

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA INDUÇÃO DE XILANASES:
CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *xynA1* DE *Caulobacter crescentus*
E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR DELINEAMENTO EXPERIMENTAL EM
Aspergillus fumigatus Fresen**

LUCIANA GRACIANO

**CASCAVEL – PARANÁ – BRASIL
2015**

LUCIANA GRACIANO

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA INDUÇÃO DE *XILANASES*:
CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *xynA1* DE *Caulobacter crescentus*
E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR DELINEAMENTO EXPERIMENTAL EM
Aspergillus fumigatus Fresen**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Agrícola, área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rita de Cássia G. Simão

Co-orientador: Prof. Dr. Divair Christ

**CASCADEL – PARANÁ – BRASIL
2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G756a

Graciano, Luciana

Aproveitamento de resíduos agroindustriais para indução de xilanases: clonagem e expressão do gene *xynA1* de *Caulobacter crescentus* e produção enzimática por delineamento experimental em *Aspergillus fumigatus* Fresen./ Luciana Graciano. Cascavel, UNIOESTE, 2015.

54 f. ; 30 cm.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Garcia Simão

Coorientador: Prof. Dr. Divair Christ

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Agrícola,
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas

1. Resíduos agroindustriais. 2. Xilanase. 3. Clonagem. 4. *Caulobacter crescentus*. 5. Expressão. 6. Otimização. 7. *Aspergillus fumigatus*.
Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título

Revisão de português, inglês e normas de monografia do PGEAGRI realizada por Ana Maria Vasconcelos e entregue em sete de maio de 2015.

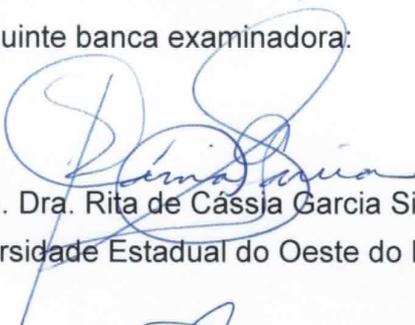
CDD 21.ed. 631

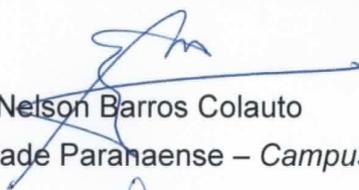
Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Beijo – CRB 9^a/965

LUCIANA GRACIANO

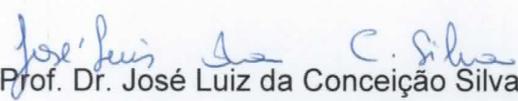
"Aproveitamento de resíduos agroindustriais para indução de xilanases: clonagem e expressão do gene *xynA1* de *Caulobacter crescentus* e produção enzimática por delineamento experimental em *Aspergillus fumigatus* Fresen"

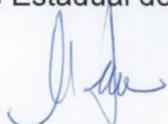
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, **aprovada** pela seguinte banca examinadora:


Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Garcia Simão
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* Cascavel


Prof. Dr. Nelson Barros Colauto
Universidade Paranaense – *Campus* Umuarama


Prof.^a Dra. Samara Ernandes
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Dois Vizinhos


Prof. Dr. José Luiz da Conceição Silva
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* Cascavel


Prof.^a Dra. Luciane Sene
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* Cascavel

Cascavel, 27 de abril de 2015.

BIOGRAFIA RESUMIDA

Luciana Graciano, natural de Cascavel, Paraná, Brasil, nascida no dia 20 de abril de 1986, formou-se em Ciências Biológicas - Licenciatura em 2008 pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná-UNIOESTE (*Campus* Cascavel) onde também obteve o grau de mestre em Engenharia Agrícola pelo programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola em 2011 pelo Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, cuja linha de pesquisa é Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental. Como formação complementar, possui especialização em Educação Ambiental pela Itaipu Binacional (2008) e Ensino de Ciências e Matemática pela UNIOESTE (2012). Os projetos de pesquisa na qual atua abordam as áreas de Microbiologia, Bioquímica, Biotecnologia e Gestão Ambiental (produção de enzimas com aproveitamento de resíduos), Biodiversidade (isolamento de novas linhagens fúngicas) e Genética de Microrganismos (clonagem e expressão gênica). Participou do grupo de pesquisa Bioquímica e Biotecnologia sob orientação da Prof^a Dra. Rita C. G. Simão de 2009 a 2015.

Dedico esta tese com todo meu amor e carinho para minha mãe Maria, por todas as orações e dedicação incondicional para que todos meus projetos fossem realizados da melhor forma. Dedico também aos meus irmãos, Joseane e Marcelo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida, saúde e força durante toda a caminhada durante os quatro anos de doutorado, e também pelas pessoas especiais que colocou em meu caminho.

À UNIOESTE, *campus* de Cascavel, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI), pelo apoio e pela oportunidade da realização do mestrado e doutorado. Em especial à Vera Celita Schmidt e ao Técnico Edison Barbosa da Cunha pela constante disposição em ajudar durante o doutorado. A todos os colegas do PGEAGRI pela colaboração e pelos momentos compartilhados no decorrer do curso.

À CAPES, pela disponibilização da bolsa de estudo, ao CNPq e à Fundação Araucária pelos auxílios concedidos para as pesquisas realizadas.

À Prof^a Dr^a Rita de Cássia Garcia Simão, pela orientação, compreensão, incentivo, amizade, confiança e principalmente pelo exemplo de responsabilidade e ética profissional.

Aos professores doutores Marina K. Kadowaki, Divair Christ, José L. da C. Silva, Rinaldo F. Gandra, Luciane Sene, Alexandre Maller, Sandra L. Balbo, Maria Lúcia Bonfleur pela disponibilização dos laboratórios, equipamentos e reagentes quando necessário bem como pelo auxílio em momentos de dúvida e colaboração com os trabalhos desenvolvidos.

À Juliana M. Corrêa, pela parceria e amizade durante todas as fases do mestrado e doutorado e também pelo exemplo de garra e dedicação.

A toda a equipe do laboratório de Bioquímica durante o período de 2009 a 2015 em que compartilharam comigo momentos de alegrias nos intervalos de experimentos, cafés e festas de aniversários. Em especial aos amigos de laboratório, Elaine L. dos Santos, Fabíola G. N. Vieira, Adilson Bosseto, Amanda Alves, Priscila I. Justo, Diandra de Andrades e Alessandra Oriente, pela ajuda e amizade durante a realização da pesquisa no laboratório.

Às minhas amigas, Thaisa Pegoraro, Silvana Vailões, Luiza Steffanello, Juliana Miranda, Andressa Caroline, Simone Padilha e Diandra pela amizade, companhia, pelas conversas, pelo apoio e força que a mim dedicaram.

À minha família, pela compreensão, ajuda, carinho, incentivo e paciência durante este período e toda minha vida. E em especial a minha querida mãe, Maria Benedita de F. Graciano, e aos meus irmãos, Joseane F. Graciano e Marcelo Graciano.

Aos servidores e colegas do prédio Biomédicas (CCMF e CCBS), que fizeram parte da minha rotina de trabalho e que se prestaram gentilmente para ajudar quando foi preciso.

Agradeço também aos membros desta banca de avaliação de tese de doutorado pela disponibilidade e disposição para avaliarem e darem sugestões a este trabalho.

Finalmente, agradeço a todos que colaboraram de alguma forma na concretização deste trabalho e na conclusão do curso de doutorado em Engenharia Agrícola.

RESUMO GERAL

APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA INDUÇÃO DE XILANASES: CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *xynA1* DE *Caulobacter crescentus* E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR DELINEAMENTO EXPERIMENTAL EM *Aspergillus fumigatus* Fresen

As xilanases são glicosídeo hidrolases (GHs) com diferentes propriedades físico-químicas e várias aplicações biotecnológicas, como na indústria têxtil, alimentícia e de papel e celulose. Xilanases podem ser utilizadas para a degradação de fontes de carbono renováveis, tais como os resíduos agroindustriais. Desta forma, é possível aproveitar a capacidade energética de compostos disponíveis em abundância e que poderiam ser descartados levando à poluição de solos e corpos hídricos. Atualmente, existe uma busca por estratégias que permitam a otimização de processos biotecnológicos para utilizar a capacidade energética presentes na biomassa para geração de produtos de valor agregado, como a produção de xilitol e do etanol celulósico. Ferramentas bioquímico-moleculares e planejamentos estatísticos de otimização de processos são exemplos de estratégias que visam melhorar o desempenho catalítico de enzimas. Neste contexto, este trabalho objetivou aproveitar resíduos agroindustriais para a indução de xilanases usando duas abordagens. Na primeira, foi realizada a clonagem e expressão do gene *xynA1* (CCNA_02894) de *Caulobacter crescentus* em *Escherichia coli* com a obtenção de uma proteína recombinante fusionada a uma cauda de histidina carboxi-terminal (XynA1), que foi posteriormente purificada e caracterizada quanto a suas propriedades bioquímicas e cinéticas. Nesta análise, verificou-se que dentre as várias fontes de carbono testadas para indução da XynA1 em *C. crescentus*, os substratos palha de milho, palha de milho hidrolisada e o sabugo de milho foram os mais eficientes para induzir a atividade xilanásica. Além disso, a caracterização da XynA pura, obtida por cromatografia de afinidade em colunas pré-empacotadas de níquel-sepharose de elevado desempenho, mostrou que a XynA1 possui atividade enzimática e atividade específica de 18,26 U mL⁻¹ e 2,22 e U mg⁻¹ usando xilano de beechwood como substrato na reação. A atividade de XynA1 foi inibida por EDTA e íons metálicos tais como Cu²⁺ e Mg²⁺. Em contraste, β-mercaptoetanol, ditioneitol (DTT), e Ca²⁺ induziram a atividade da enzima recombinante. Os dados cinéticos para XynA1 revelaram valores de K_M e V_{máx} de 3,77 mg mL⁻¹ e 10,2 μM min⁻¹, respectivamente. Finalmente, a enzima apresentou um pH ótimo igual a 6 e temperatura ótima de 50 °C. Além disso, 80% da atividade de XynA1 foi mantida a 50 °C por 4 horas de incubação. Isso sugere estabilidade térmica para aplicação em processos biotecnológicos. Na segunda etapa do trabalho, foi realizada a otimização da produção xilanásica por um novo isolado

termotolerante de *Aspergillus fumigatus* Fresen. (OI-1R-T), obtido de bioma de Mata Atlântica, usando metodologias estatísticas de delineamento experimental como Planejamento Plackett-Burman (Plackett-Burman Design-PBD) e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Verificou-se, nesses ensaios, uma atividade xilanásica de 530 U mL⁻¹ na presença de 6,5% de palha de milho no meio de cultivo otimizado. Ensaio de hidrólises enzimáticas da palha de milho, palha de milho hidrolisada e do xilano de beechwood foram realizados durante 96 horas com 2 U mL⁻¹ de atividade xilanásica do extrato bruto otimizado no mesmo resíduo, resultando em uma produção líquida de 3,89, 20,96 e 21,64 μmol mL⁻¹ de açúcares redutores, respectivamente. Assim, sugere-se que a enzima fúngica, mesmo em extrato bruto, também poderia ser aplicada em processos biotecnológicos diversos.

Palavras-chave: xilanase, resíduos agroindustriais, clonagem, expressão, otimização, *Caulobacter crescentus*, *Aspergillus fumigatus*

OVERVIEW

AGROINDUSTRIAL WASTE RECOVERY FOR INDUCTION OF xylanases: CLONING AND GENE EXPRESSION IN *Caulobacter crescentus xynA1* AND ENZYMATIC PRODUCTION BY EXPERIMENTAL DESIGN IN *Aspergillus fumigatus* Fresen

Xylanases are glycoside hydrolases (GHs) with different physicochemical properties and various biotechnological applications such as textile industry, food as well as pulp and paper processing. Xylanases can be used for the degradation of renewable carbon sources, such as agricultural residues. Thus, it can be used the energy capacity of compounds that are available in abundance and could be disposed, which consequence leads to pollution of soil and water bodies. Currently, there is a search for strategies to optimize biotechnological processes to use the power capacity present in biomass in order to produce value-added products such as the production of xylitol and cellulosic ethanol. Biochemical and molecular tools as well as statistical planning of optimization process are examples of strategies to improve catalytic performance of enzymes. In this context, this study aimed to use agroindustrial wastes for xylanase induction according to two approaches. At first, the cloning and expression of *xynA1* (CCNA_02894) *Caulobacter crescentus* gene were performed in *Escherichia coli* to obtain a recombinant protein fused to a carboxy-terminal histidine tail (XynA1), which was subsequently purified and characterized based on their biochemical and kinetic properties. In this analysis, it was found out that among several carbon sources tested for induction of XynA1 in *C. crescentus*, substrates as corn straw, hydrolyzed corn straw and corn cob were more effective to induce xylanase activity. Furthermore, characterization of pure XynA obtained by affinity chromatography on pre-packed columns nickel-sepharose of high performance showed that XynA1 has an enzymatic activity and specific activity of 18.26 U mL⁻¹ and 2.22 and U mg⁻¹, respectively, using beechwood xylan as substrate in the reaction. The XynA1 activity was inhibited by EDTA and metal ions such as Cu²⁺ and Mg²⁺. Still, beta-mercaptoethanol, dithiothreitol (DTT) and Ca²⁺ induced activity of the recombinant enzyme. Kinetic data for XynA1 revealed K_M and V_{máx} values of 3.77 mg ml⁻¹ and 10.2 uM min⁻¹, respectively. Finally, the enzyme showed an optimum pH equal to 6 and an optimum temperature of 50 °C. Moreover, 80% XynA1 activity was maintained at 50 °C for four hour-incubation, suggesting a thermal stability to be used in biotechnological processes. In the second step of this trial, optimization of xylanase production by a new isolated thermotolerant *Aspergillus fumigatus* Fresen (OI-1R-T) was carried out. It was obtained from Atlantic Forest biome, using statistics methodologies of experimental design as Plackett-Burman Design (Plackett-Burman Design - PBD) and Central Composite Rotational Delineation (CCRD). It was observed in these assays a 530 U ml⁻¹ xylanase activity in 6.5% of corn straw in an

optimized medium. Hydrolysis enzyme assays of corn husks, hydrolyzed corn straw and beechwood xylan have been performed for 96 hours with 2 U ml⁻¹ of xylanase activity of optimized crude extract in the same residue. This resulted in a net production of 3.89, 20.96 and 21.64 μmol mL⁻¹ of reducing sugars, respectively. It suggested that the fungal enzyme, even in crude extract, could also be applied in several biotechnological processes.

Keywords: xylanase, agroindustrial waste, cloning, expression, optimization, *Caulobacter crescentus*, *Aspergillus fumigatus*

RESUMO PARA O ARTIGO 1

CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *xynA1* QUE CODIFICA UMA XILANASE DO GRUPO GH10 EM *Caulobacter crescentus*

Caulobacter crescentus (cepa NA1000) é uma bactéria aquática que pode viver em ambientes oligotróficos e apresenta inúmeros genes que codificam enzimas envolvidas na desconstrução da parede celular vegetal, incluindo cinco genes para β -xilosidases (*xynB1-xynB5*) e três genes para xilanases (*xynA1-xynA3*). A atividade total de xilanases, na presença de diferentes substratos, foi avaliada e verificou-se que os compostos derivados do milho foram os mais eficientes na indução da xilanase bacteriana. O gene *xynA1* (CCNA_02894) que codifica uma xilanase predita do grupo 10 das glico-hidrolases (GH10) foi eficientemente expresso em *Escherichia coli* LMG194 usando 0,02% de arabinose, após clonagem no vetor pJET1.2/blunt e subclonagem no vetor de expressão pBAD/gIIIa, que fornece uma proteína de fusão com histidinas carboxi-terminais, denominada XynA1. A caracterização de XynA1 purificada mostrou atividade enzimática e atividade específica de 18,26 U mL⁻¹ e 2,22 U mg⁻¹, na presença de xilano de beechwood como substrato para dosagem. A atividade de XynA1 foi inibida por EDTA e íons metálicos tais como Cu²⁺ e Mg²⁺. Em contraste, β -mercaptoetanol, ditioneitol (DTT) e Ca²⁺ induziram a atividade da enzima recombinante. Os dados cinéticos para XynA1 revelaram valores de K_M e V_{max} de 3,77 mg mL⁻¹ e 10,20 μ M min⁻¹, respectivamente. Finalmente, o enzima apresentou pH ótimo de 6 e temperatura ótima de 50 °C. Além disso, 80% da atividade de XynA1 foi mantida a 50 C durante 4 horas de incubação. Isso sugere estabilidade térmica para processos biotecnológicos. Este trabalho é o primeiro estudo sobre a clonagem, superexpressão e caracterização enzimática de uma xilanase de *C. crescentus*.

Palavras-chave: xilanase, *Caulobacter crescentus*, resíduos agroindustriais, clonagem, caracterização.

ABSTRACT FOR MANUSCRIPT 1

CLONING AND EXPRESSION OF THE *xynA1* GENE THAT ENCODES A XYLANASE OF GH10 GROUP IN *Caulobacter crescentus*

Caulobacter crescentus (NA1000 strain) are aquatic bacteria that can live in environments of low nutritional quality and present numerous genes that encode enzymes involved in plant cell wall deconstruction, including five genes for β -xylosidases (*xynB1–xynB5*) and three genes for xylanases (*xynA1–xynA3*). The overall activity of xylanases in the presence of different agro-industrial residues was evaluated, and it was found that the residues from the processing of corn were the most efficient in inducing bacterial xylanases. The *xynA1* gene (CCNA_02894) encoding a predicted xylanase of group 10 of glyco-hydrolases (GH10) that was efficiently overexpressed in *Escherichia coli* LMG194 using 0.02 % arabinose, after cloning into the vector pJET1.2 blunt and subcloning into the expression vector pBAD/gIII, provided a fusion protein that contained carboxy-terminal His-tags, named XynA1. The characterization of pure XynA1 showed an enzymatic activity of 18.26 U mL⁻¹ and a specific activity of 2.22 U mg⁻¹ in the presence of xylan from beechwood as a substrate. XynA1 activity was inhibited by EDTA and metal ions such as Cu²⁺ and Mg²⁺. By contrast, β -mercaptoethanol, dithiothreitol (DTT), and Ca²⁺ induced recombinant enzyme activity. Kinetic data for XynA1 revealed K_M and V_{max} values of 3.77 mg mL⁻¹ and 10.20 μ M min⁻¹, respectively. Finally, the enzyme presented an optimum pH of 6 and an optimum temperature of 50 °C. In addition, 80% of the activity of XynA1 was maintained at 50 °C for 4 h of incubation, suggesting a thermal stability for the biotechnological processes. This work is the first study concerning the cloning, overexpression, and enzymatic characterization of *C. crescentus* xylanase.

Keywords: Xylanase, *Caulobacter crescentus*, agro-industrial residues, cloning, characterization.

RESUMO PARA O ARTIGO 2

DESENHO EXPERIMENTAL APLICADO À OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE UMA NOVA XILANASE DEGRADADORA DE BIOMASSA DE *Aspergillus fumigatus* Fresen

A otimização da produção de xilanase de uma nova cepa de *Aspergillus fumigatus* Fresen (OI-1R-T) foi realizada a partir de metodologias estatísticas. O Planejamento Plackett-Burman demonstrou que os seguintes componentes do meio Czapek foram biologicamente significativos: nitrato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e palha de milho. Esses fatores foram selecionados para a implementação de um Delineamento Composto Central Rotacional 2^4 com a validação do modelo proposto. A observação dos gráficos de superfície de resposta indicou uma tendência ao aumento da produção enzimática com elevação da concentração da palha de milho. Um teste adicional foi realizado com concentrações variadas de palha de milho e a atividade de xilanase otimizada foi de 530 U mL^{-1} na presença de 6,5% (w/v) de biomassa residual, que foi onze vezes maior do que a obtida apenas com o Planejamento Plackett-Burman ($45,8 \text{ U mL}^{-1}$). A estabilidade térmica da enzima foi mantida a 90% a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por seis horas. Ensaios de hidrólises enzimáticas foram realizados visando obter açúcares redutores provenientes da quebra da palha de milho, palha de milho hidrolisada e xilano de beechwood. Este procedimento foi realizado durante 96 horas com 2 U mL^{-1} de xilanase (extrato bruto) e resultou nas produções líquidas de 3,89, 20,96 e $21,64 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1}$ de açúcares redutores, respectivamente. Logo, há a indicação de possíveis aplicações biotecnológicas para o extrato bruto com enzimas xilanolíticas (xilanase).

Palavras-chave: xilanase; *Aspergillus fumigatus*; delineamento experimental; palha de milho; hidrólise enzimática.

ABSTRACT FOR MANUSCRIPT 2

EXPERIMENTAL DESIGN APPLIED TO THE OPTIMIZATION OF A NEW BIOMASS-DEGRADING XYLANASE OF *Aspergillus fumigatus* Fresen

The optimization of xylanase production of a new *Aspergillus fumigatus* Fresen strain (OI-1R-T) was obtained by statistical approaches. The Plackett-Burman Design evaluation showed that the following components of Czapeck medium were biologically significant: sodium nitrate, potassium phosphate, magnesium sulfate and corn straw. These factors were selected to implement the 2^4 Central Composite Rotational Delineation with the proposed model validation. The response surface plots have indicated a trend for increased xylanase activity with increasing concentrations of maize straw. An additional test was carried out with different concentrations of maize straw and the optimized xylanase activity was 530 U ml^{-1} in the presence of 6.5% (w / v) of residual biomass, which was 11 times higher than the one obtained only with the Plackett-Burman Planning (45.8 U mL^{-1}). The thermostability of the enzyme was kept at 90% at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ for 6 hours. Enzymatic hydrolyses tests were performed to obtain reducing sugars from maize straw, hydrolyzed maize straw and beechwood xylan. This procedure has been performed for 96 hours with 2 U ml^{-1} for xylanase (crude extract) and resulted in net production of 3.89, 20.96 and $21.64 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1}$ for reducing sugars, respectively. This indicated possible biotechnological applications to the crude extract with xylan-degrading enzymes (xylanase).

Keywords: xylanase; *Aspergillus fumigatus*; experimental design; maize straw; enzymatic hydrolysis

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS **XV**

LISTA DE TABELAS **XVI**

ARTIGO 1 **1**

CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *xynA1* QUE CODIFICA UMA XILANASE DO GRUPO GH10 EM *Caulobacter crescentus*

ARTIGO 2 **20**

DESENHO EXPERIMENTAL APLICADO À OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE UMA NOVA XILANASE DEGRADADORA DE BIOMASSA DE *Aspergillus fumigatus* Fresen.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DO ARTIGO 1

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 Efeito de vários resíduos agroindustriais na produção de xilanase por <i>C. crescentus</i> | 07 |
| FIGURA 2 SDS-PAGE do lisado celular da <i>E. coli</i> LMG194 recombinante | 09 |
| FIGURA 3 O efeito do pH sobre a atividade enzimática da xilanase recombinante e estabilidade a vários valores de pH | 10 |
| FIGURA 4 Efeito da temperatura e da estabilidade térmica na atividade da xilanase de <i>C. crescentus</i> | 11 |
| FIGURA 5 Análise filogenética para o gene <i>XynA1</i> de <i>C. crescentus</i> | 15 |

FIGURAS DO ARTIGO 2

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 Gráfico de Pareto para o efeito de cada fator na atividade de xilanase do fungo <i>A. fumigatus</i> Fresen. (OI1R-T) com Planejamento Fatorial Plackett-Burman | 27 |
| FIGURA 2 Superfícies de resposta para a produção de xilanase pelo fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen. (OI1R-T) – Versão colorida | 31 |
| FIGURA 3 Atividade de xilanase pelo de <i>A. fumigatus</i> Fresen. (OI1R-T) cultivado em meio Czapeck otimizado contendo palha de milho (2.5-7%). | 33 |
| FIGURA 4 Estabilidade térmica para a atividade de xilanase presente no extrato bruto do fungo <i>A. fumigatus</i> Fresen. (OI1R-T) | 34 |
| FIGURA 5 Hidrólise de compostos pela ação das enzimas presentes do extrato bruto enzimático produzido pelo fungo <i>A. fumigatus</i> Fresen. (OI1R-T) | 35 |

LISTA DE TABELAS

TABELAS DO ARTIGO 1

| | |
|--|----|
| TABELA 1 Efeito de diferentes compostos sobre a atividade da xilanase | 13 |
|--|----|

TABELAS DO ARTIGO 2

| | |
|---|----|
| TABELA 1 Níveis utilizados no DCCR para os quatro fatores estudados | 23 |
| TABELA 2 Planejamento Plackett-Burman | 26 |
| TABELA 3 Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^4 | 29 |
| TABELA 4 Resumo da ANOVA do modelo matemático | 29 |

ARTIGO 1

CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *xynA1* QUE CODIFICA UMA XILANASE DO GRUPO GH10 EM *Caulobacter crescentus*

Versão adaptada para a língua portuguesa com base no artigo publicado no periódico *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Graciano et al. (2015), *Cloning and Expression of the xynA1 Gene Encoding a Xylanase of GH10 Group in Caulobacter crescentus*, 175 (8): 3915-3929.

Introdução

A revolução industrial favoreceu o crescimento econômico mundial e também o maior consumo de matéria-prima e combustíveis fósseis, por conseguinte, houve um esgotamento desses recursos na natureza e o impacto negativo de seu uso sobre o meio ambiente. Na atualidade, para que o desenvolvimento global seja sustentável, o aproveitamento da biomassa vegetal é uma alternativa interessante e necessária. Os resíduos derivados da parede celular das plantas podem ser considerados uma das fontes de energia renovável com maior potencial e contribuem para as necessidades atuais e futuras de energia. O uso da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração, por exemplo, requer a otimização da produção de enzimas envolvidas com a quebra da parede celular das plantas [1].

A biomassa lignocelulósica é constituída por três principais frações poliméricas: a celulose (45-55%), a hemicelulose (25-35%) e a lignina (20-30%), que são unidas entre si por ligações covalentes. Essa estrutura forma um complexo de estrutura rígida de difícil degradação devido a sua disposição molecular resistente ao ataque microbiano [2].

A hemicelulose compreende, depois da celulose, o segundo grupo de polissacarídeos renováveis mais abundantes na natureza, presentes nas madeiras e nos resíduos da agroindústria. A hemicelulose é formada principalmente pelo xilano, homopolissacarídeo linear de resíduos de β -D-xilanopiranosose unidos por ligações do tipo β -1,4 e localiza-se na interface entre celulose e lignina em todas as camadas da parede celular vegetal. Estruturalmente, as hemiceluloses são formadas por resíduos de açúcares como as hexoses (D-manose, L-ramnose, L-fucose, D-galactose, L-galactose) e as pentoses (D-xilose e L-arabinose). E pode apresentar quantidades variáveis de ácido D-glucurônico, ácido D-4-Ometilglucurônico, ácido D-galacturônico e ainda os grupos O-acetil ou ésteres de ácido ferúlico e p-cumárico ligados através de unidades de L-arabinose à cadeia principal [3].

A hidrólise enzimática completa da hemicelulose envolve um complexo multi-enzimático, composto por enzimas auxiliares que atuam nas cadeias laterais do xilano como α -glucuronidase (E.C. 3.2.1.139), α -L-arabinofuranosidase (E.C. 3.2.1.55) e acetil-xilano-

esterase (E.C. 3.1.1.72) e as endo-xilanases (E.C. 3.2.1.8) que atuam na cadeia principal do xilano liberando xilooligossacarídeos, que são em seguida hidrolisados a açúcares menores pelas β -Xilosidases (E.C. 3.2.1.37) [4]

As Xilanases são glicosídeo-hidrolases (GH), que apresentam diferentes estruturas moleculares e propriedades físico-químicas. Xilanases microbianas apresentam aplicabilidade biotecnológica em vários setores industriais. Isso se deve à capacidade dessa enzima em degradar fontes de carbono de baixo custo, tais como os materiais lignocelulósicos presentes em resíduos agrícolas. Deste modo, fica demonstrado o importante aproveitamento da capacidade energética de diferentes compostos vegetais. Xilanases podem ser usadas como suplementos de ração animal, na indústria de panificação para melhorar a textura de pães; na indústria de alimentos e bebidas para aumentar a qualidade do produto; na indústria têxtil, no branqueamento da polpa de celulose e também para produção de açúcar de baixo peso molecular, o xilitol. Enzimas xilanólíticas podem ainda trazer benefícios para a economia global através do processamento de materiais lignocelulósicos para a geração de biocombustíveis e outros produtos químicos [5].

Em verdade, um desafio presente e futuro para a otimização dos processos biotecnológicos é explorar cada vez mais efetiva e eficientemente a capacidade energética das hemiceluloses presentes nos resíduos agroindustriais. A hidrólise de hemiceluloses pode ser feita pela utilização de enzimas e o uso de ferramentas moleculares denominadas de tecnologia do DNA recombinante permite a produção mais eficaz de enzimas com potencial para quebrar a hemicelulose em moléculas menores, partindo-se da manipulação de sequências gênicas específicas para a síntese dessas enzimas. Desse modo, estudos de genes codificadores de xilanases bem como o estudo de microrganismos produtores de xilanases ainda desconhecidos continuam sendo alternativas interessantes para que se encontrem enzimas com características econômica e industrialmente aplicáveis ao desenvolvimento de processos industriais mais limpos.

C. crescentus é uma bactéria Gram-negativa, aquática de vida livre, não patogênica, encontrada principalmente em ambientes aquáticos e em muitos tipos de solos, além de ser considerada como excelente modelo para estudo de diferenciação celular em bactérias, em função do seu ciclo de vida assimétrico [6]. A análise do genoma de *C. crescentus*, a primeira proteobactéria de vida livre da classe alfa a ser seqüenciada, destacou a presença de oito genes envolvidos diretamente com a degradação do xilano, dos quais cinco genes codificam enzimas com provável atividade de β -xilosidase e três com provável atividade endo-xilanásica.

Dois genes (*xynB1* e *xynB2*) que codificam β -Xilosidases foram estudados previamente [7-9] na bactéria. No presente trabalho, foi realizada a caracterização enzimática da primeira Xilanase recombinante de *C. crescentus* codificada pelo gene *xynA1* (CCNA 02894) a partir de abordagens bioquímico-moleculares. Apesar de *C. crescentus*

apresentar três genes para xilanase, sendo duas prováveis GH10, até o presente momento nenhuma xilanase de *C. crescentus* havia sido estudada, portanto, este é o primeiro registro na literatura.

Material e Métodos

Cepas Bacterianas e Condições de Cultura

A cepa de *C. crescentus* NA1000 foi crescida a 30 °C em meio PYE (peptona e extrato de levedura) para a extração de DNA genômico. A atividade xilanásica global de *C. crescentus* foi realizada após crescimento da bactéria em meio mínimo (M2) [10] suplementado com 0,2% de glicose e 2% de diferentes resíduos agroindustriais. Para clonagem, subclonagem e indução, foram usadas as cepas de *E. coli* DH5 α , TOP10 e LMG194, respectivamente. Essas cepas foram cultivadas em meio de cultura Luria-Bertani (LB) contendo ampicilina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a 37 °C.

Produção de Xilanase por C. crescentus em Diferentes Substratos

Para a análise de atividade xilanásica global por *C. crescentus*, células da bactéria foram crescidas na presença de diferentes substratos, como os resíduos agroindustriais: palha de milho (folhas da espiga), casca de arroz, palha de soja, fibra do fruto de maracujá, bagaço de cevada (resíduo de cervejaria), fibra de coco (resíduo de indústria de água de coco), bagaço de cana e sabugo de milho; obtidos de propriedades agrícolas ou agroindústrias da região Oeste do Paraná (Brasil) e também com palha de milho hidrolisada (PMH). Os resíduos foram preparados conforme Corrêa et al.[9] e a palha de milho foi hidrolisada pelo pré-tratamento de auto-hidrólise, no qual 1 g de palha de milho foi adicionado em um tubo com 10 mL de água e submetido ao aquecimento a 200 °C em tubo digestor durante uma hora. Após esse período, o tubo foi transferido imediatamente para um banho de gelo e aguardado seu resfriamento. A fase líquida foi filtrada em papel filtro e a PMH presente na solução foi precipitada por adição de três volumes de etanol absoluto (20 °C, 24h). Após esse período, a fração líquida foi retirada com cuidado por inversão e o precipitado foi então seco em estufa 50 °C por 24 horas.

A produção de xilanase foi realizada em meio contendo 2% (p/v) dos diferentes resíduos como fonte de carbono em 5 mL de meio mínimo M2 [10] contendo 0,2% de glicose (esta concentração inicial mínima de glicose é necessária para que a *C. crescentus* possa se adaptar ao meio e consiga sintetizar as enzimas xilanolíticas). Os resíduos e a PMH foram esterilizados por autoclave durante 15 minutos e o M2 foi esterilizado por filtração a vácuo (devido à presença da glicose) O pré-inóculo da *C. crescentus* foi feito com crescimento celular por 12 horas em meio PYE a 30 °C e 120 rpm. Os meios contendo

resíduos agrícolas e a PMH com meio mínimo foram usados para diluir o inóculo das células de *C. crescentus* em fase estacionária para uma $DO_{\lambda 600}$ nm igual a 0,150, conforme protocolo definido por Corrêa et al.[9]. As culturas foram incubadas a 30 °C sob agitação (120 rpm) durante 24 horas. Após esse período, alíquotas de 1 mL da solução de crescimento foram centrifugadas a 15.000 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi reservado para análise da xilanase extracelular e os precipitados celulares foram secos e congelados para dosagens de xilanase intracelular. O precipitado celular congelado foi lisado com 350 µL de tampão fosfato 50 mM pH 6.0 sob agitação vigorosa em vórtex até o seu descongelamento. A amostra foi mantida em gelo e foi feita a dosagem de atividade xilanolítica global da bactéria.

Clonagem do Gene xynA1 de C. crescentus

Os oligonucleotídeos, *xynA1**EcoRI*-Forw (5'aagaattctgcgcggttttctggagcg3') e *xynA1**HindIII*-Rev (5'tataagcttcccgcgccggcgccgcttcag3') foram sintetizados de acordo com a sequência de DNA do gene *xynA1* fornecida pelo sequenciamento do genoma de *C. crescentus* (*accession number*: CCNA_02894) [6]. Esse foi o primeiro gene que codifica para xilanase em *C. crescentus* estudado por nosso laboratório, assim foi denominado *xynA1*. A amplificação do gene foi feita com a utilização de 50 pmoles de cada primer em volume de 50 µL de reação de PCR contendo 0.2 µg de DNA genômico de *C. crescentus*, 5 µL DMSO e 1 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen®). A amplificação foi realizada com 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 68 °C por 2 minutos, e 68 °C por 2 minutos.

O produto de PCR foi resolvido em gel de agarose TAE 1X 1%. O fragmento de 1.158 pb correspondente ao gene *xynA1* foi recortado do gel e tratado com uma polinucleotídeo quinase (Fermentas®) para produção de extremidades não coesivas e ligado ao vetor de clonagem pJET1.2/blunt (Fermentas®). Após confirmação da clonagem e sequenciamento, o recombinante pJET1.2/blunt-*xynA1* foi digerido com *EcoRI/HindIII*, e o fragmento gerado foi clonado *in frame* no vetor *pBAD/gIIIA EcoRI/HindIII* (Invitrogen®) para gerar uma proteína de fusão com uma cauda de histidinas na região carboxi-terminal, denominada XynA1. Os plasmídeos recombinantes pJET1.2/blunt-*xynA1* e pBAD/gIIIA-*xynA1* foram sequenciados na UNIOESTE e as reações resolvidas por sequenciador capilar pelo serviço de sequenciamento do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Superexpressão e Purificação da XynA1 Recombinante de C. crescentus

Para indução da expressão da xilanase recombinante de *C. crescentus*, células de *E. coli* LMG194 contendo o plasmídeo pBAD/gIIIa-xynA1 foram crescidas em meio LB contendo ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) a 37°C e 180 rpm por 12 horas. Quando as células de *E. coli* atingiram a fase estacionária, a cultura foi diluída 100 vezes e novamente submetida às mesmas condições de crescimento até a fase mid-log. Após esse período, a cultura foi induzida com 0,02% de L(+) arabinose (Sigma®) por 4 horas. As células foram lisadas com a solução *Fast Break Cell Lysis* (Promega®) contendo 20 mg mL^{-1} de lisozima (Sigma®) e inibidores de protease ($10 \mu\text{L mL}^{-1}$) (Sigma®). A mistura contendo solução de lise foi incubada a 25°C , 90 rpm por 30 minutos. Em seguida, o lisado foi centrifugado a $15.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi transferido para colunas pré-empacotadas de níquel *sepharose His-SpinTrap columns* (GE Healthcare®) para purificação da proteína de fusão recombinante por cromatografia de afinidade. As proteínas aderidas à coluna foram eluídas com 20 mM de tampão fosfato (pH 7.4) contendo 500 mM de imidazol. As amostras purificadas foram dialisadas contra água deionizada e analisadas por SDS-PAGE 9%.

Determinação da Atividade e Proteína Total da Xilanase

As reações para verificação da atividade de xilanase foram feitas utilizando xilano de beechwood 1% (Sigma®) em tampão fosfato de sódio (pH 6.0) como substrato, com incubação a 50°C . A quantificação dos açúcares redutores foi feita pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) [10]. A atividade xilanásica foi definida como sendo a quantidade em milimoles de xilose por mililitro (mL) de enzima em 1 min nas condições de ensaio (U mL^{-1}). A concentração das proteínas foi mensurada pelo reagente de Bradford de Bio-Rad com soro albumina bovina (BSA) como padrão [11].

Efeito do pH e da Temperatura na Atividade e Estabilidade da XynA1

O pH ótimo foi determinado utilizando tampão McIlvaine (pH 3-10) a 50°C . Para determinar a estabilidade ao pH, a xilanase purificada foi incubada nos diferentes valores de pH (3-10) a 4°C por 24 horas e a atividade residual da proteína foi verificada conforme protocolo padrão. Para determinar a temperatura ótima, a enzima, já em seu pH ótimo, foi submetida ao ensaio padrão alterando a faixa de temperatura de 30 a 80°C . A termoestabilidade foi realizada pela incubação da enzima em seu pH ótimo, nas três melhores temperaturas encontradas por um período de 0 – 240 minutos, seguida por análise padrão de atividade enzimática. O pH e a temperatura ótimos e a termoestabilidade foram expressos como atividade relativa ao maior valor de atividade encontrado (100%).

Efeito de Diferentes Compostos na Atividade de XynA1

O efeito de diferentes compostos sobre o XynA1 de *C. crescentus* foi verificado com diluição da enzima em diferentes compostos a 2 mM, seguido de incubação por 15 minutos em gelo e posterior dosagem da atividade enzimática padrão na temperatura ótima. Os compostos testados foram sulfato de magnésio ($MgSO_4$), sulfato de cobre ($CuSO_4$), sulfato de zinco ($ZnSO_4$), sulfato de manganês ($MnSO_4$), sulfato ferroso ($FeSO_4$), cloreto de cálcio ($CaCl_2$), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de Potássio (KCl), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ditiotritol (DDT) e β -mercaptoetanol. Os resultados foram expressos como atividade residual comparados com a dosagem da amostra controle na ausência de compostos.

Determinação dos Parâmetros Cinéticos para XynA1 de C. crescentus

Para verificar o efeito da concentração do substrato na atividade de XynA1, diferentes concentrações de xilano de *beechwood* ($4 - 14 \text{ mg mL}^{-1}$) foram adicionadas à mistura de reação e os ensaios enzimáticos de atividade xilanásica na condição otimizada foram realizados de acordo com o método descrito por Miller [12]. Os parâmetros cinéticos como constante de Michaelis-Menten (K_M) e a velocidade máxima de reação ($V_{M\acute{a}x}$) foram mensurados conforme plotagem de dados e verificação da equação linear duplo-recíproco.

Análises Estatísticas

Os experimentos foram realizados em triplicatas, com repetições para os dados inconsistentes. O programa estatístico Origin[®] graph 8.5 (*Data Analysis and Technical Graph*) foi utilizado para o estudo estatístico dos dados através da análise da dispersão das médias e também para a plotagem dos gráficos.

Análise Comparativa da Xilanase de C. crescentus com de Outras Bactérias

A análise da sequência da xilanase predita a partir do gene *xynA1* de *C. crescentus* depositado no GenBank foi realizada utilizando o algoritmo NCBI BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e Blastx programa. O ponto isoelétrico e o tamanho molecular da proteína foram determinados de acordo Kozlowski [13]. A sequência de XynA1 e outras xilanases bacterianas pertencem ao grupo GH10 de acordo com a classificação do banco de dados do CAZY (**C**arbohydrates-**A**ctive en**ZY**mes: <http://www.CAZY.org>). Uma árvore filogenética foi construída utilizando o método de *Bootstrap* pelo programa MEGA 6.06. Uma sequência de uma xilanase bacteriana do grupo GH11 foi utilizada como *outgroup* para análises de parentesco.

Resultados e Discussão

Efeito de Substratos na Produção de Xilanase

Células de *C. crescentus* foram crescidas em meio mínimo contendo 0,2% de glicose e suplementado com diferentes substratos. Células de *C. crescentus* exibiram clara preferência pelos derivados de milho para indução da atividade de xilanases de modo geral (Figura 1). A produção de xilanase intracelular foi maior com a palha de milho hidrolisada (PMH), seguida pelo sabugo de milho com 1,40 e 1,39 U mL⁻¹, respectivamente. Os demais resíduos levaram a uma produção menor que 1 U mL⁻¹ sendo a fibra do fruto de maracujá o resíduo com menor capacidade indutora para a produção de xilanase intracelular. A xilanase extracelular teve produção interessante com a indução pela PMH (5,60 U mL⁻¹), seguida da palha de milho bruta (3,53 U mL⁻¹) e depois fibra do fruto de maracujá (1,87 U mL⁻¹).

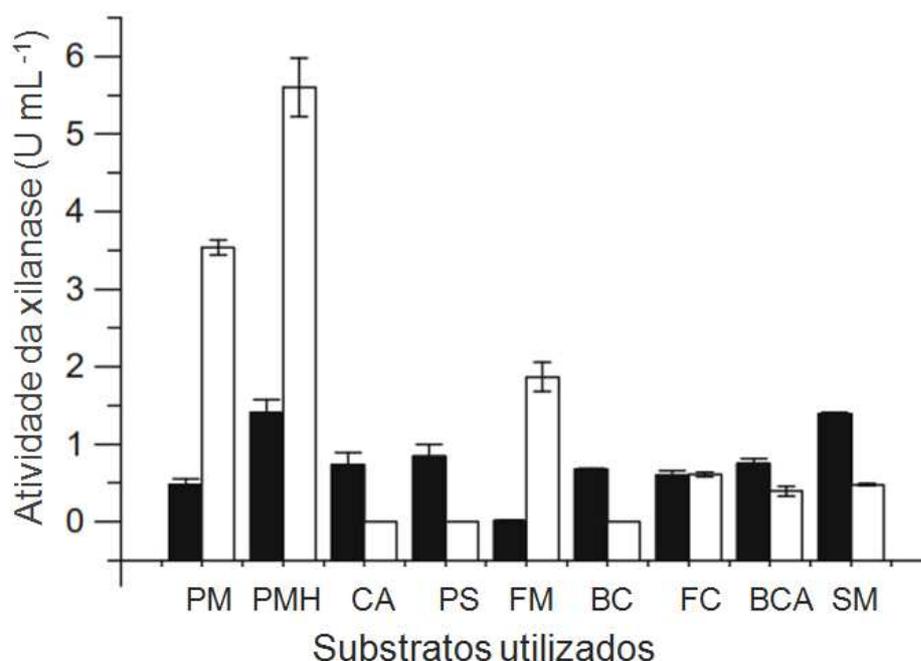


Figura 1 Efeito de vários substratos na produção de xilanase por *C. crescentus*: (barras pretas): xilanase intracelular e (barras brancas): xilanase extracelular. Substratos: (PM) palha de milho, (PMH) palha de milho hidrolisada, (CA) casca de arroz, (PS) palha de soja, (FM) fibra do fruto de maracujá, (BC) bagaço de cevada, (FC) fibra de coco, (BCA) bagaço de cana-de-açúcar, (SM) sabugo de milho. O meio de fermentação foi composto por 2% de resíduos agroindustriais (p/v) em meio mínimo M2 contendo glicose (0,2%). O inóculo foi obtido pela diluição das células em fase estacionária para densidade ótica a 600 nm igual a 0,15 nos meios de cultivo. O crescimento bacteriano ocorreu a 30 °C durante 24 horas sob agitação de 120 rpm.

A utilização de fontes alternativas para a produção de xilanase, como os resíduos agrícolas, tem sido objeto de várias pesquisas, visto que são substratos de baixo custo, de fácil acesso e rentáveis. O xilano puro, devido ao seu elevado custo, não é acessível para a produção de xilanase em escala industrial [4]. Exemplos de aplicação de resíduos para produção de xilanase por bactérias são: *Bacillus altitudinis* DHN8 com produção de xilanase induzida por palha de sorgo, palha de trigo, palha de arroz e palha de milho [14].

A cepa *Geobacillus stearothermophilus* KIBGE-IB29 apresentou produção de xilanase induzida por casca de laranja, cevada, sagu e também por farelo de trigo [17]. Xilanase de *Streptomyces* sp. CS428 foi induzida por sabugo de milho e farelo de trigo [16]. Poorna e Prema [18] mostraram que a produção de xilanase por *Bacillus pumilus* pode ser induzida em meio contendo palha de arroz e flocos de soja. Quanto à indução da produção de xilanases por resíduos pré-tratados, o *Bacillus circulans* D1 mostrou produção de xilanase por bagaço de cana ($8,4 \text{ U mL}^{-1}$) e capim hidrolisados ($7,5 \text{ U mL}^{-1}$) [19]. Um resultado semelhante foi verificado no presente trabalho para xilanases de *C. crescentus* quando crescidas em palha de milho hidrolisada.

A maior produção de xilanase obtida no presente estudo foi com o crescimento da bactéria na presença da palha de milho hidrolisada. Uma hipótese para isto é o fato de que os resíduos agrícolas derivados do milho são mais ricos em hemicelulose e assim poderiam ativar mais efetivamente a produção de enzimas xilanólíticas. Em favor a essa hipótese, o trabalho de Corrêa et al. [9] verifica que o sabugo de milho é um excelente indutor para a atividade β -xilosidásica em *C. crescentus*. Segundo Adhyaru et al. [14], a indução de xilanases pode ser considerada um fenômeno complexo e o nível de resposta aos diferentes indutores varia de acordo com as cepas. O nosso estudo mostrou que a produção de xilanase de *C. crescentus* intracelular foi melhor na presença de sabugo de milho e a melhor produção de xilanase extracelular foi induzida com palha de milho. A hemicelulose de palha de milho mostrou ser efetiva para a produção de Xilanase intra e extracelular; entretanto, sua viabilidade deve ser ainda analisada em nível industrial.

A Clonagem do Gene xynA1 e Purificação da Enzima Recombinante

O fragmento do gene *xynA1* contendo 1.158 pb que codifica a enzima endo-1,4-beta-Xilanase de *C. crescentus* foi amplificado por PCR usando DNA genômico como molde com os primers *xynA1-EcoRI-Forw* e *xynA1-HindIII- rev*. O produto de PCR gerado foi ligado no vetor de clonagem pJET1.2/*blunt* e posteriormente subclonado dentro do quadro de leitura com uma cauda de histidina carboxi-terminal no vetor de expressão pBAD/gIIIa digerido com as enzimas de restrição *EcoRI/HindIII*. O recombinante pBAD/gIIIa-*xynA1* foi sequenciado e a proteína predita de 385 aminoácidos e 43 kDa obteve 100% de identidade com a codificada pelo gene de *C. crescentus* (CCNA_02894). O recombinante pBAD/gIIIa-*xynA1* foi incubado com 0,02% de arabinose (v/v) para expressão da xilanase recombinante e, subsequentemente, a enzima foi purificada. A expressão foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida.

As células de *E. coli* que super-expressaram o gene *xynA1* foram lisadas e a proteína recombinante foi purificada com colunas pré-empacotadas de níquel-Sepharose. Uma única banda de aproximadamente 50 kDa foi observada por SDS-PAGE (Fig. 2) e está

de acordo com o peso molecular previsto considerando-se os aminoácidos adicionais a partir da cauda carboxi-terminal com histidinas. A determinação da atividade enzimática da xilanase purificada de *C. crescentus* revelou atividade de $18,26 \text{ U mL}^{-1}$ e atividade específica de $2,22 \text{ mg L}^{-1}$ utilizando xilano de beechwood (1%) como substrato da reação. Para explorar as enzimas bacterianas para aplicações industriais, a superexpressão destas enzimas é desejável. Há vários relatos que descrevem a *E. coli* como hospedeiro para indução heteróloga, como exemplo pode-se citar a superexpressão das enzimas β -xilosidase I [7] e β -xilosidase II [8] de genes provenientes da *C. crescentus*.

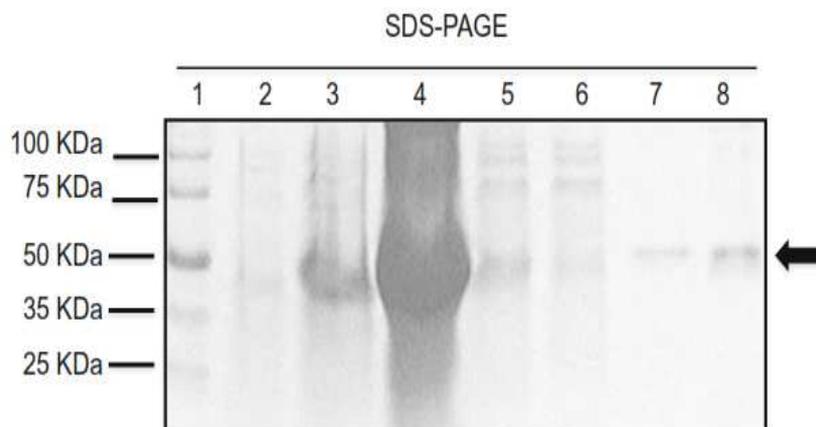


Figura 2 SDS-PAGE do lisado celular de *E. coli* LMG194 recombinante indica a superexpressão do gene heterólogo *xynA1* e a purificação da xilanase recombinante de *C. crescentus* (linhas): (1) marcador de peso molecular para proteína (Promega®); (2) proteínas totais extraídas da cepa LMG194; (3) proteínas totais da cepa LMG194 contendo a construção de pBAD/gIII A-*xynA1* após 4 horas de indução com 0,02% de arabinose (p/v) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$; (4) alíquota do sedimento após a lise das células; (5-6) solução tampão obtida após lavagem das colunas; (7-8) solução final das colunas de níquel-Sepharose com tampão contendo imidazol (500 mM) que mostra a xilanase purificada de aproximadamente 50 kDa.

O processo de clonagem e expressão do gene *xynA1* em *E. coli* representou aumento na atividade xilanásica ($18,6 \text{ U mL}^{-1}$) de aproximadamente 13 e 3 vezes se comparado com a produção pela cepa parental NA1000 de *C. crescentus* crescida em meio mínimo contendo 2% (p/v) de palha de milho hidrolisada (xilanase intracelular: $1,41 \text{ U mL}^{-1}$ e extracelular: $5,6 \text{ U mL}^{-1}$). Após purificação, a enzima foi bioquimicamente caracterizada para que a partir do conhecimento de suas propriedades possam ser feitos futuros estudos de aplicações biotecnológicas.

Caracterização Bioquímica da Xilanase de *C. crescentus*

O pH ótimo para a atividade de XynA1 foi determinado como pH 6 seguido por pH 7 (Fig. 3). No entanto, para a estabilidade ao pH, observou-se que, em pH 6, a enzima perde 50% da sua atividade em 24 horas. Isso não foi observado em pH 7, em que 60% da atividade manteve-se, indicando ser a melhor condição para manter a estabilidade da atividade enzimática.

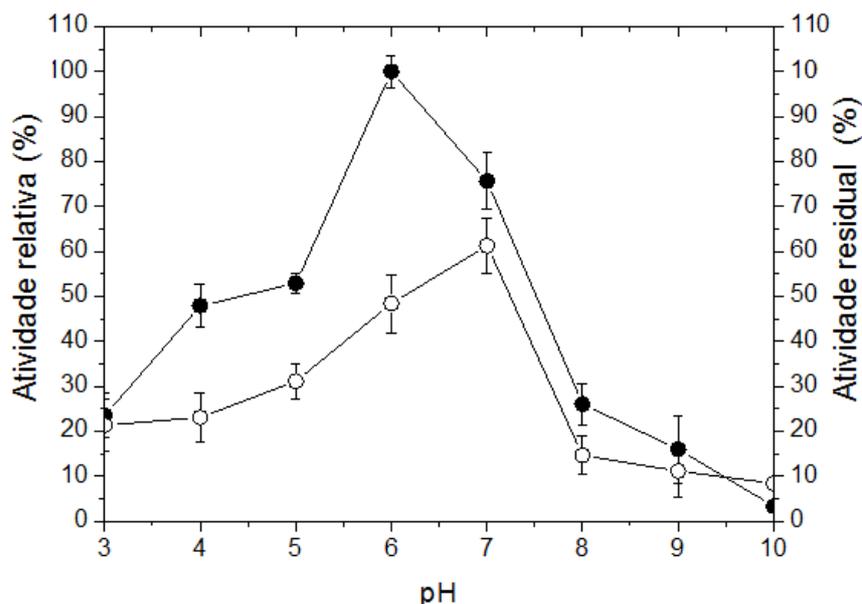


Figura 3 O efeito do pH sobre a atividade enzimática da xilanase recombinante (*círculos pretos*) e estabilidade a vários valores de pH (*círculos brancos*). A atividade xilanásica foi verificada por incubação da enzima purificada com xilano de beechwood em tampões em diferentes valores de pH (3-10) durante 10 min a 50 °C. Em paralelo, alíquotas da enzima purificada foram incubadas a 4 °C durante 24 horas, sob as mesmas condições de variação de pH; depois disso, a atividade da xilanase foi avaliada para verificar a sua estabilidade. A atividade enzimática foi expressa como uma porcentagem (atividade relativa) do valor máximo, em pH 6. A estabilidade a diferentes valores de pH foi expressa como a atividade residual do valor de atividade da enzima obtida no tempo zero de incubação.

Outras faixas testadas de pH apresentaram atividades mais baixas. Além disso, vale ressaltar que o ponto isoelétrico baseado na estrutura da proteína foi de 9 e a atividade nessa faixa foi basal porque a proteína se precipita em seu ponto isoelétrico. Outras xilanases bacterianas também já apresentaram o pH 6 como o mais eficiente: *Bacillus spp.* cepa SPS-O [15], *Streptomyces sp.* CS624 [16] e a bactéria extremófila *Caldicellulosiruptor kronotskyensis* [20]. Ainda, é possível verificar ampla faixa de pH para xilanases bacterianas, como a xilanase levemente ácida de *Bacillus sp.* BP-23 (pH 5,5) [21] até alcalinas como a de *Bacillus sp.* 41 M-1 (pH 9,0) [22].

A xilanase de *C. crescentus* demonstrou ser mais estável em pH neutro (7,0) sugerindo uma especificidade para tais condições de pH, ao contrário das outras xilanases que apresentam maior intervalo de estabilidade, como o da xilanase *C. kronotskyensis* em pH 5,5-7,5 [20]. A determinação do pH ótimo e da estabilidade ao pH de enzimas é muito importante para a biotecnologia enzimática porque indica as condições em que a enzima permanece ativa e com rendimento elevado. Além disso, estes dados contribuem para a formulação de coquetéis enzimáticos, nos quais o sinergismo das enzimas e o rendimento dependem das características de ação de cada uma. Tendo em conta esses fatores, a XynA1 de *C. crescentus* apresenta como atividade ideal condições que variam de neutras a levemente ácidas e essa enzima apresentou uma temperatura ótima a 50 °C (Fig. 4a). A

atividade da xilanase diminuiu cerca de 30 e 40%, a 55 e 60 °C, respectivamente. Quando testada a temperaturas extremas, 30 e 80 °C, a enzima mostrou atividade inferior a 30%. As bactérias com a mesma temperatura ótima para atividade xilanásica são *Cellulosimicrobium* sp. MTCC 10645 [23] e *Jonesia denitrificans* [24]. Ainda é possível comentar que existem xilanases com temperaturas extremas como a termófila de *Bacillus* spp. cepa SPS-0 [13], extremófila na *Thermotoga thermarum* (95 °C) [25] além da ativa em baixas temperaturas de *Flavobacterium johnsoniae* (30 °C) [26].

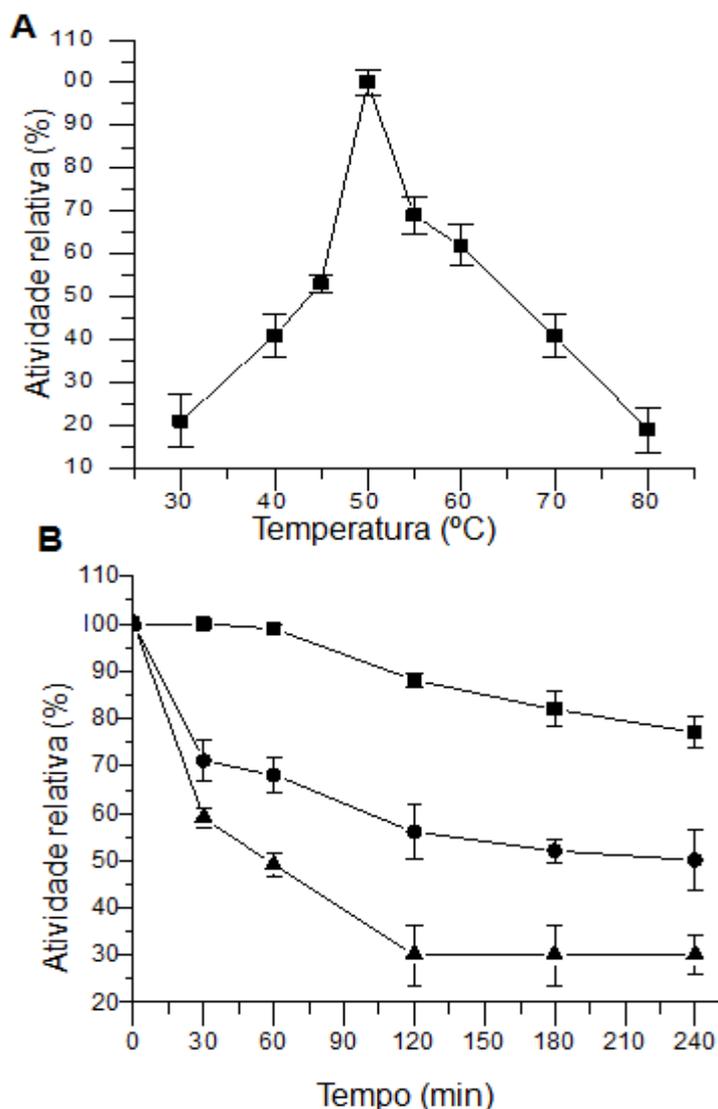


Figura 4 (a) Efeito da temperatura: a temperatura ótima foi verificada pela atividade padrão da enzima com pH 6 em diferentes temperaturas (30-80 °C). **(b)** Estabilidade térmica da XynA de *C. crescentus* realizada com incubação da enzima (0 a 240 min, pH 6,0) em três temperaturas: 45 °C (círculos pretos), 50 °C: (quadrados pretos) e 55 °C: (triângulos pretos). Após incubação, a atividade enzimática foi determinada segundo o método padrão. A temperatura ótima foi apresentada como a atividade relativa ao valor mais elevado e a estabilidade térmica foi apresentada como atividade residual (comparadas com a atividade no tempo zero de incubação).

Os ensaios de termoestabilidade (Fig. 4b) demonstraram que a atividade hidrolítica da enzima foi mantida por um período mais longo a 50 °C e perdeu apenas 20% de sua atividade em 4 horas de incubação. As outras temperaturas testadas para termoestabilidade, 45 e 55 °C, apresentaram queda de 50% da atividade em 4 e 1 hora,

respectivamente. Similarmente, as xilanases de *Bacillus subtilis* [27] e de *J. denitrificans* [24] também foram estáveis a 50 °C, mantendo 85% (3 h) e 70% (4 h) de suas atividades, respectivamente.

As características de pH, estabilidade ao pH, temperatura e termoestabilidade agregam importantes fatores para aplicação industrial de xilanases. De maneira semelhante à XynA1 de *C. crescentus*, a xilanase de *Bacillus* sp. cepa BP-23 apresenta características semelhantes de pH e temperatura ótimos (5,5 e 50 °C). Além disso, experimentos associados ao branqueamento químico da pasta de papel feito com a xilanase de *Bacillus* sp cepa BP-23 levaram a uma economia de 38% em comparação com o consumo de dióxido de cloro [21]. Esta é uma possível aplicação biotecnológica a ser testada para a proteína XynA1 de *C. crescentus*.

O Efeito de Compostos na Atividade da Xilanase

Em processos industriais, vários compostos podem estar presentes na solução em que se deseja utilizar enzimas que hidrolisem determinados substratos. Desse modo, é necessário saber se as enzimas utilizadas são afetadas de modo positivo (induzidas) ou negativo (inibidas) por componentes do meio. Para isso, pré-testes com compostos como agentes quelantes, metais e agentes redutores são necessários para indicar algumas características básicas sobre o funcionamento de enzimas. Assim, a xilanase purificada foi submetida a ensaios de atividade enzimática na presença de diferentes compostos a uma concentração de 2 mM sendo eles: ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA), β-mercaptoetanol, DTT e outros (Tabela 1). Como resultado, observou-se que a xilanase foi fortemente inibida pelos metais Cu^{2+} (61%) e Mg^{2+} (64%) e pelo agente quelante EDTA (60%). A inibição pelo metal cobre já foi verificada para a xilanase de *Paenibacillus campinasensis* BL11 (80%) [28] e *Bacillus mojavensis* FK-UEB [29] (100%).

A xilanase de *F. johnsoniae* apresentou 36% de inibição por magnésio [21] enquanto a xilanase de *Streptomyces* sp. CS624 mostrou inibição de 60% [16]. Uma justificativa para a inibição por metais pode ser devido à interação entre os íons metálicos e os aminoácidos do domínio catalítico da enzima [16]. A inibição da atividade da xilanase na presença de EDTA indica que algum metal é necessário para a reação enzimática e que, provavelmente, a enzima tenha resíduos de cisteína incluídos na sua área catalítica [16, 30]. Este efeito inibitório já foi constatado também para a xilanase de *Streptomyces* sp. CS624 (65%) [16] e *P. campinasensis* BL11 (50%) [28].

Os íons Zn^{2+} (18%) e Fe^{2+} (24%) afetaram moderadamente a atividade nesses experimentos. Os agentes redutores β-mercaptoetanol (10%) e DTT (30%) e o íon Ca^{2+} (11%) induziram a atividade da enzima.

Tabela 1. Efeito de diferentes compostos sobre a atividade da xilanase A

| Substância (2 mM) | Atividade residual (%) ^a |
|-------------------|-------------------------------------|
| Controle | 100 |
| MgSO ₄ | 96 ± 1.05 |
| CuSO ₄ | 39 ± 5.24 |
| ZnSO ₄ | 82 ± 3.69 |
| MnSO ₄ | 100 ± 2.02 |
| FeSO ₄ | 76 ± 1.32 |
| MgCl ₂ | 46 ± 8.84 |
| CaCl ₂ | 111 ± 1.81 |
| NaCl | 99 ± 5.09 |
| KCl | 95 ± 1.06 |
| EDTA | 40 ± 5.05 |
| DDT | 129 ± 2.34 |
| β-mercaptoetanol | 110 ± 1.84 |

^a Os resultados foram expressos como a atividade residual de acordo com o valor obtido no controle como 100%

Segundo Mander e colaboradores [16], o β-mercaptoetanol tem sido entendido como intensificador da atividade xilanásica por algumas bactérias, cuja indução já foi relatada para a xilanase de *P. campinasensis* BL11 (58%) [28] e *Bacillus subtilis* [27]. Isso se justifica pelo poder que este agente redutor tem em neutralizar os efeitos oxidativos de ligações dissulfeto, provavelmente, a partir de resíduos de cisteína, por fornecer estabilização ou estimulação da enzima [28].

Chen et al. [26] também apresentaram a estimulação da atividade da xilanase na presença de DTT para *F. johnsoniae* (36%) e comentaram que isso representa o papel do grupamento tiol redutor na estabilidade/atividade da enzima. O íon Ca²⁺ pode influenciar a atividade enzimática por ser requerido pela enzima, de modo a causar mudanças na sua conformação ou até mesmo pela sua ligação em sítios ativos [30]. A estimulação por cálcio também foi relatada para a xilanase de *Streptomyces* sp. CS624 (27%) [16]. Os outros metais testados não afetaram a atividade da XynA1 de *C. crescentus*.

Parâmetros Cinéticos

Para que uma enzima possa ser industrialmente utilizada, seus parâmetros cinéticos devem ser adequados e, com isso, seu papel funcional pode ser determinado. A constante de Michaelis-Menten foi determinada usando várias concentrações de xilano de beechwood (4 – 14 mg mL⁻¹). Os valores de K_M e V_{Máx} foram 3,77 mg mL⁻¹ e 10,20 μM min⁻¹. Tais dados indicam que a enzima tem baixa afinidade e reduzida velocidade de reação ao xilano de beechwood. Xilanases com menor afinidade ao substrato também já foram relatadas, como *P. campinasensis* BL11 (K_M 6,78 mg mL⁻¹) [28] *Streptomyces* sp. CS624 (K_M 9,79 mg mL⁻¹) [16] e *Bacillus circulans* BL53 (K_M 9,9 mg mL⁻¹ e V_{max} 25,25 mmol min⁻¹) [31].

Semelhante a XynA1 de *C. crescentus*, tais dados cinéticos foram encontrados para a xilanase de *F. johnsoniae* com K_M 5 mg mL⁻¹ e V_{max} 13,23 μ mol mg⁻¹ min⁻¹ [26] que indicam que a afinidade para este substrato pode ser baixa para algumas xilanases bacterianas. Outra característica comum entre tais xilanases é que ambas as bactérias são encontradas em ambientes aquáticos e vivem em habitats de água doce oligotróficos. Os valores relatados são consistentes com os apresentados por Beg et al. [4] para xilanases microbianas.

Análise da Sequência de XynA1

A sequência predita para a proteína xilanase de *C. crescentus* a partir do gene *xynA1*, anotada como uma provável GH10 no GenBank [6], foi comparada com outras xilanases pertencentes ao mesmo grupo de glico-hidrolases, segundo o CAZY. Uma árvore filogenética foi montada utilizando a metodologia *Neighbor-Joining* e *bootstrap* pelo programa MEGA 6.06. Uma xilanase GH11 foi também utilizada para comparação e foi definida como grupo externo.

Na Figura 5, está a árvore filogenética para as xilanases de diferentes bactérias estudadas por abordagens múltiplas. As bactérias que apresentaram maior similaridade entre as proteínas analisadas foram as do próprio gênero *Caulobacter*.

Já era esperada elevada similaridade entre as cepas *C. crescentus* NA1000 e *C. crescentus* CB15, visto que a linhagem NA1000 é um mutante derivativo da CB15 [6]. A amostra com maior similaridade foi a AGU12220, o que denota uma proximidade evolutiva entre essa e *C. crescentus*. Foi possível observar ainda 90% de similaridade com um precursor de uma endo-1,4-beta-xylanase (GH10) de *Brevundimonas abyssalis*, isolada de sedimentos do chão de águas profundas no Japão. *B. abyssalis* pertence à família *Caulobacteraceae* da classe Alphaproteobacteria e está classificada entre os gêneros *Brevundimonas* e *Caulobacter* [32].

Entre as xilanases GH10 selecionadas aleatoriamente no CAZY, foi possível observar que a pertencente à bactéria *Sphingomonas sanxanigenens* DSM 19645 apresentou a maior similaridade (63%) com o produto do gene *xynA1* de *C. crescentus*, seguida da endo-1.4-beta-xylanase (GH10) da *Agrobacterium* sp. H13-3. Assim como *C. crescentus*, *S. sanxanigenens* e *Agrobacterium* são ambas Alpha-proteobactérias, o que justifica a similaridade das sequências de suas xilanases. Foi observado um menor grau de similaridade com a xilanase da bactéria *C. crescentus*, quando comparada com endo-xilanases GH10 de bactérias Gram-positivas como *Bacillus halodurans* e *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

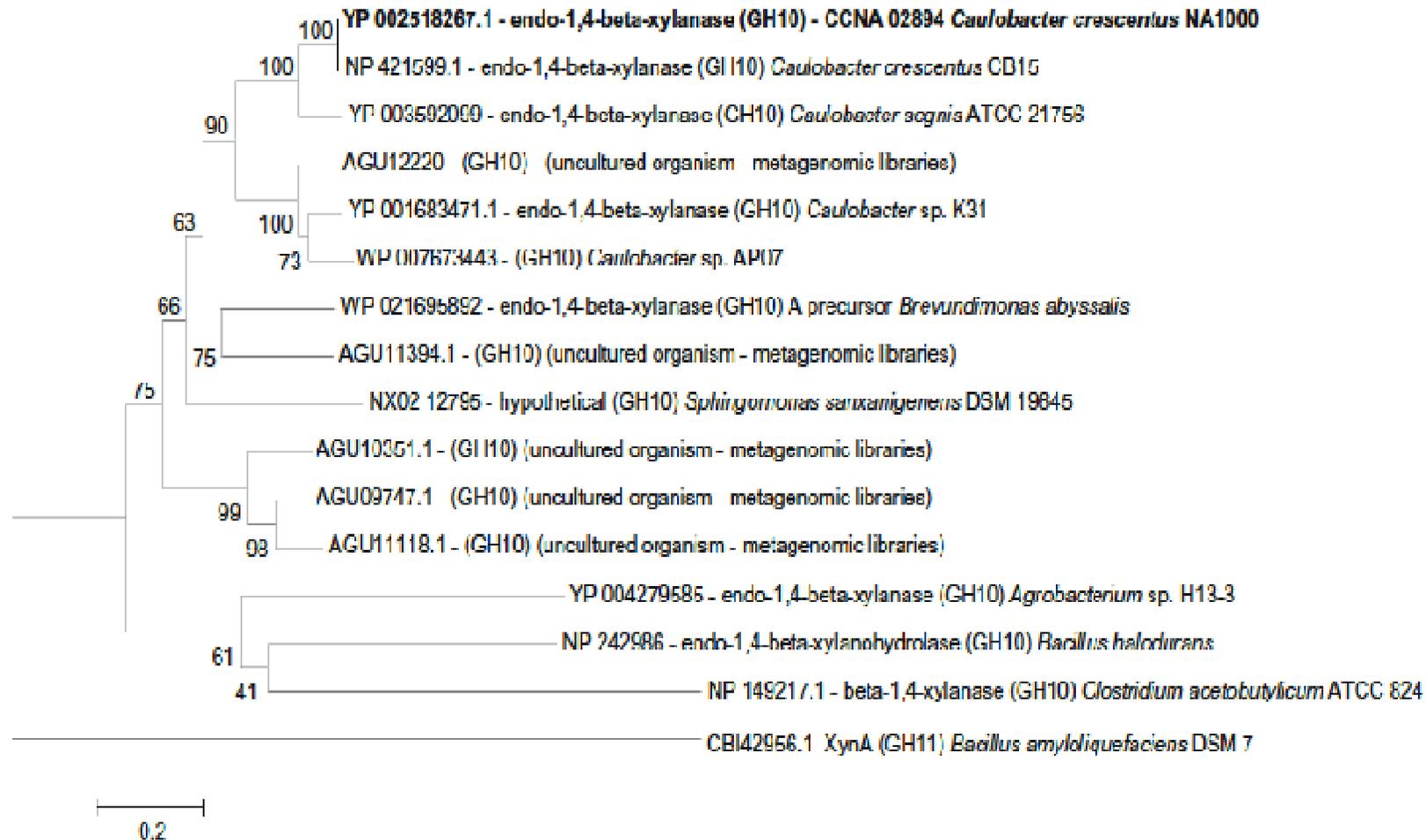


Figura 5 A análise filogenética foi realizada com auxílio do Programa MEGA 6.06. A árvore foi montada pelo método de *Neighbor-Joining* com a sequência completa de Xilanases do grupo GH10 de *C. crescentus* (*em destaque*) e de outras bactérias retiradas do CAZY. Uma Xilanase do grupo GH11 também foi utilizada como *outgroup* para a verificação de parentesco. A porcentagem de árvores idênticas, em que a taxa associada agrupada no teste de *bootstrap* (500 réplicas) é mostrada ao lado dos ramos. A árvore é desenhada à escala, com comprimentos dos ramos nas mesmas unidades como os das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas pelo método de correção de *Poisson* e estão em unidades do número de substituições de aminoácidos por sítio. A análise envolveu 16 sequências de aminoácidos. Todas as posições que continham lacunas e dados em falta foram eliminadas. Houve um total de 184 posições no conjunto de dados final.

Como esperado, foi observada uma baixa similaridade entre as xilanases GH10 comparadas e o *outgroup*, pertencente ao grupo da glicohidrolases 11 (GH11). A ausência de similaridade entre as proteínas de diferentes famílias (GHs) se deve a diversificações relacionadas com as sequências de aminoácidos, nas quais as famílias podem ser definidas com base nas semelhanças entre as sequências de aminoácidos em seus domínios catalíticos, visto que membros de uma mesma família podem compartilhar dobramentos estruturais comuns, topologia do sítio ativo e mecanismos catalíticos similares [33]. A organização de enzimas pelas suas similaridades retrata como os eventos evolutivos conduziram a uma ampla diversificação estrutural dos vários grupos. Assim, foram refletidas suas especificidades para diferentes substratos ou diferentes padrões catalíticos para grupos distantes. Ao contrário de enzimas que apresentam uma disposição semelhante em grupos, outras podem apresentar a conservação de resíduos de aminoácidos nos domínios catalíticos e nos padrões de catálise similares, muitas vezes até idênticos. Portanto, sugere-se que essas enzimas divergiram pouco durante o processo evolutivo e que surgiram a partir de um mesmo ancestral [30].

Conclusões

O presente estudo é o primeiro sobre clonagem, superexpressão e caracterização enzimática de uma xilanase de *C. crescentus*. Além disso, a cepa *C. crescentus* NA1000 foi capaz de sintetizar xilanases em resposta a diferentes compostos testados, entre eles os resíduos agroindustriais. A análise funcional do gene *xynA1* de *C. crescentus* por superexpressão em *E. coli* mostrou que a atividade da xilanase foi 13 vezes maior do que xilanase intracelular produzida pela cepa parental cultivada em meio mínimo contendo 2% (p/v) de palha de milho hidrolisada. A caracterização bioquímica da XynA1 recombinante resultou como condições ótimas o pH 6,0 e a temperatura de 50 °C. A estabilidade térmica foi mantida durante 4 horas a 50 °C, com apenas 20% de perda da atividade. Os agentes redutores β -mercaptoetanol, DTT e o íon Ca^{2+} induziram a atividade da enzima. Isso pode indicar que a mesma necessita desses compostos para se tornar mais estável. A análise da proteína predita codificada pelo gene *xynA1* demonstrou maior similaridade com outras xilanases da família GH10 da classe *Caulobacteraceae* de Alpha-proteobactérias.

Referências bibliográficas

1. Liu, T., Mcconkey, B., Huffman, T., Smith, S., Macgregor, B., Yemshanov, D., & Kulshreshtha, S. (2014). Potential and impacts of renewable energy production from agricultural biomass in Canada. *Applied Energy*, 130, 222–229.
2. Peng, P., & She, D. (2014). Isolation, structural characterization, and potential applications of hemicelluloses from bamboo: A review. *Carbohydrate Polymers*, 112, 701–720.
3. Ojeda, K., El-Halwagi, M., Kafarov (2013) V. Chapter 12: Design of a lignocellulosic feedstock biorefinery based on a biochemical processing platform using process integration methodologies and energy analysis. In: *Integrated biorefineries: design, analysis, and optimization*, Stuart, P. R.; El-Halwagi, M. M. CRC Press, p.370-391.
4. Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 326–338.
5. Zhong, C., Lau, M. W., Balan, V., Dale, B. E., & Yuan, Y. J. (2009). Optimization of enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation from AFEX-treated rice straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84, 667–676.
6. Marks, M. E., Castro-Rojas, C. M., Teiling, C. D. U. L., Kapatral, V., Walunas, T. L., & Crosson, S. (2010). The genetics basis of laboratory adaptation in *Caulobacter crescentus*. *The Journal of Bacteriology*, 192, 3678–3688.
7. Graciano, L., Corrêa, J. M., Gandra, R. F., Seixas, F. A. V., Kadowaki, M. K., Sampaio, S. C., Silva, J. L., Osaku, C. A., & Simão, R. C. G. (2012). The cloning, expression, purification, characterization and modeled structure of *Caulobacter crescentus* β -xylosidase I. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 2879–2888.
8. Corrêa, J. M., Graciano, L., Abrahão, J., Loth, E. A., Gandra, R. F., Kadowaki, M. K., Henn, C., & Simão, R.C. G. (2012). Expression and characterization of a GH39 β -xylosidase II from *Caulobacter crescentus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168, 2218–2229.
9. Corrêa, J. M., Mingori, M. R., Gandra, R. F., Loth, E. A., Seixas, F. A., & Simão, R. C. G. (2014). Depletion of the xynB2 gene upregulates β -xylosidase expression in *C. crescentus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 1085–1097.
10. Ely, B. (1991). Genetics of *Caulobacter crescentus*. *Methods in Enzymology*, 204, 372–384.
11. Bradford M.M. (1982). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
12. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31, 426–428.
13. Kozlowski, L. P. (2013) Isoelectric point according different scales—isoelectric point calculator, available in: <http://isoelectric.ovh.org>
14. Adhyaru, D. N., Bhatt, N. S., & Modi, H. A. (2014). Enhanced production of cellulase-free, thermo-alkalisolvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8, its characterization

- and application in sorghum straw saccharification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3,182–190.
15. Bataillon, M., Cardinali, A.-P. N., Castillon, N., & Duchiron, F. (2000). Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. strain SPS-0. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 187–192.
 16. Mander, P., Choi, Y. E., Pradeep, G. C., Choi, Y. S., Hong, J. H., Cho, S. S., & Yoo, J. C. (2014). Biochemical characterization of xylanase produced from *Streptomyces* sp. CS624 using *anagro residue* substrate. *Process Biochemistry*, 49,451–456.
 17. Bibi, Z.; Ansari, A.; Zohra, R.R.; Aman, A.; Qader, S. U. (2014) Production Of Xylan Degrading Endo-1,4-B-Xylanase From Thermophilic *Geobacillus Stearothermophilus* Kibge-lb29. *Journal Of Radiation Research And Applied Sciences*, Doi: 10.1016/J.Jrras.2014.08.001.
 18. Poorna, C.A.; Prema, P. (2006). Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues, *Biochemical Engineering Journal*, 32, 106-112.
 19. Bocchini, D.A.; Oliveira, O.M.M.F.; Gomes, E.; Da Silva, R. (2005). Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 40, 3653-3659.
 20. Qiao, W., Tang, S., Mi, S., Jia, X., Peng, X., & Han, Y. (2014). Biochemical characterization of a novel thermostable GH11 xylanase with cbm6 domain from *Caldicelluloriruptor kronotskyensis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 107,8–16.
 21. Blanco, A., Vidal, T., Colom, J. F., & Pastor, F. I. (1995). Purification and properties of xylanase a from alkali-tolerant *Bacillus* sp. strain BP-23. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 4468–4470.
 22. Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Aono, R., & Horikoshi, K. (1993). Production of alkaline xylanase by a newly isolated alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9,221–224.
 23. Kamble, R. D., & And Jadhav, A. R. (2012). Production, purification and characterisation of alkali stable xylanase from *Cellulosimicrobium* sp. mtcc 10645. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 1790–1797.
 24. Nawel, B., Said, B., Estelle, C., Hakim, H., & Duchiron, F. (2011). Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. *Process Biochemistry*, 46, 519–525.
 25. Shi, H., Zhang, Y., Li, X., Huang, Y. J., Wang, L., Wang, Y., Ding, H., & Wang, F. (2013). A novel highly thermostable xylanase stimulated by Ca²⁺ from *Thermotoga thermarum*: Cloning, expression and characterization. *Biotechnology for Biofuels*, 6, 1–9.
 26. Chen, S., Kaufman, M. G., Miazgowicz, K. L., Bagdasarian, M., & Walker, E. D. (2013). Molecular characterization of a cold-active recombinant xylanase from *Flavobacterium johnsoniae* and its applicability in xylan hydrolysis. *Bioresource Technology*, 128, 145-155.
 27. Sá-Pereira, P., Mesquita, A., Duarte, J. C., Barros, M. R. A., & Costa-Ferreira, M. (2002). Rapid production of thermostable cellulase-free xylanase by a strain of *Bacillus subtilis* and its properties. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 924–933.

28. Ko, C. H., Tsai, C. H., Tu, J., Lee, H. I., Ku, L. T., Kuo, P. A., & Lai, Y. K. (2010). Molecular cloning and characterization of a novel thermostable xylanase from *Paenibacillus campinasensis* BI11. *Process Biochemistry*, 45, 1638–1644.
29. Kallel, F., Driss, D., Bouaziz, F., Neifer, M., Ghorbel, R., & Chaabouni, S. E. (2014). Production of xylooligosaccharides from garlic straw xylan by purified xylanase from *Bacillus mojavensis* UEB-FK and their in vitro evaluation as prebiotics. *Food and Bioproducts Processing*. doi:10.1016/j.fbp.2014.07.012.
30. Murugan, S., Arnold, D., Pongiya, U. D., & Narayanan, P. M. (2011). Production of xylanase from *Arthobacter* sp. MTCC6915 using saw dust as substrate under solid state fermentation. *Enzyme Research*, 1, 1–7.
31. Heck, J. X., Soares, L. H. B., Hertz, P. F., & Ayub, M. A. Z. (2006). Purification and properties of a xylanase produced by *Bacillus circulans* BI53 on solid-state cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, 32, 179-184.
32. Tsubouchi, T., Shimane, Y., Usui, K., Shimamura, S., Mori, K., Hiraki, T., Tame, A., Uematsu, K., Maruyama, T., & Hatada, Y. (2013). *Brevundimonas abyssalis* sp. nov., a dimorphic prosthecate bacterium isolated from deep-subsea floor sediment. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 63, 1987–1994.
33. Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J. P., Davies, G. (1995). Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 92, 7090-709

ARTIGO 2

DESENHO EXPERIMENTAL APLICADO À OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE UMA NOVA XILANASE DEGRADADORA DE BIOMASSA DE *Aspergillus fumigatus* Fresen.

Versão adaptada para a língua portuguesa com base no artigo submetido à publicação no periódico *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, ISSN: 1381-1177, (MOLCAB-D-15-00128) em 14/03/2015. Graciano et al. (2015). Experimental design applied to optimization of a novel biomass-degrading xylanase of *Aspergillus fumigatus* Fresen.

1. Introdução

A necessidade da elevada produção de alimentos e o aumento no consumo de energia têm se expandido de modo acentuado nas últimas décadas. Em escala paralela ao crescimento econômico mundial, nota-se o esgotamento dos recursos energéticos além do aumento de prejuízos ambientais. Um dos fatores que contribui para a poluição ambiental é a elevada produção de resíduos cujo tratamento e cuja disposição final têm sido feitos de forma irregular. Assim, há a necessidade da aplicação de estratégias que minimizem impactos ambientais a partir de processos que otimizem o aproveitamento de resíduos da agroindústria e agreguem valor às cadeias produtivas. Neste contexto, ressaltam-se iniciativas que levem à busca contínua pela preservação dos recursos naturais e do meio ambiente usando diferentes tecnologias modernas, práticas baratas e eficientes [1].

O acúmulo de grande quantidade de biomassa vegetal no Brasil tem-se destacado como grande potencial para a produção de bioenergia. O País apresenta extensas dimensões de áreas cultiváveis com solos e condições climáticas adequadas e a biomassa é normalmente formada por resíduos de colheita ou do beneficiamento das principais culturas agrícolas tais como: cana-de-açúcar, arroz, milho, trigo, soja, as quais são muitas vezes subutilizadas pela indústria. Os resíduos agroindustriais são constituídos em grande parte por lignocelulose, que corresponde à biomassa mais abundante e renovável disponível no Planeta, e é composta por celulose (45-55%), hemicelulose (25-35%) e a lignina (20-30%) [2].

O xilano é o principal componente estrutural da hemicelulose e contém unidades de xilose ligadas principalmente por ligações β -1,4. Ele corresponde ao segundo biopolímero mais abundante na hemicelulose após a celulose e tem um grau de ramificação molecular variável dependendo de sua fonte de origem [3,4].

Para que ocorra a hidrólise do xilano, é necessária a ação de diferentes tipos de enzimas, cujas principais são: xilanases, que hidrolisam o xilano em moléculas menores, os xilo-

oligômeros, e as β -xilosidases, que hidrolisam os xilooligossacarídeos até monossacarídeos de xilose [5, 7]. As xilanases são enzimas com grande aplicabilidade industrial como em alimentos [8], processos têxteis [9], em indústrias de papel e celulose [10], na sacarificação de materiais lignocelulósicos [11], em silagens agrícolas e rações de aves [12]. A utilização das xilanases e de seus produtos de hidrólise também tem se destacado, uma vez que os xilooligossacarídeos produzidos podem ser considerados alimentos funcionais, ou seja, aqueles que auxiliam ou modulam o bom funcionamento do organismo, de modo a promover a saúde [13]. Em geral, a utilização de xilanases pode melhorar o processamento de materiais lignocelulósicos para a geração de combustíveis líquidos e produtos químicos [12].

Dentre os microrganismos produtores de xilanase, do ponto de vista industrial, os fungos filamentosos são os melhores produtores, visto que esses microrganismos produzem elevadas quantidades de enzimas extracelulares [14, 15]. Dentre os fungos de maior interesse para a produção de xilanases, destacam-se os representantes do gênero *Aspergillus* [16]. O *Aspergillus fumigatus* Fresen (OI-1R-1T), estudado no presente trabalho, foi isolado de uma reserva ambiental contendo um fragmento do Bioma da Mata Atlântica remanescente. Cabe destacar que este bioma conta atualmente com menos de 10% de sua área original [17] e representa um dos cinco principais “hotspots” do Planeta [18]. É uma mata com elevada biodiversidade e elevado nível de endemismo, embora sofra pressão antrópica em função da extensa área cultivável que a rodeia. Apesar disto, a Mata Atlântica brasileira apresenta elevada biodiversidade de microrganismos ainda pouco explorada, ressaltando-se assim a relevância da prospecção de novas espécies ou isolados.

Visando melhorar a produção enzimática por fungos, a otimização de meios de cultura é uma via interessante para alcançar elevados níveis de produção. A otimização de culturas por métodos tradicionais de “um fator em um tempo” requer maiores esforços em questão de tempo, trabalho e recursos. Desse modo, técnicas de delineamento experimental auxiliam a formulação de modelos estatísticos de otimização que envolvam um número mínimo de experimentos para um grande número de variáveis [5, 20].

Deste modo, no presente trabalho, foi usado o delineamento experimental para a otimização da produção da xilanase de *A. fumigatus* Fresen isolado de Bioma de Mata Atlântica. O principal resíduo usado foi a palha de milho e as estratégias estatísticas empregadas foram o Planejamento Plackett-Burmann e o Delineamento Composto Central Rotacional. Visando à aplicabilidade industrial, a termoestabilidade foi determinada e experimentos de hidrólise enzimática também foram conduzidos para avaliar a capacidade de degradação da biomassa vegetal com a formação de açúcares redutores aproveitáveis em processos biotecnológicos diversos.

2. Experimentos

2.1 Microrganismo e meio de cultura

Os experimentos foram realizados com a cepa *Aspergillus fumigatus* Fresen (OI-1R-1T) - um isolado de raízes de plantas em decomposição do Refúgio Biológico Bela Vista Itaipu (Foz do Iguaçu – Paraná –Brasil) (latitude 24°55'16"S e longitude 53°54'35"W), o qual é uma reserva ambiental contendo fragmento do Bioma da Mata Atlântica remanescente.

A coleta e o isolamento do microrganismo foram autorizados pela Itaipu Binacional e realizados por alunos e professores do laboratório de bioquímica de microrganismos. O fungo isolado foi identificado por análises morfológicas na Universidade Federal de Pernambuco. A identificação molecular foi realizada por análise da região ITS para confirmar a identidade dessa espécie. A preservação e a esporulação da cepa foram feitas em meio nutriente ágar-batata-dextrose (BDA) contendo 1,5% glicose (p/v), 2% Agar (p/v), 20% de caldo de batata e água destilada (19). O meio foi esterilizado por autoclave durante 30 minutos. Os tubos de ensaio inoculados com ágar inclinado foram incubados a 42 °C durante sete dias e armazenados a 4 °C por até 30 dias. O isolado OI-1R-1T de *A. fumigatus* Fresen. foi registrado e armazenado na micoteca do laboratório de Bioquímica da UNIOESTE (Cascavel, PR).

2.2 Preparação do inóculo e produção de xilanase

Para a preparação do inóculo, foram utilizados tubos contendo o fungo em fase reprodutiva por suspensão dos conídeos com 10 mL de água destilada seguido de homogeneização da solução em frasco Erlenmeyer de 250 mL. O inóculo para os experimentos foi de 1 mL (1×10^5 conídios mL⁻¹) por frasco. Todos os ensaios para a produção de xilanase foram realizados em frascos de 125 mL contendo 25 mL de meio mineral Czapeck (modificado) na seguinte composição padrão (p/v): 0,3% de NaNO₃, 0,1% de KH₂PO₄, 0,05% de MgSO₄.7 H₂O, 0,5% de KCl, 0,00 1% de FeSO₄. 7 H₂O, 0,1% de extrato de levedura e 1% de palha de milho em pH 6,0. Os experimentos de otimização envolveram a análise deste meio de cultura por meio de planejamento experimental. Os cultivos foram incubados em estufa a 42 °C durante três dias. A palha de milho (folhas da espiga) utilizada foi obtida de produtores rurais da região Oeste do Paraná e foi preparada conforme Corrêa et al. [21]. Os meios de cultivo antes de serem inoculados foram esterilizados a 121 °C durante 30 minutos em autoclave.

2.3 Dosagem de atividade

Após a incubação para crescimento fúngico e para produção de enzimas, os cultivos foram submetidos à filtração a vácuo com papel filtro Whatman. Os extratos líquidos foram

congelados para posterior dosagem de atividade. A dosagem de atividade da xilanase foi verificada pelo método de mensuração dos açúcares redutores por DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Sigma®) [22]. Uma unidade (U) de atividade de xilanase foi definida como quantidade em μmoles de xilose produzida por 1 U de enzima em um minuto nas condições de ensaio (U mL^{-1}). O substrato utilizado foi xilano de beechwood (Sigma) em tampão fosfato de sódio em pH 7,0 a 60 °C, definido em experimentos prévios como as melhores condições para a atividade xilanásica.

2.4 Planejamento experimental

2.4.1 Seleção de componentes do meio de cultivo pelo Planejamento Plackett-Burmann (PBD)

A partir do meio padrão do meio mineral Czapeck modificado, oito variáveis independentes foram estudadas em 16 experimentos, incluindo NaNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, extrato de levedura, palha de milho e pH. Cada variável foi representada em dois níveis, indicados por (+1) e (-1) (Tabela 2). Quatro repetições nos pontos centrais (0) foram adicionadas para verificar a reprodutibilidade do ensaio. Os resultados foram analisados pelo software Statistica versão 8 e as variáveis, as quais apresentaram $p < 0,05$ no gráfico de Pareto foram consideradas ideais por influenciarem de forma significativa a produção de xilanase.

2.4.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

O Delineamento Composto Central Rotacional foi empregado para otimizar a produção de xilanase a partir de fatores previamente selecionados pelo PBD. Os fatores significativos foram NaNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e palha de milho (Tabela 1).

Tabela 1 Níveis utilizados no DCCR para os quatro fatores estudados

| Fatores | -2 | -1 | 0 | +1 | +2 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| NaNO_3 (g) | 0 | 0,15 | 0,3 | 0,45 | 0,6 |
| KH_2PO_4 (g) | 0 | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g) | 0 | 0,025 | 0,05 | 0,075 | 0,1 |
| Palha de milho (g) | 0,125 | 0,250 | 0,375 | 0,5 | 0,625 |

Assim, o DCCR foi construído com quatro fatores e dois níveis, incluindo quatro repetições nos pontos centrais e oito nos pontos axiais. Os compostos que não tiveram influência elevada para a produção de xilanase foram determinados e fixados: pH 6 e extrato de levedura 0,1%. KCl e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ foram retirados do meio de cultivo. Os resultados foram analisados pelo software Statistica versão 8 e foram calculados os efeitos principais das

variáveis e suas interações e a Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 5%.

2.4.3 Validação do modelo para otimização da produção de xilanase

Verificado o conjunto das variáveis que apresentaram maior influência para a produção de xilanase, o programa gerou um modelo matemático que permitiu ajuste ótimo dos fatores testados que minimiza a função de perda quadrática multivariada. A análise dos dados permitiu determinar os coeficientes significativos e ajustar ao modelo de segunda ordem (Eq. 1).

$$\hat{X} = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i,j=1}^4 b_{ij} X_i X_j \quad (\text{Eq. 1})$$

Para a confirmação da produção predita, gerada pela análise da equação, seis ensaios padronizados com as concentrações ótimas definidas pelo planejamento experimental foram conduzidos. A equação apresenta a resposta predita para as variáveis em que X significa a atividade da xilanase. Os coeficientes de regressão foram verificados em nível de significância pelo teste t-student's e os dados experimentais foram analisados utilizando o Software Statistica 8. Os coeficientes significativos representados por b_0 , b_i , b_{ii} , b_{ij} são os coeficientes da regressão do modelo, e X_i e X_j são as variáveis independentes em valores codificados.

2.5 Variação da concentração do substrato

Após a verificação dos dados otimizados e confirmação do modelo estatístico para otimização do meio de cultura para a produção de xilanase, um novo experimento foi executado, visto que na análise dos gráficos de superfície de resposta gerados pelo programa houve a tendência para se aumentar a atividade enzimática com o aumento da concentração do substrato (palha de milho). Deste modo, nove faixas novas de resíduos de 2,5 – 7 % foram testadas em triplicata. A faixa de teste do ensaio de confirmação do modelo foi considerada como a inicial.

2.6 Ensaio da termoestabilidade enzimática

A termoestabilidade foi realizada com a incubação do extrato enzimático bruto em pH 6 e em diferentes temperaturas 50 – 70 °C por um período de 10 minutos a 6 horas. As amostras, após o período de incubação, foram congeladas para dosagem posterior a fim de

verificar a atividade xilanásica, conforme já descrito. Os resultados foram expressos como atividade relativa ao maior valor de atividade encontrado (100%).

2.7 Ensaio de hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada com a incubação do extrato enzimático bruto com três compostos: palha de milho bruta, palha de milho hidrolisada e xilano de beechwood (Sigma®). Para isso, foram preparados frascos Erlenmeyers em duplicata contendo 1% de cada composto em 20 mL de tampão fosfato de sódio (pH 6). A hidrólise foi verificada pela incubação de 2 U mL⁻¹ de xilanase presentes no extrato bruto ao meio e incubação por um período de 1 – 96 horas em estufa a 50 °C. Alíquotas de 1 mL da mistura de incubação foram retiradas nos intervalos determinados e congeladas para dosagens posteriores incluindo a análise da quantidade de açúcares redutores totais produzidos.

A palha de milho foi preparada conforme descrito por Corrêa et al [21]. A palha de milho hidrolisada foi preparada por auto-hidrólise, no qual 1 grama de palha de milho foi adicionado em um tubo com 10 mL de água e submetida ao aquecimento a 200 °C em tubo digestor durante uma hora. Após esse período, o tubo foi transferido imediatamente para um banho de gelo e aguardado seu resfriamento. A fase líquida foi filtrada em papel filtro e a hemicelulose diluída presente na solução foi precipitada por adição de três volumes de etanol absoluto (20° C durante 24 horas). Após esse período, a fração líquida foi retirada com cuidado por inversão e o precipitado foi então seco em estufa a 50 °C por 24 horas. Os meios de cultura contendo os diferentes compostos foram esterilizados a 121 °C durante 30 minutos em autoclave e o extrato enzimático bruto foi esterilizado por filtração a vácuo com membrana de 0,22 µm (*Corning*) para evitar o crescimento de microrganismos durante os ensaios de hidrólise.

3. Resultados e Discussão

3.1 Planejamento experimental

3.1.1 Planejamento Plackett-Burmann

Na Tabela 2, estão os valores codificados e reais das variáveis utilizadas em cada nível e a matriz do planejamento para seleção de componentes do meio de cultivo a partir do Planejamento Plackett-Burmann (PBD). Como resposta para a produção de xilanase pelo fungo *A. fumigatus* Fresen. (OI1R-T), observou-se uma variação da produção dessa enzima de 3,1 a 45,8 U mL⁻¹. A análise padrão de variância (ANOVA) calculada a partir de resultados dos ensaios experimentais para a produção da xilanase indicou um R² de 0,95 e os dados sobre os componentes que apresentaram significância no nível de p < 0,05 para a produção estão apresentados por meio do gráfico de Pareto (Fig. 1).

A análise do gráfico de Pareto (Fig. 1) permitiu verificar que para a produção de xilanase de *A. fumigatus* Fresen, somente os fatores KCl e pH foram insignificantes, uma vez que influenciaram para a diminuição nos níveis de 1,97 e 3,74 U mL⁻¹ na produção da enzima, respectivamente.

Tabela 2 Planejamento Plackett-Burman (16 ensaios) para seleção de variáveis do meio de cultivo para a produção de xilanase por *Aspergillus fumigatus* Fresen. (OI1R-T)

| Variáveis codificadas e reais | | | | | | | | | |
|-------------------------------|--------------------------------|--|---|------------------|--|------------------------|------------------|----------|-----------------------------------|
| Ensaios | X1 NaNO ₃ (g) | X2 KH ₂ PO ₄ (g) | X3 MgSO ₄ .7H ₂ O (g) | X4 KCl (g) | X5 Fe ₂ (SO ₄) ₃ (g) | X6 Ext. Lev. (g) | X7 PM* (%) | X8 pH | Xilanase (U mL ⁻¹) |
| 1 | 1 (0,3) | -1 (0) | 1 (0,05) | -1 (0) | -1 (0) | -1 (0,05) | 1 (1,5) | 1 (8) | 45,8 |
| 2 | 1 (0,3) | 1 (0,1) | -1 (0) | 1 (0,05) | -1 (0) | -1 (0,05) | -1 (0,5) | 1 (8) | 28,2 |
| 3 | -1 (0) | 1 (0,1) | 1 (0,05) | -1 (0) | 1 (0,001) | -1 (0,05) | -1 (0,5) | -1 (6) | 9,2 |
| 4 | 1 (0,3) | -1 (0) | 1 (0,05) | 1 (0,05) | -1 (0) | 1 (0,15) | -1 (0,5) | -1 (6) | 35,7 |
| 5 | 1 (0,3) | 1 (0,1) | -1 (0) | 1 (0,05) | 0,001 | -1 (0,05) | 1 (1,5) | -1 (6) | 25,2 |
| 6 | 1 (0,3) | 1 (0,1) | 1 (0,05) | -1 (0) | 1 (0,001) | 1 (0,15) | -1 (0,5) | 1 (8) | 39,3 |
| 7 | -1 (0) | 1 (0,1) | 1 (0,05) | 1 (0,05) | -1 (0) | 1 (0,15) | 1 (1,5) | -1 (6) | 15,3 |
| 8 | -1 (0) | -1 (0) | 1 (0,05) | 1 (0,05) | 1 (0,001) | -1 (0,05) | 1 (1,5) | 1 (8) | 3,1 |
| 9 | -1 (0) | -1 (0) | -1 (0) | 1 (0,05) | 1 (0,001) | 1 (0,15) | -1 (0,5) | 1 (8) | 10,8 |
| 10 | 1 (0,3) | -1 (0) | -1 (0) | -1 (0) | 1 (0,001) | 1 (0,15) | 1 (1,5) | -1 (6) | 16,0 |
| 11 | -1 (0) | 1 (0,1) | -1 (0) | -1 (0) | -1 (0) | 1 (0,15) | 1 (1,5) | 1 (8) | 7,4 |
| 12 | -1 (0) | -1 (0) | -1 (0) | -1 (0) | -1 (0) | -1 (0,05) | -1 (0,5) | -1 (6) | 2,9 |
| 13 | 0 (0,15) | 0 (0,05) | 0 (0,025) | 0 (0,025) | 0 (0,0005) | 0 (0,1) | 0 (1) | 0 (7) | 23,3 |
| 14 | 0 (0,15) | 0 (0,05) | 0 (0,025) | 0 (0,025) | 0 (0,0005) | 0 (0,1) | 0 (1) | 0 (7) | 23,0 |
| 15 | 0 (0,15) | 0 (0,05) | 0 (0,025) | 0 (0,025) | 0 (0,0005) | 0 (0,1) | 0 (1) | 0 (7) | 23,7 |
| 16 | 0 (0,15) | 0 (0,05) | 0 (0,025) | 0 (0,025) | 0 (0,0005) | 0 (0,1) | 0 (1) | 0 (7) | 19,7 |

*PM: Palha de milho

Desta forma, tais variáveis foram mantidas na menor concentração testada para os demais experimentos resultando na remoção total do KCl (-1: 0 g) e mantendo-se o pH em valor igual a 6 (-1). Os dados significantes que se destacaram foram o NaNO₃, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O e a palha de milho. Estes dados mostraram que tais componentes foram estatisticamente significativos para a produção de xilanase pelo fungo, sendo que, quanto maior a concentração, melhor foi a atividade enzimática. Em ordem de significância, o nitrato de sódio (NaNO₃) apresentou um efeito positivo de 74,83 U mL⁻¹ quando foi adicionado em maior quantidade, uma mudança de 0 g (-1) para 0,3 g (+1). Os demais componentes do meio com influência positiva na produção da xilanase foram: MgSO₄ 7 H₂O, KH₂PO₄ e a palha de milho com aumento na atividade da enzima para 50,12, 32,46 e 28,94 U mL⁻¹, respectivamente.

Com base nesses resultados, o delineamento experimental (DCCR) foi planejado com concentrações maiores do que as inicialmente testadas e indicadas na Tabela 1. Esse experimento ainda permitiu verificar que a variável Fe₂(SO₄)₃ demonstrou elevado poder de

inibição, indicando que o aumento de sua concentração no cultivo de 0g (-1) para 0,0005 g (+1) provocou drástica inibição na atividade xilanásica uma vez que observou-se queda de $43,67 \text{ U mL}^{-1}$ (Fig.1). Assim, este fator foi eliminado para experimentos posteriores. Finalmente, o fator extrato de levedura demonstrou-se significativo nas concentrações testadas. Entretanto, foi o item que apresentou menor efeito na produção enzimática e com base nisso, optou-se por fixar essa variável no valor do ponto central testado (0,1 g). Após a verificação dos graus de significância e dos fatores mais importantes que determinaram a elevação da produção da xilanase pelo fungo *A. fumigatus* Fresen. (OI1R-T), foram selecionadas quatro variáveis: NaNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e a palha de milho para ensaios posteriores.

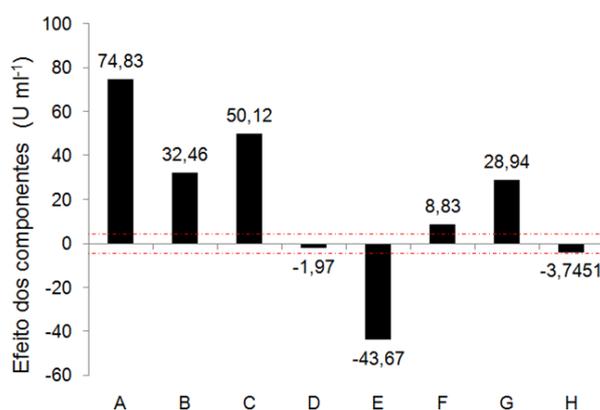


Figura 1 Gráfico de Pareto para o efeito de cada fator na atividade de xilanase do fungo *A. fumigatus* Fresen (OI1R-T) com Planejamento Fatorial Plackett-Burman: (A) NaNO_3 , (B) KH_2PO_4 , (C) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (D) KCl, (E) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (F) Extrato de levedura, (G) Palha de milho, (H) pH. Nível de significância 5%.

A otimização por PBD para xilanase para *Thermomyces lanuginosus* SDYKY-1 [20] mostrou também como dados significativos (5% de significância) entre outros: o KH_2PO_4 , o resíduo testado (sabugo de milho) e o FeSO_4 [20]. Entretanto, ao contrário do que foi verificado neste trabalho, o KH_2PO_4 teve influência negativa para *T. lanuginosus* (-120,67), o FeSO_4 teve influência positiva e o $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mostrou-se insignificante. O sabugo de milho também foi um fator positivo para a atividade xilanásica, mas o pH não foi significativo. Em outro trabalho com PBD, o processo de otimização da produção de xilanase pelo fungo *Aspergillus fumigatus* ABK9, por meio de fermentação em estado sólido (SSF), apresentou como variáveis significativas o pH, a razão substrato (farelo de trigo: palha de arroz pré-tratados) e a quantidade de substrato (g mL^{-1}) [23].

Tais dados apontam que a produção enzimática por diferentes tipos de fungos podem apresentar grandes variações quanto à composição do meio. Entretanto, é possível também verificar que o uso de resíduos é vantajoso, visto que a palha de milho, por exemplo, é um recurso disponível e é uma das biomassas agrícolas mais abundantes nos continentes americanos, representando uma aplicação de economia de fonte de carbono. A seleção de substratos e meios de cultivos adequados para síntese de enzimas-alvo

representa uma medida fundamental para o desenvolvimento eficiente da Biotecnologia, visto que, uma das estratégias da engenharia metabólica, a otimização de processos visa: aumentar a produtividade, reduzir os custos, aumentar a eficiência e usar matérias-primas renováveis para fornecer um processo ambientalmente mais viável do que as abordagens químicas convencionais [24].

3.1.2 Otimização por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Os resultados do dimensionamento Plackett-Burman foram utilizados para um planejamento experimental 2^4 para a otimização da produção de xilanase pelo *A. fumigatus* Fresen. (OI1R-T) utilizando a metodologia DCCR. Para a determinação dos níveis ótimos para produção enzimática, quatro fatores selecionados como significativos foram usados em diferentes faixas conforme a Tabela 1: são eles (-2, 1, 0, 1 e +2). A Tabela 3 apresenta o delineamento experimental que indica os valores codificados e reais usados em cada nível das variáveis juntamente com a resposta experimental para a atividade xilanásica (U mL^{-1}). A variação da produção desta enzima de 120 a 430 U mL^{-1} foi observada e indica importante aumento na produção enzimática em comparação com o planejamento Plackett-Burman.

A análise de variância (ANOVA) para variável dependente é apresentada na Tabela 4, cujo coeficiente de regressão foi verificado em nível de significância (5%), assim indicado pelo valor de F calculado (8,24) maior que o F tabelado (2,66). Deste modo, o F calculado da regressão maior que o F tabelado demonstrou que o modelo quadrático selecionado foi significativo para o experimento realizado.

O R^2 de 0,70 (Tabela 4) é justificado pelo fato do planejamento experimental conduzido neste trabalho resultar em dados de quatro dimensões. Em dados estatísticos o R^2 normalmente apresenta dados de duas dimensões; entretanto, ao serem analisados os dados de quatro dimensões, dois dados além dos dados de R^2 podem ficar fora de ajuste. Isso faz com que os dados fiquem discrepantes e exista a maior diferença entre eles. Apesar disso, planejamentos estatísticos não são avaliados apenas pelo R^2 . É possível inferir a validade do experimento pela observação da tendência dos resultados e comprová-los significativamente pela análise do F calculado em relação ao F tabelado. Desse modo, o experimento apresentado demonstrou ser significativo.

A aplicação de análise de regressão múltipla nos dados experimentais por meio do programa estatístico permitiu a geração de um modelo matemático de 2ª ordem para a otimização do meio de cultivo, cujo objetivo foi melhorar a produção da xilanase pelo fungo *A. fumigatus* Fresen. (OI-1R-T).

Tabela 3 Matriz do Planejamento experimental 2⁴ para otimização da produção de xilanase pelo *Aspergillus fumigatus* Fresen. (OI1R-T) utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

| Ensaio* | Variáveis codificadas e reais | | | | Xilanase (U mL ⁻¹) |
|---------|-------------------------------|---|--|----------------|-----------------------------------|
| | X1 NaNO ₃ (g) | X2 KH ₂ PO ₄ (g) | X3 MgSO ₄ .7H ₂ O (g) | X4 PM** (%) | |
| 1 | -1 (0,15) | -1(0,05) | -1 (0,025) | -1 (1) | 270 |
| 2 | 1(0,45) | -1(0,05) | -1 (0,025) | -1 (1) | 301 |
| 3 | -1 (0,15) | 1(0,15) | -1 (0,025) | -1 (1) | 266 |
| 4 | 1(0,45) | 1(0,15) | -1 (0,025) | -1 (1) | 307 |
| 5 | -1 (0,15) | -1(0,05) | 1 (0,075) | -1 (1) | 120 |
| 6 | 1(0,45) | -1(0,05) | 1 (0,075) | -1 (1) | 328 |
| 7 | -1 (0,15) | 1(0,15) | 1 (0,075) | -1 (1) | 197 |
| 8 | 1(0,45) | 1(0,15) | 1 (0,075) | -1 (1) | 184 |
| 9 | -1 (0,15) | -1(0,05) | -1 (0,025) | 1 (2) | 304 |
| 10 | 1(0,45) | -1(0,05) | -1 (0,025) | 1 (2) | 308 |
| 11 | -1 (0,15) | 1(0,15) | -1 (0,025) | 1 (2) | 240 |
| 12 | 1(0,45) | 1(0,15) | -1 (0,025) | 1 (2) | 375 |
| 13 | -1 (0,15) | -1(0,05) | 1 (0,075) | 1 (2) | 254 |
| 14 | 1(0,45) | -1(0,05) | 1 (0,075) | 1 (2) | 290 |
| 15 | -1 (0,15) | 1(0,15) | 1 (0,075) | 1 (2) | 180 |
| 16 | 1(0,45) | 1(0,15) | 1 (0,075) | 1 (2) | 306 |
| 17 | -2 (0) | 0(0,1) | 0(0,05) | 0 (1,5) | 129 |
| 18 | 2(0,6) | 0(0,1) | 0(0,05) | 0 (1,5) | 250 |
| 19 | 0 (0,3) | -2(0) | 0(0,05) | 0 (1,5) | 260 |
| 20 | 0 (0,3) | 2(0,2) | 0(0,05) | 0 (1,5) | 310 |
| 21 | 0 (0,3) | 0 (0,1) | -2(0) | 0 (1,5) | 315 |
| 22 | 0 (0,3) | 0 (0,1) | 2(0,1) | 0 (1,5) | 348 |
| 23 | 0 (0,3) | 0 (0,1) | 0 (0,05) | -2(0,5) | 157 |
| 24 | 0 (0,3) | 0 (0,1) | 0 (0,05) | 2(2,5) | 430 |
| 25 | 0 (0,3) | 0 (0,1) | 0 (0,05) | 0 (1,5) | 320 |
| 26 | 0 (0,3) | 0 (0,1) | 0 (0,05) | 0 (1,5) | 310 |
| 27 | 0 (0,3) | 0 (0,1) | 0 (0,05) | 0 (1,5) | 320 |
| 28 | 0 (0,3) | 0 (0,1) | 0 (0,05) | 0 (1,5) | 345 |

* Ordem dos ensaios realizados aleatoriamente, **PM: Palha de milho

Tabela 4 Resumo da ANOVA do modelo matemático de 2^a ordem para xilanase

| Fonte de variação | SQ* | GL** | MQ*** | Fcalc | Ftab |
|-------------------|------------|------|-----------|-------|------|
| Regressão | 94679,900 | 5 | 18.935,98 | 8,24 | 2,66 |
| Resíduos | 50555,500 | 22 | 2.297,98 | | |
| Total | 145235,400 | 27 | | | |

R²=0,70; p-valor <0,05

*Soma dos quadrados

**Graus de liberdade

***Média dos quadrados

A equação de segunda ordem representa o modelo matemático para prever a quantidade de enzima que seria produzida pelos parâmetros otimizados (Eq.2) na qual

\hat{X} representa a quantidade enzima prevista e N e K representam os valores codificados para otimização dos parâmetros nitrato de sódio (NaNO_3) e fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4).

$$\hat{X} = 312,8 - 9,6125N^2 + 34,58K^2 \quad (\text{Eq. 2})$$

Para a determinação dos níveis ótimos das variáveis, foram gerados gráficos de superfície de resposta para analisar a produção de xilanase (Fig. 2). As faixas de produção ótimas para as concentrações testadas de nitrato de sódio e fosfato de potássio foram de 0,30 – 0,45 g e 0,05 – 0,15 g, respectivamente. E apresentaram para esses dois elementos os pontos ótimos ideais dentro das variações testadas, próximos ao ponto central (Fig. 2a, b). A produção máxima da enzima ocorreu com as maiores concentrações testadas de palha de milho, 2% - 2,5% (p/v) e demonstrou clara tendência ao aumento da produção da enzima com o aumento deste resíduo no meio (Fig. 2c).

O sulfato de magnésio (Fig. 2b) não apresentou influência significativa para a produção nas concentrações testadas. Isso indica, de acordo com análise dos gráficos, que a sua redução no meio proporcionaria aumento da produção enzimática. E pode indicar que sua presença em conjunto com os demais elementos cause efeito negativo na produção da enzima pelo fungo. Com base nos resultados obtidos, a partir do experimento os elementos mais significativos para a produção de xilanase foram: palha de milho, o nitrato de sódio e o fosfato de potássio.

3.1.3 Otimização e confirmação dos experimentos

O programa Statistica 8.0 foi utilizado para projetar um conjunto numérico de dados codificados preditos de otimização para os dados trabalhados de acordo com o modelo quadrático. Os dados indicaram as condições otimizadas para chegar a uma concentração de nitrato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e palha de milho, requeridos para melhorar a produção de xilanase. Nestas simulações matemáticas, as condições mais adequadas para o aumento da produção de xilanase foram de 0,37 g de nitrato de sódio, 0,1 g de fosfato de potássio, ausência total de sulfato de magnésio e 0,625 g (2,5%, p / v) de palha de milho.

Para confirmar o modelo teórico, tais condições foram testadas experimentalmente em triplicatas. A atividade média da xilanase obtida neste experimento foi de 354 U mL^{-1} , um resultado consistente com o valor previsto de $302,4 \text{ U mL}^{-1}$. Tal resultado validou o modelo proposto pela otimização DCCR e por verificar aumento na atividade xilanásica de 117%.

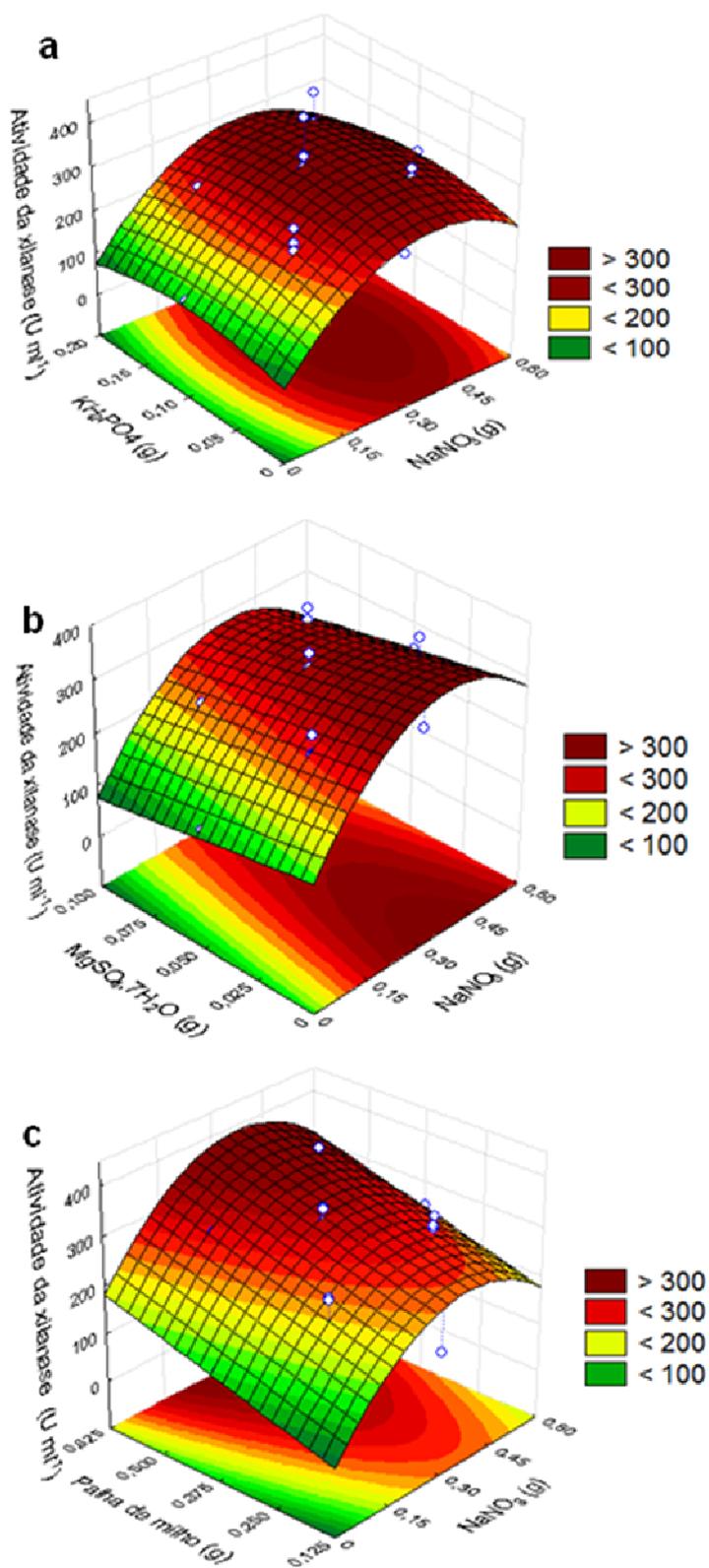


Figura 2 Superfícies de resposta para a produção de xilanase pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresen. (OI1R-T) em função: (a) nitrato de sódio (NaNO₃) e fosfato de potássio (KH₂PO₄), (b) NaNO₃ e sulfato de magnésio (MgSO₄·7H₂O) e (c) NaNO₃ e palha de milho.

Ao comparar a maior produção enzimática encontrada na otimização PBD ($45,8 \text{ U mL}^{-1}$) com a encontrada após confirmação do modelo matemático do DCCR (354 U mL^{-1}), verificou-se aumento de 7,72 vezes na produção de xilanase. Esse dado foi superior ao observado para a otimização de xilanase do fungo *T. lanuginosus* cepa SDYKY-1 utilizando PBD e Planejamento Composto Central (CCD) [20]. E a atividade xilanásica de *T. lanuginosus* após a otimização por CCD foi de apenas 1,42 vezes maior do que a obtida usando PBD.

3.1.4 Produção otimizada da xilanase pela elevação da quantidade do substrato

Após confirmação do modelo estatístico, um novo experimento foi conduzido com aumentos progressivos da concentração de palha de milho, a fim de determinar se a atividade de xilanase de *A. fumigatus* Fresen poderia ser aumentada ainda mais. O aumento da concentração da biomassa (palha de milho) levou a um aumento adicional na atividade da enzima quando usado em combinação com outros elementos otimizados, de tal modo que a adição de 1,625 g (6,5%, p / v) de palha de milho resultou em uma atividade de xilanase de 530 U mL^{-1} (Fig. 3). O resultado representa aumento de 11 vezes na produção total de xilanase em comparação com o valor mais elevado do obtido do experimento PBD inicial ($45,8 \text{ U mL}^{-1}$).

Tais resultados são muito interessantes do ponto de vista tecnológico, pois eles indicam que microrganismos isolados de ecossistemas inexplorados podem apresentar características interessantes quando devidamente submetidos a experimentos baseados em delineamento experimental. Outro fator importante é a utilização de resíduos agroindustriais baratos e abundantes para a produção de compostos de interesse biotecnológico. Esse procedimento é capaz de agregar valor econômico à cadeia de produção e ainda representa ganho ambiental diante da reutilização da biomassa de plantas.

A otimização para produção de xilanase por *Aspergillus carneus* utilizando PBD e CCD apresentou aumento de 227% em comparação com o obtido antes de aplicar o desenho experimental [5]. Já a produção de xilanase por PBD e Box-Behnken em fermentação em estado sólido (SSF) para *Aspergillus fumigatus* ABK9 foi de 1,18 vezes maior quando comparada ao valor total otimizado com o maior valor obtido no Planejamento Plackett-Burmann [23]. Ambos trabalhos indicam otimização inferior ao obtido neste estudo, visto que, no presente estudo, ao finalizar o ensaio de elevação da concentração de palha de milho, foram produzidas 530 U mL^{-1} de atividade xilanásica pelo fungo. Este resultado representa aumento de 11,57 vezes se comparados ao maior valor obtido no PBD ($45,8 \text{ U mL}^{-1}$).

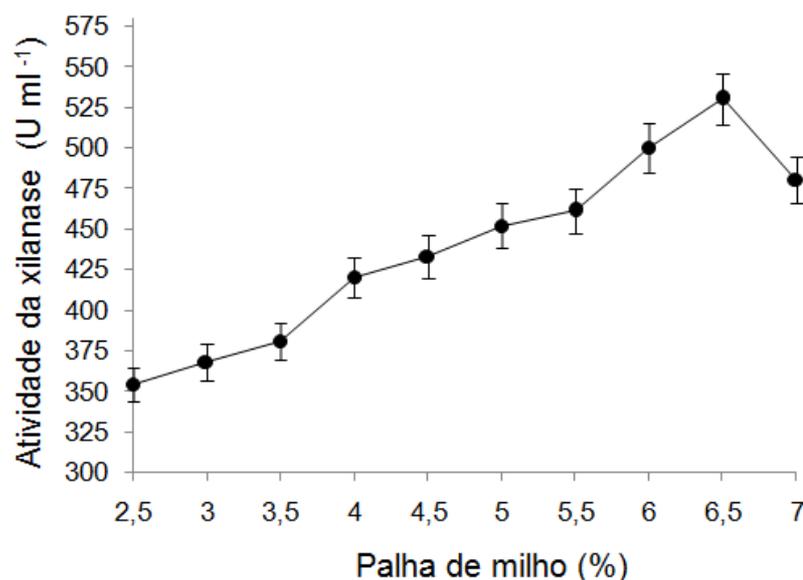


Figura 3 Atividade de xilanase pelo de *A. fumigatus* Fresen. (OI1R-T) após três dias de cultivo estacionário a 42 °C em 25 mL de meio Czapeck líquido otimizado contendo: NaNO₃ (0,37g), KH₂PO₄(0,1g), extrato de levedura (0,1g), pH (6,0) e palha de milho (2,5-7%). Os experimentos foram feitos em triplicata e as dosagens para xilanase do extrato bruto total seguiram o protocolo descrito no tópico experimentos.

O meio mais eficaz para a produção de xilanase pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresen. (OI1R-T) verificado neste trabalho foi chamado de Czapeck líquido otimizado (25 mL) contendo: NaNO₃ (0,37g), KH₂PO₄ (0,1g), extrato de levedura (0,1g), pH (6), palha de milho (6,5%) e água destilada. As condições ideais de cultura foram a 42 °C durante três dias. Segundo os dados da literatura, não há relatos anteriores sobre a otimização da produção de xilanase por cepas termo-tolerantes de *A. fumigatus* Fresen. ou outros fungos isolados do bioma Mata Atlântica, utilizando abordagens estatísticas para as condições de fermentação contendo materiais abundantes e de baixo custo como subprodutos agrícolas, i.e, a palha de milho.

A maioria dos estudos sobre a produção de xilanase por *A. fumigatus* utilizando resíduos têm sido realizados em fermentação em estado sólido (SSF). No caso do *A. fumigatus* SK1, níveis significativos de atividade de xilanase foram obtidos usando o óleo de palma [25]. Duas linhagens de *A. fumigatus* estudados por Sherief et al. [26] e *A.fumigatus* ABK9 [23] foram cultivadas com mistura de palha de arroz e farelo de trigo para otimizar a produção de xilanase. Para *A. fumigatus* P40M2, um aumento significativo na atividade xilanásica foi observado com uso do farelo de trigo, farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço-de-cana, tratado com explosão a vapor, casca de laranja, e as misturas de alguns desses [27].

A grande capacidade do *A. fumigatus* utilizar um amplo número de materiais lignocelulósicos também foi referida por outros autores [28]. No entanto, não há referências na literatura até o momento para o uso de palha de milho para a produção de xilanase, lembrando que esse resíduo é produzido abundantemente no continente americano.

3.2 Ensaio de termoestabilidade da xilanase

O teste da termoestabilidade da atividade da xilanase em extrato bruto mostrou maior estabilidade a 50 °C, pois diminuiu em 10% após 6 horas de incubação a essa temperatura (Fig. 4). Além disso, a xilanase apresentou meia vida de 3 horas a 60 °C. À temperatura de 55 °C, a enzima perdeu mais de 70% da sua capacidade hidrolítica durante a primeira hora de incubação. De modo similar aos resultados apresentados, Mander et al. [29] também relataram elevada estabilidade térmica para a xilanase produzida por *Streptomyces* sp. CS624 a 50 °C. A xilanase de *Aspergillus terreus* [30] e *Streptomyces* sp. CS428 [31] também mostraram ser estáveis a 50 °C. A xilanase de *A. terreus* foi capaz de reter 68% da sua atividade máxima no intervalo de temperatura de 40 a 55 °C [30]. Essa propriedade bioquímica da xilanase de *A. fumigatus* Fresen foi determinada como estudo prévio para verificar a possibilidade de sua aplicação biotecnológica em processos de hidrólise de diferentes compostos. Enquanto, a estabilidade térmica é uma característica fundamental para o bom desempenho da enzima em aplicações práticas.

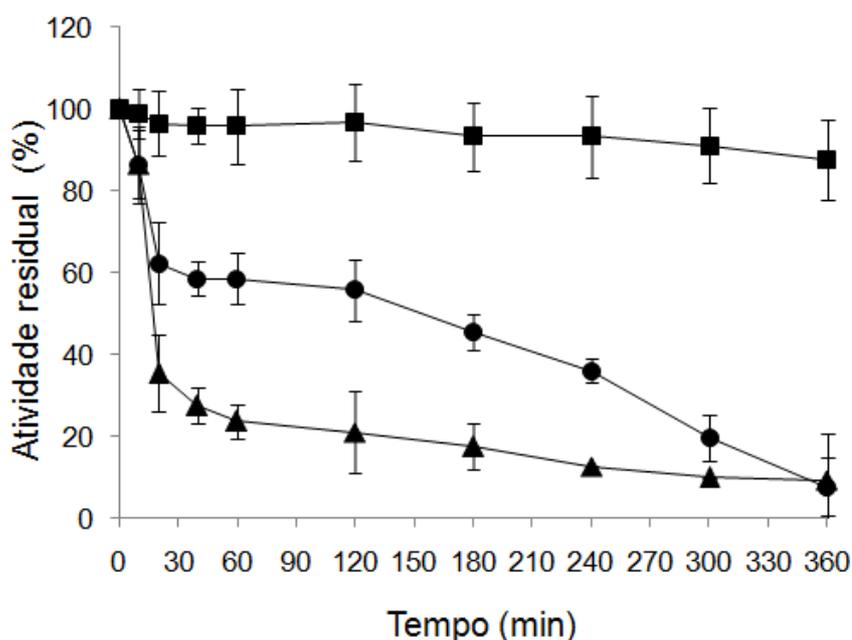


Figura 4 Estabilidade térmica para a atividade de xilanase presente no extrato bruto do fungo *A. fumigatus* Fresen. (OI1R-T). Os ensaios para verificar a termoestabilidade foram feitos com a incubação do extrato bruto em três temperaturas: 50 (■), 55 (▲) e 60 °C (●), em pH 6, em um intervalo de 0 – 360 min. Depois da incubação, as amostras foram utilizadas para dosagem padrão de atividade. A estabilidade térmica foi apresentada como atividade residual comparada à atividade no tempo zero de incubação.

3.3 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática do extrato bruto produzido utilizando as condições otimizadas da xilanase mostrou que a enzima permaneceu ativa durante 96 horas a 50 °C e levou à formação de açúcares redutores crescentes ao longo do tempo (Fig. 5). A palha de milho bruta apresentou hidrólise menor do que os outros substratos utilizados. Isso pode ser

explicado em parte pela estrutura rígida da lignina que reduz o acesso ao local ativo da enzima xilanase na cadeia de polímeros de xiloses da lignocelulose [32].

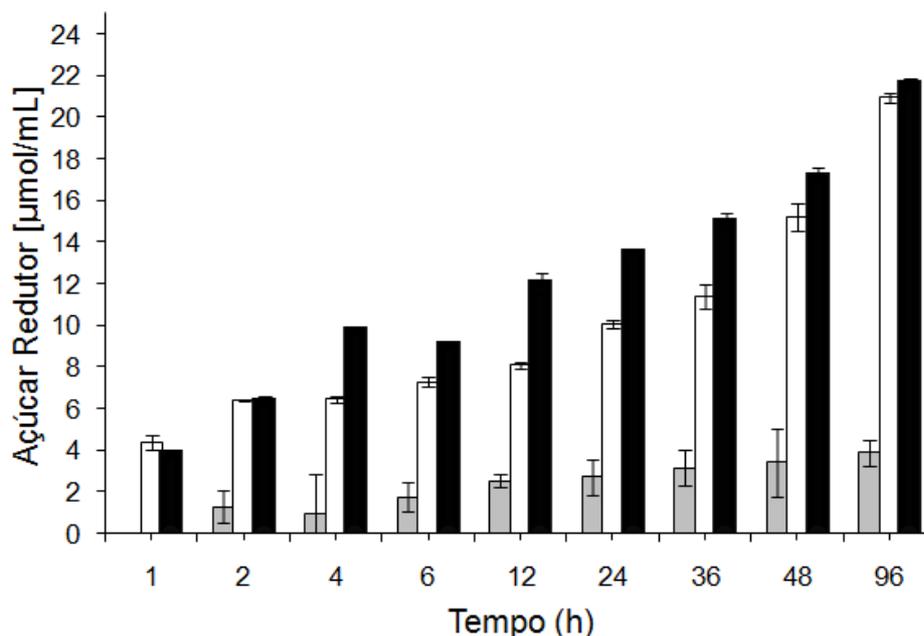


Figura 5 Hidrólise de compostos pela ação das enzimas presentes do extrato bruto enzimático produzido pelo fungo *A. fumigatus* Fresen. (O11R-T) após processo de otimização da produção de xilanase. Os compostos utilizados estão representados pelas barras: (cinzas) palha de milho bruta, (brancas) palha de milho hidrolisada, (pretas) xilano de beechwood (Sigma®). A hidrólise foi realizada com a incubação do extrato enzimático bruto (2 U mL^{-1} xilanase), previamente esterilizado por membrana, com cada um dos três compostos (1%) preparados em frascos com 20 mL de tampão fosfato de sódio (pH 6,0). O período de incubação de 1- 96h (estufa 50 °C). Aliquotas foram retiradas para dosagens de açúcares redutores totais produzidos.

3.1.3 Otimização e confirmação dos experimentos

O programa Statistica 8.0 foi utilizado para projetar um conjunto numérico de dados codificados preditos de otimização para os dados trabalhados de acordo com o modelo quadrático. Estes dados indicaram as condições otimizadas para chegar a uma concentração de nitrato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e palha de milho, requeridos para melhorar a produção de xilanase. Nestas simulações matemáticas, as condições mais adequadas para o aumento da produção de xilanase foram de 0,37 g de nitrato de sódio, 0,1 g de fosfato de potássio, ausência total de sulfato de magnésio e 0,625 g (2,5%, p / v) de palha de milho.

A xilanase Xyn110g de *Gloeophyllum trabeum*, clonada e expressa em *Pichia pastoris* GS115, também foi eficaz em hidrolisar palha de milho pré-tratada (hemicelulose), produzindo açúcares redutores a 50 °C, e pH 4 [33]. Com *G. trabeum*, misturas de diferentes enzimas foram mais efetivas para a hidrólise de materiais lignocelulósicos. A demonstração prática da capacidade da xilanase de *A. fumigatus* Fresen para hidrolisar substratos poliméricos, mesmo quando se utiliza a enzima não purificada, salienta a importância de bioprospecção para a identificação de novas espécies ou isolados de microrganismo que

produzam xilanases, porque as características bioquímicas de cada enzima podem variar em diferentes isolados pertencentes à mesma espécie.

É interessante ainda destacar que a cepa *A. fumigatus* Fresen (OI-1R-T) apresenta reduzida atividade celulásica (dados não publicados). Isso indica a aplicação favorável do fungo para processos que dependam da ausência de atividade de degradação da celulose como as indústrias que envolvem o branqueamento de papel [25].

Em geral, foi observada uma produção de 3,89, 20,96 e 21,64 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ de açúcares redutores para palha de milho em extrato bruto, palha de milho hidrolisada e xilano de beechwood, respectivamente, utilizando extrato de enzima contendo 2 U mL^{-1} de xilanase. De acordo com Mosier et al. [34], a palha de milho é composta por 35,1-39,5% de celulose, 20,7-24,6% de hemicelulose e 11 a 19,1% de lignina e contém elevada quantidade de celulose e hemicelulose para possíveis aplicações biotecnológicas a partir de açúcares de 5-6-carbono, assim como a produção de bioetanol.

Existem dois pontos-chave para a aplicação de enzimas produzidas em processos que utilizam resíduos. O primeiro permite a utilização da xilanase presente no extrato bruto otimizado de *A. fumigatus* Fresen. (OI-1R-T) em processos biotecnológicos que visam à produção de açúcares de baixo peso molecular, para eliminar os passos de purificação de enzimas, que poderiam conduzir a custos adicionais aos processos. Além disso, xilooligossacarídeos e xiloses produzidos por xilanases e β -xilosidases podem ser utilizados por leveduras que fermentam pentoses. Essas representam um recurso importante para a produção de etanol celulósico. De acordo com Farinas et al. [35], a produção de etanol a partir da biomassa da planta é uma alternativa promissora para a produção de energia renovável e sustentável, mas o custo elevado das enzimas necessárias para converter biomassa representa também uma barreira [36].

A segunda vertente representa o crescente mercado que visa à utilização de fontes alternativas, como os resíduos agroindustriais, tanto como fonte de carbono de baixo custo para cultivo de microrganismos como para o fornecimento de açúcares fermentáveis de baixo peso molecular que podem ser utilizados em outros ramos como o mercado alimentício. Por exemplo, a xilanase purificada de *Streptomyces* sp. CS624 [29], produzida em cultivo com farelo de trigo, foi capaz de produzir xilooligossacarídeos com a hidrólise de xilano e de farelo de trigo. Isso demonstra que os resíduos agrícolas podem, por meio de tecnologia microbiana limpa, ser utilizados em várias aplicações, agregam valor ao produto e geram novos produtos com possíveis aplicações biotecnológicas.

Conclusões

Neste estudo, as condições de cultivo do fungo termotolerante *A. fumigatus* Fresen. (OI-1R-T) foram otimizadas com sucesso para a obtenção de elevada produção e atividade de xilanase a partir da combinação de dois métodos estatísticos: o Planejamento Fatorial Plackett-Burman e o Delineamento Central Composto Rotacional, com a análise de gráficos de superfície de resposta. A palha de milho mostrou ser um excelente indutor de atividade de xilanase, com a grande vantagem de ser um substrato barato e extremamente abundante nas Américas. Os dados mostraram que a xilanase atingiu uma atividade máxima de 530 U mL⁻¹ após a otimização. Isto representa um aumento de 11 vezes na produção enzimática total em comparação com a melhor atividade enzimática obtida nos testes iniciais utilizando PBD (45,8 U mL⁻¹). Experimentos de hidrólise enzimática demonstraram que o extrato bruto de *A. fumigatus* Fresen expressando xilanase sob condições otimizadas foi capaz de hidrolisar palha de milho bruta, palha de milho hidrolisada e xilano de beechwood. A capacidade hidrolítica da enzima foi observada pela geração de açúcares redutores em ensaios e a enzima permaneceu ativa durante mais do que 96 h a 50 °C.

Referências Bibliográficas

- [1] B.K.Bajaj, Y.P.Khajuria, V.P. Singh. Biocatal. Agric. Biotechnol.(2012) 314-320.
- [2] P. Peng, D. She.Carbohydr. Polym.112 (2014) 701-720.
- [3] D. S. Kocabas, S. Güderb, N.Özben. J. Mol. Catal. B: Enzym. 115 (2015) 66-75.
- [4] E.A.Rennie, H.V.Scheller. Curr. Opin. Biotechnol. 26 (2014) 100-117.
- [5] T.J. Fang, B.C.Liao, S.CLee. New Biotechnol. 27 (2010) 25-32.
- [6] E.U.Kiran, O. Akpınar, U. Bakir. Food and Bioprod. Process.91 (2013) 565-574.
- [7] S. Lagaert, A. Pollet, M.Courtin,G. Volckaert.Biotechnol. Adv.32 (2014) 316-332.
- [8] R. Schoenlechner, M. Szatmari, A. Bagdi, S. Tömösközi. Food Sci. Technol.51 (2-13) 361-366.
- [9] A. Sanghi, N. Garg, J. Sharma, K. Kuhar, R.C. Kuhad, V.K. Gupta.World J.Microbiol.Biotechnol.24 (2008) 633-640.
- [10] A. Sharma, V. V. Thakur, A. Shrivastava, R.K. Jain, R.M. Mathur, R. Gupta, R.C. Kuhad. Bioresour. Technol. 169 (2014) 96-102.
- [11] S.P. Saha, S. GhoshBiocatal. and Agricult. Biotechnol. 3 (2014)188-196.
- [12] Z.Q. Jiang, W. Deng, Y. P. Zhu, L.T. Li, Y. J. Sheng, K. Hayashi. J. Mol. Catal. B: Enzym. 27 (2004) 207-213.
- [13] A.A. Ayyappan, S.G. Prapulla. Compr. Rev. in Food Sci. 10 (2011) 1-16.
- [14] D. Haltrich, B. Nidetzky, K.D.Kulbe, W. Steiner, S. Zupancic.Bioresour. Technol. 58 (1996) 137-161.
- [15] S.G.Nair, R. Sindhu, S. Shashidhar.Afri. J.Microbiol. Res. 2 (2008) 82-86.
- [16] C.Botella, A. Diaz, I. Ory, C. Webb, A. Blandino.Process Biochem. 42 (2007) 98-101.
- [17] G. Sparovek, G. Berndes, A.G.O.P.Barretto, I.L.F.Klug. Environ. Sci. Policy 19 (2012) 65-72.
- [18] N. Myers, R.A. Mittermeier, C.G. Mittermeier, G.A.B.Fonseca, J. Kent. Nature 403 (2000) 853-858.
- [19] MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D.M.W. Guia prático para fungos fitopatogênicos. Recife: UFRPE (1997) 106.
- [20] Y. Su, X. Zhang, X. Hou, Zhu X, Guo X, Ling P. New Biotechnol. 28 (2011): 40-46.

- [21] J.M. Corrêa, M.R. Mingori, R.F. Gandra, E. A. Loth, F.A.V. Seixas, R.C.G.Simão. *Appl.Biochem. and Biotechnol.*172 (2014) 1085-1097.
- [22] G. L. Miller. *Anal Chem* 31(1959) 424-426.
- [23] A. Das, T. Paul, S.K. Halder, A. Jana, C. Maity, P.K.D. Mohapatra, B.R. Pati, K.C. Mondal. *Bioresour. Technol.* 128 (2013) 290-296.
- [24] D. M. Wuest, S. Hou, K.H. Lee. *Metabolic Engineering. Comprehensive Biotechnology.* Second ed., Elsevier, New York, 2011.
- [25] S.K. Ang, E.M. Shaza, Y. Adibah, A.A. Suraini, M. S. Madihah. *Process Biochem.* 48 (2013) 1293-1302.
- [26] A.A. Sherief, A.B. El-Tanash, N. Atia. *Res. J Microbiol.*5 (2010) 199-211.
- [27] P.D.S. Delabona, R.D.P.B.Pirota, C.A. Codima, C.R. Tremacoldi, A. Rodrigues, C.S. Farinas. *Ind. Crop Prod.* 42 (2013) 236-242.
- [28] C. Stewart, J. Heptinstall. In: W.A.Wood,S.T. Kellogg (Eds.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc. New York, 1988, pp. 264-274.
- [29] P. Mander, Y.H. Choi, G.C. Pradeep, Y.S. Choi, J.H. Hong, S.S. Cho, G.C. Yoo. *Process Biochem.* 49 (2014) 451-456.
- [30] L. R.S. Moreira, M.C. Campos, P.H.V.M.Siqueira, L.P. Silva,C.A.O.Ricart, P.A.Martins, R.M.L.Queiroz, E.X.F.Ferreira. *Fungal Genet. Biol.* 60 (2013) 46-52.
- [31] G.C.Pradeep, Y.H.Choi, Y.S.Choi, C.N. Seong, S.S. Cho, H.J.Lee, J.C. Yoo. *Process Biochem.* 48 (2013) 1188-1196.
- [32] W.F.Anderson, D.E. Akin. *J. Ind. Micro. Biotechnol.* 2008; 35: 355-366.
- [33] H. M. Kim, K.H.Lee, K.H.Kim, D.S.Lee, Q.A.Nguyen, H.J.Bae. *J.Biotechnol.* 172 (2014) 38-45.
- [34] N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y.Y. Lee, M.Holtzapple, M. Ladisch. *Bioresour. Technol.* 96 (2005) 673-686.
- [35] C. S. Farinas, M.M. Loyo, A.B. Junior, P.W.Tardioli, V.N. Bertucci, S. Couri. *New Biotechnol.*27 (2010) 810-815.