

KAMILA DE SOUSA GOMES

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XILANASES DO
FUNGO *Chrysosporthe cubensis* E UTILIZAÇÃO NA
HIDRÓLISE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

G633p
2014

Gomes, Kamila de Sousa, 1987-
Purificação e caracterização de xilanases do fungo
Chrysosporthe cubensis e utilização na hidrólise de bagaço de
cana-de-açúcar / Kamila de Sousa Gomes. – Viçosa, MG, 2014.
xi, 59f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Sebastião Tavares de Rezende.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.46-54.

1. *Chrysosporthe cubensis*. 2. Xilanases. 3. Cana-de-açúcar.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em
Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.76

KAMILA DE SOUSA GOMES

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XILANASES DO
FUNGO *Chrysosporthe cubensis* E UTILIZAÇÃO NA
HIDRÓLISE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 15 de julho de 2014.

Larissa Mattos Trevizano

Lílian da Silva Fialho

Valéria Monteze Guimarães

Sebastião Tavares de Rezende
(Orientador)

Dedico este trabalho

A Deus

Aos meus pais

Aos meus irmãos

Aos meus amigos

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades a mim concedidas.

Aos meus pais, Ronaldo e Fátima, por todo apoio e incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos, Karina e Humberto, pela amizade e carinho.

Ao Prof. Sebastião Tavares de Rezende pela oportunidade, confiança ao meu trabalho e orientação.

À Prof^ª. Valéria Monteze Guimarães pela colaboração, apoio e amizade.

Aos amigos dos laboratórios de Análises Bioquímicas e de Tecnologia Enzimática: Lorena, Gabi, Rafa Ladeira, Rafa Ventorim, Amanda, Lílian, Mari, Rosi, Maíra, Tiago Leal, Thiago Dutra, Daniel e Naldo; pela amizade e companheirismo durante todo esse tempo.

Aos amigos de Bambuí, da graduação e de Viçosa, em especial às companheiras de república: Gabi, Ju, Marcela, Giovanna e Luísa; pela amizade e boa convivência.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de realização deste trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e do BIOAGRO, pela atenção e colaboração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

KAMILA DE SOUSA GOMES, filha de Ronaldo Pereira Gomes e Aparecida de Fátima Sousa Gomes, nasceu na cidade de Bambuí – MG, em 05 de maio de 1987.

Em abril de 2008, iniciou o curso de graduação na primeira turma de Bioquímica da Universidade Federal de São João Del Rei, concluindo-o em dezembro de 2011.

Ingressou, em julho de 2012, no programa de pós-graduação em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae* em julho de 2014.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Xilanases.....	2
2.2. Aplicação de xilanases na indústria alimentícia	4
2.3. Aplicação de xilanases na indústria de papel e celulose.....	5
2.4. Aplicação de xilanases na produção de biocombustível	6
2.5. <i>Chrysosporthe cubensis</i>	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1. Materiais.....	9
3.2. Cultivo do fungo <i>Chrysosporthe cubensis</i> e produção de xilanases.....	10
3.3. Purificação.....	11
3.3.1. Cromatografia de troca iônica.....	11
3.3.2. Cromatografia de exclusão molecular.....	11
3.4. Ensaio enzimático.....	11
3.4.1. Determinação da atividade xilanásica.....	11
3.4.2. Determinação da atividade de endoglicanases.....	12
3.4.3. Determinação da atividade de β -xilosidases.....	12
3.5. Determinação de proteína total	13
3.6. Zimograma e eletroforese em gel de poliacrilamida.....	13
3.7. Caracterização enzimática.....	14
3.7.1. Determinação do pH e da temperatura ótima de reação.....	14
3.7.2. Determinação da estabilidade térmica e da estabilidade em diferentes valores de pH.....	15
3.7.3. Especificidade das xilanases por diferentes substratos	15
3.7.4. Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$	15
3.8. Efeito sinérgico entre as xilanases do fungo <i>C. cubensis</i>	16

3.9. Análise da composição dos produtos de hidrólise da xilana <i>oat spelt</i>	16
3.10. Sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar	17
3.11. Análise estatística dos dados	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1. Purificação das xilanases do fungo <i>C. cubensis</i>	18
4.2. Determinação do grau de pureza e da massa molecular das xilanases do fungo <i>C. cubensis</i>	23
4.3. Caracterização enzimática.....	27
4.3.1.Efeito do pH e da estabilidade em diferentes valores de pH.....	27
4.3.2.Efeito da temperatura e análise da estabilidade térmica.....	30
4.3.3.Especificidade das xilanases por diferentes substratos.....	35
4.3.4.Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{máx}$	37
4.4. Efeito sinérgico entre as xilanases do fungo <i>C. cubensis</i>	39
4.5. Análise da composição dos produtos de hidrólise da xilana <i>oat spelt</i>	40
4.6. Sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.....	42
5. CONCLUSÕES.....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
7. ANEXOS.....	55

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorbância
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina sérica bovina
°C	Grau Celsius
CMC	Carboximetilcelulose
CuSO ₄	Sulfato de cobre
DNS	Dinitrossalicilato
FeCl ₃	Cloreto férrico
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
<i>g</i>	Gravidade
H ₃ BO ₄	Ácido bórico
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
K _M	Constante de Michaelis-Menten
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MM	Massa molecular
MnCl ₂	Cloreto de manganês
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µmol	Micromol
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ MoO ₄	Molibdato de sódio
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amônio
nm	Nanômetro
P1	Pico de atividade xilanase 1

P2	Pico de atividade xilanase 2
P3	Pico de atividade xilanase 3
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PDA	Potato dextrose agar
pH	Potencial hidrogeniônico
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volume
ρ -NP- β Xil	ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TLC	<i>Thin-layer chromatography</i>
U	Unidade de atividade enzimática
V	Volts
v/v	Volume/volume
$V_{\max}$	Velocidade Máxima
X	Xilose
X3	Xilotriose
X4	Xilotetraose
ZnSO ₄	Sulfato de zinco

RESUMO

GOMES, Kamila de Sousa M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014. **Purificação e caracterização de xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis* e utilização na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.** Orientador: Sebastião Tavares de Rezende.

A biomassa lignocelulósica é a maior fonte de carboidratos naturais do mundo, sendo constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Grande parte da biomassa não é aproveitada devido à dificuldade de acesso de enzimas hidrolíticas à parede celular vegetal, resultando na dificuldade de degradação da parede e sua posterior conversão em açúcares fermentáveis. A busca por combustíveis alternativos é uma das áreas que incentiva a produção de enzimas hidrolíticas, além do setor alimentício e da indústria de papel e celulose, que vêm utilizando cada vez mais processos enzimáticos. Neste trabalho, foi realizada a purificação, a caracterização cinética e bioquímica das xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis* e a aplicação das xilanases no processo de sacarificação do bagaço de cana-de açúcar. O fungo foi cultivado em meio sólido, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono. O extrato enzimático foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna Q-Sepharose, seguido de cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl S-200. A massa molecular das xilanases determinada por SDS-PAGE, foi de aproximadamente 21,5 kDa para P2 e 41,5 kDa para P3. As xilanases presentes em P1 apresentaram atividade máxima a 60°C e pH 4,0. P2 a 55°C e pH 3,0. Já P3 apresentou melhor atividade a 80°C e pH 3,0. As enzimas P1 e P3 hidrolisaram melhor a xilana *oat spelt*, e P2 a xilana *beechwood*. Os substratos CMC e p-NP-βXil não foram hidrolisados por nenhuma das xilanases. O valor de K_M , usando a xilana *oat spelt* como substrato, foi de 2,65 mg/mL para P1; 1,81 mg/mL para P2 e de 1,18 mg/mL para P3. Xilobiose e xilotriose foram os principais produtos de hidrólise da xilana *oat spelt*, indicando que as xilanases exercem a função de endo-β-1,4-xilanases. As enzimas ainda mostraram-se eficientes na hidrólise do

bagaço de cana-de açúcar, promovendo um aumento na concentração de açúcares redutores, mostrando-se promissoras para o processo de sacarificação de biomassa.

ABSTRACT

GOMES, Kamila de Sousa M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **Purification and characterization of xylanases from fungus *Chrysosporthe cubensis* and application in hydrolysis of sugarcane bagasse.** Adviser: Sebastião Tavares de Rezende.

Lignocellulosic biomass is the world's most natural source of carbohydrates, consisting mainly of cellulose, hemicellulose and lignin. Much of the biomass isn't used due to the difficulty of access to the plant cell wall hydrolytic enzymes, resulting in difficulty in degradation of the wall and their subsequent conversion into fermentable sugars. The search for alternative fuels is one area that encourages the hydrolytic enzymes production, besides the food industry and the pulp and paper industry, which has been using enzymatic processes increasingly. The aims of this work were the purification and characterization of xylanases from *Chrysosporthe cubensis*. The fungus was grown under solid state fermentation using wheat bran as carbon source. For enzymes purification, the enzymatic extracts were submitted to the ion exchange chromatography (Q-Sepharose) and gel filtration (Sephadex S-200). The xylanases molecular mass was approximately 21.5 kDa to P2 and 41.5 kDa to P3, under denaturing conditions. The xylanases present in P1 showed better performance at 60°C and pH 4.0, P2 at 55°C and pH 3.0. P3 showed better performance at 80 °C and pH 3.0. The oat spelt xylan was the best substrate hydrolyzed by P1 and P3, and P2 beechwood xylan. CMC and p-NP- β Xil were not hydrolyzed by any of the xylanases. The K_M value, using oat spelt xylan as substrate, was 2.65 mg/mL to P1; 1.81 mg/mL to P2 and 1.18 mg/mL to P3. Xylobiose and xylotriose were the main hydrolysis products of oat spelt xylan indicating that xylanases act as endo- β -1,4-xylanases. Xylanases also proved to be efficient in the sugarcane bagasse hydrolysis, due to the increase in the reducing sugars concentration, indicating potential for the process of biomass saccharification.

1. INTRODUÇÃO

A parede celular vegetal é composta por três principais polímeros: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é um polímero linear de cadeia longa formada por monômeros de glicose unidos por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas. A união destes monômeros dá origem às microfibrilas de celulose, que interagem entre si por ligações de hidrogênio (BON *et al.*, 2008). Essas longas fibras celulósicas são, por sua vez, recobertas por hemicelulose, um polissacarídeo ramificado de composição heterogênea, sendo composta principalmente por glicose, manose, galactose, arabinose e xilose. A lignina, presente apenas na parede celular secundária, é um polímero complexo que contém cadeias de monômeros quimicamente distintos, derivados de compostos fenólicos (SUN, 2002; ARANTES e SADDLER, 2010).

As porções celulósicas e hemicelulósicas representam em torno de 40-50 e 20-30% do peso seco das plantas, respectivamente, e são polissacarídeos que podem ser hidrolisados a açúcares menores e fermentados para a produção de etanol. O etanol produzido a partir da biomassa lignocelulósica é importante, sobretudo para a diminuição da dependência por combustíveis fósseis (SANGKHARAK, 2011).

As xilanases (EC 3.2.1.8) são enzimas hemicelulolíticas que hidrolisam as ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) da xilana. Fungos, bactérias e algumas leveduras são os principais produtores de xilanases. Fungos filamentosos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* já são conhecidos por secretarem enzimas hidrolíticas de interesse comercial, entre elas as xilanases.

Em estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, foi verificado que o fungo fitopatógeno *Chrysosporthe cubensis* secreta uma ampla variedade de enzimas hidrolíticas, com destaque para as xilanases, que apresentaram alta atividade e termoestabilidade. Além disso, foi observado que o conjunto de celulasas e hemicelulasas secretado pelo fungo *C. cubensis* foi mais eficiente na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar que o coquetel comercial Multifect® CL (FALKOSKI *et al.*, 2011, 2013).

Xilanases têm sido utilizadas na indústria de papel e celulose, na indústria de alimentos e na de bicomustíveis (SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002; HUANG

et al., 2014). Deste modo, a busca pelo aprimoramento de processos industriais e biotecnológicos tem incentivado estudos na área de enzimas, objetivando-se, principalmente, a diminuição dos custos de produção e o aumento da eficiência dos processos. Além disso, sabe-se que o uso de catalisadores enzimáticos é vantajoso em relação aos químicos, por serem mais específicos e não gerarem compostos tóxicos.

Considerando os aspectos discutidos, o objetivo geral desse trabalho foi purificar e caracterizar as xilanases presentes no extrato enzimático do fungo *Chrysosporthe cubensis*, visando principalmente contribuir com o estudo de enzimas de interesse comercial e incentivar o uso destes biocatalisadores em processos industriais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Xilanases

Xilanases (exo ou endoxilanases) (EC 3.2.1.8) e xilosidases (EC 3.2.1.37) são enzimas extracelulares produzidas principalmente por bactérias, fungos e algumas leveduras. São um grupo de enzimas hemicelulolíticas que hidrolisam aleatoriamente as ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) da xilana e de xilooligossacarídeos (BUTT et al., 2008).

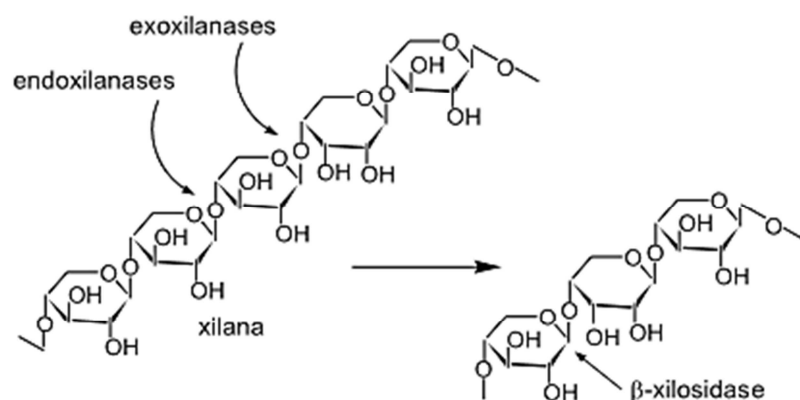


Figura 1 - Estrutura da xilana e ação das enzimas: xilanase e β -xilosidase.

As β -xilosidases participam da hidrólise de moléculas de xilobiose e xilooligossacarídeos curtos, liberando moléculas de xilose. A afinidade desta enzima pelo substrato é inversamente proporcional ao grau de polimerização, deste modo, as β -xilosidases não são capazes de promover a hidrólise da xilana (DELCHEVA *et al.*, 2008).

A xilana, composta por unidades de D-xilopirranose com graus variáveis de substituições em suas cadeias laterais, é o segundo polissacarídeo mais abundante e um dos principais componentes da parede celular vegetal. Localiza-se principalmente na parede celular secundária, formando uma interfase entre a lignina e a celulose (BIELY, 1997; GOMES *et al.*, 2007).

Devido à heterogeneidade e complexidade deste polissacarídeo, são necessárias várias xilanases com diversas especificidades, sequências primárias e conformações tridimensionais para hidrolisar completamente as xilanas (SCHELLER e ULVSKOV, 2010).

As enzimas que atuam na hidrólise da cadeia principal das xilanas são as endo-xilanases e as exo-xilanases, ou simplesmente xilanases. Tais enzimas são responsáveis pela hidrólise das ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) da xilana (Figura 1), produzindo xilooligossacarídeos de tamanhos variados e xilose (GOMES *et al.*, 2007, POLIZELI *et al.*, 2005).

Wong *et al.* (1988) classificaram as xilanases em dois grupos com base em suas propriedades físico-químicas: (i) que possuem massa molecular baixa (<30 kDa) e PI básico, e (ii) com massa molecular elevada (> 30 kDa) e PI ácido.

Segundo Biely e colaboradores (1997), a maioria das xilanases já estudadas apresentam massa molecular variando de 6 a 80 kDa, são ativas na faixa de pH 4,5 a 6,5 e estáveis entre 40 e 60 °C.

As xilanases pertencem à família das glicosil-hidrolases e grande parte delas compõem duas principais famílias: a família F (também conhecida como 10) e a família G (também conhecida como 11). As xilanases da família 10 são maiores, mais complexas, apresentam uma topologia em barril tipo α/β 8 (TIM), e em alguns casos são altamente glicosiladas. As da família 11 são menores (<30 kDa), mais consistentes estruturalmente, apresentam topologia de *jelly-roll*, não são glicosiladas, possuem um mecanismo catalítico composto por dois glutamatos agindo como resíduos catalíticos e são mais específicas para xilanas, sendo estas de maior interesse biotecnológico (KULKARNI *et al.*, 1999).

Xilanases da família 11 são conhecidas por acomodar de cinco a sete resíduos xilopiranosídicos no sítio catalítico, enquanto nas xilanases da família 10, o substrato é ligado superficialmente à base do barril (SUBRAMANIYAN *et al.*, 2002; DODD *et al.*, 2009). Estas diferenças na estrutura tridimensional das famílias correspondem a diferentes atividades catalíticas das enzimas. Xilanases da família 11 possuem pontos de clivagem mais específicos, de acordo com o tamanho da cadeia xilopiranosídica e as ramificações existentes. As xilanases da família 10 podem promover a hidrólise desde pontos próximos às ramificações, quanto xilooligossacarídeos ligados a outras cadeias polissacarídicas, como à celulose, apresentando maior flexibilidade desta enzima para indústria (BIELY *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2011).

2.2. Aplicação de xilanases na indústria alimentícia

Endoxilanases têm sido utilizadas para melhorar a qualidade de massas, pães, biscoitos, bolos e outros produtos de panificação. Acredita-se que a capacidade da endoxilanase de hidrolisar a arabinoxilana favorece a redistribuição de água, melhorando assim a textura, o volume e a estabilidade das massas (MAAT *et al.*, 1992; POUTANEN, 1997). A vantagem de utilizar enzimas é que estas podem contribuir com a diminuição de aditivos químicos empregados como conservantes (KULKARNI *et al.*, 1999).

Xilanas têm um papel importante na qualidade do pão devido a sua capacidade de absorção de água e interação com glúten (NUYENS *et al.*, 2001). Heldt-Hansen (1997) relatou o uso de xilanases e endoglicanases na hidrólise da arabinoxilana e do amido. Quando a arabinoxilana é hidrolisada, o glúten fica mais livre, o que é importante para a estrutura da massa, melhorando o manuseio, o volume e a estrutura do miolo.

Na extração, clarificação e estabilização de sucos de frutas e vinhos, e no processo de liquefação de frutas têm-se empregado com grande frequência as xilanases (UHLIG, 1998).

Na fabricação de cerveja ocorre liberação de longas cadeias de arabinoxilanas que aumentam sua viscosidade, podendo deixá-la mais turva. As xilanases auxiliam na solubilização das arabinoxilanas a oligossacarídeos

menores, diminuindo a viscosidade e, conseqüentemente, eliminando a turbidez (KRONBAUER *et al.*, 2007; MOTTA *et al.*, 2013).

Segundo Polizeli *et al.* (2005), a xilose produzida pela ação das xilanases pode ser convertida a xilitol, um poliálcool que apresenta poder adoçante semelhante à sacarose, de baixo teor calórico e não cariogênico, podendo ser usado como adoçante de baixa caloria nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

Xilanases também tem sido utilizadas na fabricação de rações para animais, principalmente para suínos e aves, reduzindo custos na produção e aumentando o valor nutricional, devido melhoras na absorção e digestibilidade dos seus ingredientes (CHESSON, 1987; GRAHAM *et al.*, 1995). 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).

2.3. Aplicação de xilanases na indústria de papel e celulose

Celulases e hemicelulases têm sido utilizadas na indústria do papel para diferentes finalidades. Dentre estas, as xilanases surgiram como uma tecnologia promissora de branqueamento da polpa de celulose para a produção de papel. Essas enzimas catalisam a hidrólise da xilana, principal componente da hemicelulose, liberando a lignina, principal componente que contém grupos cromóforos, sem danificar a celulose (MEDEIROS *et al.*, 2007, BORGES, 2010). É importante ressaltar que as xilanases não atuam como agente branqueador ou deslignificador propriamente dito, seu desempenho proporciona maior facilidade de branqueamento da polpa nos estágios posteriores (LOMBARDI, 2013).

O clareamento da polpa Kraft utilizando xilanases, contribui para a diminuição do uso de cloro e, conseqüentemente, diminuindo a poluição ambiental causada pelos organoclorados e dioxinas (BUCHERT *et al.*, 1997. SUURNAKKI *et al.*, 1996, DUARTE *et al.*, 2000), que são substâncias tóxicas e carcinogênicas (VIIKARI *et al.*, 1994). No processo de produção da polpa celulósica Kraft, o setor de branqueamento é o maior gerador de efluentes, representando até 80% do efluente total da fábrica (BORGES, 2010). Em processos totalmente livres de reagentes clorados, as xilanases aumentam o

brilho e a resistência do papel, e também diminuem a quantidade de reagentes químicos necessários (BUCHERT *et al.*, 1997; SUURNAKKI *et al.*, 1996), melhorando assim a qualidade dos efluentes gerados.

Segundo Manoir *et al.* (1991) e Damaso *et al.* (2002), estudos comprovam que o uso de xilanases no processo de biobranqueamento reduziu cerca de 20-30% do uso de cloro, diminuindo também entre 15-20% a taxa de adsorção destes compostos recalcitrantes em efluentes.

Khandeparkar e Bhosle (2007) utilizando xilanases no processo de branqueamento de polpa kraft, observaram uma economia de 29% de compostos clorados, e não observaram diferença significativa na viscosidade da polpa, além de um ganho de 9,6% de alvura, quando comparado ao mesmo processo sem adição das xilanases.

Xilanases podem ainda ser aplicadas para modificar a polpa na formação do papel, reduzindo o número kappa, melhorando a alvura e resistência à tração da polpa (BORGES, 2010), ou ainda serem utilizadas no processo de reciclagem do papel (BIELY *et al.*, 1997).

Thakur *et al.* (2012) estudando a ação de xilanases na polpa kraft de fibra curta, observou uma redução do índice de arrebetamento de 3,2% da fibra. No entanto, para maior eficiência das xilanases, deve-se trabalhar com extratos enzimáticos resistentes à alcalinidade e à alta temperatura, e totalmente livres de celulasas (KULKARNI *et al.*, 1999; KHANDEPARKAR e BHOSLE, 2007; LOMBARDI, 2013).

2.4. Aplicação de xilanases na produção de biocombustível

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo a cana plantada para fins de produção de açúcar e álcool (GONÇALVES *et al.*, 2005). Resíduos agroindustriais como o bagaço da cana-de-açúcar, farelo de trigo, palha de arroz e de milho têm despertado a atenção por ser uma fonte barata de energia.

Segundo ainda 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.

Hemicelulose e celulose representam mais de 50% do peso seco destes resíduos e podem ser convertidos em açúcares solúveis, quer por hidrólise ácida ou enzimática. Deste modo, eles podem ser usados como uma fonte de energia renovável, principalmente para produção de etanol (SILVA *et al.*, 2005; OGEDA e PETRI, 2010).

A conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis produz o etanol de segunda geração (OGEDA e PETRI, 2010), já o etanol de primeira geração produzido no Brasil é obtido através da fermentação do caldo extraído da cana-de-açúcar (BUCKERIDGE *et al.*, 2012).

A primeira etapa na conversão da biomassa a etanol é a redução do tamanho das partículas, como a moagem, seguido do pré-tratamento.

O pré-tratamento é crucial antes da hidrólise enzimática. Vários pré-tratamentos já estão disponíveis para hidrolisar e separar celulose e hemicelulose da lignina. Estes incluem explosão a vapor, tratamento com ácido diluído, tratamento com ácido concentrado, tratamento alcalino, tratamento com SO₂, tratamento com peróxido de hidrogênio, explosão da fibra com amônia e tratamentos com solventes orgânicos (SILVA *et al.*, 2005; CARVALHEIRO *et al.* 2008).

Após o pré-tratamento, a biomassa é submetida à ação de enzimas que vão hidrolisar a celulose e a hemicelulose em moléculas menores. Tal processo é conhecido como sacarificação e é muito importante para que os microrganismos consigam realizar a fermentação.

As xilanases também têm sido empregadas na produção de etanol a partir da batata-doce, a fim de se obter a viscosidade adequada ao processo, de modo que a hemicelulose é degradada e convertida em açúcares fermentáveis (ZHANG *et al.*, 2010).

A xilose produzida pela ação das xilanases pode ser convertida a etanol por meio de fermentação, seja por microrganismos selvagens ou geneticamente modificados. Fungos filamentosos como *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor pusillus* e leveduras como a *Pichia stipidis* são capazes de fermentar xilose a etanol (FALKOSKI *et al.*, 2011). Estudos recentes têm utilizado a xilose, obtida da hidrólise da hemicelulose, para a produção de biogás (TOLEDO, 2012).

Assim, a produção de bioetanol a partir de resíduos agrícolas é uma alternativa apropriada, em vista do esgotamento dos combustíveis fósseis

(ZHANG *et al.*, 2011), diminuindo a dependência por recursos não renováveis e a redução das emissões de gases de efeito estufa. No entanto, um dos principais desafios para tornar o processo de produção de etanol de segunda geração viável economicamente, concentra-se na produção, a baixo custo, de enzimas que sejam eficientes e adequadas para uso na hidrólise da celulose e hemicelulose.

2.5 - *Chrysoporthe cubensis*

Chrysoporthe cubensis- (Bruner) Gryzenhout & M.J. Wingf. - é um importante patógeno que pertence à família Cryphonectriaceae. É conhecido por causar cancos nos troncos das árvores, principalmente espécies de eucalipto, que reduzem o crescimento e pode levar à sua ruptura ou morte (ALFENAS *et al.*, 2009; GRYZENHOUT *et al.*, 2010).

O cancro é um sintoma caracterizado por lesões necróticas, deprimidas, mais frequentes nos tecidos corticais de caules, raízes e tubérculos. Eventualmente, este tipo de sintoma é observado em folhas e frutos. A doença é epidemiologicamente importante em regiões em que a temperatura média é $\geq 23^{\circ}\text{C}$ e a queda anual de chuva ≥ 1200 mm (GUIMARÃES *et al.*, 2010), estando presente em diversas partes do mundo (GRYZENHOUT *et al.*, 2010). Estudos sugerem que *C. cubensis* pode ser nativo da América do Sul e sudeste da Ásia, e que, provavelmente, foi introduzido na África.

Fungos do gênero *Chrysoporthe spp.* apresentam micélio branco com manchas amarronzadas e borda mais clara. São de crescimento rápido, cobrindo uma placa de 90 mm em 7 dias em uma temperatura ótima de 30°C . Estruturas de frutificação são produzidas em cultura primária, mas raramente após subcultura (HODGES *et al.*, 1979).

Fungos são os principais produtores de hemicelulases, como as xilanases, por exemplo. Em estudo prévio feito por nosso grupo de pesquisa, descobriu-se que o fungo da espécie *C. cubensis* secreta enzimas lignocelulolíticas que tem apresentado atividade promissora e potencial para aplicação em processos de sacarificação de biomassa (FALKOSKI *et al.*, 2011). Falkoski e colaboradores (2013) ainda demonstraram que as xilanases presentes no coquetel

lignocelulolítico do fungo *C. cubensis* apresentam alta termoestabilidade, característica que é muito interessante para o setor industrial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no laboratório de Análises Bioquímicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), e no laboratório de Enzimologia Aplicada, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

3.1. Materiais

Glicose, albumina sérica bovina (BSA), *Coomassie Brilliant Blue* G-250, Vermelho Congo, dodecil sulfato de sódio (SDS), TEMED, Bis/acrilamida, DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), meio PDA, extrato de levedura, CMC, xilana *birchwood*, xilana *beechwood*, xilana *oat spelt*, *p*-nitrofenil- β -xilopiranosídeo (*p*-NP- β Xil) e placa de sílica gel para cromatografia em camada delgada-TLC foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Nitrato de prata e tiosulfato de sódio foram obtidos da Merck S. A. Indústria Química (São Paulo, Brasil).

Os padrões xilose, xilotriose e xilotetraose foram obtidos da Megazyme (Bray, Co. Wicklow, Ireland).

O marcador molecular para gel foi obtido da Thermo Scientific (Waltham, MA, USA).

Da GE Healthcare (Uppsala, Sweden) foram obtidas as colunas Q-Sepharose (5x5 mL) e Sephacryl S-200 (16/60).

Da Genencor International Inc. (Rochester, NY, USA) foi obtido o coquetel comercial de celulasas Multifect® CL.

Da Doles (Goiânia, GO, Brasil) foi obtido o kit para determinação da concentração de glicose.

Farelo de trigo (Pró Vida) foi obtido do comércio local e o bagaço de cana-de-açúcar da Usina Jatiboca, Urucânia, MG.

Os demais reagentes utilizados para a execução deste trabalho apresentavam procedência e grau de pureza analítica.

3.2. Cultivo do fungo *Chrysosporthe cubensis* e produção de xilanases

O fungo *C. cubensis* foi cedido pelo Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

O fungo foi cultivado em placa contendo meio PDA e mantido a 28°C em incubadora tipo BOD por 5 dias. Após esse período, foi transferido para geladeira e repicado periodicamente.

Para a produção do extrato enzimático, primeiramente, o inóculo foi obtido por fermentação submersa em *Erlenmeyer* de 250 mL, contendo 100 mL de meio mineral com a seguinte composição: glicose (10,0 g/L), NH_4NO_3 (1,0 g/L), KH_2PO_4 (1,0 g/L), MgSO_4 (0,5 g/L) e extrato de levedura (2,0 g/L). Para cada 100 mL de meio, foram adicionados 10 discos do fungo *C. cubensis* crescido em placa PDA. A fermentação submersa foi realizada em *shaker* durante 5 dias, a 28°C e 150 rpm.

Em seguida, 8 mL do inóculo foram adicionados a 37,5 g de mistura úmida em cada *Erlenmeyer* para a fermentação em estado sólido. Farelo de trigo foi utilizado como fonte de carbono, mantendo a umidade final de 60%. A fermentação foi realizada em *Erlenmeyer* de 125 mL contendo: NH_4NO_3 (1,0 g/L), KH_2PO_4 (1,5 g/L), MgSO_4 (0,5 g/L), CuSO_4 (0,25 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L) e os seguintes elementos traços: MnCl_2 (0,1 mg/L), H_3BO_4 (0,75 mg/L), Na_2MoO_4 (0,02 mg/L), FeCl_3 (1,0 mg/L) e ZnSO_4 (3,5 mg/L). A fermentação foi mantida em incubadora tipo BOD a 28°C por 7 dias.

Para a obtenção do extrato enzimático, foi adicionado tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5 na proporção 10:1 (tampão/farelo de trigo seco) e agitado em *shaker* a 150 rpm/60 min. A mistura foi filtrada com filtro de nylon e centrifugada a 15000g/10 min a 4°C. O sobrenadante, que é o extrato enzimático bruto, foi armazenado em freezer a -20°C.

3.3. Purificação

3.3.1. Cromatografia de troca iônica

Para a purificação das xilanases foram utilizadas cromatografias líquidas, em sistema *Fast Protein Liquid Chromatography*- FPLC, ÄKTA system (GE).

A coluna trocadora de ânions Q-Sepharose (5x5 mL) foi previamente equilibrada com 40 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Em seguida, foram aplicados 5 mL do extrato enzimático bruto e 40 mL do tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5,0, para eluição das proteínas que não se ligaram à coluna. Para eluir as proteínas aderidas à coluna, foram utilizados 40 mL de gradiente salino linear (0,0 a 1,0 M) de NaCl. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 4 mL/min, pressão de 0,3 MPa e frações de 2,5 mL foram coletadas em cada tubo. As frações com atividade de xilanase foram reunidas e submetidas à cromatografia de exclusão molecular.

3.3.2. Cromatografia de exclusão molecular

A coluna Sephacryl S-200 (16/60) foi previamente equilibrada com 60 mL de tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,0. Em seguida, foram aplicados 3 mL de amostra proveniente da cromatografia de troca iônica, 130 mL do tampão acetato de sódio 25 mM e pH 5,0 para a eluição das proteínas. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 1,0 mL/min e 0,15 MPa de pressão. Frações de 3 mL foram coletadas em cada tubo. A concentração de proteína e a atividade enzimática foram determinadas para as frações coletadas.

3.4. Ensaios enzimáticos

3.4.1. Determinação da atividade xilanásica

A atividade das xilanases foi determinada pela dosagem de açúcar redutor, como descrito por Miller (1956), usando glicose como padrão. A reação foi

preparada da seguinte forma: 400 μ L de xilana *birchwood* 1,25% (p/v) e 100 μ L de enzima, diluído quando necessário em tampão acetato de sódio 100 mM e pH 5. A reação foi incubada em banho-maria a 50°C durante 15 minutos e paralisada com a adição de 500 μ L de reagente DNS. A reação foi mantida em banho fervente por 5 minutos e, em seguida, adicionado 1 mL de água destilada. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro Multiskan GO Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) e convertida a μ moles de açúcar redutor, através de uma curva padrão construída utilizando de 0,3 a 1,9 μ moles de glicose, a partir de uma solução estoque de concentração 1 mg/mL.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μ mol de açúcar por minuto nas condições padrões do ensaio.

3.4.2. Determinação da atividade de endoglicanases

A atividade de endoglicanase foi determinada pelo método de Miller (1956). A reação foi preparada da seguinte forma: 400 μ L de carboximetilcelulose (CMC) 1% e 100 μ L de enzima, diluído 5 vezes em tampão acetato de sódio 100 mM e pH 5. A reação foi incubada em banho-maria a 50°C durante 15 minutos e paralisada com a adição de 500 μ L de reagente DNS. A reação foi mantida em banho fervente por 5 minutos e, em seguida, adicionado 1 mL de água destilada. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 540 nm e convertida a μ moles de açúcar redutor, através de uma curva padrão construída utilizando de 0,3 a 1,9 μ moles de glicose, a partir de uma solução estoque de concentração 1 mg/mL.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μ mol de açúcar por minuto nas condições padrões do ensaio.

3.4.3. Determinação da atividade de β -xilosidases

A atividade β -xilosidase foi determinada utilizando o substrato p-NP- β Xil. A reação foi conduzida da seguinte forma: 125 μ L de solução 4 mM de p-NP- β Xil

foram adicionados a 375 μL de enzima e incubado a 50°C por 15 minutos. A reação foi paralisada com a adição de 500 μL de carbonato de sódio 0,5 M. Os valores de absorbância obtidos a 410 nm foram transformados em μmoles de p-NP, utilizando uma curva padrão obtida com 0 – 1,0 μmoles de p-NP a partir de uma solução estoque de concentração 2 $\mu\text{moles/mL}$.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir 1 μmol de p-NP por minuto, nas condições padrões do ensaio.

3.5. Determinação de proteína total

A concentração de proteínas nas diversas preparações foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). O preparo do reagente de Bradford (5X) foi feito da seguinte maneira: 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL de etanol 95 % (v/v) e 100 mL de ácido fosfórico 85 % (v/v). Após solubilização, o volume foi completado para 200 mL, agitado por 30 minutos e filtrado em papel Whatman nº1.

Para o ensaio, foram utilizados 200 μL de extrato enzimático, diluído quando necessário, 600 μL de água destilada e 200 μL de reagente de Bradford 5X. Após 15 minutos de reação em temperatura ambiente, os valores de absorbância foram tomados a 595 nm e convertidos em valores de massa proteica através de uma curva padrão variando entre 2,0 a 28,0 μg de proteína, utilizando-se uma solução de BSA 0,2 mg/mL.

3.6. Zimograma e eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970), com algumas modificações.

Após a corrida, o gel foi retirado das placas e fixado em metanol, ácido acético e água (50:12:38; v/v) por 40 min. Em seguida, lavado três vezes com etanol 50% por 10 min cada, seguido por uma lavagem com tiosulfato de sódio

0,02% (p/v) por 1 min e imediatamente com água destilada, 3 vezes, por 10 segundos cada. O gel foi incubado durante 20 minutos em solução de nitrato de prata 0,2% (p/v) com 37 μ L de formaldeído 37% (v/v). Após coloração, o gel foi lavado com água e revelado com solução de carbonato de sódio 4% (p/v), 2 mL de tiosulfato de sódio 0,02% (p/v) e 50 μ L de formaldeído 37% (v/v). A reação foi paralisada com 3 mL de ácido acético glacial PA.

A massa molecular (MM) das xilanases purificadas foi estimada utilizando a eletroforese em gel de poliacrilamida (12,0%) em condições desnaturantes. Os marcadores de massa molecular utilizados foram os da Thermo Scientific (Waltham, MA, USA), uma mistura de 14 proteínas altamente purificadas, já com suas massas moleculares conhecidas e variando entre 200 a 10 kDa. A massa molecular das xilanases foi estimada por meio de uma curva padrão que correlaciona a distância em centímetros percorrida no gel pelas proteínas, no eixo X, e o logaritmo das massas moleculares, no eixo Y.

Para o zimograma, xilana *birchwood* 1,25% (p/v) foi adicionada ao gel de separação, a concentração final do gel foi de 10%. O gel foi realizado em condições desnaturante, com SDS 10%, e não redutora, sem β -mercaptoetanol. Após a corrida, o gel foi incubado por 30 min em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5 e contendo isopropanol 20%. Em seguida, equilibrado em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5 por 30 min e por mais 15 min em banho-maria a 50°C. O zimograma foi corado com Vermelho Congo 0,1% (p/v) por 15 min e descorado com solução NaCl 1M para evidenciar as bandas.

Ambos foram realizados em sistema vertical de gel Mini-Protean II system (Bio-Rad, California, USA) a 100V.

3.7. Caracterização enzimática

3.7.1. Determinação do pH e da temperatura ótima de reação

O efeito do pH na atividade de xilanase das enzimas purificadas foi avaliado realizando a dosagem de açúcares redutores, como descrito no item 3.4.1, na presença de substrato diluído em tampão McIlvaine (McIlvaine, 1921), variando a faixa de pH de 2,0 a 8,0.

A determinação do efeito da temperatura sobre a atividade de xilanase foi realizada como descrito no item 3.4.1, exceto que o ensaio foi realizado em temperaturas variando de 20 a 90°C.

3.7.2. Determinação da estabilidade térmica e da estabilidade em diferentes valores de pH

A estabilidade térmica das xilanases purificadas foi avaliada através da pré-incubação das enzimas na ausência de substrato a 50, 60, 70 e 80°C por 30 min, 1, 2, 6, 12, 24 e 36 horas. Após o período de pré-incubação, alíquotas foram retiradas e a atividade enzimática determinada de acordo com o ensaio padrão. Os valores de meia-vida ou $T_{1/2}$ em diferentes temperaturas foram estimados por meio de curvas que correlacionam a porcentagem da atividade residual e o tempo de incubação, utilizando o programa Sigma Plot, versão 10.0.

A estabilidade em diferentes valores de pH foi avaliada na faixa de 2,0 a 8,0. As amostras foram diluídas em tampão McIlvaine no pH desejado na proporção de 1:1, enzima:tampão (v/v). Após 30 min de pré-incubação a 5°C, a atividade xilanásica residual foi determinada, conforme descrito no item 3.4.1, exceto que o ensaio foi realizado em pH 4.

3.7.3. Especificidade das xilanases por diferentes substratos

A atividade das xilanases purificadas frente a diversos substratos foi avaliada. Os substratos escolhidos foram: as xilanas *birchwood*, *beechwood* e *oat spelt* 1,25% (p/v); CMC 1,0% (p/v) e p-NP- β Xil 4 mM. As atividades foram determinadas de acordo com os itens 3.4.1; 3.4.2. e 3.4.3, respectivamente.

3.7.4 Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$

Os parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$ das xilanases purificadas foram estimados utilizando o programa Sigma Plot, versão 10.0. Para tanto, as enzimas

foram incubadas em concentrações crescentes (0,5 a 10,0 mg/mL) de xilana *oat spelt* e a atividade foi determinada como descrito anteriormente no item 3.4.1.

3.8. Efeito sinérgico entre as xilanases do fungo *C. cubensis*

O efeito sinérgico entre as xilanases do fungo *C. cubensis* foi avaliado com base no cálculo de atividade teórica conforme equação: (% enzima₁ x atividade₁) + (% enzima₂ x atividade₂). Esse valor teórico foi comparado com a atividade determinada de acordo com o item 3.4.1. A mesma quantidade de enzima em U/mL foi garantida para que não houvesse disparidades. O sinergismo foi expresso como porcentagem da atividade teórica.

3.9. Análise da composição dos produtos de hidrólise da xilana *oat spelt*

A composição dos produtos de hidrólise da xilana *oat spelt* 2% foi analisada em placa de sílica gel (Sigma-Aldrich) por cromatografia em camada delgada (TLC).

As misturas de reações continham: 150 µL das enzimas purificadas, 300 µL de solução de xilana *oat spelt* 2% (p/v) preparada em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4 na proporção 2:1 (solução de xilana/amostra de enzima). A reação foi incubada a 50°C por 12h, e posteriormente, 25 µL do produto de cada reação foram aplicados na placa. A cuba de vidro (15x15 cm) foi saturada com 100 mL da mistura n-propanol:ácido acético:água na proporção de 1:1:0,1 (v/v). Após eluição, os produtos da hidrólise foram visualizados com α-naftol 1% (p/v) em etanol absoluto contendo 10% de ácido fosfórico (v/v). A placa foi aquecida em estufa a 120°C por 10 minutos. Soluções de xilose, xilotriose e xilotetraose na concentração de 5 mg/mL foram usados como padrões.

3.10. Sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar

Primeiramente, o bagaço de cana-de-açúcar, obtido da usina Jatiboca, Urucânia/ MG, foi pré-tratado com solução 1% de NaOH durante 60 minutos em autoclave a 120°C. As frações líquida e sólida do material pré-tratado foram separadas usando funil de *Buchner* com papel filtro. Em seguida, a fração sólida foi lavada com água destilada e estocada a -20°C em recipiente selado hermeticamente.

A sacarificação foi realizada em *Erlenmeyer* de 125 mL contendo bagaço a 2% (p/v) em 15 mL de tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5. Tetraciclina (40 µg/mL) e azida (10 mM) foram adicionadas à reação para inibir a contaminação. A quantidade de enzima adicionada foi de 10 unidades de FPase do kit comercial Multifect® CL por grama de biomassa em cada reação. Quatro tratamentos foram testados. Um apenas com o coquetel comercial Multifect® CL, servindo como controle e três tratamentos onde o coquetel comercial foi suplementado com P1, P2 e P3 da troca iônica, separadamente. Nos tratamentos suplementados, foram adicionadas mais 10 U/mL de cada xilanase purificada.

A reação foi conduzida em *shaker* a 250 rpm, 50°C por 72 h. Amostras de 1,0 mL foram coletadas em diferentes intervalos de tempo e centrifugadas a 10000g por 5 min. O sobrenadante foi imediatamente congelado para análise.

A eficiência da hidrólise foi avaliada pela determinação de açúcares redutores totais, segundo Miller (1956), e pela estimativa da concentração de glicose usando o kit comercial Doles, cujo princípio se baseia na reação da enzima glicose oxidase.

3.11. Análise estatística dos dados

Os valores obtidos das atividades enzimáticas das xilanases em diferentes substratos foram analisados utilizando o software OriginPro 7.0, realizando análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey, ao nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Os cálculos rodados encontram-se no Anexo 1. O desvio padrão também foi calculado para todos os ensaios.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Purificação das xilanases do fungo *C. cubensis*

O extrato contendo as xilanases do fungo *C. cubensis* obtido após 7 dias de cultivo em meio sólido, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono, apresentou atividade de xilanase de 360 U/g de farelo de trigo. Por conter altos níveis de proteína e hemicelulose em sua composição, o farelo de trigo tem-se mostrado uma boa fonte para a indução de xilanases, quando comparado a outras fontes de carbono, como a polpa *Kraft* e a palha de milho. O farelo de trigo mostra-se também como uma boa fonte de carbono para a fermentação em estado sólido (SSF), quando comparada à fermentação submersa, por manter um balanço na proporção C/N adequado à SSF (FALKOSKI *et al.*, 2013).

Após a produção do extrato enzimático, o mesmo foi filtrado e submetido às etapas de purificação. As xilanases foram purificadas por cromatografia de troca iônica em coluna Q-Sepharose, seguida de cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl S-200. O resumo dos resultados obtidos em cada etapa de purificação está representado na Tabela 1.

Tabela 1 - Resumo dos resultados obtidos em cada etapa de purificação das xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis*, quando cultivado em meio sólido e utilizando farelo de trigo como fonte de carbono.

Etapas	Atv. Enzima* (U)	Proteína* (mg)	Atv. Específica (U/mg)	Fator purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	49.305,0	2.220,0	22,2	1,0	100,0
Troca iônica					
P1	15.900,0	225,0	70,7	3,2	32,3
P2	24.255,0	1.800,0	13,5	0,6	49,2
P3	1.657,5	105,0	15,8	0,7	3,4
Gel filtração					
P2	6.615,0	256,5	25,8	1,2	13,4
P3	630,0	21,0	30,0	1,4	1,3

*Valores calculados para um total de 1,5L de extrato bruto produzido.

Na primeira etapa de purificação, o perfil cromatográfico revelou a presença de três picos de atividade de xilanase, sendo que o primeiro pico foi eluído antes do gradiente salino e os outros dois, durante o gradiente. Os picos de atividade obtidos a partir da cromatografia de troca iônica foram denominados P1, P2 e P3. O perfil desta cromatografia está representado na Figura 2.

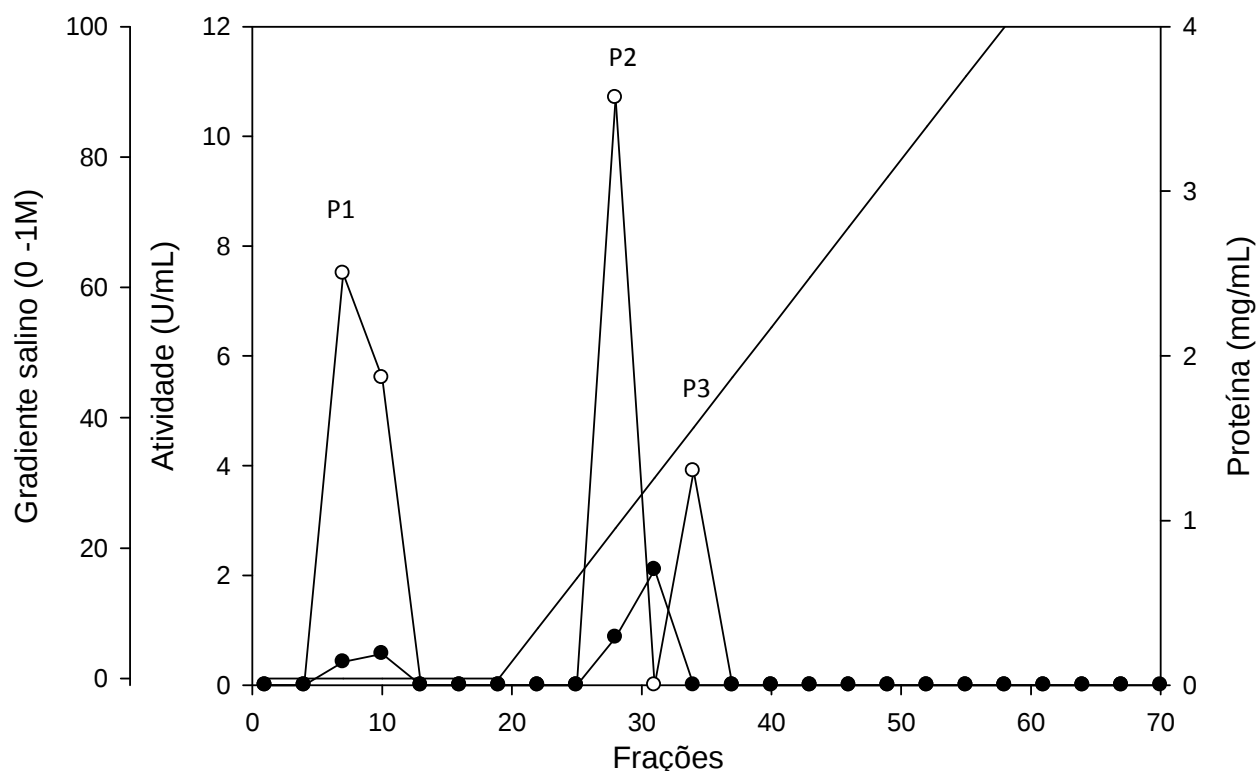


Figura 2 – Perfil cromatográfico obtido após a aplicação do extrato enzimático bruto do fungo *Chrysosporthe cubensis* em coluna de troca iônica Q-Sepharose. Eluição das proteínas (●), atividade xilanásica (○) e gradiente salino de NaCl (---).

A coluna Q-Sepharose é uma coluna de troca aniônica, sendo assim, as proteínas que não aderiram à coluna são catiônicas, e as que se ligaram, aniônicas. As xilanases presentes em P1 são de caráter catiônico, já P2 e P3 que foram eluídas com gradiente salino de aproximadamente 0,3 M e 0,4 M de NaCl, respectivamente, apresentam caráter aniônico.

De acordo com os dados obtidos na Tabela 1, observamos que ao final da primeira etapa de purificação, P1 obteve um fator de purificação de 3,2 vezes e rendimento igual a 32,3%. Já P2 e P3 tiveram em fator de purificação de 0,6 e 0,7, respectivamente, devido a maior parte das proteínas serem eluídas em um pico que sobrepõe aos picos de atividade P2 e P3.

Para conseguir amostras com maior grau de pureza, P2 e P3 foram submetidas à cromatografia de gel filtração e ao final deste processo, P2 e P3 apresentaram um fator de purificação de 1,2 e 1,4 vezes e rendimento igual a 13,4 e 1,3%, respectivamente.

Em geral, pode-se dizer que foram obtidos bons resultados de purificação para as xilanases de *C. cubensis*. A troca iônica foi eficiente para purificar P1 e separá-la de P2 e P3. A utilização da cromatografia de troca iônica já foi descrita por diversos autores, Monti R. *et al* (2003), Querido *et al.*, (2006), Kamble e Jadhav (2012), como um dos passos de purificação de xilanases, e por isso, foi adotada neste trabalho, já que também foi relatada sua eficiência quando comparada às outras cromatografias.

O uso da cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sephadex A-50 foi relatada por Vikramathithan *et al.*, (2012) em seu trabalho sobre purificação de xilanases de *Opuntia vulgaris*, obtendo um fator de purificação de 12,8 vezes para T₇₀ e de 15,3 para T₉₀. O rendimento foi de 15% para T₇₀ e de 17,3% para T₉₀. Apesar de ter obtido um fator de purificação de 3,2 para P1, o rendimento de 32,2% foi superior ao encontrado por Vikramathithan e colaboradores (2012).

P2 que obteve um rendimento final de 13,4% está de acordo com valores já descritos na literatura, onde a cromatografia de troca iônica em coluna Resource-Q, seguida de cromatografia de gel filtração em coluna Superdex™ 200 HR 10/30, foi relatada por Chi *et al.*, (2012) para a purificação de uma xilanase de *Bacillus sp.* MX47, obtendo um fator de purificação de 29,8 vezes e rendimento igual a 6,8%.

E por fim, P3 que obteve um rendimento final de 1,3 não pode ser considerado pequeno, visto que na primeira vez que apareceu na troca iônica já apresentava um rendimento de 3,4%, não perdendo muita atividade de uma etapa para a outra. O rendimento final de 1,47% foi obtido após a purificação de uma xilanase de *Emericella nidulans* por cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose, seguida de cromatografia de gel filtração em coluna Sephadex G-50

por Silva *et al.*, (2014), indicando que existem rendimentos próximos aos observados para P3 de *C. cubensis* já relatados na literatura.

O zimograma foi realizado para confirmar a presença de isoformas de xilanases no extrato enzimático do fungo *C. cubensis* (Figura 3). A análise do zimograma revelou a presença de quatro bandas no gel, sugerindo a existência de pelo menos quatro xilanases do fungo *C. cubensis*. A análise do zimograma ainda pode comprovar que as quatro isoformas foram separadas em três diferentes picos de atividade, que correspondem a diferentes xilanases, após a cromatografia de troca iônica.

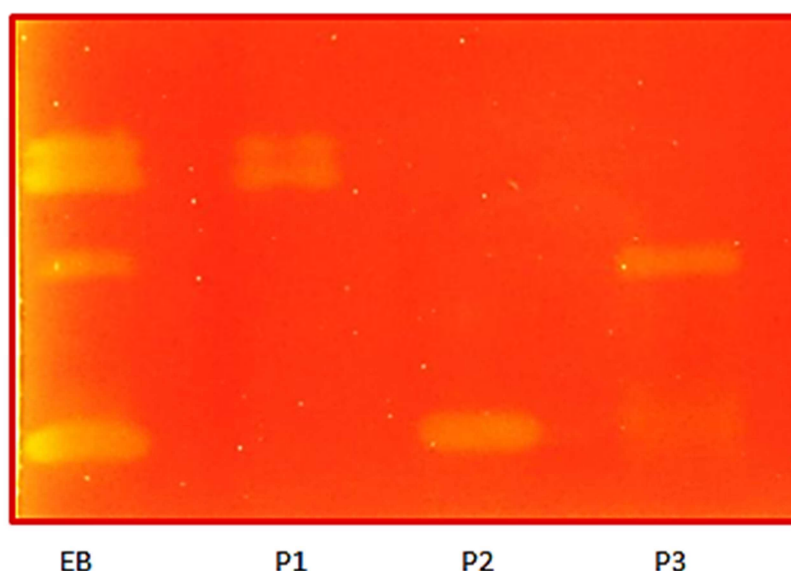


Figura 3 - Zimograma realizado em gel de poliacrilamida 10%, contendo xilana *birchwood* no gel de separação. Corado com Vermelho Congo 0,1% (p/v). EB - extrato bruto. P1, P2 e P3 - picos de atividade xilanásica obtidos após a cromatografia de troca iônica.

As frações que continham atividade de xilanase em cada pico foram reunidas e posteriormente submetidas à cromatografia de exclusão molecular. O perfil dessa cromatografia está representado na Figura 4.

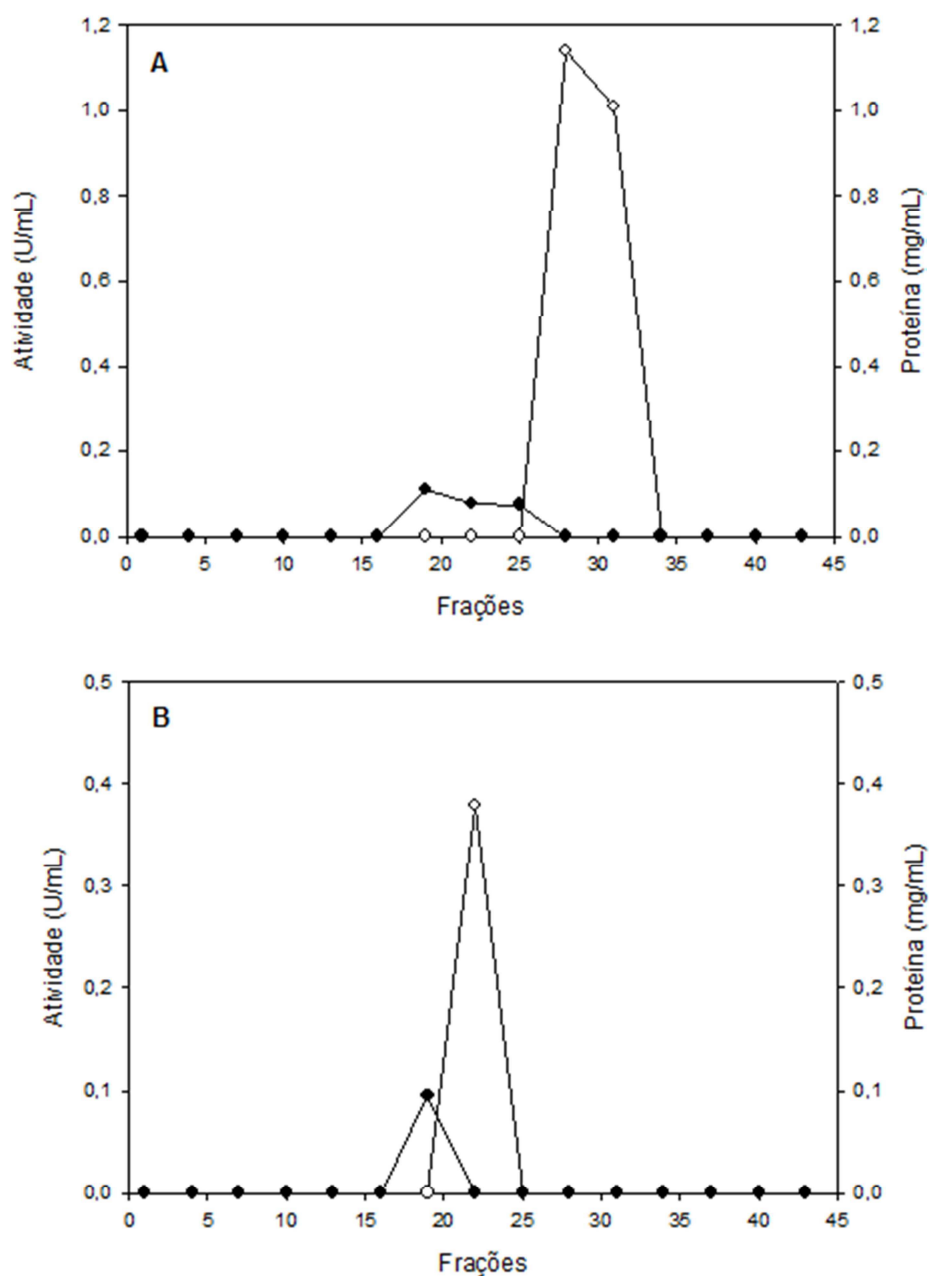


Figura 4 - Perfil cromatográfico obtido após a aplicação da amostra proveniente da troca iônica em coluna Sephacryl S-200. Eluição das proteínas (●), atividade xilanásica (○). A e B referem-se a P2 e P3, respectivamente.

Ao analisar a Figura 4, observamos que P3 foi eluída primeiro da coluna de Sephacryl S-200 que pico P2, sugerindo que a xilanase P3 apresenta massa molecular maior do que a xilanase P2.

O perfil de eluição da segunda etapa de purificação, exclusão molecular em Sephacryl S200, apresentou um só pico de atividade, tanto para P2 quanto para

P3, e um conjunto de proteínas "indesejáveis" foi eliminado. As frações com atividade foram reunidas e armazenadas em freezer -20°C para a caracterização enzimática.

4.2. Determinação do grau de pureza e da massa molecular das xilanases do fungo *C. cubensis*

As frações referentes a cada etapa de purificação foram submetidas à análise eletroforética em gel de poliacrilamida 12%. O resultado pode ser visualizado nas Figuras 5 e 6.

Com base no SDS-PAGE obtido, observa-se que o número de bandas proteicas diminuiu consideravelmente do extrato bruto para as etapas finais do processo de purificação, linha 3, 6 e 7 (Figura 5), confirmando a eficácia do protocolo de purificação utilizado e validando a Tabela de purificação apresentada anteriormente (Tabela 1).

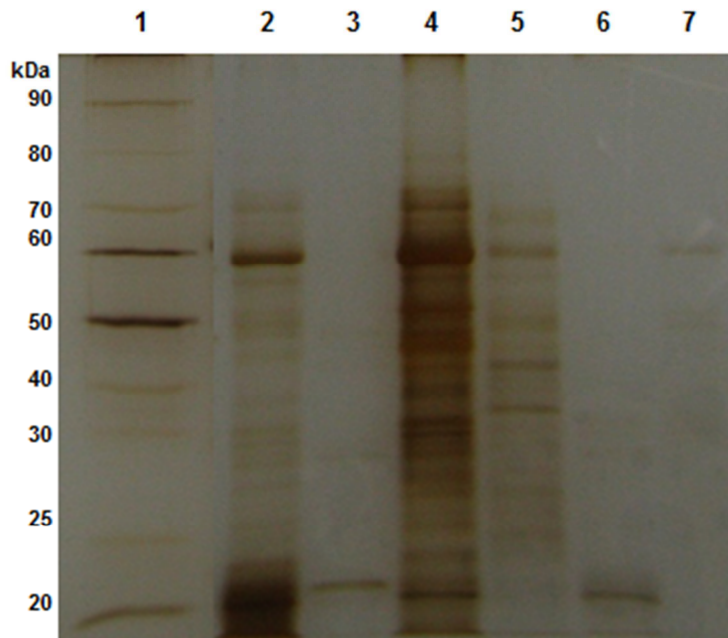


Figura 5 - Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12%) de amostras contendo xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis*, corado com prata. 1- marcadores de massa molecular. 2- extrato bruto. 3, 4 e 5- P1, P2 e P3 da troca iônica, respectivamente. 6 e 7- P2 e P3 da gel filtração.

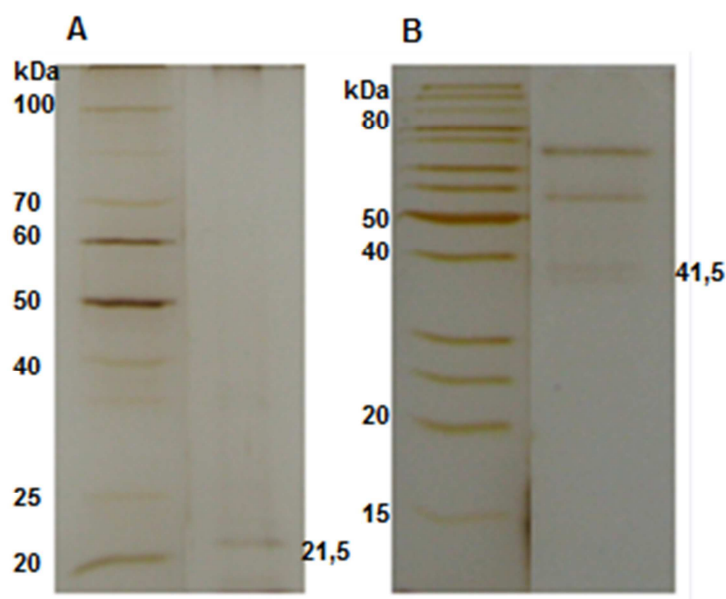


Figura 6 - Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12%) de amostras contendo xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis*, corado com prata. Em A, observa-se o marcador molecular e a fração P2 da gel filtração. Em B, observa-se o marcador molecular e a fração P3 da gel filtração.

A análise eletroforética revelou a presença de uma única banda para P2 (Figura 6A), demonstrando que o processo de purificação produziu uma amostra enzimática com alto grau de pureza. P3 também foi identificada no gel de SDS-PAGE conforme visualizado na Figura 6B. Já P1 não aparece no gel, sendo visualizada apenas por meio do zimograma.

A massa molecular das enzimas purificadas (P2 e P3) foram calculadas a partir da regressão linear obtida correlacionando-se o logarítmo das massas moleculares de proteínas padrão com a distância percorrida no gel SDS-PAGE (Figura 7). Para P2, que percorreu uma distância de 11,8 cm, o valor estimado foi de aproximadamente 21,5 kDa. Para P3, que percorreu uma distância de 6,3 cm, o valor estimado foi de aproximadamente 41,5 kDa.

A massa molecular das xilanases do extrato bruto do fungo *C. cubensis* já havia sido estimada por Falkoski *et al.* (2013), sendo 53,2 e 47,9 kDa as xilanases que correspondem a P1, 37,3 kDa a xilanase referente a P3 e 19,2 kDa a xilanase referente a P2. Deste modo, a massa molecular das xilanases purificadas está bem próxima da massa estimada por Falkoski *et al.* (2013).

De acordo com a massa molecular obtida, poderíamos inferir que P1 e P3 se adequariam à família 10 das glicosil-hidrolases, por serem xilanases maiores que 30 kDa. P2 por sua vez, se adequaria melhor à família 11 das glicosil-hidrolases, por ter massa molecular inferior a 30 kDa. Entretanto, para uma classificação exata quanto à família, seriam necessários mais estudos em relação ao mecanismo catalítico, sequências conservas de aminoácidos, da sequência primária e estrutura tridimensional das xilanases, entre outros.

Outro fato interessante é a proximidade da massa molecular das xilanases presentes em P1 (53,2 e 47,9 kDa), que poderia ser fruto de modificações pós-traducionais, como por exemplo, uma diferença no perfil de glicosilação, visto que xilanases da família 10 são, na maioria das vezes, glicosiladas (KULKARNI *et al.*, 1999).

A multiplicidade de formas também é comumente descrito para β - xilanases de fungos e bactérias, como um resultado do processamento do mRNA e de modificações pós-traducionais (LUCENA-NETO S. L., FERREIRA-FILHO E. X., 2004).

Sendo assim, as xilanases de *C. cubensis* estão dentro da faixa de massa molecular das xilanases já estudadas, que segundo Biely e colaboradores (1997), varia de 6 a 80 kDa.

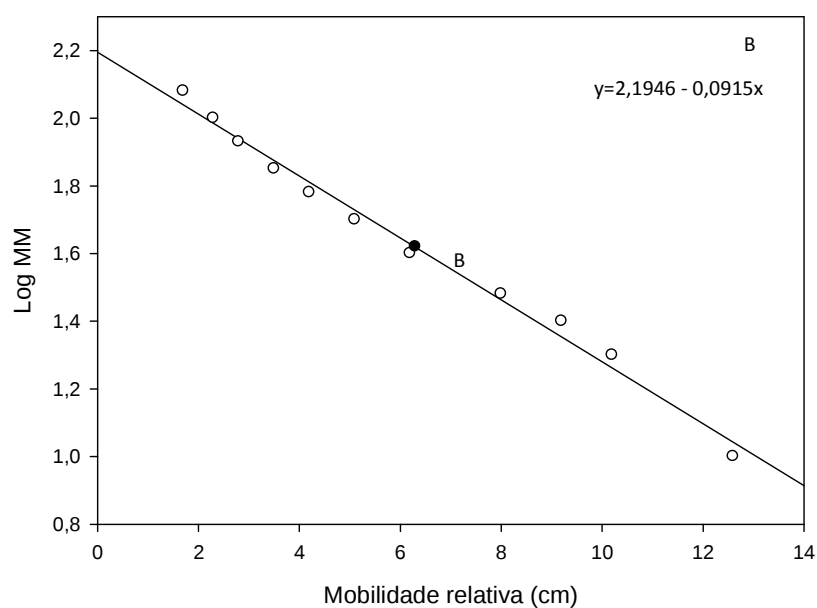
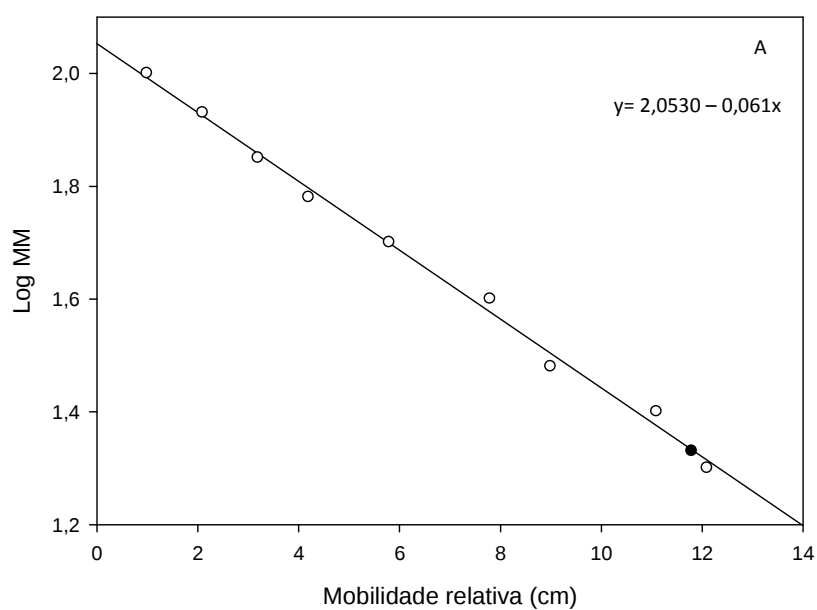


Figura 7 - Estimativas das massas moleculares das xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis*. Os coeficientes para as regressões foram calculados utilizando o programa Sigma Plot versão 10.0. Padrões de massa molecular (○); xilanases (●). A e B correspondem a P2 e P3, respectivamente.

4.3. Caracterização enzimática

Para a caracterização cinética e bioquímica das xilanases foram utilizadas as frações provenientes da cromatografia de troca iônica para P1 e as frações provenientes da cromatografia de gel filtração para P2 e P3.

4.3.1. Efeito do pH e da estabilidade em diferentes valores de pH

A atividade de xilanase das enzimas purificadas foram testadas na faixa de pH compreendida entre 2,0 e 8,0, na temperatura de 50°C, utilizando xilana *birchwood* como substrato (Figura 8). Foram encontradas atividades superiores a 60% na faixa de pH de 3,0 - 6,0 para P1 e de 2,0 - 4,5 para P2 e P3. A atividade ótima foi em pH 4,0 para P1 e em pH 3,0 para P2 e P3. As enzimas, P2 e P3, apresentaram pouca ou nenhuma atividade na faixa de pH entre 6,0 – 8,0. P1 já não apresentou atividade em pH igual a 8,0.

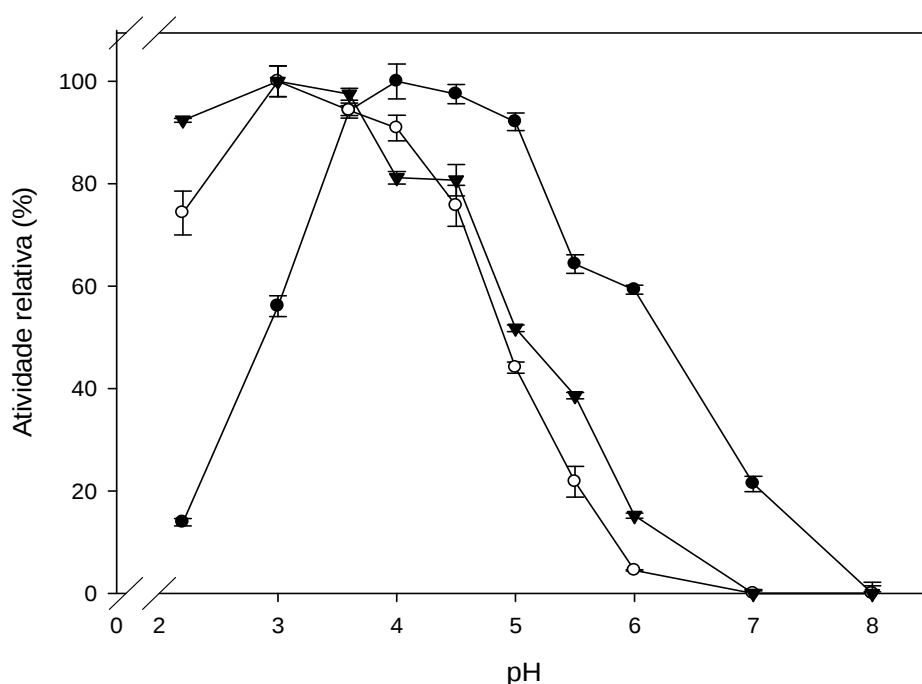


Figura 8 – Efeito da variação de pH na atividade das xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis*, onde (●) P1, (○) P2 e (▼) P3.

Valores de pH ótimo próximos aos encontrados para as xilanases de *C. cubensis* foram encontrados para a xilanase de *Penicillium glabrum*, que apresentou atividade máxima quando incubada em pH 3,0 (KNOB *et al.*, 2013) e para a xilanase do fungo *Penicillium expansum*, cuja atividade ótima foi em pH 5,5 (QUERIDO *et al.*, 2006). Já a xilanase de *Paenibacillus* sp. mostrou-se mais ativa na faixa de pH entre 4,0 e 8,0, mantendo mais de 80% de atividade quando incubada na faixa de pH de 5,0 a 7,0. A melhor atividade observada foi em pH igual a 6,0 (ZHENG *et al.*, 2014).

Segundo Knob *et al.*, (2013) e Zheng *et al.*, (2014), xilanases que apresentam maior desempenho em pH ácido são muito utilizadas em processos biotecnológicos como: produção de ração animal, na clarificação e maceração de sucos e vinhos, na indústria alimentícia e na conversão de bioenergia. Sendo assim, as xilanases purificadas a partir do extrato bruto de *C. cubensis* poderiam ser utilizadas para estas finalidades.

Na análise de estabilidade em diferentes valores de pH, foi observado que em geral, as xilanases conseguiram readquirir sua conformação nativa. As alterações estruturais provocadas pela variação de pH foram capazes de promover uma mudança na estrutura tridimensional das enzimas levando-as à desnaturação, porém as xilanases readquiriram sua conformação nativa quando expostas a pH 4 (Figura 9).

Observa-se ainda que mesmo em pH distantes do pH ótimo, as xilanases foram capazes de reassumirem sua conformação nativa, mostrando-se altamente estáveis quanto à variações de pH, apresentando mais de 80% de atividade quando pré-incubadas na faixa de pH de 2,0 a 8,0 durante 30 minutos.

Kamble e Jadhav (2012), estudando a xilanase de uma espécie de *Bacillus*, observaram que a enzima era completamente estável, mantendo 100% de atividade após 1h de incubação em valores de pH diferentes do ótimo.

A estabilidade em pH também foi verificada para uma xilanase de *Penicillium glabrum*. A enzima manteve-se estável quando incubada por 24 h em pH ácido, apresentando mais de 80% de atividade residual quando incubada na faixa de pH de 2,5 a 5,0 (KNOB *et al.*, 2013). Já a xilanase de *Paenibacillus* sp. mostrou-se estável apenas em valores de pH entre 4,0 e 7,0 (ZHENG *et al.*, 2014).

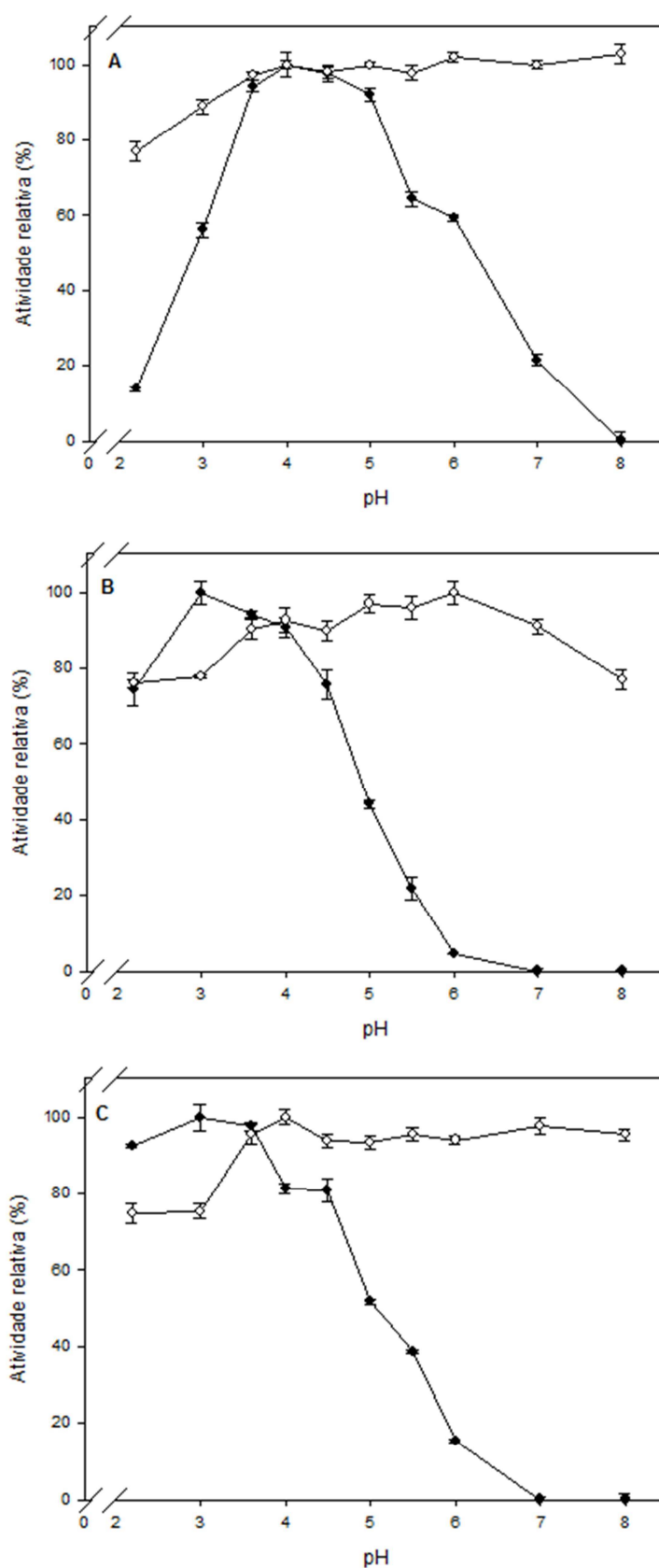


Figura 9- Efeito do pH sobre a estabilidade das xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis*, após 30 min de pré-incubação, onde (●) efeito do pH, (○) estabilidade. A, B e C correspondem a P1, P2 e P3, respectivamente.

4.3.2. Efeito da temperatura e análise da estabilidade térmica

A atividade xilanásica das enzimas purificadas foi determinada na faixa de temperatura entre 20 e 90°C, em pH 5, utilizando xilana *birchwood* como substrato (Figura 10).

Ao analisar o efeito da temperatura na atividade das xilanases do fungo *C. cubensis*, podemos observar que as enzimas possuem um comportamento diferente, e conseqüentemente, exibem atividade máxima em valores distintos de temperatura.

Para P1, foram encontradas atividades superiores a 80% na faixa de temperatura entre 50 e 70°C, a temperatura ótima foi de 60°C. Em temperaturas acima de 70°C foi observado um decréscimo acentuado na atividade de P1.

Para P2, as maiores atividades foram observadas entre 35 e 60°C, apresentando atividade superior a 80%, sendo a temperatura ótima de 55°C. Em temperaturas acima de 60°C foi observado um decréscimo acentuado na atividade de P2.

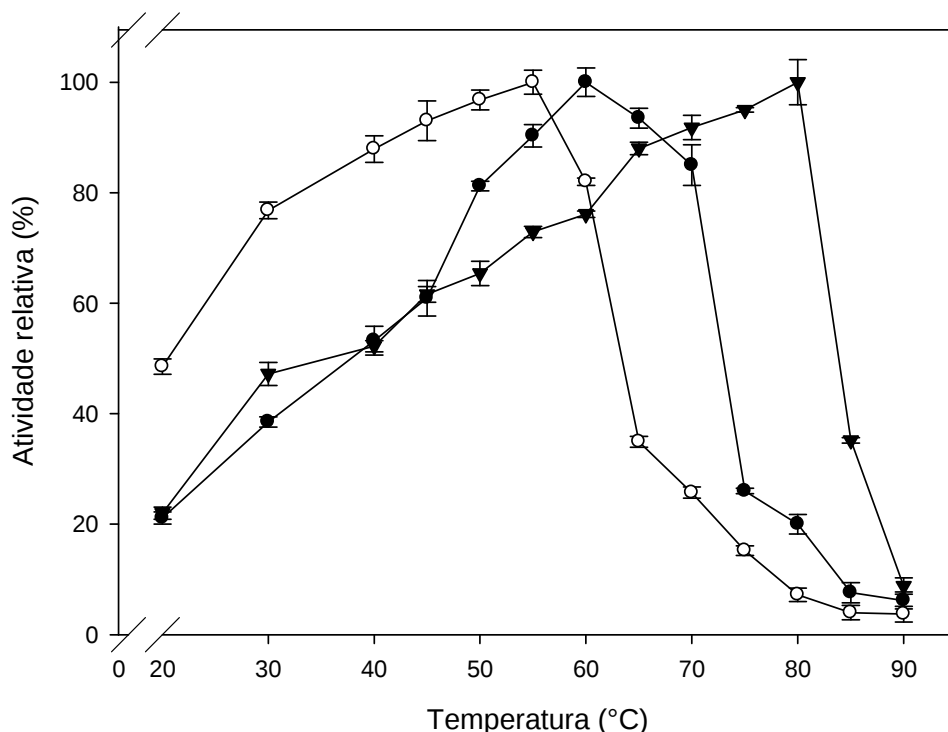


Figura 10 - Efeito da temperatura na atividade das xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis*, onde (●) P1, (○) P2 e (▼) P3.

Para P3, as maiores atividades foram observadas na faixa entre 65 e 80°C, apresentando atividade superior a 80%. A temperatura ótima foi de 80°C. A 85°C foi observado um decréscimo acentuado na atividade de P3.

Para a xilanase recombinante da bactéria termofílica *Geobacillus* sp. 7.1, a temperatura ótima observada foi de 75°C (CANAKCI *et al.*, 2012) e, de acordo com Taibi *et al.* (2012), a xilanase de *Actinomadura* sp. cepa Cpt20 apresentou temperatura ótima de 80°C.

Segundo Chi *et al.* (2012), a xilanase extracelular purificada da bactéria *Bacillus* sp. cepa MX47 apresentou atividade ótima a 40°C, enquanto a 50 e 60°C, a enzima exibiu, aproximadamente, 40% e 20% da atividade máxima, respectivamente

Valores de temperatura ótima próximos aos encontrados para as xilanases de *C. cubensis* foram descritos para a xilanase purificada do fungo *Fomitopsis pinicola*, que apresentou atividade ótima a 70°C (SHIN *et al.*, 2014) e para a xilanase de *Paenibacillus* sp. NF1 que foi a 60 °C (ZHENG *et al.*, 2014).

A termoestabilidade das xilanases do fungo *C. cubensis* também foi avaliada nas temperaturas de 50, 60, 70 e 80 °C como descrito no item 3.7.2.

A xilanase presente em P2 mostrou-se mais estável em relação à P1 quando incubada a 50°C (Figura 11), de modo que não foi detectada atividade significativa para P1 após 12 h de incubação. Por outro lado, após 12 h de incubação, P2 ainda mantinha cerca de 66% de atividade residual e após 24 h de incubação, esse valor era de aproximadamente 50%.

Para os ensaios de termoestabilidade realizados a 60 e 70°C para as xilanases P1 e P2, foi observado que após um curto intervalo de tempo, pouca ou nenhuma atividade era detectada, o que indica que estas xilanases apresentam uma maior instabilidade estrutural quando expostas a temperaturas mais elevadas. P1 perdeu mais de 80% de sua atividade quando incubada nessas temperaturas após o período de 1h, chegando a perder 90% de atividade após 2 h de incubação.

A xilanase presente em P3 apresentou um perfil mais distinto. Foi observado que esta enzima era capaz de manter-se estável por mais tempo quando incubada a temperaturas mais altas, o que de fato corrobora com seu valor de temperatura ótima. P3 manteve aproximadamente 62% de sua atividade residual após 6 h de incubação a 70°C, e ainda após 12 h, mantinha cerca de 32% de atividade. Em

temperatura de 60°C, a enzima perdeu apenas 30% de atividade após o período de 36 h de incubação. Na temperatura de 80°C, a enzima mostrou-se mais instável.

Zheng *et al.*, (2014) observaram que a xilanase purificada de *Paenibacillus* sp. NF1 era estável a temperaturas de 70 - 80°C. Após um período de pré-incubação de 180 minutos, a enzima exibia cerca de 40% de atividade a 70°C e 20% de atividade de a 80°C. A xilanase P3 de *C. cubensis* apresentou mais de 70% de atividade quando incubada a 70°C por 2 h, mostrando-se mais estável que a xilanase de *Paenibacillus* sp. NF1 quando incubada nesta temperatura.

Segundo Bruins e colaboradores (2001), xilanases comerciais como as Pulpzyme e Cartazyme são pouco termoestáveis, apresentando atividade ótima entre 50–60 °C e mantendo 50% de sua atividade por apenas 15 min a 55 °C.

Os valores de meia-vida das xilanases do fungo *C. cubensis* foram obtidos por meio de um ajuste dos dados obtidos nos experimentos de termoestabilidade a uma equação do tipo exponencial decadente ($y = a.e^{-b.x}$) utilizando o programa Sigma Plot 10.0, como descrito no item 3.7.2. Os valores obtidos encontram-se resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 - Resumo das temperaturas ótimas e meia-vida ($t_{1/2}$) para as xilanases purificadas de *Chrysosporthe cubensis*.

	T_{ótima} (°C)	t_{1/2} (h)
P1	60	2,7 (50°C)
P2	55	17,2 (50°C)
P3	80	6,4 (70°C)

Silva (2014) determinou o tempo de meia-vida para a xilanase purificada do fungo *Emericella nidulans*, os valores observados foram de 10 min quando incubado à temperatura de 50°C e de 7 min quando a 55°C. Os valores encontrados por Silva (2014) são muito inferiores aos encontrados para as xilanases do fungo *C. cubensis*, que apresentaram $t_{1/2}$ 16 e 103 vezes maiores, para P1 e P2, respectivamente, a 50°C. Um $t_{1/2}$ de 6,4 h a 70°C encontrado para P3 é uma característica interessante, indicando a necessidade de mais estudos sobre esta xilanase.

Sendo assim, podemos concluir que as xilanases do fungo *C. cubensis* são enzimas bastante termoestáveis e que podem ser aplicadas a processos industriais que exijam temperaturas em torno de 50 a 70°C, como por exemplo, na indústria alimentícia e de biocombustíveis. Para otimização dos resultados, seria mais viável trabalhar com P1 e P2 a uma faixa de temperatura compreendida entre 40 e 55°C e P3 variando de 50 a 70°C.

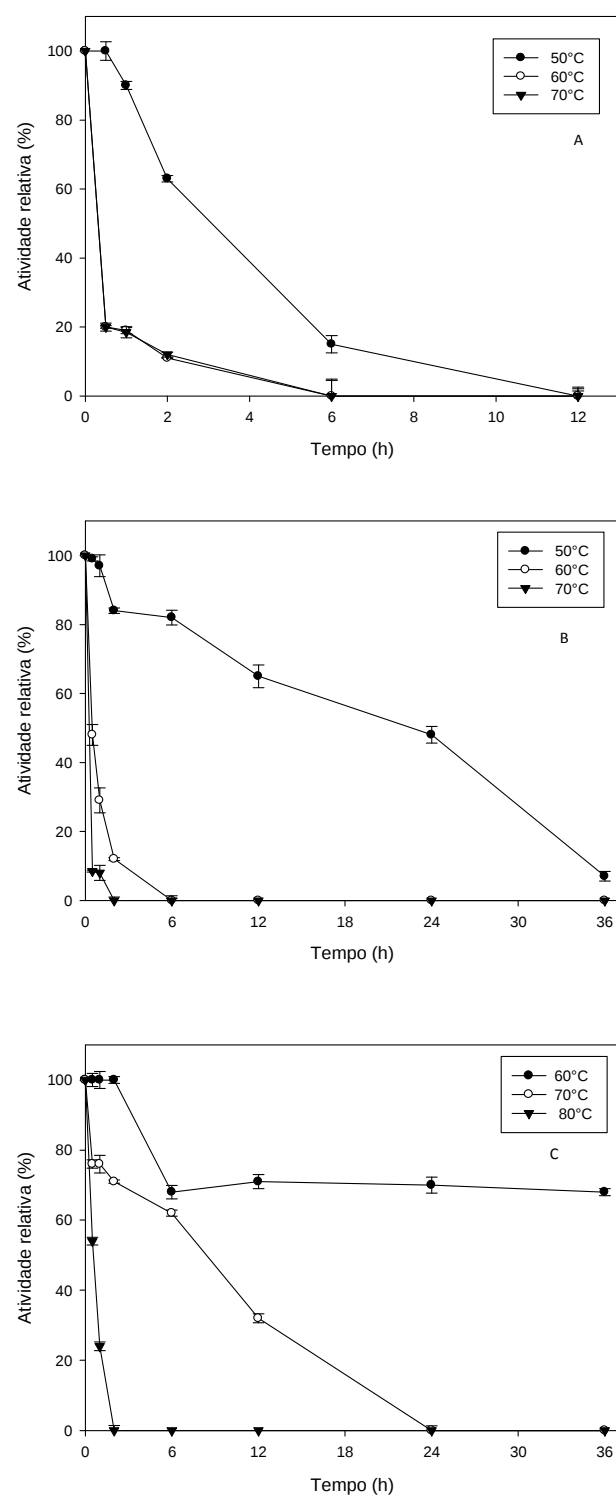


Figura 11 – Efeito da temperatura na estabilidade das xilanases purificadas de *Chrysosporthe cubensis*. A, B e C correspondem à P1, P2 e P3, respectivamente.

4.3.3. Especificidade das xilanases por diferentes substratos

As xilanases de *C. cubensis* foram avaliadas quanto à capacidade de hidrolisar diversos polímeros naturais e também alguns substratos sintéticos, como mostram as Figuras 12 e 13.

Os principais fatores que influenciam na taxa de hidrólise da xilana são o comprimento da cadeia e o grau de substituição (GONÇALVES *et al.*, 2012). A xilana *birchwood* é composta por mais de 90% de resíduos de xilose em ligação do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4). A xilana *beechwood* apresenta mais de 90% de resíduos de xilose, e também arabinose em suas poucas ramificações. Já a composição da xilana *oat spelt* é mais variada. Ela apresenta aproximadamente 70% de xilose, 15% de glicose e 10% de arabinose, sendo a xilana mais ramificada (Sigma-Aldrich).

As xilanases purificadas foram capazes de hidrolisar as xilanas *birchwood*, *beechwood* e *oat spelt*, ambos os substratos solúveis. Para P1 e P3, a melhor atividade foi para xilana *oat spelt*, e para P2, xilana *beechwood*.

Conforme relatado por Gonçalves e colaboradores (2012), xilanases da família G10 hidrolisam, preferencialmente, xilanas com muitas substituições na cadeia principal, por outro lado, as xilanases da família G11 preferem cadeias de xilanas não substituídas, apresentando maior especificidade pelo substrato. Sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho sugerem, novamente, que as xilanases de P1 e P3 podem pertencer à família G10, enquanto P2 poderia pertencer à G11.

As xilanases foram incapazes de promover a hidrólise dos substratos p-NP β -Xil e CMC, sendo assim, tais enzimas não apresentam atividade xilosidase e nem hidrolisam as ligações β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glicopirranose da celulose. Resultados semelhantes foram observados por Kamble e Jadhav (2012) em seus estudos sobre a purificação de uma xilanase de *Bacillus* produzida por fermentação em estado sólido.

Vikramathithan *et al.* (2012) demonstraram, em seu estudo sobre xilanases de *Opuntia vulgaris* spp, que a maior atividade observada foi para xilana *oat spelt*, quando usada como substrato. A diferença ainda mostrou-se significativa quando comparada à xilana *birchwood*. Além disso, Vikramathithan *et al.* (2012) relataram que as xilanases foram pouco ativas na hidrólise de CMC e amido.

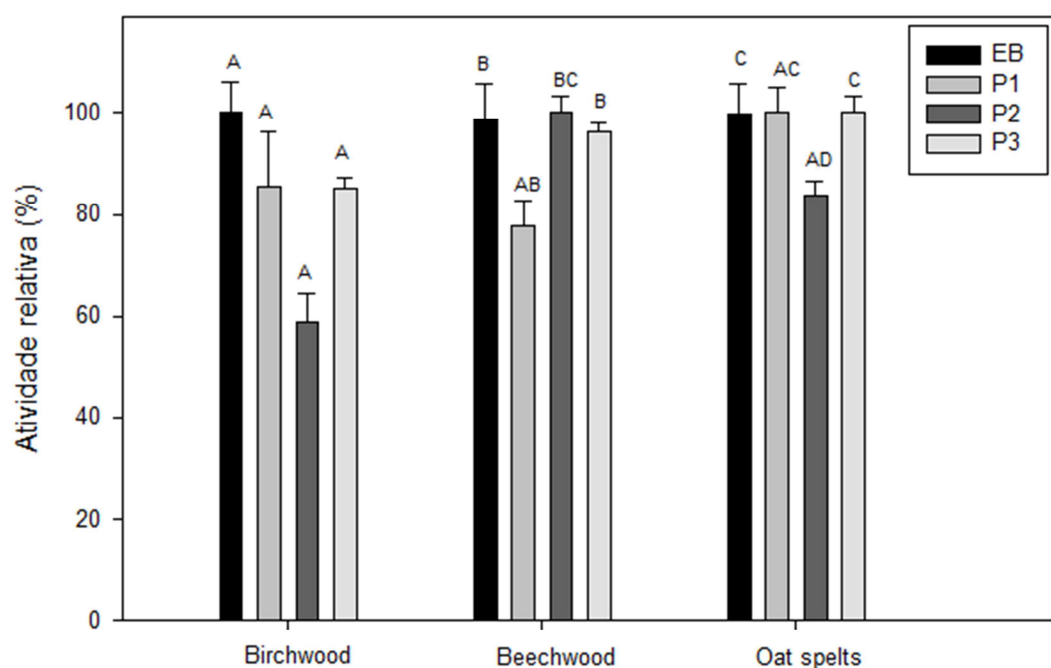


Figura 12 – Efeito de polímeros naturais como substratos na atividade das xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis*. Os tratamentos com as mesmas letras não diferem entre si, com $\alpha = 5\%$ (ANOVA).

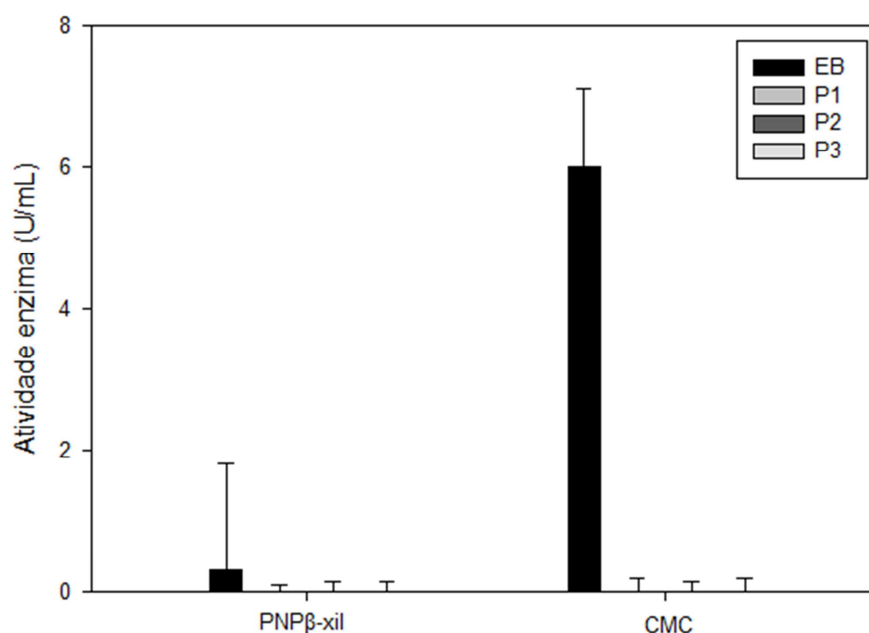


Figura 13 – Efeito de outros substratos na atividade das xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis*.

4.3.4. Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$

O efeito da concentração do substrato, xilana *oat spelt*, na velocidade da reação catalisada pelas xilanases de *C. cubensis* foi determinada pela curva de Michaelis-Menten (Figura 14).

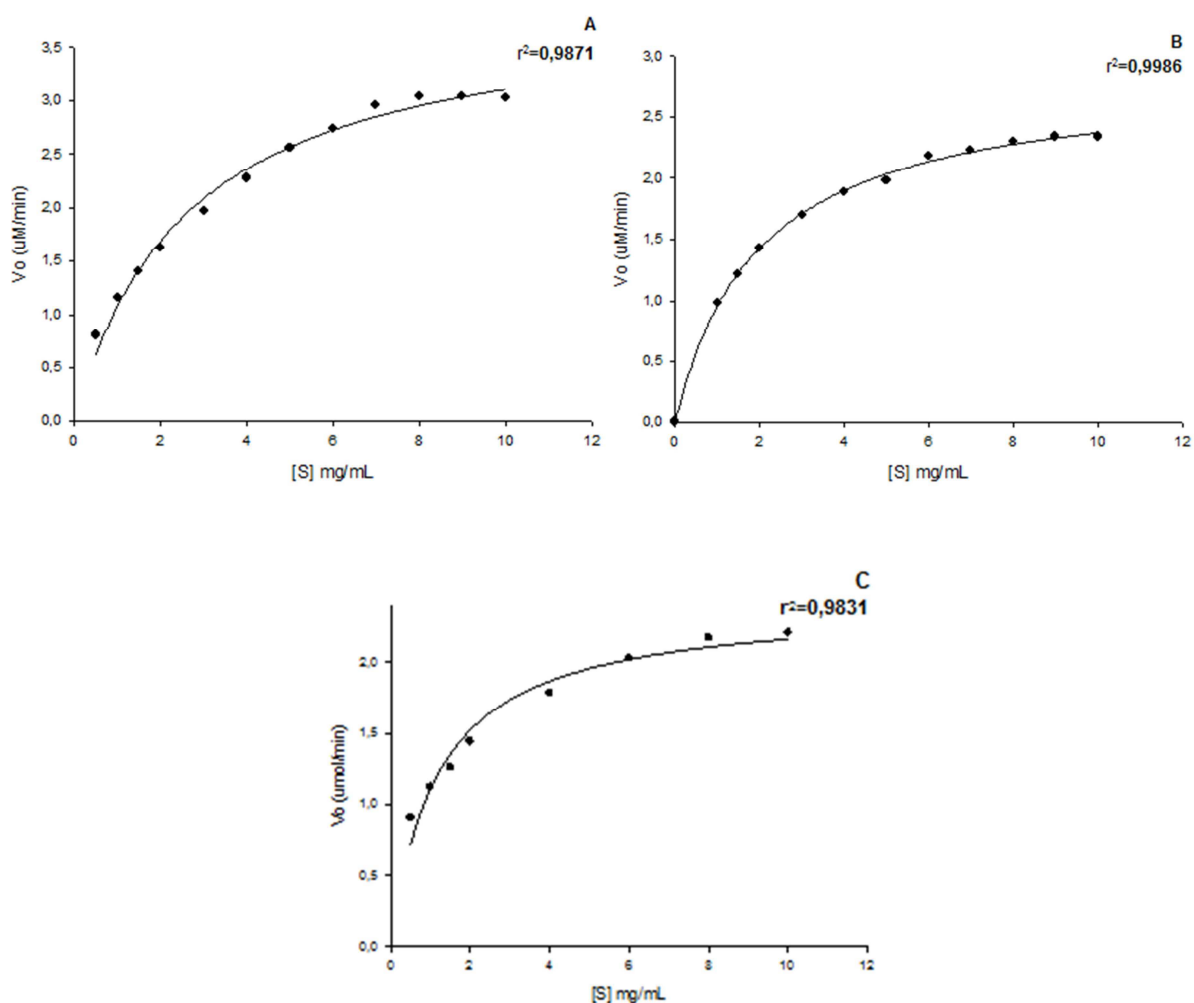


Figura 14 - Efeito da concentração do substrato xilana *oat spelt* na velocidade da reação catalisada pelas xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis*. A, B e C representam P1, P2 e P3, respectivamente.

Os valores da constante cinética K_M e da velocidade máxima $V_{m\acute{a}x}$ para cada xilanase purificada estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ determinados pela curva de Michaelis-Menten utilizando xilana *oat spelt* como substrato.

	K_M (mg/mL)	$V_{m\acute{a}x}$ (μ M/min)
P1	2,65	3,93
P2	1,81	2,84
P3	1,18	2,42

Considerando-se os aspectos cinéticos, K_M e $V_{m\acute{a}x}$, as enzimas P1, P2 e P3 apresentaram similaridade entre si, sendo considerada uma diferença significativa apenas quando os valores são dez vezes um maior que o outro.

Os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ foram determinados para uma xilanase purificada de *Aspergillus fumigatus*, usando xilana *oat spelt* como substrato (SILVA *et al.*, 1999) . Os valores encontrados foram de 5,72 mg/mL e 2,34 IU/mL, respectivamente.

Em seus estudos de purificação e caracterização de uma xilanase termoestável de *Actinomadura sp.* cepa Cpt2, Taibi e colaboradores (2012) determinaram os parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$. Os valores encontrados foram de 1,55 mg/mL e 781,71 μ mol/min/mg, respectivamente. Xilana *oat spelt* também foi utilizada como substrato.

Vikramathithan e colaboradores (2012) encontraram valores de K_M de 3,49 e 2,1 mg/mL, usando xilana *oat spelt* como substrato. Os valores de $V_{m\acute{a}x}$ foram de 10,4 e 8,9 μ mol/min/mg para as xilanases de *Opuntia vulgaris* spp.

Sendo assim, os valores de K_M encontrados para as xilanases purificadas de *C. cubensis*, usando xilana *oat spelt* como substrato, estão de acordo com os valores já descritos na literatura.

4.4. Efeito sinérgico entre as xilanases do fungo *C. cubensis*

Como o fungo *C. cubensis* apresenta um complexo sistema xilanolítico, foi avaliada a capacidade de cada xilanase purificada em promover um efeito sinérgico sobre outra. No entanto, não foi observado efeito sinérgico entre tais enzimas (Figura 15). O valor de atividade observado ficou em torno de 80% do valor teórico em todas as possibilidades testadas, de acordo com as condições do ensaio. Tal fato sugeriu-nos que as xilanases poderiam apresentar um mesmo padrão de produtos de hidrólise, o que ficou depois comprovado pela análise de TLC.

A ação sinérgica entre enzimas é descrita na literatura principalmente por enzimas que atuam na hidrólise da cadeia principal da xilana e enzimas desramificadoras. O efeito sinérgico entre xilanase e arabinofuranosidase para a produção de xilooligossacarídeos, a partir do bagaço de cana-de-açúcar, foi descrita por Gonçalves *et al.* (2012). Por terem mecanismos de hidrólise diferentes, tais enzimas foram capazes de expressar efeito sinérgico positivo, promovendo uma hidrólise mais eficiente da hemicelulose.

O efeito sinérgico entre xilanase e β -xilosidase foi descrito por Wongwisansri e colaboradores (2013). Eles observaram que após 15 min de incubação, a concentração de açúcares redutores aumentou 127%, sob as mesmas condições. E que após 72 h o aumento podia chegar a 350%, sugerindo que o tempo de incubação pode melhorar ainda mais o sinergismo entre as enzimas.

A ação sinérgica entre o coquetel enzimático de *C. cubensis* e de *Penicillium pinophilum* foi descrita por Visser e colaboradores (2013). A mistura dos dois extratos enzimáticos foi capaz de melhorar a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, principalmente quando a proporção 50:50 foi utilizada. O efeito sinérgico observado foi devido, principalmente, à ação das enzimas: xilanase e endoglicanase, confirmando também o efeito sinérgico entre enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas.

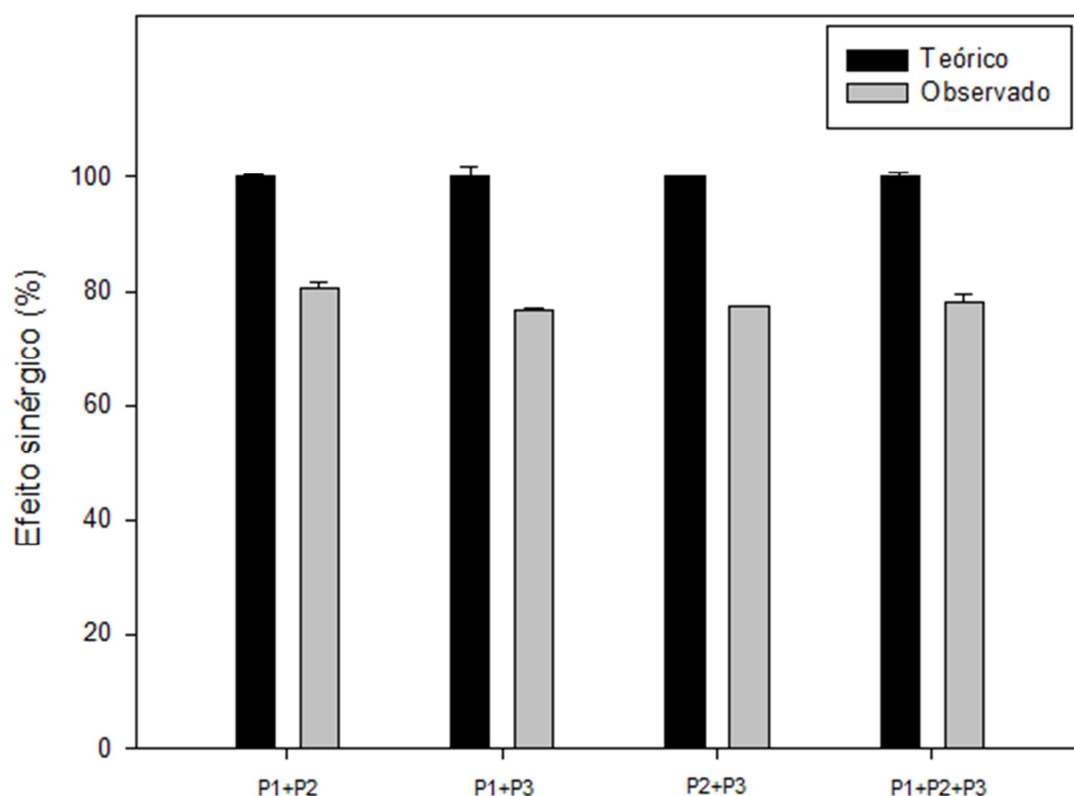


Figura 15 - Efeito sinérgico entre as xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis*. O cálculo de atividade teórico foi de acordo com a equação: $(\% \text{ enzima}_1 \times \text{atividade}_1) + (\% \text{ enzima}_2 \times \text{atividade}_2)$.

4.5. Análise da composição dos produtos de hidrólise da xilana *oat spelt*

Devido à capacidade das xilanases hidrolisarem as ligações β -(1→4) da xilana, a composição dos produtos de hidrólise da xilana *oat spelt* 2% foi analisada por cromatografia em camada delgada (TLC), como descrito no item 3.9. Na Figura 16, podemos observar os resultados obtidos após a revelação da placa.

A análise da TLC revela que os principais produtos de hidrólise são a xilobiose e a xilotriose, sugerindo que o fungo *C. cubensis* possui potencial para a produção de xilooligossacarídeos.

Um perfil similar de hidrólise ao obtido neste trabalho também foi descrito por Wu e colaboradores (2013), que analisaram os produtos de hidrólise da xilana *beechwood*. Wu *et al.*, ainda relatou sobre a importância da produção de xilooligossacarídeos para a indústria de alimentos.

A ocorrência de oligossacarídeos, como xilobiose e xilotriose, como produto final da hidrólise da xilana *oat spelt*, atribui para uma hidrólise do tipo endo da xilana, ou seja, das ligações internas da cadeia principal da xilana, levando-nos à conclusão que as enzimas purificadas são endo- β -1,4-xilanases.

A identificação dos produtos de hidrólise da xilana de bétula por HPAEC-PAD, realizada por Silva e colaboradores (2014), revelou a presença principalmente de xilose e xilobiose. No entanto, foi concluído que a xilanase apresenta mecanismo de ação do tipo endo, uma vez que houve detecção de xilooligômeros.

A presença de resíduos de xilose, principalmente em P3, poderia ser explicada devido a uma maior versatilidade catalítica da enzima, visto que P3 apresenta características de membros da família 10, que são hidrolases menos específicas. Ou então, devido simplesmente ao amplo tempo de hidrólise, que foi de 12 h.

Verma *et al.*, (2013) também observaram, por meio de TLC, que com o aumento do tempo de hidrólise, a concentração de xilooligossacarídeos menores também aumentava, o que é vantajoso para aplicação na indústria de prebióticos.

Todas as enzimas purificadas apresentaram um perfil bastante similar. Conforme esperado, o controle não foi hidrolisado, pois não continha nenhuma das xilanases purificadas.

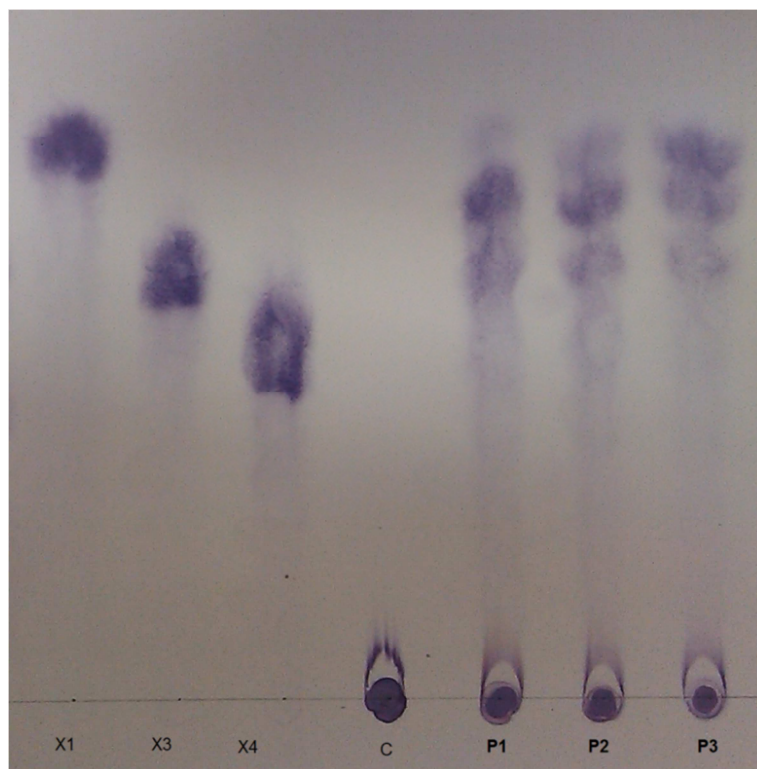


Figura 16 – Análise dos produtos de hidrólise da xilana *oat spelt* por TLC. X1, X3 e X4 correspondem aos padrões: xilose, xilotriose e xilotetraose, respectivamente. C - Controle. P1, P2 e P3 - picos de atividade xilanásica obtidos a partir da troca-iônica.

4.6. Sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi escolhido para o processo de sacarificação devido à cana-de-açúcar ser considerada uma das principais culturas produzidas no Brasil. Além disso, o bagaço obtido após a moagem da cana tem despertado interesse quando comparado a outros resíduos agroindustriais, principalmente por ser uma fonte rica em açúcares fermentáveis (GOLDENBERG, 2007).

Neste trabalho, foi utilizado o pré-tratamento alcalino. O pré-tratamento alcalino remove preferencialmente a lignina, facilitando o acesso das enzimas hidrolíticas aos constituintes da parede celular vegetal, em especial à celulose e hemicelulose, auxiliando no processo de sacarificação da biomassa e minimizando a adsorção improdutiva das enzimas (LADISCH *et al.*, 2010).

O desempenho das xilanases purificadas de *C. cubensis* foi avaliado em um processo de sacarificação (Figura 17 e 18). Os resultados mostram claramente que os tratamentos suplementados com as xilanases purificadas foram mais eficientes, conforme pode ser observado na Figura 17. Como o coquetel comercial Multifect® CL é composto principalmente por celulasas, a inserção de xilanases ajudou a promover a hidrólise da hemicelulose, e consequentemente, foi observado um aumento na concentração de açúcares redutores.

A concentração de glicose não diferiu entre os tratamentos, sendo assim, a hidrólise da hemicelulose pelas xilanases não favoreceu a liberação de glicose a partir da celulose. Um pequeno decréscimo na concentração de glicose foi observado após 48 horas. Sabe-se que a transglicosilação é capaz de diminuir a concentração de glicose livre, e que β -glicosidases catalisam reações de transglicosilação (BHATIA *et al.*, 2002). Deste modo, a ação de β -glicosidases presentes no coquetel comercial Multifect® CL poderiam estar contribuindo para a formação de glicooligossacarídeos.

A sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar usando o mesmo coquetel comercial (Multifect® CL) em comparação ao coquetel enzimático bruto do fungo *C. cubensis* foi estudada por Falkoski e colaboradores (2013), onde ficou evidente a eficiência das enzimas presentes no extrato de *C. cubensis*, de modo que houve um aumento considerável de açúcares liberados durante o processo de sacarificação.

Os resultados obtidos nesse experimento sugerem que as xilanases do fungo *C. cubensis* podem ser utilizadas em processos de conversão de biomassa, e principalmente, podem ser aplicadas em processos de sacarificação visando à produção de etanol de segunda geração.

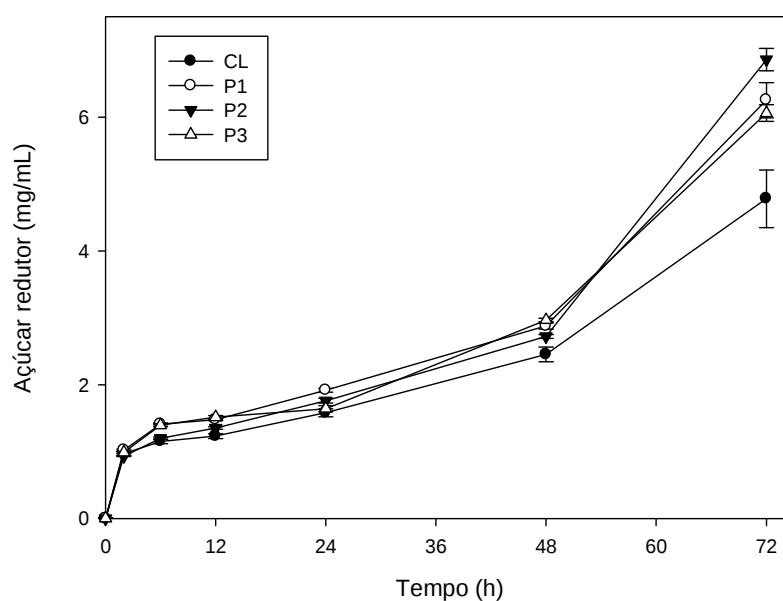


Figura 17 – Concentração de açúcares redutores liberados a partir da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. CL- coquetel comercial Multifect® CL. P1, P2 e P3- coquetel suplementado com as xilanases purificadas do fungo *Chrysosporthe cubensis*.

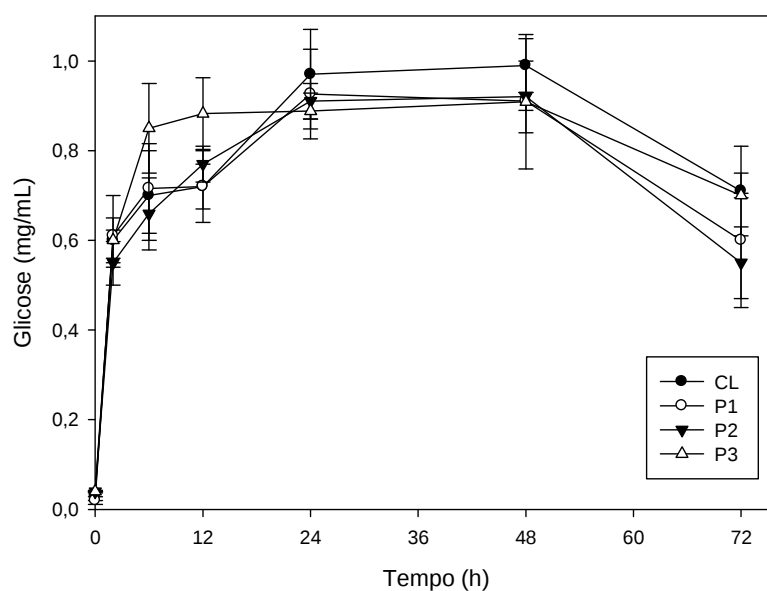


Figura 18 - Concentração de glicose liberada a partir da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. CL- coquetel comercial Multifect® CL. P1, P2 e P3- coquetel suplementado com as xilanases purificadas do fungo *Chrysosporthe cubensis*.

5. CONCLUSÕES

O fungo *Chrysosporthe cubensis* produziu em meio sólido, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono, quatro xilanases. As xilanases foram purificadas e caracterizadas. De acordo com os resultados obtidos, o fungo *Chrysosporthe cubensis* secreta xilanases com potencial para a produção de xilooligossacarídeos e para a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. Sendo assim, as xilanases mostraram-se promissoras para aplicações industriais e biotecnológicas, principalmente para a indústria de alimentos e biocombustíveis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. 2.ed. Viçosa: Editora UFV. 2009.

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

BHATIA Y, MISHRA S, BISARIA VS. Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**. 22:375-407. 2002.

BIELY P., VRSANSKA M., TENKANEN M., KLUEPFEL D., Endo- b -1,4-xylanase families: Differences in catalytic properties, **J. Biotechnol**. 151–166. 1997.

BON, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro. Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT (Portugal), 2008.

BORGES M. T. Efeito da aplicação de xilanase na polpa kraft de eucalipto. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Viçosa. 2010.

BRUINS, M., JANSSEN, A. E. M., BOOM, R. **Appl. Biochem. Biotechnol**. 90-155. 2001.

BUCHERT J, BERGNOR E, LINDBLAND G, VIIKARI L, EK M. Significance of xylan and glucomannan in the brightness reversion of kraft pulps. **Tappi**. J;80:165–75. 1997.

BUCKERIDGE, M.S. et al. Ethanol from sugarcane in Brazil: a ‘midway’ strategy for increasing ethanol production while maximizing environmental benefits. **Global Change Biology Bioenergy**. 4. 119-126. 2012.

BUTT M.S., *et al.*: Xylanases in Baking Industry, **Food Technol. Biotechnol.** 46 (1) 22–31. 2008.

CANAKCI S. *et al.* Cloning, purification and characterization of an alkali-stable endoxylanase from thermophilic *Geobacillus* sp. 71. **World J Microbiol Biotechnol.** 2012.

CARVALHEIRO F., DUARTE L. C. GÌRIO F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific and Industrial Research.** 67. 849-864. 2008.

CHESSON A. Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. In: Haresign W, Cole DJA, editors. **Recent advances in animal nutrition.** London: Butterworths. 71–89. 1987.

CHI W.J. *et al.* A novel alkaliphilic xylanase from the newly isolated mesophilic *Bacillus* sp. *mx47*: production, purification, and characterization. **Appl Biochem Biotechnol.** 168(4):899-909. 2012.

DAMASO M. C. T. *et al.*, Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* ioc-4145. **Brazilian Journal of Microbiology.** 33. 333-338. 2002.

DELCHEVA, G., DOBREV, G., PISHTIYSKI, I. Performance of *Aspergillus niger* B 03 β -xylosidase immobilized on polyamide membrane support. **Journal of Molecular Catalysis.** 54(3):109-115. 2008.

DODD, D., CANN I. K. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Glob Change Biol Bioenergy.** 18. 2-17. 2009.

DUARTE M. C. T. *et al.*, Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilus*. **Brazilian Journal of Microbiology.** 2000.

FALKOSKI, D. L., Enzimas lignocelulolíticas de fungos de podridão branca e fitopatógenos: produção, caracterização e aplicação em processos de sacarificação da biomassa. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Viçosa. 2011.

FALKOSKI, D. L. et al. *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**. 130. 296-305. 2013.

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**. 101. 8915-8923. 2010.

GOLDEMBERG J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**. 2007.

GOMES E., GUEZ, M. A. U., MARTIN, N. and SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**. v.30, p.136-145. 2007.

GONÇALVES, R. A ., BENAR, P., COSTA, S. M., RUZENA, D. S., MORIYA, R. Y., LUZ, S. M., FERRETTI, L. P. Integrated processes for use of pulps and lignins obtained from sugarcane bagasse and straw. **Appl. Biochem. Biotechnol**. V. 121-124, p. 821-836. 2005.

GONÇALVES, T. A. et al. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**. 119. 293-299. 2012.

GRAHAM H, BAALNAVE D. Dietary enzymes for increasing energy availability. In: Wallace RJ, Chesson A, editors. **Biotechnology in animal feeds and animal feedings**. Weinheim, Germany. 296–309. 1995.

GRYZENHOUT M., TARIGAN M., CLEGG P.A., WINGFIELD M. J., *Cryptometrion aestuescens* gen. sp. nov. (Cryphonectriaceae) pathogenic to Eucalyptus in Indonesia. **Australasian Plant Pathology**. 39, 161–169. 2010.

GUIMARÃES L. M. S. et al., Genetic control of Eucalyptus urophylla and E. grandis resistance to canker caused by Chrysosporium cubensis. **Genetics and Molecular Biology**, 33, 3, 525-531. 2010.

HANG, Y.D.; WOODAMS, E.E. Xylanolytic activity of commercial juice-processing enzyme preparations. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 389–392. 1997.

HELDT-HANSEN HP. Development of enzymes for food applications. In: Poutanen K, editor. **Biotechnology in the food chain—New tools and applications for future foods**. Helsinki, Finland. 177, 45–55. 1997.

HODGES CS, GEARY TF, CORDELL CE. The occurrence of Diaporthe cubensis on Eucalyptus in Florida, Hawaii and Puerto Rico. **Plant Disease Reporter**. 1979.

HUANG J. et al., Direct Ethanol Production from Lignocellulosic Sugars and Sugarcane Bagasse by a Recombinant *Trichoderma reesei* Strain HJ48. **The Scientific World Journal**. ID.798683. 2014.

KAMBLE R. D.; JADHAV A. R. Isolation, Purification, and Characterization of Xylanase Produced by a New Species of Bacillus in Solid State Fermentation. **International Journal of Microbiology**. ID 683193. 2012.

KHANDEPARKAR, BHOSLE, Application of thermoalkalophilic xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 in biobleaching of kraft pulp. **Bioresource Technology**. 98(4):897-903. 2007.

KNOB A. et al. Production, purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate. **BioMed Research International**. 2013.

KRONBAUER, E. A., W. PERALTA, R. M., OSAKU, C. A., KADOWAKI, M. K., **Produção de xilanase por *Aspergillus casielus* com diferentes fontes de carbono**. B. CEPPA, Curitiba, v.25. nº 2 , p. 207-216. 2007.

KULKARNI N., SHENDYE A., RAO M., Molecular and biotech-nological aspects of xylanases, **Microbiol. Rev.** v.25, nº 2 , p. 207-216. 1999.

LADISCH M., MOSIER N. S., KIM Y., XIMENES E., AND HOGSETT D. Converting cellulose to biofuels. **Biofuels**. 106(3), 56-63 .2010.

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**. 10:20. 2011.

LOMBARDI L. R. Qualidade da madeira de eucalipto e *Acacia mangium* consorciadas para produção de polpa kraft branqueada. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Viçosa. 2013.

LORA J. S.; GLASSER W. G.; **J. Polym. Environ.** 10, 39. 2002.

LUCENA-NETO S. L., FERREIRA-FILHO E. X. Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea* var. *Thermoidea*. **Brazilian Journal of Microbiology**. 35. 86-90. 2004.

MAAT J, ROZA M, VERBAKEL J. et al.;. **Xylanases and their applications in bakery**. In: Visser J, Beldman G, Kusters-van Someren MA, Voragen AGJ, editors. Xylans and xylanases. Progress in Biotechnology, Vol. 7. Amsterdam: Elsevier. 349–60. 1992.

MANOIR J. R. et al., **Proc. Int. Pulp Bleaching Conf.**, Stockholm, 123. 1991.

McILVAINE T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. Journal of Biological Biochemistry. 49. 183-186. 1921.

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

MONTI, Rubens *et al.* Production and purification of an Endo-1,4-b-Xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* by electroelution. **Braz. J. Microbiol.** vol. 34, n.2, 124-128. 2003.

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.

NUYENS F.H., VERACHTERT H., MICHIELS C., Evaluation of a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain secreting a *Bacillus pumilus* endo-beta-xylanase for use in bread-making, **Meeting of the Benelux Yeast Research Groups**, Leuven, Belgium. 2001.

OGEDA T. L., PETRI D. F. S., Hidrólise enzimática da biomassa. **Química Nova**. Vol. 33, No. 7, 1549-1558. 2010.

POLIZELI, M.L.T.M.; RIZZATTI, A.C.S.; MONTIR, R.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A.; AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 67 (5), 577-591, 553. 2005.

POUTANEN K. Enzymes: an important tool in the improvement of the quality of cereal foods. **Trends Food SciTechnol**. 8:300-6. 1997.

QUERIDO A. L. S. *et al.* Partial purification and characterization of xylanase produced by *Penicillium expansum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 49. 474-480. 2006.

SAHA B. C., BOTHAST R. J., Enzymes in Lignocellulosic Biomass Conversion. Cap. 2. In: **Fuels and Chemicals from Biomass**. 1997.

SANGKHARAK K., VANGSIRIKUL P., JANTHACHAT S., Isolation of novel cellulase from agricultural soil and application for ethanol production. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**. Vol 2, 230-239. 2011.

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

SILVA, C. H. C. *et al.* Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Rev. Microbiology**. vol.30, n.2, 114-119. 1999.

SILVA C. O. G. *Emericella nidulans* e bagaço de cana-de-açúcar: ferramentas para produção de endo- β -1,4- xilanase. **Dissertação de mestrado**, UnB. 2014.

SILVA *et al.*, Production of xylanase and cmcase on solid state fermentation indifferent residues by *Thermoascus aurantiacus miehe*. **Brazilian Journal of Microbiology**. vol.36, n.3, 235-241. 2005.

SHIN K., JEYA M., LEE J., KIM Y. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Fomitopsis pinicola*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 2010.

SUBRAMANIYAN S., PREMA P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Crit. Rev. Biotechnol.** 22, 33 – 64. 2002.

SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review. **Bioresource Technology**. 83. 1-11. 2002.

SUURNAKKI A, HEIJNESSON A, BUCHERT J, TENKANEN M, VIIKARI L, WESTERMARK U. Effect of pulp surfaces on enzyme aided bleaching of kraft pulps. **J Pulp Paper Sci.** 22:J91–6. 1996.

TAIBI Z. *et al.* Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomadura sp.* strain cpt20 isolated from poultry compost. **Appl Biochem Biotechnol.** 2012.

THAKUR, V. V.; JAIN, R. K.; MATHUR, R. M. Studies on xylanase and laccase enzymatic prebleaching to reduce chlorine based chemicals during CEH and ECF bleaching. **Bioresources.** 7. 2220-2235. 2012.

TOLEDO K., Etanol de segunda geração com biogás. FAPESP. 2012. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/15120>. Acessado em: 15/09/2013.

UHLIG H. **Industrial enzymes and their applications**, New York: John Wiley & Sons, Inc. 435. 1998.

VERMA D, *et al.* Thermostable and Alkalistable Endoxylanase of the Extremely Thermophilic Bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1: Cloning, Expression, Characteristics and Its Applicability in Generating Xylooligosaccharides and Fermentable Sugars. **Appl Biochem Biotechnol.** 170. 119-130. 2013.

VIEIRA, D. S. Estrutura, termoestabilidade e atividade de xilanases: um estudo via simulação molecular. **Tese de Doutorado.** USP, Ribeirão Preto, 2007.

VIIKARI, L., KANTELINEN, A., SUNDQUIST, J., LINKO, M. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. **FEMS Microbiol. Ver.** 13. 335-350. 1994.

VIKRAMATHITHAN J. *et al.* Purification and biochemical characterization of two major and thermophilic xylanase isoforms (T₇₀ and T₉₀) from xerophytic *Opuntia vulgaris* plant spp. **Cellulose.** 19: 1373-1383. 2012.

VISSER, E. M. *et al.* Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. 144. 587-594. 2013.

WONG, K.K.Y., TAN L.U.L., SADDLER J.N., Multiplicity of β -1,4 xylanase in microorganisms: Functions and applications, **Microbiol Rev**. 52. 305–317. 1988.

WONGWISANSRI, S. *et al.* High-level production of thermotolerant β -xylosidase of *Aspergillus sp.* BCC125 in *Pichia pastoris*: characterization and its application in ethanol production. **Bioresource Technology**. 132. 410-413. 2013.

WU, Q., *et al.* Identification of a novel fungus, *Leptosphaerulina chartarum* SJTU 59 and characterization of its xylanolytic enzymes. **Plos One**. 8. 73729. 2013.

ZHANG, J. H. *et al.* Comparison of the synergistic action of two thermostable xylanases from GH families 10 and 11 with thermostable cellulases in lignocellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**. 102. 9090-9095. 2011.

ZHANG, L., CHEN, Q., JIN, Y.L., XUE, H.L., GUAN, J.F., WANG, Z.Y., ZHAO, H., Energy-saving direct ethanol production from viscosity reduction mash of sweet potato at very high gravity (VHG). **Fuel Process Technol**. 91. 1845-1850. 2010.

ZHANG, L. , ZHAO, H., GAN M., JIN, Y.L., GAO X., CHEN, Q., WANG, Z.Y., Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**. 102. 4573–4579. 2011.

ZHENG H. *et al.* Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Paenibacillus sp.* NF1 and its application in xylooligosaccharides production. **J. Microbiol. Biotechnol**. 24(4), 489–496. 2014.

7. ANEXOS

Anexo 1 – Resultado da análise estatística (ANOVA) para o efeito da especificidade das xilanases por diferentes substratos

One-Way ANOVA - EFEITO SUBSTRATO – EXTRATO BRUTO

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
Data1_A	3	1,04303	0,06018	0,03474
Data1_B	3	1,26937	0,0716	0,04134
Data1_C	3	0,81333	0,10984	0,06341

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	2	0,311955269	0,155977634	22,48344	0,00163
Error	6	0,0416246800	0,00693744667		

At the 0,05 level, the population means are significantly different.

Means Comparison using Tukey Test

Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals Lower Limit	Upper Limit	Significant at 0,05 Level
Data1_A	1,04303				
Data1_B	1,26937	-0,22633	-0,435	-0,01766	Yes
Data1_C	0,81333	0,2297	0,02103	0,43837	Yes
Data1_B	1,26937				
Data1_C	0,81333	0,45603	0,24736	0,6647	Yes

One-Way ANOVA - EFEITO SUBSTRATO – P 1

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
Data1_A	3	0,95927	0,10942	0,06317
Data1_B	3	1,13057	0,04824	0,02785
Data1_C	3	0,86043	0,10401	0,06005

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	2	0,112083736	0,0560418678	6,69359	0,02964
Error	6	0,0502348000	0,00837246667		

At the 0,05 level, the population means are significantly different.

Means Comparison using Tukey Test

Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals Lower Limit	Upper Limit	Significant at 0,05 Level
Data1_A	0,95927				
Data1_B	1,13057	-0,1713	-0,40054	0,05794	No
Data1_C	0,86043	0,09883	-0,1304	0,32807	No
Data1_B	1,13057				
Data1_C	0,86043	0,27013	0,0409	0,49937	Yes

One-Way ANOVA - EFEITO SUBSTRATO – P 2

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
Data1_A	3	0,54833	0,0562	0,03245
Data1_B	3	1,0305	0,03244	0,01873
Data1_C	3	0,4668	0,02623	0,01514

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	2	0,556890069	0,278445034	170,49522	5,17013E-6
Error	6	0,009798926	0,001633154		

At the 0,05 level, the population means are significantly different.

Means Comparison using Tukey Test

Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals Lower Limit	Upper Limit	Significant at 0,05 Level
Data1_A	0,54833				
Data1_B	1,0305	-0,48217	-0,58341	-0,38092	Yes
Data1_C	0,4668	0,08153	-0,01971	0,18278	No
Data1_B	1,0305				
Data1_C	0,4668	0,5637	0,46246	0,66494	Yes

One-Way ANOVA – EFEITO SUBSTRATO – P 3

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
Data1_A	3	0,5308	0,02241	0,01294
Data1_B	3	0,81547	0,01763	0,01018
Data1_C	3	0,3624	0,0332	0,01917

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	2	0,314663076	0,157331538	246,45522	1,73935E-6
Error	6	0,003830266	6,3837777E-4		

At the 0,05 level, the population means are significantly different.

Means Comparison using Tukey Test

Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals Lower Limit	Upper Limit	Significant at 0,05 Level
Data1_A	0,5308				
Data1_B	0,81547	-0,28467	-0,34797	-0,22137	Yes
Data1_C	0,3624	0,1684	0,1051	0,2317	Yes
Data1_B	0,81547				
Data1_C	0,3624	0,45307	0,38977	0,51637	Yes