



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular -
PMBqBM - SBBq**

ALINE PEREIRA DE ALMEIDA

**Produção, purificação, caracterização e avaliação do potencial
biotecnológico da endo-xilanase do fungo termofílico *Humicola brevis* var.
*thermoidea***

Campo Grande - MS

2021



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular -
PMBqBM - SBBq**

ALINE PEREIRA DE ALMEIDA

**Produção, purificação, caracterização e avaliação do potencial
biotecnológico da endo-xilanase do fungo termofilo *Humicola brevis* var.
*thermoidea***

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq do Instituto de Biociências (INBIO) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

Orientador: Prof. Dr. Douglas Chodi Masui.

Campo Grande - MS

2021

TERMO DE APROVAÇÃO

ALINE PEREIRA DE ALMEIDA

Produção, purificação, caracterização e avaliação do potencial biotecnológico da endo-xilanase do fungo termófilo *Humicola brevis* var. *thermoidea*

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq do Instituto de Biociências (INBIO) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Douglas Chodi Masui (Orientador)

Instituto de Biociências – INBIO

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Prof. Dr. Roberto Ruller

Instituto de Biociências – INBIO

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Prof^ª. Dr^ª. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

Faculdade Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - FFCLRP

Universidade de São Paulo (USP)

Campo Grande

10 de Junho de 2021

*A Deus, por ser essencial em minha vida,
autor de meu destino e meu guia,*

dedico.

AGRADECIMENTOS

A jornada em busca de conhecimento não é uma tarefa tão simples como aquelas que presenciamos nas telas de cinema, pois por trás de um cientista existem diversas tentativas que resultam em erros e acertos, auxiliando em seu aprendizado. Entretanto, esta se torna mais leve quando alguém está disposto a instruí-lo e ajudando-o a cumprir o seu propósito tanto profissional quanto pessoal.

Dentre aqueles que se fizeram presentes durante todo o processo de desenvolvimento do meu projeto, venho por aqui oferecer o meu agradecimento:

- À Deus, pela proteção durante este período e aos próximos que estarão por vir;
- À minha família por sempre me apoiar e fazer acreditar que tudo é possível desde que seja feito com muito amor e perseverança;
- As instituições de fomento, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
- Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de obter o título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular);
- À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e a todos seus funcionários, alunos e professores pela estrutura acadêmica e pessoal;
- Ao meu orientador Prof. Dr. Douglas Chodi Masui pela amizade, orientação, paciência e dedicação;
- Ao Prof. Dr. Roberto Ruller pela amizade e apoio durante a execução do projeto;
- Ao prof. Dr. Hamilton Cabral e a técnica Dr.^a Nathália Gonsales da Rosa-Garzon da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) pela colaboração e auxílio, respectivamente.
- Ao prof. Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira e ao técnico Dr. André Justino (FFCLRP-USP), pela colaboração e auxílio, respectivamente.
- As Prof.^a Dr.^a Giovana Cristina Giannesi e Fabiana Fonseca Zanoelo pela instrução e colaboração;
- Aos meus colegas e amigos de laboratório (LBq-UFMS) pela ajuda teórica e prática dos experimentos realizados, e por todos os momentos felizes que passamos juntos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E UNIDADES	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Biomassa lignocelulósica.....	19
2.2 Obtenção e aplicações da hemicelulose e seus derivados.....	25
2.2.1 Xilanases e o complexo xilanolítico.....	27
2.2.2 Classificação estrutural e modo de ação das xilanases.....	29
2.2.3 Aplicações de endo-xilanases termotolerantes.....	32
2.2.4 Microrganismos produtores de endo-xilanases termotolerantes.....	35
2.3 Microrganismo de estudo.....	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Microrganismo.....	39
4.2 Manutenção e ativação do fungo produtor.....	39
4.3 Produção da endo-xilanase de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i> por fermentação em estado sólido (FES).....	39
4.4 Atividade xilanásica.....	40
4.5 Dosagem de proteínas.....	40
4.6 Purificação da endo-xilanase de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i> (XylHb).....	40
4.6.1 Precipitação da XylHb com sulfato de amônio.....	40
4.6.2 Precipitação da XylHb com solventes orgânicos.....	41
4.6.2.1 Precipitação da XylHb com acetona.....	41
4.6.2.2 Precipitação da XylHb com etanol.....	42
4.6.3 Teste de “binding” da XylHb em diferentes resinas de troca iônica.....	42
4.6.4 Cromatografia da XylHb por troca iônica.....	43
4.6.5 Cromatografia da XylHb por exclusão molecular.....	43
4.7 Análise eletroforética da XylHb pura e teste de atividade por zimograma.....	44
4.8 Análise da XylHb por eletroforese bidimensional.....	44
4.8.1 Primeira dimensão - focalização isoelétrica.....	44
4.8.2 Equilíbrio da tira focalizada.....	45
4.8.3 Segunda dimensão - eletroforese desnaturante (SDS-PAGE).....	45
4.8.4 Revelação das bandas do gel bidimensional e análise de imagem.....	45
4.9 Caracterização biofísica.....	46
4.9.1 Avaliação do perfil da estrutura secundária da XylHb por dicroísmo circular...46	
4.9.2 Efeito da temperatura na fluorescência intrínseca do triptofano (FIT) da XylHb..47	
4.10 Caracterização bioquímica da XylHb e endo-xilanase comercial Cellic [®] HTec247	
4.10.1 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática.....	47

4.10.2	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática.....	48
4.10.3	Parâmetros cinéticos.....	48
4.10.4	Efeito de sais e agentes químicos na atividade enzimática.....	48
4.10.5	Efeito do etanol e NaCl na atividade e estabilidade enzimática.....	49
4.11	Ensaio de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.....	49
4.12	Análise dos dados obtidos.....	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1	Produção da endo-xilanase extracelular de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i>	52
5.2	Precipitação e purificação da endo-xilanase extracelular de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i>	52
5.2.1	Precipitação seletiva da endo-xilanase extracelular.....	53
5.2.2	Teste de “binding” da XylHb em diferentes resinas de troca iônica.....	55
5.2.3	Cromatografia da XylHb por troca iônica.....	57
5.2.4	Cromatografia da XylHb por exclusão molecular.....	58
5.2.5	Análise da XylHb por eletroforese bidimensional.....	60
5.3	Caracterização biofísica.....	62
5.3.1	Avaliação do perfil da estrutura secundária da XylHb por dicroísmo circular....	62
5.3.2	Efeito da temperatura na fluorescência intrínseca do triptofano (FIT) da XylHb	64
5.4	Caracterização bioquímica da XylHb e endo-xilanase comercial Cellic®HTec2	66
5.4.1	Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática.....	66
5.4.2	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática.....	68
5.4.3	Parâmetros cinéticos.....	70
5.4.4	Efeito de sais e agentes químicos na atividade enzimática.....	72
5.4.5	Efeito do etanol e NaCl na atividade e estabilidade enzimática.....	74
5.5	Ensaio de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.....	77
	CONCLUSÕES.....	83
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Evolução dos biocombustíveis no Brasil.	14
Figura 2: Área colhida e de plantio de cana do setor sucroalcooleiro.	15
Figura 3: Valorização de resíduos lignocelulósicos em produtos de alto valor.	16
Figura 4: Representação esquemática da estrutura da biomassa lignocelulósica.	20
Figura 5: Estrutura da celulose demonstrando o padrão de ligações de hidrogênio inter e intracadeia.	21
Figura 6: Ilustração esquemática dos tipos de hemiceluloses presentes na parede celular de plantas.	23
Figura 7: Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides.	24
Figura 8: Produtos potenciais a partir do pré-hidrolisado de hemiceluloses.	27
Figura 9: Estrutura da hemicelulose e modo de ação das hemicelulases.	28
Figura 10: Dobramento característico de uma endo-xilanase GH10 de <i>Aspergillus fumigatus</i> Z5 e GH11 de <i>T. lanuginosus</i>	30
Figura 11: Subsítios de hidrólise de endo-xilanases da família GH10 e GH11.	31
Figura 12: Precipitação da endo-xilanase extracelular de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i> utilizando sulfato de amônio e solventes orgânicos.	54
Figura 13: Teste <i>binding</i> da influência do pH e da resina na interação de xilanases extracelulares de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i>	56
Figura 14: Purificação da endo-xilanase extracelular de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i> com colunas cromatográficas DEAE Toyopearl®giga cap – 650M.	57
Figura 15: Purificação da endo-xilanase extracelular de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i> com resina cromatográfica TSK Fractogel 50 (S).	58
Figura 16: Eletroforese em gel poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) da endo-xilanase extracelular purificada de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i>	59
Figura 17: Eletroforese 2D da xilanase extracelular purificada de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i>	61
Figura 18: Espectros de dicroísmo circular da estrutura secundária de proteínas.	63
Figura 19: Espectro de dicroísmo circular da xilanase purificada de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i> e estrutura da xilanase GH11 de <i>T. lanuginosus</i>	63
Figura 20: Influência da temperatura na atividade enzimática e fluorescência intrínseca do triptofano (FIT) da endo-xilanase purificada de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i>	65
Figura 21: Efeito do pH na atividade e estabilidade da XylHb e Cellic®HTec2.	67

Figura 22: Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da XylHb e Cellic [®] HTec2.	69
Figura 23: Efeito da xilana <i>bichwood</i> na atividade da XylHb e Cellic [®] HTec2.	70
Figura 24: Efeito do etanol na atividade e estabilidade enzimática da XylHb e Cellic [®] HTec2.....	75
Figura 25: Efeito do NaCl na atividade e estabilidade enzimática da XylHb e Cellic [®] Htec2.	76
Figura 26: Sacarificação de bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente com (Cellic [®] CTec2) e combinações (Cellic [®] CTec2 + Cellic [®] HTec2; Cellic [®] CTec2 + XylHb).	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teor de celulose, hemicelulose e lignina em diferentes materiais lignocelulósicos.	20
Tabela 2: Purificação da endo-xilanase extracelular de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i>	58
Tabela 3: Ponto isoelétrico e massa molecular da endo-xilanase extracelular purificada de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i>	61
Tabela 4: Comparação entre os parâmetros cinéticos da xilanase purificada (XylHb) e comercial (Cellic [®] HTec2) utilizando xilana <i>birchwood</i> como substrato.	71
Tabela 5: Efeito de sais e agentes químicos na atividade da xilanase purificada XylHb e Cellic [®] HTec2.	73
Tabela 6: Sacarificação de amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotermicamente com Cellic [®] CTec2 e coquetel (Cellic [®] CTec2 + Cellic [®] HTec2; Cellic [®] CTec2 + XylHb).	79
Tabela 7: Características comparativas entre a XylHb e Cellic [®] HTec2.	83

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E UNIDADES

ART	Açúcares redutores totais	$\lambda_{\text{máx}}$	Lambda máximo
CBM	Modulo de ligação a carboidratos	Kgf/cm²	Um quilograma-força por centímetro quadrado
CD	Dicroísmo circular	mL/min	Mililitro por minuto
Cellic[®]CTec2	Coquetel de celulases	λ_{EM}	Lambda de emissão
Cellic[®]HTec2	Coquetel de hemicelulases	rpm	Rotação por minuto
CM	Carboximetil	min	Minuto
CNC	Celulosenanocristalina	α	Alfa
DEAE	Dietilaminoetil	xg	Força centrífuga relativa
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico	k_{cat}	Renovação enzimática
DS	Grau de sinergismo	mg/g	Miligrama por grama
DTT	Ditiotreitol	β	Beta
E1G	Etanol de primeira geração	mg mL⁻¹	Miligrama por mililitro
E2G	Etanol de segunda geração	m/v	Massa por volume
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético	μg	Micrograma
FES	Fermentação em estado sólido	-NH₃⁺	Grupo amina
FIT	Fluorescência intrínseca do triptofano	U mg⁻¹	Unidades por miligrama
GH	Hidrolase de glicosídeos	t_{1/2}	Tempo de meia vida
GH10	Hidrolases de glicosídeos da família 10	ex.	Exemplo
GH11	Hidrolases de glicosídeos da família 11	K_M	Constante de Michaelis-Menten
GL	Gay-Lussac	mol L⁻¹	mol por litro
GOD	Glicose oxidase	v/v	Volume por volume
HE	Hidrólise enzimática	mmol L⁻¹	Milimol por litro
kDa	Quilodalton	μmol	Micromol
pI	Ponto isoelétrico	K_{cat}/K_M	Eficiência catalítica
SDS	Dodecil sulfato de sódio	mA	Miliampère
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio	V h⁻¹	Volt por hora
U totais	Unidades totais	U g⁻¹	Unidades por grama
XOS	Xilooligossacarídeos	-COO⁻	Grupo carboxila
XylHb	Endo-xilanase de <i>Humicola brevis</i> var. <i>thermoidea</i>	g L⁻¹	Gramas por litro

RESUMO

A biodegradação da biomassa lignocelulósica, particularmente da hemicelulose, depende de um grupo de enzimas denominado de complexo hemicelulolítico, produzidas principalmente por fungos e bactérias. Dentre estas hemicelulases, as endo-xilanases têm sido amplamente utilizadas com objetivo de se valorizar a hemicelulose na aplicação em bioprocessos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi produzir, purificar, caracterizar e avaliar o potencial biotecnológico da endo-xilanase de *Hemicoloma brevis* var. *thermoidea* na sacarificação da biomassa lignocelulósica. Com este intuito, a partir do coquetel enzimático obtido através de fermentação em estado sólido, a endo-xilanase nativa (XylHb) foi purificada. A caracterização biofísica das estruturas secundárias por dicroísmo circular indicaram a predominância de folhas β , uma característica típica de endo-xilanases da família GH11 e a análise da fluorescência intrínseca dos Trp indicaram que a proteína tem o seu enovelamento terciário com os resíduos de Trp imersos em um ambiente hidrofóbico. Os resultados das caracterizações bioquímicas e cinéticas da XylHb indicaram que a enzima apresentou uma maior tolerância em uma ampla faixa de pH, temperatura, NaCl e etanol, tendo um melhor desempenho em hidrolisar a xilana *birchwood* em temperaturas de 50 e 60 °C quando compara a xilanase comercial (Cellic[®]HTec2). Os ensaios de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente demonstraram que a suplementação de Cellic[®]CTec2 com XylHb apresentaram interações sinérgicas e elevaram significativamente a liberação de glicose e açúcares redutores totais quando comparados ao padrão comercial Cellic[®]Ctec2 individual. Assim, a XylHb purificada do extrato enzimático de *H. brevis* var. *thermoidea* por apresentar propriedades físico-químicas potenciais, performances e sinergismo com celulase comercial, que são características importantes para a aplicação em ambiente industrial, poderá contribuir como uma alternativa biotecnológica promissora para aplicação e valorização da hemicelulose na produção de bioprodutos.

PALAVRAS CHAVE: Endo-xilanase, Cellic[®]HTec2, Sinergia, Sacarificação.

ABSTRACT

The biodegradation of lignocellulosic biomass, particularly hemicellulose, depends on a group of enzymes called the hemicellulolytic complex, produced mainly by fungi and bacteria. Among these hemicellulases, endo-xylanases have been widely used to enhance hemicellulose in application in bioprocesses. In this context, this work aimed to produce, purify, characterize and evaluate the biotechnological potential of *Humicola brevis* var. *thermoidea* in saccharification of lignocellulosic biomass. For this purpose, from the enzymatic cocktail obtained by solid-state fermentation, the native endo-xylanase (XylHb) was purified. The biophysical characterization of the secondary structures by circular dichroism indicated the predominance of β sheet, a typical characteristic of endo-xylanases of the GH11 family, and the intrinsic fluorescence of Trp analysis indicated that the protein has its tertiary folding with the Trp residues immersed in a hydrophobic environment. The results of the biochemical and kinetic characterizations of XylHb indicated that the study enzyme had a higher tolerance over a wide range of pH, temperature, NaCl, and ethanol, having a better performance in hydrolyzing birchwood xylan at temperatures of 50 and 60 °C when comparing commercial xylanase (Cellic[®]HTec2). The hydrolysis assays of the hydrothermally pretreated sugarcane bagasse demonstrated that the supplementation of Cellic[®]CTec2 with XylHb showed synergistic interactions and significantly increased the release of glucose and total reducing sugars when compared to the individual Cellic[®]Ctec2 commercial standard. Thus, a purified XylHb from the enzymatic extract of *H. brevis* var. *thermoidea*, due to its physical-active properties, performance and synergism with commercial cellulase, which are important characteristics for application in an industrial environment, can contribute as a promising biotechnological alternative, application and valorization of hemicellulose in the production of bioproducts.

KEYWORDS: Endo-xylanase, Cellic[®]HTec2, Synergy, Saccharification.

1 INTRODUÇÃO

Com o objetivo de proporcionar melhorias em seu meio, o ser humano está sempre em busca de transformações. A mais promissora se fez através da produção energética, pois a maneira pela qual esta é produzida, armazenada e transmitida são fatores determinantes para o desenvolvimento de uma nação (GONZÁLEZ; AMADO; SAUER, 2019). Entretanto, a forma como o homem utiliza a disponibilidade de recursos energéticos vem gerando diversas preocupações nas últimas décadas, quando projetada em longo prazo no que diz respeito à oferta e a demanda (FGV, 2019; COSTA; BLANCHET, 2019).

Tais preocupações serviram de incentivo para que o termo “sustentabilidade” fosse implementado pela primeira vez, em julho de 1972, na Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente, na cidade de Estocolmo – Suécia (COSTA; BLANCHET, 2019), abrangendo a discussão de assuntos relacionados às soluções para os impactos ocasionados pelo crescente desenvolvimento global buscando a preservação da humanidade e o meio ambiente. Entretanto, tais medidas foram intensificadas na reunião da Rio 92, com a criação da Agenda 21 (WITTMAYER *et al.*, 2015; XAVIER; JACOBI; TURRA, 2019). Sua relevância não se deu apenas por estas singelas citações, mas principalmente por ter servido de marco histórico, pois a partir deste momento a necessidade de desenvolvimento sustentável foi vista e reconhecida em todo o mundo.

Buscando atender ao que foi proposto, o governo brasileiro reduziu o investimento em fontes energéticas não renováveis. Esta iniciativa foi reforçada pela crise do petróleo na década de 70, que somada à incerteza política dos principais países exportadores dessa mercadoria e a desvantagem de ser uma das maiores fontes de gases causadores do efeito estufa, corroborou para que o país buscasse realizar o investimento em fontes energéticas renováveis (FURTADO, 2019; MENDES *et al.*, 2020).

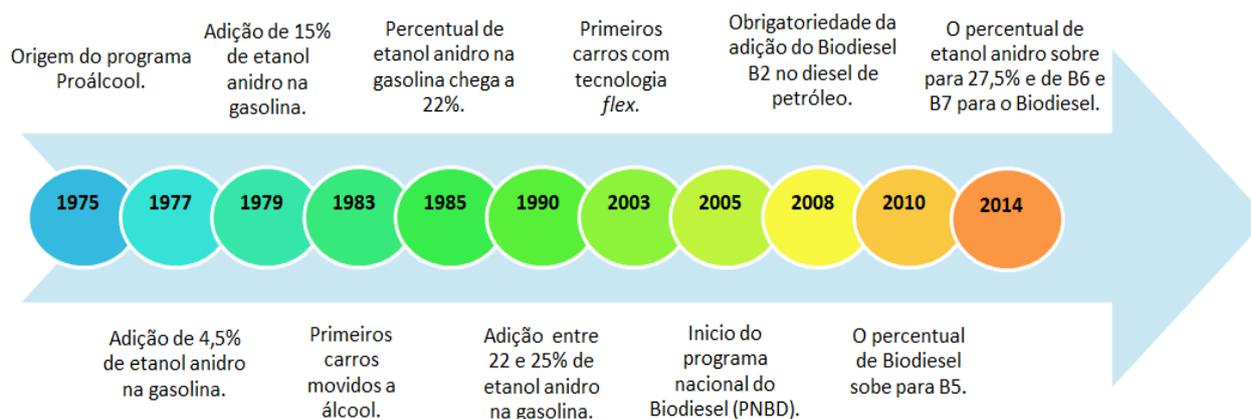
O primeiro passo rumo à sustentabilidade se deu pela criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), em 14 de novembro de 1975 (Decreto nº 76.593) (EAGLIN, 2018; NASTARI, 2019; SILVA; BOMTEMPO; ALVES, 2019). O principal objetivo deste foi realizar a substituição da gasolina pelo álcool visando estimular a produção de etanol para atender o mercado energético global (COSTA, 2020). Para que este objetivo fosse atingido, foram adquiridas algumas medidas: a) estímulo da agricultura voltada para a produção do etanol; b) estímulo à ampliação, modernização e produção de biorrefinarias; c) estímulo à pesquisa científica brasileira e d) estímulo ao

desenvolvimento de veículos movidos a álcool (GIMENEZ, 2018; PESSOA; REZENDE; ASSUNÇÃO, 2019).

Este cenário se demonstrou promissor até o ano de 2000 e foi novamente impulsionado pela iniciativa governamental da implementação dos veículos *flex fuel* em 2003, e do aumento dos percentuais deste biocombustível (anidro) na gasolina (PESSOA; REZENDE; ASSUNÇÃO, 2019; BRITO *et al.*, 2019). Desde 1977 até os dias atuais, este percentual variou de 4,5 até 27% (Figura 1) (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E DE BIOCOMBÚSTIVEIS, 2016).

O etanol combustível pode ser produzido a partir de diversas fontes de biomassa vegetal. Dentre estas, a cana-de-açúcar é a mais promissora quando associada a rendimento energético (ANTERO; SILVA; VALE, 2019; ANTUNES *et al.*, 2019).

Figura. 1: Evolução do diesel de petróleo no Brasil.

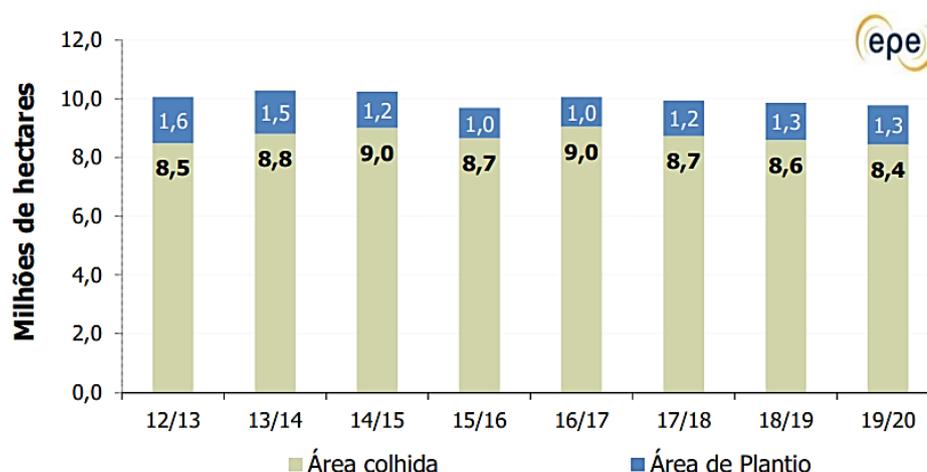


Representação do progresso na utilização de biocombustíveis a partir da origem do programa Proálcool. Os automóveis que circulam no Brasil usam duas categorias de etanol: o hidratado e o anidro. O hidratado é usado diretamente em motores desenvolvidos para este fim ou em motores com tecnologia *flex*. O etanol anidro é misturado à gasolina, sem prejuízo para os motores à gasolina, em proporções variáveis, de acordo com a vigência legal. Fonte: Adaptado de Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e de Biocombustíveis, (2016).

O Brasil produz duas variedades de etanol a E1G, a partir da sacarose extraída da cana-de-açúcar e a E2G, através da biomassa gerada pelo processamento da cana (MOREIRA *et al.*, 2019). Este segundo foi influenciado principalmente pela iniciativa de se duplicar a produção do álcool utilizando uma menor área cultivável, auxiliando na sustentabilidade da produção com a diminuição do descarte incorreto de matéria prima ao final do processamento industrial (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2018; EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2019; MOREIRA *et al.*, 2019).

Dados da safra referente à 2019/2020 demonstraram que foram produzidos 625,96 milhões de toneladas de cana-de-açúcar e a área colhida foi estimada em 8,4 milhões de hectares (Figura 2) (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2019). De modo geral, para cada tonelada que é processada nas usinas ocorre a produção de 270 kg de bagaço, constituído de 50% de umidade e 50% de fibras (TOLMASQUIM, 2016). Ainda de acordo com este autor, deste excedente, cerca de 70% é reutilizado para atender as demandas energéticas da unidade e os outros 30% podem ser comercializados ou utilizados para exportação de bioeletricidade.

Figura 2: Área colhida e de plantio de cana do setor sucroalcooleiro.



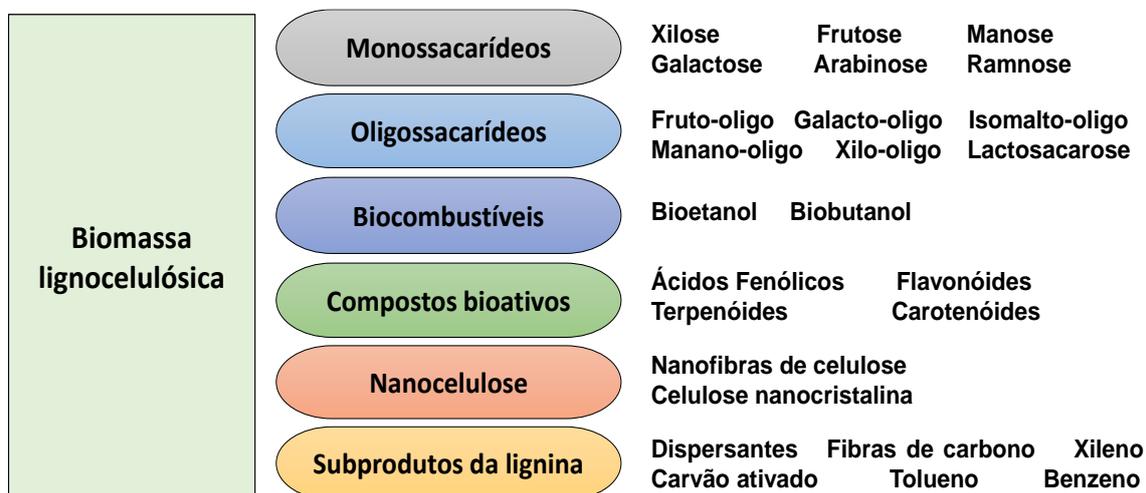
A área total colhida pelo setor sucroenergético, na safra 2019/20, foi de 8,4 milhões de hectares. Desde a safra 2013/14, a área de cana colhida tem oscilado em torno de 8,8 milhões de hectares. Fonte: Empresa de Pesquisa Energética, (2019).

Outra grande vantagem relacionada à diminuição de áreas cultiváveis da cana se faz por meio da redução da competição agrícola para a produção alimentícia. Dados referentes à safra de 2018/19 demonstraram que foram produzidos 242,1 milhões de toneladas, sendo que a soja, o milho e o arroz foram as principais culturas produzidas no país (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019). Dentre estes, o milho tem se demonstrado promissor para a produção de biocombustíveis apresentando um elevado crescimento na produção de bioetanol nos últimos anos (CHEN *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2019). Em 2019, a produção brasileira atingiu 36 bilhões de litros, cerca de, 11% superior a 2018 (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2019). Frente a estas informações diversos investimentos foram feitos nesta matéria prima, reafirmando seu potencial dentro do setor de biocombustíveis e para a matriz energética brasileira (MOHANTY; SWAIN, 2019).

Entretanto, nos últimos anos a crescente expansão da agricultura levou ao acúmulo de uma grande quantidade de resíduos lignocelulósicos em todo o mundo (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016; BHARAGAVA, 2019). Estes resíduos são o excedente da mistura de ações envolvendo a produção de safras e processos de colheita, e podem envolver bagaços, sementes, palhas, caules, cascas, fiapos, farelos, polpas e fibras (SARSAIYA *et al.*, 2019).

Objetivando promover um destino mais nobre aos resíduos lignocelulósicos gerados, diversas aplicações têm sido investigadas para a produção de uma grande variedade de produtos de alto valor (monossacarídeos, oligossacarídeos, biocombustíveis, compostos bioativos, nanocelulose e subprodutos da lignina) (Figura 3) (BHOWMICK; SARMAH; SEN, 2018).

Figura 3: Valorização de resíduos lignocelulósicos em produtos de alto valor.



A valorização dos resíduos de biomassa é baseada na utilização de constituintes químicos, como carboidratos e frações não carboidratos da biomassa, para produzir produtos comercialmente viáveis como os monossacarídeos, oligossacarídeos, biocombustíveis, moléculas bioativas, nanocelulose e subprodutos da lignina. Fonte: Adaptado de Cho *et al.*, (2020).

Para a obtenção destes bioprodutos é necessário que ocorra a hidrólise dos principais polímeros presentes nos resíduos lignocelulósicos, sendo estes: a celulose, hemicelulose e a lignina (YOUSUF; PIROZZI; SANNINO, 2020).

Neste sentido, o método inicial para acesso a estas fibras é através de pré-tratamentos que podem ser químicos, físicos, termoquímicos e/ou biológicos (VIDAL; HORA, 2011). O objetivo do pré-tratamento é a recuperação máxima destes biopolímeros que deverão ser utilizados nas etapas subsequentes de sacarificação e fermentação (ENSHASY *et al.*, 2016; MICHELIN *et al.*, 2017). A sacarificação ou hidrólise enzimática tem como objetivo desconstruir eficientemente os biopolímeros em

monômeros de açúcares fermentescíveis (principalmente glicose e xilose) por microrganismos. Estas etapas são consideradas muito caras e os “gargalos” no processo de produção, de bioprodutos.

Durante anos, o direcionamento da maioria das pesquisas no desenvolvimento de tecnologias de etanol E2G estava focado majoritariamente no reaproveitamento da celulose. Entretanto, atualmente viu-se a importância econômica da bioconversão do conteúdo de hemicelulose em bioprodutos de alto valor agregado (xilitol, xilo-oligômeros e biocombustíveis) (AJAO *et al.*, 2018).

A desconstrução dos resíduos lignocelulósicos, em especial da hemicelulose, é realizada por enzimas denominadas hemicelulases (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018; MALGAS *et al.*, 2019; FU *et al.*, 2019). O complexo xilanolítico presente dentro do grupo das hemicelulases é composto por xilanases que podem ser do tipo endo- β -(1 \rightarrow 4)-xilanases e β -xilosidases, e as enzimas acessórias: α -L-arabinofuranosidases, feruloil esterases, esterases de ácido *p*-coumárico, α -D-glicurônidas e acetil xilano esterases. Dentre estas, as xilanases se destacam por realizarem a hidrólise do principal componente da hemicelulose, a xilana (POLIZELI *et al.*, 2005; WALIA *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2019).

A xilana é um polímero constituído de repetições de xilose (açúcares de cinco carbonos - 5C) e é considerado o segundo polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza representando, cerca de 35% da massa seca da madeira e de resíduos agrícolas (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018). Os principais produtos de hidrólise da xilana incluem a xilose, xilobiose e os xilo-oligossacarídeos (XOS) (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018; MALGAS *et al.*, 2019; FU *et al.*, 2019).

Uma aplicação muito discutida, porém pouco explorada, é a utilização dos XOS. A importância comercial dos xilo-oligômeros se baseia nas propriedades nutracêuticas benéficas para a micro-flora intestinal humana e animal, podendo ser incorporados aos produtos alimentares. Porém, a produção de XOS é apenas uma das diversas aplicações que podem ser feitas através da utilização de xilanases (HONG *et al.*, 2019).

Outras aplicações envolvem a clarificação de sucos, melhora na consistência de cervejas, na digestibilidade de rações animais e produção de açúcares fermentescíveis para conversão em bioprodutos, nos quais a utilização destas enzimas auxiliaria na redução do impacto ambiental ocasionado pelo descarte incorreto dos resíduos lignocelulósicos (JUTURU; WU, 2012; TORRE; KADOWAKI, 2017).

Os microrganismos produtores de xilanases variam desde protozoários e fungos, a bactérias e leveduras, sendo os mais importantes para produção em escala industrial os

fungos filamentosos por secretarem grandes quantidades destes biocatalisadores para o meio extracelular (POLIZELI *et al.*, 2005; CHADHA *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2019; KANGO; JANA; CHOUKADE, 2019).

Neste contexto, algumas características enzimáticas que são consideradas importantes para o estudo e aplicação biotecnológica envolvem: a alta eficiência, quimiotolerância (pH, sais, solventes e outros), termofilia e termotolerância, e outras condições adversas que são encontradas em processos industriais. Dentre estas, a termofilia e termotolerância se destacam devido ao fato de alguns processamentos serem realizados em altas temperaturas e pHs extremos, como ex. o biobranqueamento da polpa celulósica (JUTURU; WU, 2012; WALIA *et al.*, 2017). Além disso, o microrganismo produtor deve ser de fácil cultivo (fontes nutricionais estáveis e de baixo custo) e escalonável.

Trabalhos anteriores relataram que fungos termofílicos do gênero *Humicola* se mostraram promissores na produção de hidrolases glicosídicas consideradas atípicas e eficientes (MASUI *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2015; FARIA *et al.*, 2020). Dentre estes, *Humicola brevis* var. *thermoidea*, quando cultivado em farelo de trigo e água 1:2 (m/v), foi capaz de expressar altas quantidades de β -glucosidases ($20,7 \pm 1,5$ U g⁻¹) e xilanases ($5.327,4 \pm 370,7$ U g⁻¹) tolerantes a altas temperaturas e pHs alcalinos que são altamente eficientes para hidrolisar substratos ricos em celulosas e hemicelulosas, respectivamente (MASUI *et al.*, 2012).

Desta forma, o foco deste trabalho foi realizar a produção, purificação, caracterização e avaliação do potencial biotecnológico da endo-xilanase produzida pelo fungo termófilo *H. brevis* var. *thermoidea*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa lignocelulósica

Os materiais lignocelulósicos são a fonte de biopolímeros mais abundante encontrado na natureza, representando aproximadamente de 60 a 65% da biomassa vegetal (YOUSUF; PIROZZI; SANNINO, 2020). Estes materiais podem ser categorizados como toda a biomassa acima do solo (galhos, folhagens, caules e frutos), abaixo do solo (raízes) e proveniente de madeiras mortas (ARIFFIN; SAPUAN; HASSAN, 2019). Além de serem subdivididos em outros seis grupos, sendo estes: resíduos de colheitas (bagaço de cana e palha de milho), madeira de lei (álamo e alpino), madeira de conífera (pinheiros), resíduos celulósicos (papel), biomassa de herbáceas (feno de alfafa) e resíduos sólidos municipais (papelão, caixas de cereais e jornal (RODRIGUES *et al.*, 2017). Tornando-os uma alternativa rentável para pequenos produtores que queiram utilizar materiais renováveis.

Dentre as principais fontes de resíduos lignocelulósicos encontra-se o agronegócio. De acordo com Rodrigues *et al.*, (2017), a oferta de agrosíduos mundiais corresponde, cerca de, 290 milhões de toneladas produzidas de culturas de cereais, 300 milhões da produção de sementes e 54 milhões de outros tipos de cultura que podem ser somadas com aqueles não comestíveis, incluindo os caules e palhas, que são descartados como resíduos.

O Brasil destaca-se no agronegócio por conter uma grande área cultivável de grãos, cereais, frutas e principalmente cana-de-açúcar. O último levantamento da safra de inverno de 2020 pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) mostrou que foram produzidas, cerca de, 2,93 milhões de toneladas de algodão; 11,2 milhões de toneladas de arroz; 3,18 milhões de toneladas de feijão; 102,1 milhões de toneladas de milho; e 120,9 milhões de toneladas de soja, gerando, portanto, uma grande quantidade de subprodutos, como os resíduos lignocelulósicos.

Os resíduos lignocelulósicos gerados são constituídos principalmente por biopolímeros incluindo a celulose, hemicelulose e lignina (RODRIGUES *et al.*, 2017; YOUSUF; PIROZZI; SANNINO, 2020). A quantidade destes biopolímeros é variável entre os materiais lignocelulósicos (Tabela 1) e tem atraído considerável atenção pelo potencial de bioconversão em produtos de alto valor agregado, como açúcares, ácidos orgânicos, oligossacarídeos e biocombustíveis (YADAV; KUMAR; SEHRAWAT, 2019; OKOLIE *et al.*, 2020).

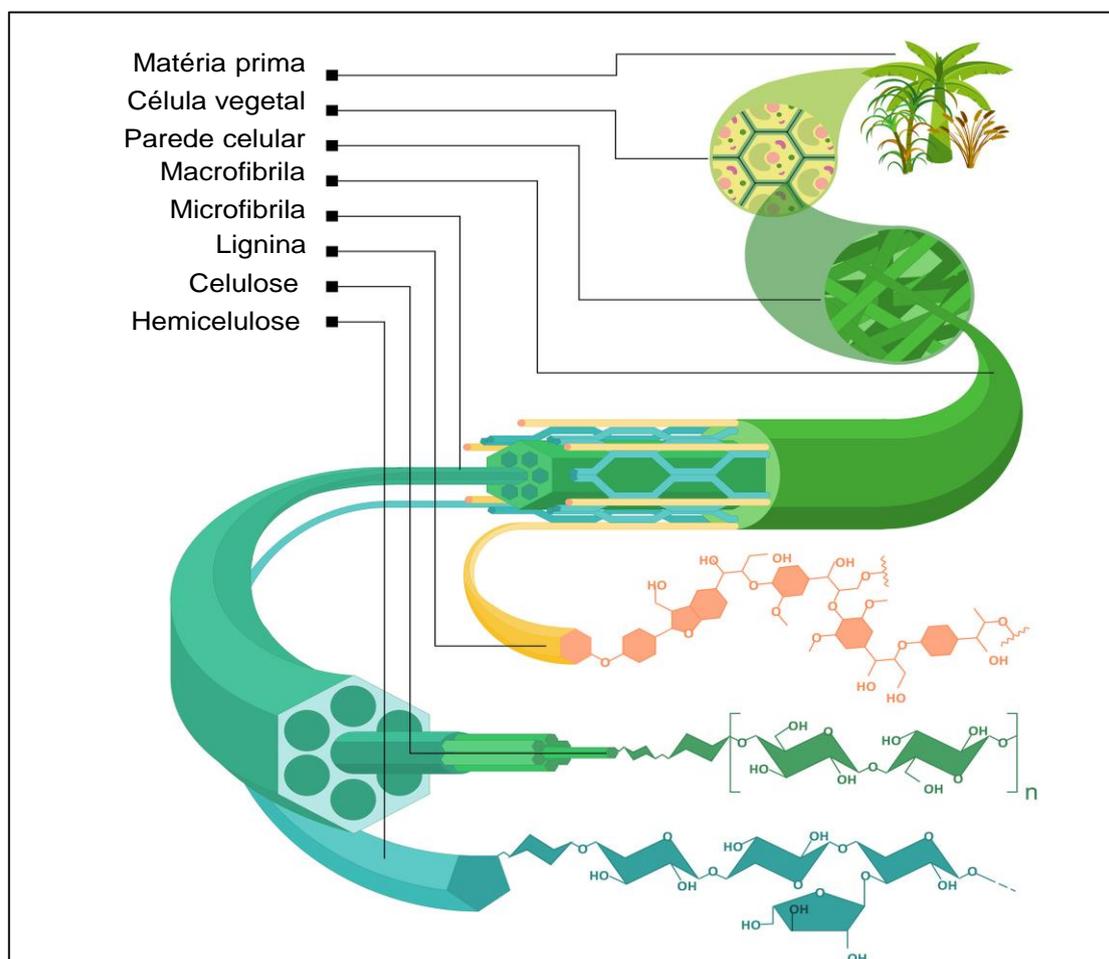
Tabela 1: Teor de celulose, hemicelulose e lignina em diferentes materiais lignocelulósicos.

Material lignocelulósico	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Palha de trigo	29 - 35	26 - 32	16 - 21
Gramíneas	25 - 40	25 - 50	30
Bagaço de cana-de-açúcar	42	25	20
Palha de arroz	38	26	19
Espiga de milho	45	35	15
Palha de milho	38	26	19
Casca de banana	13	14	14

Fonte: Adaptado de Yadav, Kumar e Sehrawat, (2019).

Essas estruturas ligam-se umas as outras por ligações de hidrogênio de maneira rígida e hierárquica, impedindo que haja a interação de moléculas de água e a ação de microrganismos (Figura 4) (GUERRIERO *et al.*, 2016).

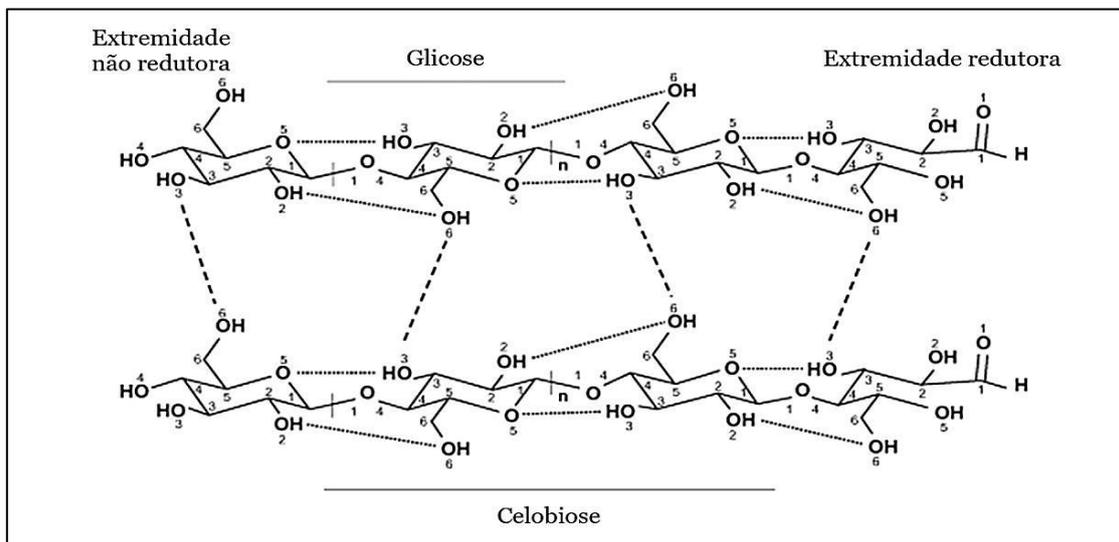
Figura 4: Representação esquemática da estrutura da biomassa lignocelulósica.



O esquema mostra os principais componentes que formam a estrutura de resíduos lignocelulósicos. A matéria-prima (biomassa) é formada pela união de várias células vegetais. Cada célula contém uma parede celular responsável pelo transporte de nutrientes, comunicação e barreira contra patógenos. A estrutura da parede contém fibrilas de celulose que se cruzam formando o aspecto de malha. A celulose se liga a hemicelulose por ligações de hidrogênio e ambos os polissacarídeos realizam ligações covalentes com a lignina. Fonte: Adaptado de Magalhães *et al.*, (2019).

A celulose é o polissacarídeo mais abundante encontrado nos materiais lignocelulósicos. Sua estrutura é formada por cadeias contendo de 10 a 20 mil unidades de glicose (β -D-glicopirranose) unidos através ligações β -(1 \rightarrow 4)-glicosídicas (Figura 5) (KLEMM *et al.*, 2005; SOMERVILLE, 2006; CRANG; LYONS; WISE, 2018). A ausência de cadeias laterais permite que a glicose seja empacotada firmemente em decorrência de interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio, através dos grupos hidroxila (-OH) presentes nas unidades de glicose (SOMERVILLE, 2006). A complexa rede de interações a torna uma estrutura cristalina insolúvel e relativamente resistentes a soluções alcalinas e agentes oxidantes (MAHMUD *et al.*, 2019). No entanto, ao longo da estrutura da celulose há regiões desordenadas denominadas de amorfas (SOMERVILLE, 2006).

Figura 5: Estrutura da celulose demonstrando o padrão de ligações de hidrogênio inter e intracadeia.



No esquema acima as unidades de glicose estão dispostas em um ângulo de 180° entre si e cada dímero de glicose formam as unidades repetitivas de celobiose. A junção de várias unidades de celobiose formam a celulose contendo as extremidades redutora e não redutora. Cada unidade de glicose apresenta três grupos hidroxilas (OH), um primário no carbono 6 e dois secundários nos carbonos 2 e 3, que exibem diferentes polaridades e podem estar envolvidas em ligações intra e intermoleculares. Linhas tracejadas: ligações de hidrogênio intercadeias; Linhas pontilhadas: ligação de hidrogênio intracadeia. Fonte: Adaptado de Ciolacu, (2018).

Nas regiões cristalinas as redes de interações inter e intramoleculares, bem como as orientações moleculares, podem variar originando polimorfos de celulose. São essas regiões que são extraídas, resultando na celulose nanocristalina (CNC) (GEORGE; SABAPATHI, 2015). Em plantas superiores, a celulose desempenha um papel essencial como elemento de reforço na parede celular, geralmente em conjunto com a hemicelulose e a lignina podendo ser considerada um bio-nanocompósito, que resulta de uma interação única entre essas estruturas (SOMERVILLE, 2006).

Após a celulose, a hemicelulose é considerada o segundo polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza. O termo hemicelulose compreende um grupo heterogêneo de polímeros que contém diferentes unidades de açúcares unidos através de ligações β -(1 \rightarrow 4) glicosídicas, incluindo as pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose e ramnose) e açúcares acetilados, podendo apresentar adicionalmente ramificações de ácidos urônicos (SCHELLER; ULVSKOV, 2010; ZHU; XIN; GU, 2019).

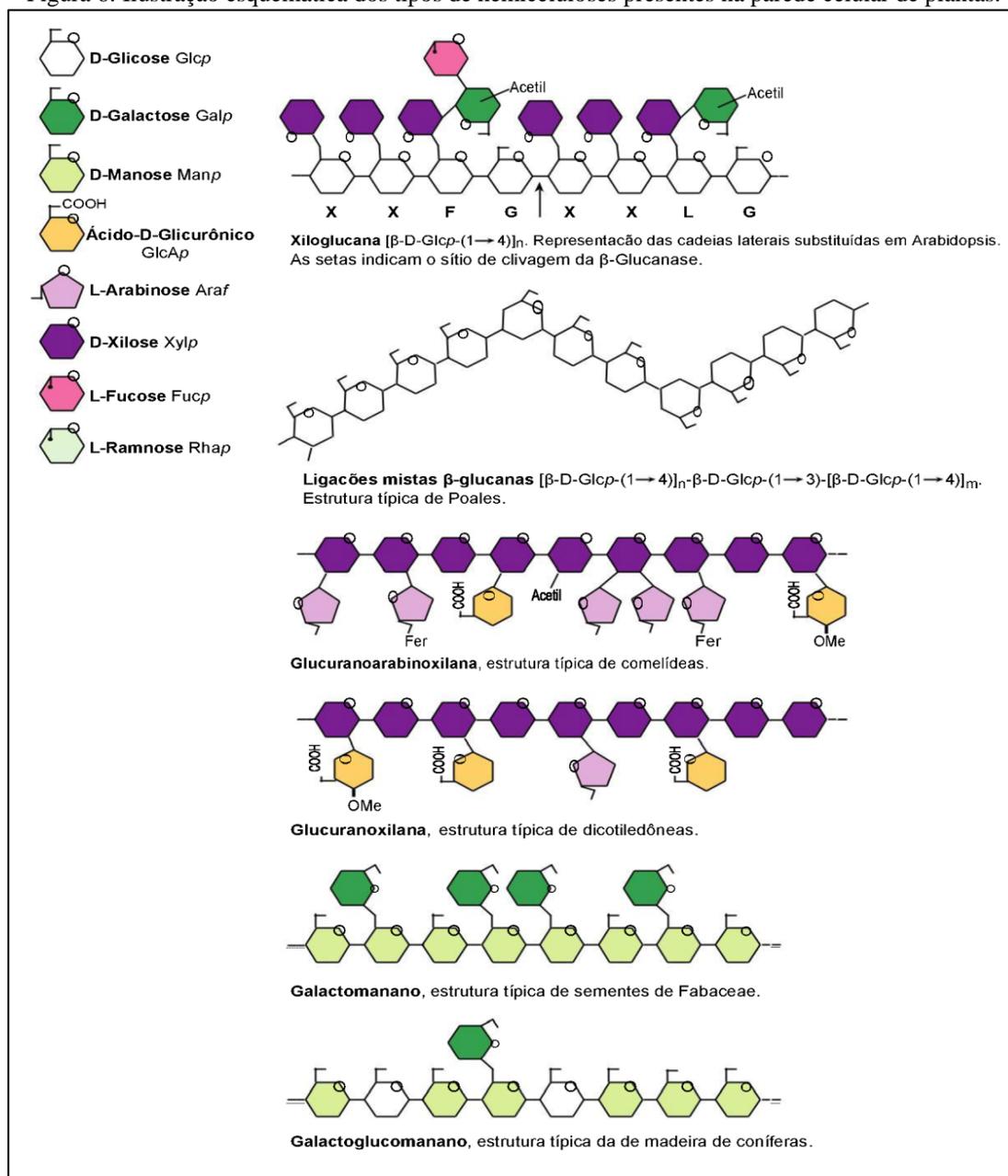
Devido à heterogeneidade estrutural deste polissacarídeo, este foi subdividido em 4 grupos de acordo com a prevalência do açúcar em sua cadeia principal, sendo estes: as xiloglucanas, xilanas (xilana simples, arabinoxilana, glucuranoxilana e glucuranoarabinoxilana), mananas (manana simples, glucomananas, galactomananas e glucogalactomananas) e β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)-glucanas (Figura 6) (PAULY *et al.*, 2013).

As xilanas se destacam por serem as mais abundantes dentro da hemicelulose. Consistem principalmente de uma estrutura formada por unidades de xilose unidas através de ligações β -(1 \rightarrow 4) glicosídicas e ramificações cujas proporções variam de acordo com a origem do tecido da planta, podendo ser amplamente classificadas como homoxilanas, arabinoxilanas, glucuranoxilanas ou glucuranoarabinoxilanas (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018).

As homoxilanas são formadas por uma cadeia simples de unidades de xilose e podem ser encontradas por ex. em madeiras de carvalho e faia. Por outro lado, as arabinoxilanas são os principais constituintes da parede de células vegetais, especialmente em grãos cereais, consistindo em uma cadeia principal de resíduos de xilose com ramificações de arabinose que são ligados ao oxigênio 2 ou 3 da xilose (KISZONAS; FUERST; MORRIS, 2013). Ademais, os resíduos de arabinose podem ter ligações adicionais ao ácido ferúlico podendo formar reticulações covalentes com a lignina ou grupos de ácido ferúlico presentes em outras cadeias de arabinoxilana (SCHELLER; ULVSKOV, 2010; PAULY *et al.*, 2013). Já as glucuranoxilanas são encontradas principalmente em madeiras, ervas, plantas lenhosas e consistem normalmente de uma estrutura de xilose com resíduos de ácido 4-O-metil- α -D-glicurônico ligados ao oxigênio 2 da xilose.

Por fim, as glucuranoarabinoxilanas são encontradas normalmente na lignocelulose de gramíneas como ex. bagaço de cana de açúcar e contém cadeias laterais de arabinofuranosil, ácidos 4-O-metil- α -D-glicurônico e acetil ligadas à cadeia principal de xilose, refletindo a composição atual da biomassa que é direcionada para a produção de bioprodutos (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018; ZHU; XIN; GU, 2019).

Figura 6: Ilustração esquemática dos tipos de hemiceluloses presentes na parede celular de plantas.



As letras sob a molécula de xiloglucano (XYFG) ilustram os símbolos usados para as cadeias laterais mais comuns. O padrão de ramificação dos xiloglucanos é de significância tanto funcional quanto taxonômica, pois, xiloglucanos menos ramificados são menos solúveis e isso pode se correlacionar com aspectos funcionais. Os glucanos ligados a β - (1 \rightarrow 4) com ligações β - (1 \rightarrow 3) únicas intercaladas são bem conhecidos em gramíneas (Poales). “Fer” representa a esterificação com ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicínâmico), que é característico de xilanos em monocotiledôneas comelinídeas. As glucuranoarabinoxilanas feruladas são encontrados em todas as monocotiledôneas comelinídeas com exceção de Arecales (palmeira). Polissacarídeos β -(1 \rightarrow 4) contendo manose são amplamente distribuídos e a hemicelulose principal em Carófitas (algas verdes). A cadeia principal pode consistir inteiramente de manose, como nos mananos e galactomananos, ou com manose e glicose em um padrão não repetido como nos glucomananos e galactoglucomananos. Mananas e glucomananas são frequentemente acetiladas. Fonte: Adaptado de Scheller e Ulvskov, (2010).

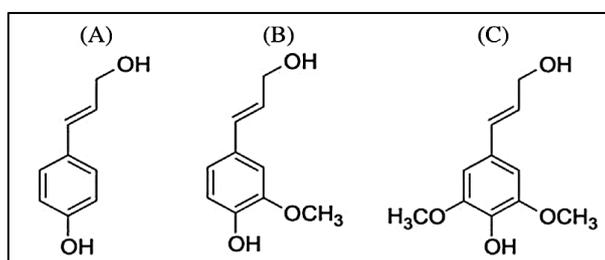
Embora as proporções relativas dos polissacarídeos presentes nas paredes celulares vegetais (que são direcionadas como matérias-primas para produção

bioprodutos) sejam geralmente conhecidas, a falta de conhecimento sobre como os açúcares individuais que estão quimicamente ligados dentro da parede representam uma limitação importante para projetos de coquetéis enzimáticos para hidrólise eficiente da biomassa.

Por fim, a lignina é considerada um dos componentes mais complexos presentes na biomassa lignocelulósica. Durante o desenvolvimento celular é incorporada como o último componente a parede, interpenetrando as fibrilas de celulose para promover o fortalecimento celular (CRANG; LYONS; WISE, 2018). Do ponto de vista morfológico é considerada um heteropolímero amorfo de três precursores do álcool cinâmico (álcool sinapílico, coniferílico e *p*-cumarílico) ligados uns aos outros por ligações alquil-alquil, alquil-aril e aril-aril (Figura 7) (RALPH; LAPIERRE; BOERJAN, 2019). Esses precursores consistem em um anel aromático de até dois grupos metoxi e uma cadeia lateral de três carbonos, que formam uma rede tridimensional dentro da parede celular (LU; RALPH, 2010).

Dentre os tipos de lignina originados através destas interações, pode-se citar a guaiacil, guaiacil sirigil e a *p*-hidroxifenil lignina. A guaiacil é composta principalmente por unidades de álcool coniferílico, enquanto que a guaiacil sirigil contém unidades de álcool coniferílico e sinapílico. Por outro lado, a *p*-hidroxifenil é composta por monômeros de álcool *p*-cumarílico (SHARMA; KUMAR, 2020). Em geral, a guaiacil é encontrada em angiospermas, enquanto a guaiacil sirigil e *p*-hidroxifenil estão presentes em gimnospermas e gramíneas, respectivamente (HATAKEYAMA; HATAKEYAMA, 2010; LU; RALPH, 2010; RALPH; LAPIERRE; BOERJAN, 2019).

Figura 7: Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides.



(A) Álcool *p*-cumarílico; (B) Álcool coniferílico; (C) Álcool sinapílico. Fonte: Adaptado de Yousuf, Pirozzi e Sannino, (2020).

Essas estruturas favorecem para que a lignina adquira propriedades recalcitrantes tornando-a o componente mais difícil de ser extraído da lignocelulose. Desta forma, fazendo-se necessário a utilização de pré-tratamentos para separá-la totalmente da biomassa (KUMAR; SHARMA, 2017).

2.2 Obtenção e aplicações da hemicelulose e seus derivados

As aplicações potenciais das hemiceluloses têm atraído um volume crescente de pesquisas devido às suas propriedades físico-químicas e biodegradabilidade (SAHA, 2003; AJAO *et al.*, 2018; NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018). No entanto, este polissacarídeo precisa ser primeiramente obtido, através de métodos que visam a sua despolimerização da biomassa lignocelulósica e posterior fracionamento com índices de rendimento otimizados (ARORA *et al.*, 2020).

A hemicelulose pode ser obtida através de pré-tratamentos que podem ser químicos, físicos, termoquímicos ou biológicos, ou uma associação entre algumas destas técnicas (RAJENDRAN *et al.*, 2017). O tratamento químico com ácido diluído 2–5% (v/v) em temperaturas acima de 160 °C é uma forma eficaz para a extração e conversão da hemicelulose em açúcares monoméricos e produtos de degradação como o furfural ou 5-hidroxi metilfurfural (CANILHA *et al.*, 2011; MICHELIN *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2018).

Por outro lado, a extração química alcalina é considerada uma das mais eficazes para o rendimento de hemiceluloses de alto peso molecular (NASCIMENTO *et al.*, 2016; RAJAGOPALAN; SHANMUGAVELU; YANG, 2017). O tratamento alcalino dissolve em condições moderadas as porções de hemicelulose e lignina presentes nos materiais lignocelulósicos, diminuindo a cristalinidade da celulose resultando em duas frações, uma líquida (xilo-oligômeros e lignina) e outra sólida (celulose) (KIM; LEE; KIM, 2016). Ademais, este pré-tratamento promove a quebra das ligações éster que reticulam a lignina e a xilana, proporcionando a deslignificação e o aumento da porosidade da biomassa (XU; SUN, 2016). No entanto, os maiores impedimentos das extrações alcalinas envolvem a corrosão da superfície de reatores, incrustação por sílica e o tratamento da água efluente. Desta forma, fazendo-se necessária a utilização de pré-tratamentos que sejam mais amigáveis ao meio ambiente.

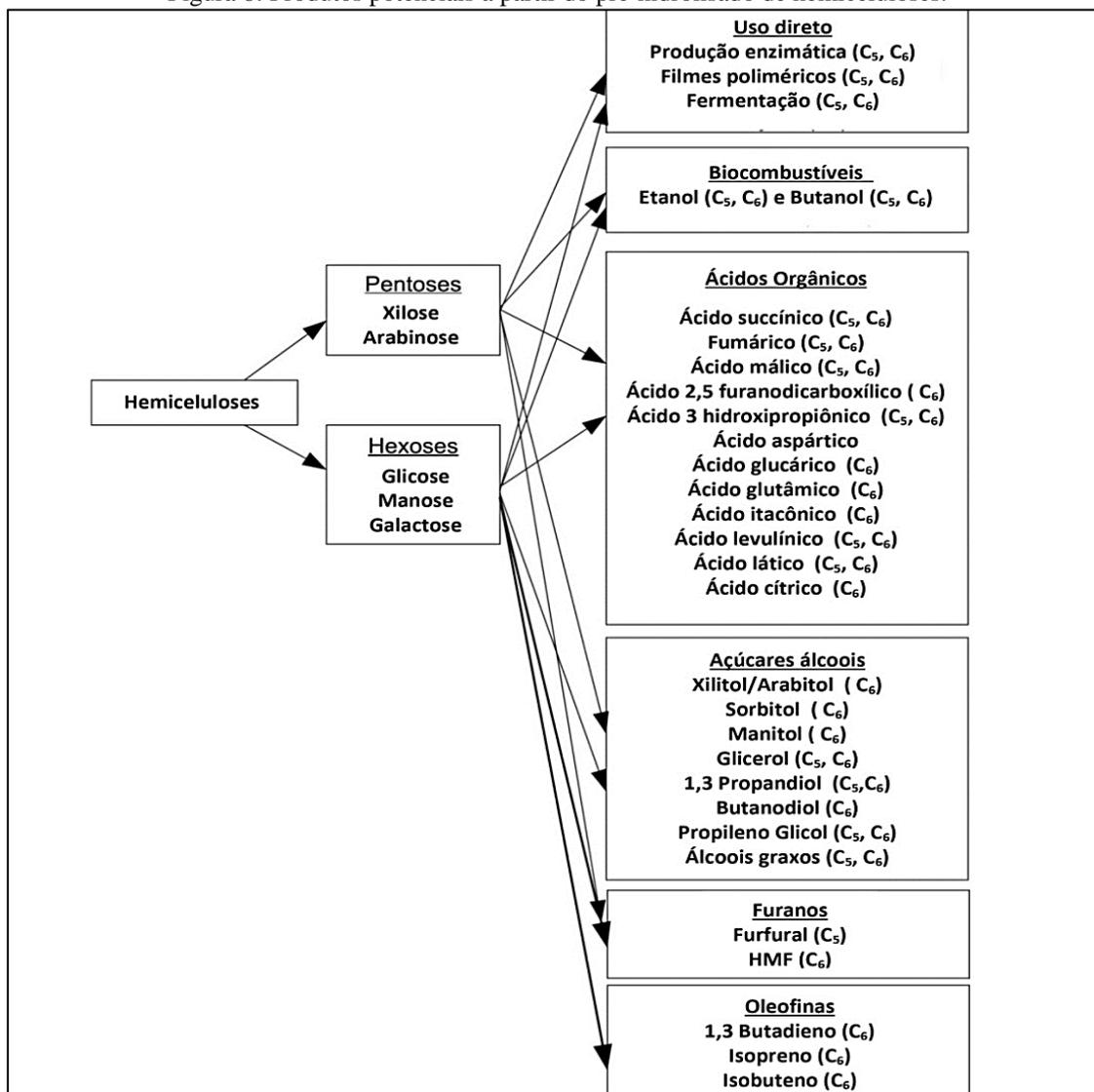
Dentre as metodologias consideradas ecologicamente corretas, estão o pré-tratamento biológico e o hidrotérmico. O pré-tratamento biológico faz o uso de microrganismos capazes de produzir enzimas que degradam os componentes presentes na lignocelulose para a produção de derivados (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016; SHARMA *et al.*, 2017). No entanto, os tempos de tratamento variam entre 10-14 dias, o que torna o processo desvantajoso para fins industriais.

O tratamento hidrotérmico é um processo que utiliza apenas água como meio de reação sob alta pressão e temperatura (XIAO; SONG; SUN, 2017; POLETTO *et al.*, 2020). Dentre os tratamentos hidrotérmicos a explosão a vapor é amplamente utilizada para a separação dos constituintes presentes na lignocelulose. Durante este tratamento, a água pressurizada em temperaturas acima de 120 °C é submetida a ionização formando íons hidrônio que induzem a despolimerização parcial da hemicelulose. A clivagem de grupos acetil presentes na estrutura dos açúcares C5 e C6 da hemicelulose, conseqüentemente, levam à formação adicional de íons hidrônio (GALLINA *et al.*, 2018). Posteriormente, a explosão causada pela rápida liberação da pressão rompe as ligações entre os constituintes da lignocelulose, formando ao final frações distintas de celulose, hemicelulose e lignina (JEONG; LEE, 2015).

Dentre os materiais lignocelulósicos, o bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é amplamente utilizado como fonte de biopolímeros para produção de açúcares e oligossacarídeos (SINGH *et al.*, 2007; BATALHA *et al.*, 2015; SILVEIRA *et al.*, 2018; SCARCELLA *et al.*, 2021). O bagaço recuperado nos canaviais é composto de aproximadamente 50% de celulose, 30% de hemicelulose e 20% de lignina, podendo ser variável (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016). Após o processo de pré-tratamento hidrotérmico, Robl *et al.*, (2016) relatam que o bagaço pré-tratado resultou em uma fração líquida rica em hemiceluloses e uma fração sólida contendo as seguintes composições: $56,03 \pm 0,26\%$ de celulose, $4,59 \pm 0,40\%$ de hemicelulose, $36,36 \pm 0,34\%$ de lignina e $4,24 \pm 0,14\%$ de cinzas.

As pentoses e hexoses presentes na fração líquida podem ser usadas diretamente para o cultivo de leveduras, produção de enzimas e filmes poliméricos, ou convertidos através de métodos químicos ou bioquímicos (fermentação) em produtos como os biocombustíveis, açúcares álcoois, ácidos orgânicos, furanos ou oleofinas (Figura 8) (AJAO *et al.*, 2018; QASEEM; SHAHEEN; WU, 2021). Por outro lado, a fração sólida, contendo a celulose e porções de hemicelulose e lignina residuais, pode ser encaminhada para processos de sacarificação com coquetéis enzimáticos para aumentar o rendimento de açúcares fermentescíveis (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018).

Figura 8: Produtos potenciais a partir do pré-hidrolisado de hemiceluloses.



Na ilustração estão representadas as possíveis rotas de aproveitamento das pentoses e hexoses obtidas a partir da hemicelulose pré-tratada. As aplicações diretas envolvem a fermentação, produção enzimática e a produção de filmes poliméricos. Já as aplicações indiretas envolvem processos de conversão que podem ser químicos ou bioquímicos para a produção de derivados incluindo os biocombustíveis, açúcares álcoois, furanos e oleofinas. Fonte: Adaptado de Ajao *et al.*, (2018).

Os coquetéis enzimáticos reproduzem os processos naturais de hidrólise que ocorrem no meio ambiente, auxiliando na clivagem e/ou modificações de ligações específicas nos componentes das fibras lignocelulósicas (BALA; SINGH, 2017). O conjunto de enzimas responsáveis pela sacarificação da hemicelulose são as hemicelulases. Dentre as hemicelulases, as xilanases se destacam por hidrolisarem as frações de xilana presentes na hemicelulose (CHADHA *et al.*, 2019).

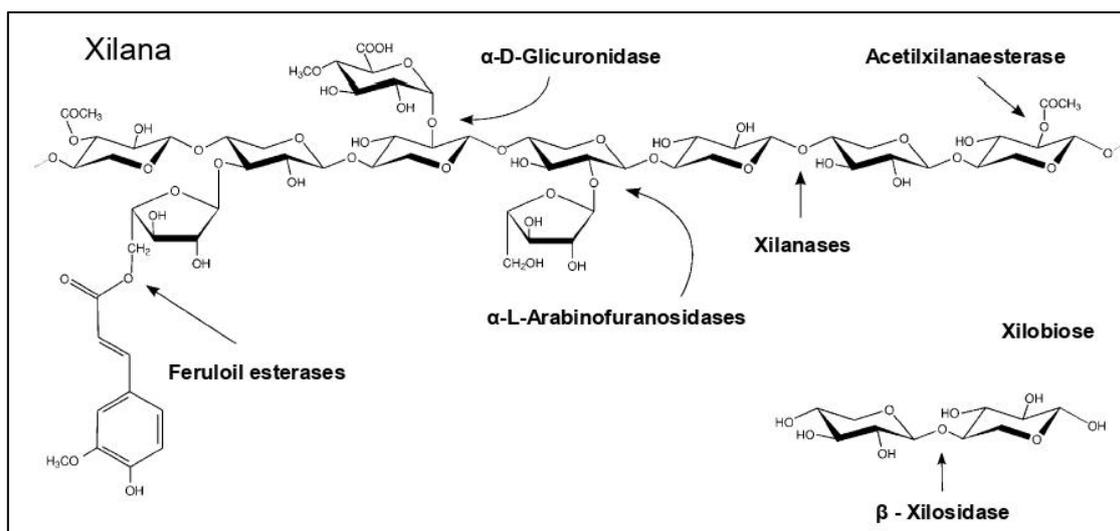
2.2.1 Xilanases e o complexo xilanolítico

As xilanases são hemicelulases pertencentes ao complexo xilanolítico e atuam em sinergismo para realizarem a completa hidrólise da xilana em seus açúcares constituintes

(ALOLIKA; SINGH, 2019). Podem ser do tipo endo- β -(1 \rightarrow 4)-xilanases (EC 3.2.1.8) e β -xilosidases (EC 3.2.1.37), e atuam em conjunto com enzimas acessórias: α -L-arabinofuranosidas (EC 3.2.1.55), α -D-glicuronidas (EC 3.2.1.139), acetil xilano esterases (EC 3.1.1.72), Feruloil esterases (EC 3.1.1.73) e esterases de ácido *p*-coumárico (EC 3.1.1.B10) (Figura 9) (MICHELIN *et al.*, 2017).

As endo- β -(1 \rightarrow 4)-xilanases clivam as ligações glicosídicas internas da estrutura da xilana ocasionando uma redução no grau de polimerização do substrato. A xilana não é clivada aleatoriamente, as ligações selecionadas para hidrólise dependem da natureza da molécula do substrato, ou seja, do comprimento da cadeia, do grau de ramificação e da presença de substituintes (POLIZELI, *et al.*, 2005; BALA; SINGH, 2017). Inicialmente, os principais produtos da hidrólise são os xilo-oligômeros β -D-xilopiranosil, mas em um estágio posterior, pequenas moléculas como di e trissacarídeos podem ser produzidos (GONÇALVES *et al.*, 2012).

Figura 9: Estrutura da hemicelulose e modo de ação das hemicelulases.



A cadeia principal de xilana é composta por resíduos de D-xilose ligados em β →1,4. Esta estrutura pode ser substituída de várias maneiras por cadeias laterais de resíduos arabinosil, glucuranosil, metilglucuranosil, acetil, feruloil e *p*-coumaroil. A hidrólise da estrutura da xilana é realizada por xilanases que podem ser do tipo endo-xilanases (realizam a hidrólise das ligações internas da xilana liberando xilo-oligômeros) ou β -xilosidases (realizam a hidrólise dos xilo-oligômeros em xilobiose e monômeros de D-xilose), enquanto que a remoção de cadeias laterais da xilana é catalisada por α -L-arabinofuranosidas, α -D-glicuronidas, acetil xilano esterases, feruloil esterases e esterases de ácido *p*-cumárico. Fonte: Adaptado de Javier *et al.*, (2007).

Atuando em conjunto com as endo-xilanases, as β -xilosidases hidrolizam os xilo-oligômeros em xilobiose, liberando resíduos β -D-xilopiranosil do terminal não redutor. As β -xilosidases purificadas geralmente não hidrolisam a xilana, seu melhor substrato é a xilobiose e sua afinidade pelos xilo-oligômeros é inversamente proporcional ao seu grau de polimerização (GONÇALVES *et al.*, 2012; CHADA *et al.*, 2019).

Já as α -L-arabinofuranosidasas, α -D-glicuronidasas e acetil xilano esterases removem a arabinose, os substituintes do ácido 4-O-metil glicurônico e acetil das cadeias de xilana, respectivamente. Enquanto que as feruloil esterases e esterases de ácido *p*-coumárico clivam as ligações éster entre os grupos laterais de arabinose e ácido ferúlico e *p*-coumárico, respectivamente (SINGH *et al.*, 2019).

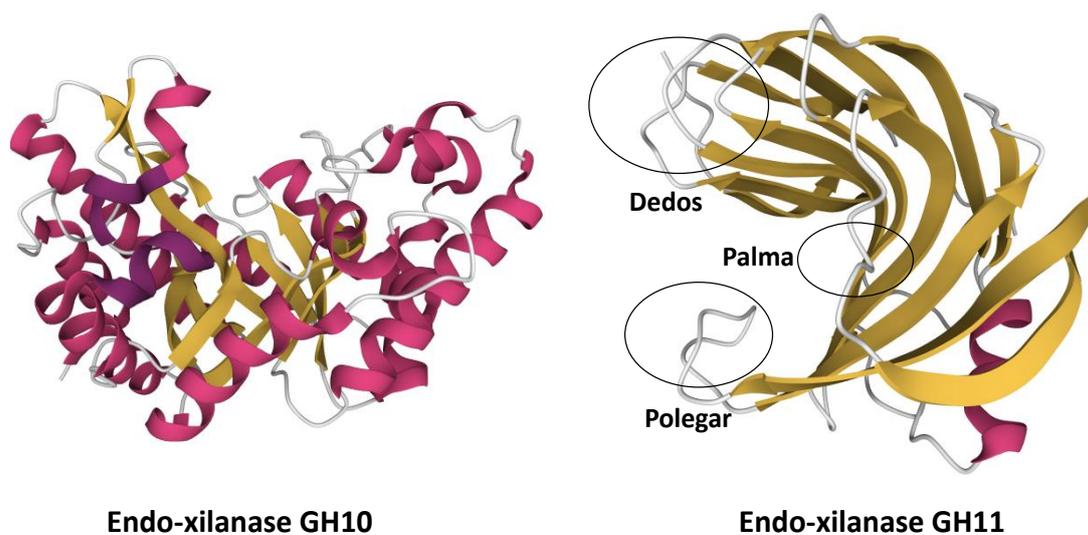
2.2.2 Classificação estrutural e modo de ação das xilanases

Em relação a classificação estrutural e organização, Henrissat e Bairoch (1993) propuseram um sistema de agrupamento no qual é baseado em comparações da estrutura primária e dos sítios catalíticos. Este é o mais aceito hoje por fornecer informações estruturais, mecanismos de ação e evolução dentro do grupo, sendo denominado de enzimas ativas carboidratos ou hidrolases de glicosídeos (GH) (<http://www.cazy.org/>).

As hidrolases de glicosídeos constituem um grupo extenso de enzimas, que inclui aquelas que catalisam a clivagem de ligações glicosídicas entre carboidratos ou entre um carboidrato e uma porção não carboidrato (NAUMOFF, 2011). Com base na similaridade de sequência do domínio catalítico, as xilanases foram classificadas em 13 famílias dentro das GHs (GH5, 7, 8, 10, 11, 16, 26, 30, 43, 44, 51, 62 e 98) (BASIT *et al.*, 2018). Dentre estas, as mais estudadas e abundantes nos fungos filamentosos são as pertencentes às famílias GH10 e 11 (GONÇALVES *et al.*, 2015).

As endo-xilanases GH10 (anteriormente conhecidas como F) são enzimas de peso molecular elevado (>30 kDa) sua estrutura apresenta 8 dobras em forma de barril (β/α) criando o formato de "tigela de salada", com loops estendidos criando uma fenda catalítica que contém de quatro a cinco subsítios de ligação para a xilose (DODD; CANN, 2009). Em contrapartida, as endo-xilanases do tipo GH11 (anteriormente conhecidas como G) são enzimas que apresentam baixo peso molecular (<30 kDa), podem ser sub agrupadas com base em seus pontos isoelétricos (*pI*s alcalinos e ácidos) (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012). A estrutura das GH11 apresenta a forma de “ β -sanduíche” composta por folhas β paralelas e antiparalelas, e uma única α hélice que lembra o formato de uma “mão direita”, de maneira que as folhas β formam regiões conhecidas como “dedos”, “palma” e “polegar” (Figura 10) (JUTURU; WU, 2012; BASIT *et al.*, 2018).

Figura 10: Dobramento característico de uma endo-xilanase GH10 de *Aspergillus fumigatus* Z5 e GH11 de *T. lanuginosus*.



Representação típica de uma endo-xilanase GH10 mostrando a forma em “tigela de salada” constituída por 8 dobras em forma de barril (β/α) e de uma endo-xilanase GH11 contendo a representação estrutural β -sanduíche e as regiões reconhecidas como “polegar”, “palma” e “dedos”. As folhas β estão representadas em amarelo enquanto que as α hélices estão representadas em roxo. Fonte: Adaptado de Gruber *et al.*, (1998) e Miao *et al.*, (2018).

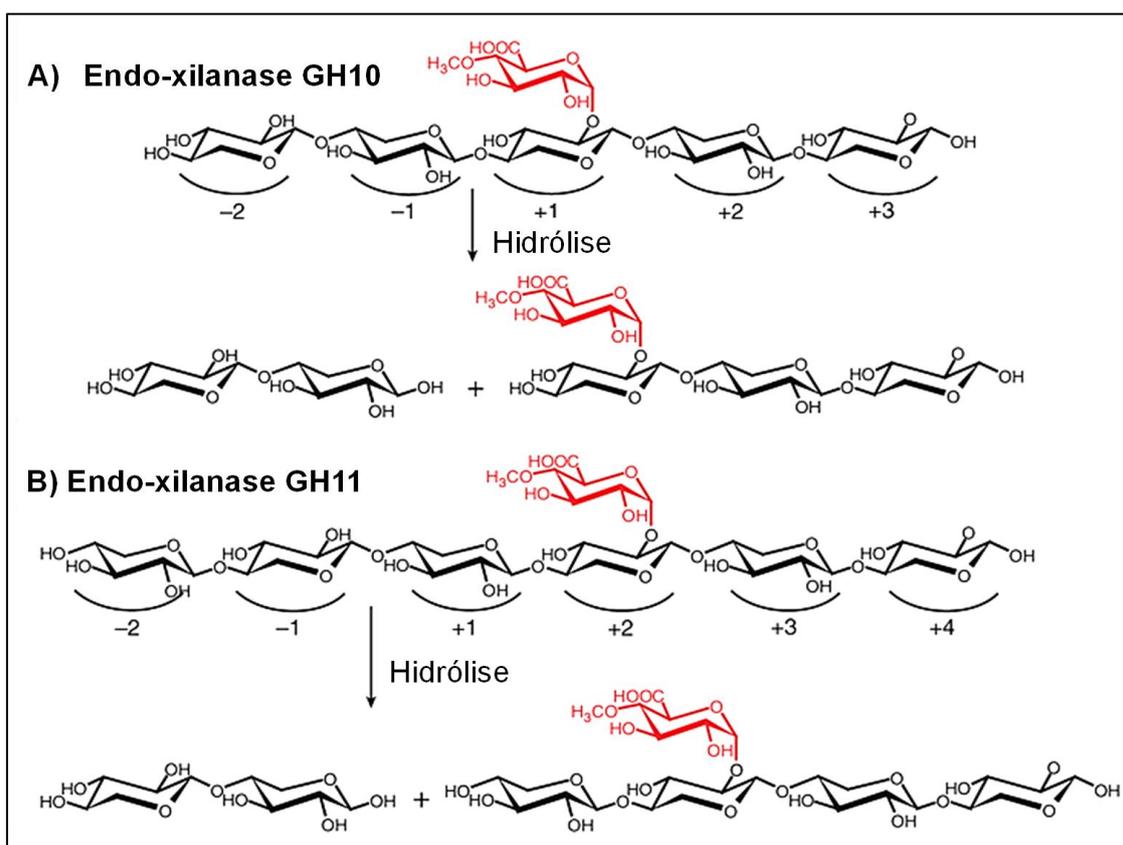
Algumas endo-xilanases GH10 e 11 podem ser consideradas modulares apresentando pelo menos dois módulos distintos: um domínio catalítico e um módulo de ligação a carboidratos (CBM). Os CBMs são estruturas que apresentam as seguintes funções: aumentar a superfície de contato com o substrato, ruptura não hidrolítica do substrato e modificações superficiais e interfaciais. Por outro lado, o domínio catalítico é a região responsável por acomodar o substrato e promover a sua conversão em produto (ENSHASY *et al.*, 2016).

O sítio ativo ou sítio de ligação ao substrato de endo-xilanases está comumente localizado dentro do domínio catalítico. Resíduos de aminoácidos aromáticos que revestem a parte interna do domínio catalítico, formam vários subsítios responsáveis por reconhecer e acomodar uma unidade monomérica de substrato, como a D-xilose (MOREIRA; FILHO, 2016). Os subsítios podem ser identificados com números positivos + n (para aqueles onde a extremidade redutora do substrato se liga) e números negativos - n (para aqueles onde a extremidade não redutora se liga) (POLLET; DELCOUR; COURTIN, 2010). O sítio catalítico contendo os resíduos de aminoácidos responsáveis pela clivagem da ligação xilosídica estão situados entre os subsítios -1 e +1 do substrato polissacarídeo (DODD; CANN, 2009).

As endo-xilanases GH11 podem apresentar até sete subsítios de reconhecimento que selecionam o substrato baseado na localização das ramificações presentes na cadeia

principal de xilana, uma vez que só pode hidrolisar ligações xilosídicas onde as duas frações de xilose, presentes nos subsítios (-1) ou (+1) não são ramificadas (KARLSSON *et al.*, 2018). Por outro lado, as endo-xilanases GH10 podem apresentar de quatro a cinco subsítios de ligação para o substrato e a sua atividade não é impedida pela presença de substituintes nos subsítios (-1) ou (+1) (Figura 11) (DODD; CANN, 2009; MOREIRA; FILHO, 2016). Desta forma, as endo-xilanases GH10 clivam estruturas de xilanas altamente decoradas e liberam xilo-oligômeros que contêm arabinose ou cadeias laterais glicurônicas na extremidade não redutora. Ademais, estas enzimas também realizam a hidrólise dos xilo-oligômeros solúveis produzidos pelas endo-xilanases GH11, sendo este o principal mecanismo sinérgico entre estas duas famílias enzimáticas (GONÇALVES *et al.*, 2015).

Figura 11: Subsítios de hidrólise de endo-xilanases da família GH10 e GH11.



O esquema representa as diferenças nos produtos de hidrólise entre endo-xilanases GH10 e 11 quando incubadas com xilanas substituídas. A) Para as enzimas da família GH10, as substituições na cadeia de xilana são acomodadas no local +1, portanto, essas enzimas podem liberar xilo-oligômeros nos quais o resíduo de xilose no terminal não redutor é substituído. B) Para as enzimas da família GH11, as substituições na cadeia de xilana não são acomodadas no local +1, portanto, essas enzimas produzem xilo-oligossacarídeos com substituições no penúltimo resíduo de xilose. Fonte: Adaptado de Dodd e Cann, (2009).

A catálise da ligação glicosídica presente entre os subsítios -1 e +1, em endo-xilanases GH10 e 11, são realizadas através retenção da configuração do carbono

anomérico através dois resíduos de glutamatos atuando como um nucleófilo e um catalisador ácido/básico (POLLET; DELCOUR; COURTIN, 2010; JUTURU; WU, 2012; BASIT *et al.*, 2018). A retenção é realizada através do mecanismo de duplo deslocamento envolvendo duas reações consecutivas de substituição molecular. Durante a primeira reação (glicosilação), um nucleófilo de ácido carboxílico desprotonado ataca o carbono anomérico do substrato, deslocando o resíduo de açúcar para formar um intermediário enzima-substrato covalente. Durante a segunda reação (deglicosilação), uma molécula de água ativada desloca o ácido carboxílico enzimático, resultando na hidrólise do intermediário enzima-substrato e na retenção da configuração estereoquímica do carbono anomérico (DODD; CANN, 2009; PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012; KARLSSON *et al.*, 2018).

Algumas endo-xilanases GH10 e 11 são amplamente estudadas para aplicações industriais como a produção celulose e papel, e o biobranqueamento da polpa celulósica pela resistência em altas temperaturas e pHs extremos (TORRE; KADOWAKI, 2017). O mecanismo pelo qual ocorre a termoestabilidade não foi muito bem elucidado, mas estudos sugerem que podem ocorrer em decorrência da presença de pontes dissulfeto, interações entre resíduos carregados, grau de empacotamento hidrofóbico e o ancoramento das extremidades amino e carboxi terminais (RULLER, *et al.*, 2014; PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012; CHADA *et al.*, 2019).

2.2.3 Aplicações de endo-xilanases termotolerantes

A termofilia é uma característica altamente desejável para a utilização industrial de enzimas, as quais, devido à maior termoestabilidade tendem a serem preservadas de uma possível inativação térmica em operações de transporte, manuseio e/ou necessidades de operação no bioprocessos. Além disso, uso de temperaturas mais altas em processos industriais também aumenta a solubilidade do substrato e do produto, reduz o tempo de hidrólise e minimiza o risco de contaminação microbiana. (ATALAH *et al.*, 2019).

As xilanases termoestáveis atuam em um amplo número de aplicações industriais incluindo desde a produção de papel e celulose até alimentos, rações e biocombustíveis (ENSHASY *et al.*, 2016; MICHELIN *et al.*, 2017). De acordo com Polizeli *et al.*, (2005), as xilanases junto com as celulasas e pectinases representam 20% do mercado global de enzimas industriais.

A produção de papel e celulose é realizada em altas temperaturas (55 - 70 °C) e pH alcalino. Neste cenário as endo-xilanases termoalcalinofílicas são utilizadas para realizarem a hidrólise da ligação interna da xilana entre as macromoléculas de

revestimento, o que facilita a remoção da lignina nas etapas subsequentes de branqueamento, aumentando o brilho da polpa (POLIZELI *et al.*, 2005; ENSHASY *et al.*, 2016; WALIA *et al.*, 2017). A vantagem da utilização de enzimas neste processo envolve a redução do consumo de cloro e descargas tóxicas, tornando-a uma opção amigável ao meio ambiente.

Além disso, a hidrólise enzimática da xilana durante o biobranqueamento da polpa resulta na liberação de alguns produtos, dentre estes os xilo-oligossacarídeos (XOS). Os XOS possuem efeitos pré-bióticos, que podem ser usados na alimentação aumentando o crescimento de microrganismos promotores da saúde, como as bifidobactérias, na microflora intestinal humana e animal (HONG *et al.*, 2019). Por esse motivo, os XOS tem sido usados em uma série de bebidas, chás, laticínios, leite de soja e rações (GONÇALVES *et al.*, 2012). Ademais, os XOS têm sido utilizados em setores farmacêuticos por apresentarem efeito imunomodulador, antimicrobiano, anti-inflamatório e anticarcinogênico (GUPTA *et al.*, 2018; YAHFOUFI *et al.*, 2018; BHARDWAJ; KUMAR; VERMA, 2019).

As rações animais contêm diversas fibras provenientes de cereais e soja, que são ricos em conteúdo lignocelulósico. Essas fibras precisam sofrer tratamentos sobre alta temperatura e pressão para serem transformados em *pallets* ou grânulos que melhoram a sua absorção nutricional (ENSHASY *et al.*, 2016). Entretanto, este processo gera grande gasto. As endo-xilanases termoestáveis são benéficas se adicionadas antes do processo de peletização, facilitando à liberação de nutrientes e XOS presentes nas fibras (GRAMINHA *et al.*, 2008).

Os mossocarídeos oriundos da hidrólise da xilana (D-Xilose) podem ser convertidos através de fermentação em açúcares álcoois como o xilitol e em biocombustíveis como o etanol E2G (CHEN *et al.*, 2018). Na indústria de biocombustíveis, primeiramente as endo-xilanases são utilizadas em conjunto com outras enzimas na forma de coquetéis enzimáticos. Estes coquetéis atuam em sinergismo para degradarem a biomassa lignocelulósica em oligossacarídeos e açúcares fermentescíveis (D-Xilose e D-Glicose), que poderão ser posteriormente fermentados através de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia fermentans*, *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Kluyveromyces marxianus*) em etanol E2G (AZHAR *et al.*, 2017). Por outro lado, produtos comerciais como o adoçante xilitol, presentes em algumas gomas de mascar, também podem ser produzidos através da fermentação da D-Xilose por microrganismos (MICHELIN *et al.*, 2017). O efeito benéfico do xilitol esta associado ao menor teor

calórico quando comparado à glicose, tornando-o uma alternativa na produção alimentícia para pacientes diabéticos (SOOCH, 2017).

Além das aplicações tradicionais já citadas, as endo-xilanases termoestáveis também têm sido utilizadas em várias outras áreas, incluindo a fabricação de têxteis e de alimentos (JUTURU; WU, 2012; SINGH *et al.*, 2019). Nas indústrias têxteis as endo-xilanases livres de celulasas são usadas para processar a fibra vegetal, pois podem liberar fibras longas de celulose intactas, diminuir o teor de lignina e melhorar a cor e a qualidade das fibras (KANGO; JANA; CHOUKADE, 2019; EID; IBRAHIM, 2021). Ademais, após esta etapa, não há a necessidade de etapas subsequentes de branqueamento, pois a utilização dos químicos ocasiona a oxidação e escurecimento das fibras.

Na indústria alimentícia, as endo-xilanases podem ser utilizadas na panificação, extração e clarificação de sucos, e produção de XOS (BUTT *et al.*, 2008; SHARMA; THAKUR; GOYAL, 2018). O pão é um dos alimentos mais convencionalmente consumidos em escala mundial e pode ser produzido com farinha refinada ou trigo integral. O trigo integral é rico em fibras compostas por arabinoxilanas, que estão presentes em duas formas: solúvel e insolúvel em água (CAVELLA *et al.*, 2008). As endo-xilanases transformam o arabinoxilano insolúvel em uma forma solúvel, que interage com a água na massa aumentando o volume, criando frações mais uniformes e finas, e diminuindo a firmeza da massa (SHARMA; THAKUR; GOYAL, 2018). Além disso, a melhora na qualidade da massa favorece para que não ocorra aderência às peças da máquina durante a fabricação (BUTT *et al.*, 2008).

Por outro lado, durante os processos de extração e clarificação de sucos as endo-xilanases termoestáveis, em conjunto com celulasas, amilases e pectinases, elevam o rendimento de suco por meio da liquefação de frutas e vegetais, estabilização da polpa do fruto, aumento da recuperação de aromas, óleos essenciais, vitaminas, sais minerais, corantes comestíveis, pigmentos etc., redução da viscosidade, hidrólise de substâncias que dificultam a limpeza física ou química do suco, ou que podem causar turvação no concentrado (POLIZELI, *et al.*, 2005; MALHOTRA; CHAPADGAONKAR, 2018, SILVA *et al.*, 2019).

Estas foram algumas das possíveis aplicações envolvendo a possível utilização de endo-xilanases termoestáveis para a melhoria de processos biotecnológicos. No entanto, para as possíveis aplicações, estas enzimas precisam ser primeiramente obtidas através a triagem de microrganismos produtores.

2.2.4 Microrganismos produtores de endo-xilanases termotolerantes

Os principais produtores de endo-xilanases termotolerantes para aplicações industriais são as bactérias, arqueias, os fungos e as leveduras (CHADA *et al.*, 2019; KASIRAJAN; MAUPIN-FURLOW, 2020). Estes microrganismos podem ser isolados de várias fontes incluindo solo, mar, materiais em decomposição, piscinas quentes e fontes termais (KUMAR *et al.*, 2018).

Diversos trabalhos relataram a extração e purificação de endo-xilanases de origem bacteriana (GERASIMOVA; KUISIENE, 2012; RULLER *et al.*, 2014; GHOSH *et al.*, 2019). Dentre alguns gêneros produtores de endo-xilanases termotolerantes pode-se citar *Caldicoprobacter*, *Microcella*, *Planococcus*, *Bacillus*, *Caldicellulosiruptor*, *Geobacillus*, *Thermosaccharolyticum*, *Rhodothermus*, *Roseithermus*, *Thermoanaerobacterium* e *Thermotoga* (CHAKDAR *et al.*, 2016; THEBTI *et al.*, 2016; BASIT *et al.*, 2018; KUMAR; DANGI; SHUKLA, 2018; TEO *et al.*, 2019). Dentre estes, os exemplares *Bacillus* são amplamente estudados por serem fontes potenciais de endo-xilanases, como ex. as expressas por *B. brevis* e *B. subtilis* nas quais apresentaram atividade entre temperaturas de 40 a 80 °C e foram estáveis a uma ampla faixa de pH 4,0 – 10,0 (GOSWAMI *et al.*, 2014; TORKASHVAND *et al.*, 2020).

Por outro lado, estudos relacionados demonstraram que uma das endo-xilanases mais termoestáveis, foi relatada para *Thermotoga sp.* FJSS3-B.1, com temperatura ótima de 105 °C e $t_{1/2}$ = 90 min a 95 °C (KUMAR; DANGI; SHUKLA, 2018). Posteriormente, uma nova *Thermoanaerobacterium* prospectada de uma fonte termal na Islândia, quando enriquecida anaerobicamente com 0,5% (m/v) de xilana, mostrou ser capaz de expressar endo-xilanases termofílicas com temperaturas ótimas acima de 70 °C. Uma destas endo-xilanases (XynDZ5), reteve mais de 80% de sua atividade máxima em temperaturas de até 65 °C, após 24 h de reação (ZARAFETA *et al.*, 2020). Ademais, *Herbinix hemicellulosilytica*, uma bactéria isolada de um reator de biogás, também produziu seis endo-xilanases termofílicas, incluindo duas GH11 (MECHELKE *et al.*, 2017).

Além das bactérias mencionadas acima, existem vários microrganismos como as arqueias que também foram relatadas como bons produtores de endo-xilanases termoestáveis que podem ser utilizadas na valorização dos resíduos hemicelulósicos (KASIRAJAN; MAUPIN-FURLOW, 2020). Dentre estas: *Pyrococcus furiosus*, *Sulfolobus solfataricus*, *Thermococcus zilligii*, *Pyrodictium abyssi* e cepas de *Thermofilum* (BASIT *et al.*, 2018; SULEIMAN; KRÜGER; ANTRANIKIAN, 2020). Em complemento, estudos relacionados mostraram que as hidrolases glicosídicas originadas por arqueias apresentam atividades máximas em uma faixa de temperatura mais alta em

comparação com os bacterianos, como ex. a endo-xilanase de *Pyrodictium abyssi*, que é ativa a 110 °C (ATALAH *et al.*, 2020).

No entanto, dentre os microrganismos, os fungos filamentosos termófilos são preferíveis para a produção de termozimas voltadas para aplicações industriais, por vantagens que envolvem: alta secreção enzimática para meio extracelular, maior solubilidade de reagentes e produtos, e redução da contaminação em temperaturas elevadas (TORRE; KADOWAKI, 2017).

Entre alguns fungos termófilos amplamente explorados para a produção de endo-xilanases de alto valor industrial, destacam-se: *Thermoascus aurantiacus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Scytalidium thermophile*, *Malbranchea cinnamomea*, *Chaetomium thermophilum*, *Myceliophthora thermophila*, *Mycothermus thermophilus*, *Rasamsonia emersonii*, *Clostridium thermocellum*, *Sporotrichum thermophile*, *Humicola lanuginosa*, *Humicola grisea* e *Humicola insolens* Y1 (POLIZELI *et al.*, 2005; BASIT *et al.*, 2018; BALA; SINGH, 2019; SADAF; FATIMA; KHARE, 2019). *Thermoascus aurantiacus*, um fungo isolado da área de floresta Aravali da Universidade de Nova Delhi, além de produzir xilanases termoestáveis, também produz compostos antioxidantes e subprodutos que podem ser úteis durante a produção de biocombustíveis (PING *et al.*, 2018).

No entanto, fungos do gênero *Humicola*, que contém espécies não patogênicas e não tóxicas, se mostraram promissores na produção de ampla gama de celulasas e hemicelulasas. Dentre estes, *H. insolens* Y1, *H. grisea* e *H. brevis* var. *thermoidea* são uma excelente fonte para a produção de enzimas xilanolíticas (RANA; JOHRI; THAKUR, 1996; MASUI *et al.*, 2012; SHI *et al.*, 2015).

2.3 Microrganismo de estudo

O gênero *Humicola* se engloba dentro da divisão dos ascomicotas e foi introduzido inicialmente por Traeen (1914) envolvendo duas espécies, *H. fuscoatra* e *H. grisea*. Ambos produzem esporos (formados lateralmente ou terminalmente em hifas ou conidióforos) e obtém parede espessa. Anos após, Goh e Hyde (1999) constaram que o gênero *Trichocladium* representava uma contraparte de *Humicola*, diferenciada pela produção de conídios septados de pigmentação escura. Esta afirmação foi corroborada pelos resultados obtidos por Hambleton e colaboradores nos quais ficaram surpresos ao observarem que as sequências ITS de *H. grisea* e a espécie-tipo de *Trichocladium*, *T. asperum*, eram idênticas, sugerindo que as duas espécies pertencem ao mesmo gênero (HAMBLETON; NICKERSON; SEIFERT, 2005).

Apesar de ser um gênero com características morfológicas simples quando comparados a outros ascomicotas, estes vêm se demonstrando promissores para aplicações biotecnológicas. Algumas espécies obtêm potencial como biofertilizantes no controle biológico de pragas presentes em cultivares, na produção de cogumelos (promovendo o crescimento de espécies comestíveis do gênero *Agaricus*) e principalmente na produção de enzimas termoestáveis para decompor carboidratos poliméricos (STRAATSMA; SAMSON, 1993; MASUI *et al.*, 2012; YANG; LIN; SU, 2014). Vários exemplares *Humicolas* apresentam a característica de termofilia (RANA; JOHRI; THAKUR, 1996; NETO; FILHO, 2004; MASUI *et al.*, 2012; SHI *et al.*, 2015). As enzimas produzidas por este gênero têm sido investigadas durante os últimos anos em razão do seu grande potencial em aplicações biotecnológicas (NETO; FILHO, 2004; MASUI *et al.*, 2012; YANG; LIN; SU, 2014; SHI *et al.*, 2015; FARIA *et al.*, 2020).

O microrganismo utilizado neste projeto é o fungo filamentosso *H. brevis var. thermoidea* obtido da *American Type Culture Collection* (ATCC) N° 28402 gentilmente cedido pelo Prof. Dr. João Atilio Jorge da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo (FFCLRP – USP) de Ribeirão Preto - SP. *Humicola brevis var. thermoidea* apresenta a velocidade máxima de crescimento entre 37-60 °C, enquanto que a temperatura mínima e máxima em que foi observado o crescimento foram de 23 e 65 °C, respectivamente. Resultados obtidos por Masui *et al.*, (2012) mostraram que *H. brevis var. thermoidea* é um bom produtor de xilanases secretadas para o meio extracelular, quando cultivado entre 40-60 °C, em meio semi-sólido, constituído de farelo de trigo e água 1:2 (m/v).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi produzir e obter de forma homogênea a endo-xilanase nativa do fungo *H. brevis* var. *thermoidea* para estudos biofísicos, bioquímicos e avaliação do potencial biotecnológico na sacarificação da lignocelulose pré-tratada.

3.2 Objetivos específicos

- Produzir por fermentação em estado sólido (FES) a endo-xilanase do fungo *H. brevis* var. *thermoidea*;
- Desenvolver um protocolo de purificação envolvendo precipitação por agentes químicos e cromatografias, e validar o método através de zimograma;
- Análisar o ponto isoelétrico e massa molecular da XylHb através de gel bidimensional (2D);
- Caracterizar biofísicamente a XylHb através de dicroísmo circular (CD) e fluorescência intrínseca do triptofano (FIT);
- Avaliar as propriedades da endo-xilanase purificada (XylHb) e comercial (Cellic[®]HTec2), em relação as propriedades bioquímicas (efeito e estabilidade ao pH, temperatura, agentes químicos e cinética);
- Avaliar o potencial da XylHb com celulase comercial (Cellic[®]CTec2) na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

A linhagem de *H. brevis* var. *thermoidea* usada neste trabalho foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC 28402).

4.2 Manutenção e ativação do fungo produtor

A linhagem de *H. brevis* var. *thermoidea* foi mantida através de repiques sucessivos em tubos de ensaio inclinados contendo meio sólido Batata Dextrose e Agar 3,9% % (Oxoid, GBR), previamente esterilizados em autoclave por 20 min, a 1,5 Kgf/cm². Em seguida, *H. brevis* var. *thermoidea* foi incubado durante 14 dias a 40 °C e 70% de umidade, e após o período de incubação, o cultivo foi imediatamente utilizado para a produção enzimática ou armazenado à 4 °C com repiques mensais (MASUI *et al.*, 2012).

4.3 Produção da endo-xilanase de *H. brevis* var. *thermoidea* por fermentação em estado sólido (FES)

Para o inóculo em FES foi utilizado o repique produzido de acordo com o item 4.2. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 10 mL de água destilada previamente autoclavada por 20 min, a 1,5 Kgf/cm². A inoculação do fungo no substrato (resíduo agrícola) se deu pela transferência de 2 mL desta suspensão na fonte de carbono.

A produção da endo-xilanase extracelular de *H. brevis* var. *thermoidea* seguiu o protocolo otimizado por Masui *et al.*, (2012), no qual determinou que o farelo de trigo e água 1:2 (m/v) foi melhor agrosresíduo utilizado como fonte nutricional em FES. Desta forma, seguiu-se a metodologia realizada em triplicatas, em frascos de Erlenmeyer de 250 mL não ultrapassando a capacidade igual a 5 vezes o volume, contendo 5 g de farelo de trigo previamente autoclavado por 20 min, a 1,5 Kgf/cm² e 10 mL de inóculo. Posteriormente, o meio de cultivo foi mantido durante 7 dias a 50 °C com 70% de umidade para a expressão enzimática.

O coquetel hemicelulásico (xilanase extracelular) foi obtido através da ressuspensão do cultivo em 30 mL de água destilada gelada. O ressuspensão foi filtrado em peneira sintética e centrifugado por 10 min, a 10.000xg, a 4 °C em centrífuga Hermle Z236K (Hermle, DEU). O conteúdo sedimentado foi descartado e o sobrenadante contendo coquetel enzimático foi avaliado em testes de atividade enzimática.

4.4 Atividade xilanásica

A atividade endo-xilanásica foi mensurada pela hidrólise da xilana comercial. O meio reacional foi inicialmente constituído por uma micro-reação adapta em placa usando 10 μL de solução enzimática, 40 μL de água destilada e 50 μL de tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 5,5, contendo xilana *Birchwood* 0,5% (m/v) (Sigma-Aldrich, USA) a 50 °C (MASUI *et al.*, 2012). Após a incubação durante 10 min, a reação foi interrompida com a adição de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959) na proporção 1:1, seguida de aquecimento em banho fervente. Uma alíquota de 100 μL foi retirada para leitura em microplaca a 540 nm em espectrofotômetro Spectramax 384 Plus (Molecular Devices CA-USA®). Cada ensaio foi reproduzido em quintuplicata (RULLER *et al.*, 2014).

Os açúcares redutores formados após a hidrólise dos polímeros foram mensurados através do método proposto por Miller (1959), utilizando-se xilose como padrão. Medidas de atividade controle contendo enzima desnaturada por calor foram realizados para estimar a hidrólise espontânea do substrato. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 μmol de açúcar redutor por minuto. Uma unidade de atividade específica (U mg^{-1}) foi definida como a relação entre o número de unidades de atividade por massa de proteína (total ou de xilanase purificada), em miligramas, presente no meio de reação.

4.5 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas totais (mg mL^{-1}) foi determinada através de método descrito por Bradford (1976), usando soro albumina bovina como padrão.

4.6 Purificação da endo-xilanase de *H. brevis* var. *thermoidea* (XylHb)

A purificação proteica é importante, pois objetiva atingir a homogeneidade da proteína em estudo para posteriores etapas de caracterização enzimática. Inicialmente a amostra produzida precisa passar por etapas de captura (precipitação e concentração), purificação intermediária (troca iônica) e polimento (exclusão por peso molecular) (MILNE, 2016).

4.6.1 Precipitação da XylHb com sulfato de amônio

Dentre os métodos clássicos utilizados em laboratório para a precipitação de proteínas destaca-se a precipitação com sais. Dentre os sais, o sulfato de amônio é o

preferido para a precipitação "salting-out" de proteínas por permitir o alcance de forças iônicas elevadas (WINGFIELD, 2016; MATULIS, 2016).

Por este motivo, foi realizado um teste de precipitação com o extrato bruto de *H. brevis* utilizando 1 mL de volume final, variando um gradiente de concentração entre 0 e 80% (m/v) de sulfato de amônio PA (Sigma-Aldrich, USA). Após, a solução foi armazenada durante 24 h, a 4 °C e posteriormente centrifugada durante 5 min a 16.000xg em centrífuga Eppendorf 5418 (Eppendorf, USA). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado e dialisado no mesmo volume inicial em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 5,0). A atividade enzimática e a quantificação de proteínas foram feitas de acordo com os itens 4.4 e 4.5, respectivamente. Os resultados obtidos foram apresentados na forma de atividade residual relativa, considerando-se a atividade da xilanase sem tratamento como 100%. Todos os testes foram feitos em quintuplicatas.

4.6.2 Precipitação da XylHb com solventes orgânicos

Outro método bem empregado para precipitação de proteínas envolve a utilização de solventes orgânicos. A adição desses solventes em um extrato aquoso contendo proteínas tem uma variedade de efeitos, que combinados auxiliam na redução da constante dielétrica do meio, o qual promove a agregação de proteínas por interação de cargas proporcionando a precipitação (MATULIS, 2016). Por esta razão, foram avaliados o efeito dos dois principais solventes orgânicos utilizados na precipitação de proteínas: a acetona e o etanol.

4.6.2.1 Precipitação da XylHb com acetona

Posteriormente ao teste de precipitação com sulfato de amônio foi realizada a precipitação da xilanase extracelular com acetona e etanol, respectivamente. Para este primeiro, o volume desejado de extrato bruto foi distribuído em microtubos de 2 mL e mantidos em banho de gelo. A seguir, acetona gelada foi adicionada a cada um dos microtubos, variando a concentração do solvente de 0 a 80% (v/v). Após, a solução foi armazenada durante 24 h, a -20 °C e posteriormente centrifugada a 16.000xg durante 5 min, a 4 °C em centrífuga Eppendorf 5418 (Eppendorf, USA). O sobrenadante foi removido e o precipitado ressuscitado no mesmo volume inicial em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0. A atividade enzimática e a quantificação de proteínas foram feitas de acordo com os itens 4.4 e 4.5, respectivamente. Os resultados obtidos foram apresentados na forma de atividade residual relativa, considerando-se a atividade da xilanase sem tratamento como 100%. Todos os testes foram feitos em quintuplicatas.

4.6.2.2 Precipitação da XylHb com etanol

Para a precipitação com etanol gelado foi utilizada um teste com a mesma metodologia empregada no item 4.6.2.1. A precipitação com etanol gelado como já descrito pela literatura para outras xilanases, mostrou vantagens quanto ao rendimento de recuperação e possibilidade de reciclo (WANG *et al.*, 2017; COSTA; FARINAS; MIRANDA, 2018). Por esta razão, este método de precipitação será continuado na etapa de purificação intermediária (os resultados obtidos serão demonstrados e discutidos em outra sessão).

A precipitação da amostra para a purificação intermediária envolveu aumento da escala sendo precipitados 10 mL de extrato bruto contendo 2.084,9 U Totais. Estes foram adicionados em um Becker de vidro de 50 mL e precipitados com 70% de etanol gelado (v/v), durante 24 h, à -20°C . Após, a amostra foi centrifugada a $16.000\times g$ durante 5 min a 4°C em centrifuga Hermle Z236K (Hermle, DEU). O sobrenadante foi retirado e o precipitado ressuspenso em 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 5,0. O material ressuspenso foi reservado para os testes subseqüentes, e a atividade e proteínas avaliados de acordo com os itens 4.4 e 4.5, respectivamente. Os resultados obtidos foram expressos na tabela de purificação.

4.6.3 Teste de “binding” da XylHb em diferentes resinas de troca iônica

Etapas cromatográficas utilizando resinas de troca iônica para a purificação de biomoléculas proteicas são muito utilizadas por separá-las de acordo com as diferenças em sua carga superficial (LACKI, 2018).

Com a finalidade de se selecionar a melhor resina e o pH de interação entre a xilanase extracelular de *H. brevis* e a fase estacionária, foram realizados testes manuais em “binding”. Os testes foram feitos através de micro-ensaios em tubos contendo de 2 tipos de resinas de trocas iônicas, respectivamente: CM Celulose (Sigma-Aldrich, USA) e DEAE Toyopearl[®] giga cap – 650M (Tosoh, JPN).

Para cada matriz foram avaliadas três soluções tamponantes em diferentes pH: Glicina-HCl 50 mmol L^{-1} , pH 3,0, acetato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 5,0 e Tris-HCl 50 mmol L^{-1} , pH 8,0, em quintuplicatas equilibradas em seu tampão correspondente. Em seguida, foram adicionadas amostras de xilanases na proporção de 1:1 (v/v) (extrato e resina) equilibradas no tampão correspondente. Incubou-se durante 20 min sobre baixa agitação a 25°C . Em seguida, os tubos foram centrifugados a $5.000\times g$ em centrífuga Eppendorf 5418 durante 5 min, e o primeiro eluído da resina foi denominado de “não

ligado”. Em seguida, foram realizadas cinco lavagens “lavagem 1-5”, e a eluição foi realizada utilizando tampão com NaCl 2 mol L⁻¹ e denominados de “eluição 1-5”.

A atividade enzimática e quantificação de proteínas totais de cada sobrenadante foram feitas de acordo com os itens 4.4 e 4.5, respectivamente. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual relativa, considerando-se a atividade das xilanases sem o tratamento como 100%. Baseado no valor de pH e na matriz que obteve a melhor interação com a proteína de interesse, foi realizado o teste em escala ampliada.

4.6.4 Cromatografia da XylHb por troca iônica

Baseada nos resultados obtidos anteriormente foi feita a cromatografia de troca iônica manual utilizando a coluna de 1,0 x 10 cm contendo 10 mL da resina DEAE Toyopearl[®] giga cap 650M. A resina foi equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0. Em seguida, a resina foi carregada com 1 mL da xilanase precipitada (item 4.6.2.2), contendo 1.754,09 U Totais, que foram eluídos utilizando gradiente de 100 mL contendo NaCl 0-2 mol L⁻¹ e recolhidas em frações de 1 mL por tubo.

As frações coletadas foram monitoradas individualmente mediante a medida de absorvância a 280 nm utilizando espectrofotômetro 600 Plus (FEMTO – BRA). Aquelas frações que obtiveram absorção em 280 nm e correlação com atividade xilánasica (item 4.4) foram reunidas, concentradas e equilibradas em tampão acetato 50 mmol L⁻¹, pH 5,0, contendo de NaCl 150 mmol L⁻¹ utilizando Vivaspin[®]20, 10 kDa (Cityva, DEU) através de centrifugação a 7.000xg, a 4 °C. O concentrado foi analisado mediante a atividade enzimática, quantificação proteica e grau de pureza através dos itens 4.4, 4.5 e eletroforese SDS-PAGE, respectivamente.

4.6.5 Cromatografia da XylHb por exclusão molecular

Como segunda etapa de cromatografia e polimento para obtenção da endo-xilanase pura, adotou-se a cromatografia manual por exclusão molecular. Para isso, o concentrado da troca iônica com 1.710,54 U Totais de endo-xilanase, foi aplicado na coluna de 1,0 x 130 cm contendo 102 mL da resina TSK Fractogel (Merck, DEU) previamente equilibrada com o mesmo tampão contendo NaCl 150 mmol L⁻¹, a uma vazão de 0,1 mL/min, a 25 °C e recolhidas em frações de 1 mL por tubo. As frações coletadas foram monitoradas individualmente mediante a medida de absorvância a 280 nm utilizando espectrofotômetro 600 Plus (FEMTO – BRA). Aquelas frações que obtiveram absorção em 280 nm e correlação com atividade xilánasica (item 4.4) foram

reunidas, quantificadas e analisadas quanto a sua pureza através de eletroforese SDS-PAGE.

4.7 Análise eletroforética da XylHb pura e teste de atividade por zimograma

A análise da endo-xilanase purificada foi feita através de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) 15% de acordo com o método de Laemmli (1970), utilizando os marcadores de peso molecular de 14 a 100 kDa Scienco (Scienco Biotech, BRA) e 10 a 250 kDa Kaleidoscope (BIO-RAD - USA). Para a aplicação das amostras, as mesmas foram dialisadas em água destilada e concentradas em concentradores Microcon Amicon 10 kDa (Millipore, USA). As bandas de proteínas foram reveladas com *Comassie Brilliant blue* R-250 e nitrato de prata (DAVIS, 1964; BLUM; BEIER; GROSS, 1987).

O zimograma de atividade em gel foi feito utilizando diferentes concentrações de xilanase purificada, variando entre 5 a 25 µg. Inicialmente, o gel foi incubado durante 30 min a temperatura ambiente em solução tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0, contendo isopropanol 25% (v/v), sob baixa agitação para remover o SDS e renaturar às proteínas no gel. Em seguida, o gel foi incubado durante 30 min, a 50 °C, em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0, contendo xilana *birchwood* 0,5 % (m/v) (Sigma-Aldrich), lavado sob agitação branda com água destilada durante 10 min e incubado em solução de vermelho Congo a 0,1% (m/v) durante 15 min, a 25 °C, respectivamente. Por fim, a solução foi descartada e substituída por NaCl 1,0 mol L⁻¹ durante 10 min para detecção das bandas de atividade (YANG *et al.*, 2010).

4.8 Análise da XylHb por eletroforese bidimensional

Todos os experimentos desta sessão foram realizados com o auxílio do Prof. Dr. Hamilton Cabral e técnica de laboratório Dr.^a Nathália Gonsales da Rosa-Garzon da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) em parceria com o laboratório de bioquímica e microrganismos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Esta análise foi feita em 4 etapas principais: Primeira dimensão (Isofocalização), Equilíbrio da tira focalizada, Segunda dimensão (separação por massa molecular) e Análise de imagem, que estão descritos a seguir:

4.8.1 Primeira dimensão - focalização isoeletrica

Objetivando analisar o ponto isoeletrico da endo-xilanase purificada, foi realizada a primeira dimensão em gel. Uma amostra contendo 10 µg de XylHb foi suplementada

com de azul de bromofenol 0,002% (m/v), solução de anfólitos (IPG *buffer*) 0,5% (v/v) e DTT 2,8 mL. Posteriormente, a amostra foi reidratada passivamente durante 16 h, a 25 °C em tiras com gradiente linear de pH 3,0 a 10,0 *Imobilline Dry Strip* (Cytiva, USA) de 7 cm. Para esta etapa a tira foi acomodada no aparato IPG *Box* (Cytiva, USA).

As amostras foram submetidas à isofocalização em placa de cerâmica (*Dry Strip Cover Fluid*) utilizando o sistema Ettan IPGfor 3 (Cytiva, USA) e os parâmetros analisados através do Ettan IPGfor 3 *Control Software*. Após a focalização foram acumulados 5720 V h⁻¹. As tiras foram retiradas do sistema de focalização e submetidas ao equilíbrio ou armazenadas a -80 °C até o momento do uso.

4.8.2 Equilíbrio da tira focalizada

Para a execução da segunda dimensão, a tira focalizada foi equilibrada com tampão de equilíbrio SDS (tampão Tris-HCl 75 mmol L⁻¹, pH 8,8, contendo ureia 6 mol L⁻¹, glicerol 29,3% (v/v), SDS 2% (m/v), azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 10%), durante 15 min, a 25 °C. Após, a solução foi removida e a tira adicionada ao mesmo tampão contendo iodoacetamida (25 mg mL⁻¹) e novamente submetidas a agitação pelo mesmo intervalo de tempo e temperatura. Por fim, a solução foi retirada e a tira pronta para a segunda dimensão.

4.8.3 Segunda dimensão - eletroforese desnaturante (SDS-PAGE)

A tira equilibrada foi acomodada horizontalmente sobre o gel de poliacrilamida desnaturante 15%, e com o auxílio de papel filtro foi aplicado o marcador de peso molecular 14 a 100 kDa Scienco (Scienco Biotech, BRA).

As placas foram seladas com solução de agarose 0,5% (m/v) contendo azul de bromofenol 0,002% (m/v) e o aparato foi introduzido na cuba Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). A cuba foi preenchida com tampão Tris-glicina 0,05 mmol L⁻¹, pH 8,3, e a segunda dimensão foi realizada seguindo o protocolo do fabricante: 15 mA/gel durante 15 min e 30 mA/gel durante 30 min.

4.8.4 Revelação das bandas do gel bidimensional e análise de imagem

Após o término da eletroforese o gel foi retirado das placas e solução fixadora composta por ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v), durante 24 h, a 25 °C. Em seguida, a solução foi removida e o gel foi submetido à coloração da mesma forma que no item 4.7, durante 16 h, a 25 °C. Posteriormente, a solução foi descartada e o excesso

de corante removido com solução fixadora, previamente descrita. O gel adequadamente descorado foi submetido à análise de imagem.

Para a obtenção das imagens, o gel bidimensional foi lavado com água ultrapura e digitado com o auxílio do densitômetro DS-6000. As imagens capturadas foram arquivadas no modo TIF (*Targed Image File*) e analisados no programa Image Master 2D platinum v7.0 (GE) para a detecção dos pontos de proteínas isofocalizados, da massa molecular e ponto isoelétrico. Os pontos de proteínas isofocalizados de interesse foram coletados manualmente com o auxílio de agulhas hipodérmicas estéreis, armazenados em tubos congelados a -80 °C para a análise por espectrometria de massas.

4.9 Caracterização biofísica

Os experimentos biofísicos objetivaram analisar os parâmetros de estrutura secundária e terciária da XylHb purificada. As análises de fluorescência intrínseca do triptofano (FIT) e dicroísmo circular (CD) foram realizados em colaboração com o prof. Dr. Hamilton Cabral e o auxílio da técnica Dr.^a Nathália Gonsales da Rosa-Garzon (FCFRP-USP), e com o prof. Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira e o auxílio do técnico André Justino (FFCLRP-USP), respectivamente.

4.9.1 Avaliação do perfil da estrutura secundária da XylHb por dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular foram coletados em um espectropolarímetro J-810 (Jasco, JPN). Foram realizadas 5 varreduras a 50 nm s⁻¹ variando de 190 a 240 nm em água ultrapura contendo 0,1 mg mL⁻¹ de amostra a 25 °C, em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm. As varreduras foram subtraídas do branco (amostra de água ultrapura). Os resultados foram expressos na forma de elipsidade molar residual média (θ), 10³ grau.cm².dmol⁻¹, através da *equação 1*:

$$[\theta] = \frac{\theta \cdot 100 \cdot M}{C \cdot l \cdot n}$$

Onde:

θ : Elipsidade (graus);

l : Caminho óptico (cm);

C : Concentração de proteínas (mg mL⁻¹);

M : Massa molecular da proteína;

n : Número de resíduos de aminoácidos da proteína (kDa);

100: Fator de adequação das unidades.

4.9.2 Efeito da temperatura na fluorescência intrínseca do triptofano (FIT) da XylHb

Os espectros de fluorescência foram coletados em um espectrofluorímetro Lumina™ (Thermo Scientific, USA). A amostra foi analisada utilizando-se a concentração proteica de 0,1 mg mL⁻¹ em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,5, em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico e submetida a incubação em diferentes temperaturas em intervalos de 10 min, variando entre 30 e 90 °C.

Para a emissão de fluorescência a amostra foi excitada em 295 nm, fotoselecionando-se majoritariamente os resíduos de triptofano. A emissão foi monitorada no intervalo de 200 a 450 nm, acumulando-se 5 varreduras para cada temperatura com o intervalo de equilíbrio térmico. As correções da linha de base foram realizadas subtraindo-se o espectro do tampão de amostra e os resultados foram analisados pelo comprimento de onda máximo de emissão ($\lambda_{m\acute{a}x}$) através do Luminous Software (Thermo Scientific, USA).

Após a caracterização biofísica, com objetivo de avaliar o potencial biotecnológico da XylHb, fez-se testes comparativos de desempenho bioquímico (efeito e estabilidade ao pH, temperatura, etanol, NaCl, eficiência catalítica, efeito de íons e químicos) e de sacarificação com celulase comercial Cellic®CTec2 (Novozymes, DNK), da enzima em estudo, confrontados com a endo-xilanase comercial Cellic®HTec2 (Novozymes, DNK). As avaliações foram confrontadas com Cellic®HTec2 por esta enzima ser a principal endo-xilanase utilizada para diversas aplicações envolvendo o bioprocessamento da biomassa lignocelulósica para a produção de bioetanol E2G e de papel e celulose.

4.10 Caracterização bioquímica da XylHb e endo-xilanase comercial Cellic®HTec2

4.10.1 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática

A influência do pH foi feita mediante a incubação individual de 0,3 µg de endo-xilanase (XylHb ou Cellic®HTec2) em 40 µL de tampão glicina-citrato-fosfato 100 mmol L⁻¹, em diferentes valores de pH (entre pH 3,0-10,0), e 50 µL de xilana *birchwood* (Sigma-Aldrich, USA) 1% (m/v) diluída em água destilada, durante 10 min, a 50 °C (RULLER *et al.*, 2014).

A estabilidade ao pH foi realizada através da incubação de 3 µg de endo-xilanase em 900 µL de tampão em diferentes pHs como já citado anteriormente, durante 24 h, a 25 °C. Uma alíquota de 10 µL (contendo 0,3 µg) de endo-xilanase foi utilizada para atividade enzimática e posterior análise de açúcares redutores totais liberados de acordo com o item 4.4. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual relativa, considerando-se o pH com a maior atividade enzimática como 100%. Todos os micro-ensaios foram realizados em quintuplicatas.

4.10.2 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática

As reações de micro-ensaios para o efeito da temperatura foram feitas respeitando o item 4.4 mediante a incubação individual de 0,3 µg de endo-xilanase (XylHb ou Cellic[®]HTec2) em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,5, durante 10 min e em temperaturas que variaram entre 25 e 80 °C.

A termoestabilidade foi avaliada mediante a pré-incubação de 100 µL de endo-xilanase (contendo 3 µg) em 900 µL de água, em intervalos de tempo entre 0 e 24 h e nas temperaturas de 50, 60 e 70 °C. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 1 min e uma alíquota de 10 µL (contendo 0,3 µg) de endo-xilanase foi utilizada para atividade enzimática e posterior análise de açúcares redutores totais liberados de acordo com o item 4.4. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual relativa, considerando-se a temperatura com a maior atividade enzimática como 100%. Todos os micro-ensaios foram realizados em quintuplicatas.

4.10.3 Parâmetros cinéticos

Para a determinação dos parâmetros cinéticos (K_M , $V_{Máx}$, K_{cat} e K_{cat}/K_M) os micro-ensaios de atividade enzimática foram realizados individualmente utilizando 10 µL de endo-xilanase (contendo 0,3 µg) (XylHb ou Cellic[®]HTec2) de acordo com o item 4.4, sob as condições ótimas de pH (5,5 para ambas) e temperaturas de 70 e 50 °C, durante 10 min. O substrato utilizado foi a xilana *birchwood* em concentrações finais variando de 0,1 a 18 mg mL⁻¹. Todos os micro-ensaios foram realizados em quintuplicatas.

4.10.4 Efeito de sais e agentes químicos na atividade enzimática

O efeito de diferentes sais (KCl, LiCl, NaCl, CaCl₂, NiSO₄, ZnCl₂, FeCl₃, CuSO₄, MgSO₄, HgCl₂, Pb(NO₃)₂), compostos quelantes (EDTA) e redutores (β-mercaptoetanol) foram avaliados através da presença de 10 mmol L⁻¹ destes aditivos nas micro-reações enzimáticas. Os solventes (etanol e metanol) e compostos fenólicos (ácido cinâmico,

ferúlico, tânico, *p*-coumárico e 4-hidróxibenzóico) foram avaliados através da presença de 10% (v/v) e 1 mg mL⁻¹ destes aditivos nas micro-reações enzimáticas, respectivamente (CARLI *et al.*, 2016).

As micro-reações enzimáticas e a quantificação de açúcares redutores liberados foram realizados individualmente utilizando 10 µL de endo-xilanase (contendo 0,3 µg) de acordo com o item 4.4 nas condições ótimas obtidas anteriormente para a XylHb (pH 5,5 e 70 °C) e Cellic[®]HTec2 (pH 5,5 e 60 °C). As atividades relativas foram calculadas considerando-se o sistema reacional sem adição de nenhum composto como 100%. Todos os micro-ensaios foram realizados em quintuplicatas.

4.10.5 Efeito do etanol e NaCl na atividade e estabilidade enzimática

O efeito da concentração do etanol e NaCl na atividade enzimática foram avaliadas por meio da pré-incubação individual de 10 µL (contendo 0,3 µg) de endo-xilanase (XylHb ou Cellic[®]HTec2) em um gradiente de concentração de etanol, de 0 a 30% (v/v) ou NaCl, de 0,1 a 2 mol L⁻¹ (v/v), em tampão acetato e sódio 50 mmol L⁻¹ com 0,5% de xilana *birchwood* (Sigma-Aldrich, USA), de acordo com o item 4.4 e nas condições ótimas obtidas anteriormente.

Os testes de estabilidade utilizando concentrações crescentes de etanol e NaCl, foram realizados individualmente através da pré-incubação de 3 µg de endo-xilanase (XylHb ou Cellic[®]HTec2) em etanol 0 a 30% (v/v) ou NaCl 0,1 a 2 mol L⁻¹ (v/v), os mesmos sendo incubados a 25 °C durante 24 h. A atividade enzimática e a quantificação de açúcares redutores totais liberados foram de acordo com o item 4.4 nas condições ótimas obtidas anteriormente. Os resultados obtidos nos micro-ensaios foram expressos na forma de atividade residual relativa, considerando-se a atividade da amostra sem tratamento como 100%. Todos os micro-ensaios foram realizados em quintuplicatas.

4.11 Ensaios de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

O bagaço de cana-de-açúcar é uma das matérias primas mais exploradas para a produção de açúcares fermentescíveis voltados para a indústria de biocombustíveis, no entanto, para que a produção destes açúcares ocorra, são necessárias etapas preliminares de pré-tratamento e sacarificação enzimática (RAJENDRAN *et al.*, 2017). Os pré-tratamentos, como ex. hidrotérmico, auxiliam na redução da recalcitrância do bagaço para que as enzimas utilizadas na etapa sacarificação possam realizar a conversão dos polissacarídeos presentes no material pré-tratado, em mono e oligossacarídeos, com maior eficiência (KANGO; JANA; CHOUKADE, 2019).

Um das principais enzimas utilizadas como controle comercial, para realizar a conversão da lignocelulose açúcares, é o coquetel celulásico Cellic[®]CTec2 (Novozymes, DNK). No entanto, a Cellic[®]CTec2 individual não é totalmente eficiente para a conversão do bagaço pré-tratado, fazendo-se necessária a suplementação com enzimas axiliares (BRAR *et al.*, 2021). Por esta razão, a fabricante sugere a suplementação da Cellic[®]CTec2 com o coquetel hemicelulásico Cellic[®]HTec2 para auxiliar na conversão adicional das porções de celulose e hemicelulose presentes na biomassa, mas o alto custo desta mistura somada a quantidade necessária para a conversão da lignocelulose é um dos principais “gargalos” para a viabilidade econômica do processo (LOPES; FERREIRA-FILHO; MOREIRA, 2018).

Com o objetivo de se solucionar este problema, estratégias incluindo a triagem de novas enzimas de origem microbiana, para a substituição ou suplementação das enzimas comerciais, tem sido explorada (BASIT *et al.*, 2018; FARIA *et al.*, 2020). A aplicação destes novos biocatalisadores tem sido feita principalmente por meio de combinações enzimáticas, extraídas diretamente dos microrganismos produtores, ou na forma semi-purificada, por gerarem menos custo de produção quando comparados as enzimas puras (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018).

Por este motivo, o presente trabalho buscou avaliar o potencial biotecnológico da XylHb pré-purificada com 70% de etanol como complemento para a Cellic[®]CTec2 na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente, e substituto da hemicelulase comercial (Cellic[®]HTec2).

As micro-reações de hidrólise enzimáticas (HE) foram realizadas utilizando dois controles, sendo estes: um controle principal constituído pela celulase comercial Cellic[®]CTec2 100% (5 mg / g de substrato) e outro pela mistura comercial contendo Cellic[®]CTec2 50% + Cellic[®]HTec2 50% (2,5 + 2,5 mg / g de substrato). Estes controles foram comparados em relação a quantidade de glicose, açúcares redutores totais liberados e sinergia com a mistura de Cellic[®]CTec2 50% + XylHb 50% (2,5 + 2,5 mg / g de substrato). As micro-reações foram realizadas em diluições adequadas de modo a ter cargas finais enzimáticas de 5 mg / g de substrato, conforme proposto pela bula da fabricante das enzimas comerciais.

Os micro-ensaios de HE foram realizados em microtubos contendo substrato pré-tratado 2% (m/v) e o volume final de 1 mL foi ajustado com tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0, (ALVIRA *et al.*, 2011). As amostras foram todas acondicionadas e controladas mediante utilização em condições de ensaio usando termomixer Accuterm[™] (Labnet, New Jersey, USA) a 50 °C e 500 rpm, durante 72 h. As quantidades de glicose e

açúcares redutores totais liberados foram analisados através dos métodos da glicose-oxidase (GOD) (BERGMEYER; GAWEHN, 1974) e do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), respectivamente. Os efeitos sinérgicos entre as preparações de misturas enzimáticas individuais foram avaliadas usando a *equação 2*, de acordo com Hu, Arantes e Saddler, (2011).

$$DS = \frac{\sum CP_{mistura}}{\sum CP_{individual}}$$

Onde:

DS: Grau de sinergismo;

$\sum CP_{mistura}$: Soma da concentração de produto produzido com o coquetel;

$\sum CP_{individual}$: Soma da concentração de produto produzido com o preparo enzimático individual.

4.12 Análise dos dados obtidos

Os experimentos de caracterização foram realizados em quintuplicatas utilizando diferentes amostras purificadas de XylHb (N=5) e os dados estão apresentados como média e desvio padrão (DP). A velocidade máxima ($V_{Máx}$) e a constante de Michaelis-Menten (K_M) foram calculados, empregando o programa SigrafW (LEONE *et al.* 2005). Os dados obtidos no experimento de hidrólise do bagaço de cana pré-tratado e efeito de aditivos foram submetidos a análise de variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey e Dunnett no programa Graphpad Prism 8 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA), respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção da endo-xilanase extracelular de *H. brevis* var. *thermoidea*

Inicialmente, o extrato bruto rico em xilanases extracelulares foi produzido através de fermentação em estado sólido (FES) e extraído de acordo com o item 4.3.

Os resultados de produção demonstraram que *H. brevis* var. *thermoidea* quando cultivado em farelo de trigo e água 1:2 (m/v) produziu aproximadamente 4.560 ± 552 U g⁻¹ de xilanases extracelulares. Esta produção foi próxima ao relatado anteriormente para a mesma cepa ($5.327,4 \pm 370,7$ U g⁻¹) e para outros fungos do mesmo gênero, como *Humicola lanuginosus* (4.977 U g⁻¹), quando cultivados sobre as mesmas condições (KAMRA; SATYANARAYANA, 2004; MASUI *et al.*, 2012).

Estudos adicionais de produção realizados por Masui *et al.*, (2012), demonstraram que *H. brevis* var. *thermoidea* quando cultivado em outras fontes de carbono em FES, apresentou níveis, cerca de, 5 a 12 vezes menores de xilanases extracelulares quando comparados ao farelo de trigo. Dentre alguns exemplos, pode-se citar: a fibra de soja ($1.102,3 \pm 121,1$ U g⁻¹), casca de amendoim ($935,5 \pm 110,4$ U g⁻¹), bagaço de cana-de-açúcar ($481,7 \pm 58,3$ U g⁻¹), proteína de soja ($435,3 \pm 55,3$ U g⁻¹) e soja moída ($426,1 \pm 51,4$ U g⁻¹).

Por outro lado, em estudos de produção envolvendo fungos de gêneros distintos, foi relatado que *Trichoderma longibrachiatum* produziu $479,7$ U g⁻¹ de xilanases extracelulares, enquanto que *Aspergillus niger* NFCCI 4113, *M. thermophila* e *Fusarium oxysporum* produziram, 1.175; 1.292 e 1.840 U g⁻¹ quando cultivados em FES utilizando farelo de trigo como substrato (AZIN; MORAVEJ; ZAREH, 2007; MORETTI *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2018). Essas produções foram menores quando comparadas as obtidas para fungos do gênero *Humicola* ao utilizarem o mesmo substrato, sugerindo que este gênero seja promissor para a produção de hemicelulases a partir de agrosíduos ricos em glucuranoarabinosilanos, como o farelo de trigo.

Desta forma, o extrato bruto rico em xilanases extracelulares, produzidas por *H. brevis* var. *thermoidea* em FES constituído por farelo de trigo e água 1:2 (m/v), foi utilizado para etapas posteriores de precipitação e purificação.

5.2 Precipitação e purificação da endo-xilanase extracelular de *H. brevis* var. *thermoidea*

5.2.1 Precipitação seletiva da endo-xilanase extracelular

As xilanases extracelulares presentes no extrato bruto produzidos a partir de FES foram submetidas à testes iniciais de precipitação utilizando solventes orgânicos e inorgânicos de acordo com os itens 4.6.1 e 4.6.2, respectivamente. Foram avaliadas três metodologias para precipitação de proteínas, sendo estas: sulfato de amônio, acetona gelada e etanol gelado.

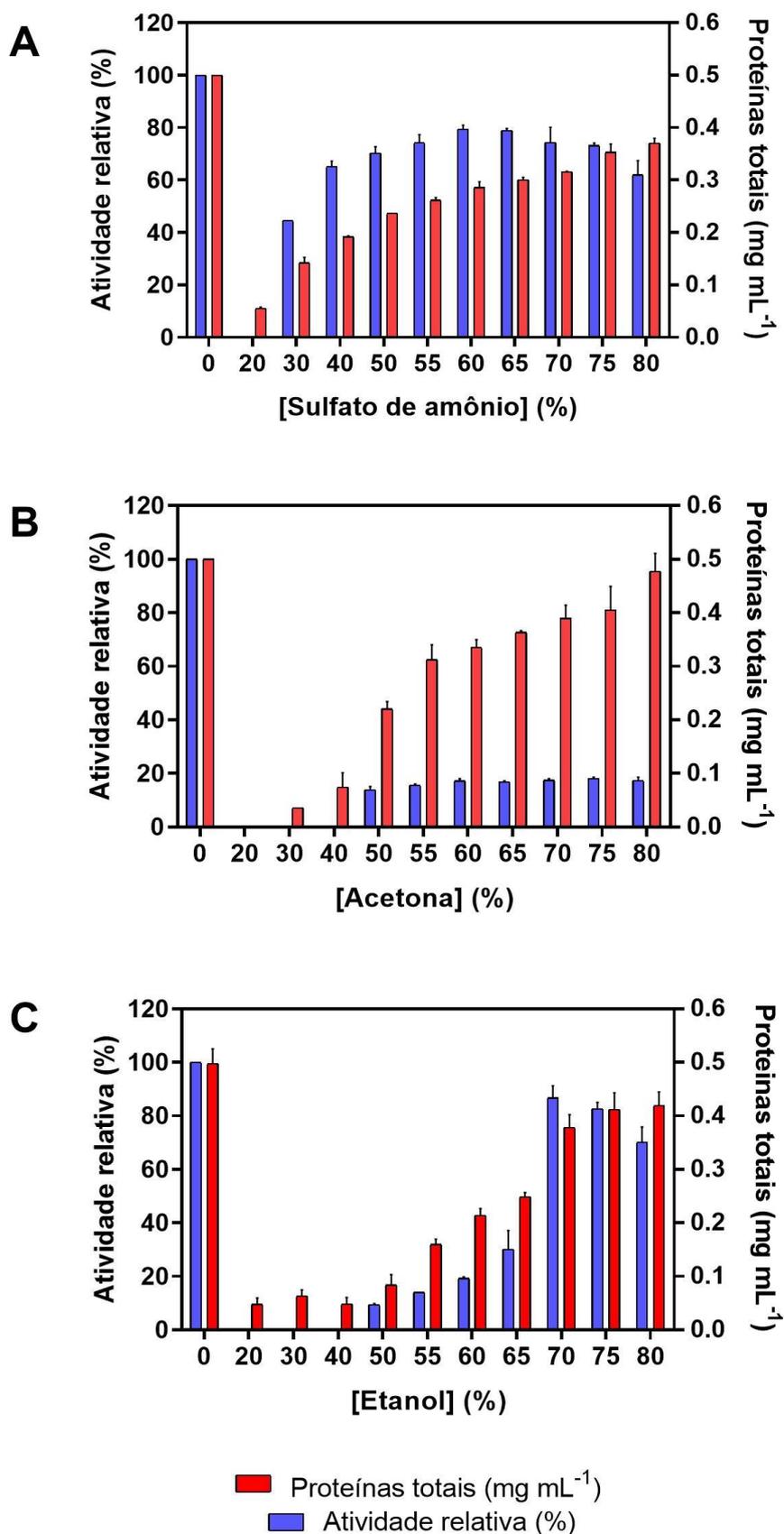
Dentre as metodologias testadas a que se demonstrou mais efetiva para a precipitação de xilanases extracelulares foi aquela utilizando 70% (v/v) de etanol gelado, apresentando a recuperação de 85% de atividade quando comparada ao extrato bruto (Figura 12). O segundo melhor foi o sulfato de amônio 60% (m/v) (com 80% de recuperação) e por último a acetona gelada 75% (v/v) (20% de recuperação). O decréscimo de atividade na utilização de acetona gelada indica que ocorreu a possível desnaturação proteica não reversível ao utilizar este solvente orgânico.

O etanol é o mais importante dos solventes devido às suas propriedades físico-químicas, como ex.: a completa miscibilidade com água, inércia química, baixa toxicidade, baixo custo, ausência da necessidade de etapas subsequentes de diálise (que são necessárias para aquelas que utilizam sais como sulfato de amônio). Além disso, pensando em um processo de escalonamento e aplicação, a possibilidade de reciclo para novas precipitações através da rota evaporação e recuperação do solvente (CORTEZ; PESSOA; ASSIS, 1998). Estas características tornaram o método escolhido de precipitação com etanol gelado além de viável, uma etapa unitária de produção (*downstream*) da endo-xilanase, uma estratégia sustentável.

Metodologias envolvendo a precipitação de proteínas como etapas preparativas para procedimentos de purificação são amplamente utilizadas. Um estudo realizado por Kumar e Shukla, (2018), ao testarem diferentes solventes orgânicos na precipitação de xilanases produzidas por *T. lanuginosus* VAPS24, observaram que a acetona foi o solvente que obteve o maior índice de recuperação, correspondendo a 83%. Diferente do observado para as endo-xilanases extracelulares de *H. brevis* var. *thermoidea*, nas quais tiveram apenas 20% de recuperação quando a acetona foi usada.

Outro trabalho realizado por Costa, Farinas e Miranda, (2018) demonstrou que ao utilizarem 80% de etanol obtiveram recuperações de 79 e 97% da atividade de xilanases extracelulares expressas por *A. niger* e *Trichoderma harzianum*, respectivamente. Corroborando com o obtido para as endo-xilanases de *H. brevis* var. *thermoidea* quando a precipitação com etanol foi utilizada.

Figura 12: Precipitação da endo-xilanase extracelular de *H. brevis* var. *thermoidea* utilizando sulfato de amônio e solventes orgânicos.



A) Sulfato de amônio; B) Acetona gelada; C) Etanol gelado. 100% = 140 U mg⁻¹. Cada valor no painel representa as médias \pm SD ($n = 5$).

A diferença da metodologia de precipitação e a concentração final do solvente orgânico ou inorgânico que será utilizado é estritamente relacionada à variação da solubilidade proteica, dependendo de fatores que incluem a distribuição e proporção dos grupos polares e apolares presentes na superfície da biomolécula (BURGUES, 2009).

Desta forma, buscando-se aperfeiçoar o procedimento, aumentar a rentabilidade e a praticidade da etapa de concentração da enzima, o método selecionado para dar continuidade aos estudos de purificação foi o da precipitação com etanol. Uma amostra de 10 mL de extrato bruto contendo 2.084,90 U Totais foi precipitada e ressuspendida em 1 mL de solução tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ de acordo com o item 4.6.2.2. O precipitado apresentou 1.754,09 U Totais, representando 84,13% de recuperação e um fator de purificação de 2,09 vezes (Tabela 2). Esta foi reservada para as etapas subsequentes de cromatografia.

5.2.2 Teste de “binding” da XylHb em diferentes resinas de troca iônica

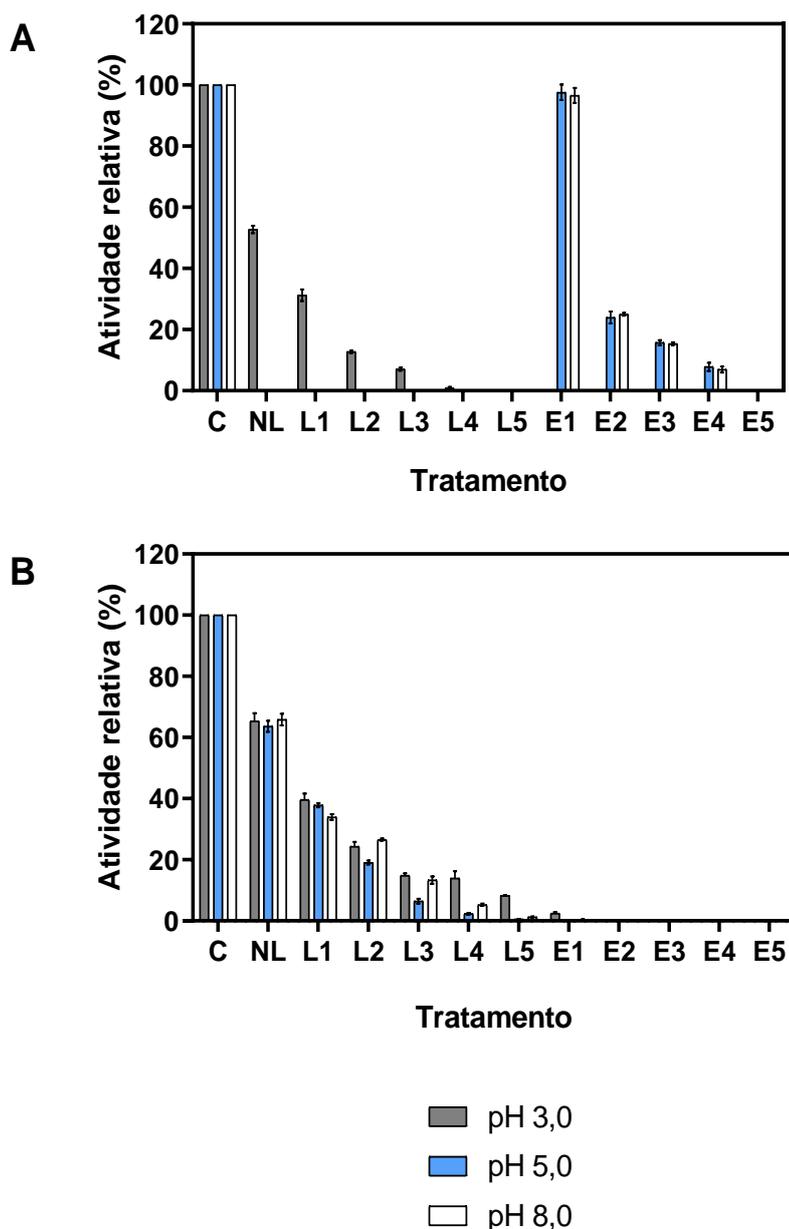
Após a padronização do método de precipitação, amostras do extrato bruto foram previamente equilibradas, em valores de pH 3,0; 5,0 e 8,0, e submetidas a testes em *binding* utilizando duas resinas de trocas iônicas, como descritos no item 4.6.3.

Foram utilizadas duas resinas para o teste, sendo estas: DEAE Toyopearl[®] giga cap – 650M (Tosoh, JPN) e CM Celulose (Sigma-Aldrich, USA).

A Dietilaminoetil (DEAE) Toyopearl[®] giga cap – 650M (Tosoh, JPN), é uma resina trocadora de ânions que contém uma matriz de polímero metacrílico hidroxilado com cadeias laterais α -amino (NH₃⁺). A faixa operacional dos grupos laterais, para que estejam na forma protonada, varia de pH 2,0 – 9,0 e a capacidade de ligação da matriz corresponde a 150 mg de BSA / g de resina (MILNE, 2016). Por outro lado, a Carboximetil (CM) Celulose (Sigma-Aldrich, USA), é uma resina trocadora de cátions que contém grupos laterais α -carboxilas (COO⁻) ligados a uma superfície de celulose. A faixa operacional destes grupos laterais, para que estejam na forma desprotonada, varia de pH 4,0 – 12,0 e a capacidade de ligação desta matriz é de 60 mg de BSA / g de resina (MILNE, 2016).

A partir dos resultados obtidos, dentre as duas resinas avaliadas, apenas a DEAE Toyopearl[®] giga cap – 650M (Tosoh, JPN), em pH 5,0 e 8,0, favoreceu a interação com as xilanases extracelulares, de *H. brevis* var. *thermoidea* (Figura 13).

Figura 13: Teste *binding* da influência do pH e da resina na interação de xilanases extracelulares de *H.brevis* var. *thermoidea*.



A) DEAE Toypearl® giga cap-650M. B) CM celulose. C: Controle; NL: Não ligado; L1: Lavagem 1; L2: Lavagem 2; L3: Lavagem 3; L4: Lavagem 4; L5: Lavagem 5; E1: Eluição 1; E2: Eluição 2; E3: Eluição 3; E4: Eluição 4; E5: Eluição 5. 100% = 460 U mg⁻¹. As etapas de eluição foram realizadas na presença de 2 mol L⁻¹ de NaCl. Cada valor no painel representa as médias ± SD (n = 5).

A presença de interações na DEAE, a partir de pH 5,0, sugeriu que a xilanase extracelular (XylHb) obtém o ponto isoelétrico (*pI*) ácido apresentando a somatória ds cargas presentes na superfície negativa neste pH, favorecendo a interação eletrostática com os grupos α -amino presentes na resina. Este resultado corrobora com o obtido para a CM celulose (Sigma-Aldrich, USA), uma vez que em valores de pH próximos a neutralidade os grupos α -carboxila estejam predominantemente na forma de COO⁻ (desprotonados), ocasionando repulsão de cargas com a amostra.

A partir destes resultados foi selecionada a resina trocadora de ânions DEAE Toyopearl® giga cap – 650M (Tosoh, JPN) e pH 5,0 para as etapas seguintes. A principal vantagem da utilização de pHs que variam de 4,5 a 6,5 para a purificação de xilanases produzidas por fungos filamentosos envolve a proximidade ao pH ótimo de catálise destas biomoléculas, que se encontra dentro desta faixa de atuação (podendo haver exceções). Como exemplo: a xilanases produzidas por *C. thermophile*, *Chrysosporium lucknowense*, *Remersonia thermophila* e *H. insolens* (CHADA *et al.*, 2019).

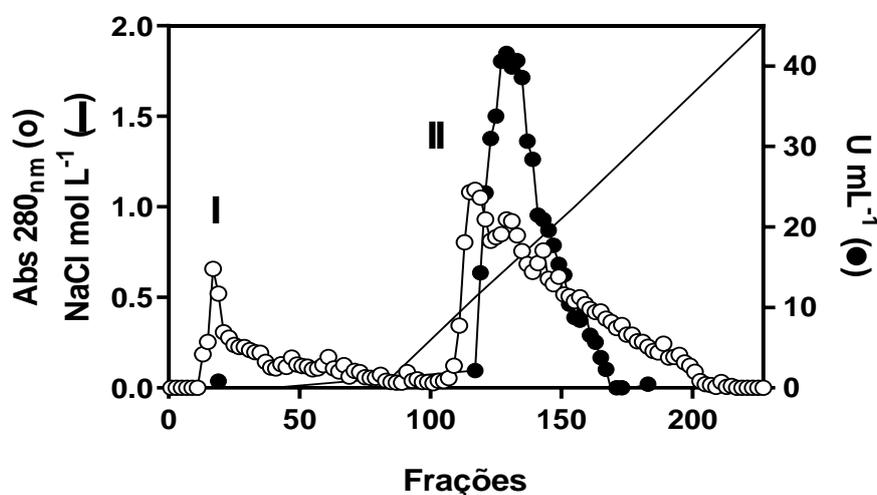
5.2.3 Cromatografia da XylHb por troca iônica

O extrato precipitado no item 4.6.2.2 contendo 1.754,09 U Totais, foi aplicado na coluna de troca iônica DEAE Toyopearl® giga cap – 650M de acordo com o item 4.6.4.

A eluição da resina resultou em um pico de proteínas antes do gradiente salino (I) sem atividade enzimática para endo-xilanase e outro após o gradiente salino (II) com atividade enzimática (Figura 14). As frações referentes ao pico II, eluídas em $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, foram recolhidas e agrupadas. O pico II apresentou 1.710,54 U totais, representando 82,04% de recuperação após esta etapa cromatográfica e um fator de purificação de 10,08 vezes (Tabela 2).

Uma eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) foi realizada para análise do grau de pureza obtida após esta etapa (Figura 16A). O resultado obtido indicou que a amostra não alcançou o grau de pureza adequado, sendo necessário mais um passo cromatográfico. Desta forma, o eluído correspondente ao pico II foi equilibrado em tampão apropriado como o descrito no item 4.6.4 para a etapa subsequente de exclusão por peso molecular.

Figura 14: Purificação da endo-xilanase extracelular de *H. brevis* var. *thermoidea* com colunas cromatográficas DEAE Toyopearl® giga cap – 650M.



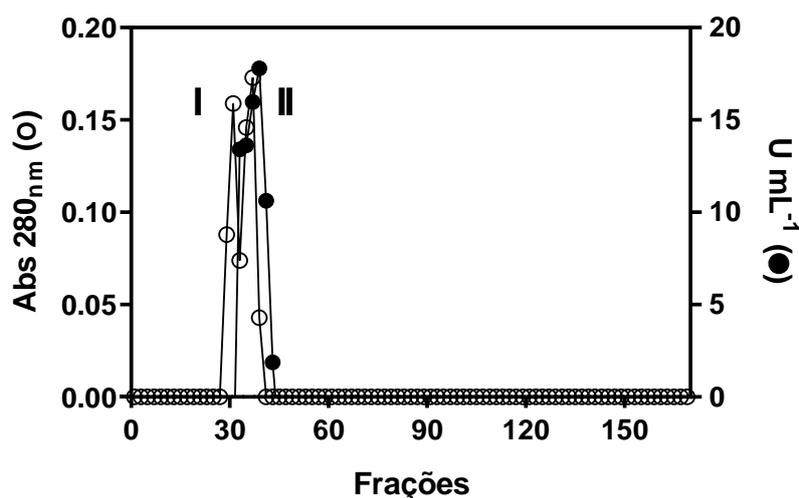
A atividade xilanolítica foi expressa por U mL^{-1} (●), a emissão dos resíduos de aminoácidos aromáticos por $\text{Abs } 280_{\text{nm}}$ (○) e o gradiente salino por NaCl mol L^{-1} (—). I (pico I); II (pico II).

5.2.4 Cromatografia da XylHb por exclusão molecular

O primeiro pico (I) não apresentou atividade enzimática para endo-xilanase, ao contrário do observado para o segundo pico (II). A amostra corresponde ao eluído do pico II, foi aplicado na resina de exclusão por peso molecular TSK Fractogel 50 (S) de acordo com o descrito no item 4.6.5. Esta resina tem a propriedade de separar proteínas com o peso menor do que 30 kDa. Assim como na etapa de troca iônica, a eluição da resina resultou novamente em dois picos de proteínas (Figura 15).

Após a eluição, as frações referentes ao segundo pico foram reunidas e sujeitas a eletroforese desnaturante (SDS-PAGE). O perfil eletroforético da amostra do pico principal contendo atividade xilanásica máxima apresentou apenas uma banda proteica, indicando que a XylHb foi purificada de forma homogênea (Figura 16B).

Figura 15: Purificação da endo-xilanase extracelular de *H. brevis* var. *thermoidea* com resina cromatográfica TSK Fractogel 50 (S).



A atividade xilanolítica foi expressa por $U\ mL^{-1}$ (o) e a emissão dos resíduos de aminoácidos aromáticos por $Abs\ 280_{nm}$ (●). I (pico I); II (pico II).

Todas as frações com atividade xilanásica foram reunidas. O reunido correspondeu a 1.298 U Totais, uma recuperação de 62,2% e um fator de purificação de 37,12 vezes quando comparada a etapa anterior (Tabela 2).

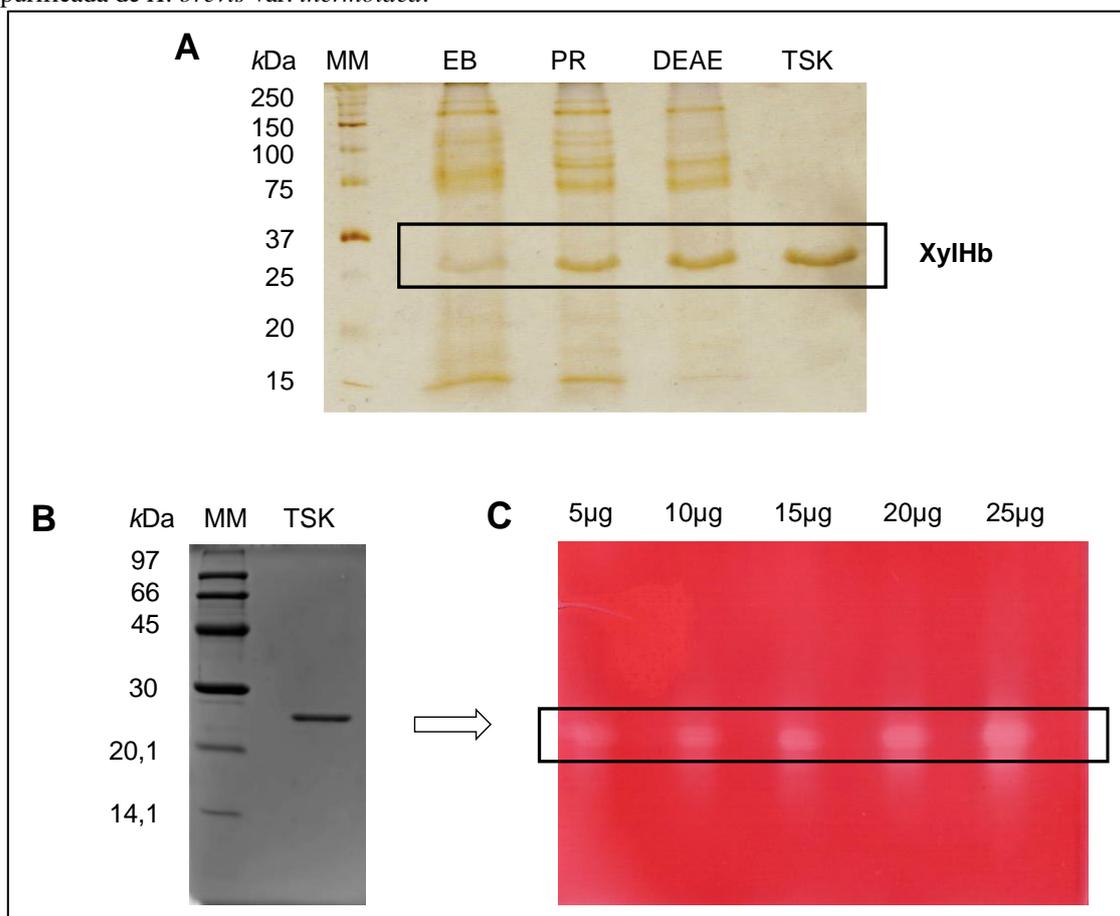
Tabela 2: Purificação da endo-xilanase extracelular de *H. brevis* var. *thermoidea*.

Etapas	Proteínas totais (mg)	U totais	U mg^{-1}	Rendimento	Fator de purificação
Extrato bruto	7,6	2.084,90	274,32	100	1
Precipitação com etanol (70%)	3,05	1.754,09	575,11	84,13	2,09
DEAE Toyopearl® giga cap – 650M	0,618	1.710,54	2.767,86	82,04	10,08
TSK Fractogel 50(S)	0,127	1.298,00	10.185,19	62,25	37,12

Este rendimento foi maior quando comparado com endo-xilanases de outros fungos do mesmo gênero e de gêneros distintos, como ex.: *H. grisea* var. *thermoidea* (NETO; FILHO, 2004) e *T. aurantiacus* (PING *et al.*, 2018). Entretanto, obteve o rendimento menor quando comparado a endo-xilanase de *T. lanuginosus* (KUMAR; SHUKLA, 2018).

Posteriormente, a amostra purificada foi submetida à atividade em gel (zimograma), em concentrações que variaram de 5 a 25 μg de acordo com a metodologia citada no item 4.7. Em todas as dosagens utilizadas foi possível realizar a detecção da atividade enzimática indicando, desta forma, que baixas concentrações de XylHb são suficientes para processos de hidrólise da xilana (Figura 16C).

Figura 16: Eletroforese em gel poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) da endo-xilanase extracelular purificada de *H. brevis* var. *thermoidea*.



A) Etapas de purificação da XylHb, MM: Massa molecular; EB: Extrato bruto (10 μg); PR: Precipitado com etanol gelado (10 μg); DEAE: DEAE Toyopearl® giga cap 650M (10 μg); TSK: TSK Fractogel 50 (S) (10 μg). B) Amostra das frações da TSK Fractogel reunidas contendo a xilanase purificada a direita (TSK) (10 μg) e a Massa molecular à esquerda (MM). C) Zimograma utilizando 5, 10, 15, 20 e 25 μg de xilanase purificada coradas com vermelho Congo.

Estes resultados corroboram com alguns resultados descritos na literatura para *T. lanuginosus* VAPS24, *T. aurantiacus*, *Talaromyces thermophilus*, *P. thermophila*, *R. thermophila* e *H. insolens* Y1, nos quais foram necessários mais de uma etapa para adquirirem xilanases purificadas (PING *et al.*, 2018; KUMAR; SHUKLA, 2018; BALA; SING, 2019). São raras as exceções nos quais as purificações dessas enzimas são realizadas com êxito em apenas uma ou duas etapas, como no caso encontrado para *T. lanuginosus*, *Aspergillus japonicus* e *Aspergillus tamarii* Kita (HEINEN *et al.*, 2018; BALA; SING, 2019; SILVA *et al.*, 2019).

Assim, o protocolo de purificação da XylHb desenvolvido neste trabalho incluindo uma etapa de precipitação com etanol gelado seguido pela utilização de duas etapas cromatográficas, que incluíram uma resina de troca aniônica como fase intermediária e de exclusão molecular como fase de polimento, se mostrou eficiente, promissor e foi a primeira vez descrita para a endo-xilanase de *H. brevis* var. *thermoidea*.

5.2.5 Análise da XylHb por eletroforese bidimensional

Após as duas etapas de cromatografia para purificação, a XylHb foi submetida à focalização isoeletrica com o objetivo de se identificar o *pI*, a massa molecular e para posteriores testes de análise por espectrometria de massas (Item 4.8).

A descoberta do ponto isoeletrico é importante por fornecer o pH em que há o equilíbrio entre cargas positivas e negativas presentes em macromoléculas. A solubilidade de proteínas depende de vários fatores, dentre eles a presença das cargas elétricas ao longo de sua superfície. A existência de uma carga positiva ou negativa determina a interação com o meio aquoso, além de estabelecer um estado de repulsão entre as próprias moléculas de proteína, aumentando a interação com o solvente e, conseqüentemente, favorecendo a solubilidade (PERGANDE; COLOGNA, 2017).

Como mostrado na Figura 17, o perfil da proteína purificada em eletroforese 2D demonstrou a presença de possíveis isoformas que estão na faixa ácida do gel, que diferem entre si por uma pequena variação na massa molecular e no *pI*. Nota-se a existência de cinco pontos na mesma faixa de onde se encontrava a banda referente à XylHb.

Os pontos isofocalizados foram identificados e analisados pelo programa Image Master 2D platinum v7.0 (Cytiva, USA), para a detecção da massa molecular e ponto isoeletrico como descritos no item 4.8.4. O resultado das análises indicou que a variação de massa molecular entre 25 e 26 kDa e o *pI* ente pH 4,0 e 4,9, corroborando com a hipótese levantada anteriormente na qual a xilanase expressa obtém o *pI* ácido (Tabela 3).

Figura 17: Eletroforese 2D da xilanase extracelular purificada de *H. brevis var. thermoidea*.

Perfil 2D da amostra da xilanase expressa delimitada em preto e identificada de 129 a 133 (a direita) e o peso molecular (MM) (a esquerda).

A prevalência de massa molecular abaixo dos 30 kDa indica que a xilanase alvo seja pertencente à família GH11. Dentre outros fungos que expressaram xilanases pertencentes a esta família, encontra-se o *Thermus thermophilus*, *T. lanuginosus* IOC-4145, *C. thermophile* e *Malbranchea flava* MTCC 4889 (NETO; FILHO, 2004; BALA; SINGH, 2018; CHADA *et al.*, 2019; ALOLIKA; SINGH, 2019).

O ponto isoelétrico encontrado é diferente do encontrado para endo-xilanases expressas por fungos do mesmo gênero como *H. insolens* e *H. fuscoatra* nos quais expressaram xilanases com *pIs* alcalinos de ~ 9,5 e 9,7. Entretanto, semelhante a outros fungos termofílicos, tais como: *C. thermophilum* (*pI* ~ 4,5), *T. lanuginosus* (*pI* ~ 4,1), *C. lucknowense* (*pI* ~ 5,5) e *Malbranchea sp.* (*pI* ~ 3,4) (GHATORA *et al.*, 2006; PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

Tabela 3: Ponto isoelétrico e massa molecular da endo-xilanase extracelular purificada de *H. brevis var. thermoidea*.

Pontos de proteínas	Ponto isoelétrico (<i>pI</i>)	Massa molecular (kDa)
130	4,93	26
129	4,82	26
132	4,54	26
131	4,29	25
133	4,09	25

A multiplicidade de fatores como ação de proteases, glicosilação ou produtos alternativos de um mesmo gene, pode favorecer a produção de isoformas que auxiliam na completa hidrólise da xilana (DESHPANDE *et al.*, 2008). Isto pode ser a resposta para o observado na análise correspondente a presença de vários pontos de proteínas iofocalizados. Entretanto, para que as bases de fatores incluindo ponto isoelétrico e a massa molecular sejam compreendidas, mais estudos terão que ser realizados.

5.3 Caracterização biofísica

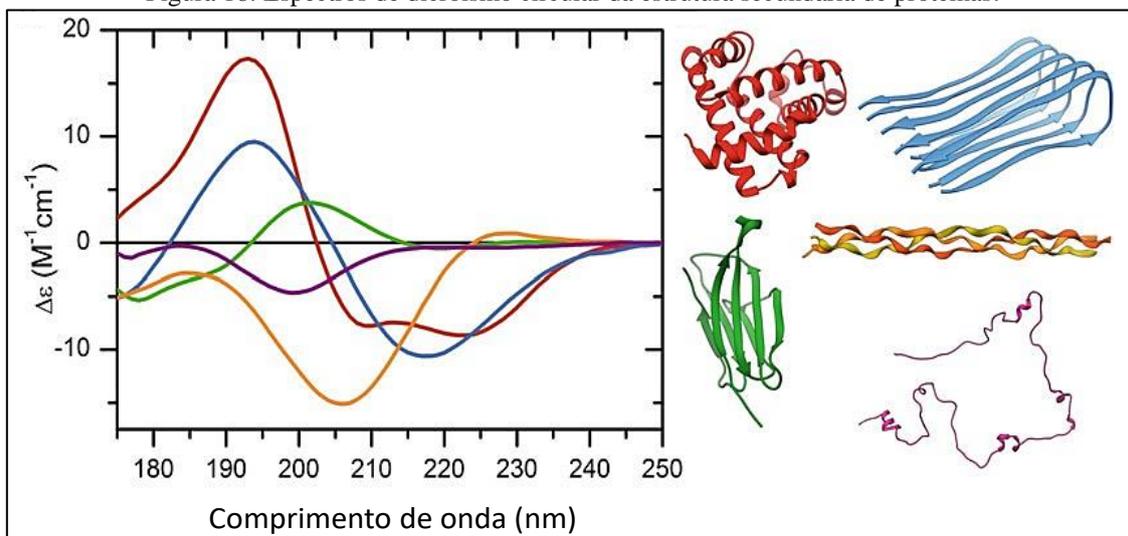
5.3.1 Avaliação do perfil da estrutura secundária da XylHb por dicroísmo circular

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica espectroscópica não destrutiva que utiliza a absorção da luz polarizada no sentido horário ou anti-horário para a avaliação estrutural de moléculas opticamente ativas. Para biomoléculas como as proteínas, esta técnica é utilizada na avaliação de estruturas secundárias, terciárias e comportamento frente a diferentes condições como pH e temperatura (ROGERS *et al.*, 2019; HUSSAIN *et al.*, 2019). Dentre as vantagens do CD, destaca-se a utilização de quantidades reduzidas de amostra para os testes e possibilidade de reaproveitamento (KELLY; JESS; PRICE, 2005; GREENFIELD, 2007).

Nas proteínas, os cromóforos de interesse incluem a ligação peptídica (absorção abaixo de 240 nm), cadeias laterais de aminoácidos aromáticos (absorção na faixa de 180 a 250 nm) e ligações dissulfeto (bandas largas de absorção fracas centradas em torno de 260 nm) (GREENFIELD, 2007). Ainda de acordo com este autor, as proteínas α -helicoidais têm sinais negativos em 208 e 222 nm e positivo em 193 nm. Proteínas com folhas β bem definidas têm sinais negativos em 218 nm e positivos em 195 nm, enquanto proteínas desordenadas têm elipicidade molar baixa e sinais negativos perto de 195 nm (Figura 18).

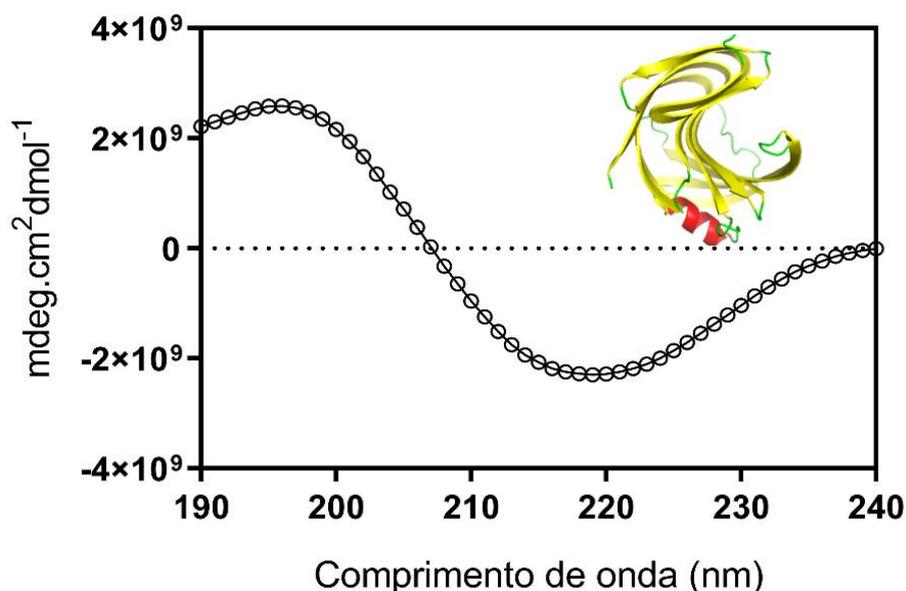
Para a análise da integridade do perfil secundário da XylHb após as etapas de purificação, a endo-xilanase foi submetida à análise estrutural por dicroísmo circular conforme descrito no item 4.9.1.

Figura 18: Espectros de dicroísmo circular da estrutura secundária de proteínas.



Proteínas de estruturas secundárias distintas, como α -hélice (vermelho), folha β paralela (azul), folha β antiparalela (verde), hélice de poliprolina (laranja) e cadeia desordenada (roxo), exibem formas espectrais características indicando que a espectroscopia por CD pode ser útil para a determinação da estrutura secundária de proteínas. Fonte: Adaptado de Micsonai, Bulyáki e Kardos, (2020).

O espectro de dicroísmo apresentou uma banda negativa com sinal próximo a 218 nm (Figura 19). Esse perfil é indicativo de uma estrutura com alto conteúdo de estrutura secundária do tipo folhas β . O alto percentual de folhas β associado aos resultados de baixo peso molecular, permite sugerir novamente que a xilanase pertença à família GH11. Somados a isso, o resultado estrutural obtido foi similar ao reportado na literatura para outras xilanases da família GH11 (GONÇALVES *et al.*, 2012; HEINEN *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2020a).

Figura 19: Espectro de dicroísmo circular da xilanase purificada de *H. brevis* var. *thermoidea* e estrutura da xilanase GH11 de *T. lanuginosus*.

5.3.2 Efeito da temperatura na fluorescência intrínseca do triptofano (FIT) da XylHb

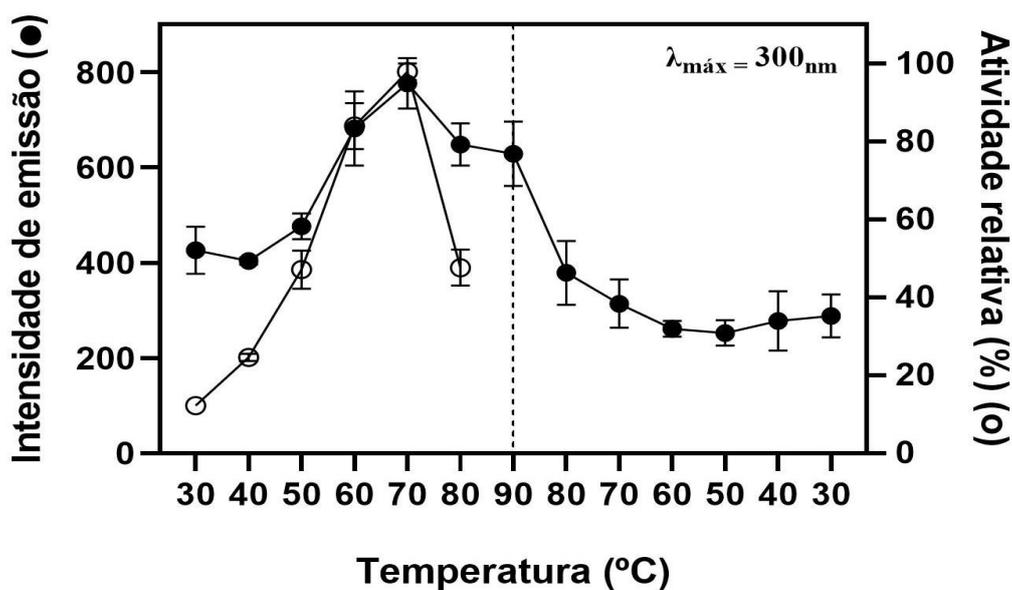
A espectroscopia de fluorescência de proteínas é realizada principalmente através da análise de fluoróforos intrínsecos (tirosina, fenilalanina e triptofano). Estes fluoróforos absorvem a luz (energia) de um comprimento de onda específico (λ_{EX}) e após um breve intervalo denominado “vida útil” da fluorescência, realizam a emissão em um comprimento de onda mais longo (λ_{EM}) (YANG *et al.*, 2017; HELLMAN; SHNEIDER, 2019). A fluorescência de resíduos de aminoácidos é altamente sensível ao microambiente em que se encontram, portanto, monitorar os parâmetros de fluorescência ($\lambda_{m\acute{a}x}$) incluindo a ação da temperatura e pH, sugerem modificações estruturais sofridas na vizinhança dos fluoróforos (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014).

Desta forma, com o objetivo de compreender a influência da temperatura na modificação da estrutura terciária da XylHb, esta enzima foi submetida ao monitoramento através de fluorescência intrínseca do triptofano (FIT) em diferentes temperaturas conforme descrito no item 4.9.2.

A amostra contendo a XylHb foi submetida ao aquecimento em temperaturas variando entre 30 e 90 °C e posterior resfriamento. O espectro de emissão de fluorescência, após excitação em 295 nm, apresentou $\lambda_{m\acute{a}x} = 300$ nm, indicando que a proteína é dobrada com seus resíduos de triptofanos imersos em um ambiente hidrofóbico (LADOKHIN, 2000).

Conforme a temperatura foi alterada de 30 a 90 °C, observou-se que a intensidade de emissão aumentou progressivamente até atingir o máximo em 70 °C, e posteriormente, decresceu à medida que a temperatura ficou próxima de 90 °C. Atingidos os 90 °C, a temperatura foi reduzida progressivamente para o possível reenovelamento proteico. Entretanto, a intensidade de emissão não obteve modificações indicando que a proteína sofreu desnaturação irreversível após os 70 °C (Figura 20).

Figura 20: Influência da temperatura na atividade enzimática e fluorescência intrínseca do triptofano (FIT) da endo-xilanase purificada de *H. brevis* var. *thermoidea*.



(○) Temperatura ótima; (●) Fluorescência intrínseca do triptofano. 100% = 10.503 U mg⁻¹. Cada valor no painel representa as médias ± SD ($n = 5$).

A partir destes resultados, notou-se que o aquecimento progressivo favoreceu a modificação do microambiente proteico da XylHb auxiliando na máxima exposição dos resíduos de triptofano a 70 °C, coincidindo com os resultados obtidos para a temperatura ótima desta enzima, levantando a hipótese de que estes resíduos estejam relacionados com a catálise enzimática.

Estudos relacionados relataram que xilanases GH11 expressas por microrganismos apresentam resíduos de triptofano, tirosina, isoleucina e fenilalanina mediando o sítio catalítico. Dentre estes resíduos, o triptofano e a tirosina são os mais predominantes (MICHAUX *et al.*, 2010; PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012). O anel aromático destes aminoácidos forma interações de empilhamento com o anel do açúcar servindo como uma plataforma na fenda de ligação do substrato, desta forma auxiliando na catálise enzimática (FUJIMOTO *et al.*, 2000; CHENG *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2020b). Resultados semelhantes foram registrados para a XynA de *T. lanuginosus* DSM 5826 (MAHARAJ *et al.*, 2011).

Desta forma, estas informações corroboram com a hipótese levantada. Entretanto, experimentos auxiliares como cristalografia e *docking* molecular são necessários para afirmar que realmente os resíduos de triptofano estão auxiliando indiretamente no processo catálise da XylHb.

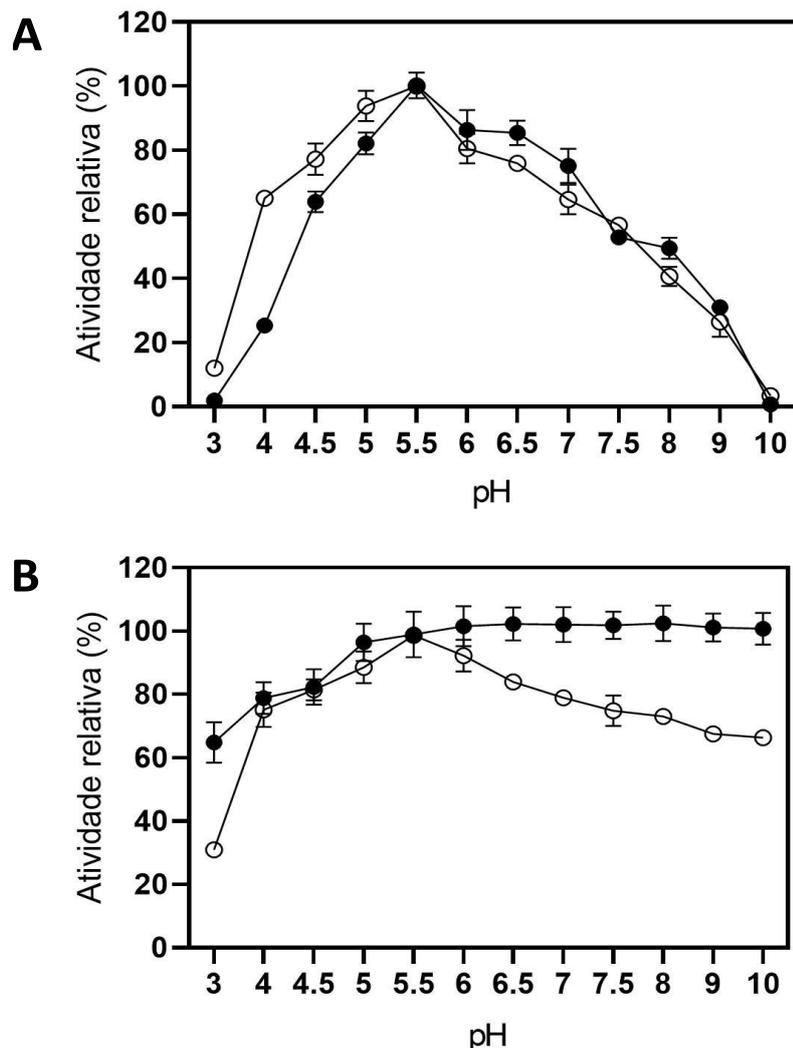
5.4 Caracterização bioquímica da XylHb e endo-xilanase comercial Cellic[®]HTec2

5.4.1 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática

A influência do pH na atividade e estabilidade da XylHb foram comparadas com as da endo-xilanase comercial (Cellic[®]HTec2) uma vez que esta segunda é amplamente utilizada para diversas aplicações envolvendo o bioprocessamento do bagaço de cana-de-açúcar para produção de bioetanol e de papel, e celulose (item 4.10.1). Para o efeito do pH, foi observado que tanto a XylHb quanto a Cellic[®]HTec2 obtiveram o máximo de liberação de açúcares redutores em pH 5,5, correspondendo a 100% da atividade total. Para valores de pH abaixo do ótimo (5,0) observou-se que a atividade enzimática apresentou 90%, e 85% de liberação de açúcares, para Cellic[®]HTec2 e XylHb, respectivamente. Em valores de pH superiores ao ótimo, foi observado o decréscimo gradativo de atividade (Figura 21A). A partir destes resultados, conclui-se que, ambas as enzimas avaliadas são endo-xilanases ácidas.

O pH ótimo encontrado está dentro do que foi descrito para endo-xilanases expressas por fungos, nos quais a máxima liberação de açúcares ocorreu entre pH 4,5 e 6,5. Como exemplo, podemos citar: *C. thermophilum* (pH 5,0), *T. lanuginosus* (pH 6,0), *Caldocelum saccharolyticum* (pH 5,5), *R. thermophila* (pH 6,0), *H. grisea* var. *thermoidea* (pH 4,5 a 6,5) (NETO; FILHO, 2004; PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012; BALA; SINGH; 2018). Por outro lado, o trabalho de Boonrung *et al.*, (2016), demonstrou que, a xilanase extracelular de *M. thermophila* BF1-7 foi mais ativa em pH 12,0, sendo o mais alto relatado dentre os fungos. Entretanto, reteve apenas 55% da atividade na faixa de pH 9,0 – 12,0, após a incubação por 24 h.

Conforme mostrado na Figura 21B, a XylHb foi estável em uma ampla faixa de pH (5,0-10,0), retendo 100% da atividade inicial por 24 h. Por outro lado, a enzima comercial permaneceu estável apenas em pH 5,5. Nota-se que a XylHb foi mais resistente a ambientes alcalinos quando comparada a enzima comercial, podendo, desta forma, ser caracterizada como álcalo-tolerante. Estes resultados corroboraram com aqueles encontrados por Masui *et al.*, (2012) ao caracterizarem a endo-xilanase no extrato bruto de *H. brevis* var. *thermoidea*.

Figura 21: Efeito do pH na atividade e estabilidade da XylHb e Cellic[®]HTec2

(A) pH ótimo. (B) Estabilidade ao pH por 24 h. (●) XylHb; (○) Cellic[®]HTec2. 100% = 10.253 U mg⁻¹. Cada valor no painel representa as médias \pm SD ($n = 5$).

Estudos anteriores demonstraram que a tolerância a álcali parece ser uma característica recorrente entre xilanases fúngicas GH11 (WU *et al.*, 2020a). Uma xilanase de *A. tamaritii* Kita reteve mais de 80% de sua atividade quando incubada por 24 h em valores de pH entre 4,0 e 9,0 (HEINEN *et al.*, 2018), enquanto que uma xilanase de *T. lanuginosus* (Sigma[®]) manteve 100% de sua atividade quando incubada durante 5 h e valores de pH entre 5,0 e 8,0 (SOUZA *et al.*, 2018).

Ademais, a xilanase expressa por *H. insolens* Y1 foi estável entre a faixa de pH 5,0 - 9,0, após 24 h de incubação (SHI *et al.*, 2015). O perfil encontrado foi similar ao obtido neste trabalho, indicando que fungos pertencentes ao gênero *Humicola* produzem xilanases que são estáveis em pHs alcalinos. Desta forma, podendo ser utilizadas para processos que envolvam tratamentos nesta faixa de pH, como exemplo: o biobranqueamento da polpa celulósica.

A estabilidade a variações de pH são de extrema importância uma vez que exerce influência na solubilidade das substâncias, na estabilidade química e nas condições de armazenamento da proteína purificada.

5.4.2 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática

A influência da temperatura na atividade e estabilidade da XylHb e Cellic[®]HTec2 foram comparadas conforme o item 4.10.2. Para a temperatura ótima, foi observado que o máximo de liberação de açúcares redutores ocorre em 70 e 60 °C, para a XylHb e para Cellic[®]HTec2, respectivamente. Em temperaturas superiores à ótima, foi observado o decréscimo gradativo de atividade para ambas as enzimas (Figura 22A).

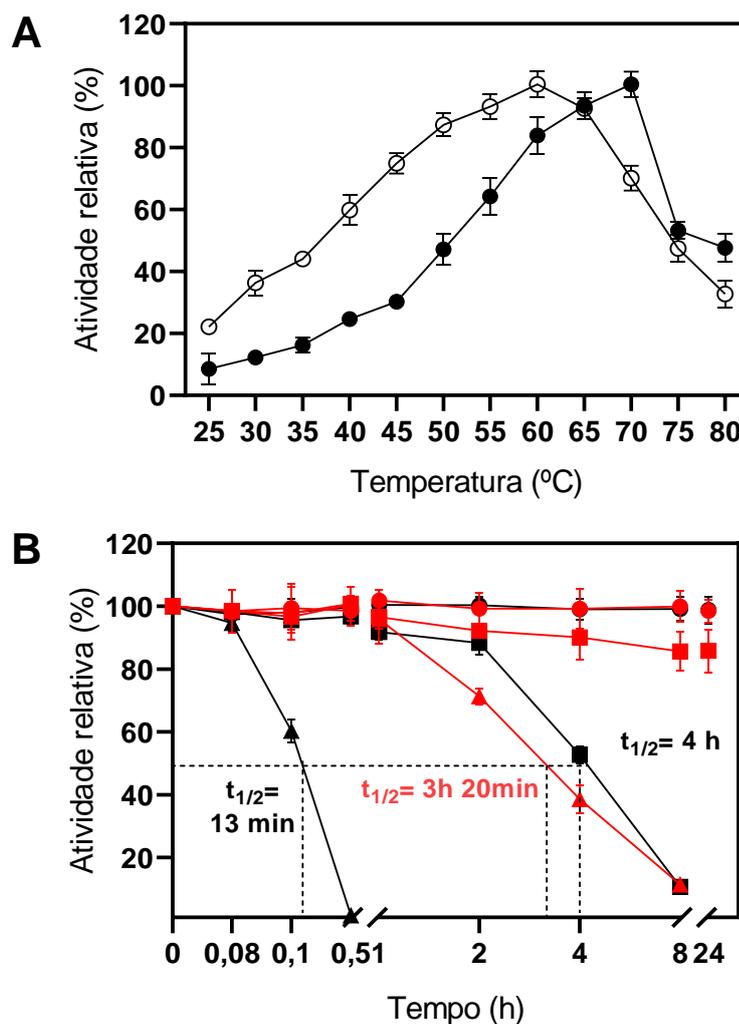
As temperaturas ótimas observadas corroboram com os resultados encontrados na literatura para o extrato bruto contendo a endo-xilanase de *H. brevis* var. *thermoidea* (MASUI *et al.*, 2012) e para a Cellic[®]HTec2, conforme o indicado pelo protocolo sugerido pela fabricante Novozymes.

Enzimas que possuem atividade em temperaturas elevadas são desejáveis para a indústria, entretanto, deve estar aliada a termoestabilidade, pois, uma enzima termoestável pode suportar períodos mais longos de processamento quando comparada aquelas que não são termoestáveis. Desta forma, as amostras enzimáticas avaliadas anteriormente foram submetidas à termoestabilidade em temperaturas de 50, 60 e 70 °C, durante 24 h (Figura 22B).

Os resultados demonstraram que, em 50 °C, ambas as amostras foram estáveis durante todo o tempo de ensaio. Em 60 °C, foram estáveis durante os primeiros 30 min, e após este tempo a enzima comercial (Cellic[®]HTec2) obteve o decréscimo gradativo de atividade, ficando inativa após 24 h e apresentando $t_{1/2} = 4$ h. Entretanto, a amostra XylHb obteve a perda de apenas 20% na atividade ao final do ensaio nesta temperatura.

A 70 °C, a enzima comercial (Cellic[®]HTec2) obteve a perda gradativa de atividade após os primeiros 5 min, apresentando $t_{1/2} = 13$ min. A XylHb foi estável durante 1 h nesta temperatura, apresentando posteriormente o decréscimo gradativo de atividade, apresentando $t_{1/2} = 3$ h 20 min.

A partir destes resultados podemos concluir que a XylHb foi mais estável em temperaturas de 60 e 70 °C quando comparada a amostra comercial Cellic[®]HTec2, sugerindo que esta enzima possa ser utilizada para aplicações industriais que demandem temperaturas acima de 50 °C.

Figura 22: Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da XylHb e Cellic[®]HTec2.

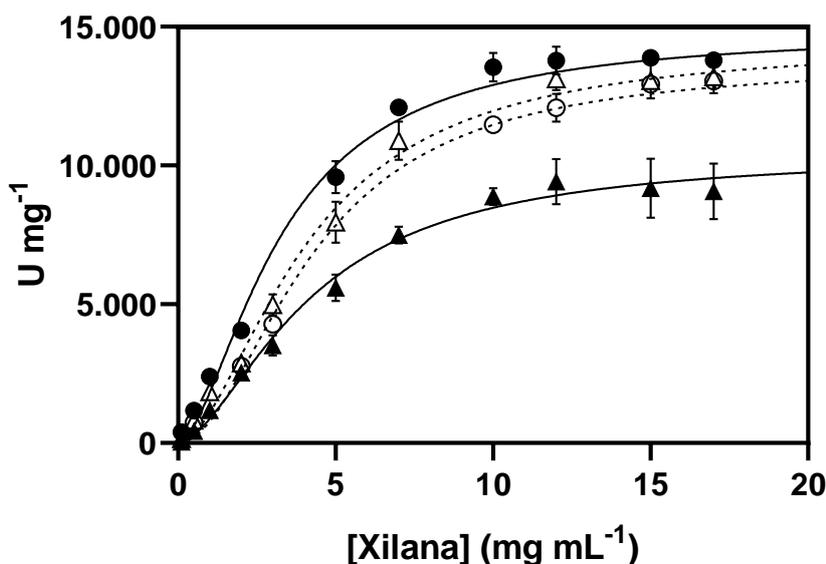
A) Temperatura ótima. (●) XylHb; (○) Cellic[®]HTec2. B) Termoestabilidade enzimática, durante 24 h. XylHb (●) 50 °C; (■) 60 °C; (▲) 70 °C. Cellic[®]HTec2 (●) 50 °C; (■) 60 °C; (▲) 70 °C. ($t_{1/2}$) Tempo de meia vida. 100% = 10.503 U mg⁻¹. Cada valor no painel representa as médias \pm SD ($n = 5$).

Resultados obtidos por Masui *et al.*, (2012) ao analisarem a endo-xilanase no extrato bruto obtiveram os mesmos resultados que a enzima purificada. Outro fungo do mesmo gênero, *H. grisea* var. *thermoidea*, expressou uma xilanase com a mesma temperatura ótima de *H. brevis* var. *thermoidea*, entretanto, apresentando $t_{1/2} = 20$ min em 60 °C (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012). Outros fungos de gêneros distintos, como *S. thermophilum* e *T. aurantiacus* são amplamente utilizados para processos de hidrólise da biomassa e indústria de papel e celulose, respectivamente. Suas xilanases apresentam a temperatura ótima de 60 °C e conseguiram reter entre 70 a 85% da atividade durante o intervalo de 90 a 120 min em 50 °C (TIQUIA; GRUBE, 2019). A enzima expressa pelo *H. brevis* var. *thermoidea* conseguiu reter até 100% da atividade após 24 h na mesma temperatura, reforçando o potencial promissor da endo-xilanase expressa por este fungo.

5.4.3 Parâmetros cinéticos

Com a finalidade de averiguar afinidade pelo substrato e eficiência catalítica, os parâmetros cinéticos da XylHb e Cellic[®]HTec2 foram determinados utilizando a xilana *birchwood* como substrato, em uma concentração variando de 0,1 a 18 mg mL⁻¹ em temperaturas de 50 e 70 °C, conforme descrito no item 4.10.3 (Figura 23).

Figura 23: Efeito da xilana *bichwood* na atividade da XylHb e Cellic[®]HTec2.



Enzima purificada XylHb 50 °C (○); 70 °C (●); Enzima comercial 50 °C (△); 70 °C (▲). Os dados representam as médias \pm SD ($n = 5$).

Os resultados demonstraram que a afinidade pelo substrato em 50 °C para a XylHb ($K_M = 4,3 \pm 0,5$ mg mL⁻¹) e Cellic[®]HTec2 ($K_M = 4,2 \pm 0,6$ mg mL⁻¹), foram semelhantes, e em 70 °C, a XylHb ($K_M = 3,2 \pm 0,3$ mg mL⁻¹) apresentou maior afinidade do que a amostra comercial ($K_M = 4,1 \pm 0,4$ mg mL⁻¹). Em complemento, a XylHb obteve a eficiência catalítica (razão k_{cat}/K_M) mais alta do que a xilanase comercial em ambas temperaturas avaliadas, e pode degradar a xilana *birchwood* com maior eficiência (Tabela 4). Em termos comparativos, a XylHb pode ser utilizada eficientemente em bioprocessos tanto em suas condições ótimas de hidrólise quanto nas condições exigidas industrialmente.

Tabela 4: Comparação entre os parâmetros cinéticos da xilanase purificada (XylHb) e comercial (Cellic[®]HTec2) utilizando xilana *birchwood* como substrato.

Enzima	Temperatura (°C)	K _M (mg mL ⁻¹)	V _{Máx} (U mg ⁻¹)	K _{cat} (s ⁻¹)	K _{cat} /K _M (mLs ⁻¹ mg ⁻¹)
XylHb	50	4,3 ± 0,5	13.717 ± 1.870	5.633 ± 798	1.310 ± 185
	70	3,2 ± 0,3	14.849 ± 1.783	6.400 ± 736	2.000 ± 230
®HTec2	50	4,2 ± 0,6	10.471 ± 1.555	4.150 ± 649	988 ± 154
	70	4,1 ± 0,4	14.443 ± 1.675	5.750 ± 246	1.402 ± 60

O trabalho realizado por Liao *et al.*, (2015), relata que, a eficiência catalítica (K_{cat}/K_M) obtida para quatro xilanases (Xyn10A, Xyn10B, Xyn 11A e Xyn11B) expressas por *Penicillium oxalicum* GZ-2, ao hidrolisarem a xilana *birchwood*, corresponderam a: 24,8; 626,4; 14,6 e 229,1 mL s⁻¹mg⁻¹, respectivamente. Posteriormente, Silva *et al.*, (2019), demonstraram que, a xilanase expressa por *A. japonicus* obteve a razão K_{cat}/K_M de 98,05 mL s⁻¹mg⁻¹. Estes resultados foram inferiores quando comparados aos resultados obtidos para a XylHb ao hidrolisar o mesmo substrato.

Por outro lado, a afinidade (K_M) pela xilana *birchwood*, obtida para a XylHb, corrobora com o encontrado para as xilanases expressas por fungos do mesmo gênero (*H. insolens* Y1), e de gêneros distintos (*T. lanuginosus* CBS 288.54 e *Trichoderma inhamatum*) (LI *et al.*, 2005; DU *et al.*, 2013; SILVA; TERRASAN; CARMONA, 2015). No entanto, apresentou mais afinidade quando comparada as xilanases produzidas por *T. thermophilus* F1208 (6,71 mg mL⁻¹) (LI *et al.*, 2017), *T. longibrachiatum* KT693225 (20 mg mL⁻¹) (ATY *et al.*, 2018) e *Penicillium glabrum* (5,3 mg mL⁻¹) (ALOLIKA; SINGH, 2019).

Em geral, os valores de K_M e $V_{Máx}$ descritos para xilanases de origem fúngica variam entre 0,09 a 40 mg mL⁻¹ e 0,106 a 15.000 μmol min mg⁻¹, respectivamente (KNOB *et al.*, 2013). Desta forma, os valores de K_M e $V_{Máx}$ obtidos pela enzima de *H. brevis* var. *thermoidea* estão dentro dos valores apresentados para xilanases fúngicas. Ademais, os valores de K_M obtidos para a xilana *birchwood* sugerem a alta afinidade por este substrato. Desta forma, reforçando o potencial promissor desta enzima para aplicações biotecnológicas.

A alta afinidade pela xilana *birchwood* pode estar relacionada ao modo de ação de xilanases GH11. As enzimas pertencentes a esta família selecionam o substrato baseado na localização das ramificações presentes na cadeia principal de xilana, uma vez que só podem hidrolisar ligações onde as duas frações de xilose presentes nos subsítios (-1) e (+1) não são ramificados (MOREIRA; FILHO, 2016). Na xilana *birchwood*, cerca

de 94% dos carboidratos são compostos por xilose, o que o torna um substrato ideal para padronizar as atividades de várias xilanases (LIAB *et al.*, 2000). No entanto, em trabalhos anteriores, foi relatado que, a afinidade destas enzimas é bem variável, com alguns exemplares obtendo a maior afinidade por arabinoxilanas (MA *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2018). Essas modificações podem estar associadas a presença de um CBM ligado a estrutura da proteína. O CBM reconhece a ramificação de arabinoxilana e auxilia no melhor posicionamento para processos de hidrólise. No entanto, para se sugerir que há um CBM presente na estrutura da XylHb, testes adicionais de hidrólise com arabinoxilanas (como ex. a xilana *Oat Spelt*) e análises biomoleculares seriam necessários.

5.4.4 Efeito de sais e agentes químicos na atividade enzimática

Com o objetivo de avaliar o efeito de alguns efetores na atividade enzimática da XylHb e Cellic[®]HTec2, foram realizados micro-ensaios individuais conforme descritos no item 4.10.4 (Tabela 5).

Os resultados obtidos demonstraram que, a atividade da XylHb não apresentou alterações significativas na presença de EDTA, Etanol, Ca²⁺, Mg²⁺, ácido 4-hidroxibenzoico, tânico e *p*-coumárico, enquanto que a enzima comercial não apresentou alterações apenas na presença de EDTA e etanol. A ausência de estímulo ou inibição por EDTA, um quelante de íons metálicos, pode indicar que as enzimas estudadas não requerem íons metálicos para as suas ações. Em adição, as amostras foram estimuladas significativamente por β -mercaptoetanol, em cerca de, $42,7 \pm 5,21$ e $57,5 \pm 5,61\%$ para a XylHb e Cellic[®]HTec2, respectivamente. O efeito do agente redutor pode ser atribuído à proteção de grupos tiol de resíduos de cisteína, evitando sua oxidação (GLUSKER, 1991).

Ademais, a XylHb também foi estimulada por ácido ferúlico ($45,3 \pm 2,75\%$) e Na⁺ ($32,6 \pm 4,63\%$). Os compostos fenólicos são amplamente conhecidos como inibidores da ação de enzimas envolvidas na degradação de resíduos lignocelulósicos (MICHELIN *et al.*, 2016). Na literatura, poucas exceções destes biocatalizadores são resistentes ou estimuladas por estes compostos (TIAN *et al.*, 2013; AMO *et al.*, 2019; MONCLARO *et al.*, 2019). De acordo Tian *et al.*, (2013), estas características podem estar correlacionadas a uma diminuição no conteúdo de α hélice, aumento de folhas β e da flexibilidade geral da proteína na presença destes compostos. Por outro lado, o estudo realizado por Monclaro *et al.*, (2019) demonstrou que, o *docking* molecular de uma xilanase GH11 de *A. niger* com ácido ferúlico, mostrou que este composto tem preferência de ligação dentro do sítio catalítico. Quando a GH11 foi complexada com um xilo-oligômero, o composto

fenólico interagiu com a Ser94, Tyr89 e o substrato presente no sítio catalítico, sugerindo que a ativação enzimática ou tolerância a compostos fenólicos pode estar correlacionada a mudanças sutis na conformação da enzima devido à presença do ácido ferúlico. Ademais, os autores relataram que, a Ser94 e Tyr89 estão localizados no chamado "thumb loop", uma região flexível muito importante para eventos catalíticos, que podem realizar movimentos de abrir e fechar com base na temperatura e na ligação do substrato. Logo, sugerindo que a região do polegar das xilanases GH11 possa desempenhar um papel importante na tolerância e/ou ativação por ácido ferúlico - especialmente quando a xilana é complexada com a xilanase (MONCLARO *et al.*, 2019).

Desta forma, os resultados da tabela 5 demonstraram que a XylHb possa ser resistente e até mesmo estimulada por compostos fenólicos e outros aditivos incluindo o etanol. A amostra comercial não apresentou as mesmas características descritas, que são atrativas em bioprocessos que utilizam lignocelulose pré-tratada na produção de etanol E2G.

Tabela 5: Efeito de sais e agentes químicos na atividade da xilanase purificada XylHb e Cellic®HTec2.

Aditivo	Atividade relativa (%)	
	XylHb	Cellic®HTec2
Controle	100 ± 2,01	100 ± 1,09
Pb(NO ₃) ₂	50,8 ± 1,36*	52,18 ± 3,47*
LiCl	74,9 ± 3,21*	97,03 ± 5,60
CaCl ₂	99,2 ± 2,05	85,09 ± 4,90*
HgCl ₂	10,3 ± 1,25*	3,16 ± 3,96*
MgSO ₄	95,8 ± 5,05	89,39 ± 6,7*
FeCl ₃	14,7 ± 1,06*	18,58 ± 9,69*
KCl	95,4 ± 5,05*	85,17 ± 8,36*
ZnCl ₂	80,4 ± 3,65*	50,45 ± 3,22*
NiSO ₄	73,5 ± 0,86*	82,81 ± 7,76*
CuSO ₄	30,5 ± 1,03*	49,33 ± 1,51*
NaCl	132,6 ± 4,63*	91,73 ± 5,75*
EDTA	99,6 ± 1,52	95,77 ± 4,35
β-mercaptoetanol	142,7 ± 5,21*	157,57 ± 5,61*
Etanol	95,1 ± 5,08	98,67 ± 2,78
Metanol	46,6 ± 3,01*	37,67 ± 4,18*
Ácido cinâmico	72,41 ± 9,01*	69,81 ± 4,02*
Ácido ferúlico	145,36 ± 2,75*	105,71 ± 5,01
Ácido 4-hidroxibenzoico	105,03 ± 4,56	89,32 ± 5,36*
Ácido tânico	103,14 ± 4,85	78,35 ± 9,33*
Ácido <i>p</i> -coumárico	107,58 ± 6,16	78,23 ± 9,71*

Os dados representam as médias ± SD (n = 5). 100% = 10.105 U mg⁻¹. (*) Diferença significativa pelo teste de Dunnett (p < 0,05).

Por outro lado, notou-se que, Pb^{2+} ($49,2 \pm 1,36$ e $47,82 \pm 3,47\%$), Hg^{2+} ($89,7 \pm 1,25$ e $96,84 \pm 3,96\%$), Fe^{3+} ($85,3 \pm 1,06$ e $81,42 \pm 9,69\%$), Cu^{2+} ($69,95 \pm 1,03$ e $50,67 \pm 1,51\%$) e Metanol ($53,4 \pm 3,01$ e $62,33 \pm 4,18\%$) exerceram a alta inibição da atividade enzimática da XylHb e Cellic[®]HTec2, respectivamente.

As inibições ocasionadas por metais pesados, tais como Pb^{2+} e Hg^{2+} , está associada à estabilidade relativa do complexo destes íons como ligantes em proteínas, com grupos tiol e carboxil. Para formar este complexo ocorrem ligações multi-pontuais com as cadeias laterais dos ligantes presentes na proteína (SHARMA *et al.*, 2008). Em contraste, as inibições ocasionadas por outros íons metálicos podem estar associadas a interações com grupamentos presentes na tríade catalítica (imidazol, carboxil, tiol, indol, tio éster, hidroxil e amida), a concentração destes íons e a natureza da proteína (GLUSKER, 1991; DUDEV; LIM, 2013). Resultados semelhantes foram obtidos para endo-xilanases expressas por outros fungos (DO *et al.*, 2013; CARLI *et al.*, 2016; BASIT *et al.*, 2018; KUMAR; SHUKLA, 2018; PING *et al.*, 2018; AMO *et al.*, 2019).

5.4.5 Efeito do etanol e NaCl na atividade e estabilidade enzimática

O processo simultâneo de hidrólise e fermentação é uma etapa promissora para a produção de bioetanol com baixo custo. De acordo com Szambelan *et al.*, (2018), os processos fermentativos com *S. cerevisiae* para a obtenção deste bioproduto atingem níveis entre 10 e 12% de teor alcóolico ($\pm 10^\circ$ GL).

A utilização de enzimas tolerantes ao etanol é valiosa para o aumento no rendimento final de produção. Outro fator que pode ser limitante é a presença de sais resultantes das etapas de pré-tratamentos químicos preliminares. Neste cenário, sais são potenciais inibidores enzimáticos necessitando-se a utilização de enzimas halotolerantes (CARLI *et al.*, 2016).

Deste modo, para compreender os efeitos do etanol e do NaCl na atividade da XylHb e Cellic[®]HTec2, ambas as enzimas foram submetidas a ensaios de acordo com o método descrito no item 4.10.5.

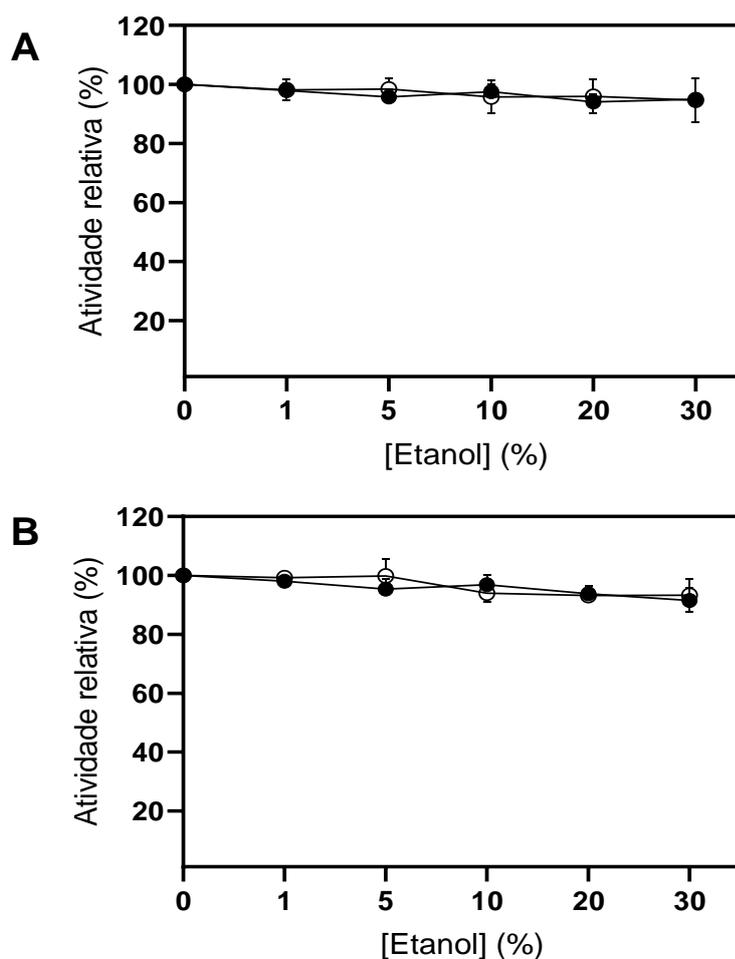
A Figura 24A demonstra que, o etanol não exerceu nenhum efeito na atividade enzimática de ambas as amostras avaliadas em concentrações de até 30% (v/v). Em adição, as amostras foram estáveis em todas as concentrações avaliadas, após 24 h de incubação (Figura 24B). A partir destes dados podemos concluir que a XylHb é tão atrativa quanto a endo-xilanase comercial desafiada em termos de estabilidade ao etanol, podendo sugerir que seja uma candidata potencial para aplicações envolvendo à produção

de bioetanol (durante o processo de sacarificação e fermentação simultâneos), na clarificação de bebidas alcoólicas ou na indústria cervejeira.

Resultados semelhantes foram relatados para XynG2 de *A. oryzae*, na qual foi resistente durante períodos longos de incubação (100 h) em etanol 30% (v/v) (SATO *et al.*, 2010). No entanto, as xilanases de *Lechevalieria sp*, *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1 e de *Byspora sp*. MEY-1, foram ativas apenas entre concentrações de 10 a 20% de etanol (v/v) (ZHOU *et al.*, 2012; YEGIN, 2017; WANG *et al.*, 2017).

O mecanismo pelo qual ocorre a estabilidade ao etanol é pouco conhecido, porém estudos anteriores sugerem que pode estar relacionado com a presença de ligações dissulfeto intermoleculares e a natureza hidrofóbica das proteínas (OGINO; ISHIKAWA, 2001; SATO *et al.*, 2010). Entretanto, mais pesquisas são necessárias para se afirmar como se ocorre a estabilidade proteica neste tipo de solvente.

Figura 24: Efeito do etanol na atividade e estabilidade enzimática da XylHb e Cellic[®]Htec2.

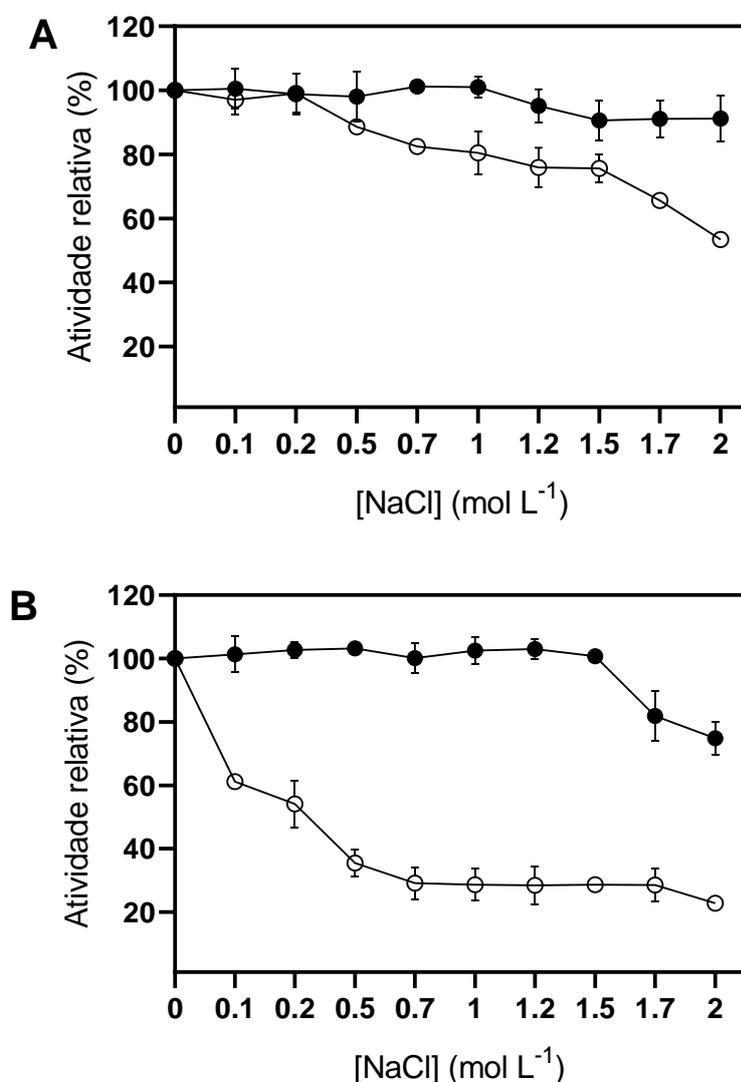


A) Efeito do etanol na atividade enzimática. B) Estabilidade a várias concentrações de etanol, após 24 h. 100% = 9.950 U mg⁻¹. (●) XylHb; (○) Cellic[®]Htec2. Cada valor no painel representa as médias \pm SD ($n = 5$).

Para o efeito de concentrações crescentes de sal NaCl, os resultados demonstraram que a XylHb não sofreu influência na atividade enzimática em concentrações de até 1 mol L⁻¹, após, a amostra sofreu a inibição de apenas 10% na atividade entre 1 e 2 mol L⁻¹. Por outro lado, a enzima comercial reteve atividade em concentrações de 0,5 mol L⁻¹ e em concentrações superiores, obteve uma inibição gradativa na atividade enzimática (Figura 25A).

Em complemento, a XylHb foi mais tolerante a altas concentrações salinas quando comparada a enzima comercial, retendo até 80% de atividade enzimática após 24 h de incubação em 2 mol L⁻¹ de NaCl, enquanto que a Cellic[®]Htec2 reteu apenas 20% de atividade enzimática ao final do ensaio (Figura 25B).

Figura 25: Efeito do NaCl na atividade e estabilidade enzimática da XylHb e Cellic[®]Htec2.



A) Efeito do NaCl na atividade enzimática. B) Halotolerância, após 24 h. (●) XylHb; (○) Cellic[®]Htec2. 100% = 10.542 U mg⁻¹. Cada valor no painel representa as médias ± SD ($n = 5$).

A partir destes dados podemos concluir que, a XylHb é mais halotolerante quando comparada a Cellic[®]Htec2. A primeira xilanase halotolerante produzida por fungos foi relatada por Carli *et al.*, (2016), em seu trabalho foi descrito que Excg1 permaneceu com 60% de atividade enzimática na concentração de 2 mol L⁻¹ de NaCl.

Posteriormente, outros estudos relataram a descoberta de novas xilanases fúngicas halotolerantes, como ex.: aquelas expressas por *Emericellopsis sp.*, *Pseudogymnoascus sp.*, *Phoma sp.* e *Aspergillus clavatus*, que apresentaram atividade de 100% após serem incubadas entre concentrações de 2 a 4 mol L⁻¹ de NaCl (BATISTA-GARCÍA *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2018; PASIN *et al.*, 2020).

Nota-se que existem poucos exemplos de fungos produtores de xilanases halotolerantes presentes na literatura, pois durante anos grande parte dos estudos tem sido concentrados, majoritariamente, em enzimas bacterianas. Dentre alguns exemplos de bactérias produtoras de xilanases halotolerantes temos: *Bacillus pumilus* GESF-1, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1, *Thermobifida halotolerans* YIM 90462, *Bacillus sp.* HJ14, *Marinimicrobium sp.* LS-A18 e *Roseithermus sacchariphilus* (MENON *et al.*, 2010; HUNG *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2018; TEO *et al.*, 2019).

De acordo com estudos anteriores, a halotolerância enzimática pode ocorrer por diversos fatores, dentre eles, a presença de resíduos ácidos (aspartato e glutamato) e um pequeno número de grandes resíduos apolares (valina, isoleucina, leucina, metionina e fenilalanina), que os tornam altamente solúveis, mesmo em condições nas quais as interações hidrofóbicas são favorecidas (GRAZIANO; MERLINO, 2014). Entretanto, mais pesquisas são necessárias para se afirmar como que ocorre a estabilidade salina.

Enzimas halófilas apresentam grandes oportunidades para as indústrias de alimentos, biorremediação e processos biossintéticos, e os usos biotecnológicos destas enzimas não estão restritas à sua estabilidade em altas concentrações de sal, pois foi relatado anteriormente que são tolerantes a altas temperaturas e estáveis na presença de solventes orgânicos (DUMORNE *et al.*, 2017). Desta forma, corroborando com os resultados obtidos para a XylHb.

5.5 Ensaios de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

O bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é amplamente utilizado como fonte de biopolímeros para a produção de etanol E2G (SINGH *et al.*, 2007; BATALHA *et al.*, 2015; SILVEIRA *et al.*, 2018). No entanto, para a conversão eficiente do bagaço em

etanol, esta matéria prima precisa passar por algumas etapas, que incluem: pré-tratamento, sacarificação enzimática e fermentação (VIDAL; HORA, 2011).

A etapa de pré-tratamento auxilia na redução da recalcitrância da biomassa para a etapa posterior de hidrólise ou sacarificação enzimática. Uma das principais metodologias de pré-tratamento empregadas, para a produção de monômeros e oligômeros a partir do bagaço de cana-de-açúcar, é o tratamento hidrotérmico (explosão a vapor) por utilizar apenas água pressurizada em altas temperaturas para separar os constituintes de celulose, hemicelulose e lignina (POLETTO *et al.*, 2020). Após o pré-tratamento hidrotérmico, as frações de celulose contendo hemicelulose e lignina residuais, são encaminhadas para o processo de hidrólise enzimática para a conversão dos polissacarídeos sólidos em açúcares fermentescíveis solúveis (principalmente xilose e glicose) (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018).

Cellic[®]CTec2 e HTec2 (Novozymes, DNK) são celulasas e hemicelulasas de última geração que são eficazes em uma ampla variedade de materiais lignocelulósicos pré-tratados para a conversão de carboidratos em açúcares simples antes da fermentação, respectivamente (LOPES; FERREIRA-FILHO; MOREIRA, 2018). A fabricante recomenda a utilização combinada destas duas enzimas por aumentar o rendimento de mono e oligossacarídeos, no entanto, estas enzimas têm alto custo e a quantidade necessária para se converter 80% da fração de glucanos, em taxas de carregamento de 20% de substrato, variam entre 20 - 60 mg de proteína / g substrato, sendo os grandes “gargalos” para a viabilidade econômica do processo (BRAR *et al.*, 2021). Além disso, as recomendações de uso destas enzimas variam entre temperaturas de 45 – 55 °C, reduzindo a eficiência para aplicações que demandem altas temperaturas.

Há um interesse crescente em enzimas de microrganismos lignocelulolíticos termofílicos para aplicações industriais devido à capacidade de degradar a biomassa em altas temperaturas, pois isso ajudaria diminuindo custos de resfriamento após pré-tratamentos (ex. explosão a vapor), diminuindo contaminações e aumento de liquidez e fluidez facilitando o bombeamento do sacarificado para subsequente filtração e fermentação (ATALAH *et al.*, 2019). Como resultado, estes microrganismos e suas enzimas estão ganhando notoriedade no campo da bioconversão (SHARMA *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2021). Portanto, explorar o uso de novas enzimas de diferentes microrganismos, que possam atuar em conjunto ou substituir as enzimas comerciais pode contribuir para o desenvolvimento eficiente de conversão da lignocelulose (FRASSATTO *et al.*, 2021).

Desta forma, foram avaliados o potencial da XylHb como complemento para Cellic[®]CTec2 (um dos principais coquetéis utilizados para a produção de E2G) na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente conforme descrito no item 4.11. Objetivando o potencial desta enzima na substituição da hemicelulase comercial (Cellic[®]HTec2) respeitando as proporções sugeridas pela fabricante das enzimas comerciais.

Os resultados em micro-ensaios demonstraram a HE contendo o controle comercial Cellic[®]CTec2 100% (5 mg / g de substrato) liberou $14,75 \pm 0,73$ mg mL⁻¹ de glicose e $20,6 \pm 0,53$ de ART, após 72 h de hidrólise, respectivamente. Ao utilizar a combinação comercial Cellic[®]CTec2 com Cellic[®]HTec2 50% / 50% (2,5 + 2,5 mg / g de substrato), a liberação de glicose aumentou em $10,91 \pm 0,03\%$ e de ART em $12,13 \pm 0,05\%$. Já a combinação contendo Cellic[®]CTec2 com XylHb 50% / 50% (2,5 + 2,5 mg / g de substrato), a liberação de glicose aumentou em $7,52 \pm 0,01\%$ e de ART em $14,07 \pm 0,02\%$ (Tabela 6).

Tabela 6: Sacarificação de amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente com Cellic[®]CTec2 e coquetel (Cellic[®]CTec2 + Cellic[®]HTec2; Cellic[®]CTec2 + XylHb).

Amostra + Mistura hidrolítica	Glicose (mg mL ⁻¹)	Incremento (%)	Açúcares totais (mg mL ⁻¹)	Incremento (%)
Tratamento hidrotérmico + Cellic [®] CTec2 (100%)	$14,75 \pm 0,73$	100	$20,6 \pm 0,53$	100
Tratamento hidrotérmico + coquetel (Cellic [®] CTec2 + Cellic [®] HTec2) (50% / 50%)	$16,36 \pm 0,22$	$110,91 \pm 0,03$	$23,1 \pm 0,29$	$112,13 \pm 0,05$
Tratamento hidrotérmico + coquetel (Cellic [®] CTec2 + XylHb) (50% / 50%)	$15,86 \pm 0,12$	$107,52 \pm 0,01$	$23,5 \pm 0,11$	$114,07 \pm 0,02$

A análise estatística ao nível de significância de 5%, indicou que ambas as combinações elevaram significativamente a hidrólise de bagaço de cana pré-tratado, quando comparados ao padrão Cellic[®]Ctec2 (100%). Por outro lado, quando a liberação de glicose e ART foram comparadas entre as combinações, contendo XylHb (50%) ou Cellic[®]HTec2 (50%), não foram encontradas diferenças significativas. Desta forma, indicando que a combinação contendo XylHb (50%) foi tão eficiente quanto a combinação contendo Cellic[®]HTec2 (Figura 26).

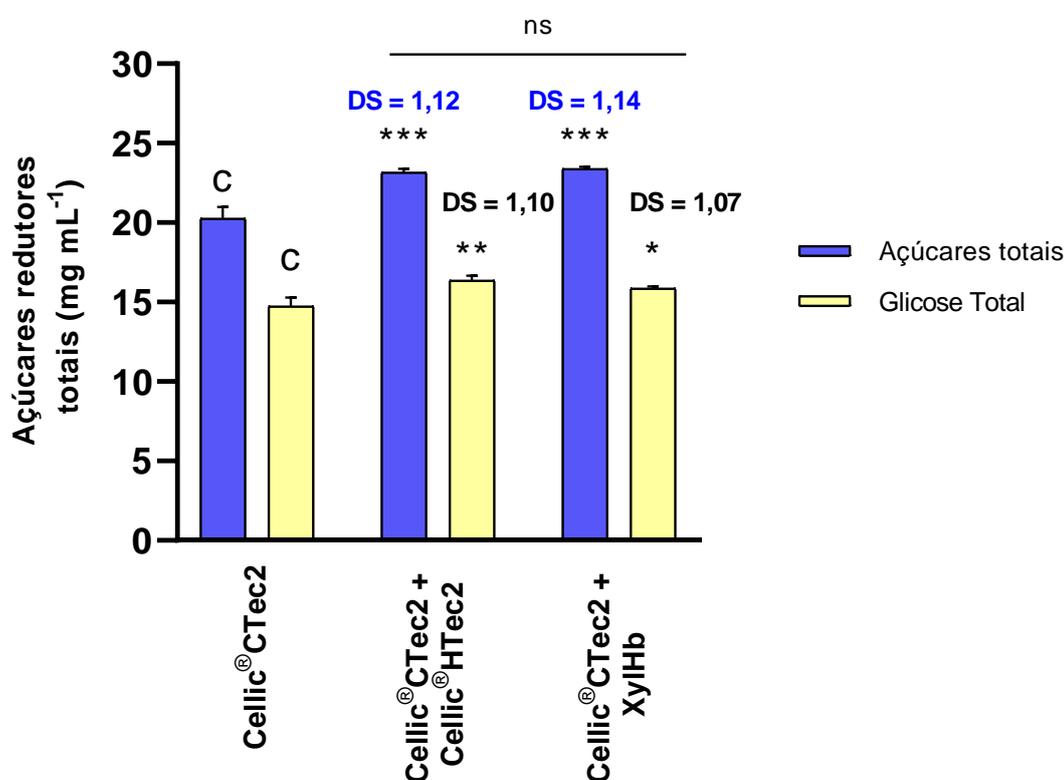
A partir destes dados foram calculados o grau de sinergismo obtidos para a liberação de glicose e ART com as combinações. Uma associação sinérgica entre duas ou mais enzimas está presente quando o grau de sinergia (DS) é maior do que 1,0, portanto,

produz um rendimento na liberação de produto maior do que o obtido a partir de enzimas agindo separadamente. Quando os valores de DS são menores do que 1,0 as associações são consideradas aditivas e indicam que a liberação de produto foi menor do que o obtido a partir de enzimas agindo separadamente (HU; ARANTES; SADDLER, (2011).

Desta forma, ao utilizar a combinação contendo Cellic[®]HTec2 (50%), foram obtidos valores sinergismo para a liberação de glicose, de DS = 1,10 e para a liberação de ART, de DS = 1,12. Já a combinação contendo XylHb (50%), foram obtidos valores sinergismo para a liberação de glicose, de DS = 1,07 e para a liberação de ART, de DS = 1,14. Logo, sugerindo que Cellic[®]HTec2 (50%) e XylHb (50%) apresentaram interações sinérgicas com Cellic[®]CTec2 (50%).

Os dados obtidos para a mistura comercial (Cellic[®]CTec2 + Cellic[®]HTec2) corroboram com o apresentado anteriormente na literatura (VALLADARES-DIESTRA *et al.*, 2020). Somado a isto, podemos afirmar que a mistura contendo a xilanase termoestável de *H. brevis* var. *thermoidea* (ATCC 28402) é cataliticamente eficiente e promoveu a sacarificação da biomassa vegetal tão bem quanto a mistura utilizada comercialmente.

Figura 26: Sacarificação de bagaço de cana pré-tratado hidrotérmicamente com (Cellic[®]CTec2) e combinações (Cellic[®]CTec2 + Cellic[®]HTec2; Cellic[®]CTec2 + XylHb).



Os dados são médias de cinco repetições junto com o desvio padrão (SD). (C) Controle; (DS) grau de sinergia; (ns) Diferença estatística não significativa; (*) Diferença significativa ($p < 0,05$); (**) Diferença significativa ($p < 0,01$); (***) Diferença significativa ($p < 0,001$) pelo teste de Tukey.

A partir destes resultados pressupõem-se que a adição de enzimas auxiliares, tais como as xilanases termoestáveis, pode reduzir significativamente a carga de coquetéis comerciais utilizados em biorrefinarias (BRAR *et al.*, 2020). A adição das xilanases aumenta a acessibilidade das celulases à estrutura da celulose por meio da hidrólise da xilana residual, incluindo o material residual nas fibras após o pré-tratamento (BAJAJ; MAHAJAN, 2019). Além disso, o aumento da disponibilidade de substrato para a interação produtiva das celulases evita a inibição destas enzimas por adsorção em frações de lignina residuais (PALONEN *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2020). Uma outra importância relatada no trabalho de Qing, Yang e Wyman, (2010), mostra que os xilo-oligômeros devem ser hidrolisados por inibirem fortemente a atividade de celulases e β -glucosidases.

As ações realizadas pelas xilanases auxilia no sinergismo entre celulases e hemicelulases melhorando a liberação de açúcares fermentescíveis que podem ser posteriormente convertidos em bioprodutos incluindo açúcares álcoois, ácidos orgânicos, furanos, oleofinas, biohidrogênio (H₂) e biocombustíveis (AJAO *et al.*, 2018; VALENCIA-OJEDA *et al.*, 2021). Ademais, produtos como os xilo-oligômeros, liberados durante a hidrólise da hemicelulose, podem ser amplamente utilizados como prebióticos na indústria alimentícia humana e animal, e nutracêutica (POLETTO *et al.*, 2020; PALANIAPPAN; ANTONY; EMMAMBUX, 2021).

Estudos anteriores relatam o efeito positivo da adição de xilanases GH11 aos coquetéis enzimáticos por aumentarem a hidrólise de materiais lignocelulósicos (FARIA *et al.*, 2020). O tamanho reduzido das GH11 auxilia na hidrólise eficiente da xilana por adentrarem com maior facilidade a matriz de celulose-hemicelulose-lignina (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

Em trabalhos anteriores, foram relatadas a hidrólise melhorada em 10% do bagaço de cana pré-tratado hidrotérmicamente após a adição de uma combinação de GH11 (*Thermobifida fusca*) e GH10 (*C. thermocellum*) à celulase comercial de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich) (GONÇALVES *et al.*, 2015). Da mesma forma, um coquetel formulado pela combinação de Celluclast 1.5L (Novozymes, NC) + GH11 de *M. thermophila*, aumentou em 2 vezes a taxa de sacarificação da biomassa pré-tratada quando comparada a celulase comercial individual (BASIT *et al.*, 2018). Em seguida, foi relatado que a substituição de 10% de Cellic[®]CTec2 por uma GH11 de *M. cinnamomea* levou a uma hidrólise melhorada, apresentando valores de DS = 1,46, após 96 h de sacarificação do bagaço de cana pré-tratado (BASOTRA *et al.*, 2018). Em adição, o coquetel formulado pela combinação de uma xilanase GH11 de *T. lanuginosus* +

Cellic[®]CTec2 resultou no aumento de 1,60 vezes na liberação de glicose e na redução de 2,7 vezes a quantidade de Cellic[®]CTec2 que era necessário para a sacarificação do bagaço de cana pré-tratado (BRAR *et al.*, 2021).

Corroborando com os trabalhos citados, a suplementação de XylHb (50%) reduziu a carga enzimática de Cellic[®]CTec2 necessária para o processo de sacarificação do bagaço pré-tratado e aumentou em $14,07 \pm 0,02\%$ a quantidade de açúcares totais liberados. Além disso, por apresentar características incluindo estabilidade a pHs alcalinos, sal, temperaturas elevadas, etanol e compostos fenólicos, a XylHb demonstrou-se uma candidata atrativa para a formulação de coquetéis melhorados. Desta forma, podendo desempenhar um papel crítico na economia do processo de produção de etanol de segunda geração, reduzindo o custo enzimático envolvido no processo e aumentando o rendimento de açúcares totais liberados para a produção de outros bioprodutos de valor industrial.

CONCLUSÕES

A xilanase de *H. brevis* var. *thermoidea* (XylHb) produzida por FES utilizando um meio de baixo custo foi purificada após 3 etapas bioquímicas, incluindo uma de precipitação com etanol e duas cromatografias em resina de troca iônica, e exclusão por peso molecular. A XylHb pura apresentou um perfil bidimensional contendo cinco possíveis isoformas de endo-xilanases que apresentaram *pIs* ácidos, baixa massa molecular (<30kDa) e estrutura secundária que indica a predominância de folhas- β , sendo estas características das xilanases da família GH11. A fluorescência intrínseca do Trp (FIT) revelou que a estrutura terciária sofre influência da temperatura e os resultados sugerem que o aumento da atividade enzimática está relacionada à maior exposição dos resíduos de Trp. Quando comparada a endo-xilanase comercial (Cellic[®]HTec2), os resultados mostraram que XylHb apresentou diversas características vantajosas sugerindo possíveis vantagens competitivas de aplicações em bioprocessos industriais (Tabela 7).

Tabela 7: Características comparativas entre a XylHb e Cellic[®]HTec2.

Característica	XylHb	Cellic [®] HTec2
Estabilidade ao pH	5,0-10,0	5,0-5,5
Estabilidade a altas temperaturas	50 -70 °C	45-55 °C
Estabilidade a íons metálicos e agentes químicos	EDTA, Ca ²⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ e β -mercaptoetanol	EDTA, β -mercaptoetanol
Estabilidade a compostos fenólicos	Sim	Não
Estabilidade ao etanol	1- 30%	1-30%
Estabilidade ao NaCl	2 mol L ⁻¹	0,5 mol L ⁻¹
Eficiência catalítica (mLs ⁻¹ mg ⁻¹)	50 °C = 1.310 \pm 185	50 °C = 988 \pm 154
	70 °C = 2.000 \pm 230,1	70 °C = 1.402 \pm 60,1
Eficiência de hidrólise com Cellic [®] CTec2 em 72 h (g L ⁻¹)	ART = 23,5 \pm 0,11	ART = 23,1 \pm 0,29
	Glicose = 15,86 \pm 0,12	Glicose = 16,36 \pm 0,22

Assim, pode-se concluir que a XylHb, por exibir características de tolerância às condições extremas envolvendo sais, solventes, pH, temperatura e compostos fenólicos, mostrou-se promissora para aplicações industriais que necessitem de tais condições. Ademais, o coquetel enzimático elaborado pela combinação de Cellic[®]CTec2 + XylHb (50% / 50%) apresentou rendimentos de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado semelhantes ao coquetel utilizado comercialmente (Cellic[®]CTec2 + Cellic[®]HTec2) (50% / 50%). Logo, reafirmando o potencial da XylHb para a formulação de coquetéis melhorados, para aplicações envolvendo a produção do etanol E2G, biobranqueamento da polpa celulósica, digestão polissacarídeos não amiláceos e produção de xilo-oligômeros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL, P. M. *et al.* Effects of changes in chemical and structural characteristic of ammonia fibre expansion (AFEX) pretreated oil palm empty fruit bunch fibre on enzymatic saccharification and fermentability for biohydrogen. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 200-208, 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E DE BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). Biocombustíveis no Brasil. ANP, v. 1, p. 1-13, 2016. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/publicacoes/folderes/2415-biocombustiveis>. Acesso em: 26 abr. 2020.

AJAO, O. *et al.* Hemicellulose based integrated forest biorefineries: implementation strategies. **Industrial Crops And Products**, v. 126, p. 250-260, 2018.

ALOKIKA, A.; SINGH, B. Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. **Applied Microbiology And Biotechnology**. v. 103, p. 8763-8784, 2019.

ALVIRA, P.; NEGRO, M. J.; BALLESTEROS, M. Effect of endoxylanase and α -l-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4552-4558, 2011.

AMO, G. S. *et al.* Heterologous expression, purification and biochemical characterization of a new xylanase from *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 798-805, 2019.

ANTERO, R. V. P.; SILVA, D. B.; VALE, A. T. Balanço energético da produção de etanol a partir da cana-de açúcar e aspectos da produção brasileira atual. **Journal Of Biotechnology And Biodiversity**, v. 7, p. 399-412, 2019.

ANTUNES, F. A. F. *et al.* Biofuel Production from Sugarcane in Brazil. **Sugarcane Biofuels**, v. 1, p. 99-121, 2019.

ARIFFIN, H.; HASSAN, M. A.; SAPUAN, S. M. (ed.). Lignocellulose for Future Bioeconomy. 1ed. **Springer**, v. 1, p. 360, 2019.

ARORA, A. *et al.* Nanobiotechnological advancements in lignocellulosic biomass pretreatment. **Materials Science For Energy Technologies**, v. 3, p. 308-318, 2020.

ATALAH, J. *et al.* Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. **Bioresource Technology**, v. 280, p. 478-488, 2019.

ATY, A. A. A. E. *et al.* Thermodynamics characterization and potential textile applications of *Trichoderma longibrachiatum* KT693225 xylanase. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 129-137, 2018.

AZHAR, S. H. M. *et al.* Yeasts in sustainable bioethanol production: a review. **Biochemistry And Biophysics Reports**, v. 10, p. 52-61, 2017.

- AZIN, M.; MORAVEJ, R.; ZAREH, D. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: optimization of culture condition by Taguchi method. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 40, p. 801-805, 2007.
- BAJAJ, P.; MAHAJAN, R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 103, p. 8711-8724, 2019.
- BALA, A.; SINGH, B. Cellulolytic and xylanolytic enzymes of thermophiles for the production of renewable biofuels. **Renewable Energy**, v. 136, p. 1231-1244, 2019.
- BALA, A.; SINGH, B. Concomitant production of cellulase and xylanase by thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and their applicability in bread making. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 33, p. 1-6, 2017.
- BASIT, A. *et al.* Characterization of Two Endo- β -1, 4-Xylanases from *Myceliophthora thermophila* and Their Saccharification Efficiencies, Synergistic with Commercial Cellulase. **Frontiers In Microbiology**, v. 9, p. 1-13, 2018.
- BASIT, A. *et al.* Thermophilic xylanases: from bench to bottle. **Critical Reviews In Biotechnology**, v. 38, p. 989-1002, 2018.
- BASOTRA, N. *et al.* Expression of catalytically efficient xylanases from thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea* for synergistically enhancing hydrolysis of lignocellulosics. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 185-192, 2018.
- BATALHA, L A. R. *et al.* Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 97-105, 2015.
- BATISTA-GARCÍA, R. A. *et al.* Characterization of lignocellulolytic activities from fungi isolated from the deep-sea sponge *Stelletta normani*. **Plos One**, v. 12, p. 0173750, 2017.
- BERGMEYER, H. U.; GAWEHN, K. (ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*, 2ed. **Elsevier**, v.1, p. 800, 1974.
- BEZERRA, T. L.; RAGAUSKAS, A. J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels, Bioproducts And Biorefining**, v. 10, p. 634-647, 2016.
- BHARAGAVA, R. N. Environmental Contaminants: ecological implications and management. **Microorganisms For Sustainability**, v. 5, p. 1-348, 2019.
- BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; VERMA, P. A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. **Bioresources And Bioprocessing**, v. 6, p. 1-13, 2019.

BHOWMICK, G.; SARMAH, A. K.; SEN, R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1144-1154, 2018.

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

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

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

BRAR, K. K. *et al.* Enhanced hydrolysis of hydrothermally and autohydrolytically treated sugarcane bagasse and understanding the structural changes leading to improved saccharification. **Biomass And Bioenergy**, v. 139, p. 105639, 2020.

BRAR, K. K. *et al.* Novel β -glucanases along with xylanase identified in *Thermomyces lanuginosus* secretome for enhanced saccharification of different lignocellulosics. **Biomass Conversion And Biorefinery**, v. 1, p. 12-25, 2021.

BRITO, T. L. F. *et al.* Transitions between technological generations of alternative fuel vehicles in Brazil. **Energy Policy**, v. 134, p. 110915-110920, 2019.

BURGUES, R. R. Protein Precipitation Techniques. **Methods In Enzymology**, v. 112, p. 331-342, 2009.

BUTT, M. S. *et al.* Xylanases in Baking Industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, p. 22-31, 2008.

CANILHA, L. *et al.* A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 1467-1475, 2011.

CARBOHYDRATE ACTIVE ENZYME (CAZY). Glycoside Hydrolase Family 11. Disponível em: <http://www.cazy.org/GH11.html>. Acesso em: 10/09/2020.

CARLI, S. *et al.* A novel thermostable and halotolerant xylanase from *Colletotrichum graminicola*. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 508-517, 2016.

CAVELLA, S. *et al.* The Influence of Dietary Fibres on Bubble Development During Bread Making. **Bubbles In Food 2**, v. 3, p. 311-321, 2008.

CHADHA, B. S. *et al.* Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: Current perspective. **Bioresource Technology**, v. 277, p. 195-203, 2019.

CHAKDAR, H. *et al.* Bacterial xylanases: biology to biotechnology. **3 Biotech**, v. 6, p. 1-5, 2016.

CHAPMAN, J.; ISMAIL, A.; DINU, C. Industrial Applications of Enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. : Recent Advances, Techniques, and Outlooks. **Catalysts**, v. 8, p. 238-240, 2018.

CHEN, S. *et al.* Integrated bioethanol production from mixtures of corn and corn stover. **Bioresource Technology**, v. 258, p. 18-25, 2018.

CHENG, Y. S. *et al.* Improving the catalytic performance of a GH11 xylanase by rational protein engineering. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 99, p. 9503-9510, 2015.

CHO, E. J. *et al.* Bioconversion of biomass waste into high value chemicals. **Bioresource Technology**, v. 298, p. 1-12, 2020.

CIOLACU, D. E. Biochemical Modification of Lignocellulosic Biomass. **Biomass As Renewable Raw Material to Obtain Bioproducts of High-Tech Value**, v. 4, p. 315-350, 2018.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos, - Safra 2019/20. **Brasília: CONAB**, v. 7, p. 1-31, 2020.

COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. SAFRA 2018/19 N.1. **Brasília: CONAB**, v. 5, p. 62, 2018.

COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Safra 2018/19 N.12. **Brasília: CONAB**, v. 6, p. 47, 2019.

CORTEZ, E. V.; PESSOA, A.; ASSIS, A. N. Xylanase recovery by ethanol and Na₂SO₄ precipitation. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 70, p. 661-666, 1998.

COSTA, J. A. M. From Sugarcane To Ethanol: The Historical Process That Transformed Brazil Into A Biofuel Superpower. **Mapping Politics**, v. 10, p. 13-35, 2020.

COSTA, J. A.; BLANCHET, L. A. A integração energética no Mercosul com base no desenvolvimento e sustentabilidade. **Novum Jus**, v. 13, p. 91-120, 2019.

COSTA, M. A. L.; FARINAS, C. S.; MIRANDA, E. A. Ethanol Precipitation as a Downstream Processing step for Concentration of Xylanases Produced by Submerged and Solid-state Fermentation. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, v. 35, p. 477-488, 2018.

CRANG, R.; LYONS, S. S.; WISE, R (ed.). Plant Anatomy. 1 ed. **Springer**, v. 1, p. 360, 2018.

DAVIS, B. J. Disc. Eletroforesis – II. Method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 121, p. 404-427, 1964.

DESHPANDE, N. *et al.* Protein glycosylation pathways in filamentous fungi. **Glycobiology**, v. 18, p. 626-637, 2008.

DO, T. T. *et al.* Molecular characterization of a glycosyl hydrolase family 10 xylanase from *Aspergillus niger*. **Protein Expression and Purification**, v. 92, p. 196-202, 2013.

DODD, D.; CANN, I. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Gcb Bioenergy**, v. 1, p. 2-17, 2009.

DU, Y. *et al.* Characterization of three novel thermophilic xylanases from *Humicola insolens* Y1 with application potentials in the brewing industry. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 161-167, 2013.

DUDEV, T.; LIM, C. Competition among Metal Ions for Protein Binding Sites: determinants of metal ion selectivity in proteins: Determinants of Metal Ion Selectivity in Proteins. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 538-556, 2013.

DUMORNE, K. *et al.* Extremozymes: a potential source for industrial applications. **Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 27, p. 649-659, 2017.

EAGLIN, J. The Demise of the Brazilian Ethanol Program: environmental and economic shocks, 1985-1990. **Environmental History**, v. 24, p. 104-129, 2018.

EID, B. M.; IBRAHIM, N. A. Recent developments in sustainable finishing of cellulosic textiles employing biotechnology. **Journal Of Cleaner Production**, v. 284, p. 124701, 2021.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (EPE). Análise de conjuntura dos biocombustíveis. **EPE**, v. 1, p. 79, 2019.

ENSHASY, H. A. E. *et al.* Microbial Xylanases: sources, types, and their applications. **Biofuel And Biorefinery Technologies**, v. 30, p. 151-213, 2016.

FARIA, S. P. *et al.* Production of cellulases and xylanases by *Humicola grisea* var. *thermoidea* and application in sugarcane bagasse arabinoxylan hydrolysis. **Industrial Crops And Products**, v. 158, p. 112968, 2020.

FGV ENERGIA. Boletim de conjuntura do setor energético. **FGV Energia**, 2019. Disponível: https://fgvenergia.fgv.br/sites/fgvenergia.fgv.br/files/boletim_dezembro_v4.pdf. Acesso em: 26 abr. 2020.

FRASSATTO, P. A. C. *et al.* β -Glucosidase production by *Trichoderma reesei* and *Thermoascus aurantiacus* by solid state cultivation and application of enzymatic cocktail for saccharification of sugarcane bagasse. **Biomass Conversion And Biorefinery**, v. 11, p. 503-513, 2020.

FU, G. *et al.* Isolation, Purification, and Potential Applications of Xylan. **Production Of Materials From Sustainable Biomass Resources**, v. 1, p. 3-35, 2019.

FUJIMOTO, Z. *et al.* Crystal structure of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 β -xylanase containing xylan-binding domain. **Journal Of Molecular Biology**, v. 300, p. 575-585, 2000.

FURTADO, A. T. Indústria do Petróleo e Gás Natural: uma vocação desperdiçada. **Cadernos do Desenvolvimento**, v. 14, p. 155-175, 2019.

GALLINA, G. *et al.* Hydrothermal extraction of hemicellulose: from lab to pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 980-991, 2018.

GEORGE, J.; SABAPATHI, S. N. Cellulose nanocrystals: synthesis, functional properties, and applications. **Nanotechnology, Science And Applications**, v. 2, p. 45-65, 2015.

GERASIMOVA, J.; KUISIENE, N. Characterization of the novel xylanase from the thermophilic *Geobacillus thermodenitrificans* JK1. **Microbiology**, v. 81, p. 418-424, 2012.

GHATORA, S. *et al.* Identification and characterization of diverse xylanases from thermophilic and thermotolerant fungi. **Bio Resources**, v. 1, p. 1-16, 2016.

GHISAIDOOBE, A.; CHUNG, S. Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 15, p. 22518-22538, 2014.

GHOSH, A. *et al.* Delineating thermophilic xylanase from *Bacillus licheniformis* DM5 towards its potential application in xylooligosaccharides production. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 35, p. 1-10, 2019.

GIMENEZ, A. R. *et al.* O aumento da produtividade e a busca pela excelência na produção do etanol brasileiro: uma história de sucesso. **Research, Society And Development**, v. 7, p. 1472195-1472214, 2018.

GLUSKER, J. P. Structural Aspects of Metal Liganding to Functional Groups in Proteins. **Metalloproteins: Structural Aspects**, v. 10, p. 1-76, 1991.

GOH, T. K.; HYDE, K. D. A synopsis of *Trichocladium* species, based on the literature. **Fungal Diversity**, v. 2, p. 101-118, 1999.

GONÇALVES, G. A. L. *et al.* Synergistic effect and application of xylanases as accessory enzymes to enhance the hydrolysis of pretreated bagasse. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 72, p. 16-24, 2015.

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

GONZÁLEZ, C. G. M.; AMADO, N. B.; SAUER, I. L. Desenvolvimento sustentável, transição energética mundial pós-combustíveis fósseis e o pensamento político da esquerda latino-americana. **Brazilian Journal Of Development**, v. 5, p. 23334-23355, 2019.

GOSWAMI, G. K. Cloning and heterologous expression of cellulose free thermostable xylanase from *Bacillus brevis*. **Springerplus**, v. 3, p. 1-10, 2014.

GRAMINHA, E. B. N. *et al.* Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed Science And Technology**, v. 144, p. 1-22, 2008.

GRAZIANO, G.; MERLINO, A. Molecular bases of protein halotolerance. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**, v. 1844, p. 850-858, 2014.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2876-2890, 2006.

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

GUERRIERO, G. *et al.* Lignocellulosic biomass: biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Engineering In Life Sciences**, v. 16, p. 1-16, 2015.

GUPTA, P. K. *et al.* Xylooligosaccharides and Their Anticancer Potential: an update. **Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements**, v. 5, p. 255-271, 2018.

HALDAR, D.; PURKAIT, M. K. Lignocellulosic conversion into value-added products: A review. **Process Biochemistry**, v. 89, p. 110-133, 2020.

HAMBLETON, S.; NICKERSON, N. L.; SEIFERT, K. A. *Humicola*, a new genus of heat-resistant hyphomycetes. **Studies In Mycology**, v. 53, p. 29-52, 2005.

HATAKEYAMA, H.; HATAKEYAMA, T. Lignin Structure, Properties, and Applications. **Biopolymers**, v. 52, p. 1-63, 2009.

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

HELLMANN, N.; SCHNEIDER, D. Hands On: using tryptophan fluorescence spectroscopy to study protein structure. **Methods In Molecular Biology**, v. 85, p. 379-401, 2019.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, p. 781-788, 1993.

HONG, C. *et al.* Xylooligosaccharides as prebiotics from biomass autohydrolyzate. **Lwt**, v. 111, p. 703-710, 2019.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect?. **Biotechnology For Biofuels**, v. 4, p. 36, 2011.

HUANG, Y. *et al.* Identification and characterization of GH11 xylanase and GH43 xylosidase from the chytridiomycetous fungus, *Rhizophlyctis rosea*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 103, p. 777-791, 2018.

HUNG, K. S. *et al.* Characterization of a novel GH10 thermostable, halophilic xylanase from the marine bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1257-1263, 2011.

HUSSAIN, R. *et al.* Circular Dichroism and Synchrotron Radiation Circular Dichroism Applications to Biomaterials. **Radiation In Bioanalysis**, v. 85, p. 147-172, 2019.

INGLE, A. P. *et al.* Biorefining of Lignocellulose into Valuable Products. **Lignocellulosic Biorefining Technologies**, v. 74, p. 1-5, 2020.

IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; KAMBOH, N. A. Production of Xylanases by *Humicola lanuginosa* in Solid State Culture by Screening Lignocellulosic Substrates. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 8, p. 364-370, 2011.

JAVIER, P. F. I. *et al.* Xylanases: molecular properties and applications. **Industrial Enzymes**, v. 92, p. 65-82, 2007.

JEONG, S. Y.; LEE, J. W. Hydrothermal Treatment. **Pretreatment Of Biomass**, v. 4, p. 61-74, 2015.

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

KAMRA, P.; SATYANARAYANA, T. Xylanase Production by the Thermophilic Mold *Humicola lanuginosa* in Solid-State Fermentation. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 119, p. 145-158, 2004.

KANGO, N.; JANA, U. K.; CHOUKADE, R. Fungal Enzymes: sources and biotechnological applications. **Advancing Frontiers In Mycology e Mycotechnology**, v. 56, p. 515-538, 2019.

KARLSSON, E. V. *et al.* Endo-xylanases as tools for production of substituted xylooligosaccharides with prebiotic properties. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 102, p. 9081-9088, 2018.

KASIRAJAN, L.; MAUPIN-FURLOW, J. A. Halophilic archaea and their potential to generate renewable fuels and chemicals. **Biotechnology And Bioengineering**, v. 118, p. 1066-1090, 2020.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**, v. 1751, p. 119-139, 2005.

KIM, J. S.; LEE, Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42-48, 2016.

KISZONAS, A. M.; FUERST, E. P.; MORRIS, C. F. Wheat Arabinoxylan Structure Provides Insight into Function. **Cereal Chemistry Journal**, v. 90, p. 387-395, 2013.

KLEMM, D. *et al.* Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, p. 3358-3393, 2005.

KNOB, A. *et al.* Production, Purification, and Characterization of a Major *Penicillium glabrum* Xylanase Using Brewer's Spent Grain as Substrate. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

KOHLI, U. *et al.* Thermostable, alkalophilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 28, p. 606-610, 2001.

KORMELINK, F. J. M. *et al.* Mode of action of the xylan-degrading enzymes from *Aspergillus awamori* on alkali-extractable cereal arabinoxylans. **Carbohydrate Research**, v. 249, p. 355-367, 1993.

KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources And Bioprocessing**, v. 4, p. 1-10, 2017.

KUMAR, B. A. Wheat bran fermentation for the production of cellulase and xylanase by *Aspergillus niger* NFCCI 4113. **Research Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 11 -18, 2018.

KUMAR, V.; DANGI, A. K.; SHUKLA, P. Engineering Thermostable Microbial Xylanases Toward its Industrial Applications. **Molecular Biotechnology**, v. 60, p. 226-235, 2018.

KUMAR, V.; SHUKLA, P. Extracellular xylanase production from *Thermomyces lanuginosus* VAPS24 at pilot scale and thermostability enhancement by immobilization. **Process Biochemistry**, v. 71, p. 53-60, 2018.

ŁACKI, K. M. Introduction to Preparative Protein Chromatography. **Biopharmaceutical Processing**, v. 89, p. 319-366, 2018.

LADOKHIN, A. S. Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis. **Encyclopedia Of Analytical Chemistry**, v. 1, p. 1-10, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEONE, F. A. *et al.* Sigraf: a versatile computer program for fitting enzyme kinetic data. **Biochemical Education**, v. 20, p. 94-96, 1992.

LI, M. *et al.* Comparison of nonproductive adsorption of cellulase into lignin isolated from pretreated lignocellulose. **Cellulose**, v. 27, p. 7911-7927, 2020.

LI, Q. *et al.* Improving special hydrolysis characterization into *Talaromyces thermophilus* F1208 xylanase by engineering of N-terminal extension and site-directed mutagenesis in C-terminal. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 451-458, 2017.

LI, X. *et al.* Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1370-1379, 2005.

LIAB, K. *et al.* Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 27, p. 89-94, 2000.

LIAO, H. Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-20, 2015.

LIN, X. *et al.* Enzymatic pulping of lignocellulosic biomass. **Industrial Crops And Products**, v. 120, p. 16-24, 2018.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. **Biotechnology Of Microbial Enzymes**, v. 8, p. 267-298, 2017.

LOPES, A. M.; FERREIRA-FILHO, E. X.; MOREIRA, L. R. An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 125, p. 632-645, 2018.

LU, F.; RALPH, J (ed). Lignin. 1 ed. **Cereal Straw as a Resource For Sustainable Biomaterials And Biofuels**, v. 1, p. 169-207, 2010.

MA, R. *et al.* Utility of Thermostable Xylanases of *Mycothermus thermophilus* in Generating Prebiotic Xylooligosaccharides. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 65, p. 1139-1145, 2017.

MAGALHÃES, A. I. *et al.* Lignocellulosic biomass from agro-industrial residues in South America: current developments and perspectives. **Biofuels, Bioproducts And Biorefining**, v. 13, p. 1505-1519, 2019.

MAHARAJ, M. *et al.* Purification and Fluorescence Spectroscopy Analysis of a Beta-xylanase from *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826 and its Thermostability Under Denaturation Conditions. **Atlas Journal Of Chemistry And Biochemistry**, v. 1, p. 1-9, 2011.

MAHMUD, M. M. *et al.* Preparation of different polymorphs of cellulose from different acid hydrolysis medium. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 969-976, 2019.

MALGAS, S. *et al.* A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 35, p. 1-13, 2019.

MALHOTRA, G.; CHAPADGAONKAR, S. S. Production and applications of xylanases, an overview. **Biotechnologia**, v. 99, p. 59-72, 2018.

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

MATULIS, D. Selective Precipitation of Proteins. **Current Protocols In Protein Science**, v. 83, p. 1-15, 2016.

- MECHELKE, M. *et al.* Characterization of the arabinoxylan-degrading machinery of the thermophilic bacterium *Herbinix hemicellulosilytica* — Six new xylanases, three arabinofuranosidases and one xylosidase. **Journal Of Biotechnology**, v. 257, p. 122-130, 2017.
- MENDES, A. P. A. *et al.* Produção de petróleo terrestre no Brasil. **BNDES Setorial**, v. 25, p. 215-264, 2019.
- MENON, G. *et al.* Isolation, purification, and characterization of haloalkaline xylanase from a marine *Bacillus pumilus* strain, GESF-1. **Biotechnology And Bioprocess Engineering**, v. 15, p. 998-1005, 2010.
- MIAO, Y. *et al.* Effect of CBM1 and linker region on enzymatic properties of a novel thermostable dimeric GH10 xylanase (Xyn10A) from filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* Z5. **Amb Express**, v. 8, p. 1-10, 2018.
- MICHAUX, C. *et al.* Structural insights into the acidophilic pH adaptation of a novel endo-1,4- β -xylanase from *Scytalidium acidophilum*. **Biochimie**, v. 92, p. 1407-1415, 2010.
- MICHELIN, M. *et al.* Effect of phenolic compounds from pretreated sugarcane bagasse on cellulolytic and hemicellulolytic activities. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 275-278, 2016.
- MICHELIN, M. *et al.* Production of Hemicellulases, Xylitol, and Furan from Hemicellulosic Hydrolysates Using Hydrothermal Pretreatment. **Hydrothermal Processing In Biorefineries**, v. 100, p. 285-315, 2017.
- MICSONAI, A.; BULYÁKI, E.; KARDOS, J. BeStSel: from secondary structure analysis to protein fold prediction by circular dichroism spectroscopy. **Methods In Molecular Biology**, v. 1, p. 175-189, 2020.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MILNE, J. J. **Scale-Up of Protein Purification: downstream processing issues**. **Methods In Molecular Biology**, v. 5, p. 71-84, 2016.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA (MME). Plano Nacional de Energia 2030. **Colaboração Empresa de Pesquisa Energética (EPE)**, v. 12. p. 248, 2007.
- MOHANTY, S. K.; SWAIN, M. R. Bioethanol Production From Corn and Wheat: food, fuel, and future. **Bioethanol Production From Food Crops**, v. 47, p. 45-59, 2019.
- MONCLARO, A. V. *et al.* Xylanase from *Aspergillus tamaris* shows different kinetic parameters and substrate specificity in the presence of ferulic acid. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 120, p. 16-22, 2019.
- MOREIRA, A. *et al.* Biofuel Production from Sugarcane: various routes of harvesting energy from the crop. **Sugarcane Biofuels**, v. 115, p. 21-38, 2019.

- MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 100, p. 5205-5214, 2016.
- MORETTI, M. M. S. *et al.* Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 43, p. 1062-1071, 2012.
- NAIDU, D. S.; HLANGOTHI, S. P.; JOHN, M. J. Bio-based products from xylan: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, p. 28-4, 2018.
- NASCIMENTO, V. M. *et al.* Alkaline pretreatment for practicable production of ethanol and xylooligosaccharides. **Bioethanol**, v. 2, p. 1-15, 2016.
- NASTARI, P. M. Quarenta anos do carro a etanol. **Agro analysis**, v. 39, p. 20-21, 2019.
- NAUMOFF, D. G. Hierarchical classification of glycoside hydrolases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 76, p. 622-635, 2011.
- NETO, S. A. L.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a new Xylanase from *Humicola grisea var. thermoidea*. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 35, p. 1-10, 2004.
- OGINO, H.; ISHIKAWA, H. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, v. 91, p. 109-116, 2001.
- OKOLIE, J. A. *et al.* Chemistry and Specialty Industrial Applications of Lignocellulosic Biomass. **Waste And Biomass Valorization**, v. 74, p. 1-10, 2020.
- PAËS, G.; BERRIN, J. G.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanases: structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 564-592, 2012.
- PALANIAPPAN, A.; ANTONY, U.; EMMAMBUX, M. N. Current status of xylooligosaccharides: production, characterization, health benefits and food application. **Trends In Food Science & Technology**, v. 111, p. 506-519, 2021.
- PALONEN, H. *et al.* Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal Of Biotechnology**, v. 107, p. 65-72, 2004.
- PASIN, T. M. *et al.* A Halotolerant Endo-1,4- β -Xylanase from *Aspergillus clavatus* with Potential Application for Agroindustrial Residues Saccharification. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 191, p. 1111-1126, 2020.
- PAULY, M. *et al.* Hemicellulose biosynthesis. **Planta**, v. 238, p. 627-642, 2013.
- PERGANDE, M.; COLOGNA, S. Isoelectric Point Separations of Peptides and Proteins. **Proteomes**, v. 5, p. 4-18, 2017.
- PESSOA, J. P.; REZENDE, L.; ASSUNÇÃO, J. Flex cars and competition in fuel retail markets. **International Journal Of Industrial Organization**, v. 63, p. 145-184, 2019.

PING, L. *et al.* Production and characterization of a novel acidophilic and thermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1270-1279, 2018.

POLETTI, P. *et al.* Xylooligosaccharides: transforming the lignocellulosic biomasses into valuable 5-carbon sugar prebiotics. **Process Biochemistry**, v. 91, p. 352-363, 2020.

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

POLLET, A.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. **Critical Reviews In Biotechnology**, v. 30, p. 176-191, 2010.

QASEEM, M. F.; SHAHEEN, H.; WU, A. M. Cell wall hemicellulose for sustainable industrial utilization. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 144, p. 110-996, 2021.

QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C. E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9624-9630, 2010.

RAJAGOPALAN, G.; SHANMUGAVELU, K.; YANG, K. L. Production of prebiotic-xylooligosaccharides from alkali pretreated mahogany and mango wood sawdust by using purified xylanase of *Clostridium* strain BOH3. **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 158-166, 2017.

RAJENDRAN, K. *et al.* Updates on the pretreatment of lignocellulosic feedstocks for bioenergy production—a review. **Biomass Conversion And Biorefinery**, v. 8, p. 471-483, 2017.

RALPH, J.; LAPIERRE, C.; BOERJAN, W. Lignin structure and its engineering. **Current Opinion In Biotechnology**, v. 56, p. 240-249, 2019.

RANA, B. K.; JOHRI, B. N.; THAKUR, I. S. Formation and activities of xylanhydrolysing enzymes of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 12, p. 12-15, 1996.

ROBL, D. *et al.* Use of Ascomycete Extracts in Enzymatic Cocktail Formulations Increases Sugar Cane Bagasse Hydrolysis. **Bioenergy Research**, v. 9, p. 559-565, 2016.

RODRIGUES, C. *et al.* Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. **Biotecnologia aplicada a agroindústria**, v. 4, p. 283-314, 2017.

ROGERS, D. M. *et al.* Electronic Circular Dichroism Spectroscopy of Proteins. **Chemistry**, v. 5, p. 2751-2774, 2019.

RULLER, R. *et al.* Concomitant adaptation of a GH11 xylanase by directed evolution to create an alkali-tolerant/thermophilic enzyme. **Protein Engineering, Design And Selection**, v. 27, p. 255-262, 2014.

SADAF, A.; FATIMA, S. W.; KHARE, S. K. *Sporotrichum thermophile* Xylanases and Their Biotechnological Applications. **Fungi In Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance**, v. 9, p. 307-328, 2019.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SANTOS, V. T. O. *et al.* Role of hemicellulose removal during dilute acid pretreatment on the cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis of compositionally diverse sugarcane hybrids. **Industrial Crops And Products**, v. 111, p. 722-730, 2018.

SARSAIYA, S. *et al.* Microbial dynamics for lignocellulosic waste bioconversion and its importance with modern circular economy, challenges and future perspectives. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 1-13, 2019.

SATO, Y. *et al.* Contribution of ethanol-tolerant xylanase G2 from *Aspergillus oryzae* on Japanese sake brewing. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, v. 110, p. 679-683, 2010.

SCARCELLA, A. S. A. *et al.* Saccharification of different sugarcane bagasse varieties by enzymatic cocktails produced by *Mycothermus thermophilus* and *Trichoderma reesei* RP698 cultures in agro-industrial residues. **Energy**, v. 226, p. 120360, 2021.

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

SHARMA, A. *et al.* Thermophilic Fungi and Their Enzymes for Biorefineries. **Fungi In Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance**, v.1, p. 479-502, 2019.

SHARMA, H. K.; XU, C.; QIN, W. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: an overview. **Waste And Biomass Valorization**, v. 10, p. 235-251, 2017.

SHARMA, K.; THAKUR, A.; GOYAL, A. Xylanases for Food Applications. **Energy, Environment, And Sustainability**, v. 1, p. 99-118, 2018.

SHARMA, S. *et al.* Heavy metal ions are potent inhibitors of protein folding. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 372, p. 341-345, 2008.

SHARMA, S.; KUMAR, A. (ed.). Lignin. 1 ed. **Springer Series On Polymer And Composite Materials**, v. 1, p. 298, 2020.

SHI, P. *et al.* Molecular Characterization of a New Alkaline-Tolerant Xylanase from *Humicola insolens* Y1. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1-7, 2015.

SILVA, D. F. S.; BOMTEMPO, J. V; ALVES, F. C. Innovation opportunities in the Brazilian sugar-energy sector. **Journal Of Cleaner Production**, v. 218, p. 871-879, 2019.

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

SILVA, P. O. *et al.* Application of an endo-xylanase from *Aspergillus japonicus* in the fruit juice clarification and fruit peel waste hydrolysis. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 1-10, 2019.

SILVEIRA, M. H. L. *et al.* Production of hemicellulosic sugars from sugarcane bagasse via steam explosion employing industrially feasible conditions: pilot scale study. **Bioresource Technology Reports**, v. 3, p. 138-146, 2018.

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

SINGH, N. *et al.* Enzyme systems of thermophilic anaerobic bacteria for lignocellulosic biomass conversion. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 572-590, 2021.

SINGH, P. *et al.* Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 24, p. 667-673, 2007.

SINGH, S. *et al.* Fungal Xylanases: sources, types, and biotechnological applications. **Recent Advancement In White Biotechnology Through Fungi**, v. 65, p. 405-428, 2019.

SOMERVILLE, C. Cellulose Synthesis in Higher Plants. **Annual Review Of Cell And Developmental Biology**, v. 22, p. 53-78, 2006.

SOOCH, B. S. Xylitol: a sugar substitute for patients of diabetes mellitus. **World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, v. 64, p. 741-749, 2017.

SOUZA, F. H. M. *et al.* Glucose and xylose stimulation of a β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*: a kinetic and biophysical study. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 94, p. 119-128, 2013.

SOUZA, L. O. *et al.* Comparison of the biochemical properties between the xylanases of *Thermomyces lanuginosus* (Sigma®) and excreted by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 during the solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 277-284, 2018.

STRAATSMA, G.; SAMSON, R. A. Taxonomy of *Scytalidium thermophilum*, an important thermophilic fungus in mushroom compost. **Mycological Research**, v. 97, p. 321-328, 1993.

SULEIMAN, M.; KRÜGER, A.; ANTRANIKIAN, G. Biomass-degrading glycoside hydrolases of archaeal origin. **Biotechnology For Biofuels**, v. 13, p. 1-5, 2020.

SZAMBELAN, K. *et al.* Separate hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and fermentation methods in bioethanol production and formation of

volatile by-products from selected corn cultivars. **Industrial Crops And Products**, v. 118, p. 355-361, 2018.

TEO, S. C. *et al.* Characterizing a Halo-Tolerant GH10 Xylanase from *Roseithermus sacchariphilus* Strain RA and Its CBM-Truncated Variant. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 20, p. 2284, 2019.

THEBTI, W. *et al.* Screening and characterization of thermo-active enzymes of biotechnological interest produced by thermophilic *Bacillus* isolated from hot springs in Tunisia. **Acta Biochimica Polonica**, v. 63, p. 1-6, 2016.

TIAN, Y. *et al.* Interaction of cellulase with three phenolic acids. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1022-1027, 2013.

TIQUIA, S. A; GRUBE, M. *Sporotrichum thermophile* Xylanases and Their Biotechnological Applications. **Fungi In Extreme Environments: Ecological Role And Biotechnological Significance**, v. 1, p. 1-625, 2019.

TOLMASQUIM, M. T. Energia Renovável: Hidráulica, Biomassa, Eólica, Solar, Oceânica. **EPE**, v. 3, p. 452, 2016.

TORKASHVAND, N. *et al.* Canola meal and tomato pomace a novel substrates for production of thermostable *Bacillus subtilis* T4b xylanase with unique properties. **Biomass Conversion And Biorefinery**, v. 1, p. 10-15, 2020.

TORRE, A. L. D.; KADOWAKI, M. K. Thermostable xylanase from thermophilic fungi: biochemical properties and industrial applications. **African Journal Of Microbiology Research**, v. 11, p. 28-37, 2017.

TRAAEN, A. E. Untersuchungen über Bodenpilze aus Norwegen. **Nytt Mag Naturvidenskapene**, v. 52, p. 1-121, 1914.

VALENCIA-OJEDA, C. *et al.* Saccharification of agave bagasse with Cellulase 50 XL is an effective alternative to highly specialized lignocellulosic enzymes for continuous hydrogen production. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, p. 105448, 2021.

VALLADARES-DIESTRA, K. K. *et al.* Imidazole green solvent pre-treatment as a strategy for second-generation bioethanol production from sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, v. 5, p. 127708, 2020.

VIDAL, A. C. F.; HORA, A. B. Perspectivas do setor de biomassa de madeira para a geração de energia. **BNDES Setorial**, v. 1, p. 261-314, 2011.

WALIA, A. *et al.* Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotech**, v. 7, p. 1-12, 2017.

WANG, H. *et al.* Heterologous expression in *Pichia pastoris* and characterization of a novel GH11 xylanase from saline-alkali soil with excellent tolerance to high pH, high salt concentrations and ethanol. **Protein Expression and Purification**, v. 139, p. 71-77, 2017.

WINGFIELD, P. T. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. **Current Protocols in Protein Science**, v. 84, p. A.3F.1–A.3F.9, 2016.

WITTMAYER, J. M. *et al.* Governing sustainability: a dialogue between local agenda 21 and transition management. **Local Environment**, v. 21, p. 939-955, 2015.

WU, J. *et al.* Novel Salt-Tolerant Xylanase from a Mangrove-Isolated Fungus *Phoma sp.* MF13 and Its Application in Chinese Steamed Bread. **Acs Omega**, v. 3, p. 3708-3716, 2018.

WU, X. *et al.* Insights Into the Role of Exposed Surface Charged Residues in the Alkali-Tolerance of GH11 Xylanase. **Frontiers In Microbiology**, v. 11, p. 1-10, 2020b.

WU, X. *et al.* The contribution of specific subsites to catalytic activities in active site architecture of a GH11 xylanase. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 51, p. 1-11, 2020a.

XAVIER, L. Y.; JACOBI, P. R.; TURRA, A. Local Agenda 21: planning for the future, changing today. **Environmental Science e Policy**, v. 101, p. 7-15, 2019.

XIAO, L. P.; SONG, G. Y.; SUN, R. C. Effect of Hydrothermal Processing on Hemicellulose Structure. **Hydrothermal Processing In Biorefineries**, v. 5, p. 45-94, 2017.

XU, J. K.; SUN, R. C. Recent Advances in Alkaline Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. **Biomass Fractionation Technologies For A Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**, v. 1, p. 431-459, 2016.

YADAV, M.; KUMAR A.; SEHRAWAT, N (ed). Microbial Enzymes and Additives for the Food Industry. 1 ed. **Nova Science Pub Inc**, v. 1, p. 340, 2019.

YAHFOUFI, N. *et al.* Role of probiotics and prebiotics in immunomodulation. **Current Opinion In Food Science**, v. 20, p. 82-91, 2018.

YANG, C., LIN, M., SU, H. Multiple resistance-activating substances produced by *Humicola phialophoroides* isolated from soil for control of *Phytophthora* blight of pepper. **Bot Study**, v. 55, p. 40, 2014.

YANG, H. *et al.* Intrinsic fluorescence spectra of tryptophan, tyrosine and phenylalanine. **Selected Papers Of The Chinese Society For Optical Engineering Conferences**, v. 1, p. 1-20, 2017.

YANG, S. Q. *et al.* High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1794-1800, 2006.

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

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

YOUSUF, A.; PIROZZI, D.; SANNINO, F. Fundamentals of lignocellulosic biomass. **Lignocellulosic Biomass To Liquid Biofuels**, v. 6, p. 1-15, 2020.

ZARAFETA, D. *et al.* XynDZ5: a new thermostable gh10 xylanase. **Frontiers In Microbiology**, v. 11, p. 1-10, 2020.

ZHANG, F. *et al.* Purification and partial characterisation of a thermostable xylanase from salt-tolerant *Thermobifida halotolerans* YIM 90462T. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 225-228, 2012.

ZHAO, Y. *et al.* Bioethanol from corn stover – Global warming footprint of alternative biotechnologies. **Applied Energy**, v. 247, p. 237-253, 2019.

ZHOU, J. *et al.* A novel xylanase with tolerance to ethanol, salt, protease, SDS, heat, and alkali from actinomycete *Lechevalieria* sp. HJ3. **Journal Of Industrial Microbiology e Biotechnology**, v. 39, p. 965-975, 2012.

ZHOU, J. *et al.* A thermo-halo-tolerant and proteinase-resistant endoxylanase from *Bacillus* sp. HJ14. **Folia Microbiologica**, v. 59, p. 423-431, 2014.

ZHU, X.; XIN, X.; GU, Y. Cellulose and Hemicellulose Synthesis and Their Regulation in Plant Cells. **Biologically-Inspired Systems**, v. 5, p. 303-353, 2019.