento de papel, uma vez que enzimas com menor massa molecular podem penetrar mais facilmente na matriz de hemicelulose-lignina-celulose das

fibras da polpa de celulose, e hidrolisar eficientemente a xilana (Ximenes *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2013).

No trabalho de Sandrim *et al.* (2005), uma xilanase foi purificada de *Aspergillus caespitosus* com massa molecular estimada de 17,7 kDa com pH e temperatura ótima de 5,5-6,5 e 50-55°C, respectivamente. A efetividade da xilanase no processo de branqueamento da polpa de celulose está relacionada com suas características bioquímicas como a baixa massa molecular, o que permite a difusão facilitada da enzima na polpa (Sandrim *et al.*, 2005).

5.4 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA XYL

5.4.1 Efeito da temperatura na atividade da Xyl

O efeito da temperatura na atividade de Xyl é apresentado na Figura 15. A maior atividade foi obtida a 50°C. No entanto, apresentou atividade enzimática em uma ampla faixa de temperaturas, retendo pelo menos 70% da sua atividade entre 20°C e 60°C. A enzima exibiu uma diminuição da atividade nas temperaturas de 70°C, 80°C e 90°C.

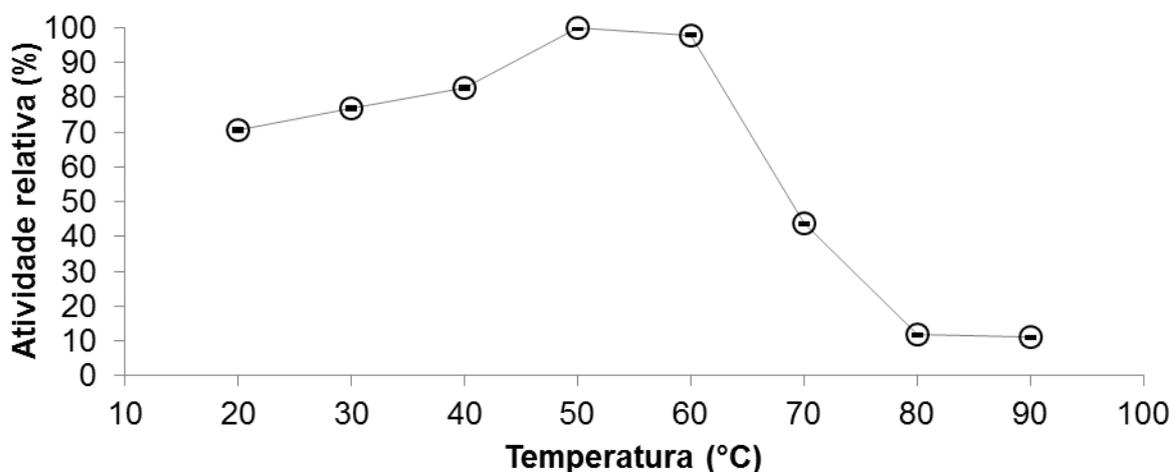


Figura 15 - Efeito da temperatura na atividade de xilanase da enzima purificada de *Aspergillus foetidus*.

Outros estudos envolvendo a purificação e caracterização de xilanases de *Aspergillus* sp. estabeleceram a temperatura ideal para atividade de xilanase dentro da faixa de 35°C – 65°C (Tabela 6). Os resultados deste trabalho estão de acordo com os resultados apresentados por Milanezi et al. (2012) que apresentaram 50°C como a temperatura de maior atividade para uma xilanase purificada de *Aspergillus niger*. No entanto, Chidi et al. (2008) purificaram uma xilanase de *Aspergillus terreus*, com atividade de xilanase máxima a 35°C (Chidi et al., 2008; Milanezi et al., 2012).

Tabela 6 - Características físico-químicas descritas para xilanases purificadas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*.

Espécie	Xilanase	Mr (kDa)	Temp. ótima (°C)	pH ótimo	Referência
<i>A.foetidus</i>	Xyl	14,19	50	5,0	Este trabalho
<i>A.terreus</i> UL 4209	Xyl	22	35	6,0	(Chidi et al., 2008)
<i>A.oryzae</i> HML366	XynH1	33,67	65	6,0	(He et al., 2015)
<i>A. cf. niger</i> BCC14405	Xyl	21	55	5,0	(Krisana et al., 2005)
<i>A.niger</i> van Tieghem LPM 93	XynI	32-33	50	4,5	(Milanezi et al., 2012)
<i>A.terreus</i>	Xyl T1	24,3	50	6,0	(Moreira et al., 2013)
<i>A.terreus</i>	Xyl T2	23,6	45	5,0	(Moreira et al., 2013)
<i>A.fumigatus</i> FC2-2	AfxynA	21	65	5,5	(Yang et al., 2015)
<i>A.awamori</i> 2B.361 U2/1	PXII-1	32,87	50	5,0 -5,5	(Teixeira et al., 2010)
<i>A.fumigatus</i> Fresenius	Xylanase II	19	55	5,5	(Silva et al., 1999)
<i>A.foetidus</i> MTCC 4898	Xyl	nd	50	5,3	(Shah e Madamwar, 2005)

nd = não determinada; Mr = massa molecular.

5.4.2 Efeito do pH na atividade de Xyl

O efeito do pH na atividade de Xyl, amostra purificada, é apresentado na Figura 16. Foi observado que a enzima estudada mostrou maiores atividades na faixa de pH 4,0 – 6,0, sendo a maior atividade em pH 5,0. Em pH 3,0 e 9,0 a enzima manteve pelo menos 60% da sua atividade e na faixa de pH de 4,0 – 8,0 manteve pelo menos 80% da sua atividade.

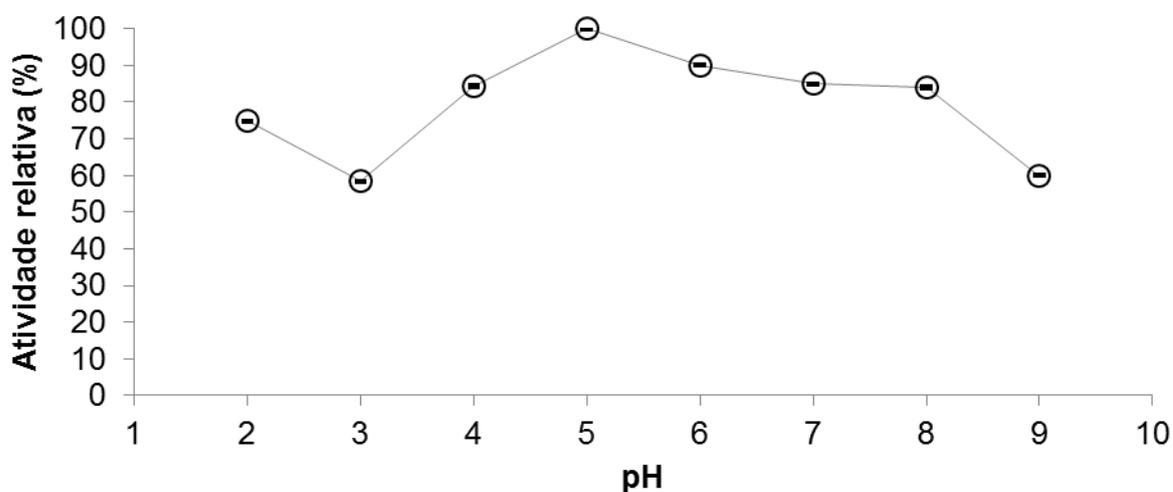


Figura 16 - Efeito do pH na atividade da xilanase purificada. Intervalo de pH entre 1 a 2, tampão HCl-cloreto de sódio; pH 3 a 5, tampão acetato de sódio; pH de 6 a 7, tampão fosfato de sódio; pH de 8 a 9, tampão Tris-HCl.

Xilanases de diversos fungos do gênero *Aspergillus* sp. apresentam maior atividade na faixa de pH de 4,5 – 6,0 (Tabela 6). Os valores obtidos neste trabalho são similares a outros trabalhos, como as xilanases purificadas a partir de *Aspergillus niger* (pH 5,0), *Aspergillus terreus* (pH 5,0) e *Aspergillus fumigatus* (pH 5,0) (Krisana *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015).

5.4.3 Termoestabilidade e tempo de meia-vida da Xyl

A resistência da enzima sob condições de altas temperaturas e agentes desnaturantes é um dos critérios mais importantes para a aplicabilidade destas nas indústrias. A termoestabilidade representa a capacidade da enzima em resistir a desnaturação térmica na ausência do substrato (Bokhari, Latif e Rajoka, 2009).

A xilanase purificada foi submetida a testes de termoestabilidade em tampão acetato de sódio pH 5,0 e a atividade residual de xilanase foi dosada após um período de incubação em duas temperaturas: 30°C e 50°C. O comportamento da atividade de xilanase ao longo do tempo está mostrado na Figura 17.

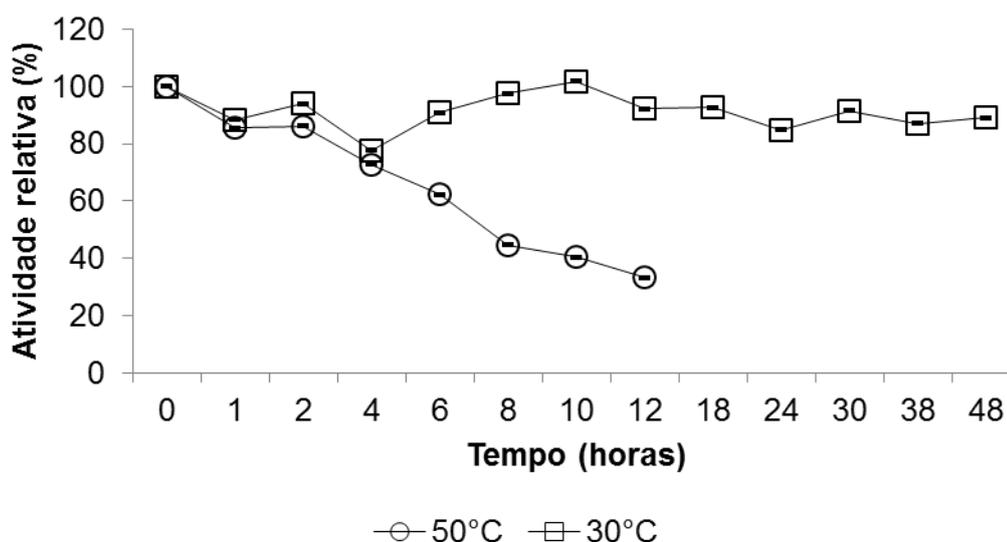


Figura 17 - Termoestabilidade da atividade de xilanase nas temperaturas de 30°C e 50°C.

A 30°C, a meia vida da Xyl foi estimada em 8 dias e 16 horas. Nesta temperatura, a xilanase reteve 90% da sua atividade inicial, ao final das 48 horas de incubação. Entretanto, a 50°C a meia vida da enzima foi reduzida pra 7 horas e 36 minutos. A enzima pode ter sido desativada, devido à desnaturação.

Diversos trabalhos já relataram a meia-vida de xilanases de *Aspergillus* sp. a 50°C. O tempo de meia-vida da Xyl (7h36min) é similar ao encontrado por Milanezi

et al. (2012), *Aspergillus niger* (6h) e por Chidi et al. (2008), *Aspergillus terreus* (5,8h) (Chidi et al., 2008; Milanezi et al., 2012).

Os valores encontrados neste trabalho foram superiores ao encontrado no trabalho de Moreira et al. (2013), *Aspergillus terreus* (2h e 3,5h) e inferior ao trabalho de Yang et al. (2015), *Aspergillus fumigatus* (70h) e de Teixeira et al. (2010), *Aspergillus awamori* (3 dias) (Teixeira et al., 2010; Moreira et al., 2013; Yang et al., 2015).

5.4.4 Efeito de íons e agentes modificadores

Nas preparações comerciais ou industriais de enzimas, aditivos podem ser adicionados para manter a estabilidade desta. Além disso, nos processos industriais, as enzimas podem ter contato com metais que estão envolvidos nas reações químicas do processo. As xilanases podem ter sua atividade modulada por compostos químicos ou íons de forma positiva ou negativa (Goluguri et al., 2016). Compreender a interação da enzima com os íons constitui uma ferramenta de grande utilidade na caracterização da estrutura e as possíveis interações que ocorrem no sítio ativo e o mecanismo de ação de enzimas de xilanases. Desta forma, o efeito de íons metálicos e outros aditivos foram determinados conforme mostrado nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade da xilanase purificada de *Aspergillus foetidus* a partir do cultivo submerso com casca de soja 1%.

(continua)

	Atividade relativa %	
	1 mM	10 mM
Controle	100,000 ± 0,002	100,000 ± 0,002
MgSO ₄	98,131 ± 0,016	103,946 ± 0,005 *
AgNO ₃	105,711 ± 0,022	96,262 ± 0,029
FeSO ₄	95,431 ± 0,018	80,584 ± 0,014 *
FeCl ₃	102,700 ± 0,028	96,470 ± 0,010
CuSO ₄	101,246 ± 0,005	73,212 ± 0,006 *
EDTA	106,749 ± 0,015	111,318 ± 0,041
CaCl ₂	112,979 ± 0,011 *	113,913 ± 0,005 *
MgCl ₂	98,650 ± 0,011	98,131 ± 0,019
ZnSO ₄	106,334 ± 0,005 *	107,891 ± 0,003 *
KCl	103,946 ± 0,009	105,607 ± 0,008 *
NaCl	105,918 ± 0,005 *	106,645 ± 0,006 *
AlCl ₃	103,634 ± 0,008	106,022 ± 0,014

Tabela 7 - Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade da xilanase purificada de *Aspergillus foetidus* a partir do cultivo submerso com casca de soja 1%.

(conclusão)

	Atividade relativa %	
	1 mM	10 mM
MnCl ₂	64,178 ± 0,006*	45,281 ± 0,004*
Co(NO ₃) ₂	96,885 ± 0,004*	69,889 ± 0,008*

(*) Indica diferença estatística no teste pareado LSD-Fisher. DP em relação à média de cada composto avaliado.

Tabela 8 - Efeito de reagentes modificadores de aminoácidos e aminoácidos na atividade da xilanase purificada de *Aspergillus foetidus* a partir do cultivo submerso com casca de soja 1%.

Reagente ou aminoácido	Concentração (mM)	Atividade relativa (%)
Controle	-	100,000 ± 0,005
Iodoacetamida	5	150,096 ± 0,006*
L-triptofano	5	104,828 ± 0,005
SDS	20	12,081 ± 0,002*
β-mercaptoetanol	5	105,231 ± 0,013

(*) Indica diferença estatística no teste pareado LSD-Fisher. DP em relação à média de cada composto avaliado.

A Xyl foi ativada na presença de Mg²⁺ (10 mM), Ca²⁺ (1 e 10 mM), K⁺ (10 mM), Zn²⁺ (1 e 10 mM) e iodoacetamida (5 mM). Por outro lado, Xyl foi inibida na presença de Fe²⁺ (10 mM), Cu²⁺ (10 mM), Mn²⁺ (1 e 10 mM), Co²⁺ (1 e 10 mM) e SDS (20 mM).

As enzimas, em sua maioria, precisam de metais para uma melhor eficiência catalítica. Os íons metálicos podem influenciar na atividade enzimática de diversas maneiras: atuar comoceptor ou doador de elétrons; mascarar nucleófilos, evitando reações indesejadas; aproximar a enzima e o substrato por meio de ligações coordenadas; ou estabilizar a conformação ativa da enzima (Mohana *et al.*, 2008).

O íon Mn^{2+} , geralmente, é relatado com um ativador para a atividade de xilanase, no entanto, para Xyl apresentou um efeito inibitório nas concentrações de 1 e 10 mM promovendo uma redução de 36% e 55%, respectivamente comparado com o controle. Duarte et al. (2012) também observou o efeito inibitório do Mn^{2+} (10 mM) na atividade de uma xilanase de *Aspergillus oryzae*, e Haq et al. (2012) onde o íon Mn^{2+} (1 mM) inibiu a xilanase de *Thermotoga petrophila*. A inibição da enzima pelos íons Mn^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} e Cu^{2+} pode ocorrer devido à presença de grupos tiol no sítio ativo da enzima, que estão envolvidos na catálise enzimática. Outra possibilidade é a importância dos grupos tiol para estabilizar a estrutura terciária da enzima (Duarte et al., 2012; Haq et al., 2012).

Goluguri et al. (2016) e Kumar et al. (2011) relataram a inibição da xilanase de *Thielaviopsis basicola* por Cu^{2+} (10 mM) e de *Bacillus halodurans* por Cu^{2+} (5 mM), respectivamente. A inibição da xilanase por este íon pode estar associada a sua natureza oxidativa. O Cu^{2+} pode catalisar a auto-oxidação dos resíduos de cisteína formando pontes dissulfeto intermoleculares e intramoleculares (Vieille e Zeikus, 2001; Kumar e Satyanarayana, 2011; Goluguri et al., 2016).

A ativação da Xyl na presença de iodoacetamida (5 mM) pode indicar que os resíduos de cisteína, se presentes, estão inacessíveis para interagir com o substrato (Ferreira, Puls e Coughlan, 1993). Um resultado similar foi encontrado por Chivero, Mutukumira e Zvauya (2001), em que o ensaio com iodoacetamida (1 mM e 4mM) ativaram as xilanases obtidas das culturas de *Ziziphus mauritiana* e *Sclerocarya birrea* (Chivero, Mutukumira e Zvauya, 2001).

A inativação da enzima por SDS pode ser atribuída ao fato de que este aditivo se liga à enzima e induz a mudanças estruturais e de desnaturação da mesma (Pires, 2013). Outros trabalhos já reportaram a inibição de xilanases por SDS (Mohana et al., 2008; Kumar e Satyanarayana, 2011; Bajaj e Manhas, 2012).

A Xyl na presença de Fe^{2+} (10 mM) foi inibida em 20%. Faulet et al. (2005) relatou a inibição de uma xilanase purificada de *Termitomyces sp.* por Fe^{2+} (1 mM) em mais de 50%. Para a utilização da enzima nos processos biotecnológicos, o íon deve ser eliminado para evitar a desnaturação enzimática antes da hidrólise (Faulet et al., 2006).

A ativação da Xyl pelos íons Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ e Zn^{2+} está de acordo com o relatado em outros trabalhos (Faulet *et al.*, 2006; Mohana *et al.*, 2008; He *et al.*, 2015; Goluguri *et al.*, 2016). Os demais íons e aditivos testados tiveram pouco ou nenhum efeito na atividade da Xyl estudada.

5.4.5 Especificidade aos substratos

A especificidade da Xyl foi avaliada por meio de ensaio de hidrólise de diversos substratos (Tabela 9). A enzima mostrou maior atividade na hidrólise dos diversos tipos de xilana, apresentando pouca ou nenhuma atividade quando incubada com papel de filtro ou substratos sintéticos. Na presença de CM-celulose ou manana a xilanase possui atividade residual menor que 3% quando comparada com a xilana de bétula.

A especificidade da Xyl majoritariamente sobre a xilana sugere que esta enzima pertença a família GH11. E indica, também, que a enzima tem grande potencial para aplicação em indústrias de papel e celulose, que requerem enzimas sem atividade sobre celulose (Paës, Berrin e Beaugrand, 2012; Moreira *et al.*, 2013).

Tabela 9 - Especificidade do substrato da xilanase purificada de *Aspergillus foetidus*.

Substrato	Ligação da cadeia principal	Atividade (UI/mL)
Xilana de bétula	B-1,4	13,880 ± 0,012
Xilana de faia	B-1,4	7,527 ± 0,009
Xilana de aveia	B-1,4	3,401 ± 0,012
Papel de filtro	B-1,4	0,002 ± 0,049
CM-celulose	B-1,4	0,241 ± 0,006
Manana	B-1,4	0,416 ± 0,004
ρNPA	ρNP- B-1,4	0,032 ± 0,000
ρNPM	ρNP- B-1,4	0,000 ± 0,001
ρNPX	ρNP- B-1,4	0,008 ± 0,006
ρNPG	ρNP- B-1,4	0,003 ± 0,001

5.4.6 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos da Xyl a 50°C com xilana de bétula (birchwood) foram analisados conforme o modelo de Michaelis-Menten, sendo $K_m = 26,32$ mg/mL e $V_{m\acute{a}x} = 68,45$ U/mL. O alto valor de $V_{m\acute{a}x}$ sugere que a Xyl é mais eficiente que outras já reportadas.

Pradeep et al. (2003) no estudo de uma xilanase purificada de *Streptomyces sp.* reportou para hidrólise da xilana de beechwood e birchwood $K_m = 102,3$ mg/mL e $K_m = 60,5$ mg/mL, respectivamente. Comparativamente, Milanezi et al. (2012) também encontrou altos valores para as constantes cinéticas. A xilanase purificada de *Aspergillus niger* apresentou $K_m = 47,08$ mg/mL utilizando como substrato a xilana oat spelt (Milanezi et al., 2012; Pradeep et al., 2013).

Controversamente, muitos outros trabalhos apresentam os parâmetros com valores menores, indicando xilanases mais específicas ao substrato, como é o caso dos trabalhos de Teixeira et al. (2010) em que a xilanase purificada de *Aspergillus awamori* apresentou para xilana oat-spelt e birchwood $K_m = 11,8$ mg/mL e 9,75 mg/mL, respectivamente (Teixeira et al., 2010).

5.4.7 Parâmetros termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos para caracterização da ligação enzima-substrato são a variação da energia livre de Gibb's (ΔG), variação de entalpia (ΔH) e variação de entropia (ΔS) (Hegde et al., 1998).

O cálculo destes parâmetros foi realizado utilizando a equação de Van't Hoff, que mostra a relação entre a temperatura e a constante de afinidade (K_a). As variáveis para determinação dos parâmetros estão mostradas na Tabela 10.

Tabela 10 - Variáveis para cálculo dos parâmetros termodinâmicos.

Temperatura (K)	Km (M)	Ka (M ⁻¹)	R ln(Ka)	1/T (K)
293	0,000678	1475,05	14,498	0,0034
313	0,001519	658,46	12,895	0,0032
323	0,001855	539,13	12,498	0,0031
343	0,003471	288,12	11,253	0,0029

Km: constante de Michaelis-Menten; Ka: constante de afinidade; R: constante dos gases.

A dependência da temperatura em relação à constante de afinidade está indicada nos valores apresentados na Tabela 10, onde a afinidade da Xyl diminui com o aumento da temperatura. A 20°C, Ka é de 1475,05 M⁻¹, enquanto que a 70°C é de 288,12 M⁻¹ (Tabela 10). Corroborando a este fato, a constante de Michaelis-Menten, que indica a especificidade da enzima pelo substrato, é crescente com o aumento da temperatura

Os dados obtidos foram ajustados de acordo com a aproximação de van't Hoff resultando na equação da reta:

$$y = 6435,37 x - 7,51625 \quad (9)$$

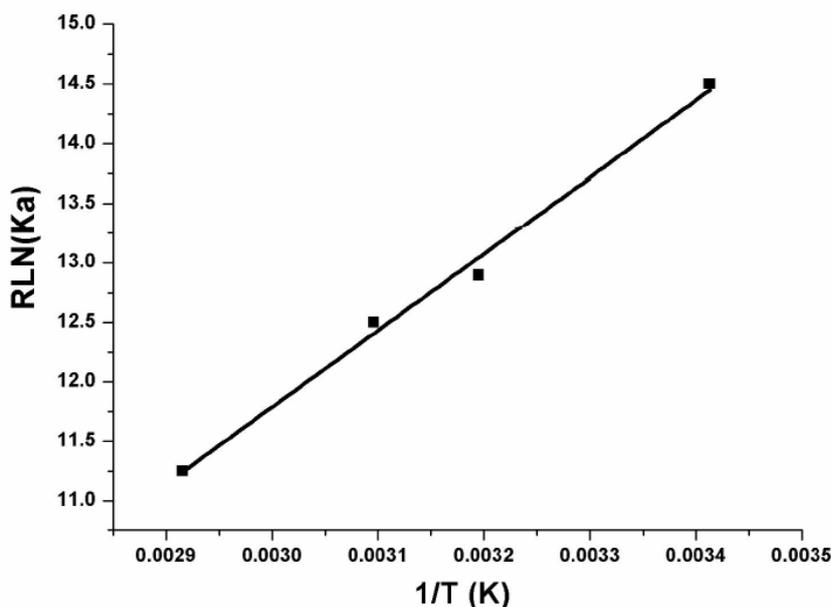


Figura 18 - Gráfico de van't Hoff para a xilanase purificada obtida de *Aspergillus foetidus*. Ka: constante de afinidade e T: temperatura em Kelvin.

A partir destes dados, as variáveis termodinâmicas ΔH e ΔS foram estimadas, sendo que ΔH corresponde à inclinação da reta e ΔS ao intercepto em Y. A variação de energia livre Gibb's foi calculada a partir da Equação 9. Os valores dos parâmetros estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Parâmetros termodinâmicos da xilanase purificada obtida de *Aspergillus foetidus*.

Parâmetros	25°C
ΔG (kJ mol ⁻¹)	- 17,56
ΔH (kJ mol ⁻¹)	- 26,94
ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	- 31,47

Quando comparada com a literatura, a Xyl apresenta uma variação de entalpia menor que valores estimados para xilanase purificada de *Chainia sp.* (Hegde *et al.*, 1998). Quanto menor o valor de ΔH , mais favorecida é a formação do complexo enzima-substrato (Bokhari, Latif e Rajoka, 2009). Além disso, valores

mais altos de ΔH indicam que mais energia é requerida para a alteração conformacional, por distorção do anel de xilose e mudança para a conformação do tipo “sofá”. A xilose apresenta essa conformação no estado de transição, ou seja, na formação do complexo enzima-substrato (Afzal *et al.*, 2005).

A atividade enzimática também pode estar associada com a variação de entropia do sistema. Em várias xilanases existe uma cadeia bem ordenada de moléculas de água que estão próximas ao sítio ativo. Quando a enzima se liga ao substrato, algumas ou todas as moléculas de água próximas ao sítio ativo são deslocadas para o solvente. Este deslocamento resulta em um ganho de 40 J/K na ΔS para cada molécula de água liberada. Se o número de moléculas de água liberada durante o estado de transição for elevado - formação do complexo enzima-substrato – o aumento da entropia estará associada a maior atividade enzimática (Afzal *et al.*, 2005).

O valor de ΔS negativo significa que a rede metabólica é mais estável, possivelmente por uma agregação parcial das moléculas enzimáticas inativas (Ortega *et al.*, 2004; Bokhari *et al.*, 2010). Quando o ΔS aumenta, a enzima assume um estado de desordem maior (do sítio ativo ou da estrutura), favorecendo que a enzima se ligue ao substrato - estado de transição (D'amico *et al.*, 2003). As enzimas mais estáveis (alto valor de ΔH), quando no seu estado nativo, estão associadas a maiores valores de ΔS nos processos de interação molecular. Este aumento na variação de entropia é sugerido por ser um efeito compensatório, favorecendo a formação dos produtos da reação (Ortega *et al.*, 2004).

Comparando a Xyl, $\Delta H = -26,94 \text{ kJmol}^{-1}$ e $\Delta S = -31,47 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ com a xilanase do trabalho de Hegde *et al.* (1998), $\Delta H = -21,00 \text{ kJmol}^{-1}$ e $\Delta S = -4,8 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ é possível observar que quanto maior o valor de ΔH , maior o valor de ΔS (Hegde *et al.*, 1998).

Os valores de ΔH e ΔS também sofrem influência das interações intermoleculares e intramoleculares. O efeito hidrofóbico das ligações de hidrogênio e interações de van der Waals na formação do complexo enzima-substrato contribui para a estabilidade deste complexo e, conseqüentemente nos valores negativos desses parâmetros (Ross e Subramanian, 1981; Boraston *et al.*, 2001).

O parâmetro que melhor determina a viabilidade da reação enzimática, no entanto, é a variação da energia livre de Gibbs (ΔG). A viabilidade da reação pode ser definida como a conversão do complexo enzima-substrato em produtos. Quanto menor o valor de ΔG , mais favorável e espontânea é a reação para a formação dos produtos (Bokhari, Latif e Rajoka, 2009). Para Xyl, $\Delta G = - 17,56 \text{ kJmol}^{-1}$, indica que a reação da xilanase com o substrato xilana é largamente favorecida. Os resultados estão de acordo com o encontrado na literatura, Hegde et al. (1998) e Boraston et al. (2001) que reportaram ΔG de $- 19,45 \text{ kJmol}^{-1}$ e de $- 29,02 \text{ kJmol}^{-1}$ para xilanases de *Chainia sp.* e *Thermotoga maritima*, respectivamente (Hegde et al., 1998; Boraston et al., 2001).

5.4.8 Energia de Ativação

O cálculo para energia de ativação (E_a) foi realizado utilizando a equação de Arrhenius, que mostra a relação entre a velocidade da reação e a temperatura.

Os dados obtidos foram ajustados de acordo com a equação de Arrhenius resultando na equação da reta.

$$y = -4074,9 x + 16,923 \quad (10)$$

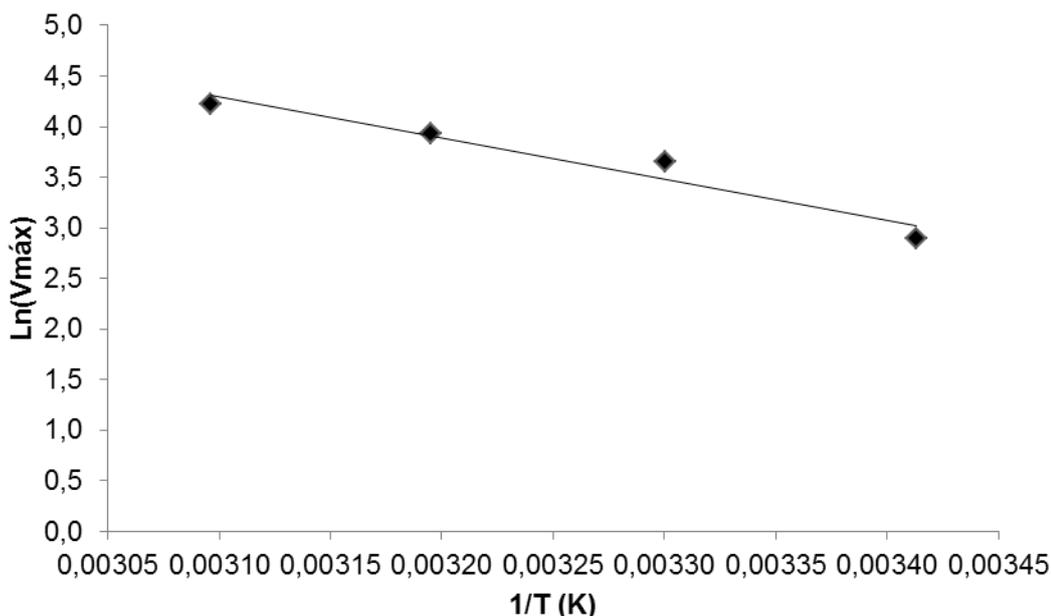


Figura 19 - Gráfico de Arrhenius para a xilanase purificada obtida de *Aspergillus foetidus*. Vmáx: Velocidade máxima da reação e T: temperatura em Kelvin.

A partir destes dados, a energia de ativação foi estimada, sendo que $(-E_a/RT)$ corresponde à inclinação da reta. O valor encontrado para E_a para a Xyl foi de $33,87 \text{ kJmol}^{-1}$.

A E_a para a Xyl foi inferior ao valor encontrado no trabalho de Petrescu et al. (2000), em que a xilanase purificada de *Cryptococcus adeliae* apresentou E_a de $52,2 \text{ kJmol}^{-1}$ e Stephens et al. (2007), em que observou-se uma E_a foi de 97 kJmol^{-1} para uma xilanase de *Thermomyces lanuginosus* (Petrescu et al., 2000; Stephens et al., 2007). Uma menor energia de ativação resulta em uma maior velocidade da reação sem afetar o equilíbrio da reação. A taxa da reação pode aumentar pela ligação específica da enzima-substrato e pela estabilização desse estado de transição (Marangoni, 2003).

O resultados da E_a para Xyl foi similar ao encontrado por Panthi et al. (2016), que relatou uma E_a de $29,39 \text{ kJmol}^{-1}$ para uma xilanase obtida de *Bacillus Methylophilicus* (Panthi et al., 2016).

5.4.9 Hidrólise da xilana de bétula por Xyl

Os produtos de hidrólise da xilana de bétula por Xyl foram analisados por CLAE, DNS e Orcinol férrico. Os resultados da Figura 20 mostram que, pela metodologia do DNS, a Xyl tem maior potencial em hidrolisar a fração solúvel da xilana em comparação com a fração insolúvel. A maior liberação de açúcares redutores ocorreu após a hidrólise da xilana por 30 horas. A quantificação de açúcares redutores para a fração solúvel e insolúvel da xilana, nesse tempo, foram de 0,95 mg/mL e de 0,29 mg/mL, respectivamente.

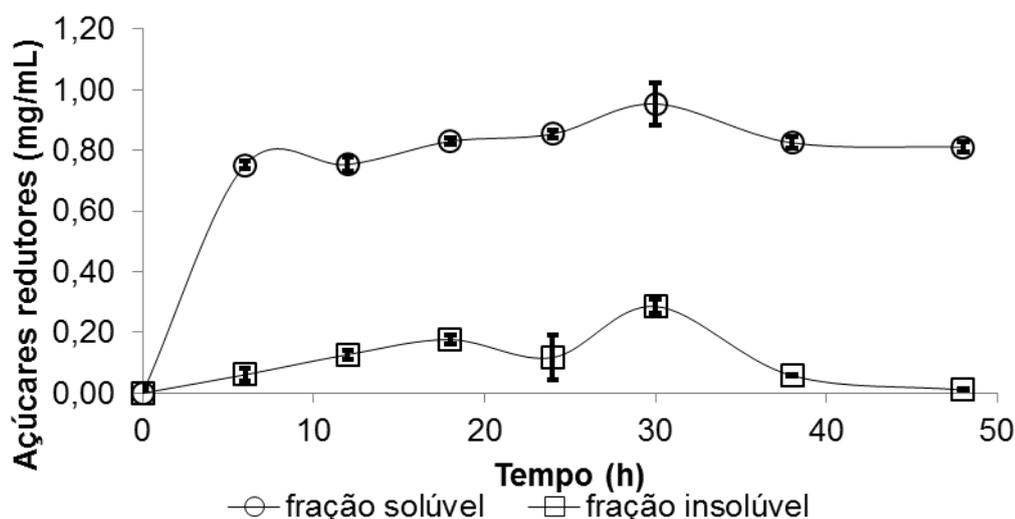


Figura 20 - Hidrólise da xilana de bétula pela Xyl. Açúcares redutores avaliados por DNS.

A taxa de hidrólise na fração solúvel da xilana de bétula aumenta significativamente nas primeiras seis horas, atingindo o pico de liberação de açúcares redutores após 30h. No intervalo de 30 a 48 horas ocorre uma tênue diminuição na liberação desses açúcares. De forma semelhante, na fração insolúvel da xilana observa-se um aumento gradual na taxa de hidrólise, com uma maior liberação de açúcares redutores, também, no tempo de 30h. Após este tempo, a liberação de açúcares redutores é drasticamente reduzida.

A maior taxa de hidrólise observada para a fração solúvel da xilana de bétula pode indicar ramificações presentes em maior quantidade na xilana solúvel que

funcionam como sítios de ligação para a atividade catalítica de Xyl. É possível que a enzima interaja quimicamente com essas ramificações, em outros locais além do seu sítio catalítico, a fim de se manter firme sobre o substrato. A ausência de tais ramificações na xilana insolúvel impediria a adsorção de Xyl ao substrato, resultando, desta forma, em baixa atividade enzimática (Milanezi *et al.*, 2012; Moreira, 2013).

Resultados similares, com maior taxa de hidrólise para fração solúvel da xilana foram observados por Ryan *et al.* (2003) utilizando uma xilanase purificada de *Penicillium capsulatum* para a hidrólise da xilana de faia e por Duarte *et al.* (2012) para uma xilanase purificada de *Aspergillus oryzae* para a hidrólise da xilana de bétula (Ryan *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2012).

Para avaliar a liberação de pentoses e hexoses, foi realizado o ensaio com Orcinol férrico. Nesse ensaio, a presença do HCl transforma o açúcar redutor em furfural. O furfural reage com o orcinol na presença dos íons férricos formando um complexo colorido que pode ser detectado em absorvâncias de 520 nm (pentoses) e 660 nm (hexoses).

O ensaio de orcinol férrico mostrou uma liberação gradual de pentoses. Para a fração solúvel da xilana de bétula e a maior liberação ocorreu após 24 horas de hidrólise (4,62 mg/mL). Por outro lado, para a fração insolúvel da xilana, a maior liberação ocorreu após 30 horas de hidrólise (3,77 mg/mL) (Figura 21).

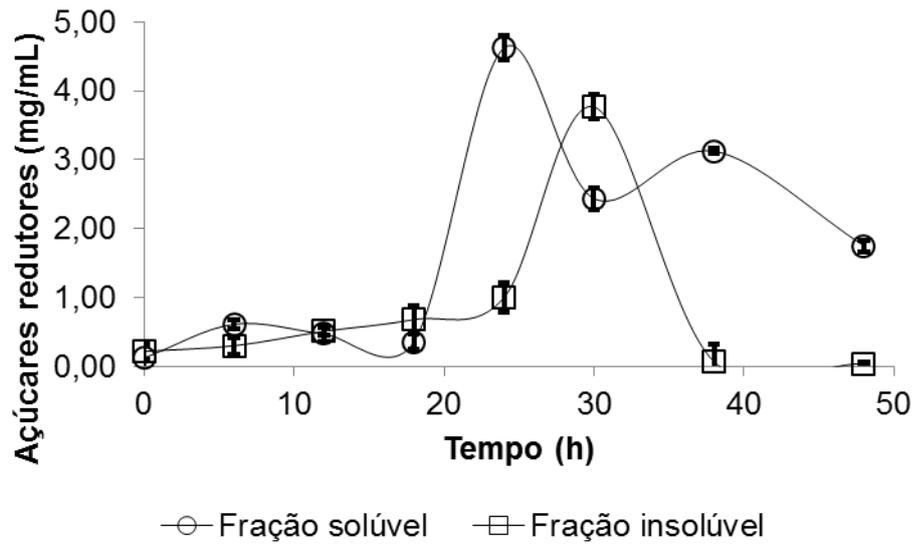


Figura 21 - Hidrólise da xilana de bétula pela Xyl. Açúcares redutores avaliados por orcinol-férrico a 660 nm (pentose).

A maior liberação de hexoses na xilana solúvel foi observada após 24 h de hidrólise (2,13 mg/mL). Na xilana insolúvel, o pico de liberação de hexoses, foi observado após 6 horas de hidrólise (0,39 mg/mL) (Figura 22).

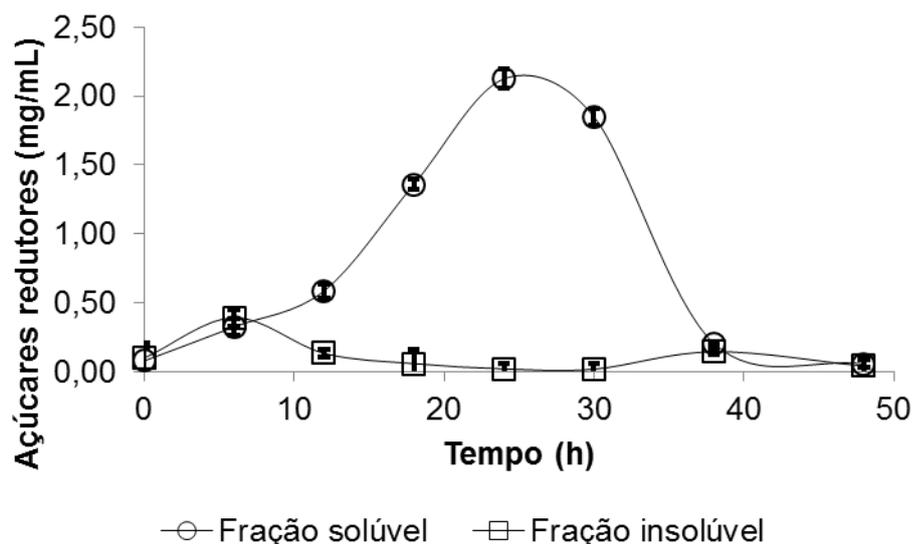


Figura 22 - Hidrólise da xilana de bétula pela Xyl. Açúcares redutores avaliados por orcinol-férrico a 520 nm (hexose).

A xilana é um polímero constituído por uma cadeia linear ligada por resíduos de β -1,4-D-xilopiranosose, que podem apresentar diferentes ramificações. Os principais açúcares presentes na xilana são D-xilose e L-arabinose (pentoses) e em menor quantidade, D-galactose, D-glicose e D-manose (hexoses) (Squina *et al.*, 2009).

Ao analisar a hidrólise da xilana pelo método do orcinol férrico, a 660 nm todas as pentoses são detectadas, incluindo resíduos de D-xilose e L-arabinose. O mesmo ocorre na detecção a 520 nm para as hexoses. A detecção de açúcares redutores pelo método, mesmo utilizando xilose como padrão, não diferencia os açúcares redutores de xilose ou xilooligômeros mais complexos. Contudo, a maior liberação de pentoses em comparação com a liberação de hexoses evidencia que a atividade da Xyl ocorre principalmente sobre a xilana.

A análise por CLAE mostrou que na hidrólise da xilana de bétula 1% por Xyl foram liberados xilose, xilobiose e xilotriose, sendo que houve maior liberação de xilose e XOS no momento inicial de hidrólise (0h). A quantidade dos produtos de hidrólise liberada ao longo do tempo diminui com o decorrer do tempo. As figuras 23 e 24 mostram o resultado da liberação dos produtos ao longo do tempo para as frações solúveis e insolúveis da xilana de bétula.

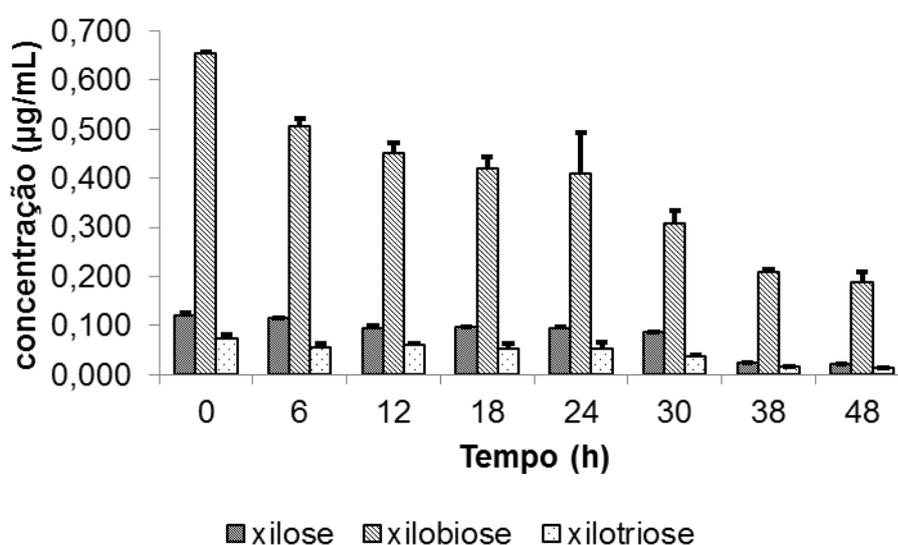


Figura 23 - Liberação de xilooligossacarídeos durante a hidrólise da fração solúvel da xilana de bétula em função do tempo.

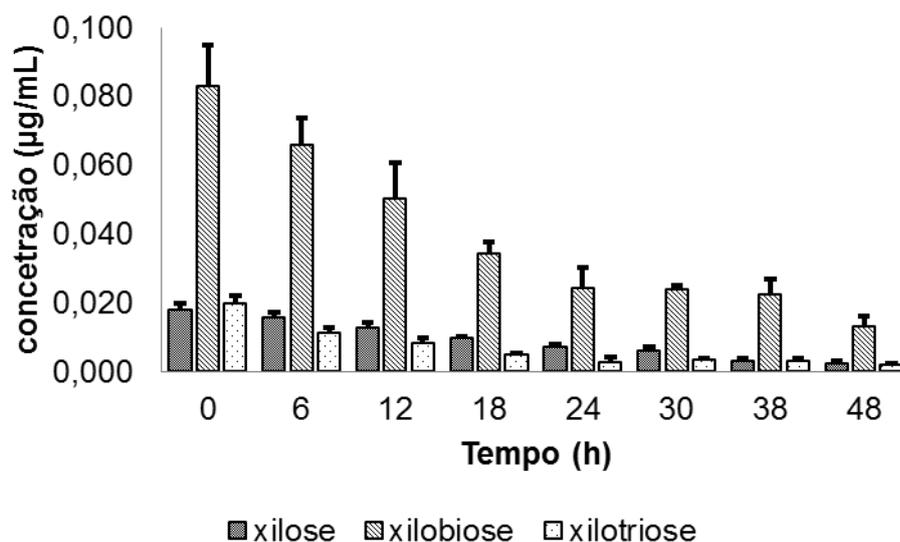


Figura 24 - Liberação de xilooligossacarídeos durante a hidrólise da fração insolúvel da xilana de bétula em função do tempo.

A identificação e análise quantitativa dos XOS solúveis que foram liberados indicam que a enzima catalisa a clivagem das ligações glicosídicas internas nas frações solúveis e insolúveis da xilana. A xilana de bétula é inicialmente degradada, formando xilose, xilobiose e xilotriose. No decorrer do tempo da hidrólise enzimática, a concentração de xilotriose diminui, sugerindo sua degradação (Berens, Kaspari e Klemme, 1996).

Os resultados da análise por CLAE podem parecer contraditórios em relação aos dados de liberação de açúcares totais e pentoses, entretanto, como no CLAE só foram detectados XOS contendo seis ou menos unidade de D-xilose, é possível inferir que produtos com maior grau de polimerização não puderam ser identificados, assim como açúcares redutores contendo outro resíduo que não D-xilose.

Neste trabalho, desde o tempo inicial, é possível detectar a xilose. Em geral, poucos trabalhos relatam que a liberação de xilose por xilanases nos ensaios de hidrólise. No entanto, alguns trabalhos citam a liberação de xilose nos ensaios. Berens, Kaspari e Klemme (1996) observaram que xilanases purificadas de *Microtetraspora flexuosa* liberaram xilose em quantidades significativas na presença da xilana de aveia (Berens, Kaspari e Klemme, 1996).

Sugere-se que o mecanismo catalítico da Xyl é do tipo “exo”. A Xyl tem capacidade de hidrolisar a xilana e utilizar os produtos formados (preferencialmente xilotriose) como substrato para formação de novos XOS com maior grau de polimerização ou a xilotriose pode ser hidrolisada formando xilobiose e xilose. Um mecanismo similar foi descrito para a ação de uma xilanase de *Acrophialophora nainiana* e de *Trichoderma viride* (Ujiie, Roy e Yaguchi, 1991; Ximenes *et al.*, 1999).

A Figura 25 mostra um exemplo de cromatograma obtido com o hidrolisado da Xyl, no tempo de 12 horas, evidenciando os picos de identificação de xilose, xilobiose e xilotriose.

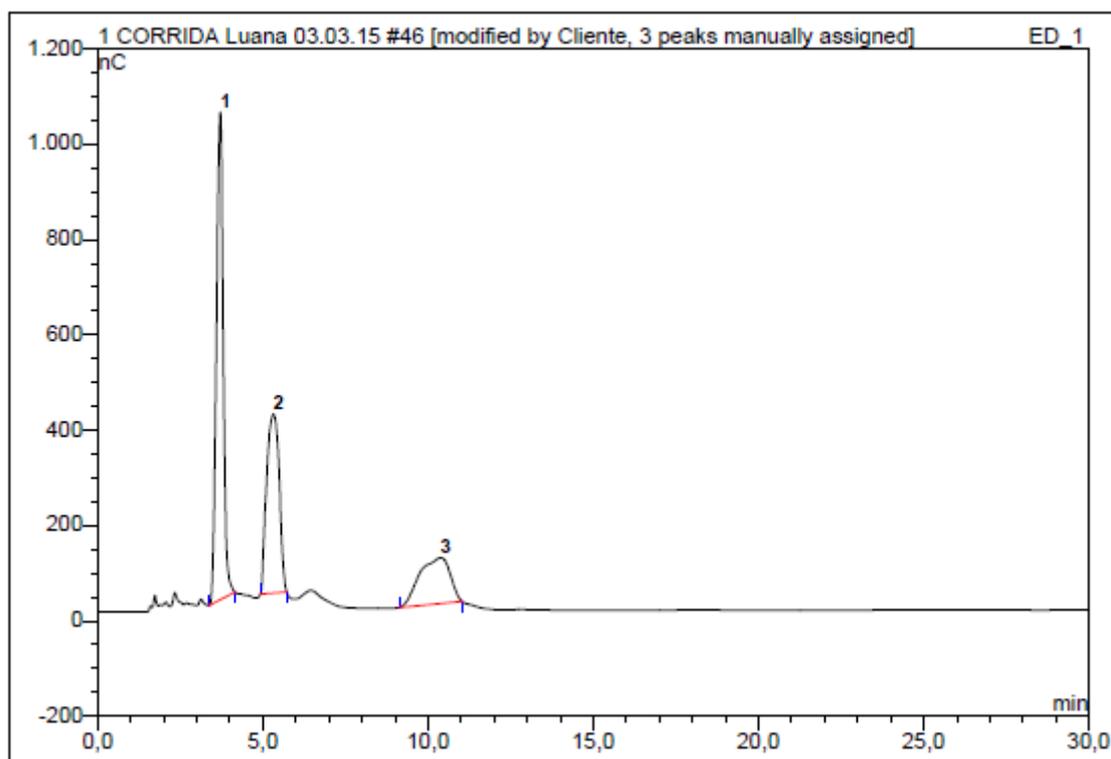


Figura 25 - Detecção por CLAE dos produtos formados pela hidrólise da xilana de bétula, com 12 horas de incubação, pela enzima Xyl. Xilose (1), xilobiose (2) e xilotriose (3).

5.4.10 Análise estrutural da Xyl

5.4.10.1 Monitoramento por fluorescência

Após a purificação e tratamento da amostra para retirada do corante eluido juntamente com a proteína, a Xyl desalinizada e sem corante apresentou uma concentração de 2,0 µg/mL. Essa amostra foi utilizada para os ensaios de fluorescência e dicroísmo circular. Conforme observado na figura 26, os espectros de fluorescência nos pHs 5,0 e 7,0 são semelhantes, apresentando bandas de emissão em aproximadamente 328 nm, deslocadas em relação ao espectro de emissão obtido em pH 9,0 de 2,3 nm e 1,4 nm, respectivamente. No pH 9,0, o espectro de emissão apresenta diminuição da intensidade de fluorescência com banda em aproximadamente 330 nm.

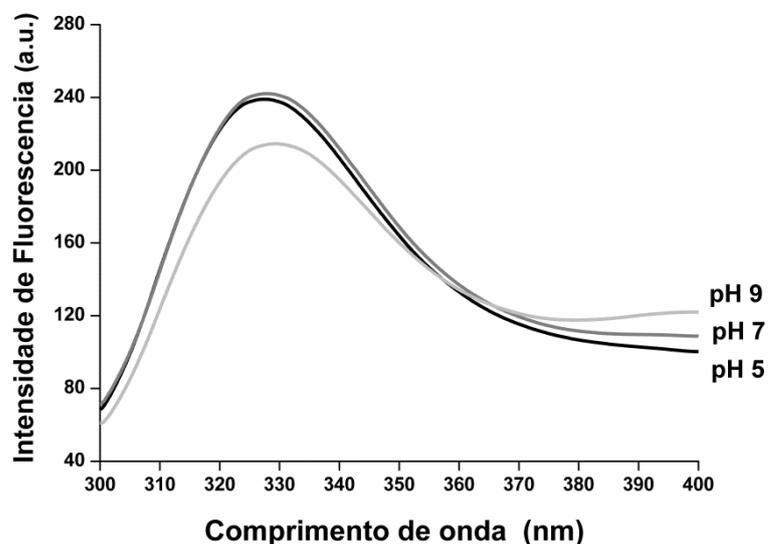


Figura 26 – Espectro de emissão de fluorescência da Xyl em tampão acetato 3 mM pH 5,0, tampão Tris-HCl 3 mM pH 7,0 e 9,0.

As bandas de emissão nos pHs 5,0 e 7,0 indicam que o triptofano encontra-se em ambientes mais hidrofóbicos da proteína. A diminuição do sinal do espectro da

Xyl e o seu respectivo deslocamento para comprimentos de onda maiores em pH 9,0 indica que o ambiente molecular do triptofano é mais hidrofílico, comparado aos pHs 5,0 e 7,0. Essa transição do ambiente molecular do triptofano dependente do pH sugere que modificações conformacionais ocorreram devido a diferenças no estado iônico da proteína, causado pela desprotonação, principalmente de grupamentos amino de resíduos de histidina. A desprotonação destes grupamentos pode causar ruptura e formação de novas ligações não covalentes no ambiente do triptofano, levando a menor intensidade do sinal, como observado no espectro da Xyl em pH 9,0 em comparação com os pHs 5,0 e 7,0 (Bushueva e Tonevitsky, 1987).

O triptofano em diferentes regiões da proteína reflete em alterações conformacionais. Dentre as alterações, inclui-se repulsão eletrostática, quebra de ligações de hidrogênio e cargas isoladas, que podem resultar até mesmo na perda ou diminuição da atividade enzimática (Nath e Rao, 2001). Desta forma, as diferenças na atividade da Xyl pode ser resultado da alteração do estado iônico da proteína sob o efeito dos diferentes pHs.

O resultado do ensaio de fluorescência pode ser correlacionado com o ensaio de pH ótimo da Xyl (item 5.4.2) que apresentou melhor atividade de xilanase em pH 5,0. Em pHs 7,0 e 9,0, a Xyl apresentou uma atividade residual de 85% e 60%, respectivamente.

Os resultados encontrados estão de acordo com o trabalho de Nath e Rao (2001), que analisou o efeito do pH em uma xilanase purificada de *Bacillus sp.* A xilanase apresentou um menor sinal de intensidade com um deslocamento (4 nm) do pico de emissão sob o efeito de pH na faixa de 8,0 – 10,0 (Nath e Rao, 2001).

5.4.10.2 Monitoramento por Dicroísmo Circular

A técnica de dicroísmo circular (CD) permite o estudo estrutural de macromoléculas, apresentando vantagens como a pequena quantidade de amostra necessária para os ensaios, análises rápidas e em solução, fácil tratamento dos dados e não destruição da amostra, com exceção das amostras submetidas à desnaturação térmica ou química. Os espectros na região distante do UV (190 – 260

nm) fornecem informações de estruturas secundárias e de mudanças conformacionais de proteínas (Kelly e Price, 2000).

As figuras 27, 28 e 29 mostram a termoestabilidade da xilanase quando incubadas em tampões de pH 5,0; 7,0 e 9,0, respectivamente. Para a análise, a temperatura variou de 25°C a 95°C.

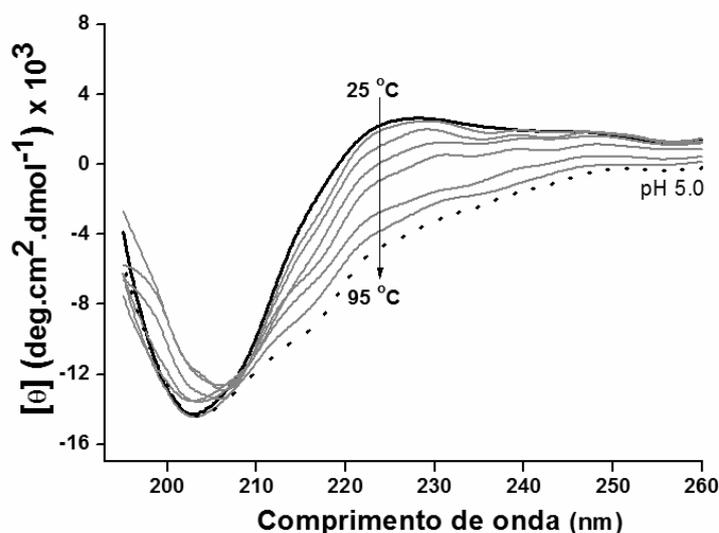


Figura 27 – Espectros de dicroísmo circular na região distante do ultravioleta da Xyl em tampão acetato 3 mM pH 5,0 e em temperaturas variando de 5 a 95°C.

Em pH 5,0, a Xyl apresentou estabilidade térmica com ocorrência de alterações leves na sua estrutura secundária, conforme indicado pelas mudanças no perfil dicróico, principalmente na faixa de 220 – 230 nm. Além disso, observa-se um deslocamento da banda dicróica de 203 para 208 nm com aumento da temperatura. A banda de 208 nm indica a presença de alfa-hélices na estrutura secundária, com alteração mínima de $-281,05 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ da elipticidade observada.

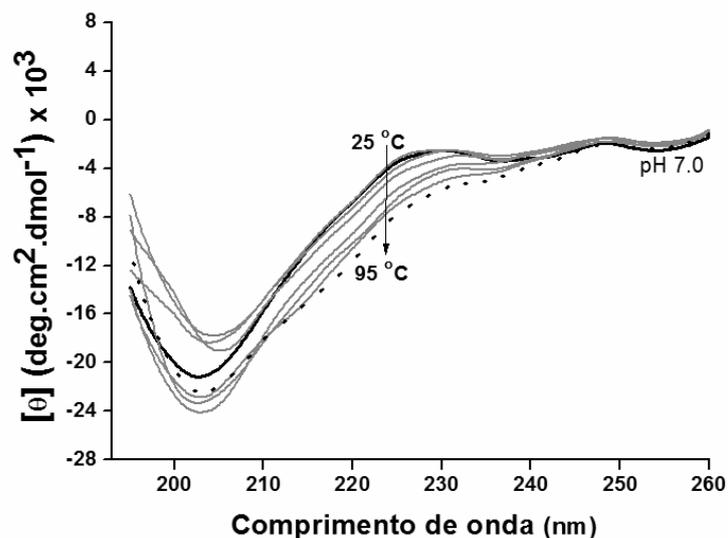


Figura 28 - Espectros de dicroísmo circular na região distante do ultravioleta da Xyl em tampão Tris-HCl 3 mM pH 7,0 e em temperaturas variando de 25 a 95°C.

Em pH 7,0, a Xyl apresentou estabilidade estrutural similar ao pH 5, indicada pela variação mínima do sinal dicróico, com concomitante deslocamento da banda de 203 nm para 208 nm em temperaturas mais elevadas. A faixa de maior variação nos valores da elipticidade ocorreu no intervalo de 200 – 210 e de 220 – 230 nm. Em 208 nm, a variação da elipticidade foi de $-572,84 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$.

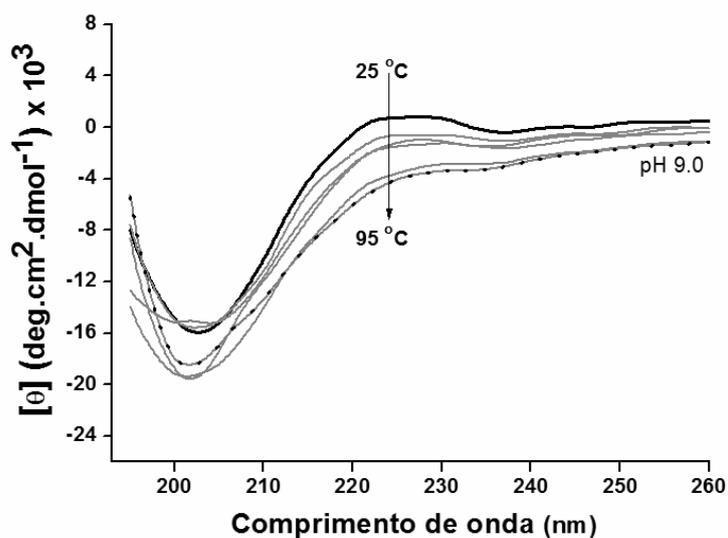


Figura 29 - Espectros de dicroísmo circular na região distante do ultravioleta da Xyl em tampão Tris-HCl 3 mM pH 9,0 e em temperaturas variando de 25 a 90°C.

Os espectros obtidos em pH 9,0 apresentaram variações mínimas na intensidade do sinal dicróico em 203 nm, sem deslocamento dessa banda para maiores comprimentos de onda, como foi observado para os pHs 5,0 e 7,0. A faixa de maior variação nos valores da elipticidade ocorreu no intervalo de 220 – 230 nm. Em 208 nm, a variação da elipticidade foi de $-754,51 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$.

Todas as alterações observadas para os espectros dicróicos nos três diferentes pHs sugerem que as estruturas secundárias podem ter sido alteradas sob o efeito do aumento da temperatura, além das mudanças conformacionais.

A Figura 30 mostra os espectros de dicroísmo circular da Xyl em pHs 5,0, 7,0 e 9,0 na temperatura de 25°C. Os espectros apresentam o mesmo perfil dicróico com variação na intensidade do sinal em 203 nm, indicando alteração da absorção e pouca variação da estrutura secundária da Xyl, conforme mostrado na Tabela 12. A intensidade da elipticidade das bandas diminuiu com o aumento do pH, alcançando menor valor do sinal dicróico para a Xyl incubada em pH 5,0.

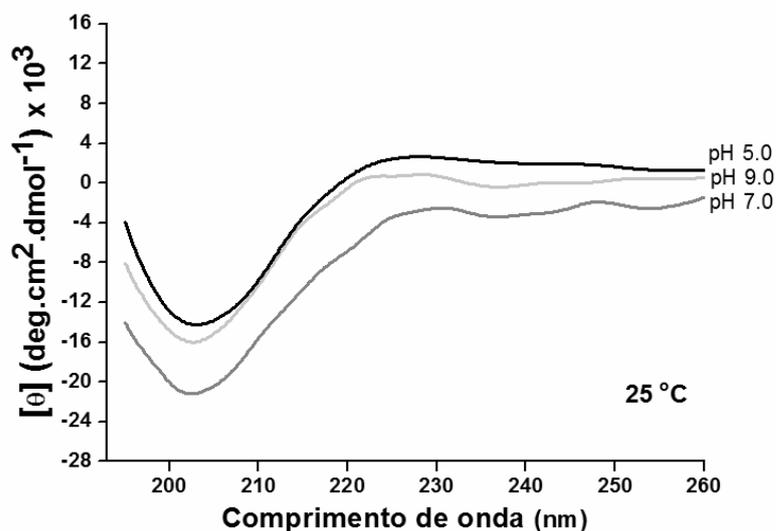


Figura 30 – Espectro de dicroísmo circular na região distante do ultravioleta da Xyl em pHs 5,0; 7,0; 9,0 na temperatura de 25°C.

Tabela 12 – Comparação das porcentagens de estrutura secundária da Xyl nos pHs 5,0; 7,0; 9,0 na temperatura de 25°C.

Estrutura secundária (%)	pH 5,0	pH 7,0	pH 9,0
Alfa hélice	3,7	5,7	3,3
β -antiparalela	41,6	41,7	45,2
β -paralela	2,2	3,1	2,5
Volta- β	21,8	20,7	22,4
Randômica	30,1	29,9	27,6

Os espectros apresentam uma banda negativa com sinal próximo a 203 nm e bandas com sinais positivos em algumas regiões do espectro. Esse perfil é indicativo de uma estrutura com baixo conteúdo de α -hélice em comparação com folhas β . A fração de α -hélice, como relatado em outros trabalhos de xilanases de baixa massa molecular (Breccia *et al.*, 1998), está presente em menor porcentagem, conforme apresentado na Tabela 12.

O baixo percentual de α -hélice (~3 - 6%) e alto percentual de folhas β (~43 - 48%), em todos os pHs analisados, permitem sugerir que a Xyl pertence à Família 11. O resultado é similar aos reportados na literatura, em que xilanases da Família 11, apresentam aproximadamente de 3 - 5% de estruturas α -hélice e maior percentual de folhas β (Hurlbert e Preston, 2001). As estruturas secundárias variaram pouco com o pH, conforme apresentado na Tabela 12.

A estabilidade da estrutura secundária da Xyl em pHs 5,0, 7,0 e 9,0 analisada em diferentes temperaturas está representada nas curvas de desnaturação térmica mostradas na Figura 31.

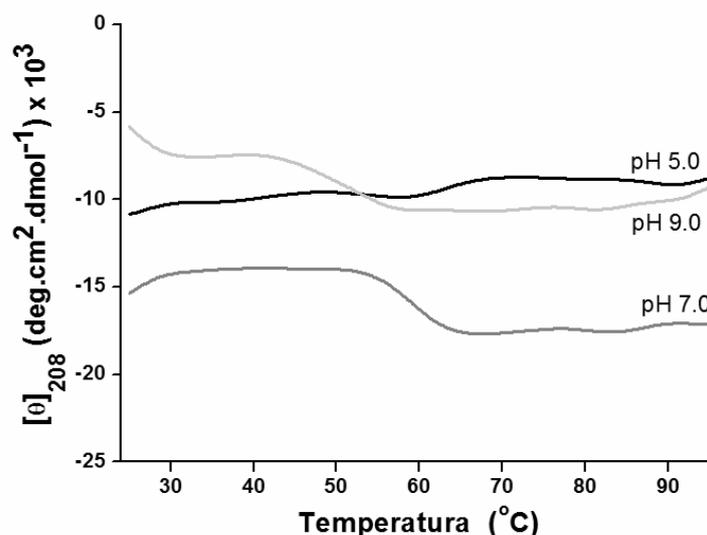


Figura 31 – Perfil da desnaturação térmica da Xyl em pHs 5,0; 7,0 e 9,0. A Xyl foi submetida a um gradiente de temperatura ($1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) em tampão acetato de sódio 3 mM pH 5,0 e em tampão Tris-HCl 3 mM pH 7,0 e 9,0 com constante monitoramento da elipticidade a 208 nm.

O perfil linear da curva de desnaturação térmica da Xyl em pH 5,0 indica que esta proteína é termoestável, preservando sua estrutura nativa. No entanto, modificações nas intensidades dicróicas observadas nos espectros variando de 260 – 190 nm (Figura 27) sugerem leves mudanças conformacionais e de estrutura secundária. Esses resultados corroboram com aqueles obtidos para os ensaios de atividade enzimática da Xyl em diferentes temperaturas (4.11.1), nos quais a enzima manteve sua atividade residual em até 70% no intervalo de 20 a 60°C. A atividade residual diminuiu drasticamente na temperatura de 70 a 90°C. Esses dados podem ser decorrentes de poucas modificações na estrutura terciária e secundária da proteína que desfavorece o acesso do substrato na região do sítio catalítico da enzima, resultando em uma menor atividade enzimática nessa faixa de temperatura.

Nos pHs 7,0 e 9,0, as curvas de desnaturação térmica apresentam perfil do tipo sigmoidal, com faixas de transição ocorrendo no intervalo de 50°C - 60°C, atingindo valores dicróicos máximos em 67-68°C para ambos os valores de pH. Esta mudança no sinal dicróico está relacionado com o aumento da absorção, condizente com mudanças da estrutura secundária ou com processo de agregação protéica. No entanto, para concluir sobre esses resultados, outros ensaios envolvendo técnicas espectroscópicas são necessários.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho nos permite concluir que:

- O fungo *Aspergillus foetidus* produz enzimas com atividade de xilanases em presença de casca de soja, sendo a casca de soja uma eficiente fonte de carbono para o fungo ao longo de 20 dias;
- O planejamento fatorial com análise de superfície resposta permitiu a construção de um modelo matemático significativo para as variáveis pH, temperatura e agitação, onde o ponto máximo de produção de xilanase foi a 120 rpm, 28°C, pH 7,0;
- A Xyl purificada apresentou um tamanho estimado de 14,19 kDa, o que possibilita sua aplicação na degradação de resíduos lignocelulósicos;
- Os estudos de caracterização da enzima sugerem que a Xyl pertença à família GH11;
- Em princípio, as características da Xyl sugere que sua maior aplicabilidade encontra-se na indústria de branqueamento de celulose.

7 PERSPECTIVAS

- Análise por espectrometria de massa da Xyl.
- Determinação da curva de crescimento do fungo *Aspergillus foetidus* em casca de soja 2% pelo método do ergosterol.
- Os resultados da caracterização da Xyl demonstraram a possibilidade da aplicação desta enzima em processos industriais. O conhecimento das habilidades de Xyl deve ser utilizado de forma a potencializar seu desempenho enzimático em cada processo industrial a ser testado.

8 REFERÊNCIAS

AFZAL, A. et al. Innovative kinetic and thermodynamic analysis of a purified superactive xylanase from *Scopulariopsis* sp. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 120, n. 1, p. 51-70, 2005.

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

AQUINO, V. **Estudo da estrutura de massas de pães elaboradas a partir de diferentes processos fermentativos**. 2012. p. 87 (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005.

AZEVEDO, M. **Diferentes processos de branqueamento da celulose e seus efeitos nas propriedades físicas e cristalinidade**. 2011. p. 158 (Doutorado). Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2011.

BAJAJ, B.; MANHAS, K. Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11 (C) with potential for fruit juice and bakery industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 330-337, 2012.

BEDFORD, M. R. et al. **Enzyme feed additive and animal feed**. GENECOR INTERNATIONAL, I. e LIMITED, F. I.: United States Patent. US005612055A, 1997.

BELTRAMINO, F. et al. Exploring the effects of treatments with carbohydrases to obtain a high-cellulose content pulp from a non-wood alkaline pulp. **Carbohydrate polymers**, v. 133, p. 302-312, 2015.

BERENS, S.; KASPARI, H.; KLEMME, J.-H. Purification and characterization of two different xylanases from the thermophilic actinomycete *Microtetraspora flexuosa* S11X. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 69, n. 3, p. 235-241, 1996.

BERGQUIST, P. et al. Production of recombinant bleaching enzymes from thermophilic microorganisms in fungal hosts. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 98, n. 1-9, p. 165-176, 2002.

BHUSHAN, B. et al. Biochemical characterization and kinetic comparison of encapsulated haze removing acidophilic xylanase with partially purified free xylanase isolated from *Aspergillus flavus* MTCC 9390. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 191-200, 2015.

BOKHARI, S.; LATIF, F.; RAJOKA, M. Purification and characterization of xylanases from *Thermomyces lanuginosus* and its mutant derivative possessing novel kinetic and thermodynamic properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 493-502, 2009.

BOKHARI, S. et al. Novel thermodynamics of xylanase formation by a 2-deoxy-D-glucose resistant mutant of *Thermomyces lanuginosus* and its xylanase potential for biobleachability. **Bioresource technology**, v. 101, n. 8, p. 2800-2808, 2010.

BORASTON, A. et al. Binding specificity and thermodynamics of a family 9 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima* xylanase 10A. **Biochemistry**, v. 40, n. 21, p. 6240-6247, 2001.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Resolução RDC nº 90, de 18 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de pão. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2000. Disponível em: < portal.anvisa.gov.br >. Acesso em: 10 de fevereiro de 2016.

BRASIL. Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2005. Disponível em: < portal.anvisa.gov.br >. Acesso em: 10 de fevereiro de 2016.

BRASILEIRO, L. B.; COLODETTE, J. L.; PILÓ-VELOSO, D. A utilização de perácidos na deslignificação e no branqueamento de polpas celulósicas. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 819-829, 2001.

BRECCIA, J. D. et al. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 1, p. 42-49, 1998.

BUCHERT, J. et al. Application of xylanases in the pulp and paper industry. **Bioresource Technology**, v. 50, n. 1, p. 65-72, 1994.

BUSHUEVA, T.; TONEVITSKY, A. The effect of pH on the conformation and stability of the structure of plant toxin—ricin. **FEBS letters**, v. 215, n. 1, p. 155-159, 1987.

BUTT, M. et al. Xylanases and their applications in baking industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 22-31, 2008.

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

CASTRO, H. **Processos Químicos Industriais II. Faculdade de engenharia química de Lorena. Departamento de engenharia química. Apostila 4, 2009.**

CHAPLIN, M. F.; KENNEDY, J. F. **Carbohydrate analysis: a practical approach.** 3.ed. IRL Press Ltd: 1994.

CHIDI, S. et al. Production, purification and characterization of cellulase-free xylanase from *Aspergillus terreus* UL 4209. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 21, p. 3939-3948, 2008.

CHIVERO, E. T.; MUTUKUMIRA, A. N.; ZVAUYA, R. Partial purification and characterisation of a xylanase enzyme produced by a micro-organism isolated from selected indigenous fruits of Zimbabwe. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 179-185, 2001.

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

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

Companies and Markets. 2015. Disponível em: < www.companiesandmarkets.com >. Acesso em: 10/11/2015.

D'AMICO, S. et al. Activity-stability relationships in extremophilic enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 7891-7896, 2003.

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

DELABONA, P. et al. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 236-242, 2013.

DHIMAN, S.; SHARMA, J.; BATTAN, B. Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review. **BioResources**, v. 3, n. 4, p. 1377-1402, 2008.

DILLON, G. et al. Validation of an Analytical Method for the Determination of the Activity of Xylanase in Animal Feed Additives and in Animal Feedingstuffs. **Journal of Applied Animal Nutrition**, v. 3, p. 1-11, 2015.

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

DUMON, C. et al. Engineering hyperthermostability into a GH11 xylanase is mediated by subtle changes to protein structure. RCSB protein data bank, 2008. Disponível em: < <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2VUL> >. Acesso em: 16 de fevereiro de 2016.

EMBRAPA. Embrapa Soja. 2016. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos> >. Acesso em: 17/01/2016.

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

FARINAS, C. et al. Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. **New Biotechnology**, v. 27, p. 810-815, 2010.

FAULET, B. et al. Purification and biochemical properties of a new thermostable xylanase from symbiotic fungus, *Termitomyces* sp. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 273-282, 2006.

FERRACIN, L. et al. Genetic relationships among strains of the *Aspergillus niger* aggregate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 241-248, 2009.

FERREIRA, E.; PULS, J.; COUGHLAN, M. Biochemical characteristics of two endo- β -1, 4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. **Journal of industrial microbiology**, v. 11, n. 3, p. 171-180, 1993.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.; VAN ELSAS, J. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 243-270, 2004.

GHOSE, T. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GLASS, N. L. et al. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Annual review of microbiology**, v. 67, p. 477-498, 2013.

GOLUGURI, B. et al. 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. et al. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química nova**, v. 30, n. 1, p. 136, 2007.

GOMES, H. **Perfil e caracterização de holocelulases secretadas por *Penicillium fellutanum* com ênfase em mananase**. 2014. p. 66 (Mestrado). Departamento de Biologia microbiana, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

GÜBITZ, G. et al. Enzymatic removal of hemicellulose from dissolving pulps. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 5, p. 491-495, 1997.

HALTRICH, D.; STEINER, W. Formation of xylanase by *Schizophyllum commune*: effect of medium components. **Enzyme and microbial technology**, v. 16, n. 3, p. 229-235, 1994.

HAQ, I. et al. Kinetic and thermodynamic study of cloned thermostable endo-1, 4- β -xylanase from *Thermotoga petrophila* in mesophilic host. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 7, p. 7251-7261, 2012.

HARRIS, A.; RAMALINGAM, C. Xylanases and its application in food industry: a review. **Journal of Experimental Sciences**, v. 1, n. 7, p. 1-11, 2010.

HAYASHI, S. et al. Utilisation of soybean residue for the production of β -fructofuranosidase. **Bioresource technology**, v. 41, n. 3, p. 231-233, 1992.

HE, H. et al. Purification and Characterization of a Thermostable Hypothetical Xylanase from *Aspergillus oryzae* HML366. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 6, p. 3148-3161, 2015.

HECK, J.; HERTZ, P.; AYUB, M. Cellulase and xylanase productions by isolated Amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 213-218, 2002.

HEGDE, S. et al. Thermodynamics of ligand (substrate/end product) binding to endoxylanase from *Chainia* sp. (NCL-82-5-1): isothermal calorimetry and fluorescence titration studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1388, n. 1, p. 93-100, 1998.

HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2012.

HU, H. et al. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 248-252, 2011.

HURLBERT, J. C.; PRESTON, J. F. Functional characterization of a novel xylanase from a corn strain of *Erwinia chrysanthemi*. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 6, p. 2093-2100, 2001.

IBARRA, D. et al. Combination of alkaline and enzymatic treatments as a process for upgrading sisal paper-grade pulp to dissolving-grade pulp. **Bioresource technology**, v. 101, n. 19, p. 7416-7423, 2010.

JEFFRIES, T. Biochemistry and genetics of microbial xylanases. **Current opinion in Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 337-342, 1996.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. **Current protein and peptide science**, v. 1, n. 4, p. 349-384, 2000.

KIRK, O.; BORCHERT, T.; FUGLSANG, C. Industrial enzyme applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

KLOCK, U.; ANDRADE, A. **Química da madeira**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. v. 3, 2005.

KRISANA, A. et al. Endo-1,4-beta-xylanase B from *Aspergillus cf. niger* BCC14405 isolated in Thailand: Purification, characterization and gene isolation. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 1, p. 17, 2005.

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

KUMAR, L. et al. Immobilization of xylanase purified from *Bacillus pumilus* VLK-1 and its application in enrichment of orange and grape juices. **Journal of food science and technology**, v. 51, n. 9, p. 1737-1749, 2014.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.

KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. Applicability of thermo-alkali-stable and cellulase-free xylanase from a novel thermo-halo-alkaliphilic *Bacillus halodurans* in producing xylooligosaccharides. **Biotechnology letters**, v. 33, n. 11, p. 2279-2285, 2011.

KUMAR, V. B.; SATYANARAYANA, T. Biochemical and thermodynamic characteristics of thermo-alkali-stable xylanase from a novel polyextremophilic *Bacillus halodurans* TSEV1. **Extremophiles**, v. 17, n. 5, p. 797-808, 2013.

LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANGARICA-FUENTES, A. et al. An investigation of the biodiversity of thermophilic and thermotolerant fungal species in composts using culture-based and molecular techniques. **Fungal Ecology**, v. 11, p. 132-144, 2014.

LEATHERBARROW, R. Enzfitter Manual, a non-linear curve fitting program for Windows. **Biosoft, London**, p. 1-104, 1999.

LEE, W. et al. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). **Journal of food Engineering**, v. 73, n. 1, p. 55-63, 2006.

LI, J. et al. Enhancing hemicelluloses removal from a softwood sulfite pulp. **Bioresource technology**, v. 192, p. 11-16, 2015.

LOMBARD, V. et al. The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy). Disponível em: < <http://www.cazy.org/> >. Acesso em: 17/01/2016.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MAGALHÃES, P. D. O. **Purificação de hemicelulases e de uma B-glicosidase de Ceriopsis Subvermispora produzidas em condições de biopolpação**. 2005. p. 131 (Doutorado). Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, São Paulo, 2005.

MARANGONI, A. G. **Enzyme kinetics: a modern approach**. 1 ed. Hoboken, New Jersey: 2003.

MATUDA, T. **Análise térmica da massa de pão francês durante os processos de congelamento e descongelamento: otimização do uso de aditivos**. 2004. p. 142 (Mestrado). Departamento de Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

MELLON, J. E. et al. Identification of a major xylanase from *Aspergillus flavus* as a 14-kD protein. **Mycopathologia**, v. 172, n. 4, p. 299-305, 2011.

MEYER, T. et al. Biotechnological Production of Oligosaccharides—Applications in the Food Industry. In: EISSA, P. A. A. (Ed.). **Agricultural and Biological Sciences - Food Production and Industry**. Food Production and Industry, 2015.

MICHELIN, M. et al. Production and properties of xylanases from *Aspergillus terricola* Marchal and *Aspergillus ochraceus* and their use in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 33, n. 7, p. 813-821, 2010.

MIELENZ, J.; BARDSLEY, J.; WYMAN, C. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3532-3539, 2009.

MILANEZI, N. et al. Isolation and Characterization of a Xylan-Degrading Enzyme from *Aspergillus niger* van Tieghem LPM 93 with Potential for Industrial Applications. **BioEnergy Research**, v. 5, n. 2, p. 363-371, 2012.

MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOHANA, S. et al. Xylanase production by *Burkholderia* sp. DMAX strain under solid state fermentation using distillery spent wash. **Bioresource technology**, v. 99, n. 16, p. 7553-7564, 2008.

MORAIS, S. A.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Chemical analysis of *Pinus oocarpa* wood part I: quantification of macromolecular components and volatile extractives. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

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

MOREIRA, L. R. et al. The hydrolysis of agro-industrial residues by holocellulose-degrading enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 498-505, 2012.

MOREIRA, L. R. D. S. **Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus*: caracterização, degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos**. 2013. p. 272 (Doutorado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

NAGAR, S.; MITTAL, A.; GUPTA, V. Enzymatic clarification of fruit juices (Apple, Pineapple, and Tomato) using purified *Bacillus pumilus* SV-85S xylanase. **Biotechnology and Bioprocess engineering**, v. 17, n. 6, p. 1165-1175, 2012.

NATH, D.; RAO, M. pH dependent conformational and structural changes of xylanase from an alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp (NCIM 59). **Enzyme and microbial technology**, v. 28, n. 4, p. 397-403, 2001.

NOGUEIRA, S. et al. Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 149-155, 2009.

O'SULLIVAN, A. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, n. 3, p. 173-207, 1997.

ORTEGA, N. et al. Kinetic behaviour and thermal inactivation of pectinlyase used in food processing. **International journal of food science & technology**, v. 39, n. 6, p. 631-639, 2004.

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

PANAGIOTOU, G.; OLSSON, L. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 250-258, 2007.

PANTHI, S. et al. Biochemical and Thermodynamic Characterization of a Novel, Low Molecular Weight Xylanase from *Bacillus Methylophilus* CSB40 Isolated from Traditional Korean Food. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-17, 2016.

PAËS, G.; BERRIN, J.-G.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanases: structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 564-592, 2012.

PESSOA, A.; KILIKIAN, B. **Purificação de produtos biotecnológicos**. São Paulo: 2005.

PETRESCU, I. et al. Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae*. **Extremophiles**, v. 4, n. 3, p. 137-144, 2000.

PIRES, S. R. **Enzimas celulolíticas fúngicas e aplicação no branqueamento de polpa Kraft e na sacarificação de biomassa lignocelulósica**. 2013. (Doutorado). Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2013.

POLIZELI, M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

PRADEEP, G. et al. A novel thermostable cellulase free xylanase stable in broad range of pH from *Streptomyces* sp. CS428. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1188-1196, 2013.

RALPH, J. et al. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, n. 1-2, p. 29-60, 2004.

ROMANOWSKA, I.; POLAK, J.; BIELECKI, S. Isolation and properties of *Aspergillus niger* IBT-90 xylanase for bakery. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 665-671, 2006.

ROSS, P.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, v. 20, n. 11, p. 3096-3102, 1981.

RYAN, S. E. et al. Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p. 775-785, 2003.

RYE, C.; WITHERS, S. Glycosidase mechanisms. **Current opinion in chemical biology**, v. 4, n. 5, p. 573-580, 2000.

SALIHU, A.; BALA, S. M.; OLAGUNJU, A. A Statistical Design Approach for Xylanase Production by *Aspergillus niger* Using Soybean Hulls: Optimization and Determining the Synergistic Effects of Medium Components on the Enzyme Production. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 4, p. 319 -323, 2015.

SAMANTA, A. et al. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2015.

SANDRIM, V. et al. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1823-1828, 2005.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263, 2010.

SEYIS, I.; AKSOZ, N. Xylanase Production from *Trichoderma harzianum* 1073 D3 with Alternative Carbon and Nitrogen Sources. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 37-40, 2005.

SHAH, A.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1763-1771, 2005.

SILVA, C. et al. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Revista de microbiologia**, v. 30, n. 2, p. 114-119, 1999.

SINGER, C. S. **Propriedades físico-químicas, reológicas, entálpicas e de panificação da farinha obtida de trigo irradiado**. 2006. (Mestrado). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

SINGH, R. et al. Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 28-35, 2009.

SIQUEIRA, F. et al. Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues. **Biodegradation**, v. 21, n. 5, p. 815-824, 2010.

SOCCOL, C.; VANDENBERGHE, L. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 205-218, 2003.

SOMERVILLE, C. et al. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. **Science**, v. 306, n. 5705, p. 2206-2211, 2004.

SQUINA, F. M. et al. Xylan decomposition by *Aspergillus clavatus* endo-xylanase. **Protein expression and purification**, v. 68, n. 1, p. 65-71, 2009.

STAUFFER, C. E. **Functional additives for bakery foods**. Springer Science & Business Media, 1990. p. 179.

STEPHENS, D. E. et al. Directed evolution of the thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of biotechnology**, v. 127, n. 3, p. 348-354, 2007.

STOGIOS, P. J. et al. Crystal structure of an endo-beta-1,4-xylanase (glycoside hydrolase family 10/GH10) enzyme from *Trichoderma reesei*. RCSB protein data bank, 2015. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4XV0>>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2016.

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.

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

SURYANARAYANAN, T. et al. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 9-19, 2009.

TASKIN, E.; STRATILOVÁ, E. Polygalacturonases produced under solid state and submerged fermentation conditions by two strains of *Aspergillus foetidus*. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 190-196, 2008.

TEATHER, R.; WOOD, P. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and environmental microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.

TEIXEIRA, R. et al. Purification and characterization studies of a thermostable β -xylanase from *Aspergillus awamori*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 37, n. 10, p. 1041-1051, 2010.

UDAY, U. et al. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International journal of biological macromolecules**, v. 82, p. 1041-1054, 2016.

UJIIE, M.; ROY, C.; YAGUCHI, M. Low-molecular-weight xylanase from *Trichoderma viride*. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1860-1862, 1991.

USDA National Nutrient Database. 2015. Disponível em: < <http://ndb.nal.usda.gov/> >. Acesso em: 16/01/2016.

VANHOLME, R. et al. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 895-905, 2010.

VARGA, J. et al. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 1-17, 2011.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 1, p. 1-43, 2001.

VIIKARI, L. et al. Bleaching with enzymes. Proceedings of 3rd International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, STFI, Stockholm, 1986. p.67-9.

VITOLO, M. et al. **Biocologia Farmacêutica**. 1. São Paulo: 2015.

VÁZQUEZ, M. et al. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 11, p. 387-393, 2000.

WAKIYAMA, M. et al. An extracellular endo-1, 4- β -xylanase from *Aspergillus japonicus*: Purification, properties, and characterization of the encoding gene. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 109, n. 3, p. 227-229, 2010.

XIMENES, F.; SILVEIRA, F.; FERREIRA, E. Production of β -Xylosidase Activity by *Trichoderma reesei* Strains. **Current microbiology**, v. 33, n. 2, p. 71-77, 1996.

XIMENES, F. A. et al. Purification and characterization of a low-molecular-weight xylanase produced by *Acrophialophora nainiana*. **Current microbiology**, v. 38, n. 1, p. 18-21, 1999.

YANG, C.-H.; YANG, S.-F.; LIU, W.-H. Production of xylooligosaccharides from xylans by extracellular xylanases from *Thermobifida fusca*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 10, p. 3955-3959, 2007.

YANG, H. et al. Production of xylooligosaccharides by xylanase from *Pichia stipitis* based on xylan preparation from triploid *Populus tomentosa*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 14, p. 7171-7176, 2011.

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