

Universidade de Brasília

***Emericella nidulans* E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR:  
FERRAMENTAS PARA PRODUÇÃO DE ENDO- $\beta$ -1,4-  
XILANASE**

**CAIO DE OLIVEIRA GORGULHO SILVA**

**Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Brasília – DF

Fevereiro 2014

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, por toda a ajuda, orientação e principalmente por acreditar em meu potencial.

Aos amigos do laboratório Paula, Helder, Leonora, Antonielle, Juliana, Débora, Guilherme, Bárbara, Gilvan, Luiz Vale, Fran, Brenda, Karen, Pedro Hamann, Pedro Martins, Jéssica, Amanda, Carol, pela ajuda durante experimentos e discussões e pelos momentos de alegria e companheirismo.

Às técnicas do laboratório Marísia e Margarete, pelo grande auxílio no dia-a-dia e pelo companheirismo.

À profa. Dra. Eliane Noronha, por ter ajudado sempre que precisei e por fazer parte da minha banca de Mestrado.

Ao prof. Dr. Carlos André Ricart, por ter aberto as portas do laboratório de Bioquímica sempre que precisei.

Ao prof. Dr. Félix Siqueira, por ter tirado várias dúvidas ao longo do meu trabalho e por fazer parte da minha banca de Mestrado.

À profa. Dra. Lourdes Isabel Velho do Amaral e ao prof. Dr. Clóvis Oliveira Silva, pela grande ajuda e dedicação em nos ensinar a trabalhar no HPLC.

À Dra. Elaine Nascimento, pela grande ajuda nos experimentos de espectrometria de massa.

Ao prof. Dr. Robert Miller, Glaucia Midorikawa e Rosane Mansan pela ajuda na identificação molecular do fungo.

Ao amigo Hermann.

Aos meus pais e minha irmã, pela ajuda e incentivo.

### **Apoio Financeiro**

Esta pesquisa foi desenvolvida com o apoio financeiro do CNPq, por meio de concessão de bolsa de estudos, e pelos projetos de pesquisa: Rede Sisbiota (CNPq/563260/2010-6), Rede Centro Oeste (CNPq/563823/2010-0 e FAPDF/193.000.470/2011), Universal (CNPq/470265/2011-6), Pronex (FAPDF/193000584/2009) e INCT do Bioetanol/CNPq.

## Sumário

Lista de figuras .....	7
Lista de tabelas.....	10
Resumo.....	11
Abstract .....	13
1. Introdução.....	14
1.1. Conversão de biomassa e o conceito de biorrefinaria.....	14
1.2. Estrutura da parede celular vegetal e enzimas envolvidas em sua degradação .....	15
1.3. Aplicações industriais de xilanases .....	20
1.4. Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica e geração de inibidores .....	23
1.5. Substrato lignocelulósico: bagaço de cana-de-açúcar .....	24
1.6. <i>Emericella nidulans</i> (= <i>Aspergillus nidulans</i> ) .....	26
2. Justificativas .....	27
3. Objetivos .....	28
4. Materiais e Métodos .....	29
4.1. Principais reagentes .....	29
4.2. Isolamento e manutenção do microrganismo .....	29
4.3. Identificação molecular do fungo de trabalho.....	30
4.4. Cultivo do microrganismo para produção de enzimas e construção da curva de indução de xilanases .....	31
4.5. Preparo do bagaço de cana-de-açúcar.....	32
4.6. Purificação da xilanase .....	32
4.7. Quantificação de proteínas .....	34
4.8. Determinação de atividade xilanolítica.....	35
4.9. Eletroforese.....	36
4.10. Identificação da proteína por espectrometria de massa .....	36

4.11.	Efeito da temperatura.....	38
4.12.	Efeito de pH.....	39
4.13.	Avaliação de termoestabilidade.....	39
4.14.	Influência de íons metálicos.....	39
4.15.	Influência de aminoácidos e reagentes modificadores de aminoácidos .....	40
4.16.	Influência de compostos fenólicos.....	40
4.17.	Determinação de parâmetros cinéticos na ausência e presença de compostos fenólicos	41
4.18.	Identificação e quantificação dos produtos de hidrólise da xilana .....	41
4.19.	Ensaio de hidrólise de polpas de celulose em diferentes estágios do processo Kraft	43
4.20.	Ensaio de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.....	44
5.	Resultados e discussão.....	45
5.1.	Identificação molecular do fungo .....	45
5.2.	Curva de indução de produção de xilanases.....	49
5.3.	Purificação.....	52
5.4.	Identificação da xilanase purificada por espectrometria de massa.....	56
5.5.	Teste sobre diferentes substratos.....	59
5.6.	Efeito de temperatura e pH .....	60
5.7.	Termoestabilidade .....	63
5.8.	Efeito de íons metálicos e EDTA.....	64
5.9.	Efeito de aminoácidos e modificadores químicos de aminoácidos .....	66
5.10.	Efeito de compostos fenólicos .....	68
5.11.	Efeito de etanol .....	77
5.12.	Hidrólise da xilana .....	78
5.13.	Hidrólise de polpas de celulose em diferentes estágios do processo Kraft.....	83

5.14. Hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar .....	90
6. Conclusões.....	94
7. Perspectivas .....	95
8. Referências Bibliográficas .....	96

## Lista de figuras

<b>Figura 1.1.</b> Esquema da estrutura lignocelulósica e seus componentes, presente em resíduos agroindustriais.....	16
<b>Figura 1.2.</b> Esquema da estrutura hipotética da xilana e enzimas envolvidas em sua degradação.....	19
<b>Figura 1.3.</b> Compostos inibitórios formados a partir da holocelulose e lignina durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	24
<b>Figura 4.1.</b> Esquema do trecho de DNA amplificado por PCR, contendo as regiões ITS 1 e 2 e o gene de RNA ribossomal 5.8S, e dos sítios de anelamento dos <i>primers</i> ITS 4 e 5 .....	30
<b>Figura 4.2.</b> Processo de purificação de xilanase de <i>E. nidulans</i> .....	33
<b>Figura 5.1.</b> Comparação de sequência nucleotídica da região ITS1 – 5.8S – ITS2 de <i>E.nidulans</i> RGT-S3 com a da linhagem utilizada neste trabalho.....	47
<b>Figura 5.2.</b> Resultado da análise BLASTn mostrando alinhamentos significativos da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do organismo deste trabalho com o banco de dados GenBank do NCBI.....	48
<b>Figura 5.3.</b> Perfil de indução de atividade xilanolítica de <i>E. nidulans</i> em meio de cultura líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (1%, m/v) como fonte de carbono.....	51
<b>Figura 5.4.</b> Perfil cromatográfico de UF10x em coluna de filtração em gel Sephacryl S-100.....	52
<b>Figura 5.5.</b> Perfil cromatográfico do segundo pico de atividade xilanolítica obtido na cromatografia Sephacryl S-100 aplicado em coluna de troca aniônica DEAE-Sepharose.....	53
<b>Figura 5.6.</b> Perfil cromatográfico do pico da xilanase obtido em DEAE-Sepharose aplicado na mesma coluna, sob as mesmas condições.....	53
<b>Figura 5.7.</b> Perfil cromatográfico do pico de atividade xilanolítica obtido na cromatografia DEAE-Sepharose aplicado em cromatografia de filtração em gel Sephadex G-50.....	54

<b>Figura 5.8.</b> SDS-PAGE 15% de amostras dos passos sequenciais de purificação a partir do extrato bruto de <i>E. nidulans</i> crescido em bagaço da cana-de-açúcar. Bandas coradas com nitrato de prata.....	56
<b>Figura 5.9.</b> Espectro de peptídeos (PMF: <i>peptide mass fingerprinting</i> ) da enzima purificada após digestão com tripsina, obtido em MALDI-TOF.....	58
<b>Figura 5.10.</b> Sequência de resíduos de aminoácidos de Endo- $\beta$ -1,4-xilanase A (XynA) de <i>E. nidulans</i> deduzida a partir do genoma deste organismo.....	59
<b>Figura 5.11.</b> Efeito da temperatura na atividade xilanolítica do EB e da xilanase purificada.....	60
<b>Figura 5.12.</b> Efeito do pH na atividade da xilanase purificada, a 50°C.....	61
<b>Figura 5.13.</b> Termoestabilidade de XynA a 28, 50 e 55°C em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0.....	63
<b>Figura 5.14.</b> Estrutura dos compostos fenólicos testado sobre a atividade de XynA.....	69
<b>Figura 5.15.</b> Efeito de compostos fenólicos (2mg/mL) sobre a atividade de XynA.....	70
<b>Figura 5.16.</b> Efeito tempo-dependente de compostos fenólicos (2mg/mL, diluídos em etanol 10%) sobre atividade de XynA à 28°C.....	71
<b>Figura 5.17.</b> Efeito tempo-dependente de compostos fenólicos (2mg/mL, diluídos em água) sobre atividade de XynA à 28°C .....	71
<b>Figura 5.18.</b> Efeito tempo-dependente de compostos fenólicos (2mg/mL, diluídos em etanol 10%) sobre atividade de XynA à 50°C .....	72
<b>Figura 5.19.</b> Efeito tempo-dependente de compostos fenólicos (2mg/mL, diluídos em água) sobre atividade de XynA à 50°C .....	72
<b>Figura 5.20.</b> Efeito de diferentes concentrações de etanol sobre atividade de XynA..	77
<b>Figura 5.21.</b> Liberação de açúcares redutores, detectados por DNS, resultante da hidrólise de xilana de bétula (solúvel e insolúvel) por XynA.....	79
<b>Figura 5.22.</b> Identificação e quantificação dos produtos de hidrólise da porção solúvel da xilana de bétula por XynA pela técnica HPAEC-PAD.....	81

- Figura 5.23.** Identificação e quantificação dos produtos de hidrólise da porção insolúvel da xilana de bétula por XynA pela técnica HPAEC-PAD.....83
- Figura 5.24.** Liberação de açúcares redutores totais durante a hidrólise de polpas de celulose em diferentes estágios do processo *Kraft* promovidas por amostras de Ultrafiltrado (UF) de *E. nidulans*.....84
- Figura 5.25.** Liberação de cromóforos durante a hidrólise das polpas de celulose em diferentes estágios do processo *Kraft*, promovidas por UF de *E. nidulans*. Polpa clara (A), polpa pré-branqueada (B) e polpa escura (C).....86
- Figura 5.26.** Liberação de pentoses livres durante a hidrólise das polpas de celulose em diferentes estágios do processo *Kraft*.....88
- Figura 5.27.** Identificação e quantificação dos produtos de hidrólise das polpas de celulose em diferentes estágios do processo *Kraft* pela técnica HPAEC-PAD. Polpa clara (A), polpa pré-branqueada (B) e polpa escura (C).....89
- Figura 5.28.** Liberação de açúcares redutores, detectados por DNS, resultante da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar não tratado, submetido à hidrólise ácida ou à explosão a vapor pelo EB de *E. nidulans*.....91
- Figura 5.29.** Identificação e quantificação dos produtos de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar não-tratado, submetido à hidrólise ácida ou à explosão a vapor pelo EB de *E. nidulans*.....93

## Lista de tabelas

<b>Tabela 4.1.</b> Detalhes do tratamento da amostra para aplicação no espectrômetro de massa.....	37
<b>Tabela 5.1.</b> Etapas de purificação do extrato bruto de <i>E. nidulans</i> crescido em meio de cultura líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (1%, m/v) como fonte de carbono.....	54
<b>Tabela 5.2.</b> Lista dos 6 peptídeos que combinaram com a XynA de <i>E. nidulans</i> . Tais peptídeos resultaram em uma cobertura de sequência de 39%.....	58
<b>Tabela 5.3.</b> Atividade enzimática da enzima purificada sobre polissacarídeos.....	59
<b>Tabela 5.4.</b> Características de xilanases fúngicas.....	62
<b>Tabela 5.5.</b> Termoestabilidade da xilanase purificada a 28, 50 e 55°C em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0.....	63
<b>Tabela 5.6.</b> Efeito de íons metálicos e EDTA sobre atividade de XynA.....	66
<b>Tabela 5.7.</b> Efeito de aminoácidos e modificadores químicos de aminoácidos sobre a atividade de XynA.....	67
<b>Tabela 5.8.</b> Parâmetros cinéticos de XynA sobre xilana de aveia solúvel e insolúvel, na presença ou ausência de compostos fenólicos.....	76

## Resumo

O bagaço de cana-de-açúcar é um importante resíduo agroindustrial brasileiro que apresenta grande potencial para ser utilizado como fonte de carbono para produção de holocelulases de interesse industrial por microrganismos. As xilanases, objeto de estudo deste trabalho, são enzimas que apresentam uma série de aplicações biotecnológicas que incluem a produção de etanol de segunda geração, o branqueamento de papel, a produção de sucos e pães e o uso como aditivo em rações animais. O objetivo desta pesquisa foi purificar e caracterizar uma xilanase produzida pelo fungo *Emericella nidulans* quando cultivado em bagaço de cana, visando o aproveitamento deste resíduo e a avaliação do potencial biotecnológico da enzima. O fungo foi capaz de secretar xilanases a partir do primeiro dia de cultivo sob fermentação submersa utilizando o bagaço. Uma xilanase de 22 kDa foi purificada a partir do extrato bruto obtido no cultivo através de ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio e cromatografias de filtração em gel e troca aniônica. A enzima apresentou alta homologia com endo- $\beta$ -1,4-xilanase A (XynA) de *E. nidulans* e desta forma foi chamada. A enzima XynA apresentou maior atividade a 55°C e na faixa de pH 3,0 – 6,5. A enzima se mostrou pouco termoestável, com meias-vidas de 40, 10 e 7 minutos a 28, 50 e 55°C, respectivamente. XynA foi mais ativa sobre a porção solúvel da xilana, com valores de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  3,39 mg/mL e 0,502 UI/mL, respectivamente. A hidrólise da xilana por XynA gerou xilooligossacarídeos, indicando ação tipo endo. Diferentes compostos fenólicos comumente liberados durante o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica causaram efeitos variados sobre XynA. Os ácidos tânico e cinâmico inibiram a enzima, enquanto o ácido 4-hidroxi-benzóico aumentou sua atividade e os ácidos ferúlico, p-cumárico e vanilina não mostraram efeito. O etanol aumentou a atividade, estabilidade e  $V_{m\acute{a}x}$  da enzima, indicando potencial para aplicação em processos de sacarificação e fermentação simultâneas de biomassa. O ultrafiltrado (uma fração semipurificada de xilanases) foi capaz de hidrolisar polpas de celulose em diferentes etapas do processo *Kraft*, resultando na liberação de açúcares redutores, cromóforos, pentoses e produtos de hidrólise

de xilana sem concomitante liberação de glicose. O extrato bruto se mostrou capaz de degradar bagaço de cana-de-açúcar não-tratado ou submetido a explosão a vapor, liberando açúcares redutores e produtos de hidrólise de xilana.

## Abstract

Sugarcane bagasse is a major lignocellulosic agroindustrial residue in Brazil with great potential for utilization as carbon source for production of industrial hemicellulases by microorganisms. Xylanases present several biotechnological applications such as in ethanol production, paper bleaching, juice and bread production and utilization as feed additive. The goal of this research was to purify and characterize one xylanase produced by the fungus *Emmericella nidulans* when grown on sugarcane bagasse, aiming the use of this residue and the investigation of biotechnological potentials of the enzyme. *E. nidulans* secreted xylanases from the first day of growth on liquid media containing bagasse as sole carbon source. One 22 kDa xylanase was purified from crude extract through ultrafiltration, ammonium sulphate precipitation, gel filtration and anion-exchange chromatographies. The enzyme showed significant homology with endo- $\beta$ -1,4-xylanase A (XynA) from *E. nidulans*, and was named that way. XynA was most active at 55°C and pH 3,0 – 6,5. Considering its thermostability, XynA presented half-lives of 40, 10 and 7 minutes at 28, 50 and 55°C, respectively. The enzyme was more active on the soluble portion of xylan, with  $K_m$  and  $V_{max}$  values 3,39 mg.mL<sup>-1</sup> and 0,502 UI.mL<sup>-1</sup>, respectively. Xylan hydrolysis by XynA produced xylooligosaccharides, indicating endo-type action. Phenolic compounds released during pre-treatment of lignocellulosic biomass caused different effects on XynA. Tannic and cinnamic acids inhibited XynA, while 4-hydroxybenzoic acid enhanced its activity and ferulic and *p*-coumaric acids and vanillin caused no effect. Ethanol increased XynA activity, thermostability and  $V_{max}$ , suggesting potential for application in simultaneous saccharification and fermentation processes. Ultrafiltrate sample (partially purified xylanases) was able to hydrolyse cellulose pulps obtained from different stages of *Kraft* process, resulting in release of reducing sugars, chromophores, pentoses and xylans degradation products with apparent no release of glucose. *E. nidulans* crude extract was able to hydrolyse untreated or steam-explosion pretreated sugarcane bagasses, releasing reducing sugars and xylans degradation products.

## Introdução

### 1.1. Conversão de biomassa e o conceito de biorrefinaria

O conceito de biorrefinaria faz uso da lógica da refinaria de petróleo, aplicando-a em uma indústria baseada em biomassa. Da mesma forma que se produz energia e uma gama de combustíveis, químicos e materiais a partir do petróleo, o objetivo da biorrefinaria seria produzi-los a partir de biomassa renovável (KAMM *et al*, 2007).

A transferência da dependência sobre o petróleo para fontes renováveis é vista como estratégica para o desenvolvimento de uma sociedade industrial sustentável e tal possibilidade tem sido reconhecida globalmente. Dentre as vantagens da substituição do petróleo pela biomassa estão o uso de matérias-primas renováveis, o controle da emissão de gases de efeito estufa e a maior independência energética das nações (FITZPATRICK *et al*, 2010).

Resíduos agroindustriais, por serem abundantes, baratos e renováveis, têm grande potencial para serem utilizados como matéria-prima em biorrefinarias para geração de produtos de valor agregado. Tais resíduos também têm a vantagem de não serem utilizados para produção de alimentos, evitando o debate “alimentos *versus* combustíveis”, que envolve a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, milho e beterraba, por exemplo (FITZPATRICK *et al*, 2010). Além disso, resíduos agroindustriais também têm um grande potencial para serem utilizados como substrato de baixo custo para crescimento de microrganismos e produção de enzimas lignocelulolíticas (SIQUEIRA *et al*, 2010).

Embutido no conceito de biorrefinaria está a proposta de provocar impactos ambientais mínimos e fazer o menor uso possível de energia não-renovável e químicos poluentes (CHERUBINI, 2010). Por isso, o prefixo "bio" da palavra se refere tanto à matéria-prima renovável quanto aos processos de bioconversão utilizados (FITZPATRICK *et al*, 2010).

A degradação enzimática dos componentes lignocelulósicos é, portanto, um importante aspecto da biorrefinaria e tem-se procurado priorizá-la sobre processos químicos, como a hidrólise ácida. Quando comparado com

processos industriais químicos, que frequentemente fazem uso de condições extremas de temperatura, pH e pressão, o uso de enzimas em processos industriais, inclusive na degradação de biomassa lignocelulósica, pode ser vantajosa por requerer condições mais amenas de temperatura, pH e pressão, apresentar maior especificidade na modificação de substratos, mostrar menor perda de substrato devido às modificações químicas indesejáveis e por ser compatível com o meio ambiente, contribuindo para a geração de processos e produtos limpos (WONG *et al*, 1988; SCHÄFER *et al*, 2005). Apesar destas vantagens, o uso de enzimas ainda encontra gargalos, dentre eles o alto custo de produção destes biocatalisadores e as lentas taxas de conversão (ARANTES e SADDLER, 2010).

Enfim, a prospecção de microrganismos lignocelulolíticos e a caracterização de seus arsenais enzimáticos são importantes para descoberta de enzimas de interesse industrial e para incentivar o uso destes biocatalisadores em processos industriais. Nesse sentido, o Brasil possui uma imensa diversidade biológica e esforços estão sendo feitos pela descoberta de microrganismos e enzimas com potencial de aplicação industrial (SOCCOL *et al*, 2010; SIQUEIRA *et al*, 2010).

## **1.2. Estrutura da parede celular vegetal e enzimas envolvidas em sua degradação**

A parede celular vegetal corresponde a um arranjo intrincado de polissacarídeos, proteínas e lignina normalmente chamado de estrutura lignocelulósica (figura 1.1) e sua completa degradação exige um arsenal enzimático atuando sinergicamente (SIQUEIRA e FILHO, 2010).

A porção polissacarídica total da parede celular vegetal, chamada de holocelulose, é composta por celulose, hemicelulose e pectina. Diversos organismos são capazes de utilizá-la como fonte de carbono e energia através da atuação de glicosil-hidrolases, as principais enzimas envolvidas em sua degradação (SIQUEIRA e FILHO, 2010).

A celulose, o mais abundante polisacarídeo lignocelulósico, é um homopolímero linear composto por resíduos de  $\beta$ -D-glicose conectados por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. O fato da celulose não ser ramificada contribui para uma forte agregação espontânea de suas cadeias lineares através de interações não covalentes, formando estruturas cristalinas chamadas microfibrilas. Na estrutura cristalina, os átomos são altamente ordenados e o empacotamento das cadeias impede a penetração de água e enzimas no interior da microfibrila. A celulose cristalina confere rigidez à parede celular vegetal, atribuindo recalcitrância à degradação por microrganismos. A celulose possui também regiões não cristalinas (amorfas) na estrutura das microfibrilas onde água e enzimas têm maior acesso (LYND *et al*, 2002; ARANTES e SADDLER, 2010).

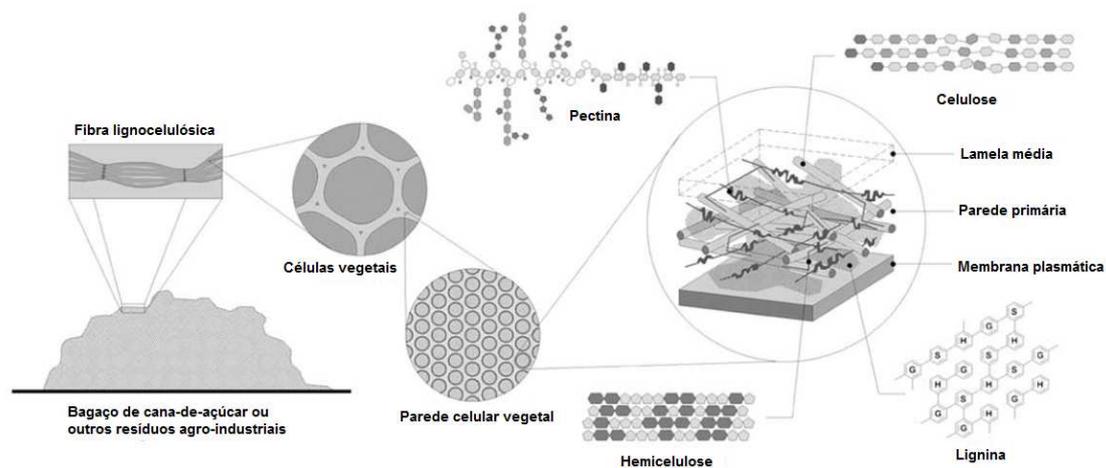


Figura 1.1. Esquema da estrutura da parede celular vegetal e seus componentes, presente em resíduos agroindustriais (SIQUEIRA e FILHO, 2010).

Proteínas não-hidrolíticas, dentre elas módulos de ligação ao carboidrato, swoleninas, proteínas da família das expansinas e da família GH61, exercem papel importante na alteração estrutural da celulose cristalina, aumentando sua acessibilidade às enzimas hidrolíticas, num processo chamado amorfogênese (ARANTES e SADDLER, 2010).

Três tipos de glicosil-hidrolases são responsáveis pela completa hidrólise da celulose. Endo-1,4- $\beta$ -glicanases catalisam a clivagem de ligações  $\beta$ -1,4 no interior da cadeia da celulose, principalmente sobre regiões amorfas, liberando oligossacarídeos de diversos tamanhos e criando extremidades de cadeia para atuação de celobiohidrolases. As celobiohidrolases (CBH) atuam nas extremidades redutora e não-redutora da celulose pelo mecanismo tipo exo, liberando moléculas de celobiose. As  $\beta$ -glicosidases atuam sobre celooligosacarídeos solúveis e celobiose, liberando glicose (LYND *et al*, 2002).

No que diz respeito às hemiceluloses, são um conjunto heterogêneo de polissacarídeos da parede celular vegetal que inclui as xilanas, xiloglucanas, mananas, glicomananas, entre outros. (SCHELLER e ULVSKOV, 2010).

A xilana (figura 1.2) é a principal hemicelulose e corresponde a um grupo de polissacarídeos que apresentam cadeia principal composta por unidades de  $\beta$ -D-xilose conectadas por ligações  $\beta$ -1,4. Normalmente apresenta ramificações laterais que podem consistir de resíduos de ácido glicurônico, ácido 4-O-metilglicurônico, L-arabinose, ácido acético, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico e D-galactose. Xilanas sem ramificações (homoxilana linear) são raras na natureza. A xilana, por ter composição mais heterogênea que a celulose, requer uma diversidade maior de enzimas para sua completa hidrólise (BEG *et al*, 2001; DE VRIES e VISSER, 2001; COLLINS *et al*, 2005; SCHELLER e ULVSKOV, 2010).

Endo- $\beta$ -1,4-xilanases hidrolisam ligações  $\beta$ -1,4 no interior da cadeia principal da xilana, liberando xilooligômeros e xilobiose. O sítio de ataque ao substrato depende da presença, quantidade e tipo de ramificações, além do seu grau de polimerização (POLIZELI *et al*, 2005). Ramificações podem limitar a atuação das endo-xilanases, atuando como impedimento estérico, ou podem ter papel positivo na ligação enzima-substrato, servindo como “pontos de ancoragem” e aumentando a ação catalítica (WONG *et al*, 1988). Os xilooligômeros e xilobiose produzidos pela ação das endo-xilanases são hidrolisados por  $\beta$ -xilosidases, que liberam xilose a partir da extremidade não-redutora. Estas enzimas variam quanto à afinidade por xilobiose, xilooligômeros

e xilooligômeros ramificados, mas normalmente a atividade é inversamente proporcional ao grau de polimerização. A inibição das endo-xilanases por seus produtos de hidrólise é diminuída pela ação das  $\beta$ -xilosidases, o que aumenta a eficiência da hidrólise da xilana (BEG *et al*, 2001; POLIZELI *et al*, 2005). Este fenômeno também ocorre na degradação da celulose pelas celulasas e  $\beta$ -glicosidases (LYND *et al*, 2002).

Além da cooperação entre endo-xilanases e  $\beta$ -xilosidases, o sinergismo entre enzimas de cadeia principal e enzimas acessórias desramificadoras também é necessário para a completa desconstrução da xilana (figura 1.2). Dentre as enzimas acessórias que removem ramificações da xilana estão as  $\alpha$ -glicuronidases,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, feruloil e *p*-cumaroil esterases e acetil xilana esterases.

As  $\alpha$ -glicuronidases são enzimas responsáveis pela remoção de resíduos de ácido glicurônico e seu derivado ácido 4-O-metil-glicurônico, presentes como ramificações de glicuronoxilanas (MONCLARO e FILHO, 2013).  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases removem ramificações de L-arabinose presentes em arabinoxilanas e glicuronoarabinoxilanas, típicas da parede celular de gramíneas, como a da cana-de-açúcar (DE VRIES e VISSER, 2001; POLIZELI *et al*, 2005). As enzimas feruloil e *p*-cumaroil esterases clivam a ligação éster entre resíduos de L-arabinose e os ácidos ferúlico e *p*-cumárico, respectivamente. Estas ligações éster atuam como conexão covalente entre xilana e outros componentes da parede celular, como lignina e pectina, contribuindo para a rigidez e recalcitrância da estrutura lignocelulósica (CHRISTOV e PRIOR, 1993; BENOIT *et al*, 2006). Acetil xilana esterases removem grupos acetil presentes em acetilxilanas (POUTANEN *et al*, 1990; MARGOLLES-CLARK *et al*, 1996).

No contexto da parede celular vegetal, a xilana está em íntima associação com a celulose, revestindo as microfibrilas, atuando na manutenção de sua integridade e dificultando sua degradação por celulasas, além de ser ligada covalentemente à matriz de lignina. A xilana, portanto, é importante na coesão

entre a celulose e a lignina (COLLINS *et al*, 2005; BEG *et al*, 2001; WONG *et al*, 1988).

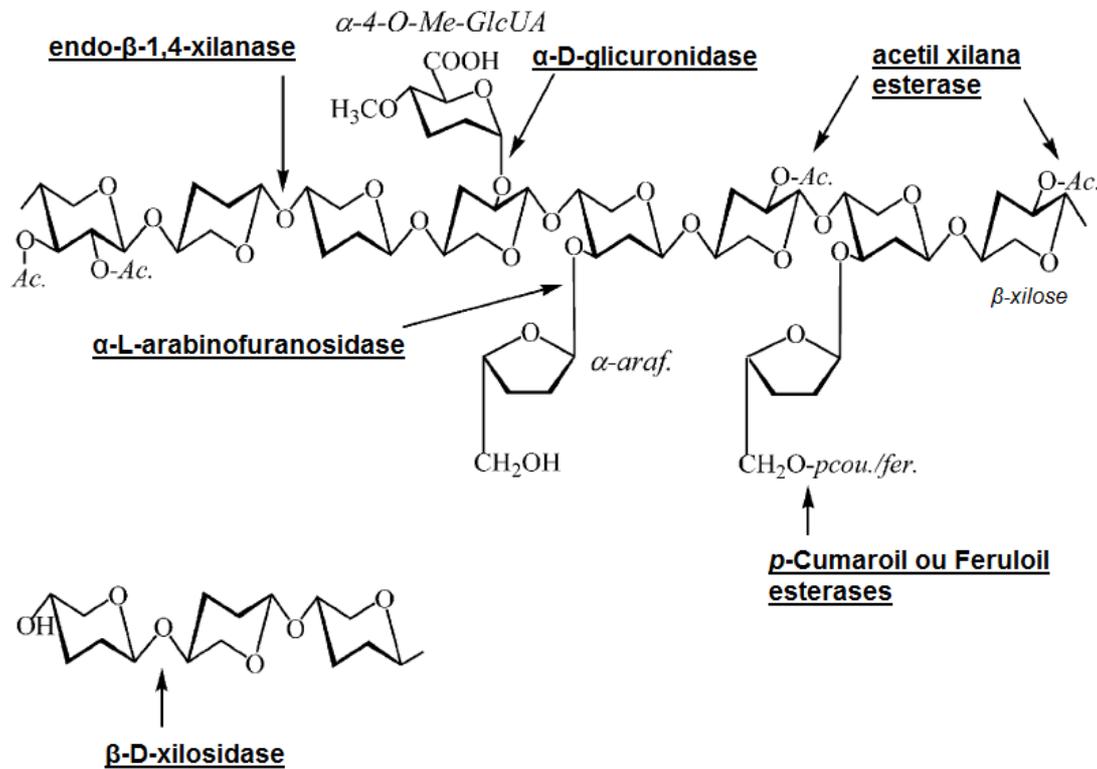


Figura 1.2. Esquema da estrutura hipotética da xilana e enzimas envolvidas em sua degradação. Substituintes: grupos acetil (Ac), ácido α-4-O-metil-glicurônico (α-4-O-Me-GlcUA), α-arabinose (α-araf), ácido p-cumárico (pcou) e ácido ferúlico (fer) (COLLINS *et al*, 2005).

A lignina é um complexo aromático, hidrofóbico, altamente recalcitrante à degradação química e biológica, formado por álcoois hidroxicinamil (coniferil, p-cumaril, sinapil e suas formas aciladas). Em contraste com a celulose e a hemicelulose, que se organizam em cadeia, o mecanismo de polimerização da lignina resulta em uma trama tridimensional de compostos aromáticos que envolvem os outros componentes da parede celular, protegendo-os contra a atuação de enzimas hidrolíticas produzidas por microrganismos patogênicos e saprófitos (GRABBER, 2005; RUIZ-DUEÑAS e MARTÍNEZ, 2009). Por ter um caráter hidrofóbico, pode causar a desativação de holocelulases por promover a exposição do núcleo hidrofóbico destas proteínas, levando à adsorção

improdutiva destas enzimas à estrutura aromática da lignina (ECKARD *et al*, 2013). A adsorção improdutiva à lignina é um importante impedimento para a degradação dos polissacarídeos da parede celular vegetal por holocelulases, sendo responsável pela grande quantidade de enzimas necessárias para a degradação de substratos lignocelulósicos. A remoção da lignina por etapas de pré-tratamento da biomassa contribui para a maior eficiência da hidrólise da celulose e será abordado posteriormente neste trabalho (HU e RAGAUSKAS, 2012)

A presença de módulos de ligação ao carboidrato (módulos proteicos com alta afinidade a carboidratos, específicos ou não) em diversas celulasas e hemicelulasas contribui para o direcionamento e concentração destas enzimas sobre a superfície de seus substratos, diminuindo a adsorção inespecífica à lignina (ARANTES e SADDLER, 2010). Xilanases com módulo de ligação à xilana podem mostrar maior eficiência na hidrólise da xilana do que enzimas sem este módulo. A presença de módulos de ligação a carboidrato específicos à celulose em xilanases também pode aumentar a eficiência de hidrólise da xilana devido à proximidade entre estes dois polissacarídeos na estrutura lignocelulósica (ZHANG *et al*, 2013).

### **1.3. Aplicações industriais de xilanases**

As xilanases apresentam uma série de potenciais aplicações industriais. Considerando a conversão de biomassa lignocelulósica a produtos de valor agregado dentro do conceito de biorrefinaria, o uso de xilanases é importante para a hidrólise da xilana presente nestes materiais, que contribui também para facilitar a hidrólise da celulose por celulasas, uma vez que a xilana se encontra recobrando as microfibrilas de celulose (ÖHGREN *et al*, 2007). A xilose produzida pela ação das xilanases pode ser convertida a etanol e xilitol através de fermentação por microrganismos selvagens ou geneticamente modificados. O xilitol é um poliólcool que apresenta poder adoçante semelhante à sacarose, baixo teor calórico e não cariogênico, podendo ser usado como adoçante de

baixa caloria nas indústrias alimentícia e farmacêutica, como citado por Polizeli *et al* (2005).

Assim como outras enzimas, xilanases também podem ser utilizadas como aditivos em ração animal com o objetivo de aumentar a digestibilidade dos seus ingredientes. Usadas principalmente em ração de aves, podem diminuir a viscosidade da ração no trato digestivo do animal, melhorando a motilidade do bolo alimentar, a digestão e a absorção dos nutrientes, exigindo um menor gasto de energia pelo animal e melhorando o ganho de peso (POLIZELI *et al*, 2005; MOTTA *et al*, 2013). Além disso, xilooligossacarídeos produzidos por xilanases podem atuar como prébiótico, estimulando o crescimento ou atividade de microrganismos no trato digestivo e conferindo benefícios à saúde do animal (LAFOND *et al*, 2011).

Xilanases, em ação conjunta com amilases, também podem ser utilizadas para melhorar a qualidade de pães. A hidrólise da hemicelulose e do amido da farinha permite um crescimento maior da massa e uma maior retenção de água, retardando o ressecamento do pão (POLIZELI *et al*, 2005; MOTTA *et al*, 2013; MONFORT *et al*, 1996).

As xilanases podem também ser usadas, em conjunto com pectinases, celulasas e amilases, na extração de suco de frutas e na clarificação e redução da viscosidade de sucos, vinhos e cervejas. A hidrólise enzimática dos polissacarídeos da parede celular que ficam em suspensão pode contribuir para a diminuição do aspecto turvo e viscoso por eles conferidos (POLIZELI *et al*, 2005; MOTTA *et al*, 2013).

Por fim, a principal aplicação industrial das xilanases tem sido no biobranqueamento de polpa de celulose e papel. O branqueamento consiste na remoção da lignina presente na polpa retirada da madeira e o uso de xilanases pode ajudar neste processo.

O processo mais comum de produção de polpa de celulose é o chamado processo *Kraft*. Tal processo visa a remoção de grande parte da lignina e das

hemiceluloses através do cozimento de cavacos de madeira com solução de hidróxido de sódio e sulfito de sódio sob alta pressão e temperatura. Estes dois reagentes atuam na deslignificação da polpa, gerando um licor escuro rico em lignina e hemiceluloses. A polpa de celulose resultante é escura e, apesar de já ter boa parte da lignina e hemicelulose removidas, apresenta cadeias curtas de hemicelulose e restos de lignina depositados sobre as fibras de celulose, que precisa, portanto, passar por um processo posterior de branqueamento. Tradicionalmente empregam-se diversas etapas para a remoção da lignina residual utilizando oxigênio, ozônio, peróxido de hidrogênio, hidróxido de sódio, gás cloro ou dióxido de cloro (DURAN *et al*, 2008). Ao final do processo de branqueamento tem-se a chamada polpa branca de celulose. O dióxido de cloro e gás cloro promovem a solubilização da lignina residual, facilitando sua remoção (SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002). O uso de cloro gera, entretanto, substâncias organocloradas extremamente tóxicas, mutagênicas e resistentes à biodegradação, sendo necessário o tratamento dos efluentes gerados no processo antes do descarte para o meio ambiente. A aplicação de xilanases antes do branqueamento pode otimizar este processo, permitindo a redução dos custos, do uso de reagentes clorados e da produção de compostos tóxicos, por facilitar a remoção da lignina pelos químicos nas etapas subsequentes. Em processos totalmente livres de reagentes clorados, as xilanases aumentam o brilho e a força do papel, e também diminuem a quantidade reagentes necessários (BUCHERT *et al*, 1994; SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002; DURAN *et al*, 2008).

O mecanismo pelo qual as xilanases facilitam o branqueamento ainda não é completamente entendido. Como citado por Buchert *et al* (1994), a hidrólise da xilana redepositada sobre as fibras de celulose as tornariam mais permeáveis ao reagentes empregados no branqueamento, facilitando a extração da lignina residual. Além disso, considerando que existem ligações cruzadas entre hemicelulose e lignina na polpa *kraft*, a clivagem da xilana (mais facilmente degradada que lignina) permite maior liberação de lignina residual (SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002; POLIZELI *et al*, 2005; DURAN *et al*, 2008).

Já foi observado que o uso de outras hemicelulases como mananases, galactosidases e feruloil esterases, assim como ligninases, também auxiliam no branqueamento da polpa de celulose e atuam em sinergia com as xilanases (CLARKÉ *et al*, 2000; SIGOILLOT *et al*, 2005).

#### **1.4. Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica e geração de inibidores**

Considerando a bioconversão industrial de biomassa lignocelulósica, uma etapa de pré-tratamento é crucial para diminuir sua recalcitrância e torná-la mais acessível à posterior hidrólise enzimática. Diversos tipos de pré-tratamento, como o *liquid hot water* (tipo de tratamento hidrotérmico), explosão à vapor e hidrólise com ácido ou álcali diluídos, já foram desenvolvidos (ZHENG *et al*, 2009). Estes tratamentos, de modo geral, solubilizam parte da lignina e hemiceluloses na biomassa, facilitando a posterior hidrólise da celulose (HU e RAGAUSKAS, 2012). A degradação e modificação química de seus componentes durante o pré-tratamento geram, entretanto, compostos inibitórios a processos fermentativos e à atuação de enzimas responsáveis pela hidrólise de celulose, hemicelulose e pectina (holocelulases) (DUARTE *et al*, 2012a). A figura 1.3 ilustra a formação de inibidores a partir da biomassa lignocelulósica.

As concentrações e tipos de inibidores formados durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica dependem da composição da biomassa, do tipo de pré-tratamento e das condições de reação (XIMENES *et al*, 2010). Dentre os inibidores gerados pela modificação química da holocelulose estão furfural, hidroximetil furfural (HMF), ácido levulínico, ácido fórmico, ácido acético e oligossacarídeos. Já a degradação e modificação da lignina geram uma série de compostos fenólicos e aromáticos cuja diversidade torna difícil a quantificação e identificação (JÖNSSON *et al*, 2013). Dentre estes compostos estão ácido tânico, ácido gálico e derivados de ácido hidróxicinâmico, como os ácidos cinâmico, ferúlico e *p*-cumárico (XIMENES *et al*, 2011).

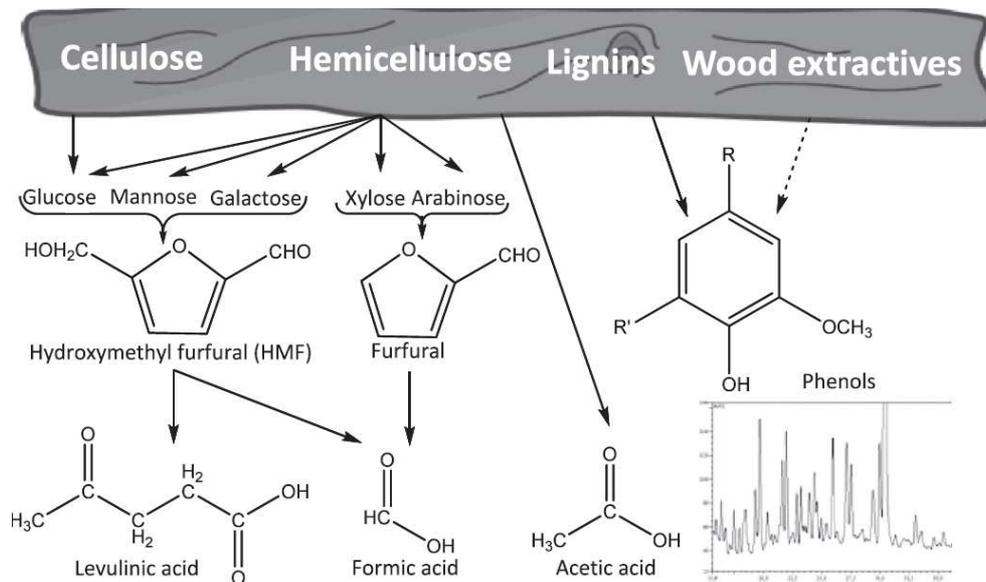


Figura 1.3. Compostos inibitórios formados a partir da holocelulose e lignina durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (JÖNSSON *et al*, 2013).

Compostos fenólicos purificados, assim como hidrolisados ou licores resultantes de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, vêm sendo testados sobre a atividade enzimática de celulases e hemicelulases e mostrado diferentes resultados. Dentre as moléculas solubilizadas durante o pré-tratamento e a degradação da lignocelulose, compostos fenólicos e xilooligossacarídeos têm sido mostrados como os principais inibidores/desativadores de celulases (XIMENES *et al*, 2011). Em comparação com as celulases, pouco se sabe sobre o efeito inibitório e/ou desativador de compostos fenólicos sobre xilanases e outras hemicelulases (DUARTE *et al*, 2012a).

### 1.5. Substrato lignocelulósico: bagaço de cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, e tal cultivo, ainda em expansão, representa o principal produto agrícola do país em termos de quantidade de biomassa produzida a cada ano (CANILHA *et al*, 2012). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013), a área cultivada de cana-de-açúcar destinada à indústria sucroalcooleira na safra de 2013/2014 está estimada em 8.799.150 hectares e a previsão da quantidade de cana a ser moída é de 652,02 milhões de toneladas.

A fração residual do colmo da cana gerado após sua moagem para extração do caldo é chamado de bagaço, enquanto a palha da cana consiste nas folhas e ponta do colmo que não é moída. O bagaço normalmente é composto por 38,4 – 45,5% de celulose, 22,7 – 27% de hemicelulose e 19,1 – 32,4% de lignina, além de 1 – 2,8% de cinzas e 4,6 – 9,1% de extrativos (CANILHA *et al*, 2012).

No Brasil, cerca de 270 – 280 Kg de bagaço (contendo 50% de umidade) são gerados por tonelada de cana-de-açúcar moída, resultando numa produção anual estimada em 186 milhões de toneladas do resíduo (SOCCOL *et al*, 2010). Grande parte (aproximadamente 88%) do bagaço gerado na moagem da cana é normalmente utilizada nas próprias usinas sucroalcooleiras para geração de energia elétrica e calor através da queima, que normalmente suprem o processo de produção de açúcar e etanol. Considerando a palha da cana-de-açúcar, aproximadamente 220 milhões de toneladas deste material são gerados anualmente e cerca de metade normalmente não é transportada para as usinas junto com o colmo, permanecendo no campo onde promove o uso sustentável do solo. Os 12% de bagaço e 50% da palha gerados, portanto, têm potencial para serem convertidos a produtos de maior valor agregado (FERREIRA-LEITÃO *et al*, 2010).

O chamado etanol de primeira geração produzido no Brasil é obtido através da fermentação do caldo extraído da cana-de-açúcar. A crescente demanda por um melhor uso da terra, pela diminuição na degradação de biomas nativos e pela substituição de combustíveis fósseis por fontes renováveis de energia impulsionam a produção de etanol de segunda geração a partir de fontes lignocelulósicas (BUCKERIDGE *et al*, 2012). O bagaço e a palha da cana-de-açúcar, por serem os resíduos agroindustriais lignocelulósicos mais abundantes no Brasil e pela localização estratégica em usinas sucroalcooleiras já existentes, têm recebido especial atenção para este propósito (FERREIRA-LEITÃO *et al*, 2010). É possível aumentar a produtividade de etanol utilizando a porção lignocelulósica da cana sem

necessidade de aumentar a área plantada, uma vez que o bagaço e a palha correspondem a dois terços da biomassa da planta (GOLDEMBERG, 2008).

Os resíduos lignocelulósicos da cana-de-açúcar, além de serem potenciais matérias-primas para conversão a etanol de segunda geração e outros produtos de maior valor agregado, também têm potencial para serem utilizados como fonte de nutrientes para crescimento de microrganismos (como *Emericella nidulans*, por exemplo) e produção de enzimas com aplicações industriais, inclusive envolvidas na degradação destes próprios resíduos (CANILHA *et al*, 2012).

### **1.6. *Emericella nidulans* (= *Aspergillus nidulans*)**

*E. nidulans* é um fungo filamentosos pertencente ao filo Ascomycota e corresponde ao teleomorfo (ou fase perfeita) da espécie *Aspergillus nidulans* (anamorfo, ou fase imperfeita). *E. nidulans* é um fungo homotático por ter capacidade de se reproduzir sexuadamente sem interagir com outros indivíduos da mesma espécie, ou seja, é auto fértil (HAN, 2009).

As placas de cultura deste organismo podem apresentar tanto estruturas reprodutivas assexuadas (conidióforos) quanto sexuadas (cleitotécios) e a razão entre esporulação sexuada ou assexuada em uma cultura deste fungo varia de acordo com as condições do meio de cultura e fatores de estresse (HAN, 2009).

A nomenclatura dual de fungos pleomórficos (aqueles que podem apresentar estados sexuais e assexuais) é comum. No 18º Congresso Internacional de Botânica em 2011, entretanto, ficou decidido que fungos pleomórficos passarão a ser chamados por apenas um nome em publicações científicas, seguindo o mote “*one fungus, one name*” (HAWSWORTH, 2011). Não está claro na literatura, porém, a nomenclatura definida para *Emericella/Aspergillus nidulans*. Neste trabalho, será assumido que, independente da estrutura reprodutiva desenvolvida, as xilanases secretadas pelo micélio das duas formas do fungo correspondem às mesmas enzimas e, portanto, referências bibliográficas sobre as xilanases de ambas as formas

serão consideradas. O nome *E. nidulans* foi escolhido para se referir ao fungo utilizado neste trabalho.

*E. nidulans* não é considerado GRAS (geralmente reconhecido como seguro, do inglês) pois é capaz de produzir e acumular esterigmatocistina, uma micotoxina carcinogênica semelhante à aflotoxina (YU *et al*, 1996). Apesar disto, é a espécie do gênero mais estudada geneticamente, tem o genoma sequenciado e vem sendo usada como organismo modelo para estudo de genética de eucariotos (GALAGAN *et al*, 2005).

O sistema xilanolítico deste fungo foi descrito na década de 90 por uma série de artigos publicados por Fernandez-Espinar *et al* (1992, 1993, 1994, 1996), por Orejas *et al* (1999, 2001) e por MacCabe *et al* (1998, 2001). No trabalho de Fernandez-Espinar *et al* (1996), foi observado que, quando cultivado na presença de xilana, o fungo *A. nidulans* secreta pelo menos três tipos de endoxilanasas denominadas X<sub>22</sub>, X<sub>24</sub> e X<sub>34</sub>, onde os números subscritos se referem a suas massas moleculares, em kDa. As xilanasas X<sub>22</sub>, X<sub>24</sub> e X<sub>34</sub> são denominadas como XynA, XynB e XynC no banco de dados UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), respectivamente. O fungo também produz uma  $\beta$ -xilosidase (KUMAR e RÁMON, 1996). As três xilanasas de *A. nidulans* já foram purificadas e parcialmente caracterizadas (FERNANDEZ-ESPINAR *et al*, 1993, 1994 e 1996) e tiveram o controle de expressão gênica investigado (OREJAS *et al*, 1999, 2001; MACCABE *et al*, 1998, 2001).

Já foi observada em pesquisas anteriores a capacidade deste fungo secretar xilanasas quando crescido em substratos lignocelulósicos como o resíduo de indústria têxtil “piolho de algodão”, engaço de bananeira (SIQUEIRA *et al*, 2010), farelo de trigo, farelo de lentilha, sabugo de milho e cascas de amendoim (KANGO *et al*, 2003). Não existem na literatura, entretanto, trabalhos de produção de xilanasas por *E. nidulans* crescido em bagaço de cana-de-açúcar, o que o presente trabalho se propõe a fazer.

## 2. Justificativas

Em estudo prévio feito por nosso grupo de pesquisa, *E. nidulans* produziu atividade de xilanase quando crescido em materiais lignocelulósicos,

em comparação com outros fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor* e *Trichoderma* (SIQUEIRA *et al*, 2010), e por isso foi escolhido para este trabalho de purificação e caracterização de xilanases.

O bagaço de cana-de-açúcar, por ser um dos principais resíduos agroindustriais brasileiros, barato e abundante e por conter um alto teor de holocelulose, foi escolhido neste trabalho para ser usado como fonte de carbono indutora de xilanases. Além disso, o potencial da utilização do bagaço para produção de etanol de segunda geração no Brasil incentiva o estudo de enzimas envolvidas em sua degradação.

Considerando que as xilanases apresentam uma série de aplicações biotecnológicas que contribuem para o desenvolvimento de processos e produtos amigáveis ao ambiente, a purificação e caracterização destas enzimas incentiva a utilização destes biocatalizadores na indústria.

Apesar da xilanase estudada neste trabalho já ter sido purificada e parcialmente caracterizada previamente, este trabalho visa aprofundar a caracterização desta enzima levando em conta aplicações industriais como hidrólise de biomassa lignocelulósica e branqueamento de papel.

### **3. Objetivos**

Produzir, purificar e caracterizar uma xilanase de *E. nidulans* crescido em bagaço de cana-de-açúcar visando o aproveitamento deste resíduo agroindustrial e a investigação do potencial biotecnológico da enzima.

Metas:

- Promover o crescimento de *E. nidulans* em meio de cultura líquido contendo o bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono
- Obter a curva de indução de atividade xilanolítica em *E. nidulans*
- Purificar uma xilanase
- Identificar a proteína purificada através de espectrometria de massa
- Realizar caracterização cinética, bioquímica e físico-química da xilanase purificada

- Verificar efeito de compostos fenólicos sobre a atividade, estabilidade e parâmetros cinéticos da xilanase purificada
- Identificar produtos de hidrólise da xilana pela enzima purificada
- Avaliar o potencial de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pelo extrato bruto de *E. nidulans*
- Avaliar o potencial do ultrafiltrado de *E. nidulans* na hidrólise de polpas de celulose em diferentes etapas do processo *Kraft*
- Fazer identificação molecular do isolado fungo

#### **4. Materiais e Métodos**

##### **4.1. Principais reagentes**

Os substratos xilana de aveia e de bétula, CMcelulose, pectina e manana foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, EUA). As resinas cromatográficas *DEAE-Sepharose*, *Sephacryl S-100* e *Sephadex-G-50* foram adquiridas da GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, EUA). As leituras espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro modelo SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices; Sunnyvale, CA, EUA).

##### **4.2. Isolamento e manutenção do microrganismo**

A linhagem do fungo *E. nidulans* utilizada neste trabalho foi isolada de compostagem natural de resíduos de algodão de indústria têxtil no estado de Santa Catarina – Brasil, como descrito no trabalho de Siqueira *et al* (2010). O microrganismo foi mantido em placas de Petri contendo meio de cultura BDA – 10% batata, 1% dextrose e 2% ágar (m/v) – à temperatura ambiente. O fungo também foi preservado a –80°C, em criotubos, imerso em solução de NaCl 0,9% (m/v), glicerol 50% (m/v) e Tween 80 0,01% (v/v).

O fungo foi previamente identificado morfológicamente como *E. nidulans* de acordo com as descrições de Klich (2002) e Samson *et al* (2000) pelo grupo de pesquisa do prof. Dr. Luís Roberto Batista, do Laboratório de Microbiologia

de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (Lavras-MG) (SIQUEIRA, 2010). A utilização da linhagem do fungo foi autorizada dentro do âmbito da rede Sisbiota de Fungos Filamentosos, com a concessão de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético nº 010770/2013-5.

#### 4.3. Identificação molecular do isolado do fungo

Para confirmação da identificação morfológica, foi realizada também sua identificação molecular. Para tanto, o fungo foi cultivado por 48h, a 28°C e 120 rpm em meio de cultura líquido contendo a seguinte composição:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (7 g/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (2 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1 g/L), extrato de levedura (0,6 g/L) e glicose (10 g/L) como fonte de carbono. O micélio foi filtrado a vácuo em papel Whatman nº5, lavado com água destilada e esterilizada, e liofilizado. O micélio seco foi macerado e submetido à extração de DNA pelo método de Raeder e Broda (1985). O trecho do genoma contendo a região ITS 1 (*internal transcribed spacer*), o gene de RNA ribossomal 5.8S e a região ITS 2 (figura 4.1) foi amplificado por PCR utilizando os *primers* universais ITS 4 e ITS 5, complementares a regiões conservadas dentro dos genes 28S e 18S, respectivamente (WHITE et al, 1990).

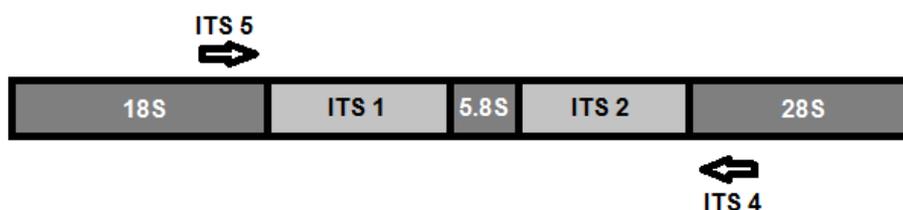


Figura 4.1. Esquema do trecho de DNA amplificado por PCR, contendo as regiões ITS 1 e 2 e o gene de RNA ribossomal 5.8S, e dos sítios de anelamento dos *primers* ITS 4 e 5.

A mistura de reação da PCR foi composta por tampão de Taq polimerase 1X (Invitrogen; Carlsbad, CA, EUA), 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM de dNTPs, 4 mM de cada *primer*, 1U de Taq polimerase *Platinum* (Invitrogen) e 1 ng de DNA genômico. As condições de PCR foram: 4 minutos iniciais de desnaturação a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 50°C por 1 minuto (anelamento dos *primers*) e 72°C por 1

minuto (extensão), e finalizado por 5 minutos a 72°C e mantido a 10°C até a interrupção do processo. O produto de amplificação foi analisado em gel de agarose 1% e 1 µg/mL de brometo de etídio.

A região de DNA amplificada foi sequenciada pelo método de Sanger. A sequência foi analisada utilizando o software Geneious R 6.1.6 e posteriormente comparada com a coleção de sequências de nucleotídeos do GenBank/NCBI (*National Center for Biotechnology*) utilizando a ferramenta Standard Nucleotide BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* – [www.blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)).

A identificação molecular do fungo foi feita no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Brasília sob orientação do Prof. Dr. Robert Miller com auxílio das pesquisadoras Glaucia Midorikawa e Rosane Mansan.

#### **4.4. Cultivo do microrganismo para produção de enzimas e construção da curva de indução de xilanases**

Para produção de xilanases, o fungo foi cultivado sob condição submersa em meio de cultura líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar como única fonte de carbono. A composição do meio líquido foi: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (7 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2 g/L), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,5 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 g/L), extrato de levedura (0,6 g/L) e bagaço de cana 1% (m/v).

Para preparação do inóculo, esporos do fungo crescido em meio BDA por 7 dias foram raspados com uma lâmina de vidro e diluídos em solução de NaCl 0,9% (m/v) e Tween 80 0,4% (v/v) de modo a obter uma suspensão contendo de 10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> esporos/mL. A contagem de esporos foi feita em microscópio ótico com uma câmara de Neubauer. Foram inoculados 3 mL desta suspensão em frascos erlenmeyer contendo 300 mL de meio de cultura. Os cultivos foram feitos em triplicata e conduzidos a 120 rpm e 28°C.

Alíquotas dos cultivos foram retiradas a cada 24 horas durante 14 dias e testes de atividade de xilanase e quantificação de proteínas foram realizados. A

curva de indução de produção de xilanases foi feito em triplicatas biológica e técnica.

Uma vez escolhido o sétimo dia para interrupção do cultivo, com base na curva de indução de xilanases (abordado posteriormente neste trabalho), o sobrenadante, ou extrato bruto (EB), contendo as enzimas secretadas pelo fungo foi separado da massa micelial e do bagaço por filtração à vácuo utilizando papel Whatman nº5 e funil de Büchner. Azida sódica foi adicionada ao EB para inibir o crescimento de microrganismos.

#### **4.5. Preparo do bagaço de cana-de-açúcar**

O bagaço de cana-de-açúcar, antes de ser utilizado no cultivo do fungo, foi autoclavado (imerso em água) a 121°C por 120 minutos e depois exaustivamente lavado em água corrente utilizando um saco de pano para remoção dos componentes solubilizados no tratamento. O material foi posteriormente seco em estufa a 60°C e moído. O bagaço foi providenciado junto à Usina CRV Álcool e Açúcar, no município de Carmo do Rio Verde – GO.

#### **4.6. Purificação da xilanase**

Xilanases microbianas são comumente purificadas por combinação de ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio e processos cromatográficos (principalmente filtração em gel e troca iônica), empregando normalmente de duas a cinco etapas de purificação, com rendimentos que variam de 0,2 a 78% (SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002; SÁ-PEREIRA *et al*, 2003).

O EB foi submetido a processos de separação de proteínas (esquematizado na figura 4.2) com o objetivo de purificar uma xilanase.

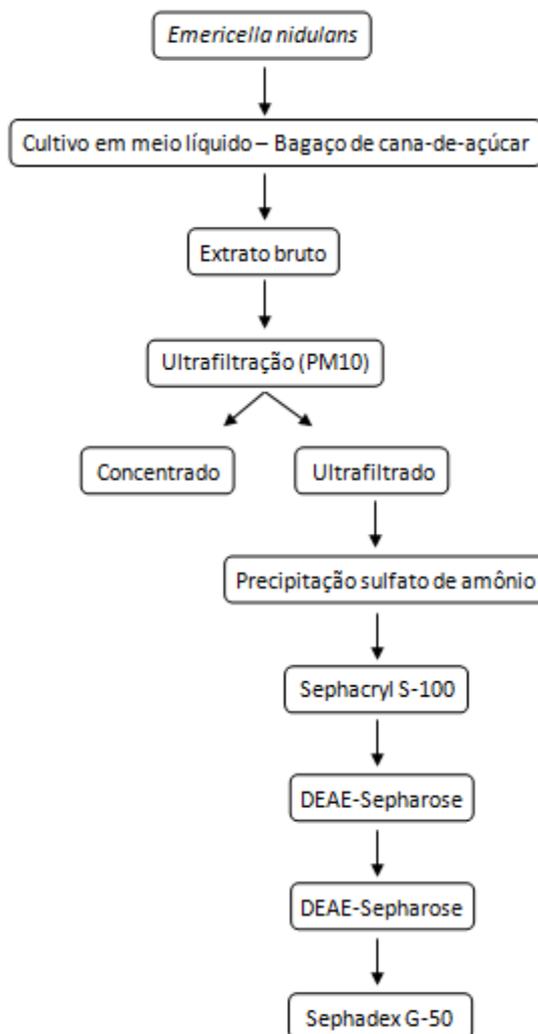


Figura 4.2. Processo de purificação de xilanase de *E. nidulans*.

Primeiramente, o EB foi submetido a ultrafiltração em membrana de retenção de 10 kDa (PM10, Milipore Co.; Billerica, MA, EUA) utilizando-se um sistema de ultrafiltração da mesma marca, sob agitação constante e pressão de 5 kgf/cm<sup>2</sup>. As duas frações obtidas foram denominadas concentrado (C) e ultrafiltrado (UF).

O UF foi posteriormente submetido à precipitação (*salting-out*) com sulfato de amônio a 60% (m/v) de saturação. O sal foi macerado e adicionado aos poucos ao UF, sob leve agitação, e mantido a 4°C por aproximadamente 16 horas. A solução foi centrifugada a 6000 rpm por 20 minutos e o pellet

resultante foi ressuspenso em água destilada de modo a concentrar a amostra 10 vezes. Esta amostra foi chamada de UF10x.

Alíquotas de UF10x foram fracionadas em uma coluna de cromatografia de filtração em gel *Sephacryl S-100* (2,7 x 32 cm) previamente equilibrada com solução tampão acetato de sódio 50mM, pH 5, contendo NaCl 0,15M e azida sódica. Frações de 5 mL foram coletadas a um fluxo de 20 mL/h.

As frações coletadas foram submetidas à leitura de absorvância a 280 nm para detecção de proteínas e a ensaios enzimáticos de xilanase (conforme descrito na seção 4.9). Frações contendo atividade xilanolítica foram coletadas e aplicadas em uma coluna de cromatografia de troca aniônica *DEAE-Sepharose* (1,9 x 3,5 cm) previamente equilibrada com solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5, contendo NaCl 0,15 M e azida sódica. Após total eluição das proteínas não aderidas, um gradiente de NaCl (0,15 – 1M) foi aplicado após 90 mL de corrida para eluir proteínas aderidas à resina. Frações de 3 mL foram coletadas a um fluxo de 18 mL/h. Frações eluídas em *DEAE-Sepharose* contendo xilanase foram re-aplicadas na mesma coluna sob as mesmas condições.

Frações com xilanases eluídas da segunda cromatografia em *DEAE-Sepharose* foram então aplicadas em uma coluna cromatográfica de filtração em gel *Sephadex-G-50* (2,7 x 53 cm) previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5, contendo NaCl 0,15 M e azida sódica. As frações com atividade xilanolítica foram coletadas e armazenadas a 4°C para posterior caracterização enzimática.

#### **4.7. Quantificação de proteínas**

A quantificação de proteínas das amostras foi feita pelo método de Bradford (1976) utilizando o reagente *Kit Protein Assay* (BioRad Laboratories; Hercules, CA, EUA). Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada para construção da curva padrão. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.8. Determinação de atividade xilanolítica

A atividade xilanolítica das amostras foi determinada utilizando a porção solúvel de xilana de aveia (*oatspelt*) que, para tal, passou por um tratamento para remoção da porção insolúvel. Seu preparo utilizou 1 g de xilana, 20 mL de NaOH 1M, 20 mL de HCl 1M e 60 mL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5, produzindo uma solução 1% (m/v). Tal solução foi centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado como substrato. A porção insolúvel foi reservada para ser utilizada posteriormente nos ensaios de determinação de parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{máx}$ ).

Em cada ensaio enzimático, 10  $\mu$ L de substrato foram incubados com 5  $\mu$ L de solução enzimática a 50°C por 30 minutos em um termociclador (BioRad Laboratories; Hercules, CA, EUA); 30 $\mu$ L de ácido dinitrosalicílico (DNS) foram adicionados ao final da reação e a mistura incubada por mais 10 minutos a 97°C. Finalmente, 150  $\mu$ L de água destilada foram adicionados e a leitura de absorbância a 540 nm foi realizada. Brancos de substrato corresponderam a misturas de 10  $\mu$ L de substrato e 5  $\mu$ L de água destilada, enquanto brancos de enzima corresponderam a 10  $\mu$ L de água e 5  $\mu$ L de solução enzimática. Os valores de absorbância dos brancos foram subtraídos dos valores dos ensaios enzimáticos.

Em alguns experimentos, como na verificação do efeito do pH, de íons, de agentes modificadores de aminoácidos e determinação dos parâmetros cinéticos, foram feitos ensaios enzimáticos com volume 10 vezes maior que os citados acima, utilizando tubos de ensaio e banhos-maria. Foram utilizados 100  $\mu$ L de substrato, 50  $\mu$ L de solução enzimática, 300  $\mu$ L de DNS e 1500  $\mu$ L de água.

Todos os ensaios foram feitos em triplicata. Xilose foi utilizada para construção da curva padrão. O método de detecção de atividade enzimática utilizado neste trabalho, desenvolvido por Miller (1959), baseia-se na capacidade do DNS ser reduzido pelas extremidades redutoras dos açúcares gerados pela degradação do polissacarídeo.

As atividades enzimáticas foram expressas em  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor liberada por minuto (UI – Unidade internacional) e por mililitro (mL) de solução enzimática (UI/mL).

Os ensaios de determinação de atividade de CMCCase, pectinase e mananase foram feitos da mesma forma como citado acima, utilizando CMC (carboximetilcelulose) 1%, pectina 0,5% e manana 0,5% (m/v), respectivamente, como substrato.

#### **4.9. Eletroforese**

Para a verificação do grau de pureza das amostras nos diversos passos da purificação e da massa molecular aparente da xilanase purificada, as amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida 15 % sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) como descrito por Laemmli (1970) a 25 mA de corrente constante utilizando um sistema *Mini-Protean III Cell* (BioRad Laboratories; Hercules, CA, EUA). As amostras, antes de aplicadas no gel, foram submetidas a precipitação por ácido tricloroacético (TCA). O pellet resultante foi ressuspenso em 15  $\mu\text{L}$  de água destilada e 15  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra 2X (Tris-HCl 125 mM, pH 7; SDS 2,0%; azul de bromofenol 0,05%; glicerol 20% e  $\beta$ -mercaptoetanol 5,0%). Em seguida, as amostras foram fervidas por 3 minutos. Um volume de 15  $\mu\text{L}$  foi aplicado no gel. O tampão de corrida da eletroforese tinha a seguinte composição: Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM e SDS 0,075% (m/v), pH 8,3. O marcador de massas moleculares *Low Molecular Weight* (LMW) (GE Healthcare) foi utilizado como referência de migração para determinação das massas moleculares aparentes. As bandas proteicas foram reveladas por coloração com nitrato de prata (BLUM *et al*, 1987).

#### **4.10. Identificação da proteína por espectrometria de massa**

Os experimentos para identificação da proteína foram feitos em um espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF modelo Autoflex II da marca Bruker Daltonics (Bremen, Alemanha), em modo positivo e refletor, com fonte de íons  $1=20\text{kV}$ , com faixa de massa de 800 a 3500 (m/z), intensidade de laser entre

20 e 40, após calibração do aparelho com uma mistura padrão de peptídeos fornecida pelo fabricante do equipamento.

A amostra de xilanase purificada (5 µg) foi aplicada em um gel de eletroforese SDS-PAGE 15% e corado com nitrato de prata antes da realização da espectrometria de massa. Uma vez identificada a banda correspondente à xilanase purificada, esta foi recortada do gel com um bisturi e submetida a um processo de descoloração, redução, alquilação, tripsinização e extração de peptídeos antes de ser aplicada no espectrômetro de massa. Os detalhes do protocolo estão descritos na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Detalhes do tratamento da amostra para aplicação no espectrômetro de massa.

<b>Etapas</b>	<b>Protocolo</b>
Lavagem	Lavagens alternadas da banda do gel com água deionizada e solução de acetonitrila (ACN) 50% (v/v) por duas vezes.
Descoloração	Incubação do gel em solução de ferrocianeto de potássio 15 mM e tiosulfato de sódio 50 mM por 10 minutos.
Redução	Incubação em solução de DTT 10 mM e $\text{NH}_4\text{CO}_3$ 100 mM a 56°C por 1 hora.
Alquilação	Incubação em solução de iodacetamida 55 mM e $\text{NH}_4\text{CO}_3$ 100 mM a 25°C por 45 minutos.
Lavagem	Lavagens alternadas com $\text{NH}_4\text{CO}_3$ 100 mM e ACN 100% (v/v) por três vezes.
Trituração	Uso de um pistilo de silicone
Secagem	Speedvac por 30 minutos.
Ressuspensão	Tampão de tripsina: $\text{NH}_4\text{CO}_3$ 50 mM, $\text{CaCl}_2$ 5 mM e tripsina 12,5 ng/µL, pH 8 ótimo para atuação da tripsina.
Tripsinização	Incubação com tampão de tripsina a 37°C por 12 horas.

A amostra (1 µL ) foi então aplicada em uma placa AnchorChip (Bruker Daltonics). Um volume de 0,5 µL de matrix HCCA (ácido α-ciano-4-

hidroxicinâmico, 20 mg/mL diluída em acetonitrila 90% e ácido tricloroacético 10% v/v) foi aplicado sobre a amostra.

A análise dos espectros peptídicos foi feita utilizando os softwares Flex Analysis e Biotoools (Bruker Daltonics). Os espectros foram calibrados utilizando-se como padrão os picos correspondentes à tripsina. Os picos contaminantes referentes à tripsina e queratina foram removidos. O espectro resultante foi comparado com o banco de dados de sequências de proteínas do UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) através do software MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Os parâmetros utilizados na busca foram: sessão taxonômica *Other Fungi*, uso de tripsina suína para degradação da proteína, carboxiamidametilação de cisteína como modificação constante, acetilação da extremidade N-terminal e oxidação de metionina como modificações variáveis, tolerância de desvio de massa molecular de 30 ppm e nenhuma clivagem perdida.

Uma vez feita a identificação da proteína por PMF (*peptide mass fingerprinting*), os dois peptídeos com maior intensidade foram selecionados para serem fragmentados e sequenciados por MS/MS (MALDI-TOF/TOF) para confirmar a identificação. Os peptídeos foram fragmentados pelo método LIFT com intensidade de laser na faixa de 30 a 40.

Os experimentos de espectrometria de massa foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da Universidade de Brasília com auxílio da Dra. Elaine Nascimento e do Prof. Dr. Carlos André Ricart.

#### **4.11. Efeito da temperatura**

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática do EB e da xilanase purificada foi determinado por meio de ensaios enzimáticos padrão (seção 4.9) sob as temperaturas 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70°C. Os ensaios foram feitos em triplicata.

#### **4.12. Efeito de pH**

Ensaio enzimáticos foram realizados na presença de tampão acetato de sódio (pH 3,0 a 6,5), fosfato de sódio (pH 6,0 a 8,0) ou tampão Tris-HCl (pH 7,5 a 9,0), todos na concentração 50mM e com força iônica ajustada com NaCl.

Misturas de reação contendo 75µL de tampão, 50 µL de solução de xilana solúvel 1% (m/v) e 25 µL de amostra enzimática foram submetidas às condições de incubação e detecção de açúcares redutores conforme descrito na seção 4.9.

#### **4.13. Avaliação de termoestabilidade**

A enzima purificada foi pré-incubada em tubos tipo eppendorf a três temperaturas: 28, 50 e 55°C. Alíquotas foram retiradas ao longo do tempo e submetidas a ensaios enzimáticos a 50°C para quantificação da atividade residual de xilanase. As atividades foram expressas como atividade relativa, sendo o tempo zero considerado como 100% de atividade.

#### **4.14. Influência de íons metálicos**

Foram realizados ensaios enzimáticos na presença de diversos íons metálicos e EDTA, em duas concentrações: 1 e 10mM. Os sais utilizados foram: MgCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, KCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub>.

A amostra enzimática foi pré-incubada a 25°C por 5 minutos com as soluções estoque dos respectivos íons para a concentração final de 1 ou 10 mM. A atividade residual de xilanase foi testada conforme descrito na seção 4.9.

O controle correspondeu à mistura de amostra enzimática com água deionizada. As atividades foram expressas como atividades relativas, sendo o controle com água considerado como 100% de atividade.

#### **4.15. Influência de aminoácidos e reagentes modificadores de aminoácidos**

Foram realizados ensaios enzimáticos na presença dos seguintes reagentes: DEPC, DTNB, DTP, DTT, EDC, iodacetamida, NBS, SDS,  $\beta$ -mercaptoetanol, L-cisteína e L-triptofano,

A xilanase purificada foi pré-incubada a 25°C por 5 minutos com solução estoque dos reagentes químicos de modo a resultar em concentrações que variaram de 1 a 20 mM, dependendo do reagente. Os ensaios foram conduzidos da mesma forma que os citados acima para verificação do efeito de íons metálicos.

#### **4.16. Influência de compostos fenólicos**

O efeito de seis compostos fenólicos foi testado sobre a atividade da xilanase purificada. Os compostos ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido cinâmico, ácido 4-hidróxi-benzóico, ácido tânico e vanilina foram escolhidos para este experimento com base nos trabalhos de Ximenes *et al* (2011) sobre inibição/desativação de celulasas.

As soluções estoques de ácido tânico e vanilina foram preparadas em água deionizada. Já as soluções dos ácidos ferúlico, *p*-cumárico, cinâmico e 4-hidróxi-benzóico, por terem baixa solubilidade em água, foram preparadas em etanol 50% (v/v), resultando numa concentração final de etanol de 10% (v/v) quando pré-incubadas com a enzima.

A enzima foi pré-incubada com cada composto fenólico, separadamente, a uma concentração final de 2 mg/mL (ou 0,2% m/v) nas temperaturas 28 e 50°C. Esta concentração, em termos de molaridade, foi de 1,17 mM para o ácido tânico e entre 10 e 14 mM para os demais compostos fenólicos. Alíquotas foram retiradas ao longo do tempo, inclusive no tempo 0h, para verificação da atividade residual de xilanase.

#### **4.17. Determinação de parâmetros cinéticos na ausência e presença de compostos fenólicos**

Experimentos de determinação de parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ ) foram realizados na ausência e presença dos compostos fenólicos na concentração de 0,2% (m/v) utilizando tanto a fração solúvel quanto insolúvel da xilana de aveia (*oat spelt*) como substratos.

As porções solúvel e insolúvel da xilana foram separadas conforme explicado na seção 4.9. As duas frações da xilana foram dialisadas exaustivamente contra água destilada e depois liofilizadas. O pó resultante foi ressuspensão em água destilada de modo a obter soluções estoque de 60 mg/mL.

A enzima purificada foi pré-incubada a 25°C por 5 minutos com os compostos fenólicos, com água ou etanol (controles) e posteriormente incubadas com o substrato. Foram realizados ensaios enzimáticos padrão (descrito na seção 4.9) com concentrações finais de substrato variando entre 1 e 40 mg/mL. Os ensaios com xilana insolúvel foram feitos em tubos tipo eppendorf para que a mistura pudesse ser centrifugada após a reação.

Os valores das constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e das velocidades máximas de reação ( $V_{m\acute{a}x}$ ) foram calculados em mg/mL e UI/mL, respectivamente, e foram estimados pelo software *Enzfitter* (LEATHERBARROW, 1987) através de regressão não-linear utilizando a equação de Michaelis-Menten.

#### **4.18. Identificação e quantificação dos produtos de hidrólise da xilana**

Soluções de xilana de bétula (10 mg/mL), em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5, foram incubadas com a xilanase purificada, numa proporção de volume de 2:1, a 28°C e 120 rpm por 24 horas. As porções solúvel e insolúvel da xilana foram testadas separadamente. O controle foi feito substituindo-se o volume de enzima por água destilada e submetido às mesmas condições de ensaio. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 6 horas para as seguintes

análises: 1) Quantificação de açúcares redutores totais por DNS, expressa em mg/mL. 2) Identificação e quantificação dos produtos de hidrólise por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) como descrito a seguir.

Os produtos de hidrólise da xilana foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de troca aniônica de alta performance acoplada a um detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD, do inglês *high performance anionic exchange chromatography – pulsed amperometric detection*). Alíquotas de 75  $\mu$ L do hidrolisado foram fervidas por 10 minutos, liofilizadas, ressuspensas em 500  $\mu$ L de água deionizada e aplicadas no aparelho de HPLC. A partir deste volume, alíquotas de 10  $\mu$ L foram recolhidas pelo amostrador (*auto sampler* AS40, Dionex Co.) e injetadas na coluna cromatográfica. As amostras foram analisadas em um sistema Dionex ICS-3000 DC Ion Chromatography, utilizando uma coluna CarboPac 100 e pré-coluna CarboPac Guard (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA).

As corridas cromatográficas foram feitas em um fluxo de 0,25 mL/min e a 20°C, usando um método de 70 minutos de duração. As amostras foram eluídas em solução de NaOH 100 mM e posterior gradiente de acetato de sódio 0 – 500 mM, com NaOH 100mM (Merck; Darmstadt, Alemanha). A coluna foi reequilibrada com NaOH 100 mM por 15 minutos entre as injeções sucessivas.

Os açúcares foram identificados em detector eletroquímico ED40, e os dados analisados pelo software Chromeleon 6.8 SR8 (Dionex Co.). D-xilose (X1) e xilooligossacarídeos com grau de polimerização de 2 a 6 (xilobiase, X2; xilotriose, X3; xilotetraose, X4; xilopentaose, X5 e xilohexaose, X6; Megazyme Corporation, Wicklow, Irlanda) foram utilizados como padrão para análise dos produtos de hidrólise da xilana.

Os experimentos com HPLC foram realizados no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade de Brasília sob orientação da Profa. Dra. Lourdes Isabel Velho do Amaral e do Prof. Dr. Clóvis Oliveira Silva.

#### **4.19. Ensaios de hidrólise de polpas de celulose em diferentes estágios do processo *Kraft***

Experimentos de hidrólise enzimática de polpas de celulose em diferentes estágios de branqueamento foram realizados com o objetivo de avaliar o potencial do UF de hidrolisar a porção hemicelulósica das polpas.

Foram utilizadas polpas de celulose de três estágios do processo *Kraft* de branqueamento: polpa escura, pré-branqueada e clara. A polpa escura foi resultante do cozimento com hidróxido de sódio e sulfito de sódio e lavagem da madeira. A polpa pré-branqueada foi resultante da deslignificação da polpa escura por tratamento com O<sub>2</sub>. A polpa branca foi obtida pelo branqueamento da polpa pré-branqueada com cloro.

As polpas de celulose foram obtidas a partir da mistura de *Eucalyptus grandis* (40%), *E. saligna* (30%) e *E. urophylla* (30%), produzidas pela empresa Conpacel (Limeira – SP) e fornecidas pelo Prof. Dr. Francides Gomes da Silva Júnior do Laboratório de Química, Celulose e Energia, Departamento de Ciências Florestais, ESALQ - Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP.

Misturas de solução enzimática (UF) e polpa de celulose (em solução aquosa 10 mg/mL) numa proporção de volume de 1:2 foram incubadas a 50°C e 120 rpm por 3 horas. Os controles foram feitos substituindo-se o volume de enzima por água destilada e submetidos às mesmas condições de ensaio.

Alíquotas foram retiradas a cada hora para as seguintes análises:

1) Quantificação de açúcares redutores totais por DNS como descrito anteriormente.

2) Quantificação de pentoses livres pelo método de orcinol-férrico (ensaio de Bial). Alíquotas de 100 µL do hidrolisado foram misturadas com 100 µL do reagente A (ácido tricloroacético 10% m/v) e fervidas por 15 minutos. Um volume de 600 µL de reagente B (sulfato de amônio férrico 1,15% e orcinol 0,2% m/v diluídos em solução HCl 9,6M) foi adicionado e as misturas foram

fervidas por mais 20 minutos. Os ensaios foram diluídos 10 vezes e as absorbâncias a 660 nm foram lidas. D-xilose foi utilizada como pentose padrão.

3) Dosagem de glicose por sistema de determinação enzimática de glicose (glicose oxidase) da marca Doles (Goiânia-GO). Alíquotas de 10  $\mu$ L do hidrolisado foram incubadas com 1 mL de reagente de cor à temperatura ambiente por 30 minutos e lidas a 500 nm. Uma solução de glicose contida no kit foi utilizada como padrão.

4) Análise de liberação de cromóforos: alíquotas de 20  $\mu$ L foram diluídas 10 vezes em água destilada e submetidas a leituras de absorbância a 237, 254, 280 e 456 nm.

5) Identificação e quantificação dos produtos de hidrólise por HPLC como descrito na seção anterior.

#### **4.20. Ensaios de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**

Experimentos para avaliar o potencial de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pelo EB de *E. nidulans* foram realizados. Três amostras deste resíduo foram testadas: bagaço não tratado ou "*in natura*", pré-tratado por explosão à vapor e pré-tratado por hidrólise com ácido sulfúrico.

As três amostras de bagaço de cana-de-açúcar foram gentilmente cedidas pelos pesquisadores Dr. Edgardo Olivares Gómez e Dr. George Jackson de Moraes Rocha do Laboratório Nacional de Ciências e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas – SP.

Os resíduos pré-tratados foram produzidos pela Usina Vale do Rosário, no município de Morro Agudo – SP. O pré-tratamento do bagaço por explosão à vapor foi realizada em um reator fabricado por Caldema Equipamentos Industriais Ltda. de 5000L. O reator foi pressurizado com vapor a 15,7 kg/cm<sup>2</sup> e 200°C por 7 minutos e despressurizado subitamente. O material foi lavado exaustivamente até a remoção total dos componentes solubilizados na reação.

Já o pré-tratamento por hidrólise ácida foi realizado em um reator em escala piloto de 350L com solução de ácido sulfúrico 100 mg/g de bagaço seco e relação sólido/líquido de 1:10, a 120°C por 10 minutos. O material foi então centrifugado para separar a fração sólida e depois lavado para remoção dos componentes solubilizados.

Misturas de EB e bagaço de cana-de-açúcar (em solução aquosa –10 mg/mL) numa proporção de volume de 1:2 foram incubadas a 28°C e 120 rpm e alíquotas foram retiradas nos tempos zero, 24, 48, 72 e 96 horas para quantificação de açúcares totais por DNS e para identificação e quantificação dos produtos de hidrólise por HPLC (conforme descrito na seção 4.18).

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Identificação molecular do fungo

A técnica de PCR pode ser usada para estabelecer relações taxonômicas e filogenéticas entre fungos (WHITE *et al*, 1990). A comparação de sequências de DNA que codificam RNAs ribossomais tem sido extensivamente utilizada para identificação de fungos ao nível de espécie. O rDNA nuclear em fungos é organizado em unidades que se repetem *in tandem* centenas de vezes ao longo do genoma. Dentro de cada unidade, os genes das três subunidades ribossomais 18S, 5.8S e 28S são separados pelas regiões espaçadoras não-codificantes (*internal transcribed spacer*) ITS1 e ITS2. As regiões ITS, por evoluírem rápido, são mais variáveis que as sequências codificantes, sendo úteis para distinguir espécies dentro de um mesmo gênero. A amplificação destas regiões variáveis dos genes de rDNA é possível com o uso de *primers* que se anelam às regiões conservadas que as flanqueiam (EDEL, 1998). A comparação de sequência de nucleotídeos da região ITS1 – 5.8S – ITS2 já foi utilizada para distinguir com sucesso espécies do gênero *Aspergillus* (HENRY *et al*, 2000).

O produto de PCR foi sequenciado e teve tamanho estimado em 576 pares de bases, menor que o encontrado na literatura, que normalmente apresenta mais de 590 pares de bases. As duas extremidades do trecho

amplificado tiveram sequenciamento pouco confiável (de acordo com as análises pelo software Geneious R) e por isso foram excluídas, resultando num trecho de 546 pares de bases (com sequenciamento confiável) que foi utilizado para análise de nBLAST. O teste nBLAST de alinhamento do trecho do genoma do isolado de fungo utilizado neste trabalho contra o banco de dados GenBank/NCBI apresentou 99,8% de similaridade de sequência com diversos isolados de *E. nidulans* (isolados RGT-S3, UOA HCPF 9186, UOA HCPF 9147, UOA HCPF 10647 e RTMH13.C5, isoladas de diversas origens como a partir de pacientes gregos com aspergilose, a partir da planta *Rumex gmelinni*, ou isoladas de localidades do Reino Unido; ARABATZIS et al, 2011; HAMMOND et al, 2008). Houve também menor percentual de similaridade de sequência com outras linhagens de *E. nidulans*, com 2 ou mais nucleotídeos não alinhados. A figura 5.1 mostra o alinhamento de nucleotídeos entre o isolado utilizado neste trabalho e o isolado de *E. nidulans* RGT-S3.

Apesar disto, isolados de outras espécies como *A. varicolor*, *E. rugulosa*, *E. dentata* e *E. cleistominuta*, além de isolados não identificados até o nível de espécie, também tiveram alta homologia de sequência (>99%) da região ITS1 – 5.8S – ITS2 com o isolado utilizado neste trabalho (figura 5.2).

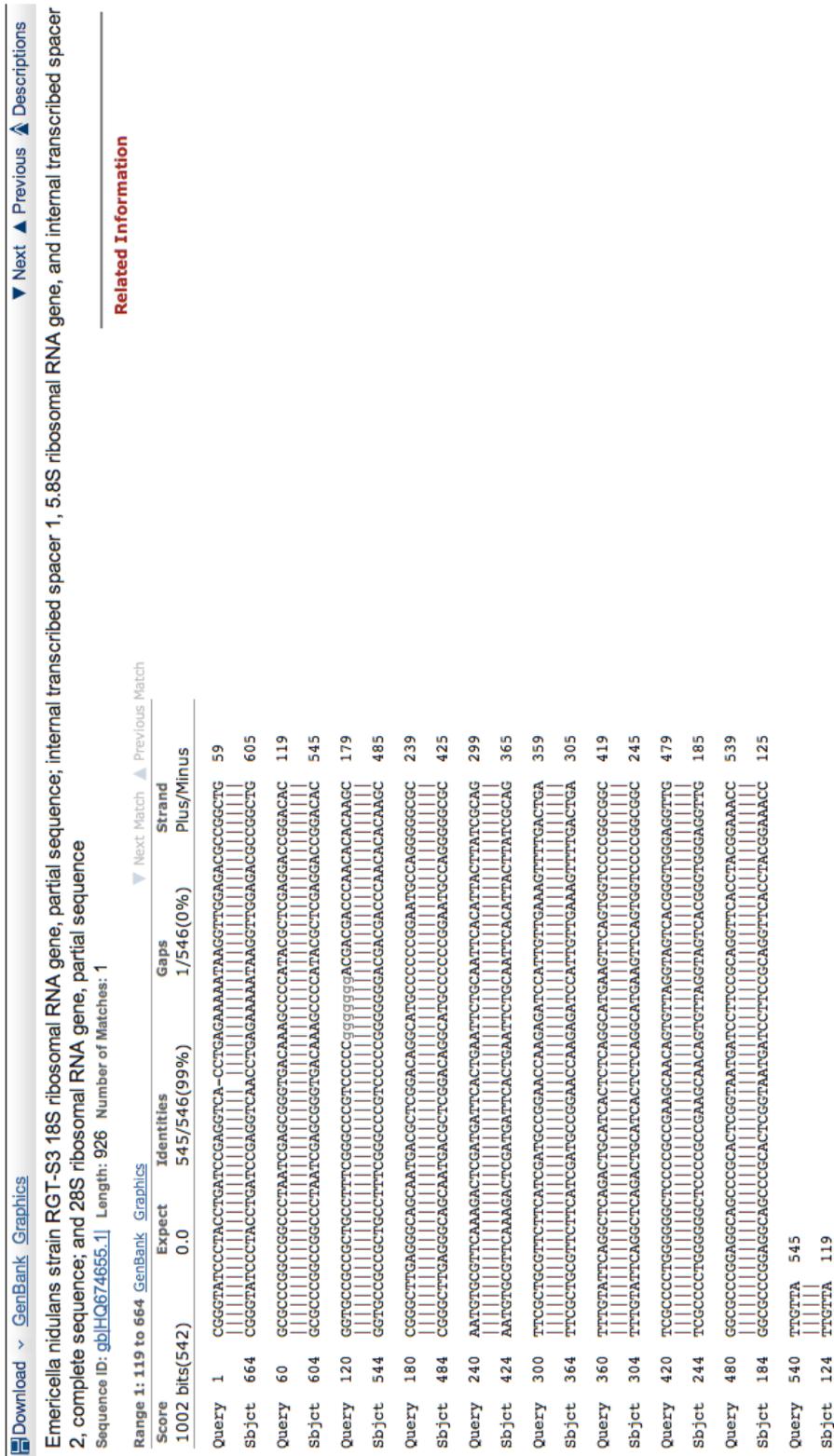


Figura 5.1. Comparação de sequência nucleotídica da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do isolado de *E. nidulans* RGT-S3 com o isolado utilizado neste trabalho.



Trabalhos anteriores indicam que é possível haver diferenças no trecho ITS1 - 5.8S - ITS2 entre diferentes isolados da mesma espécie. No trabalho de HENRY *et al* (2000), diferenças de até 4 nucleotídeos (99,3% de similaridade) na sequência ITS1 – 5.8S – ITS2 de diferentes isolados de *Aspergillus/Emericella nidulans* foram encontradas. Além disso, no mesmo trabalho, 99% de similaridade do trecho ITS1 – 5.8S – ITS2 entre *E. nidulans* e *E. quadrilineata* também foi observada.

As espécies *A. varicolor*, *E. rugulosa*, *E. dentata* e *E. cleistominuta* e *E. quadrilineata*, com quem o isolado de *E. nidulans* utilizado neste trabalho, assim como no de HENRY *et al* (2000), mostrou alta similaridade da região ITS1 – 5.8S – ITS2, pertencem todos à mesma seção filogenética (seção Nidulantes) (PETERSON, 2008).

Estes resultados indicam que a comparação da região ITS1 – 5.8S – ITS2 não tem resolução suficiente para diferenciar a espécie *E. nidulans* de algumas outras espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Emericella* pertencentes à mesma sessão filogenética.

A comparação de sequência de outras regiões do genoma além da região ITS, como os genes das proteínas  $\beta$ -tubulina e calmodulina, também são comumente utilizadas para identificação de isolados de fungos ao nível de espécie (PETERSON, 2008). Dentre as perspectivas deste trabalho está o sequenciamento destes trechos para identificação mais confiável do microrganismo.

Apesar disso, a identidade de 99,8% da sequência ITS1 – 5.8S – ITS2 com diferentes linhagens de *E. nidulans* corroboram o resultado da identificação morfológica realizada previamente (SIQUEIRA, 2010), que também indicou a espécie utilizada neste trabalho com *E. nidulans*.

## **5.2. Curva de indução de produção de xilanases**

*E. nidulans* foi capaz de secretar enzimas xilanolíticas quando crescido em meio de cultura líquido contendo o resíduo bagaço de cana-de-açúcar

como fonte de carbono. O perfil de indução de produção de xilanases está mostrado na figura 5.3.

Atividade xilanolítica foi detectada desde o primeiro dia de cultivo e continuou aumentando ao longo dos dias, atingindo um pico de atividade no sétimo (0,580 UI/mL) e outro no décimo segundo dia (0,614 UI/mL). A concentração de proteínas diminuiu no primeiro dia, provavelmente devido ao consumo de proteínas presentes no meio de cultura, derivadas do extrato de levedura e do bagaço de cana-de-açúcar, resultando numa alta atividade específica de xilanase (figura 5.3). A partir do segundo dia, a quantidade de proteínas passou a aumentar, diminuindo gradativamente a atividade específica de xilanase. Isto sugere que outras proteínas envolvidas na degradação do substrato são secretadas pelo fungo, concomitantemente às xilanases. Visando a obtenção de uma quantidade grande de enzimas xilanolíticas, foi escolhido o sétimo dia de cultivo para interromper o crescimento e prosseguir com a purificação e caracterização enzimática, uma vez que este dia correspondeu ao primeiro pico de atividade.

A escolha do primeiro dia de cultivo, momento em que a atividade específica de xilanase atinge seu valor máximo, poderia ter facilitado o processo de purificação de xilanases. Apesar disto, é possível que a composição de formas de xilanases seja diferente entre o primeiro e o sétimo dias de cultivo. Desta forma, é possível que a xilanase purificada neste trabalho (assunto abordado posteriormente, seção 5.3) não esteja presente no primeiro dia de cultivo. A realização de zimografia para detecção de atividade de xilanase ao longo dos dias de cultivo seria útil para identificar o perfil de produção de diferentes formas de xilanase, e esta análise está dentre as perspectivas futuras deste trabalho.

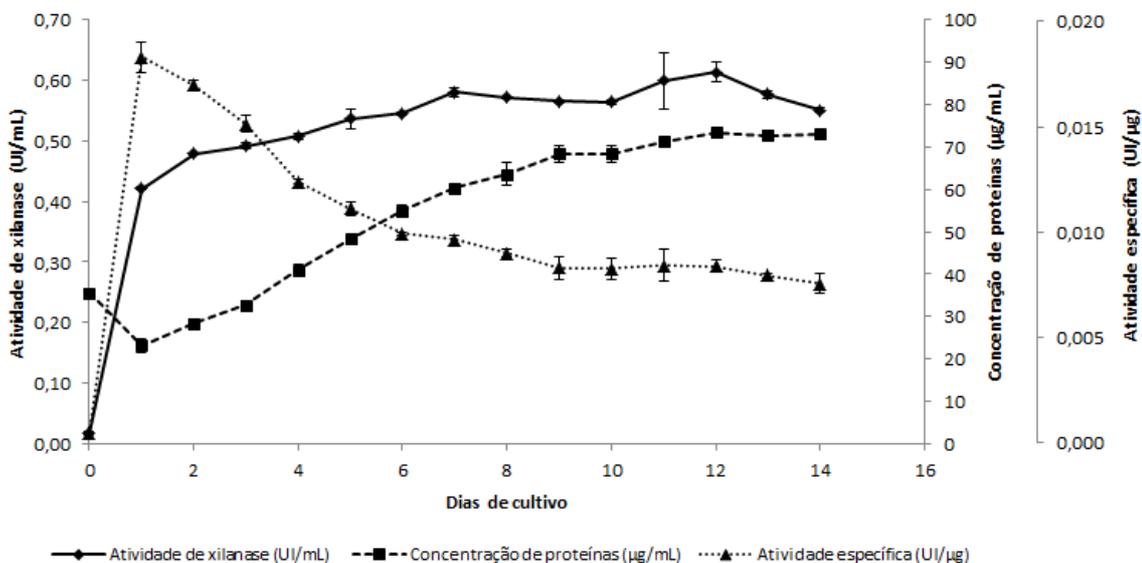


Figura 5.3. Perfil de indução de xilanases de *E. nidulans* em meio de cultura líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (1%, m/v) como fonte de carbono.

Este resultado confirma resultados observados em outros trabalhos (MOREIRA *et al*, 2008; MILANEZI *et al*, 2010) de que o bagaço de cana-de-açúcar, contendo normalmente 22,7 – 27% de hemicelulose (CANILHA *et al*, 2012), pode ser utilizado para produção de xilanases.

Já havia sido observado o uso de resíduos lignocelulósicos como piolho de algodão, engaço de bananeira (SIQUEIRA *et al*, 2010), farelo de trigo, farelo de lentilha, sabugo de milho e cascas de amendoim (KANGO *et al*, 2003) para produção de xilanases por *E. nidulans*. Além disso, *E. nidulans* já foi isolado de amostras de bagaço de cana-de-açúcar (ABDEL-SATER e EL-SAID, 2001).

A escolha da fonte de carbono é um fator importante para produção de xilanases em larga escala. A xilana pura é cara, e fontes lignocelulósicas ricas em xilana são alternativas abundantes e baratas para o crescimento de microrganismos e indução de produção xilanases (SIQUEIRA *et al*, 2010; SIQUEIRA e FILHO, 2010), podendo mostrar um potencial de indução maior do que xilanas puras (HALDRICH, 1996).

### 5.3. Purificação

Após ultrafiltração do EB através de membrana de retenção de 10kDa, atividade xilanolítica foi encontrada em ambos o concentrado e o ultrafiltrado. Pelo fato da atividade específica de xilanase do Ultrafiltrado (22,3 UI/mg) ter aumentado em relação ao EB (12,75 UI/mg) e ter sido maior que a do Concentrado (19,1 UI/mg), esta amostra foi escolhida para prosseguir com o processo de purificação de xilanases.

O ultrafiltrado foi então concentrado dez vezes (UF10x) através de precipitação com sulfato de amônio e então aplicado em resina de filtração em gel. O perfil cromatográfico de UF10x aplicado em Sephacryl S-100 está mostrado na figura 5.4.

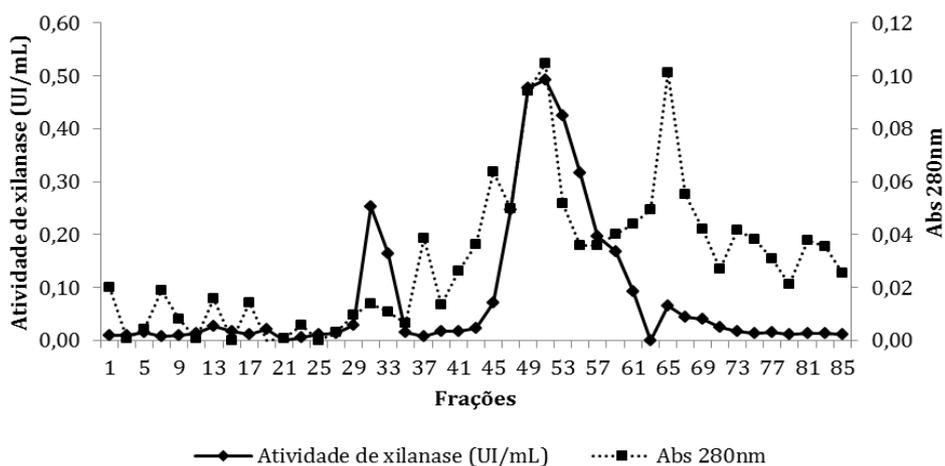


Figura 5.4. Perfil cromatográfico de UF10x em coluna de filtração em gel Sephacryl S-100.

O cromatograma mostra dois picos de atividade de xilanase, o que evidencia a multiplicidade de xilanases secretadas por *E. nidulans*. O segundo pico (com maior atividade) foi coletado para prosseguir com a purificação. Tal amostra foi aplicada em resina cromatográfica de troca aniônica DEAE-Sephacryl e o perfil obtido está mostrado na figura 5.5. A xilanase não se ligou à resina aniônica, sugerindo que esta proteína apresenta carga positiva quando em pH 5 (pH do tampão), ou seja, apresenta ponto isoelétrico (pI) maior que 5.

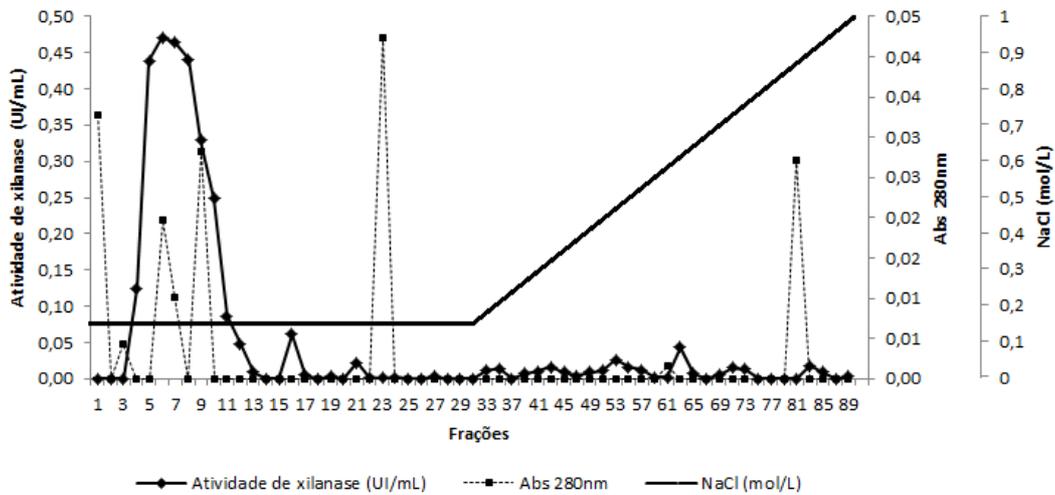


Figura 5.5. Perfil cromatográfico do segundo pico de atividade xilanólica obtido na cromatografia Sephacryl S-100 aplicado em coluna de troca aniônica DEAE-Sepharose.

O pico de xilanase obtido na cromatografia DEAE-Sepharose foi então recromatografado na mesma resina sob as mesmas condições. O resultado, mostrado na figura 5.6, é semelhante ao primeiro, com o pico de atividade eluído nos primeiros tubos.

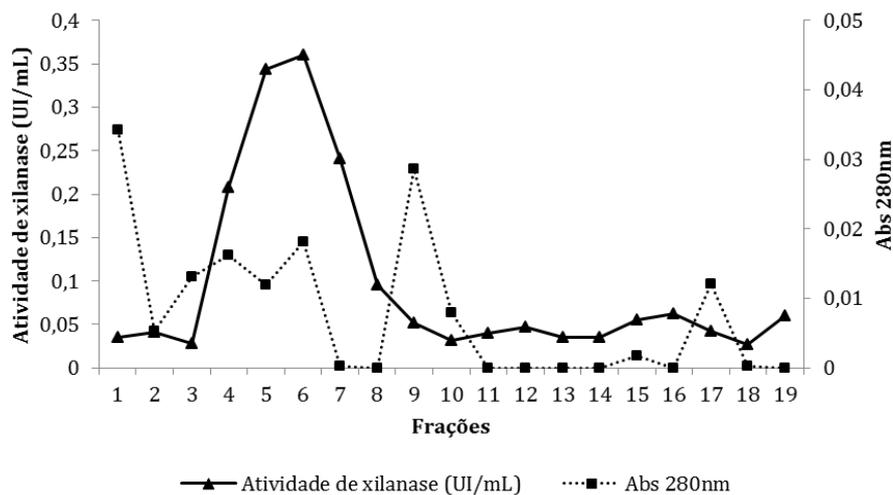


Figura 5.6. Perfil cromatográfico do pico da xilanase obtido em DEAE-Sepharose aplicado na mesma coluna, sob as mesmas condições. Gradiente de NaCl não mostrado.

O pico de atividade xilanólica obtido em DEAE-Sepharose foi coletado e então aplicado em uma coluna de filtração em gel Sephadex G-50 (figura 5.7). O pico de atividade apresentou uma xilanase aparentemente purificada.

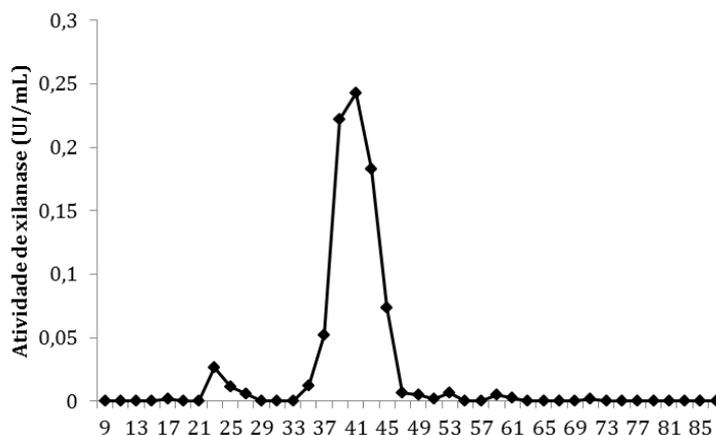


Figura 5.7. Perfil cromatográfico do pico de atividade xilanólítica obtido na cromatografia DEAE-Sepharose aplicado em cromatografia de filtração em gel Sephadex G-50.

Como mostrado na tabela 5.1, o processo de purificação gerou um aumento de 8,51 vezes na atividade específica da xilanase purificada em relação ao EB e um rendimento de purificação de 1,47%. Baixos rendimentos são normalmente obtidos quando muitas etapas de purificação são empregadas, como realizado neste trabalho (SÁ-PEREIRA *et al*, 2003).

Tabela 5.1. Etapas de purificação do extrato bruto de *E. nidulans* crescido em meio de cultura líquido contendo bagaço de cana-de-açúcar (1%, m/v) como fonte de carbono.

Etapas de purificação	Proteína total (mg)	Atividade total (UI)	Atividade específica (UI/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	37,71	480,75	12,75	1,00	100,00
Ultrafiltrado (PM10)	15,41	343,58	22,30	1,75	71,47
Ultrafiltrado 10x (sulfato de amônio)	3,39	37,12	10,97	0,86	7,72
Sephacryl S-100	0,25	21,02	83,69	6,56	4,37
DEAE -Sepharose	0,05	7,52	160,15	12,56	1,57
DEAE -Sepharose	0,02	4,69	214,23	16,80	0,98
Sephadex G-50	0,07	7,08	108,52	8,51	1,47

Os ensaios enzimáticos com amostras não purificadas não medem somente a atividade de uma xilanase, mas de todas as enzimas envolvidas em conjunto na degradação da xilana. A separação de diferentes xilanases,

xilosidases e enzimas acessórias presentes no EB durante o processo de purificação, que antes atuavam em sinergia na desconstrução da xilana, diminui a eficiência da xilanase purificada na hidrólise deste polissacarídeo. Por esse motivo, é esperado que o fator e o rendimento de purificação estejam subestimados (FILHO *et al*, 1993b).

O passo de precipitação da amostra Ultrafiltrado (UF) com sulfato de amônio, resultando em Ultrafiltrado 10x, se mostrou a principal etapa responsável pelo baixo rendimento do processo de purificação. O procedimento promoveu a diminuição da atividade específica, do fator de purificação e do rendimento de purificação, que caiu cerca de 10 vezes (de 71, 47 para 7,72%). É possível observar que boa parte da proteína total, incluindo xilanases, provavelmente não precipitou e permaneceu no sobrenadante. Segundo Sá-Pereira *et al* (2003), na precipitação com sulfato de amônio de amostras contendo xilanases, é comum o sobrenadante apresentar atividade xilanólítica, que é atribuída principalmente a xilanases de baixa massa molecular, mas isso não foi testado no presente trabalho. Além disso, não foi feita a diálise do precipitado resultante do tratamento com sulfato de amônio. O sal pode interferir na determinação da atividade enzimática e a realização de uma etapa de diálise ou dessalinização poderia ter revelado uma maior atividade de xilanase nesta amostra. Uma maior saturação de sulfato de amônio poderia ter sido testada para recuperar uma maior porcentagem da atividade xilanólítica. A concentração do UF por liofilização também poderia ter sido testada para substituir o processo de precipitação com sulfato de amônio.

A xilanase purificada, quando analisada em SDS-PAGE 15% corado com nitrato de prata, mostrou apenas uma banda proteica, correspondendo a uma massa molecular de aproximadamente 22 kDa (figura 5.8), observada também para X22 purificada de *A. nidulans*. A massa molecular desta xilanase corresponde à faixa normalmente observada para xilanases de 13 a 50 kDa (FERNANDEZ-ESPINAR *et al*, 1993).

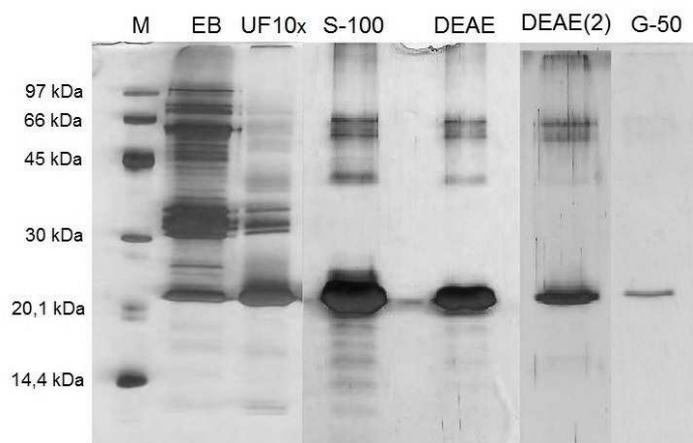


Figura 5.8. SDS-PAGE 15% de amostras dos passos sequenciais de purificação a partir do extrato bruto de *E. nidulans* crescido em bagaço da cana-de-açúcar. Bandas coradas com nitrato de prata.

A habilidade de xilanases com massa molecular superior a 10 kDa (como a xilanase purificada neste trabalho) de atravessarem membranas de ultrafiltração com poros de retenção de 10 kDa já foi observada, e isso provavelmente ocorre devido à alterações conformacionais, à estrutura compacta da enzima ou à não-uniformidade dos poros da membrana. A habilidade de penetrar por pequenos poros as tornariam capazes de penetrar na matriz lignocelulósica. Xilanases de baixa massa molecular são úteis em etapas de branqueamento de papel, uma vez que podem penetrar com maior facilidade a estrutura das fibras constituintes da parede celular vegetal e alterar de maneira eficiente as propriedades da polpa (FILHO *et al*, 1993a, 1993b; MOREIRA *et al*, 2008).

#### 5.4. Identificação da xilanase purificada por espectrometria de massa

A figura 5.9 mostra o espectro de peptídeos obtido em MALDI-TOF após digestão da proteína purificada com tripsina. A comparação do espectro peptídico da proteína purificada contra o banco de dados UniProt (através do software Mascot) apontou similaridade significativa com a enzima Endo- $\beta$ -1,4-xilanase A (XynA) pertencente a diversos isolados do organismo *E. nidulans* (isolados FGSC A4, ATCC 38163, CBS 112.46, NRRL 194 e M139). Esta

enzima XynA também corresponde à xilanase X22, purificada e caracterizada a partir de *A. nidulans* por Fernandez-Espinar *et al* (1993).

Dos 43 peptídeos detectados pelo espectrômetro de massa, 6 corresponderam a peptídeos de XynA de *E. nidulans* (tabela 5.2), que resultaram em uma cobertura de 39% da sequência desta proteína (figura 5.10). Dos 6 peptídeos em comum entre a xilanase purificada e XynA de *E. nidulans*, dois (aqueles com relação massa/carga 1853,870 e 2203,054 m/z) foram fragmentados e sequenciados por meio de MALDI TOF/TOF. A fragmentação do peptídeo 1853,870 m/z levou à confirmação da sequência GTVYSDGATYDIYTATR enquanto a fragmentação do pico 2203,054 m/z levou à confirmação da sequência YNAPSIEGTATFEQFWSVR (tabela 5.2), indicando homologia extensa com XynA de *E. nidulans*.

Pelo fato dos peptídeos da xilanase purificada terem coberto apenas 39% de XynA de *E. nidulans*, e de terem coberto principalmente a porção N-terminal desta proteína, os resultados sugerem que a enzima estudada neste trabalho pode não ser idêntica à enzima XynA. Considerando que esta xilanase foi purificada de um novo isolado de fungo *E. nidulans*, esta enzima pode ser uma xilanase diferente, podendo apresentar diferenças no comprimento, na composição de aminoácidos e nas modificações pós-traducionais, resultando em propriedades bioquímicas diferentes. Apesar disto, a enzima purificada e caracterizada neste trabalho será chamada de XynA, uma vez que apresenta similaridade significativa com XynA de *E. nidulans*.

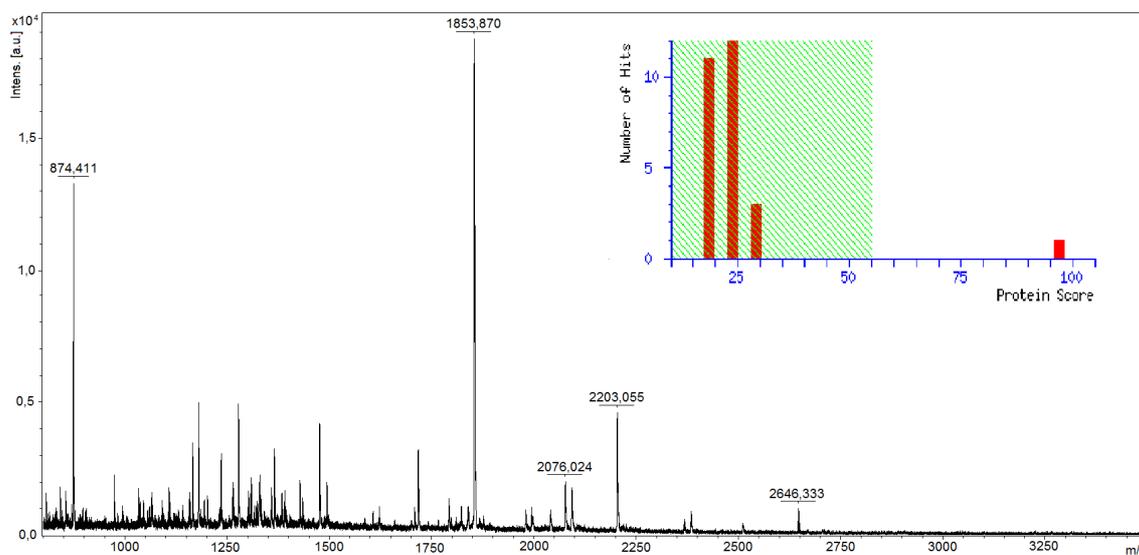


Figura 5.9. Espectro de peptídeos da enzima purificada após digestão com tripsina, obtido em MALDI-TOF. A comparação contra o banco de dados UniProt apontou similaridade significativa com a enzima endo-beta-1,4-xilanase A (XynA) de *E. nidulans*, com *protein score* de 97 (onde valores maiores que 55 foram considerados significativos).

Tabela 5.2. Lista dos 6 peptídeos em comum entre a xilanase purificada e XynA de *E. nidulans*.

Peptídeo	Começo-fim	Sequência	Massa molecular observada (Da)
1	86-93	GWNPGSTR	874,4108
2	141-157	GTVYSDGATYDIYTATR	1853,8697
3	158-176	YNAPSIEGTATFEQFWSVR	2203,0553
4	181-200	TGGTVTTANHFNAWAALGMR	2076,0244
5	181-200	TGGTVTTANHFNAWAALGMR + Oxidação (M)	2092,0589
6	201-225	LGTHNYQIVATEGYQSSGSASITVY	2646,3326

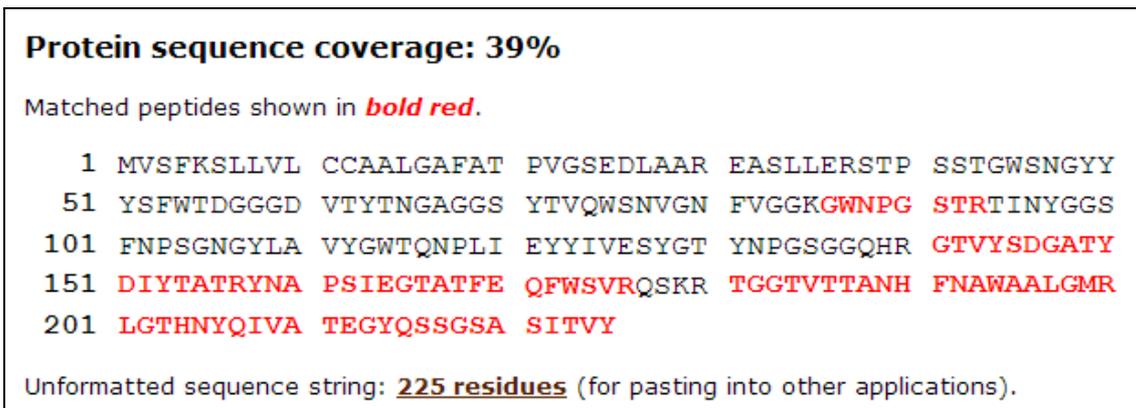


Figura 5.10. Sequência de resíduos de aminoácidos de Endo-β-1,4-xilanase A (XynA) de *E. nidulans* (como mostrada no bando de dados UniProt) deduzida a partir do genoma deste organismo. As sequências em vermelho correspondem aos peptídeos identificados por espectrometria de massa.

### 5.5. Teste sobre diferentes substratos

A atividade da enzima purificada foi testada com outros polissacarídeos além da xilana, como pectina, manana e CMC. A enzima apresentou atividade predominante de xilanase, não atuando sobre pectina, manana e CMC, como mostrado na tabela 5.3. A ausência de atividade sobre CMC confere à xilanase purificada o potencial de aplicação em processos industriais que requerem xilanases sem atividade celulolítica, como no caso do branqueamento de polpa de celulose e papel.

Este resultado está de acordo com o obtido por Fernandez-Espinar *et al* (1993) para a xilanase X22 purificada de *A. nidulans*, que não apresentou atividade sobre celulose e outros polissacarídeos.

Tabela 5.3. Atividade enzimática da enzima purificada sobre diferentes polissacarídeos. Resultados mostrados como média ± desvio padrão.

Substrato	Atividade enzimática (UI/mL)
Xilana	0,205 ± 0,018
CMC	0,005 ± 0,009
Pectina	0,000 ± 0,000
Manana	0,000 ± 0,000

### 5.6. Efeito de temperatura e pH

Nos testes de efeito da temperatura, a xilanase purificada mostrou valor máximo de atividade quando incubada a 55°C. A atividade xilanólítica do EB apresentou tendência semelhante, atuando melhor na faixa de temperatura entre 50 e 60°C (figura 5.11). A atividade da enzima purificada é menor devido à maior diluição da amostra, além de estar separada de outras enzimas presentes no EB que a auxiliam na degradação da xilana.

Este resultado não coincide com o resultado obtido por Fernandez-Espinar *et al* (1993), cuja enzima purificada X22 de *A. nidulans* mostrou pico de atividade a 62°C.

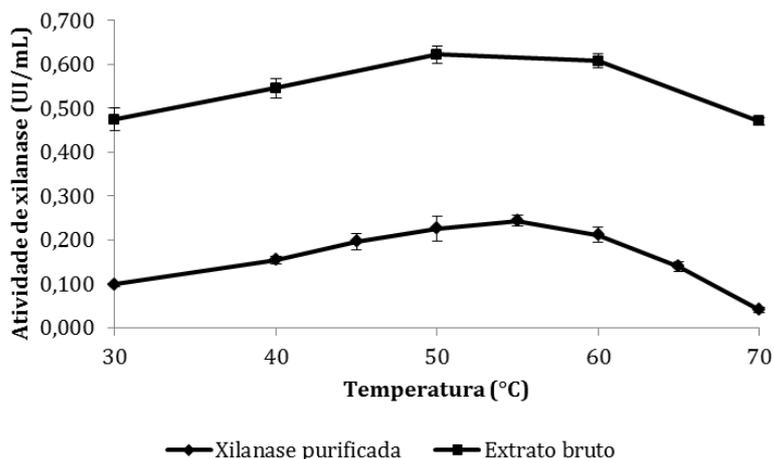


Figura 5.11. Efeito da temperatura na atividade xilanólítica do EB e da xilanase purificada.

Em relação ao efeito do pH, XynA apresentou maior atividade na faixa de pH 3,0 a 6,5, mostrando um pico em pH 5,5 (figura 5.12). A xilanase X22 purificada de *A. nidulans* por Fernandez-Espinar *et al* (1993) se mostrou mais ativa na faixa de pH 5,0 a 6,5.

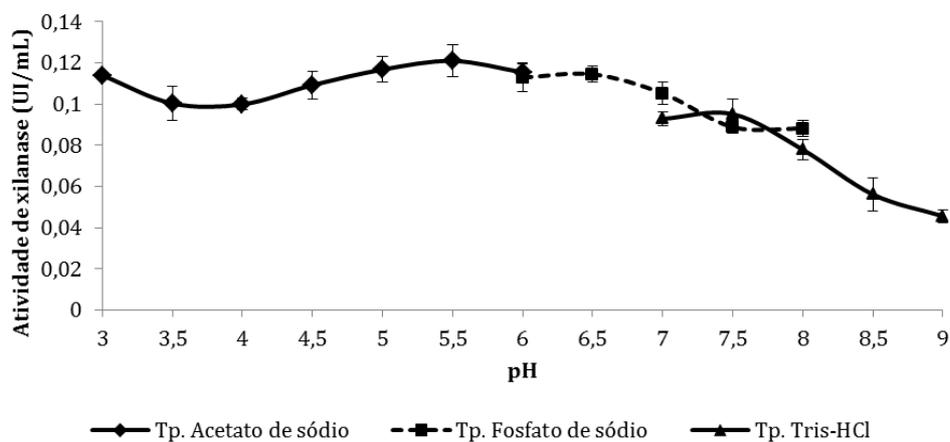


Figura 5.12. Efeito do pH na atividade da xilanase purificada, a 50°C.

Xilanases de *Aspergillus* são comumente mais ativas nas faixas de 40 a 55°C e pH 4,0 a 7,0, como citado por Fernandez-Espinar *et al* (1993) e mostrado na tabela 5.4. Considerando que algumas aplicações biotecnológicas para xilanases como hidrólise de biomassa e aditivo de ração animal requerem atividade na faixa de pH 4,8 – 5,5 e temperatura 40 – 50°C (TEIXEIRA *et al*, 2010), XynA tem potencial para ser utilizada nestes contextos. A tabela 5.4 compara as características de XynA com outras xilanases fúngicas.

Tabela 5.4. Características de xilanases fúngicas. Parâmetros cinéticos sobre xilana de aveia solúvel. Massa molecular estimada por SDS-PAGE.

Organismo	Enzima	Km (mg/mL)	Vmax (U/mL)	Temp.	pH	Massa molecular	Referencia
<i>Aspergillus awamori</i>	PXII-1	11,8	6,98	50	5,0 - 5,5	32,87	Teixeira <i>et al</i> , 2010
<i>Trichoderma harzianum</i>	XYL2	13,66	-	45	5,0	18	Silveira <i>et al</i> , 1999
<i>Aspergillus niger</i>	XynI	47,08	3,02	50	4,5	32-33	Milanezi <i>et al</i> , 2010
<i>Aspergillus oryzae</i>	XyIO1	10,5	-	50	6,0	21,5	Duarte <i>et al</i> , 2012b
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Xilanase II	5,72	2,34	55	5,0	19	Silva <i>et al</i> , 1999
<i>Acrophialophora nainiana</i>	XynIII	4,37	0,24	55	6,5	54	Cardoso e Filho, 2003
<i>Aspergillus versicolor</i>	Xilanase II	-	-	55	6,0 - 7,0	32	Carmona <i>et al</i> , 2005
<i>Aspergillus terreus</i>	XyIT1	0,421	0,147	50	6,0	24,3	Moreira <i>et al</i> , 2013
<i>Aspergillus terreus</i>	XyIT2	13,03	1,016	45	5,0	23,6	Moreira <i>et al</i> , 2013
<i>Emericella nidulans</i>	XynA	3,39	0,502	55	5,0 - 6,0	22	Presente trabalho

### 5.7. Termoestabilidade

A xilanase purificada foi submetida a testes de termoestabilidade em tampão acetato de sódio pH 5,0 em três temperaturas: 28, 50 e 55°C. Apesar de XynA ter apresentado maior atividade à 55°C, foi nesta temperatura que apresentou menor estabilidade. Ao longo do tempo, a enzima é desativada, provavelmente devido à desnaturação. O comportamento da atividade xilanolítica de XynA ao longo do tempo está mostrado na figura 5.11 e suas meia-vidas estão mostradas na tabela. 5.5

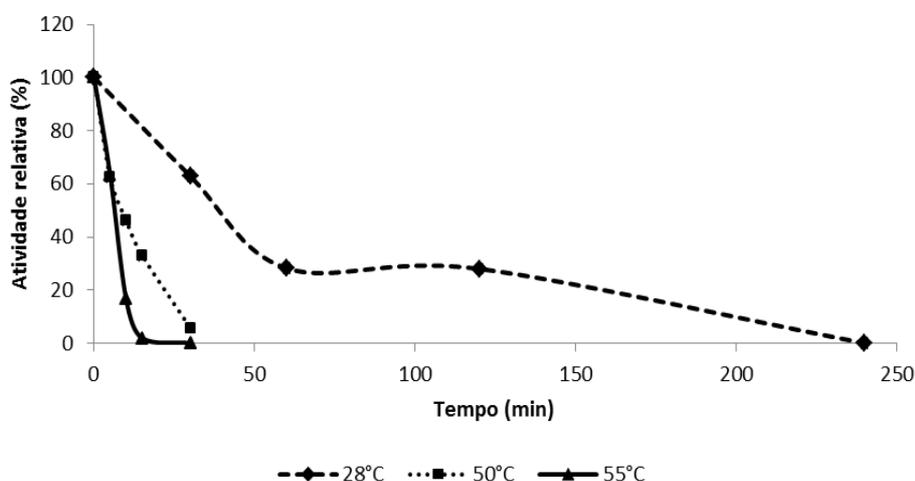


Figura 5.13. Termoestabilidade de XynA a 28, 50 e 55°C em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0.

Tabela 5.5. Termoestabilidade da xilanase purificada a 28, 50 e 55°C em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0.

Temperatura (°C), pH 5	Meia vida aproximada (min)
28	40
50	10
55	7

A termoestabilidade da enzima purificada neste trabalho é baixa quando comparada a outras xilanases do gênero *Aspergillus*. PXII-1 de *A. awamori* (TEIXEIRA *et al*, 2010) mostrou manutenção de 85% da atividade após 35 dias a 28°C e 20 dias após 20 dias, em tampão acetato de sódio pH 5,0. XynI de *A. niger* (MILANEZI *et al*, 2012) mostrou meia-vida de 110h a 45°C em tampão

acetato de sódio pH 4,5. Já a xilanase II de *A. versicolor* mostrou comportamento parecido com a xilanase purificada neste trabalho, com meia vida a 50°C e pH 6,0 de aproximadamente 20 minutos (CARMONA *et al*, 2005).

A baixa termoestabilidade de XynA na forma purificada pode ser devido à separação de outras proteínas, corantes, carboíbratos ou outros fatores estabilizantes presentes no EB. Para a aplicação desta enzima purificada em processos industriais de longa duração, fatores estabilizantes (tais como o etanol, abordado posteriormente neste trabalho) teriam que ser adicionados.

Este resultado difere significativamente do obtido por Fernandez-Espinar *et al* (1993) para X22 de *A. nidulans*, que encontrou meia vida de 40,6 h e 2 h para as temperaturas 50 e 55°C, respectivamente.

A enzima XynA de *E. nidulans* purificada neste trabalho apresentou características diferentes de X22 produzida por *A. nidulans* (Fernandez-Espinar *et al*, 1993). Pode ser que haja diferenças pontuais de aminoácidos na estrutura das duas proteínas, uma vez que foram produzidas por diferentes linhagens da mesma espécie. Além disso, o fato das duas enzimas caracterizadas terem sido produzidas sob diferentes condições de crescimento (bagaço de cana-de-açúcar ou xilana como fontes de carbono) pode ter resultado em diferenças nas duas proteínas, como diferentes padrões de glicosilação. As diferenças encontradas podem ainda ter sido resultado de diferentes metodologias utilizadas pelos dois trabalhos.

### **5.8. Efeito de íons metálicos e EDTA**

O agente quelante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) não mostrou efeito na atividade de XynA, indicando que sua atividade não depende da presença de íons metálicos. Em contraste, Fernandez-Espinar *et al* (1993) encontrou 30% de inibição de X22 de *A. nidulans* por EDTA.

A maioria dos íons provocou aumento ou diminuição menores que 10% na atividade de XynA (tabela 5.6). A maior ativação em XynA foi causada por MgCl<sub>2</sub> (13%), apesar de MgSO<sub>4</sub> não ter mostrado ativação.

XynA foi inibida por  $\text{CoCl}_2$  (68% de inibição) ,  $\text{MnCl}_2$  (59%) e  $\text{HgCl}_2$  (78%) na concentração de 10mM. O efeito inibitório de  $\text{Hg}^{+2}$  já é conhecido para xilanases de diversos fungos (FERNANDEZ-ESPINAR *et al*,1993; BEG *et al*, 2000; CARMONA *et al*, 2005; MILANEZI *et al*, 2010; TEIXEIRA *et al*, 2010; DUARTE *et al*, 2012b). A interação deste íon com grupos sulfidríla (-SH) sugere a existência de um resíduo de cisteína no sítio catalítico da enzima ou em seus arredores (TEIXEIRA *et al*, 2010) ou que este aminoácido tem importância na conformação da proteína (SEGURA e FEVRE, 1993). O íon  $\text{Mn}^{+2}$ , que comumente apresenta efeito ativador em xilanases, mostrou 78% de inibição sobre XynA. O mesmo efeito de  $\text{Mn}^{+2}$  foi encontrado por Fernandez-Espinar *et al* (1993) para X22 purificada de *A. nidulans*. Um efeito inibidor de  $\text{Mn}^{+2}$  sobre XylO1 de *A. oryzae* também foi observado (DUARTE *et al*, 2012b), enquanto xilanases de *A. awamori* (TEIXEIRA *et al*, 2010), *A. versicolor* (CARMONA *et al*, 2005) e *A. niveus* (SUDAN e BAJAJ, 2007) apresentaram ativação por  $\text{Mn}^{+2}$ . Contrariamente aos resultados encontrados neste trabalho, Fernandez-Espinar (1993) observou 19% de ativação de X22 de *A. nidulans* por  $\text{Co}^{+2}$ . Inibição por  $\text{Co}^{+2}$  também já foi observado em xilanases de *A. niger* (MILANEZI *et al*, 2010) e *A. niveus* (SUDAN e BAJAJ, 2007).

Segundo Salama *et al* (2008), a alteração da atividade de xilanases por íons metálicos pode ser devido à reação com grupos funcionais da proteína, como a hidroxila.

Tabela 5.6. Efeito de íons metálicos e EDTA sobre atividade de XynA.

Íon	1mM		10mM	
	UI/mL	Atividade relativa (%)	UI/mL	Atividade relativa (%)
Controle	0,158 ± 0,009	100	0,149 ± 0,004	100
MgCl <sub>2</sub>	0,169 ± 0,005	107	0,168 ± 0,002	113
CoCl <sub>2</sub>	0,147 ± 0,001	93	0,048 ± 0,016	32
MnCl <sub>2</sub>	0,140 ± 0,002	89	0,061 ± 0,005	41
CuCl <sub>2</sub>	0,155 ± 0,006	98	0,134 ± 0,003	90
FeCl <sub>3</sub>	0,168 ± 0,005	106	0,130 ± 0,006	87
KCl	0,164 ± 0,003	104	0,158 ± 0,002	106
NaCl	0,171 ± 0,009	108	0,150 ± 0,004	101
CaCl <sub>2</sub>	0,165 ± 0,010	105	0,162 ± 0,003	109
ZnCl <sub>2</sub>	0,145 ± 0,013	92	0,153 ± 0,009	103
HgCl <sub>2</sub>	0,159 ± 0,006	101	0,033 ± 0,002	22
CuSO <sub>4</sub>	0,160 ± 0,011	101	0,134 ± 0,002	90
FeSO <sub>4</sub>	0,153 ± 0,006	93	0,151 ± 0,006	102
MgSO <sub>4</sub>	0,146 ± 0,011	95	0,151 ± 0,002	101
ZnSO <sub>4</sub>	0,150 ± 0,004	97	0,143 ± 0,002	96
EDTA	0,152 ± 0,005	97	0,142 ± 0,008	96

### 5.9. Efeito de aminoácidos e modificadores químicos de aminoácidos

A modificação química de proteínas é uma técnica comumente usada para identificação de resíduos de aminoácidos no sítio catalítico e de ligação de uma proteína. Procedimentos envolvendo reagentes grupo-específicos, que resultam na modificação de um tipo específico de cadeia lateral de aminoácido, são úteis neste tipo de identificação (GLAZER *et al*, 1976).

Diversos modificadores químicos de aminoácidos foram incubados com XynA a fim de obter informações sobre seus grupos funcionais. O efeito de dois aminoácidos (L-triptofano e L-cisteína) e do detergente SDS (dodecilsulfato de sódio) também foi testado. Os resultados estão descritos na tabela 5.7.

Tabela 5.7. Efeito de aminoácidos e modificadores químicos de aminoácidos sobre a atividade de XynA.

Reagente	Concentração (mM)	UI/mL	Atividade relativa (%)
Controle	-	0,150 ± 0,006	100,0
NBS	1	0,000 ± 0,001	0,0
L-cisteína	20	0,100 ± 0,010	66,9
DTT	20	0,118 ± 0,012	79,0
DTNB	2	0,133 ± 0,012	88,8
Iodoacetamida	5	0,141 ± 0,000	94,3
EDC	5	0,141 ± 0,007	94,3
L-triptofano	5	0,142 ± 0,009	94,7
DTP	2	0,142 ± 0,010	95,1
SDS	20	0,150 ± 0,007	100,5
β-mercaptoetanol	5	0,158 ± 0,004	105,8
DEPC	5	0,161 ± 0,016	107,6

XynA foi completamente inibida por N-bromosuccinamida (NBS) na concentração de 1 mM. O efeito inibitório do NBS, por promover a oxidação de resíduos de triptofano, pode sugerir o envolvimento deste aminoácido na catálise, na ligação da enzima ao substrato ou na manutenção da integridade do sítio ativo. Já foi observado que o substrato, quando misturado com a enzima antes da adição de NBS, pode proteger contra a inibição por prevenir a oxidação do triptofano no sítio catalítico ou de ligação, corroborando a hipótese do envolvimento deste aminoácido no sítio ativo ou de ligação (FILHO *et al*, 1993a; KESKAR *et al*, 1989). Novos experimentos devem ser feitos para confirmação da hipótese. Vale ressaltar que o efeito inibitório do NBS é comum sobre xilanases do gênero *Aspergillus* (MILANEZI *et al*, 2010; DUARTE *et al*, 2012b; TEIXEIRA *et al*, 2010).

A manutenção da atividade original de XynA por DEPC (dietilpirocarbonato) exclui a possibilidade de envolvimento de histidina no sítio catalítico ou de ligação da enzima (CARDOSO e FILHO, 2003; FILHO *et al*, 1993a), além de sugerir que, se presente, este resíduo não tem papel importante na manutenção da conformação nativa, não sendo mecanicamente essencial (CLARKE e YAGUCHI, 1985).

O detergente SDS, apesar de comumente atuar como inibidor de xilanases (MILANEZI *et al*, 2010; DUARTE *et al*, 2012b; TEIXEIRA *et al*, 2010), não alterou a atividade de XynA.

Era esperado que DTT (ditiotreitól), cisteína e  $\beta$ -mercaptoetanol, por apresentarem grupos sulfidríla e atuarem na redução de pontes dissulfeto, causassem efeitos semelhantes sobre XynA. Estes compostos, entretanto, mostraram resultados diferentes. A queda na atividade causada por DTT e cisteína pode ser devido à quebra de pontes dissulfeto e alteração da estrutura nativa da enzima. Já a ativação de XynA por  $\beta$ -mercaptoetanol pode sugerir a ausência de pontes dissulfeto ou a inacessibilidade destas a este reagente (CARDOSO e FILHO, 2003). A partir destes experimentos, não ficou claro a existência de pontes dissulfeto na proteína. A ativação por  $\beta$ -mercaptoetanol sugere ainda a influência de cisteína na catálise da xilana (CARDOSO e FILHO, 2003). Tanto a iodacetamida quanto o DTNB (ácido ditionitrobenzóico) se ligam covalentemente ao grupo tiol de resíduos de cisteína. O fato de estes dois reagentes inibirem, apesar de pouco, a atividade enzimática, sugere a presença de resíduo de cisteína no sítio ativo (FILHO *et al*, 1993a). A inibição por  $Hg^{+2}$  também indica o envolvimento deste aminoácido na catálise.

Em contraste com o efeito ativador de L-cisteína e L-triptofano sobre xilanases de *Penicillium capsullatum*, *A. awamori* e *Acrophialophora nainiana* (FILHO *et al*, 1993; TEIXEIRA *et al*, 2010; XIMENES *et al*, 1999) a presença destes aminoácidos, principalmente cisteína, inibiram a atividade de XynA de *E. nidulans*. Xilanases de *A. oryzae* e *A. niger* também foram inibidas por L-cisteína (DUARTE *et al*, 2012b; MILANEZI *et al*, 2010).

#### **5.10. Efeito de compostos fenólicos**

A investigação do efeito de compostos fenólicos liberados durante o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica sobre enzimas hidrolíticas é importante para aperfeiçoar o processo de degradação enzimática destes materiais. Para investigar o potencial inibitório e desativador de alguns compostos fenólicos sobre a atividade de XynA, ensaios enzimáticos na presença de cada um

deles, separadamente, foram realizados. Os compostos utilizados estão mostrados na figura 5.14. O termo inibição será usado para se referir à diminuição imediata da atividade enzimática causada pelo contato entre inibidor e enzima. O termo desativação se referirá à diminuição da atividade ao longo do tempo de incubação da molécula desativadora com a enzima.

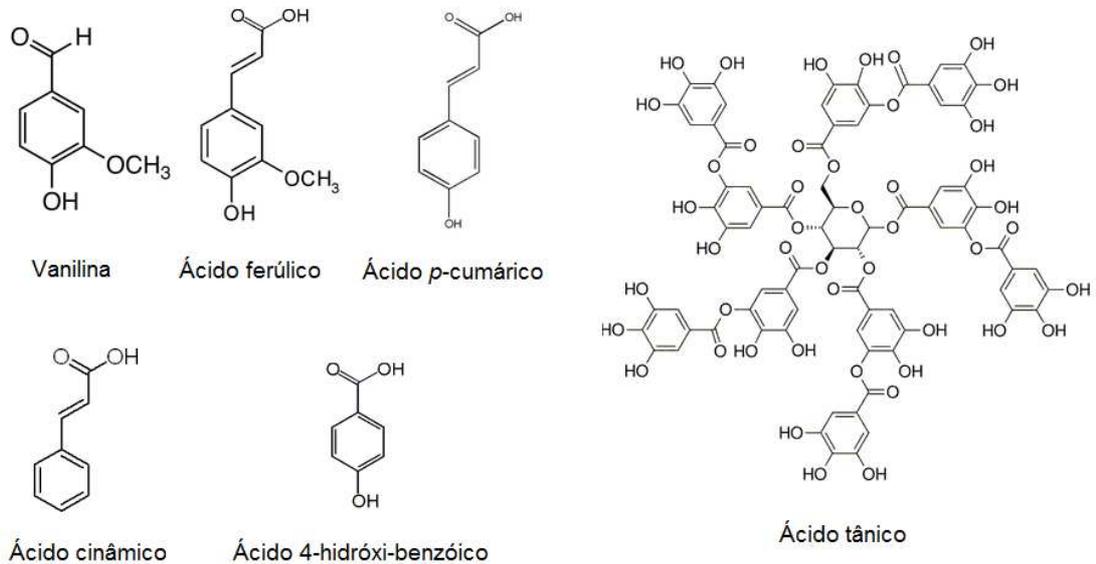


Figura 5.14. Estrutura dos compostos fenólicos testado sobre a atividade de XynA.

Os resultados de inibição dos compostos fenólicos sobre atividade de XynA estão mostrados na figura 5.15.

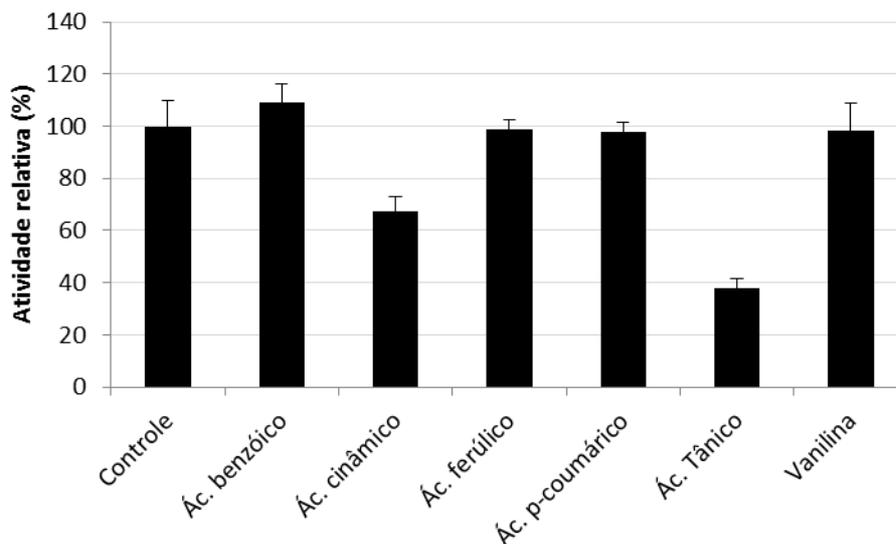


Figura 5.15. Efeito de compostos fenólicos (2mg/mL) sobre a atividade de XynA. Ácido tânico e vanilina foram diluídos em água e os demais compostos em etanol 10%. Os devidos controles com etanol e água foram considerados.

Como mostrado na figura 5.15, apenas ácido tânico e ácido cinâmico, dentre os seis compostos fenólicos testados, tiveram efeito inibitório sobre atividade de XynA. Ácido 4-hidróxi-benzóico mostrou aumento de atividade, enquanto os ácidos ferúlico, *p*-cumárico e vanilina não alteraram a atividade.

Os resultados do efeito tempo-dependente dos compostos fenólicos sobre a atividade e estabilidade de XynA estão mostrados nas figuras a seguir. As figuras 5.16 e 5.17 mostram o efeito a 28°C e as figuras 5.18 e 5.19 mostram o efeito a 50°C.

Devido à insolubilidade de alguns compostos em água (ácidos benzóico, cinâmico, *p*-cumárico e 4-hidróxi-benzóico), estes reagentes foram diluídos em etanol, ao invés de água, antes de serem incubados com a enzima. Os resultados mostram separadamente o efeito dos compostos diluídos em água e etanol.

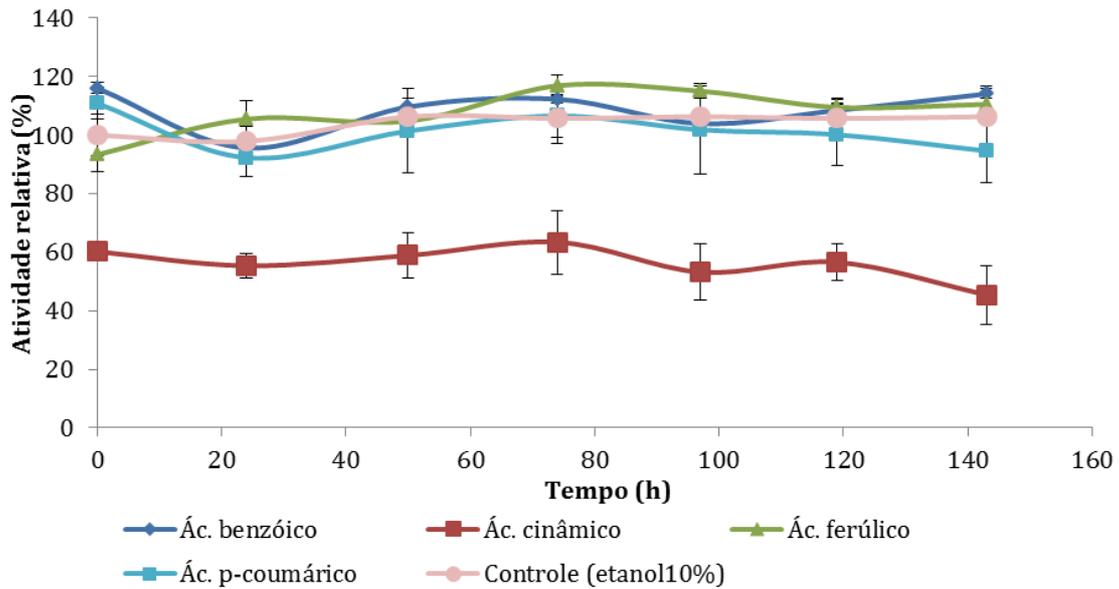


Figura 5.16. Efeito tempo-dependente de compostos fenólicos (2mg/mL, diluídos em etanol 10% v/v) sobre atividade de XynA a 28°C.

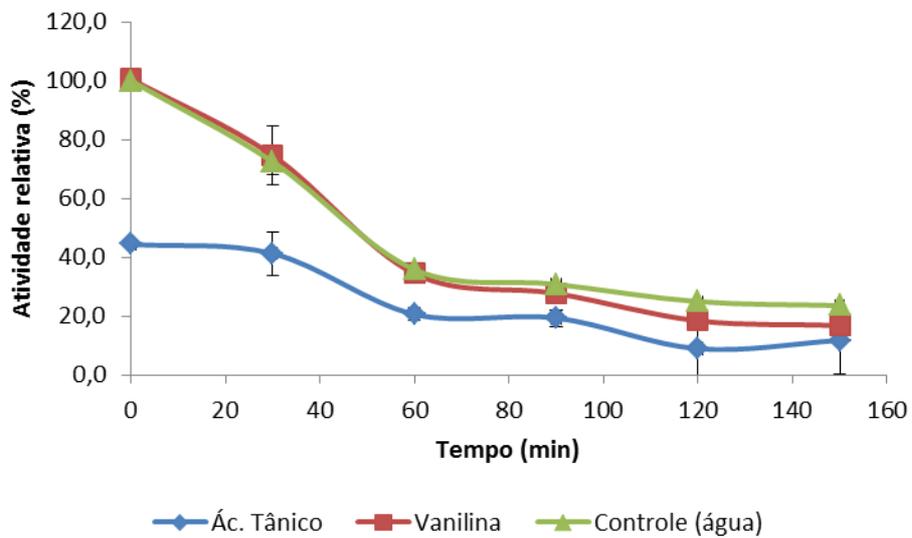


Figura 5.17. Efeito tempo-dependente de compostos fenólicos (2mg/mL, diluídos em água) sobre atividade de XynA a 28°C.

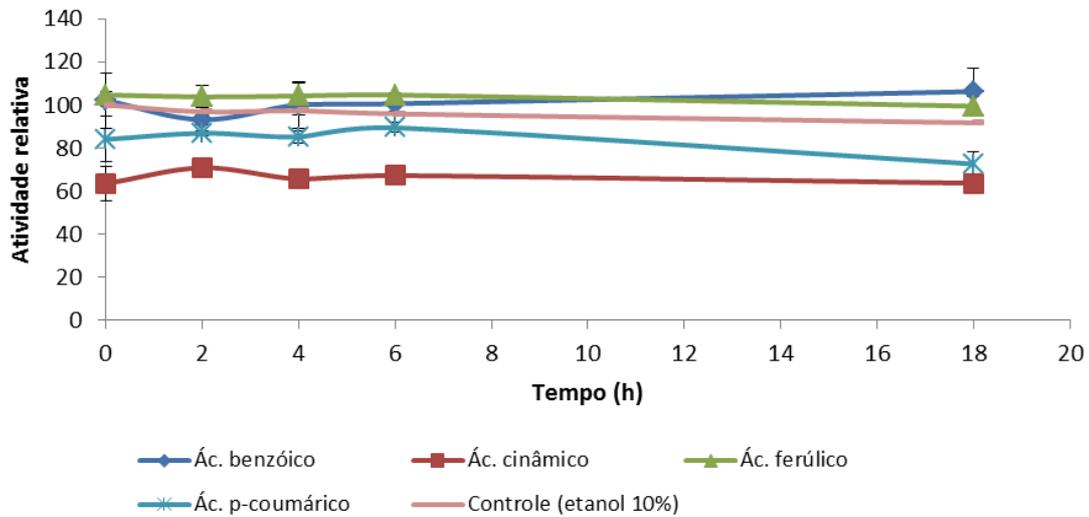


Figura 5.18. Efeito tempo-dependente de compostos fenólicos (2mg/mL, diluídos em etanol 10%, v/v) sobre atividade de XynA a 50°C.

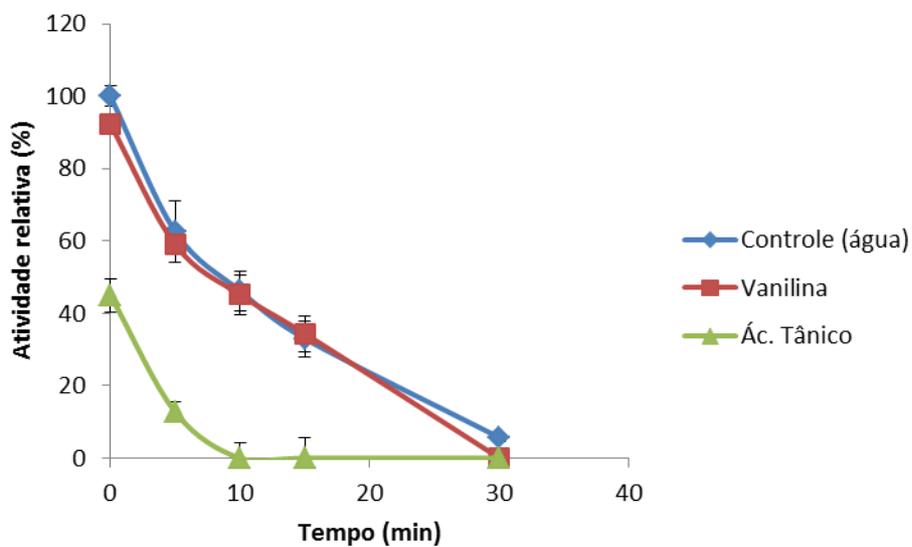


Figura 5.19. Efeito tempo-dependente de compostos fenólicos (2mg/mL, diluídos em água) sobre atividade de XynA a 50°C.

O único reagente que diminuiu a termoestabilidade da enzima em relação ao controle foi o ácido tânico, nas duas temperaturas testadas (figuras 5.17 e 5.19). Os demais compostos fenólicos, inibitórios ou não, não alteraram

significativamente a estabilidade da enzima em relação ao controle, nas duas temperaturas testadas. O ácido cinâmico, apesar de ter inibido a atividade de XynA (figuras 5.15, 5.16 e 5.18), não promoveu crescente inibição ao longo do tempo em contato com a enzima, ou seja, não promoveu desativação.

Segundo Ximenes *et al* (2011), é esperado que a desativação de uma enzima aumente com o aumento do tempo de exposição às condições inibidoras. Os resultados encontrados neste trabalho para o efeito de ácido cinâmico não corroboram esta hipótese. Mesmo incubada por um longo período de tempo (7 dias a 28°C) com o composto ácido cinâmico, XynA de *E. nidulans* não foi desativada; ou seja, sua atividade não diminuiu em função do tempo. Já o efeito do ácido tânico diluído em água está de acordo com esta hipótese, pois XynA foi inibida e desativada pelo composto: na temperatura de 50°C, a meia vida de XynA na presença de ácido tânico caiu de 7 para aproximadamente 2-3 minutos.

A xilanase XylT1 de *A. terreus* também foi inibida por ácido tânico, porém não sofreu desativação. Já XylT2 originada do mesmo fungo não foi afetada pela presença deste polifenol (MOREIRA *et al*, 2013). De acordo com Ximenes *et al* (2011), ácido tânico na concentração de 5 mg/mL inibe imediatamente a atividade de celulasas e principalmente  $\beta$ -glicosidases de *Trichoderma reesei*, além de mostrar efeito desativador sobre estas enzimas ao longo do tempo. Segundo Kawamoto *et al* (1997), ácido tânico inibe a atividade de  $\beta$ -glicosidase de amendoeira por promover desnaturação protéica irreversível. Segundo Scalbert (1991), o efeito inibitório de taninos já foi identificado para diversas enzimas microbianas (celulasas, pectinases, xilanases, peroxidases, lacases e glicosiltransferases).

Taninos são polifenóis hidrossolúveis que apresentam característica adstringente (capacidade de se ligar a outras moléculas) e, por isso, são capazes de precipitar proteínas. São comumente encontradas em plantas herbáceas e lenhosas e podem se acumular em sementes, frutas, folhas, madeira, casca e raiz (SCALBERT, 1991). Taninos também diminuem a

digestibilidade de proteínas presentes no sorgo por serem capazes de se complexar e promover a precipitação de proteínas através de ligações de hidrogênio e interações não-polares hidrofóbicas (DUODU *et al*, 2003). A formação de complexos com as enzimas, ou inclusive com o substrato, podem ser a causa da inibição por taninos (SCALBERT, 1991).

Os resultados obtidos neste trabalho, assim como dados da literatura, sugerem que estruturas polifenólicas, como o ácido tânico ou porções da lignina, liberados durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pela redução da hidrólise enzimática de seus polissacarídeos.

O ácido cinâmico se diferencia do restante dos compostos testados neste trabalho por não apresentar grupos hidroxila ligados ao anel aromático (figura 5.15). Esta característica pode ter alguma responsabilidade na inibição de XynA por ácido cinâmico. Este resultado, entretanto, não segue a mesma tendência dos resultados encontrados por Boukari *et al* (2011) para inibição da xilanase Tx-Xyl de *Thermobacillus xylanilyticus* pelos ácidos cinâmico, *p*-cumárico, caféico, ferúlico e 3,4,5-trimetoxi-cinâmico. Segundo estes autores, foi observado que quanto maior o número de grupos hidroxila no composto fenólico, maiores foram a interação inibidor-enzima e a inibição enzimática, sugerindo que estes radicais tem importância na inibição.

Considerando o efeito de ácido cinâmico sobre outras xilanases, XylT1 de *A. terreus* foi completamente desativada após 30 minutos a 28°C enquanto XylT2 foi desativada somente após 7 dias de contato com este compostos fenólico (MOREIRA *et al*, 2013). Ácido cinâmico promoveu desativação tempo-dependente de Tx-Xyl de *Thermobacillus xylanilyticus*, mas somente em concentrações maiores que 50mM (BOUKARI *et al*, 2011). As atividades de celulase e  $\beta$ -glicosidase de *T. reesei* não foram inibidas imediatamente pelo ácido cinâmico, mas sofreram desativação quando em contato com este composto fenólico durante 24 h (XIMENES *et al*, 2011).

Os ácidos 4-hidróxi-benzóico e ferúlico e vanilina não inibiram ou desativaram XynA de *E. nidulans* (figuras 5.16 e 5.18), causando aumento na atividade em alguns momentos ao longo da incubação. O aumento de atividade xilanolítica por compostos fenólicos já foi observado em outros trabalhos. A hidrólise da xilana pelo extrato bruto de *P. brasilianum* foi aumentada pela presença dos compostos fenólicos acetosiringona e guaiacol. Este resultado foi interpretado como ativação de  $\beta$ -xilosidase, devido ao aumento da liberação de xilose (PANAGIOTOU e OLSSON, 2007). Os ácidos ferúlico e vanílico mostraram efeito ativador sobre a xilanase XynA de *Bacterioides succunogenus* (MARTIN e AKIN, 1988). Xilanases de *Cryptococcus albidus* também foram ativadas na presença de certos compostos fenólicos (PECAROVICOVA et al, 1989).

O ácido *p*-cumárico causou 20% de inibição sobre XynA de *E. nidulans* a 50°C e certa desativação após 18h de incubação nesta temperatura. Em contraste, a xilanase XynA de *Clostridium cellulovorans* foi inibida instantaneamente por este composto (MORISSON et al, 2011).

A comparação dos resultados deste trabalho com a literatura mostra que o efeito de compostos fenólicos sobre xilanases varia de acordo com as enzimas, os compostos, as concentrações e as temperaturas testadas, podendo haver inibição, desativação, manutenção ou ativação da atividade.

Também foram estimados os parâmetros cinéticos de XynA ( $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ ) sobre as porções solúvel e insolúvel da xilana de aveia na presença ou ausência dos compostos fenólicos (tabela 5.8).

Tabela 5.8. Parâmetros cinéticos de XynA sobre xilana de aveia solúvel e insolúvel, na presença ou ausência de compostos fenólicos.

	Xilana solúvel		Xilana insolúvel	
	Km (mg/mL)	V <sub>máx</sub> (UI/mL)	Km (mg/mL)	V <sub>máx</sub> (UI/mL)
Controle (água)	3,390	0,502	15,330	0,420
Ácido tânico	6,110	0,280	49,310	0,150
Vanilina	2,760	0,330	8,500	0,240
Controle (etanol 10%)	4,407	0,600	17,120	0,455
Ác. <i>p</i> -cumárico	3,580	0,510	18,530	0,380
Ác. ferúlico	4,660	0,648	13,720	0,385
Ác. 4-hidróxi-benzóico	4,310	0,460	14,220	0,230
Ác. cinâmico	3,280	0,300	12,240	0,305

XynA de *E. nidulans*, na ausência de qualquer composto fenólico (controle com água), apresentou menor Km para xilana solúvel (3,39 mg/mL) do que para xilana insolúvel (15,33 mg/mL), indicando maior afinidade pela primeira. A tabela 5.4 (seção 5.6, página 62) compara parâmetros cinéticos de XynA de *E. nidulans* com xilanases de outras espécies fúngicas. É possível observar que XynA apresenta um Km menor sobre xilana de aveia solúvel que a maioria das outras xilanases consideradas.

O Km e V<sub>máx</sub> de X22 de *A. nidulans* (FERNANDEZ-ESPINAR et al, 1993) sobre xilana de aveia solúvel foram 4,2 mg/mL e 710 UI/mg enzima, respectivamente, diferindo do observado para XynA neste trabalho, que mostrou Km menor (3,39 mg/mL) e V<sub>máx</sub> menor (230,84 UI/mg enzima).

O etanol, apesar de ter aumentado o Km da enzima em relação ao controle com água, aumentou a velocidade máxima de hidrólise para ambos os substratos.

Foi observado que a maioria dos compostos fenólicos testados aumentou a afinidade, mas diminuiu a velocidade máxima de atuação da enzima (vanilina, ácido *p*-cumárico, ácido 4-hidroxi-benzóico, ácido cinâmico e ácido ferúlico). O ácido ferúlico foi o único composto a aumentar a V<sub>máx</sub> da enzima pela xilana solúvel, apesar de ter diminuído sua afinidade pelo

substrato. Nenhum composto fenólico aumentou simultaneamente a afinidade e a velocidade máxima de XynA.

O ácido tânico, maior inibidor de XynA, se destacou por diminuir tanto a afinidade da enzima pela xilana (porções solúvel e insolúvel) quanto a velocidade máxima de hidrólise.

### 5.11. Efeito de etanol

Foi possível observar, nos experimentos com compostos fenólicos, que o etanol aumenta a termoestabilidade de XynA, tanto a 28 quanto a 50°C. Ácido tânico e vanilina, apesar de serem hidrossolúveis, foram testados tanto em água quanto em etanol e os resultados deixaram evidente que a presença de etanol é responsável pela estabilização da enzima (resultados não mostrados).

Tal efeito estabilizador estimulou a investigação do efeito do etanol sobre a atividade de XynA. A figura 5.20 mostra o efeito de etanol em diferentes concentrações sobre a atividade da enzima.

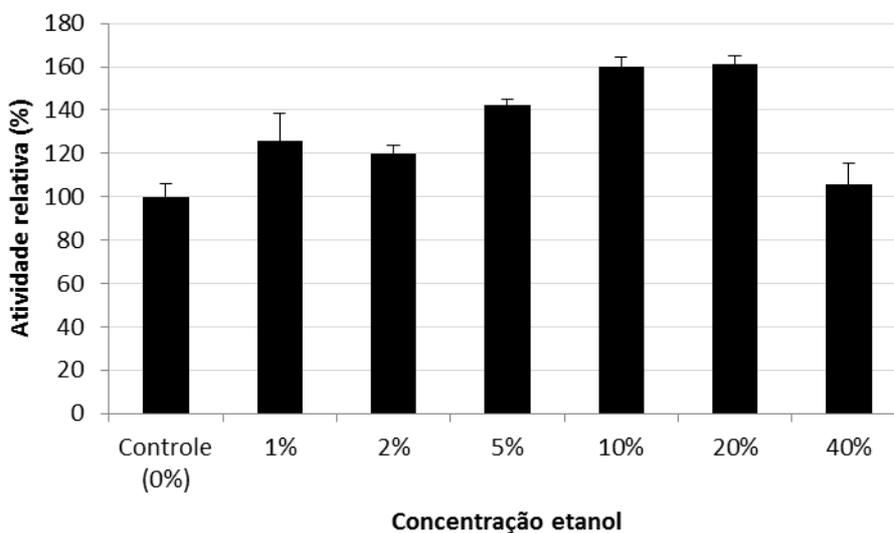


Figura 5.20. Efeito de diferentes concentrações de etanol sobre atividade de XynA. Concentrações em % (v/v).

Todas as concentrações de etanol testadas promoveram o aumento ou manutenção da atividade de XynA, não havendo efeito inibitório. Etanol 1 e 2% (v/v) promoveram aumento de aproximadamente 20% na atividade. Etanol 10 e 20% (v/v) foram as concentrações que mais aumentaram a atividade (60% de ativação), enquanto etanol 40% manteve a atividade próxima à do controle. Uma curva padrão de DNS na presença de etanol foi construída para eliminar a interferência deste álcool sobre a detecção de açúcares redutores pelo DNS.

Diferente de XynA de *E. nidulans*, a presença de etanol mostrou-se inibitória sobre a xilanase XynA de *Clostridium cellulovorans* (MORISSON *et al*, 2011) e sobre a atividade xilanolítica do complexo multi-enzimático de *Bacillus licheniformis* SVD1 (VAN DYK *et al*, 2010). Celulases de *T. reesei* também foram inibidas por etanol (WU e LEE, 1997).

O aumento da atividade, da termoestabilidade e da  $V_{m\acute{a}x}$  de XynA na presença de etanol indica seu potencial de aplicação em bioprocessos consolidados de produção de bioetanol onde a hidrólise enzimática da biomassa e a fermentação ocorrem concomitantemente no mesmo biorreator. A tolerância das enzimas hidrolíticas à presença de etanol é uma característica importante para este tipo de aplicação. Levando em conta um processo de sacarificação e fermentação simultâneas para produção de etanol, as enzimas e microrganismos empregados devem ser capazes de tolerar concentrações de etanol de até 40g/L (ou aproximadamente 5% v/v) (DIEN *et al*, 2003). Poucos trabalhos na literatura abordam o efeito de etanol sobre a atividade de xilanases.

O efeito de metanol 10% (v/v) também foi testado e se mostrou capaz de aumentar a atividade de XynA em 35% (resultado não mostrado).

#### **5.12. Hidrólise da xilana**

Os produtos de hidrólise da xilana de bétula por XynA foram detectados por DNS e identificados e quantificados por HPAEC-PAD. As porções solúvel e insolúvel da xilana foram incubadas com XynA a 28°C e 120 rpm por 24 horas.

O teor de proteínas usado neste experimento foi de 108,7  $\mu\text{g}$  XynA/g de xilana ou 11,79 UI de xilanase/g de xilana.

A figura 5.21 mostra a liberação de açúcares redutores resultante da hidrólise da xilana por XynA. Os resultados indicam que a xilanase purificada XynA é mais eficiente na hidrólise da porção solúvel da xilana, promovendo hidrólise máxima de 46,3% após 12 h de incubação, em comparação com a hidrólise da porção insolúvel, que atinge 35,27% de hidrólise no mesmo tempo de reação. Este resultado está em concordância com a maior afinidade (menor  $K_m$ ) de XynA pela xilana de aveia solúvel, em comparação com a porção insolúvel.

O fato da xilana de bétula solúvel ser mais ramificada (grupos acetil e ácido 4-O-metil-glicurônico) que sua porção insolúvel sugere que XynA atua preferencialmente sobre substratos ramificados, cujas ramificações podem ter papel positivo na ligação enzima-substrato (WONG *et al*, 1988; COUGHLAN *et al*, 1993).

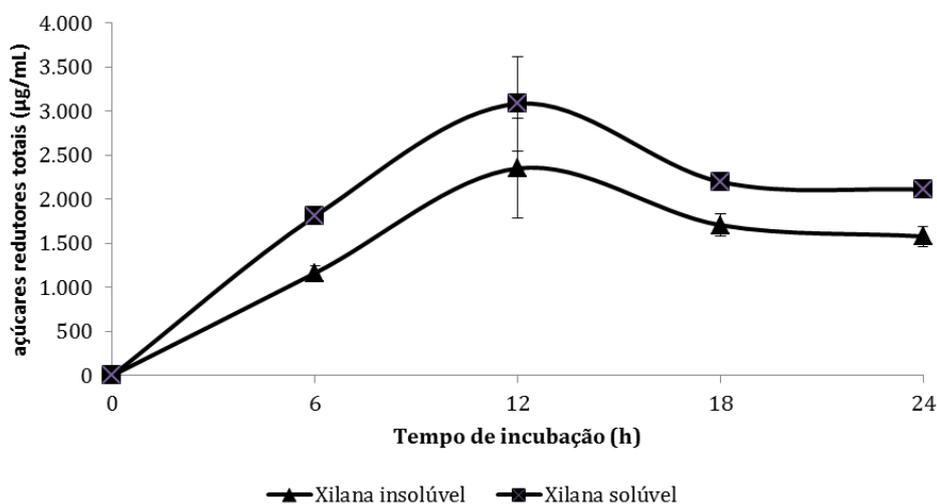


Figura 5.21. Liberação de açúcares redutores totais, detectados por DNS, resultante da hidrólise de xilana de bétula (solúvel e insolúvel, concentração inicial de 6666  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por XynA.

A hidrólise da xilana (tanto solúvel quanto insolúvel) foi mais eficiente nas primeiras 12h de incubação, quando houve maior liberação de açúcares

redutores. A quantidade de açúcares redutores diminui a partir das 18 horas de incubação e permanece constante até 24 horas. É possível que a diminuição na quantidade de açúcares redutores seja devido à reação de transxilosilação, que consiste na transferência de resíduos de xilose ou xilooligossacarídeos para outro xilooligossacarídeo, produzindo xilooligossacarídeos com maior grau de polimerização, reduzindo a quantidade de extremidades reductoras.

A capacidade de transxilosilação por endo-xilanases já foi observada. Endo- $\beta$ -1,4-xilanase rXylK1 (família GH10) de *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 apresentou atividade de transxilosilação, sintetizando xilooligossacarídeos maiores (X4 a X7) a partir de xilotriose (X3) (KIM *et al*, 2009). Resultados semelhantes foram encontrados para uma endo-xilanase de *Streptomyces ramens* L2001 (LI *et al*, 2012).

Resultados semelhantes, como a maior eficiência na hidrólise da xilana de bétula solúvel, a redução na concentração de açúcares redutores após 12 h de incubação e a possibilidade de reação de transxilosilação, foram observados para a xilanase Xyl-O1 de *A. oryzae* (DUARTE *et al*, 2012b).

Apesar de XynA ter apresentado baixa termoestabilidade (meia-vida de 40 minutos) a 28°C na ausência de substrato (mostrado na seção 5.7), a hidrólise da xilana pela enzima purificada se estendeu por longos períodos de incubação nesta temperatura. A presença da xilana provavelmente promoveu aumento da termoestabilidade de XynA. Já foi observado em trabalhos anteriores que o substrato (xilana) pode proteger xilanases contra inativação térmica. Aumento na termoestabilidade das xilanases pertencentes a *Acidothermus cellulolyticus* 11B (BARABOTE *et al*, 2010) e *Marasmius* sp. BCC7928 (RATANACHOMSRI *et al*, 2006) já foram observados, por exemplo. Segundo os autores destes trabalhos, as interações enzima-substrato provavelmente previnem, pelo menos em parte, mudanças conformacionais da proteína a altas temperaturas.

A identificação dos produtos de hidrólise da xilana de bétula solúvel pela técnica HPAEC-PAD também mostram maior liberação de açúcares no tempo de 12 horas de incubação (figura 5.22).

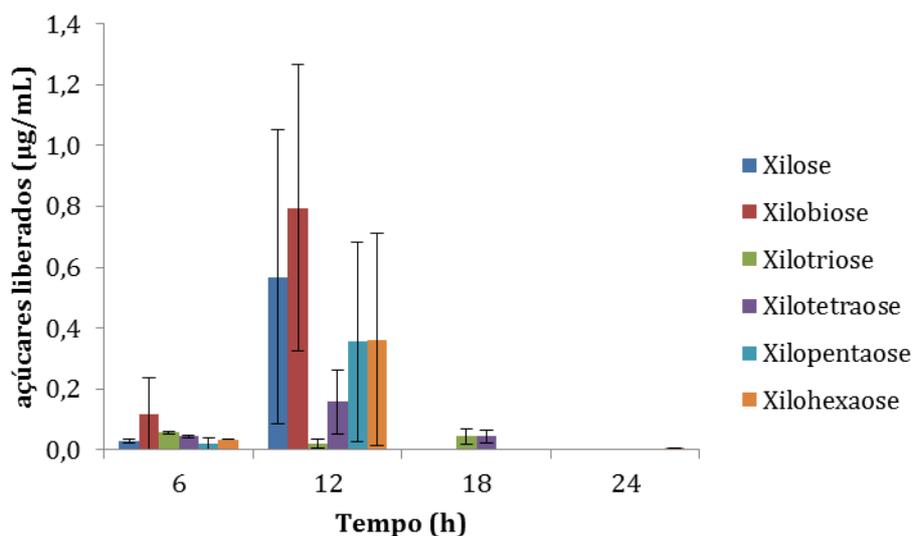


Figura 5.22. Identificação e quantificação dos produtos de hidrólise da porção solúvel da xilana de bétula por XynA pela técnica HPAEC-PAD.

A identificação dos produtos de hidrólise também indica uma provável reação de transxilosilação depois das 12 horas de incubação, com formação de xilooligômeros maiores que xilohexaose não identificados pelo experimento.

Desvios padrões altos e grande variação entre as replicatas foram observadas para os resultados de identificação e quantificação dos produtos de hidrólise da xilana. Apesar disso, os resultados sugerem que XynA apresenta mecanismo de ação do tipo endo, uma vez que houve detecção de xilooligômeros. A liberação de xilose indica a inadequação desta enzima na produção industrial de xilooligossacarídeos, situação em que a produção de xilose não é desejada. A liberação de xilose por endo-xilanases de *Nonomurea flexuosa* e *Thermoascus aurantiacus* após longos tempos de incubação com xilana também já foi observado (ZHANG *et al*, 2011). As endo-xilanases Xyn A e B de *P. capsulatum* também promoveram liberação de xilose a partir de acetilxilana e apresentaram reação de tranferase (transxilosilação)

(FILHO *et al*, 1993a). Xyl-O1 de *A. oryzae* também liberou xilose e xilooligossacarídeos (X1 a X6) a partir de xilana de bétula (DUARTE *et al*, 2012b).

O padrão de hidrólise da xilana de bétula pela enzima X22 de *A. nidulans* se mostrou diferente. Os principais produtos foram X4, X3 a X2, não havendo liberação de xilose (FERNANDEZ-ESPINAR *et al*, 1993).

Os cromatogramas obtidos por HPAEC-PAD (dados não mostrados) revelam picos irregulares com alta intensidade e com tempos de retenção maiores que os picos correspondentes aos xilooligômeros padrão utilizados. Isto sugere que xilooligossacarídeos com grau de polimerização maior que 6 e/ou com ramificações (como ácidos acético e glicurônico) provavelmente também fazem parte dos produtos de hidrólise da xilana de bétula por XynA, mas que, devido à ausência de padrões apropriados, não puderam ser identificados. A identificação de xilooligossacarídeos ramificados traria maiores informações sobre o modo de ação de XynA sobre a xilana ramificada.

A identificação dos produtos de hidrólise da xilana de bétula insolúvel (figura 5.23) indica liberação de xilooligossacarídeos (X2 a X6), sem detecção de xilose. Este resultado também indica a ação tipo endo de XynA. Xilopentaose correspondeu ao produto mais abundante no tempo de 6 horas de hidrólise.

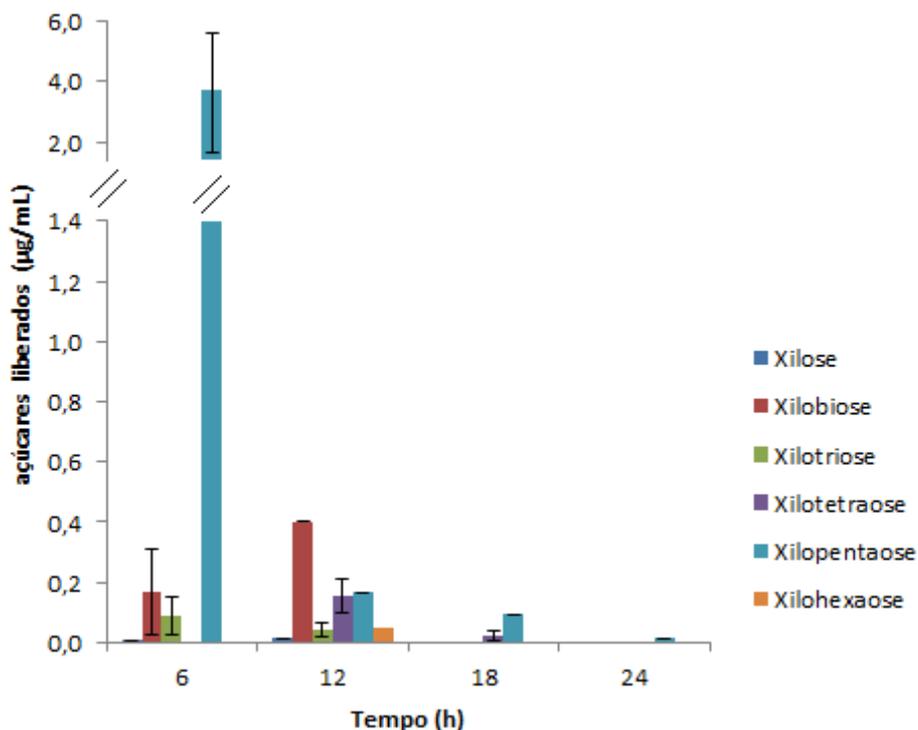


Figura 5.23. Identificação e quantificação dos produtos de hidrólise da porção insolúvel da xilana de bétula por XynA pela técnica HPAEC-PAD.

### 5.13. Hidrólise de polpas de celulose em diferentes estágios do processo *Kraft*

O Ultrafiltrado (UF) de *E. nidulans*, uma fração semipurificada de xilanases, foi testado quanto à capacidade de hidrolisar polpas de celulose em três diferentes estágios do processo *Kraft*: polpa clara, polpa pré-branqueada e polpa escura.

O teor de proteínas usado neste experimento foi de 1141 µg UF/g de polpa de celulose ou 24,16 UI de xilanase/g de polpa de celulose. É importante ressaltar que o UF não apresentou atividade enzimática de CMCase.

Foram feitas análises de liberação de açúcares redutores totais (pelo método de DNS), liberação de cromóforos (absorbância a diferentes comprimentos de onda), liberação de glicose (método de glicose oxidase), detecção de pentoses livres pelo método de orcinol-férrico (teste de Bial) e identificação e quantificação dos produtos de hidrólise por HPAEC-PAD.

Os resultados de hidrólise das polpas de celulose, como também do bagaço de cana-de-açúcar (seção 5.14), de modo geral apresentaram altos desvios padrão. A heterogeneidade dos substratos lignocelulósicos, tanto química quanto em relação ao tamanho das partículas, podem ter levado a tais resultados. Os teores de lignina, hemicelulose e celulose, devido à heterogeneidade intrínseca a estes materiais, é diferente entre as replicatas, levando a resultados de hidrólise diferente. A adsorção inespecífica e improdutiva de enzimas à lignina também pode ter contribuído para a alta variação entre os resultados. Além disso, o fato das partículas de polpa ou de bagaço não serem homogêneas pode ter contribuído, uma vez que a superfície de contato disponível para atuação das enzimas entre as replicatas foi diferente. A repetição destes experimentos de hidrólise para obtenção de resultados mais confiáveis está dentre as perspectivas deste trabalho.

A figura 5.24 mostra a liberação de açúcares redutores totais resultantes da hidrólise das três polpas quando incubadas com UF por três horas, a 50°C e 120rpm.

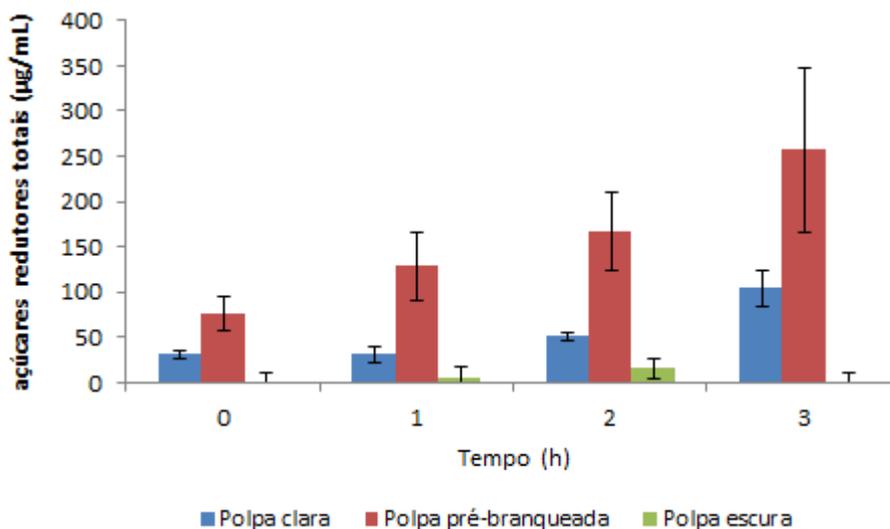


Figura 5.24. Liberação de açúcares redutores totais durante a hidrólise de polpas de celulose em diferentes estágios do processo Kraft promovidas por amostras de Ultrafiltrado (UF) de *E. nidulans*.

Observou-se que as polpas de celulose clara e pré-branqueada foram as mais suscetíveis à hidrólise pelo UF, havendo maior liberação de açúcares redutores quando comparado à polpa escura.

A maior liberação de açúcares redutores totais na hidrólise da polpa pré-branqueada pode ter ocorrido devido à maior presença de hemiceluloses nesta amostra quando comparado à polpa clara que, por ter passado por mais processos de branqueamento, apresenta celulose num estado mais puro, com menores teores de hemicelulose. Já a polpa de celulose escura, por não ter passado por processo de branqueamento, apresenta mais lignina residual que as polpas clara e pré-branqueada. Segundo Bajpai e Bajpai (1997), aproximadamente 10% da lignina presente na madeira permanece na polpa de celulose escura após o cozimento. Apesar de conter hemiceluloses, a lignina residual presente na polpa escura provavelmente dificultou o acesso das enzimas presentes no UF a estes polissacarídeos, resultando em uma baixa liberação de açúcares redutores.

A liberação de cromóforos (grupamentos que produzem cor) a partir da polpa de celulose para o sobrenadante também foi monitorada ao longo da hidrólise. É importante considerar que a hidrólise da xilana presente na polpa pode levar à liberação de porções de lignina e de compostos aromáticos. A remoção da cor da polpa é indicada pelo aumento dos valores de absorbância do sobrenadante nos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) 237, 254, 280 e 465 nm. Aumentos de absorbância nos comprimentos de onda 237 e 254 nm correspondem à liberação de compostos aromáticos. A absorbância em 465 nm corresponde à remoção de compostos hidrofóbicos e em 280 nm indica a presença de porções de lignina no sobrenadante (DURAN *et al*, 2008).

Segundo Garg *et al* (1996), o acompanhamento da liberação de cromóforos provavelmente é mais eficaz do que a detecção de açúcares redutores para monitorar a atividade de xilanase sobre polpa de celulose, uma vez que a produção de açúcares redutores continua a aumentar mesmo após xilooligossacarídeos serem liberados da superfície da celulose.

A liberação de cromóforos resultante da atuação do UF sobre as polpas de celulose está mostrada na figura 5.25.

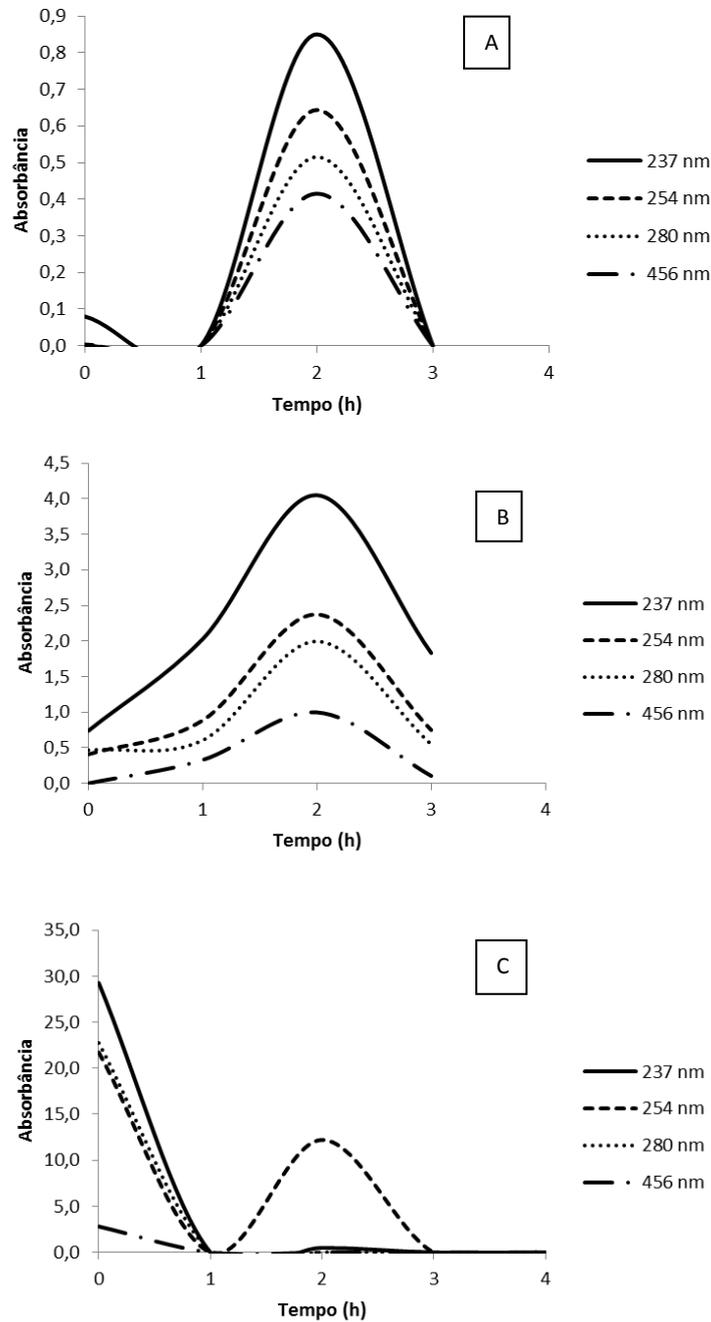


Figura 5.25. Liberação de cromóforos durante a hidrólise das polpas de celulose em diferentes estágios do processo *Kraft*, promovidas por UF de *E. nidulans*. Polpa clara (A), polpa pré-branqueada (B) e polpa escura (C).

A hidrólise da polpa de celulose clara resultou em pouca liberação de cromóforos (absorbância em 237nm < 0,9), que ocorreu somente após 2 h de incubação. Na hidrólise da polpa de celulose pré-branqueada houve uma maior liberação após 2h de incubação, com absorbância em 237nm atingindo valor 4,0. A hidrólise da polpa de celulose escura resultou na maior liberação de cromóforos dentre as polpas testadas, com absorbância em 280nm atingindo valor 12,2 após 2h de incubação.

Uma possível explicação para a diminuição da absorbância nos diferentes comprimentos de onda após 3h de incubação pode ser a redeposição da lignina e seus derivados sobre a polpa.

Já era esperado que a liberação de compostos derivados da lignina fosse baixa para as polpas clara e pré-branqueada. A quantidade de cromóforos liberados está de acordo com a quantidade de lignina residual presente em cada polpa. A polpa pré-branqueada foi resultante da deslignificação da polpa escura por tratamento com O<sub>2</sub>. Já a polpa clara, além do tratamento com O<sub>2</sub>, foi submetida a uma etapa de branqueamento com agentes clorados. A polpa de celulose escura apresenta, dentre as três, a maior quantidade de lignina residual por não ter passado por processos de branqueamento após o cozimento da madeira. Desta forma, foi possível observar que quanto maior o teor de lignina residual da polpa, maior foi a liberação de cromóforos.

A maior absorbância à 237 nm, em comparação com os outros  $\lambda$  analisados, é um resultado comumente observado para tratamento de polpas de celulose com xilanases (GARG *et al*, 1996).

Não foi possível observar uma tendência similar entre liberação de cromóforos e de açúcares redutores, uma vez que o pico de liberação de cromóforos foi após 2 h de incubação e o pico de liberação de açúcares redutores foi após 3 h de incubação. O aumento da quantidade de açúcares redutores após as 3 h de incubação pode ser devido à degradação de

xilooligossacarídeos já solubilizados e não à remoção da xilana depositada sobre a celulose (GARG *et al*, 1996).

Os resultados de liberação de pentoses livres estão mostrados na figura 5.26.

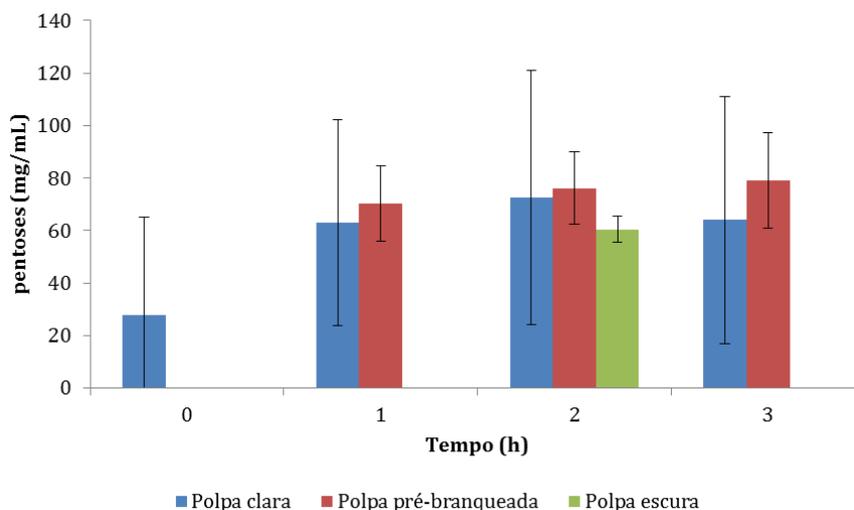


Figura 5.26. Liberação de pentoses livres durante a hidrólise das polpas de celulose em diferentes estágios do processo *Kraft*.

A detecção de pentoses livres, que podem incluir xilose e arabinose oriundos da xilana, foi maior para as polpas clara e pré-branqueada. A lignina, como citado acima, pode ter sido a responsável pela menor liberação de pentoses a partir da polpa escura.

A identificação e quantificação dos produtos de hidrólise das polpas estão mostradas na figura 5.27.

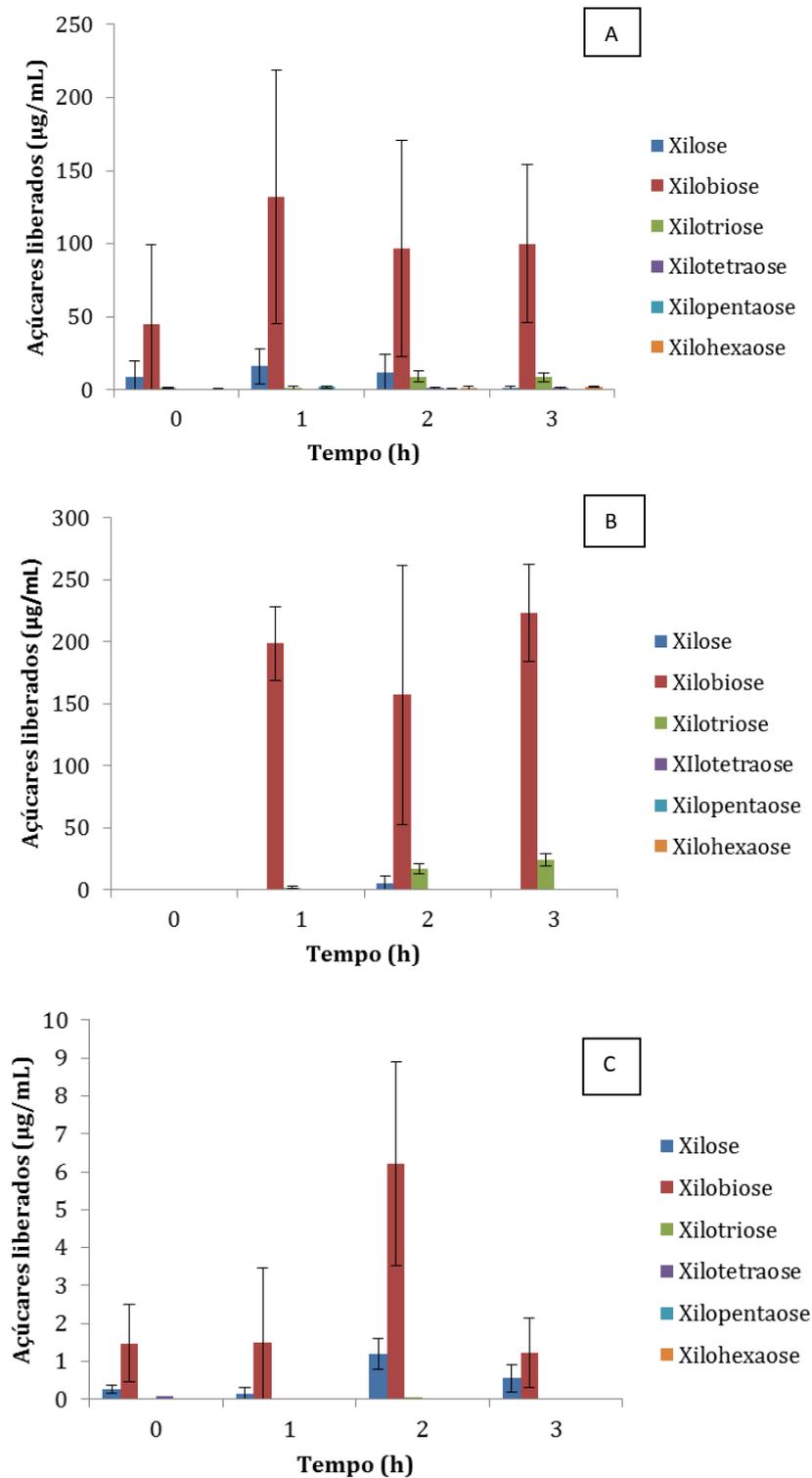


Figura 5.27. Identificação e quantificação dos produtos de hidrólise das polpas de celulose em diferentes estágios do processo *Kraft* pela técnica HPAEC-PAD. Polpa clara (A), polpa pré-branqueada (B) e polpa escura (C).

A maior detecção de produtos de hidrólise da xilana foi encontrada para polpa pré-branqueada, que também mostrou maior detecção de açúcares redutores totais liberados. A hidrólise da polpa escura liberou quantidades de xilose e xilooligossacarídeos muito menores do que as observadas para as polpas clara e pré-branqueada. A presença de lignina pode ser a causa da baixa liberação destes açúcares, assim como explicado anteriormente para a baixa liberação de açúcares redutores totais e pentoses.

Xilobiose foi o principal produto liberado na hidrólise das polpas de celulose clara, pré-branqueada e escura pelo UF. Pequenas quantidades de xilose e xilotriose também foram detectadas (figura 5.27).

Os testes de glicose oxidase não detectaram liberação de glicose (dados não mostrados), indicando que não houve degradação da celulose pelas enzimas presentes no UF.

#### **5.14. Hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**

Ensaio de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar foram realizados para verificar a eficiência do EB de *E. nidulans* em hidrolisar este tipo de substrato lignocelulósico. Vale lembrar que o fungo foi cultivado utilizando este mesmo substrato como fonte de carbono. Foram testadas a hidrólise de amostras de bagaço de cana-de-açúcar não-tratado (“*in natura*”) ou submetido aos pré-tratamentos explosão a vapor ou hidrólise ácida com ácido sulfúrico.

O teor de proteínas usado neste experimento foi de 2513,95 µg EB/g de polpa de celulose, correspondendo a 32,05 UI de xilanase; 4,98 UI de pectinase; 1,13 UI de mananase; 5,81 UI de CMCase e 26,53 UI de FPase /g de polpa de celulose.

Os pré-tratamentos de explosão à vapor e hidrólise ácida têm o objetivo de diminuir a recalcitrância da celulose, e o fazem pela solubilização de parte da hemicelulose e da lignina. Após o pré-tratamento, portanto, o teor de celulose aumenta, acompanhado pela diminuição dos teores de hemicelulose e lignina (ZHENG *et al*, 2009).

Os resultados de detecção de açúcares redutores totais por DNS estão mostrados na figura 5.28. A figura revela aumento na liberação de açúcares redutores mesmo após 96 h de incubação, indicando que as enzimas do EB permanecem ativas durante as 96 h de incubação com os diferentes substratos a 28°C.

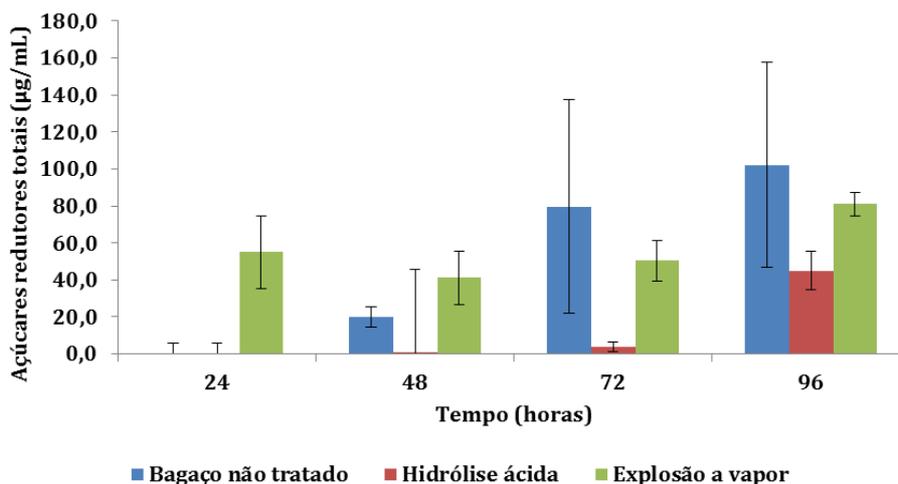


Figura 5.28. Liberação de açúcares redutores, detectados por DNS, resultante da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar não tratado, submetido à hidrólise ácida ou à explosão a vapor pelo EB de *E. nidulans*.

O EB parece ser mais eficiente na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar explodido à vapor, mostrando liberação de açúcares (figura 5.28) já nas primeiras 24h de hidrólise. Os resultados de identificação dos produtos de hidrólise por HPAEC-PAD (figura 5.29) também indicam o maior sucesso do EB na hidrólise da xilana presente no bagaço explodido, com liberação de xilobiose 14 vezes maior que a liberação detectada para o bagaço não-tratado. Mesmo contendo teor de hemicelulose mais baixo que o bagaço não-tratado, a xilana presente no bagaço explodido à vapor provavelmente é mais acessível às xilanases.

O bagaço de cana não-tratado só mostra sinais de hidrólise a partir das 48h de incubação, resultando em uma maior concentração de açúcares redutores totais ao final do experimento comparado às outras amostras de

bagaço. A maior concentração final de açúcares redutores pode ser explicada pelo maior teor de hemicelulose e holocelulose total presente no bagaço não-tratado. O fato de a hidrólise demorar mais para começar sugere que a estrutura não modificada do bagaço “*in natura*” impõe barreiras estéricas à atuação das holocelulases presentes no EB, mas que são rompidas com o passar do tempo de incubação.

Outro fator que deve ser levado em conta é a presença de compostos inibitórios à atuação de holocelulases originados durante o pré-tratamento do material lignocelulósico. Este pode ser um dos motivos que levam à maior liberação de açúcares redutores no bagaço de cana não-tratado. A hidrólise enzimática do bagaço submetido à hidrólise ácida pode ter sido menos extensa que a dos outros tipos de bagaço devido ao mesmo motivo. Segundo Zheng *et al* (2009) e Hu e Haguskas (2012), a geração de inibidores no pré-tratamento por hidrólise ácida é maior que a observada na explosão à vapor.

Os resultados de HPAEC-PAD (figura 5.29) também indicam a predominância de endo-xilanases no EB de *E. nidulans*, pelo fato de xilobiose e xilooligômeros maiores serem os produtos predominantes.

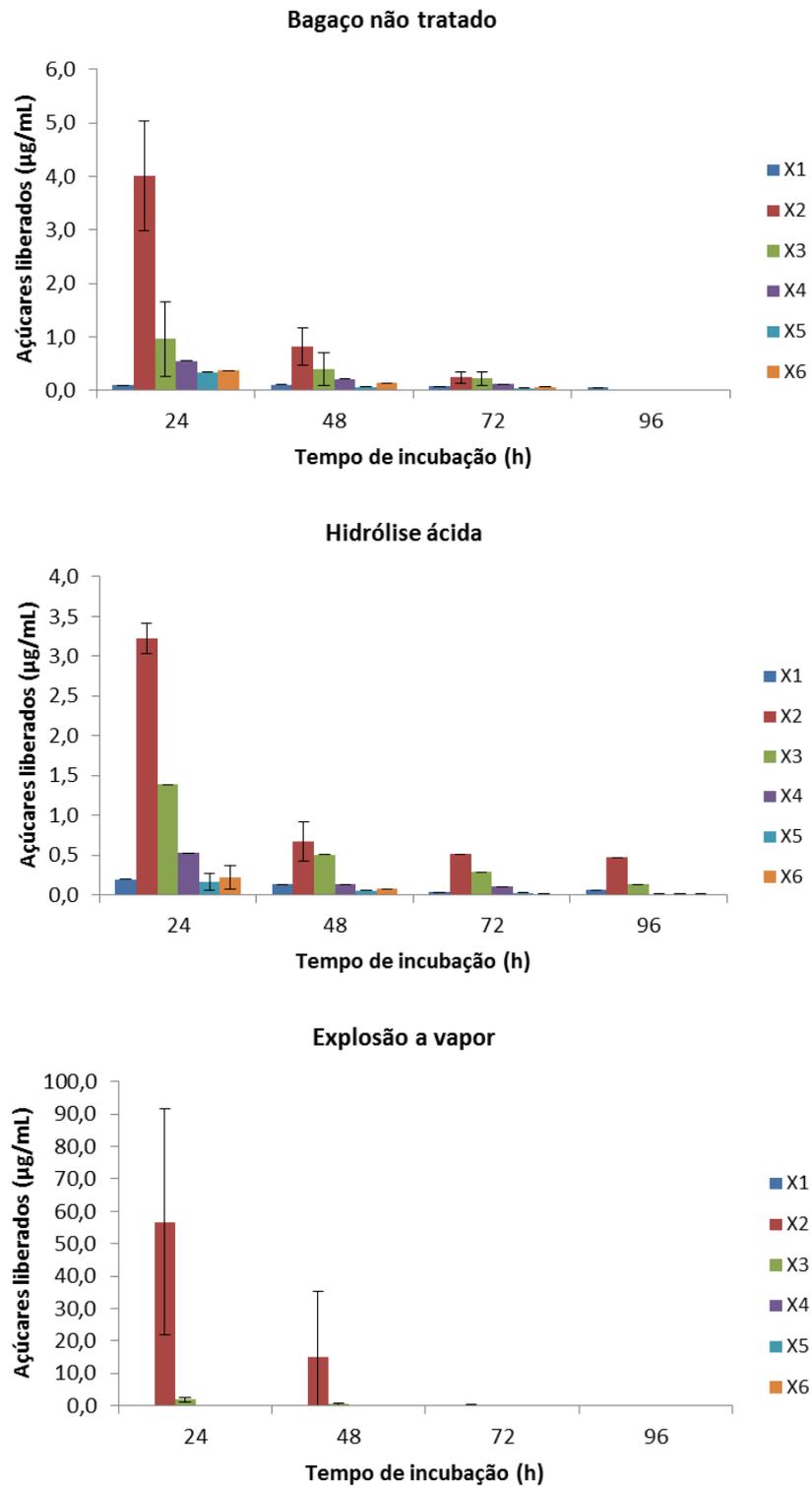


Figura 5.29. Identificação e quantificação dos produtos de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar não-tratado, submetido à hidrólise ácida ou à explosão a vapor pelo EB de *E. nidulans*.

## 6. Conclusões

Foi possível concluir a partir do trabalho realizado que:

- Os resultados de identificação molecular do isolado do fungo utilizado neste trabalho corroboram o resultado prévio de identificação morfológica, indicando *E. nidulans*, mas não são definitivos.
- O resíduo agroindustrial bagaço de cana-de-açúcar pode ser usado como fonte de carbono de baixo custo para a produção de xilanases por *E. nidulans*.
- XynA provavelmente possui habilidade de passar por poros menores que seu tamanho.
- A enzima apresentou alta homologia com endo- $\beta$ -1,4-xilanase A (XynA) de *E. nidulans*.
- XynA apresentou maior atividade em 55°C e faixa de pH de 3,0 a 6,5.
- XynA mostrou-se pouco termoestável a 28, 50 e 55°C.
- Os íons  $Hg^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  e  $Mn^{+2}$  inibiram XynA.
- XynA hidrolisa preferencialmente a porção solúvel da xilana.
- XynA liberou xilooligosacarídeos como produto de hidrólise da xilana de bétula, indicando ação do tipo endo.
- O efeito de compostos fenólicos sobre XynA e outras xilanases é variável, podendo causar inibição, desativação, manutenção ou ativação da atividade.
- XynA foi inibida por ácido cinâmico e pelo polifenol ácido tânico, não foi afetada por ácido ferúlico, *p*-cumárico e vanilina, e foi ativada por ácido 4-hidroxi-benzóico.

- O etanol aumentou a atividade, termoestabilidade e  $V_{m\acute{a}x}$  de XynA, indicando potencial de aplicação em processos de sacarificação e fermentação simultâneos de biomassa lignocelulósica.
- O ultrafiltrado foi capaz de hidrolisar polpas de celulose em diferentes etapas do processo *Kraft*, resultando na liberação de açúcares redutores, cromóforos, pentoses e produtos de hidrólise de xilana, aparentemente sem concomitante liberação de glicose.
- O extrato bruto se mostrou capaz de degradar bagaço de cana-de-açúcar não-tratado ou submetido a explosão a vapor, liberando açúcares redutores e produtos de hidrólise de xilana.

## 7. Perspectivas

- Confirmar a identificação molecular do isolado do fungo utilizado neste trabalho através do sequenciamento dos genes  $\beta$ -tubulina e/ou calmodulina
- Realizar zimografia para detecção de atividade de xilanase ao longo dos dias de cultivo do fungo em bagaço de cana-de-açúcar
- Repetir ensaios de hidrólise da xilana, polpas de celulose e amostras de bagaço de cana, a fim de obter resultados mais confiáveis
- Testar hidrólise de outros substratos lignocelulósicos pelo EB e pela enzima purificada.
- Determinar os índices *Kappa* e de alvura das polpas tratadas com xilanases de *E. nidulans*.
- Investigar efeito de compostos fenólicos sobre estrutura de XynA

## 8. Referências Bibliográficas

ABDEL-SATER, M.A.; EL-SAID, A.H.M. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, p. 15-21, 2001.

ARABATZIS, M.; KANBOURIS, M.; KYPRIANOU, M.; CHRYSAKI, A.; FOUSTOUKOU, M.; KANELLOPOULOU, M.; HONDYLI, L.; KOUPPARI, G.; KAROUZOU, C.K.; LEBESSI, E.; PANGALIS, A.; PETINAKI, E.; STATHI, A.; GRAPHAKOS, E.T.; VARTZIOTI, E.; VOGIATZI, A.; VYZANTIADIS, T.A.; ZERVA, L.; VELEGRAKI, A. Polyphasic identification and susceptibility to seven antifungals of 102 *Aspergillus* isolates recovered from immunocompromised hosts in Greece. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, n. 6, p. 3025–3030, 2011.

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4, 2010.

BAJPAI, P.; BAJPAI, P. K. Realities and Trends in Enzymatic Prebleaching of Kraft Pulp. In: SCHEPE, T. (Ed). **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Springer-Verlag, Berlin. 1997.

BARABOTE, R.D.; PARALES, J.V.; GUO, Y.Y.; LABAVITCH, J.M.; PARALES, R.E.; BERRY, A. Xyn10A, a Thermostable Endoxylanase from *Acidothermus cellulolyticus* 11B. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 21, p. 7363–7366, 2010.

BEG, Q.K.; BHUSHAN, B.; KAPOOR, M.; HOONDAL, G.S. Production and characterization of a thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 396 – 402, 2000.

BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOODAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p: 326–338, 2001.

BENOIT, I.; NAVARRO, D.; MARNET, N.; RAKOTOMANOMANA, N.; MEESSEN, L.L.; SIGOILLOT, J.C.; ASTHER, M.; ASTHER, M. Feruloil-esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agroindustrial residues. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 1820 – 1827, 2006.

BIELY, P.; VRSANSKÁ, M.; TEHKANEN, M; KLUEPFEL, D. Endo- $\beta$ -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, p. 151-166, 1997.

BLUM, H; BEIER, H; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93 – 99, 1987.

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

BRADFORD, M.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.1–2, p. 248–254. 1976.

BUCHERT, J.; TENKANEN, M.; KANTELINEN, A.; VIIKARI, L. Application of xylanases in the pulp and paper industry. **Bioresource Technology**, v.50, p. 65 – 72, 1994.

BUCKERIDGE, M.S.; SOUZA, A.P.; ARUNDALE, R.A.; ANDERSON-TEIXEIRA, K.J.; DELUCIA, E. Ethanol from sugarcane in Brazil: a 'midway' strategy for increasing ethanol production while maximizing environmental benefits. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 4, p. 119 –126, 2012.

CANILHA, L.; CHANDEL, A.K.; MILESSI, T.S.S.; ANTUNES, F.A.F.; FREITAS, W.L.C.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, S.S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012.

Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy) database, disponível em [www.cazy.org](http://www.cazy.org)

CARDOSO, O.A.V.; FILHO, E.X.F. Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, p. 309 – 314, 2003.

CARMONA, E.C.; FIALHO, M.B.; BUCHGNANI, E.B.; COELHO, G.D.; BROCHETO-BRAGA, M.R.; JORGE, J.A. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 359 – 364, 2005.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 1412–1421, 2010.

CHRISTOV, L.P.; PRIOR, B.A. Esterases of xylan-degrading microorganisms: Production, properties, and significance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 6, p. 460 – 475, 1993.

CLARKE, A.J.; YAGUCHI, M. The role of carboxyl groups in the function of endo- $\beta$ -1,4-glucanase from *Schizophyllum commune*. **European Journal of Biochemistry**, v. 149, p. 233-238, 1985.

CLARKÉ, J.H.; DAVIDSON, K.; RIXON, J.E.; HALSTEAD, J.R. FRANSEN, M.P.; GILBERT, H.J.; HAZLEWOOD, G.P. A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase and  $\alpha$ -galactosidase. **Applied Microbiololy and Biotechnology**, v.53, p. 661-667, 2000.

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

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), 2013. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar. Segundo Levantamento da Safra 2013/2014. Disponível em <http://www.conab.gov.br>.

COUGHLAN, M.P.; TUOHY, M.G.; FILHO, E.X.F.; PULS, J.; CLAEYSSSENS, M.; VRSANSKA, M.; HUGHES, M.M. Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems. In: Coughlan, M.P.; Hazlewood, G.P. (Eds.). **Hemicellulose and Hemicellulase**, p. 53 – 84, 1993. Portland Press, Londres.

DE VRIES, R.P.; VISSER, J. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 497–522, 2001.

DIEN, B.S.; COTTA, M.A.; JEFFRIES, T.W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 3, p. 258 – 266, 2003.

DUARTE, G.; MOREIRA, L.R.S.; JARAMILLO, P.M.D.; FILHO, E.X.F. Biomass-Derived Inhibitors of Holocellulases. **Bioenergy Research**, v. 5, n. 3, p. 768 – 777, 2012a.

DUARTE, G.C.; MOREIRA, L.R.S.; MENDONZA, D.P.G.; SIQUEIRA, F.G.; BATISTA, L.R.; AMARAL, L.I.V.; RICART, C.A.O.; FILHO, E.X.F. 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, p. 745 – 772, 2012b.

DUODU, K.G.; TAYLOR, J.R.N.; BELTON P.S.; HAMAKER, B.R. Factors affecting sorghum protein digestibility. *Journal of Cereal Science*, v. 38, p. 117 – 131, 2003.

DURAN, N.; MARQUES, S.; SALLES, B.C.; MEDEIROS, R.G.; FILHO, E.X.F. Enzimas na indústria de polpa e papel. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L.(Eds). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro, Editora Interciência, 2008, p. 205 – 239.

ECKARD, A.D.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; GIBBONS, W. A Review of the Role of Amphiphiles in Biomass to Ethanol Conversion. **Applied Sciences**, v. 3, p. 396-419, 2013.

EDEL, V. Polymerase chain reaction in mycology: an overview. In: BRIDGE, P.D.; ARORA, D.K.; REDDLY, C.A.; ELANDER, R.P. (Eds). **Applications of PCR in mycology**. Cambridge, CAB International, p. 1 – 20, 1998.

ESTEVEZ, F.L.; RUELLE, V.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; QUINTING, B.; FRÈRE, J.M. Acidophilic adaptation of family 11 endo- $\beta$ -1,4-xylanases: Modeling and mutational analysis. **Protein Science**, v. 13, p. 1209–1218, 2004.

FERNANDEZ-ESPINAR, M.T.; SANZ, P.; RÁMON, D.; VALLES, S. Xylanase production by *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 91, p. 91 – 96, 1992.

FERNANDEZ-ESPINAR, M.T; PIÑAGA, F.; SANZ, P.; RÁMON, D.; VALLES, S. Purification and characterization of a neutral endoxylanase from *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 113, p. 223 – 228, 1993.

FERNANDEZ-ESPINAR, M.T; PIÑAGA, F.; DE GRAAFF, L.; VISSER, J.; RÁMON, D.; VALLES, S. Purification, characterization and regulation of the synthesis of *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 555 – 562, 1994.

FERNANDEZ-ESPINAR, M.T.; VALLÉS, S.; PIÑAGA, F.; PÉREZ-GONZÁLEZ, J.A.; RÁMON, D. Construction of an *Aspergillus nidulans* multicopy transformant for the xlnB gene and its use in purifying the minor X24 xylanase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 338 – 341, 1996.

FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A.; NEPOMUCENO, A.L.; MOLINARI, H.B.; BON, E.P.S. Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. **Waste Biomass Valorization**, v. 1, p. 65–76, 2010.

FILHO, E.X.F.; PULS, J.; COUGHLAN, M.P. Physicochemical and catalytic properties of a low-molecular-weight endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase from *Myrothecium verrucaria*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 15, p. 535 – 540, 1993a.

FILHO, E.X.F.; PULS, J.; COUGHLAN, M.P. Biochemical characteristics of two endo- $\beta$ -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 11, p. 171-180, 1993b.

FITZPATRICK, M.; CHAMPAGNE, P.; CUNNINGHAM, M.F.; WHITNEY, R.E. A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8915–8922, 2010.

GALAGAN, J.E. et al. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**, v. 438, n. 22/29, p. 1105 – 1115, 2005.

GANGA, M.A.; PIÑAGA, F.; VALLÉS, S.; RAMON, D.; QUEROL, A. Aroma improving in microvinification processes by the use of a recombinant wine yeast strain expressing the *Aspergillus nidulans xlnA* gene. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 171–178, 1999.

GARG, A.P.; MCCARTHY, A.J.; ROBERTS, J.C. Biobleaching effect of *Streptomyces thermoviolaceus* xylanase preparations on birchwood kraft pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 261-267, 1996.

GLAZER, A.N.; DELANGE, R.J.; SIGMAN, D.S. Chemical modification of proteins. In: WORK, T.S. & WORK, E. (Eds). **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology**, v. 4. Amsterdam, North-Holland Publishing Company/Nova York, American Elsevier, 1976.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a Sustainable Energy Future. **Science**, v. 315, p. 808-810, 2007.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**, v.1, n.6, 2008.

GRABBER, J.H. How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies. **Crop Science**, v. 45, p.820-831, 2005.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B. KULBE, K.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 137-161, 1996.

HAMMOND, T.M.; BOK, J.W.; ANDREWSKY, M.D.; REYES-RODRIGUES, Y.; SCAZZOCCHIO, C.; KELLER, N.P. RNA silencing gene truncation in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*, v. 7, n. 2, p. 339–349, 2008.

HAN, K.H.; LEE, D.B.; KIM, J.H.; KIM, M.S.; HAN, K.Y.; KIM, W.S.; PARK, Y.S.; KIM, H.B.; HAN, D.M. Environmental factors affecting development of *Aspergillus nidulans*. **The Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p.34-40, 2003.

HAN, K.H. Molecular Genetics of *Emericella nidulans* Sexual Development. **Mycobiology**, v. 37, n. 3, p. 171-182, 2009.

HAWKSWORTH, D.L. A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. **MycoKeys**, v. 1, p. 7–20, 2011.

HENRY, T.; IWEN, P.C.; HINRICHS, S.H. Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1510-1515, 2000.

HU, F; RAGAUSKAS, A. Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. **Bioenergy Research**, v. 5, p.1043 – 1066, 2012.

JÖNSSON, L.J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N.O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 16, 2013.

KAMM, B.; GRUBER, P.R.; KAMM, M. **Biorefineries, Industrial Processes and Products**. Ullmann's, Wiley-VCH, 2007.

KANGO, N.; AGRAWAL, S.C.; JAIN, P.C. Production of xylanase by *Emericella nidulans* NK-62 on low-value lignocellulosic substrates. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 691–694, 2003.

KAWAMOTO, H.; MIZUTANI, K.; NAKATSUBO, F. Binding nature and denaturation of protein during interaction with galloylglucose. **Phytochemistry**, v. 46, n. 3, p. 437 – 438, 1997.

KESKAR, S.S.; SRINIVASAN, M.; DESHPANDE, V.V. Chemical modification of a xylanase from a thermotolerant *Streptomyces*: Evidence for essential tryptophan and cysteine residues at the active site. **Biochemistry Journal**, v. 261, p. 49-55, 1989.

KIM, D.Y.; HAN, M.K.; PARK, D.S.; LEE, J.S.; OH, H.W.; SHIN, D.H.; JEONG, T.S.; HIM, S.U.; BAE, K.S.; SON, K.H.; PARK, H.Y. Novel GH10 xylanase, with a fibronectin type 3 domain, from *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13, a bacterium in the gut of *Eisenia fetida*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, n. 22, p. 7275–7279, 2009.

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345–351, 2002.

KLICH, M.A. **Identification of Common Aspergillus Species**. Centraalbureau voor Schimmelculture, Baarn/Delft, Holanda, 2002.

KOSHLAND, D.E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. **Biological Reviews**, v. 28, n. 4, p. 416 – 436, 1953.

KUBICEK, C.P. The plant biomass. In: \_\_\_\_ **Fungi and lignocelulosic biomass**: Wiley-Blackwell, 2013, cap. 1, p. 1-28.

KUMAR, S.; RÁMON, D. Purification and regulation of synthesis of a  $\beta$ -xilosidase from *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 135, p. 287 – 283, 1996.

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

LAFOND, M.; TAUZIN, A.; DESSEAUX, V.; BONNIN, E.; AJANDOUZ, H.; GIARDINA, T. GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 20, 2011.

LEATHERBARROW, R.J. Enzfitter: a non-linear regression data analysis program for the IBM PC. **Biosoft**, London, p.1–99, 1987.

LI, X.; LI, E.; ZHU, Y.; TENG, C.; SUN, B.; SONG, H. YANG, R. A typical endo-xylanase from *Streptomyces rameus* L2001 and its unique characteristics in xylooligosaccharide production. **Carbohydrate Research**, v. 359, p.30–36, 2012.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.; PRETORIUS I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 507-77, 2002.

MACCABE, A.P.; OREJAS, M.; PEREZ-GONZÁLEZ, J.A.; RÁMON, D. Opposite patterns of expression of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes with respect to ambient pH. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 5, p. 1331–1333, 1998.

MACCABE, A.P.; RÁMON, D. Expression of the *Aspergillus nidulans xlnC* gene encoding the X34 endo-xylanase is subject to carbon catabolite repression and

pH control. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 57 – 60, 2001.

MARGOLLES-CLARK, E.; TENKANEN, M.; SODERLUND, H.; PENTTILA, M. Acetyl xylan esterase from *Trichoderma reesei* contains an active-site serine residue and a cellulose-binding domain. **European Journal of Biochemistry**, v. 237, p. 553-560, 1996.

MARTIN, S. A.; AKIN, D.E. Effect of phenolic monomers on the growth and  $\beta$ -glucosidase activity of *Bacteroides ruminicola* and on the carboxymethylcellulase,  $\beta$ -glucosidase, and xylanase activities of *Bacteroides succinogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 3019-3022, 1988.

MILANEZI, N.V.G.; GÓMEZ-MENDONÇA, D.P.; SIQUEIRA, F.G.; SILVA, L.P.; RICART, C.A.O.; FILHO, E.X.F. Isolation and Characterization of a Xylan-Degrading Enzyme from *Aspergillus niger* van Tieghem LPM 93 with Potential for Industrial Applications. **Bioenergy Research**, v. 3, n. 2, 2010.

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

MONCLARO, A.V.; FILHO, E.X.F. The Role of  $\alpha$ -Glucuronidases in the Deconstruction of Plant Cell Wall Structure. In: POLIZELI, M.L.T.M.; RAY, M. (Eds). **Fungal Enzymes**. CRC Press, 2013, p. 280 – 293.

MONFORT, A.; BLASCO, A.; PRIETO, J.A.; SANZ, P. combined expression of *Aspergillus nidulans* endoxylanase X24 and *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase in industrial baker's yeasts and their use in bread making. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3712–3715, 1996.

MOREIRA, L.R.S.; MATTOS, I.; MONCLARO, A.V.; SANTOS, S.S.T.; JENSEN, A.T.; SIQUEIRA, F.G.; FILHO, E.X.F. The use of lignocellulosic substrates as carbon sources for production of xylan-degrading enzymes from

*Acrophialophora nainiana*. **Current Topics in Biochemical Research**, v. 10, n. 2, p. 35 – 45, 2008.

MOREIRA, L.R.S.; CAMPOS, M.C.; SIQUEIRA, P.H.V.M.; SILVA, L.P.; RICART, C.A.O.; MARTINS, P.A.; QUEIROZ, R.M.L.; FILHO, E.X.F. Two  $\beta$ -xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 46–52, 2013.

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

MOTTA, F.; ANDRADE, C.; SANTANA, M. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. In: CHANDEL, A. K. e SILVA, S. S. (Eds). Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization: InTech, cap. 10, 2013.

ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2503-2510, 2007.

OREJAS, M.; MACCABE, A.P.; PEREZ-GONZÁLES, J.A.; KUMAR, S.; RÁMON, D. Carbon catabolite repression of the *Aspergillus nidulans* *xlnA* gene. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 177–184, 1999.

OREJAS, M.; MACCABE, A.P.; PEREZ-GONZÁLES, J.A.; KUMAR, S.; RÁMON, D. The wide-domain carbon catabolite repressor *creA* indirectly controls expression of the *Aspergillus nidulans* *xlnB* gene, encoding the acidic endo- $\beta$ -(1,4)-xylanase X24. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 5, p. 1517–1523, 2001.

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.

PECAROVICOVA, A.; LUZAKOVA, V.; BYSTRICKY, S.; PECAROVIC, J.; KOSIK, M. An activation of effect of some phenolics on enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Cellulose Chemistry Technology**, v.23, n.225, 1989.

PEBERDY, J.F. Protein secretion in filamentous fungi - trying to understand a highly productive black box. **Trends in Biotechnology**, v. 12, 1994.

PETERSON, S.W. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. **Mycologia**, v. 100, n. 2, p. 205 – 226, 2008.

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

POUTANEN, K.; SUNDBERG, M.; H. KORTE, H.; PULS, J. Deacetylation of xylans by acetyl esterases of *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 506-510, 1990.

PRADE, R.A.; GRIFFITH, J.; KOCHUT, K.; ARNOLD, J.; TIMBERLAKE, W.E. In vitro reconstruction of the *Aspergillus* (= *Emericella*) *nidulans* genome. **Proceedings of the Nacional Academy of Sciences USA**, v. 94, p. 14564–14569, 1997.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17-20, 1985.

RATANACHOMSRI, U.; SRIPRANG, R.; SORNLEK, W.; BUABAN, B.; CHAMPREDA, V.; TANAPONGPIPAT, S.; EURWILAICHITR, L. Thermostable Xylanase from *Marasmius* sp.: Purification and Characterization. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 39, n. 1, pp. 105-110, 2006.

RUIZ-DUEÑAS, F.J.; MARTÍNEZ, A.T. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n.2, p. 164–177, 2009.

SALAMA, M.A.; ISMAIL, K.M.I.; AMANY, H.A.; LILL, A.E.; GEWEELI, N.S.I. Biochemical studies of purified xylanases from *Aspergillus versicolor*. **International Journal of Botany**, v. 4, n. 1, p. 41 – 48, 2008.

SAMSON, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Fitenborg, O. **Introduction to Food and Airborne Fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultuur, Baarn/Delft, Holanda, 2000.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185–194, 2009.

SÁ-PEREIRA, P.; PAVEIA, H.; COSTA-FERREIRA, M.; AIRES-BARROS, M.R. A new look at xylanases: an overview of purification strategies. **Molecular Biotechnology**, v. 24, p. 257 – 281, 2003.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12. p. 3875-3883, 1991.

SEGURA, B.G.; FEVRE, M. Purification and Characterization of Two 1,4- $\beta$ -Xylan Endohydrolases from the Rumen Fungus *Neocallimastix frontalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 3654-3660, 1993.

SCHÄFER, T.; KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C.; PEDERSEN, S.; SALMON, S.; OLSEN, H.S.; DEINHAMMER, R.; LUND, H. Enzymes for Technical Applications. **Biopolymers Online**, 2005.

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

SIGOILLOT, C.; CAMARERO, S.; VIDAL, T.; RECORD, E. ASTHER, M.; PÉREZ-BOADA, M; MARTÍNEZ, M.J.; SIGOILLOT, J.C.; ASTHER, M.; COLOM, J.F.; MARTINEZ, A.T. Comparison of different fungal enzymes for

bleaching high-quality paper pulps. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 333–343, 2005.

SIQUEIRA, F.G. Resíduos agroindustriais com potencial para produção de holocelulases de origem fúngica e aplicações biotecnológicas de hidrolases. 2010. 277 p. Tese de Doutorado - Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

SIQUEIRA, F.G.; FILHO, E.X.F. Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 7, p. 54-60, 2010.

SIQUEIRA, F.G.; SIQUEIRA, E.G.; JARAMILLO, P.M.D.; SILVEIRA, M.H.L.;[ ANDREAUS, J.; COUTO, F.A.; BATISTA, L.R.; FILHO, E.X.F. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulases from filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, p. 20-26, 2010.

SILVA, C.H.C.; PULS, J.; SOUSA, M.V.; FILHO, E.X.F. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 114 – 119, 1999.

SILVEIRA, F.Q.P.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.O.; MILAGRES, A.M.F.; MEDEIROS, C.L.; FILHO, E.X.F. A new xylanase from a *Trichoderma harzianum* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 682 – 685, 1999.

SOCOL, C.R.; VANDENBERGHER, L.P.S.; MEDEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; LEITÃO, V.F.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A.; BON, E.P.S.; MORAES, L.M.P.; ARAÚJO, J.A.; TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 4820–4825, 2010.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-46, 2002.

SUDAN, R.; BAJAJ, B.K. Production and biochemical characterization of xylanase from an alkalitolerant novel species *Aspergillus niveus* RS2. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 491 – 500, 2007.

TEIXEIRA, R.S.S.; SIQUEIRA, F.G.; SOUZA, M.V.; FILHO, E.X.F.; BON, E.P.S. Purification and characterization studies of a thermostable  $\beta$ -xylanase from *Aspergillus awamori*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 37, p. 1041–1051, 2010.

VAN DYK, J.S.; SAKKA, M.; SAKKA, K.; PLETSCHE, B.I. Characterisation of the multi-enzyme complex xylanase activity from *Bacillus licheniformis* SVD1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, n. 4, p. 174 – 177, 2010.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELGARD, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Nova York, Academic Press, 1990, p. 315–322.

WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SADDLER, J.N. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. **Microbiological Reviews**, v.52, n. 3, p. 305-317, 1988.

WU, Z.; LEE, Y.Y. Inhibition of the enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 10, p. 977 – 979, 1997.

XIMENES, F.A.; PULS, J.; SILVA JR, F.G.J.; FILHO, E.X.F. Purification and characterization of a low-molecular-weight xylanase produced by *Acrophialophora nainiana*. **Current Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 18 – 21, 1999.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISH, M. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 170–176, 2010.

XIMENES, E. KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISH, M. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 54–60, 2011.

YU, J.H.; BUTCHKO, A.E.; FERMANDES, M.; KELLER, N.P.; LEONARD, T.J.; ADAMS, T.H. Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene aflR from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. **Current Genetics**, v. 29, p. 549 – 555, 1996.

ZHANG, J.; SIIKA-AHO, M.; PURANEN, T.; TANG, M.; TENKANEN, M.; VIIKARI, L. Thermostable recombinant xylanases from *Nonomuraea flexuosa* and *Thermoascus aurantiacus* show distinct properties in the hydrolysis of xylans and pretreated wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 12, 2011.

ZHANG, J.; MOILANEN, U; TANG, M; VIIKARI, L. The carbohydrate-binding module of xylanase from *Nonomuraea flexuosa* decreases its non-productive adsorption on lignin. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 18, 2013.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **Internacional Journal of Agricultural & Biological Engineering**, v. 2, n. 3, p. 51 – 68, 2009.