



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA XILANASE
PRODUZIDA POR *Streptomyces thermocerradoensis* CRESCIDO
EM FARELO DE TRIGO COMO FONTE DE CARBONO

ALONSO ROBERTO POMA TICONA

GOIÂNIA

2015

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

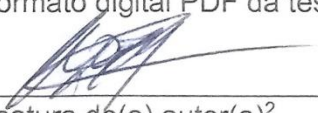
Nome completo do autor: **Alonso Roberto Poma Ticoná**

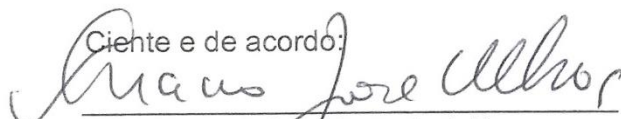
Título do trabalho: **PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA XILANASE PRODUZIDA POR *Streptomyces thermocerradoensis* CRESCIDO EM FARELO DE TRIGO COMO FONTE DE CARBONO**

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 17/ 12 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA XILANASE
PRODUZIDA POR *Streptomyces thermocerradoensis* CRESCIDO EM
FARELO DE TRIGO COMO FONTE DE CARBONO

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do grau de mestre em Biologia. Área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus

Goiânia

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Poma Ticona, Alonso Roberto
PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA XILANASE
PRODUZIDA POR *Streptomyces thermocerradoensis* CRESCIDO EM
FARELO DE TRIGO COMO FONTE DE CARBONO [manuscrito] /
Alonso Roberto Poma Ticona. - 2015.
3, 62 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Cirano Jose Ulhoa; co-orientador Dr. Luiz
Artur Mendes Bataus.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2015.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. *S. thermocerradoensis*. 2. xilanase, . 3. Caracterização. 4.
Purificação. 5. Lignocelulose. I. Jose Ulhoa, Cirano, orient. II. Título.

CDU 577.15



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 433

Aos seis dias do mês de abril do ano de dois mil e quinze, às catorze horas, no Miniauditório do ICB4 da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca examinadora: Prof. Dr. Cirano José Ulhôa, Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro e Profa. Dra. Kátia Flávia Fernandes para, em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada "Purificação e caracterização de uma xilanase produzida por *Streptomyces thermocerradoensis* crescendo em farelo de trigo como fonte de carbono", em nível de mestrado, área de concentração em Biologia Celular e Molecular, de autoria de **Alonso Roberto Poma Ticona**, discente do Programa de Pós-Graduação Biologia da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em cerca de 40 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº1238 de maio de 2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia, a dissertação foi APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Biologia pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 horas e 30 minutos, encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, eu, Renato César Rodrigues, Assistente em Administração da



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

29 secretaria de Pós-graduação do Instituto de Ciências Biológicas da
30 Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e
31 aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias
32 de igual teor.

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

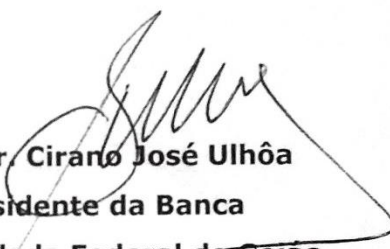
50

51

52

53

54



Prof. Dr. Cirano José Ulhôa

Presidente da Banca

Universidade Federal de Goiás



Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro

Universidade Estadual de Goiás



Profa. Dra. Kátia Flávia Fernandes

Universidade Federal de Goiás

Dedico este trabalho a meus pais e a minha irmã. Que sempre torceram por mim e foram minha fonte de inspiração para a realização deste trabalho. Quero agradecer por todos os dias em que cuidaram de mim, que apesar da distância sempre permaneceram ao meu lado. Aos meus familiares. Eu amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Cirano Jose Ulhoa, pela oportunidade concedida, pela orientação, pela paciência e por acreditar na realização deste trabalho.

A Professora Valdirene, por todos os ensinamentos e pela agradável convivência no laboratório. Ao Professor Luiz Artur, pela co-orientação e pelo incentivo. Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Biologia em especial ao professor Paulo César Ghedini e professora Kátia Flavia Fernandes pelos ensinamentos e colaboração em todo momento durante a realização do mestrado.

Aos colegas do laboratório de Enzimología da UFG, Marcela, Paulo, Juliana, Kênia, Gabi, Carol, Andrey e Marcelo, pelo companheirismo, solidariedade e gratos momentos de convivência no decorrer do trabalho.

Aos amigos que Deus colocou na minha vida João Paulo, Amanda e Fabyano, pela agradável convivência durante a realização deste trabalho, pela paciência, ensinamentos e pela amizade que dura para a vida toda.

Aos meus irmãos da “Latinada” Erika, Andrés, Carmen, William, Julio, Jesús, Veronica e Antonia, pela amizade e inumeráveis reuniões de confraternização.

A professora Eliane, pela ajuda e sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Enzimologia da UnB, que conheci há pouco tempo, mas já são muito importantes, Karen, Brenda, Fran, Jessica, Pedro1, Helder, Caio, Debora, Antonielle, Babi, Pedro 2, Carol, Magal e Marisia pela simpática acolhida e enorme ajuda na realização desse trabalho e pelos momentos de descontração.

Ao Leonardo “boludo” pelas inumeráveis conversas e troca de ideais. Ao Pedro (da Eliane), pelas caronas quando saía tarde do “lab” e os ensinamentos e conversas sobre cinética enzimática.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

À Universidade Federal de Goiás e CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

“Felicidade é a certeza de que a nossa vida não está se passando inutilmente”

Érico Veríssimo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Biomassa e resíduos lignocelulósicos	14
1.2. Degradação enzimática da biomassa	16
1.3. Microrganismos xilanolíticos	22
1.4. <i>Streptomyces</i>	22
1.5. Aplicações de xilanases	24
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivos Específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Microrganismo e produção de esporos	27
3.2. Preparo do inóculo	27
3.3. Cinética e produção de xilanases em diferentes fontes de carbono	27
3.4. Determinação da atividade xilanolítica, dosagem de açúcares redutores, proteína total e específica	28
3.5. Purificação da xilanase por cromatografia	29
3.6. Caracterização da enzima purificada	30
3.7. Eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	32
3.8. Zimograma	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Microrganismo e produção de esporos	33
4.2. Cinética de produção de xilanases com duas fontes de carbono	34
4.3. Purificação de xilanase	36

4.4. SDS-PAGE e Zimograma	39
4.5. Caracterização das xilanases presentes no EB e na enzima purificada	41
4.6. Parâmetros cinéticos	45
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES	53
7. PERSPECTIVAS	54
8. REFÊRENCIA BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE ABREVIATURAS

BCA	Bagaço de cana-de-açúcar
CMC	Carboximetilcelulose
CM	Carboximetil
DNS	ácido dinitrosalicílico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EB	Extrato bruto
FT	Farelo de trigo
MYA	Meio Agar levedura malte
Da	Dalton
pH	Potencial hidrogênio
p/v	Peso por volume
rpm	Rotação por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
UI	Unidade de atividade enzimática
v/v	volume por volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da celulose e modo de ação das celulasas	17
Figura 2. Estrutura química e degradação da hemicelulose	19
Figura 3. Estrutura química e degradação da lignina	21
Figura 4. Esquema da formação do micélio vegetativo, aéreo e esporos em <i>Streptomyces</i>	24
Figura 5. Representação esquemática das etapas de purificação de xilanase produzidas por <i>Streptomyces sp</i> cultivado em farelo de trigo	30
Figura 6. Isolado de <i>Streptomyces</i> em mios MYA sólido	33
Figura 7. Determinação da atividade xilanase produzidas por <i>Streptomyces thermocerradoensis</i> em diferentes fontes de carbono	34
Figura 8. Análise de atividade xilanolítica e proteínas totais	35
Figura 9. Cromatograma do precipitado com sulfato de amônio aplicado em ANX-Sepharose	36
Figura 10. Cromatograma da fração purificada com atividade de xilanase obtida em coluna CM-Sepharose	37
Figura 11A. Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE 12%)	39
Figura 11B. Zimograma	40
Figura 12. Efeito do pH na atividade xilanolítica do extrato bruto (EB) e enzima purificada (Xyl)	41
Figura 13. Efeito da temperatura na atividade xilanolítica do extrato bruto (EB) e enzima purificada (Xyl)	42
Figura 14. Termoestabilidade do extrato bruto a temperaturas de 40, 50 e 60°C	43
Figura 15. Termoestabilidade da enzima purificada a temperaturas de 40, 50 e 60°C	44
Figura 16. Curva de Michaelis-Menten	46
Figura 17. Gráfica de Lineweaver-Burk	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição percentual de alguns resíduos lignocelulósicos gerados de diferentes fontes agroindustriais	15
Tabela 2. Sumário das etapas de purificação da xilanase produzida por <i>Streptomyces sp</i> cultivado em farelo de trigo como fonte de carbono	38
Tabela 3. Efeito dos íons metálicos e EDTA sobre a atividade de xilanase purificada	45

RESUMO

O gênero *Streptomyces* está presente na natureza, preferencialmente em solos ricos em detritos orgânicos e crescem em microcolônias podendo degradar biopolímeros como a biomassa lignocelulósica (devido à produção de xilanases, celulasas, pectinases, mananases). As xilanases atuam na degradação da hemicelulose da parede celular vegetal e apresentam várias aplicações em processos industriais. Neste trabalho, *Streptomyces thermocerradoensis* foi cultivado por 4 dias em duas fontes de carbono: Bagaço de cana de açúcar (BCA) e farelo de trigo (FT). O isolado de *S. thermocerradoensis* foi capaz de produzir xilanases nas duas fontes de carbono utilizadas. Entretanto, a maior produção foi observada em FT e a xilanase produzida nestas condições foi utilizada para purificação e caracterização. O extrato bruto obtido foi concentrado por precipitação com sulfato de amônio e a fração concentrada foi purificada por cromatografia em resina ANX-Sepharose (pH 8,0) e em resina de troca catiônica CM-Sepharose (pH 4,0), com uma massa molecular estimada de 33 kDa. A xilanase apresentou atividade ótima a 50°C e pH de 5,0. A atividade enzimática foi fortemente inibida na presença de íons Hg^{2+} , Ag^{2+} , Fe^{3+} e aumentaram sua atividade em presença de Co^{2+} , Ca^{2+} e Mn^{2+} . A termoestabilidade foi mantida a 80% por 2 horas a temperatura de 40 e 50°C. Os parâmetros de K_m e $V_{\text{máx}}$ para xilana oat spelt como substrato foram de 3,5 mg.mL^{-1} e 0,5955 $\mu\text{mol.min}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-Chave: (*S. thermocerradoensis*, xilanase, caracterização, purificação, lignocelulose).

ABSTRACT

The genus *Streptomyces* is present in nature, preferably in soils rich in organic detritus and grow into microcolonies may degrade biopolymers such as lignocellulosic biomass (due to the production of xylanases, cellulases, pectinases, mannanases). Xylanases act in the degradation of plant cell wall hemicellulose and have many applications in industrial processes. In this work, *Streptomyces thermocerradoensis* was cultivated for 4 days on two sources of carbon: Sugarcane bagasse (SCB) and wheat bran (WB). The isolate of *S. thermocerradoensis* was able to produce xylanase in the two sources of carbon. However, the highest production was observed in WB and enzyme produced under these conditions was used for purification and characterization. The crude extract obtained was concentrated by precipitation with ammonium sulfate. The concentrated fraction was purified by chromatography ANX Sepharose (pH 8.0) and CM-Sepharose cation exchange (pH 4.0) with a molecular mass of 33 kDa. The xylanase showed optimal activity at 50 °C and pH 5.0. The enzyme activity was strongly inhibited in the presence of Hg^{2+} , Ag^{2+} , Fe^{3+} and increased their activity in the presence of Co^{2+} , Ca^{2+} and Mn^{2+} . The thermostability was kept at 80% for 2 hours at a temperature of 40 to 50 °C. The parameters K_m and $V_{\text{máx}}$ for oat spelt xylan was $3,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ and $0,5955 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1}$, respectively.

Keywords: (*S. thermocerradoensis*, xylanase, characterization, purification, lignocellulose).

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biomassa e resíduos lignocelulósicos

A biomassa lignocelulósica representa a fonte orgânica renovável mais abundante da biosfera compreendendo até 50% da biomassa terrestre (SÁNCHEZ, 2009). A lignocelulose é um material orgânico renovável que constitui o elemento estrutural da parede celular de todas as plantas e constituída principalmente de celulose (40-50%), hemicelulose (20-30%) e lignina (20-30%) (TUOMELA *et al.*, 2000). Esses polímeros encontram-se unidos entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos (CASTRO & PEREIRA, 2010). Dentre os materiais lignocelulósicos, os resíduos agroindustriais representam um grande interesse pelo fato de serem produzidos em grande escala nacionalmente.

Mundialmente, a produção de resíduos lignocelulósicos é significativa. São produzidos, aproximadamente cerca de $2,9 \times 10^3$ milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos que estão disponíveis a partir dos cultivos de cereais e $3,0 \times 10^3$ milhões de toneladas de oleaginosas (SINGHANIA *et al.*, 2010). O bagaço de cana de açúcar contou com uma produção aproximada de 142 milhões de toneladas, produto do processamento de 588 milhões de toneladas de cana produzidas no Brasil. Tendo em mente o interesse pela produção de biocombustíveis, esse bagaço poderia aumentar significativamente a produção de bioetanol que alcançou aproximadamente 23 bilhões de litros na safra 2012/2013 (ÚNICA, 2014).

A composição dos diferentes resíduos lignocelulósicos varia significativamente de um material para outro, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Composição percentual de alguns resíduos lignocelulósicos gerados de diferentes fontes agroindustriais.

Resíduos Lignocelulósicos	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
Bagaço de cana de açúcar	40	24	25	SAHA, 2003
Bagaço de laranja	16	14	1	FARINAS <i>et al.</i> , 2008
Farelo de milho	15	35	8	SAHA, 2003
Farelo de trigo	30	50	20	SAHA, 2003
Casca de arroz	36	20	19	FARINAS <i>et al.</i> , 2008
Bagaço de soja	3	4	3	FARINAS <i>et al.</i> , 2008

Todos estes componentes da parede celular vegetal dos resíduos lignocelulósicos podem ser utilizados na biorefinería, na qual a maioria das vezes a biomassa é reduzida em suas unidades estruturais para gerar produtos de interesse industrial (ALONSO *et al.*, 2013).

As técnicas que são mais estudadas e utilizadas incluem hidrólise ácida e a hidrólise enzimática (SARKAR *et al.*, 2012). Nesta última, alvo do grande esforço de pesquisa mundial, a quebra destes biopolímeros é feita por um conjunto de enzimas produzidas por um ou mais micro-organismos, celulolíticos e hemicelulolíticos (SONI & KANGO, 2013).

Nos processos de hidrólise enzimática, as enzimas podem substituir ou agir de modo complementar a compostos químicos inorgânicos, contribuindo nos processos de produção e gerando benefícios para o meio ambiente, por meio da biodegradabilidade e pelo menor consumo de energia. Como as enzimas são mais específicas em sua ação do que as substâncias químicas, os processos enzimáticos produzem uma baixa taxa de subprodutos residuais, melhorando a obtenção de produtos de qualidade e diminuindo a probabilidade poluição ambiental. Assim, o desenvolvimento de enzimas eficientes para processar resíduos agrícolas é uma das vias para o aproveitamento de forma integral de frações celulósicas e hemicelulósicas de resíduos lignocelulósicos.

1.2. Degradação enzimática da biomassa lignocelulósica

A parede celular vegetal é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Tais componentes recebem a designação de material lignocelulósico (PÉREZ et al., 2002).

A celulose é um homopolissacarídeo linear não ramificado, composto de unidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, sendo o componente mais abundante da biomassa vegetal. A celulose corresponde a aproximadamente a 45% do peso seco das plantas. Além disso, ela pode aparecer na forma cristalina e amorfa, sendo que esta última apresenta uma conformação desorganizada, permitindo uma exposição maior da estrutura celulósica. A região cristalina da celulose apresenta um alto grau de organização na qual as microfibrilas estão suficientemente compactadas para permitir a penetração de qualquer molécula (LYND et al., 2002). Na maioria das vezes, as fibras de celulose são encontradas formando uma intrincada rede junto com outros biopolímeros, principalmente hemicelulose e lignina, estes associados entre si por meio de interações físicas e covalentes (KUMAR et al., 2008)

A hidrólise enzimática da celulose é feita pela ação sinérgica de um complexo enzimático composto por três enzimas: endo β -1,4 glicanases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21). As endo β -1,4 glucanases atacam randomicamente as ligações internas das regiões de celulose amorfa, abrindo sítios de ação para as celobiohidrolases. As celobiohidrolases são também chamadas de exoglucanases e clivam as extremidades da celulose liberando monômeros e dímeros, atuando inclusive sobre a forma cristalina. As β -glucosidases são as encarregadas de hidrolisar a celobiose em duas moléculas de glicose (WANG et al., 2012).

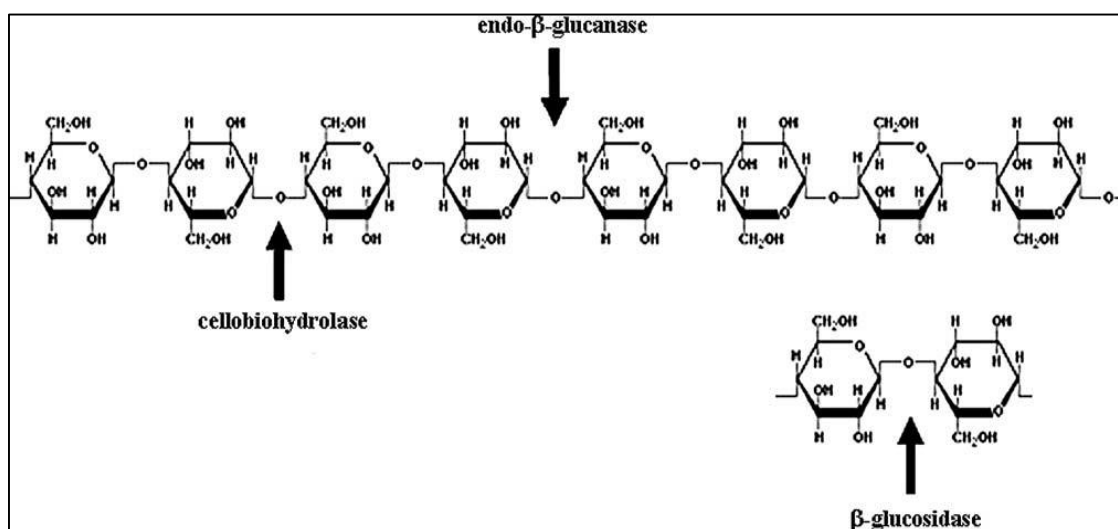


Figura 1. Estrutura molecular da celulose e modo de ação das celulasas (KUMAR et al., 2008)

As hemiceluloses são componentes estruturais importantes da parede celular de plantas. Consistem principalmente de D-xilose e L-arabinose, mas também apresentam D-manose, D-galactose, D-glicose, 4-O-metil-glicurônico, D-galacturônico e ácido D-glicurônico ligados entre si por ligações glicosídicas β -1,4 e, ocasionalmente β -1,3 (BEG et al., 2001).

Ao contrário da celulose, as hemiceluloses apresentam cadeias laterais curtas compostas por diferentes açúcares que variam de acordo com a fonte de hemicelulose. A hemicelulose é ligada fortemente à celulose por ligações de hidrogênio e também através de ligações covalentes e não covalentes com lignina, celulose e outros polímeros essenciais à parede da célula.

A xilana, a mais abundante das hemiceluloses, é constituída em média de 150 a 200 unidades de xilopiranosil (resíduos de D-xilose), unidas por ligação β -1,4, formando a cadeia principal. Essa, por sua vez, pode ser linear ou ramificada. Por se tratar de um heteropolissacarídeo, a conversão enzimática de heteroxilana a seus componentes monoméricos requer a participação sinérgica de várias enzimas, algumas atuando sobre a cadeia principal, outras sobre as ramificações. Do complexo xilanolítico, fazem

parte: endo- β -xilanases (EC 3.2.1.8), β -xilosidades (EC 3.2.1.17), α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -glucuronidases (EC 3.2.1.139), acetilxilanaesterases (EC 3.1.1.6), β -cumaroilesterases e β -feruloilesterases. (WANG et al., 2012; JUTURU & WU, 2013).

Dentre essas enzimas, as xilanases (E.C. 3.2.1.8) são enzimas chave na degradação de xilana, uma vez que atuam sobre a cadeia principal. A atividade de xilanase muitas vezes facilita a atuação de outras enzimas do complexo através de heterosinergismo, pois a presença de grandes quantidades de substituintes pode dificultar a formação de complexos do tipo enzima-substrato (JUTURU & WU, 2014).

As endo β -xilanases clivam porções internas da cadeia polimérica de xilana, fornecendo substrato para atuação das β -xilosidades. Essas últimas atuam sobre fragmentos (oligossacarídeos) de xilana e sobre as extremidades não redutoras da xilana (ação exo). Outras enzimas estão também envolvidas na degradação da xilana, isto devido à natureza complexa destes polissacarídeos: α -L-arabinofuranosidase clivam as ligações α -glicosídicas entre arabinose e xilose; acetilxilana esterase remove os grupos O-acetyl das posições 2 e 3 de resíduos de β -D-xilopiranosil; ácido ferulicoesterase clivam a ligações éster entre a arabinose e as cadeias laterais de ácido ferúlico; e ácido cumáricoesterase cliva as ligações éster entre arabinose e ácido p-cumárico (SONI & KANGO, 2013)

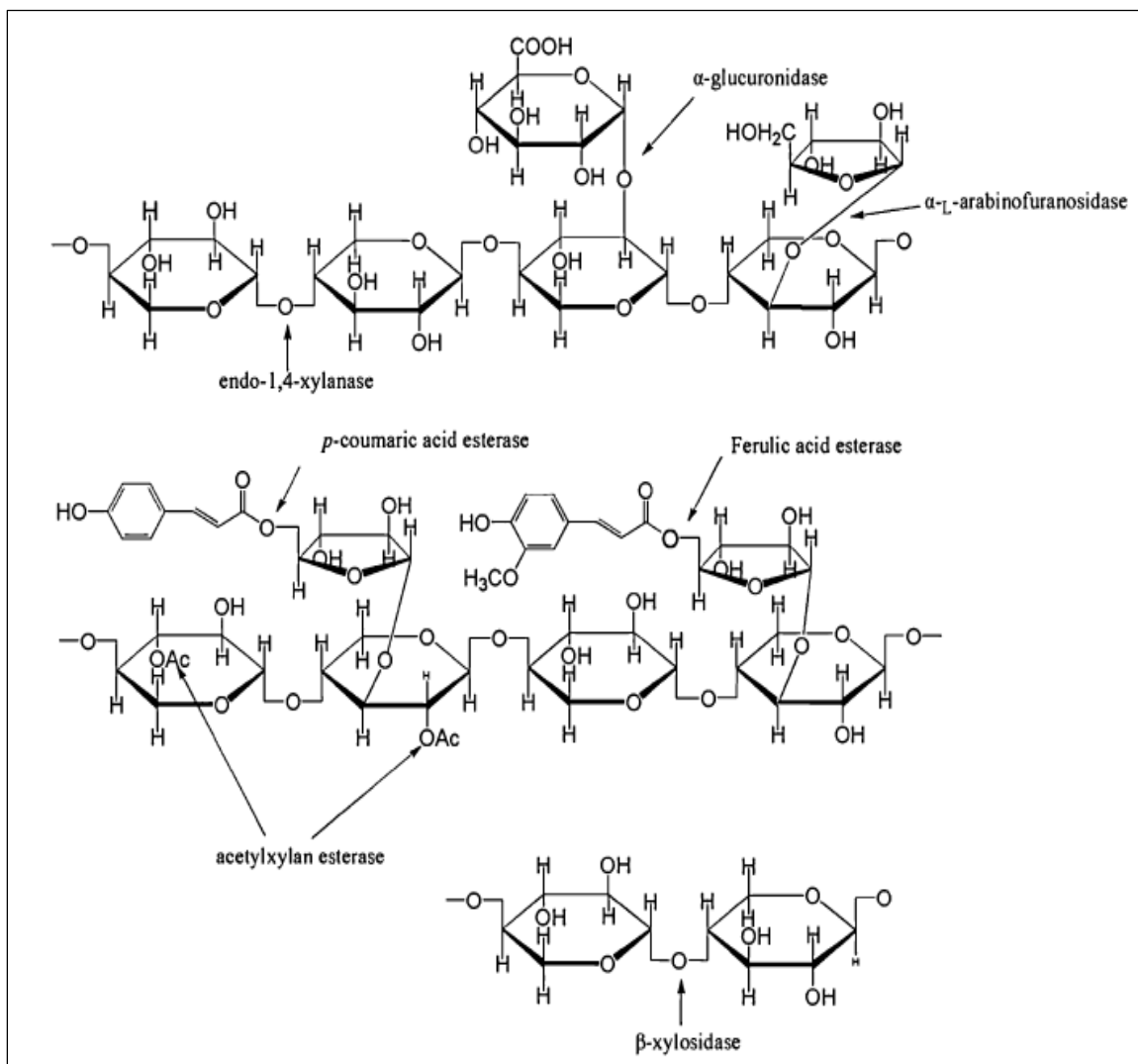


Figura 2. Estrutura química e degradação da hemicelulose (WANG et al., 2012).

A lignina é o segundo polímero mais abundante na parede celular de plantas vasculares e na natureza, depois da celulose. Aproximadamente 27% do carbono total fixado por fotossíntese em ecossistemas de terra é incorporada em lignina (SONI & KANGO, 2013). Encontra-se como parte integral da parede celular, emaranhada em uma complexa matriz de celulose e hemicelulose, constituindo uma barreira impenetrável na parede celular da planta, servindo de suporte estrutural, conferindo impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e estresse oxidativo. (KUMAR et al., 2008).

A lignina é uma complexa macromolécula fenólica, hidrofóbica, constituída por unidades de fenil-propano, de característica tridimensional e amorfa. Possui na sua estrutura átomos de carbono derivados de álcool cinamil substituído, que são cumaril, coniferil e álcool sirigil. As ligninas são altamente ramificadas, não cristalinas, com estrutura e composição química variando de acordo com a fonte de origem (SANCHEZ, 2009). A degradação da lignina pode ser entendida como um processo multienzimático por reação não específica, resultante da ação coordenada de uma série de enzimas lignolíticas intra e extracelulares as quais, desestabilizam as ligações da macromolécula, causando assim seu colapso (MARTINEZ et al., 2005; WANG et al., 2012).

As lacases (E.C. 1.10.3.2) pertencem ao grupo das polifenol oxidases que contêm átomos de cobre no sítio ativo, sendo comumente denominadas de oxidases multicobre. Estas enzimas catalisam a oxidação de compostos aromáticos e outros compostos orgânicos, como por exemplo, polifenóis, fenóis com metoxilações e aminas aromáticas, com a concomitante redução do oxigênio a uma molécula de água. Atuam sobre a molécula de lignina, favorecendo a delignificação das fibras lignocelulósicas e desta forma, como as hemicelulases facilitam o acesso das celulasas ao substrato (SANCHEZ, 2009).

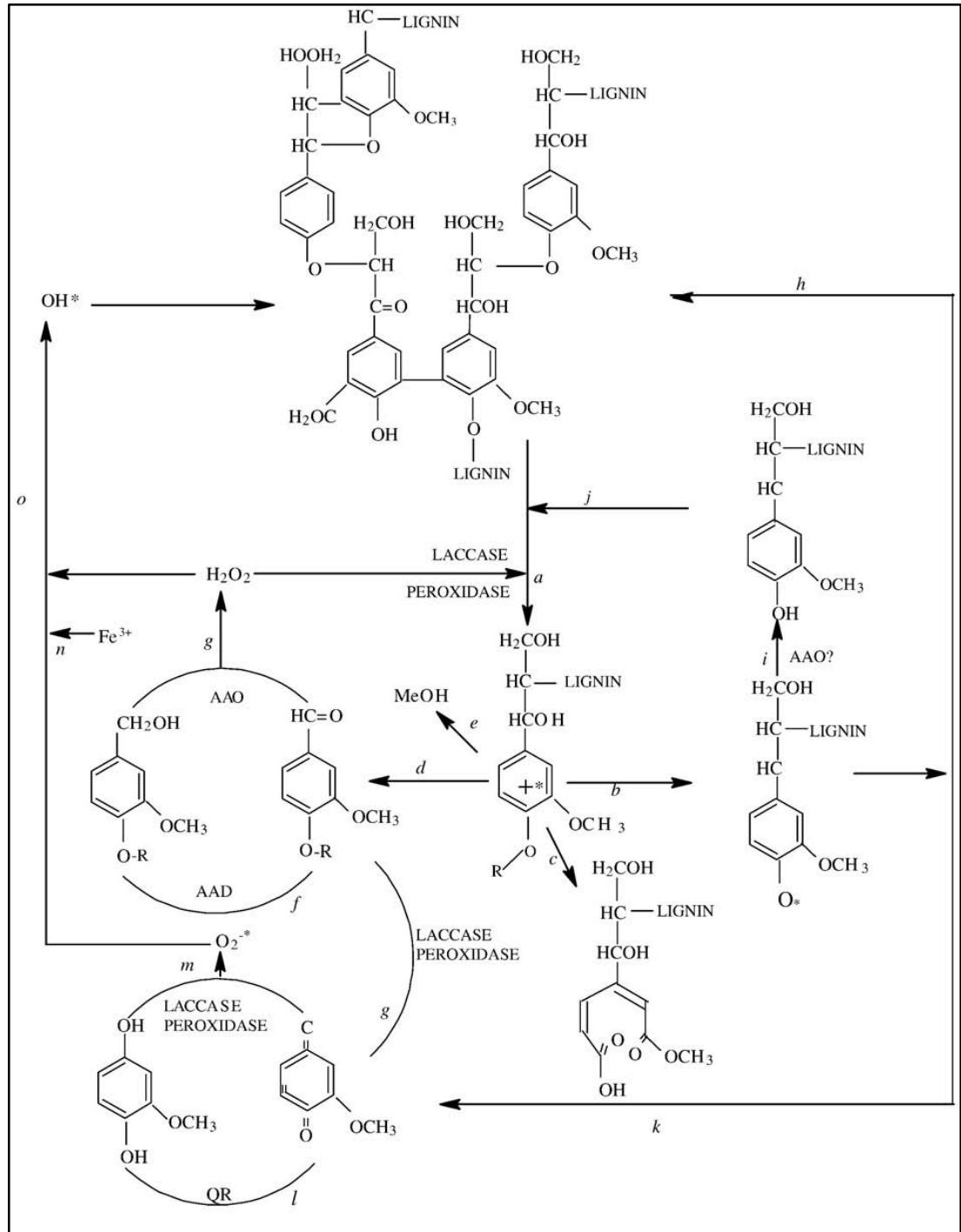


Figura 3. Estrutura química e degradação da lignina (MARTINEZ et al., 2005).

1.3. Microrganismos xilanolíticos

Os microrganismos xilanolíticos são encontrados em grupos taxonômicos variados, sendo a maioria pertencente a bactérias e fungos. Os organismos xilanolíticos ocorrem em todos os ambientes onde há acúmulo de materiais lignocelulósicos. Usualmente, ocorrem em populações mistas, onde os micro-organismos interagem sinergicamente (SUBRAMANIYAN *et al.*, 2002). Na natureza vários organismos são capazes de produzir hemicelulases, dentre estas bactérias (aeróbicas e anaeróbicas), fungos (mesofílicos, termofílicos e extremofílicos), algas, protozoários, gastrópodes e artrópodes (KULKARNI *et al.*, 1999). A maioria dos fungos fitopatogênicos produzem enzimas com atividade xilanolítica contra a parede celular vegetal.

Xilanases também foram descritos para gêneros de bactérias que não estão envolvidas em fitopatogenicidade, como *Bacillus sp* (DHILLON *et al.*, 2000). Também actinomicetos do gênero *Streptomyces* com atividade xilanolítica tem sido observados tais como *Streptomyces actuosus* (WANG *et al.*, 2003), *Streptomyces cyaneus* (NINAWA *et al.*, 2008), *Streptomyces halstedii* (RUIZ *et al.*, 1995).

1.4. *Streptomyces*

Streptomyces é o gênero mais extenso de actinobactérias, pertence à classe Actinobacteria, são membros da ordem Actinomycetales e à família Streptomycetaceae. São um grupo de bactérias Gram positivas, aeróbicas e apresentam em seu genoma um elevado conteúdo de citosina e guanina. São quimiorganotróficos e produzem uma variedade de pigmentos responsáveis pela cor do micélio sob o substrato e micélio aéreo (ANDERSON & WELLINGTON, 2001).

Streptomyces estão presentes em uma grande diversidade de biomas, preferencialmente em solos ricos em detritos orgânicos e crescem em microcolônias que degradam biopolímeros como lignocelulose, polifenóis, quitosanas, queratinas, pectinas, dentre outros (REHM, 1993). Algumas

espécies de *Streptomyces* atacam a celulose, hemicelulose e a lignina, esta habilidade, produção de hemicelulases, tem grande importância na produção de líquidos combustíveis e produtos químicos a partir de subprodutos da agricultura (SCHREMPF, 2008).

Streptomyces apresenta um complexo processo de diferenciação morfológica, similar aos fungos filamentosos e únicos em bactérias. Estes micro-organismos crescem como hifas ramificadas formando um extenso micélio vegetativo, como diferenciação em micélio aéreo e posterior dispersão de esporos. A extensão da hifa se dá por crescimento apical e é mediado principalmente pela proteína DiviVA, que está envolvida no processo de formação de novos pontos de ramificação na hifa e na sua extensão. Enzimas envolvidas exportam peptidoglicano, assim como outros componentes como ácido teicóico, proteínas de superfície e lipídeos que passam a ser secretados e incorporados na zona de crescimento (WILLEY et al., 2006; FLARDH & BUTTNER, 2009).

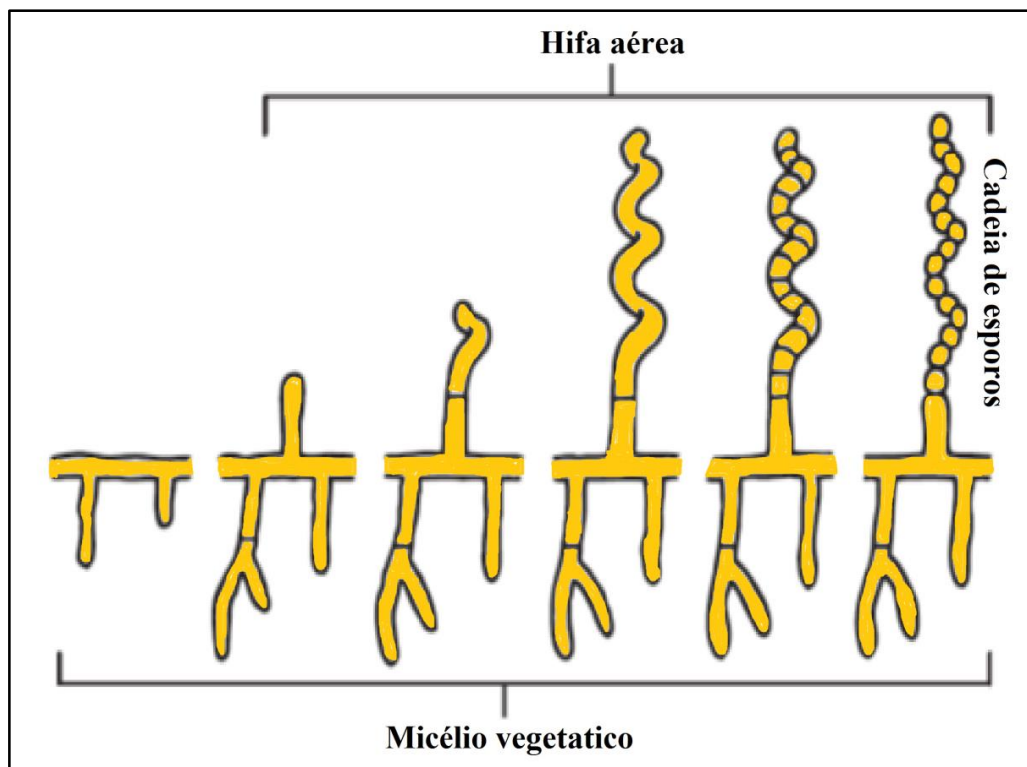


Figura 4. Esquema da formação do micélio vegetativo, micélio aéreo e esporos em *Streptomyces* (ELLIOT & FLARDH, 2012).

1.5. Aplicações biotecnológicas de xilanases

Na indústria têxtil, as xilanases tem sido utilizados para o pré-tratamento de fibras de baixa qualidade. Tais fibras são ricas em conteúdo hemicelulósico, por conseguinte, causam dificuldades no adequado processo de fiação. O pré-tratamento das fibras com xilanases termoestáveis, removem as xilanas ficando mais suave a nível significativo (PATRA & MADHU, 2010).

Na indústria dos alimentos, as xilanases têm muitas aplicações. O processamento de cereais com xilanase resultou na redução do tempo de processamento durante a fermentação destes materiais alimentícios. O tratamento da farinha de trigo com xilanases aumentou a absorção de água da massa, bem como melhoras significativas na textura do pão. As xilanases também são usadas na clarificação de sucos de frutas e vinhos. (SUBRAMANIYAN & PREMA, 2002).

Na indústria de rações, os polissacarídeos não amiláceos como estaquiose e rafinose são um grande problema na indústria dos alimentos. O pré-tratamento de silagem e grãos com xilanase, resulta na degradação dos complexos não amiláceos, liberando nutrientes. Isto melhora o valor nutricional especialmente para animais monogástricos, onde a microflora xilanolítica é ausente. A suplementação de alimentos de cereais baseados na dieta com xilanases, também melhorou significativamente a produção de ovos de codornas (BAYRAM et al., 2008).

Na bioconversão da lignocelulose, implica a sacarificação de matérias lignocelulósicas usando xilanases, liberando açúcares que podem ser utilizados para produção de xilooligosacarídeos, etanol, ácidos orgânicos e produção de hidrogênio (LI et al., 2011).

Na indústria do papel, as xilanases atuam sobre os resíduos de xilosil β -1, 4, facilitando a liberação de xilana e lignina (compostos polifenólicos responsáveis pela coloração marrom do papel) para fazer o papel branco e

brilhoso. A aplicação das xilanases podem ajudar consideravelmente, na diminuição da poluição industrial, causada pela utilização do cloro como agente químico branqueador das polpas, o que origina a formação de compostos residuais denominados organo-clorados, que são extremamente tóxicos para o meio ambiente. A utilização da xilanase, no biobranqueamento das polpas, leva a diminuição do consumo de branqueadores químicos, sem comprometer, entretanto, o resultado final, em termos da alvura do papel (VERMA & SATYANARAYANA, 2012).

2. OBJETIVOS

Purificar e caracterizar uma enzima com atividade xilanolítica produzida por *Streptomyces thermocerradoensis* na presença de resíduos lignocelulósicos.

2.1. Objetivos Específicos

- Efetuar o cultivo em condições submersas do isolado de *S. thermocerradoensis* em duas fontes de carbono: Bagaço de cana de açúcar(BCA) e farelo de trigo (FT);
- Avaliar a cinética de produção de xilanases presentes nos cultivos;
- Purificar uma enzima com atividade xilanolítica a partir do cultivo em farelo de trigo usando técnicas cromatográficas;
- Caracterizar a enzima purificada (temperatura, pH, termoestabilidade, íons);
- Determinar os parâmetros cinéticos (K_m , V_{max}) da enzima purificada.

3. MATERIAIS E METODOS

3.1. Microrganismo e produção de esporos

A linhagem de *S. thermocerradoensis* foi obtido da coleção do Laboratório de engenharia genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, isolado a partir do BCA seco em contato com solo de Cerrado e identificada como uma nova linhagem termofílica com atividade xilanolítica segundo (BRITO-CUNHA *et al.*, 2013).

A produção de esporos foi feita em meio sólido MYA (Extrato de levedura – 4,0 g/L; Extrato de malte – 10,0 g/L; Glicose – 4,0 g/L; ágar – 20g/L e pH 7,3) e incubada a 45 °C por 4 dias (PRIDHAM *et al.*, 1956).

3.2. Preparo do inóculo

O inóculo foi obtido por meio da raspagem de esporos de uma placa de Petri do meio MYA com no máximo 4 dias de crescimento, os quais foram dispersos em 50 mL de solução de NaCl 0,9% (p/v) autoclavada. A contagem de esporos da suspensão foi determinada pela observação em microscópio ótico com câmara de Neubauer, contabilizando 10^6 esporos/mL.

3.3. Cinética de produção de xilanases em diferentes fontes de carbono

Para determinar a cinética de produção de xilanases o BCA e FT foram utilizados como fonte de carbono lignocelulósicos nas concentrações de 0,5% (p/v) para cultivos submersos de *S. thermocerradoensis* os quais foram realizados em Erlenmeyer de 1,0 L, contendo 250 mL de meio líquido (KH_2PO_4 – 9,0 g/L; K_2HPO_4 – 1,5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 g/L; CaCl_2 – 0,05 g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 g/L; extrato de levedura – 1g/L; em pH 7,0) segundo (CARVALHO, 2003), autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Uma suspensão de 10^6 esporos/mL foi inoculada aos meios líquidos equivalentes a 1% do volume do meio de cultivo. Os cultivos líquidos foram incubados por 10 dias a 45°C em agitação constante de 140 rpm segundo estabelecido por (BRITO-CUNHA *et al.*, 2013). Após este período, os meios

líquidos foram filtrados a vácuo em papel filtro e centrifugados a 10.000 rpm por 20 min a 4 °C.

Aos filtrados, denominado Extrato bruto (EB), foram adicionados 0,02% (p/v) de azida sódica, para ser armazenados em câmara fria a 4 °C e posteriormente analisado a cinética da produção de enzimas frente a cada fonte de carbono. Por meio deste experimento, foi possível selecionar a fonte de carbono melhor indutora de xilanases. Posterior a esta etapa, procedeu-se a purificação e caracterização das xilanases. Os cultivos foram realizados em triplicatas biológicas.

3.4. Determinação da atividade xilanolítica e dosagem de proteína total

A atividade de xilanase foi feita misturando 100 µL de xilana “oat spelt” 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM a pH 5,0 com 50 µL da enzima, incubando em banho-maria a 50°C por 30 minutos. Após esse período de incubação da enzima com o substrato, foram adicionados 300 µL de Ácido Dinitrosalicílico (DNS), e os tubos foram fervidos por 10 minutos para a detecção dos açúcares redutores liberados pela ação enzimática, segundo metodologia descrita por MILLER (1959). As atividades enzimáticas foram expressas em Unidades Internacionais por mililitro de amostra (U.I/mL), sendo que U.I foi definida como aquela que libera um µmol do açúcar redutor correspondente por minuto de reação.

A concentração de proteínas foi determinada como descrito no kit (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EUA), segundo método proposto por BRADFORD (1976). As atividades específicas foram calculadas e expressas em UI/mg de proteína total. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5. Purificação da xilanase por cromatografia

O extrato bruto obtido na etapa de cultivo em meio líquido contendo o farelo de trigo foi filtrado a vácuo em papel filtro Whatman N°1 e centrifugado a 10.000 rpm por 20 min a 4 °C. O extrato bruto (300 ml) foi concentrado por precipitação com 60% (p/v) de sulfato de amônio por 12 horas, o processo ocorreu em câmara fria a 4°C sob agitação por meio de barra magnética. Após, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 30 ml de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) e dialisado contra o mesmo tampão por 12 horas (com trocas de tampão a cada 4 horas).

As etapas cromatográficas foram realizadas a temperatura ambiente. Um volume de 5 mL (1.2 mg/ml de proteína) da amostra do extrato bruto precipitado com sulfato de amônio e dialisado com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), contendo atividade xilanólítica foi fracionado em coluna ANX Sepharose (1x5 cm), acoplada ao sistema de purificação Akta (GE healthcare). A coluna foi previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Frações de 1 ml/min foram eluídas, seguindo-se a um gradiente linear de cloreto de sódio (0-1M) sob o mesmo fluxo. As frações foram dialisadas por 8 horas com trocas de água destilada cada 2 horas e aquelas que apresentavam atividade xilanólítica foram dialisadas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0 e reservadas para a seguinte etapa cromatográfica.

Um volume de 1 ml (92 µg/ml proteína) da fração amostral anterior foi aplicado em coluna CM Shepharose (1 x 5 cm), acoplada ao sistema de purificação Akta (GE healthcare). A coluna foi pré-equilibrada em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0. A eluição foi iniciada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0 sob fluxo de 1 ml/min, seguindo-se a um gradiente linear de cloreto de sódio (0-1M) sob o mesmo fluxo. As frações foram dialisadas por 8 horas com trocas de água destilada a cada 2 horas. A fração purificada obtida foi submetida à caracterização.

Na figura 5 é demonstrado em forma de esquema de maneira sucinta as etapas utilizadas na obtenção da enzima de interesse.

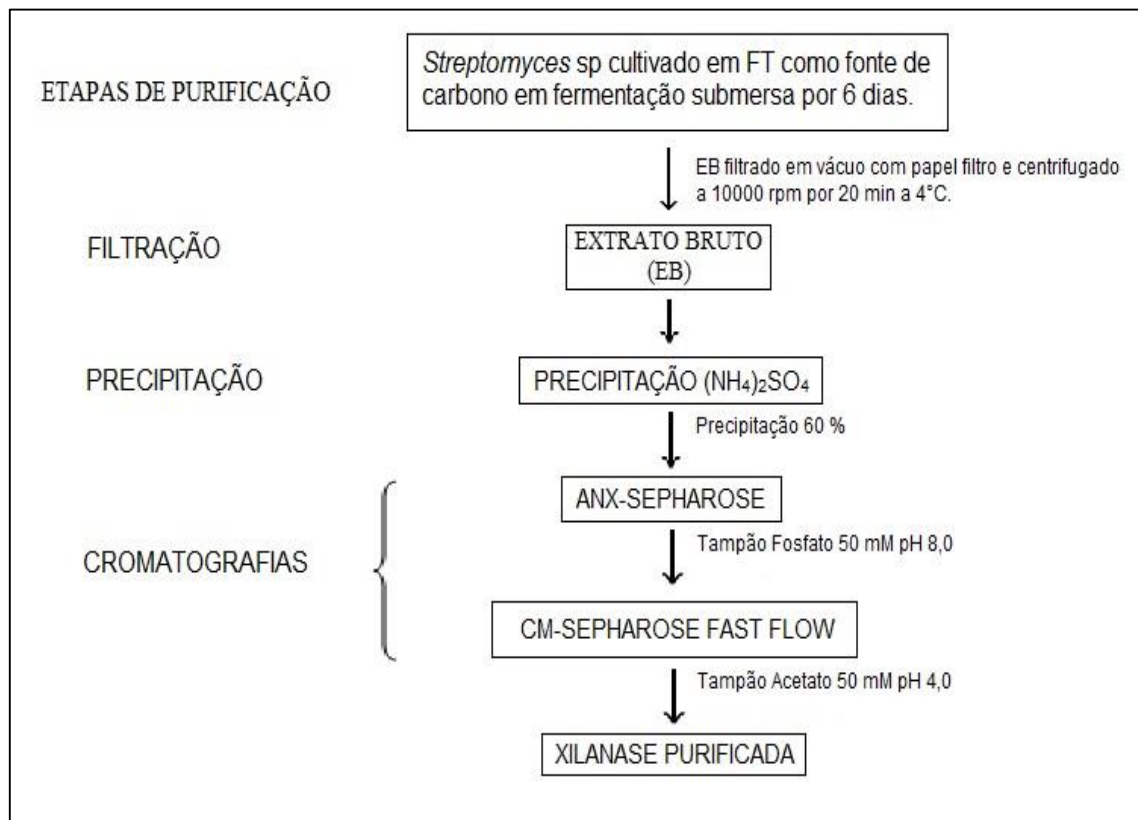


Figura 5. Representação esquemática das etapas de purificação de xilanase produzida por *Streptomyces thermocerradoensis* cultivado em farelo de trigo.

3.6. Caracterização da enzima purificada

3.6.1. Efeito da temperatura na atividade enzimática

O efeito da temperatura sobre a atividade xilanolítica da amostra purificada, foi determinado a pH 5,0 por 10 minutos no intervalo de temperatura de 30 a 80 °C. A atividade relativa foi determinada como 100% de atividade xilanolítica correspondente ao ensaio no melhor valor de temperatura dentro do intervalo analisado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6.2. Efeito do pH na atividade enzimática

O efeito do pH sobre a atividade xilanolítica da amostra purificada foi determinado nas melhores condições de temperatura por 10 minutos na faixa de pH de 3 a 10, com os seguintes tampões: Acetato de sódio (3 a 5); fosfato de sódio (6 a 7); Tris-HCl (8 a 9) e Glicina-NaOH (10,0). A atividade relativa foi determinada como 100% de atividade xilanolítica correspondente ao ensaio no melhor valor de pH dentro do intervalo analisado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6.3. Termoestabilidade da atividade enzimática

O ensaio para a determinação da termoestabilidade da amostra purificada foi realizado nas temperaturas e pH de melhor atividade. As amostras foram pré-incubadas a 40, 50 e 60 °C por 30 min; 1; 2; 4; 6 e 8 horas. A atividade relativa foi determinada como 100% de atividade xilanolítica correspondente ao ensaio realizado a partir de amostras retiradas no tempo zero dentro do intervalo analisado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6.4. Efeito dos íons

O ensaio com íons metálicos (Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , K^+ , Na^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+) e com o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) da amostra purificada foi realizado na temperatura e pH de melhor atividade nas concentrações de 1 e 10 mM. Como controle, as amostras foram incubadas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. A atividade relativa foi determinada como 100% de atividade xilanolítica correspondente ao controle. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6.5. Cinética enzimática K_m e $V_{máx}$

O efeito da concentração do substrato na velocidade da reação enzimática catalisada pela enzima purificada foi realizado avaliando-se a atividade enzimática em concentrações variáveis de substrato. O substrato utilizado foi xilana “oat spelt” na concentração de 2,5 até 5,0 mg/ml. Os dados foram calculados no programa SigmaPlot 12.3 utilizando as equações de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk.

3.7. Eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras purificadas contendo 30 µg/mL de proteína, foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 75% e fervidas por 5 minutos e resuspendidas em tampão de amostra Tris/HCl 0,5 M pH 6,8 contendo glicerol 10% (v/v), SDS 10% (p/v), 2β-mercaptoetanol e azul de bromofenol 0,05% (p/v). As amostras resuspendidas foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 12% (p/v) em condições desnaturantes, segundo LAEMMLI (1970). Foram utilizados os marcadores de massa molecular (Kid Unstained Protein Molecular WeightMarker, Termocientific): Beta-galactosidase (116 kDa), Soro albumina bovina (62,2 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Lactato Desidrogenase (35 kDa), REase Bsp98I (25kDa), Beta Lactoglobulina (18,4 kDa), Lisozima (14,4 kDa). O gel foi corado com prata para melhor visualização das bandas.

3.8. Zimograma

Para análise de zimograma, as amostras de extrato bruto e o purificado foram dialisadas e aplicadas em gel SDS-PAGE contendo 12% (v/v) de poliacrilamida, para atividade xilanase adicionou-se ao gel 0,1% (p/v) de xilana “oat spelt”. Após a corrida, o gel foi incubado em Triton X-100 a 2,5% (v/v) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente incubou-se por 2 horas a 50°C em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0, tendo sido o mesmo corado em solução 0,1 % (p/v) de vermelho de congo por 20 minutos. O gel foi lavado com NaCl 1 M até a visualização das bandas de atividade.

4. RESULTADOS

Os resultados seguintes referem-se à produção, purificação e caracterização de uma xilanase produzidas pelo actinomiceto *S. thermocerradoensis* quando cultivado em farelo de trigo como fonte de biomassa lignocelulósica.

4.1. Microrganismo e produção de esporos

A linhagem de *S. thermocerradoensis* foi cultivada em meio sólido MYA para produção de esporos. O isolado apresentou morfologia típica de *Streptomyces* como aspecto da colônia, produção de esporos e produção de agarase como se mostra na Figura 6.



Figura 6. Isolado de *Streptomyces thermocerradoensis* em meio MYA sólido.

4.2. Cinética de produção de xilanase com duas fontes de carbono

A figura 7 refere-se à análise da produção de xilanase cultivado com duas fontes de carbono por 4 dias a temperatura de 45 °C. Utilizou-se para esta avaliação o sobrenadante de cultura denominado extrato bruto (EB). Conforme pode ser observado, a atividade de xilanase induzida em FT teve maior atividade para estas condições de cultivo, com valor médio de 0,6564 U.I./mL, seguido da atividade de xilanase induzida com BCA com valor médio de 0,3449 U.I./mL. Com base na figura 7 é possível inferir que a utilização de FT no cultivo de *S. thermocerradoensis* induziu uma maior produção de xilanase. Desta forma, o EB do *S. thermocerradoensis* cultivado na presença de FT foi utilizado para proceder à purificação e caracterização de xilanase.

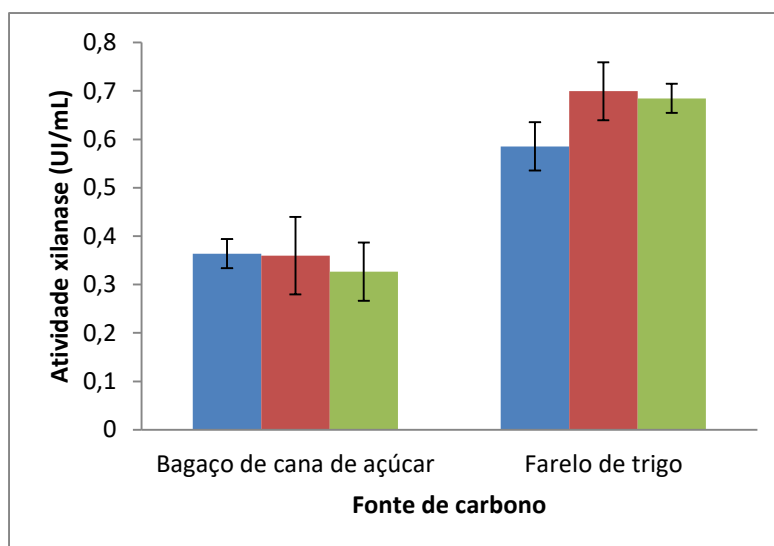


Figura 7. Determinação da atividade de xilanase produzidas por *Streptomyces thermocerradoensis* em diferentes fontes de carbono. As barras (azul, vermelho e verde), representam as réplicas biológicas do experimento. Barras verticais representam os valores do desvio padrão para triplicata técnica.

A figura 8 refere-se a produção de xilanase de *S. thermocerradoensis* induzida com farelo de trigo num tempo de 12 dias de incubação a 45 °C. A análise da atividade enzimática foi realizada todos os dias assim como a quantificação de proteínas totais. Pode-se observar que a maior produção de xilanase ocorreu no 6º dia de incubação, com valor de atividade enzimática de 1,32 U.I/mL, proteínas totais de 120 µg/mL e uma atividade específica de 11,0 UI/mg.

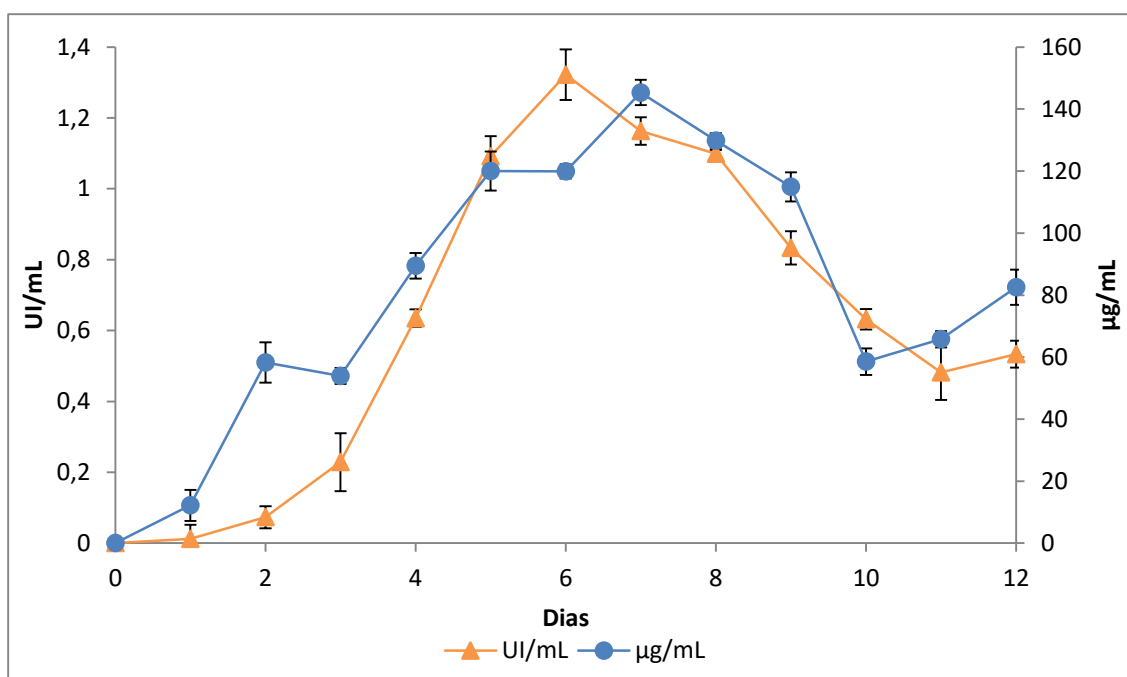


Figura 8. Análise de atividade xilanolítica e proteínas totais, produzida por *Streptomyces thermocerradoensis* cultivado em farelo de trigo num tempo de 12 dias.

4.3. Purificação de xilanase

Para purificação de xilanase foram utilizadas as seguintes estratégias: Uma etapa de precipitação com sulfato de amônio (60% p/v) e por duas etapas cromatográficas (coluna ANX-Sepharose e coluna de CM-Sepharose Fast flow).

A figura 9 apresenta o cromatograma do precipitado com sulfato de amônio em coluna ANX-Sepharose (1x5 cm), acoplada ao sistema AKTA (GE healthcare). Foi equilibrada com tampão Tris-HCl (50 mM pH 8,0) e com um gradiente de sal NaCl de 0,1 até 1,0 M. O perfil cromatográfico apresentou eluição de proteínas com atividade de xilanase nas frações 16 até 25, as quais foram analisadas suas atividades enzimáticas, proteínas totais e em gel SDS-PAGE. Após análise das frações, foi considerado para a etapa seguinte de purificação a fração 17 com atividade xilanolítica de 0,9 U.I/mL a qual foi coletada, concentrada, dialisada e armazenada a 4 °C para a posterior cromatografia de troca iônica.

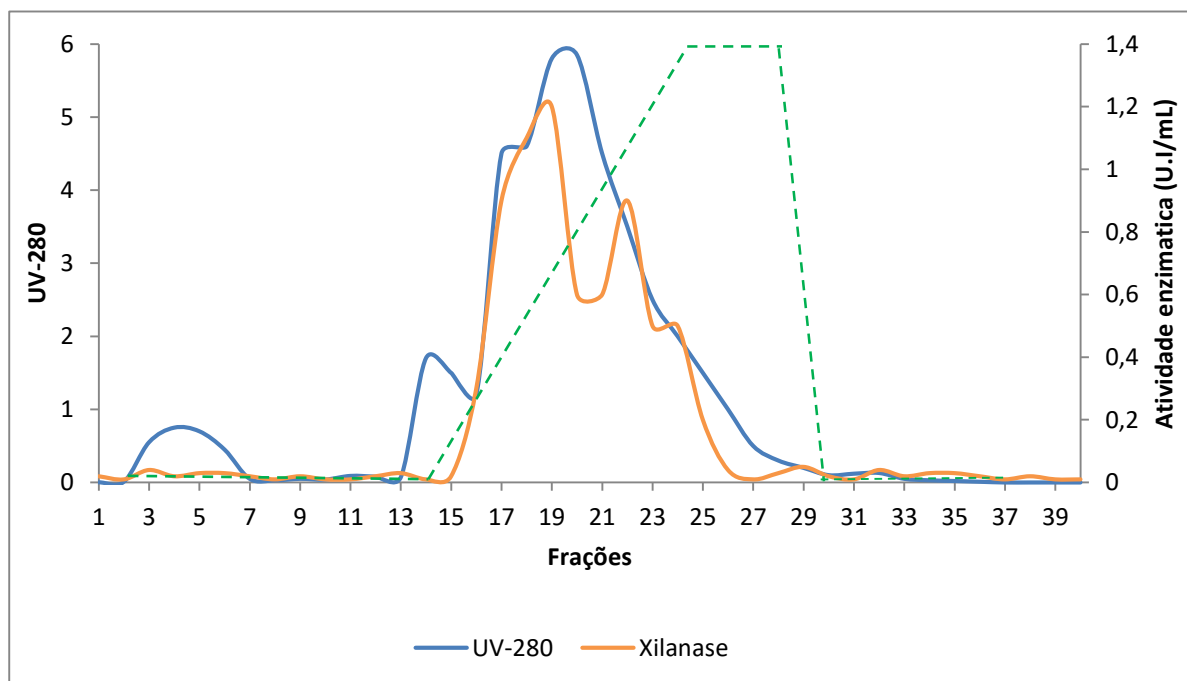


Figura 9. Cromatograma do precipitado com sulfato de amônio aplicado em ANX-Sepharose.

Uma vez que foi realizada a cromatografia na coluna ANX-Sepharose, a fração coletada foi aplicada em coluna CM-Sepharose FastFlow (CM-FF 1mL), acoplada ao sistema de AKTA (GE healthcare), equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0. O cromatograma desta etapa é apresentado na Figura 10.

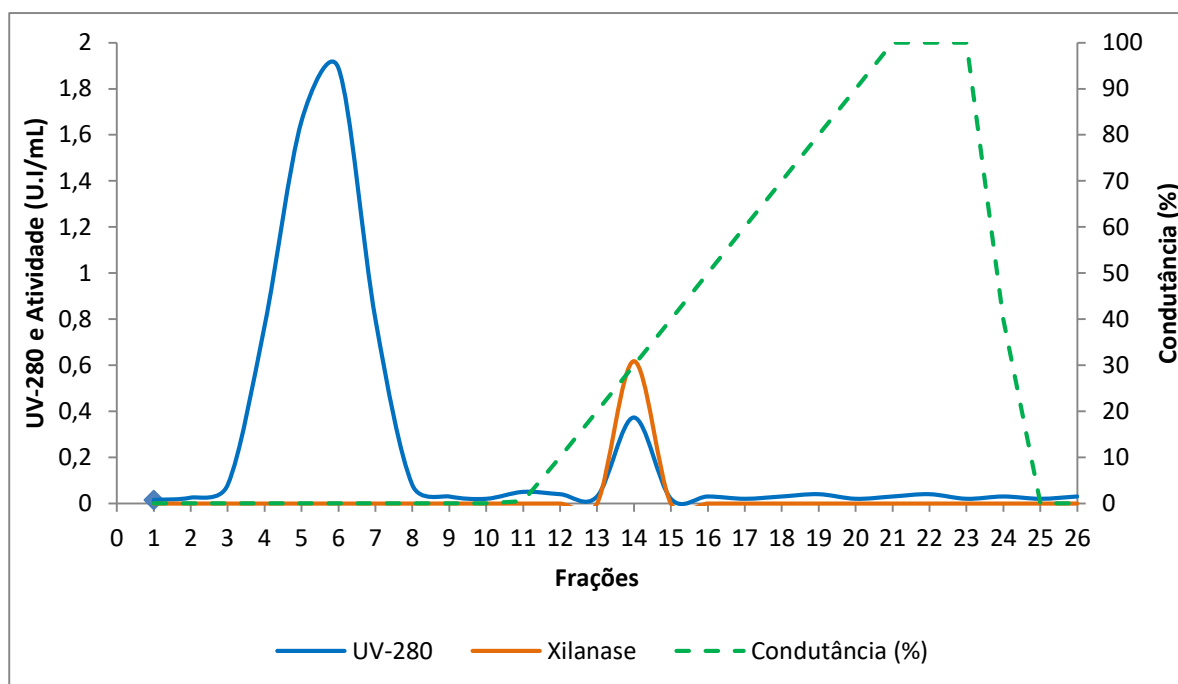


Figura 10. Cromatograma da fração purificada com atividade de xilanase obtida em coluna CM-Sepharose.

A partir da análise do cromatograma, é possível identificar dois picos de proteína (UV-280). O pico maior que foi eluído no início da cromatografia, não apresentou atividade xilanolítica, enquanto que o pico menor, o qual foi eluído durante o gradiente de cloreto de sódio (entre 25-35%), compreendendo a fração 14, apresentou atividade xilanolítica. O grau de pureza da fração contendo atividade de xilanase foi avaliado por SDS-PAGE e zimograma.

Tabela 2. Sumário das etapas de purificação da xilanase produzida por *Streptomyces thermocerradoensis* cultivado em farelo de trigo como fonte de carbono.

Etapas	Proteína total (mg)	Atividade total (U.l)	Atividade específica (U/mg)	Purificação (fold)	Rendimento (%)
Extrato bruto	38,25	386,10	10,10	1,0	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	11,73	249,51	11,48	1,1	64,6
ANX-Sepharose	1,86	51,80	27,85	2,8	13,4
CM-Sepharose	0,069	4,20	60,87	6,0	1,1

Conforme observado na tabela 2, referente às etapas de purificação. A atividade específica da enzima purificada aumentou (60,87 U.mg⁻¹), quando comparado com o extrato bruto (10,10 U.mg⁻¹). Também revelou valores de purificação 6,0 e rendimento de 1,1%.

4.4. SDS-PAGE e Zimograma

Para avaliar as etapas cromatográficas além da análise da atividade enzimática e quantificação de proteínas totais, foi necessário determinar o grau de pureza das frações mediante gel de poliacrilamida 12% (v/v), conforme observado na figura 11A. O extrato bruto (coluna 1) apresentou um conjunto de proteínas de diversas massas moleculares (23 kDa até 116 kDa), da mesma forma o precipitado com sulfato de amônio (coluna 2). O grau de purificação se observou a partir da coluna 3 (fração 17 da cromatografia AXN-Sepharose) mostrando 3 bandas, seguidamente a coluna 4 (fração 14 da cromatografia CM-Sepharose) mostrou 1 banda com massa molecular estimada de 33 kDa.

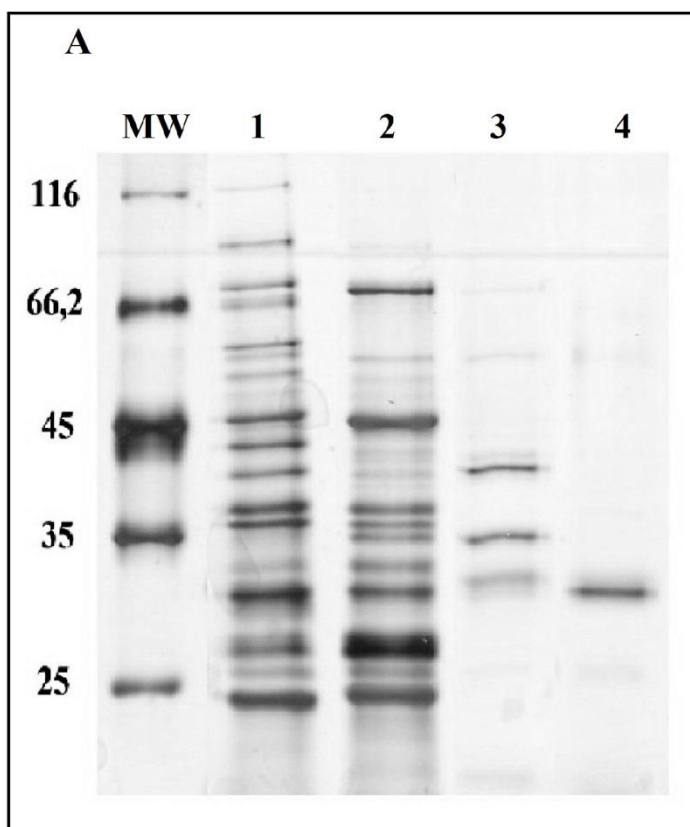


Figura 11. A) Avaliação do grau de pureza das frações cromatográficas com atividade de xilanase. Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE 12%). Marcador de massa molecular (MW); Amostra do EB (1); Precipitado com sulfato de amônio (2); Fração 17 de ANX-Sepharose (3); Fração 14 de CM-Sepharose (4). Coloração com nitrato de prata.

Para análise em gel de atividade, foi usada xilana “oatspelt” como substrato. O extrato bruto (coluna 1) mostrou 4 bandas com atividade de xilanase com massas moleculares estimadas de 45, 42, 37 e 33 kDa, enquanto a enzima purificada (coluna 4) apresentou uma massa molecular estimada de 33 kDa. (Figura 11B)

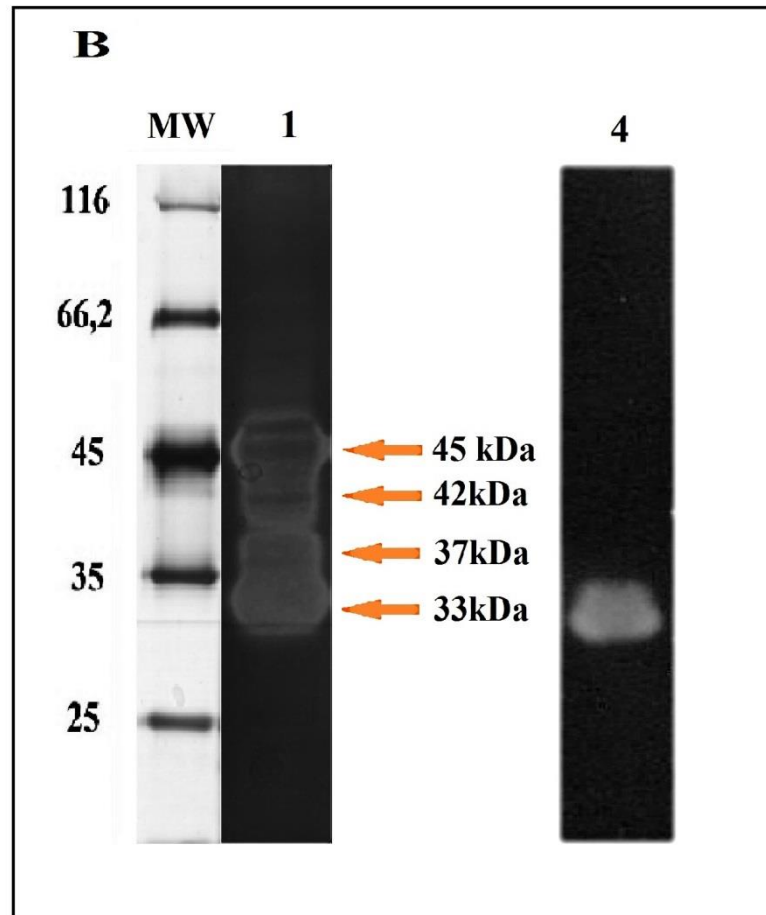


Figura 11B. Atividade em gel do extrato bruto e da fração purificada.

4.5. Caracterização das xilanases presentes no EB e da enzima purificada.

Após a purificação da enzima xilanase confirmada mediante análise de atividade xilanolítica, grau de pureza em gel de poliacrilamida (12%) e zimograma, a fração contendo a enzima purificada foi coletada, concentrada e dialisada para sua respectiva caracterização. Foi analisado o efeito do pH e temperatura na atividade xilanolítica e também foi determinado o pH e temperatura ótima. Determinou-se o efeito dos íons metálicos e EDTA na atividade xilanolítica assim como sua termoestabilidade em temperaturas de 40, 50 e 60°C.

O efeito do pH sobre a atividade de xilanase do extrato bruto (EB) e para a enzima purificada (Xyl) revelou que as duas amostras mantiveram as atividades enzimáticas superiores a 50% na faixa de pH de 4 a 8. O extrato bruto teve maior atividade em pH 6,0 e para a enzima purificada com pH 5,0. (Figura 12).

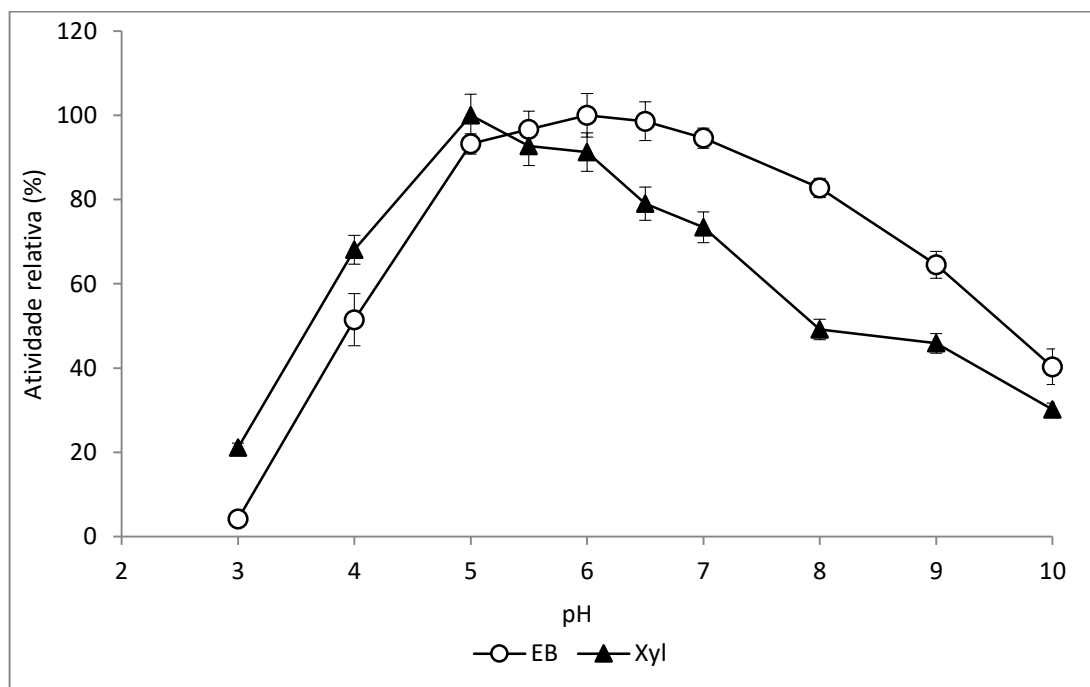


Figura 12. Efeito do pH na atividade xilanolítica do extrato bruto (EB) e da enzima purificada.

O efeito da temperatura sobre a atividade de xilanases contidas no EB, revelou 3 picos de atividade a 40, 55 e 65 °C e manteve uma atividade relativa acima de 60% nas temperaturas de 50 °C a 70°C. Para a enzima purificada (Xyl) observou-se 1 pico de atividade a 50°C, mantendo alta atividade na faixa de 40 a 60 °C com atividade maior a 65%. (Figura 13).

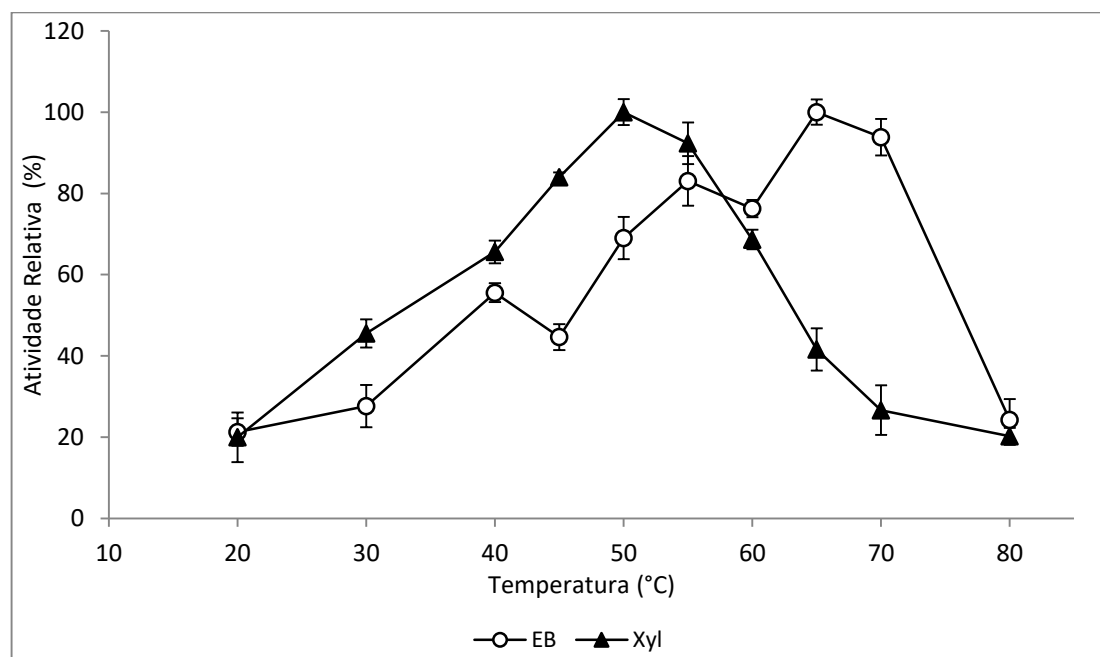


Figura 13. Efeito da temperatura na atividade xilanolítica do extrato bruto (EB) e da enzima purificada (Xyl).

A termoestabilidade das xilanases do EB também foi testada e os resultados estão apresentados na figura 14. Nesta figura observou-se que a amostra do extrato bruto permaneceu estável por 4 horas com atividade xilanolítica superior a 75%, nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C, após 8 horas a atividade diminui a 40%.

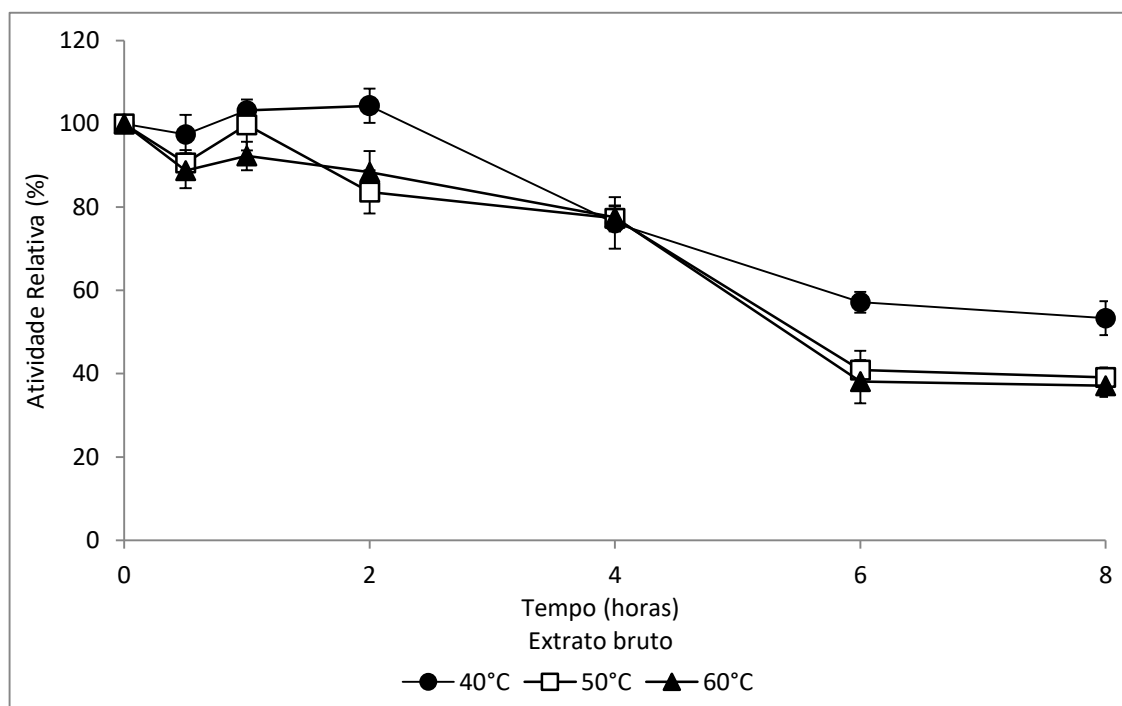


Figura 14. Termoestabilidade da atividade de xilanase do extrato bruto a temperaturas de 40, 50 e 60 °C.

A termoestabilidade da atividade de xilanase da enzima purificada é apresentada na figura 15. Após 2 horas de incubação a enzima manteve sua atividade em 80% a temperaturas de 40 e 50 °C, respectivamente, enquanto que na temperatura de 60 °C sua atividade desceu até 25%. Após 6 horas de incubação a enzima manteve sua atividade em 60% a 40°C e a temperaturas de 50 e 60°C a atividade permaneceu em 20%.

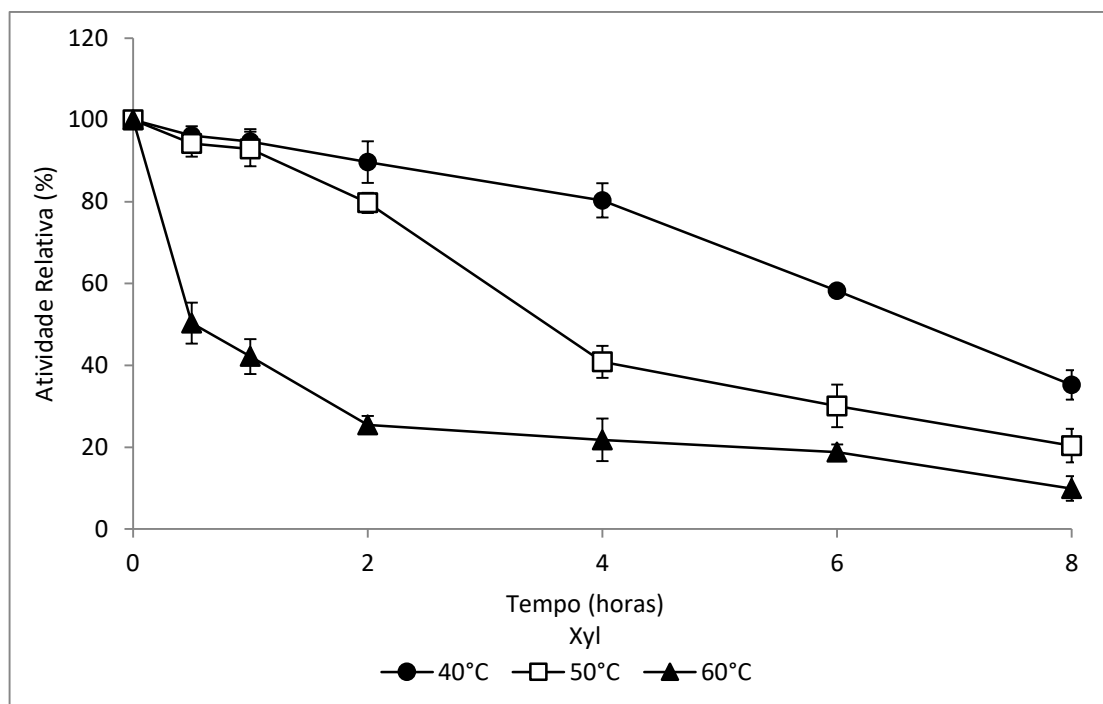


Figura 15. Termostabilidade da atividade da enzima purificada a temperaturas de 40, 50 e 60°C.

O efeito de íons metálicos e EDTA sobre a atividade xilanolítica da enzima purificada estão apresentados na tabela 3. Conforme observado na tabela, em presença de EDTA 10 mM, a atividade da enzima foi reduzida a 84%. A enzima purificada na presença de Hg^{2+} na concentração de 1 e 10 mM, a atividade da enzima foi reduzida a 39 e 5%, respectivamente. Outro íon cuja presença inibiu quase por completo a atividade da enzima foi o íon Ag^{1+} na concentração de 1 e 10 mM com atividade de 50 e 2%, respectivamente. O íon Fe^{3+} inibiu fortemente a atividade xilanase nas duas concentrações de 1 e 10 mM com atividades de 8 e 7%, respectivamente.

Os níveis de atividade aumentaram em presença de Co^{2+} na concentração de 1 e 10 mM com atividade de 141 e 189%, respectivamente. Os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} também promoveram um aumento da atividade a 159 e 215%, respectivamente. De maneira geral, a enzima purificada apresentou-se estável em presença de boa parte dos íons testados.

Tabela 3. Efeito dos íons metálicos e EDTA sobre a atividade xilanólítica da enzima purificada. Atividade relativa é expressa em porcentagem em relação ao controle (100% com atividade enzimática de 0,794 UI mL⁻¹ da enzima purificada).

	1 mM	10 mM
Ions específicos	Atividade relativa (%)	Atividade relativa (%)
Controle	100 ± 0,02	100 ± 0,04
CoCl ₂	141 ± 0,2	189 ± 0,2
MnCl ₂	153 ± 0,1	215 ± 0,1
MgCl ₂	101 ± 0,3	128 ± 0,3
CaCl ₂	128 ± 0,2	159 ± 0,1
ZnCl ₂	115 ± 0,2	122 ± 0,3
KCl	74 ± 0,1	109 ± 0,2
NaCl	97 ± 0,4	114 ± 0,2
CuCl ₂	110 ± 0,3	35 ± 0,1
FeCl ₃	8 ± 0,1	7 ± 0,1
HgCl ₂	39 ± 0,2	5 ± 0,2
AgNO ₃	50 ± 0,2	2 ± 0,4
EDTA	92 ± 0,2	84 ± 0,3

4.6. Parâmetros cinéticos

A enzima purificada foi testada perante as condições crescentes de substrato (xilana “oatspelt”) para cálculo de K_m e V_{max} . Os parâmetros cinéticos foram calculados para a atividade de xilanase, obtendo valores de K_m 3,5 mg ml⁻¹ e $V_{máx}$ de 0,5955 µmol min⁻¹. Os resultados se mostram nas figuras 16 e 17, respectivamente.

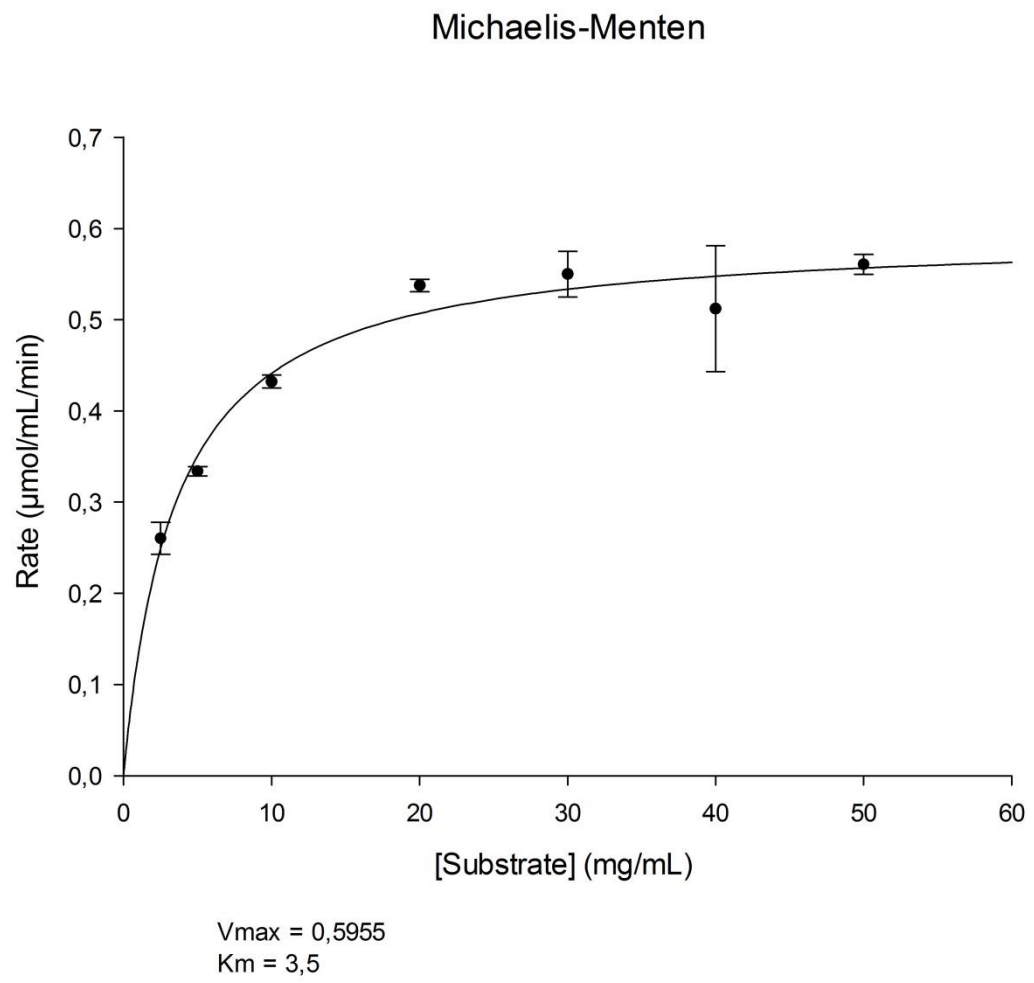


Figura 16. Curva de Michaelis-Menten utilizando substrato xilana oat spelt.

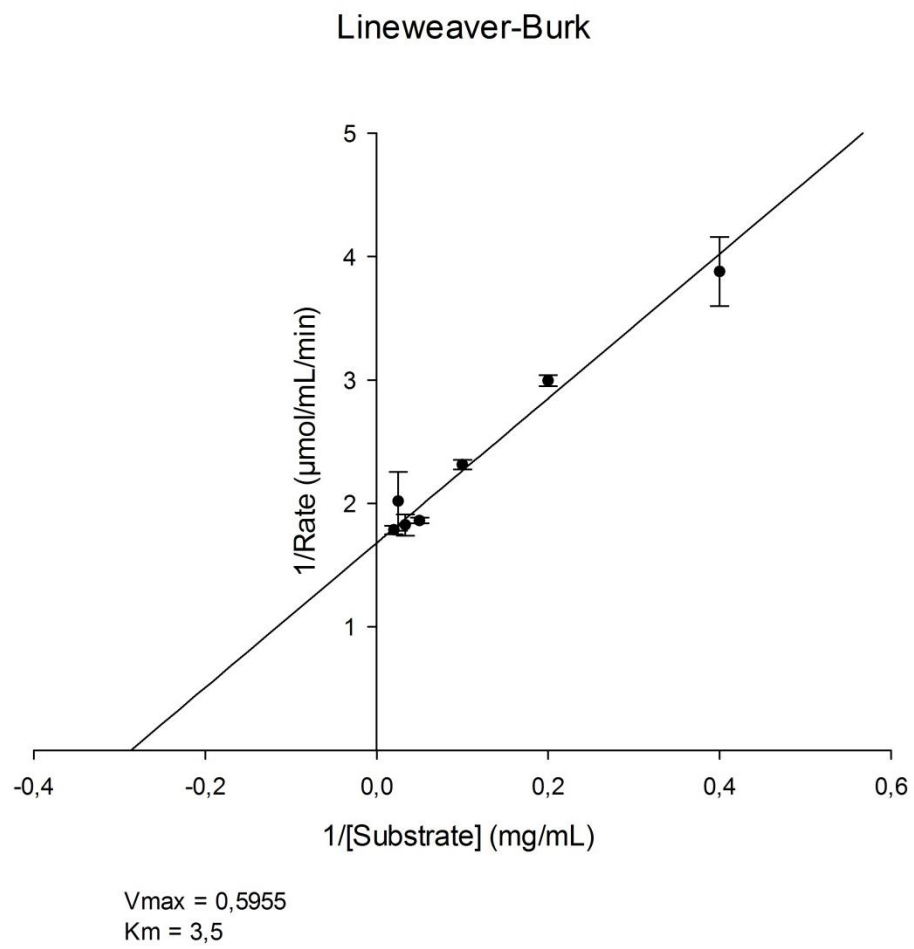


Figura 17. Gráfico de Lineweaver-Burk. Dados gerados a partir do gráfico de Michaelis-Menten.

5. DISCUSSÃO

A xilana é o principal polissacarídeo da hemicelulose constituído por cadeias 1,4- β -D-xilose e constitui 20-40% da biomassa total da planta. A total hidrólise enzimática da xilana requer a ação cooperativa de endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8), β -xilosidase (EC 3.2.1.37) e uma série de enzimas que degradam os grupos da cadeia lateral. Entre estes, endo- β -1,4-xilanase é a enzima mais importante porque cliva ligações glicosídicas para liberar cadeias curtas de oligossacarídeos.

A capacidade de hidrólise da biomassa lignocelulolítica por *Streptomyces* foi relatada no trabalho de SINGH et al., (2014) por análise proteômica, quando crescido em palha de arroz, produziu uma grande quantidade de celulases, hemicelulases, proteases e proteínas complementares. A atividade xilanolítica tem sido relatada frequentemente por diferentes espécies de *Streptomyces*, tais como *S. actuosus* (WANG et al., 2003), *S. cyaneus* (NINAWA et al., 2008), *S. halstedii* (RUIZ et al., 1995), *S. matensis* (YAN et al., 2009), *S. olivaceoviridis* (WANG et al., 2007), *S. roseiscleroticus* (ANTHONY et al., 1991), *S. thermoviolaceus* (SUJIBO et al., 1992) e *S. viridosporus* (MAGNUSON & CRAWFORD, 1997).

Na figura 6 pode-se observar o isolado de que se trata o estudo quanto cultivado em meio MYA sólido, mostra morfologia típica de *Streptomyces*, como aspecto da colônia, produção de esporos e produção de agarase como descrito por BRITO-CUNHA et al., (2013). A grande produção de resíduos lignocelulósicos que incluem bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, casca de arroz, palha de trigo, palha de arroz, palha de milho, bagaço de laranja entre outros, tem diferentes quantidades de componentes celulósicos, tornando-se uma fonte essencialmente inesgotável de matéria-prima para produtos ambientalmente amigáveis e biocompatíveis. Vários autores relatam a utilização de resíduos lignocelulósicos como substrato para produção de enzimas de interesse industrial (SÁNCHEZ, 2009; SIQUEIRA & FILHO, 2010; SAHA, 2003; SONI & KANGO, 2013).

Um fator importante para a produção de xilanases é a escolha de um substrato apropriado como fonte de carbono. Este foi estudado por SINGH et al. (2012), que utilizou resíduos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, farelo de arroz, sabugo de milho e palha de trigo) avaliando a produção simultânea de xilanases e amilases por actinomicetos termófilas.

A cinética de produção de xilanase mostrou que o farelo de trigo foi o melhor indutor de xilanase quando comparado com bagaço de cana-de-açúcar como se mostra na figura 7. No estudo de SUN et al., (2007) mostraram os efeitos da composição do farelo de trigo na produção de enzimas celulolíticas, enquanto no trabalho de REISINGER et al.,(2013) estudaram o tratamento hidrotérmico e enzimático em farelo de trigo obtendo uma grande recuperação de açúcares. O farelo de trigo é rico em carboidratos, proteínas e vitaminas assim também como ácidos fenólicos e fitoesteróis. Todos estes constituintes do farelo de trigo fazem com que ele seja um bom indutor de xilanases (BRITO-CUNHA et al., 2013). A composição celulose (30%), hemicelulose (50%) e lignina (20%) do farelo de trigo, também têm influência na produção enzimática (SAHA et al., 2003).

A purificação da enzima com atividade xilanolítica foi realizada precipitando o extrato bruto com sulfato de amônio com rendimento de 64.6% de atividade como se mostra na tabela 2. Para as etapas cromatográficas, a amostra precipitada com sulfato de amônio, foi fracionada em coluna AXN-Sepharose (figura 9) a partir do qual foi selecionada a fração 17 que constituiu o pool amostral que foi submetido à troca catiônica em coluna de CM-Sepharose (figura 10). Entretanto, a tabela 2 revelou também valores de purificação e rendimento baixos, correspondentes apenas 13.4 e 1.1% respectivamente, indicando que houve perda de atividade ou que a amostra foi diluída na coluna.

Uma explicação pelo baixo rendimento pode ser devido à perda de enzima durante o procedimento de purificação, porque apenas uma fração (fração 17 da coluna de AXN-Sepharose), com atividade de xilanase foi recuperado, a fim de aumentar a pureza da enzima.

Outra possibilidade para melhorar a resolução da cromatografia e sua atividade, poderia ser a troca por uma matriz de filtração em gel Sephadex G-50, isto sabendo que a enzima tem uma massa molecular aproximada de 33 kDa como se mostra na figura 11.

O gel de SDS-PAGE (figura 11A) mostra o grau de pureza dos passos cromatográficos e pode-se observar que houve uma pequena diferença entre as frações do extrato bruto e o precipitado com sulfato de amônio, mas sim teve diferença com a amostra da cromatografia de troca aniônica (AXN-Sepharose), (fração 17) ficando com 3 bandas, o qual foi passada por uma segunda cromatografia de troca catiônica em coluna CM-Sepharose, conseguindo purificar a proteína com atividade xilanólítica e uma massa molecular estimada de 33 kDa, similar a uma xilanase produzida por *Streptomyces* sp. 7b (30 kDa) reportado por BAJAJ & SINGH, (2010). No entanto outras xilanases purificadas com menor massa molecular foram reportados. NINAWA *et al.* (2008) purificaram uma xilanase com massa molecular de 20.5 kDa; RAHMAN *et al.*, (2014) uma xilanase de 18.1 kDa de *Streptomyces* sp cultivado em farelo de trigo; ELEGIR *et al.* (1994) duas xilanases de 26.4 e 23.8 kDa de *Streptomyces* sp. strain B-12; LI *et al.*, (2010) uma xilanase de 20.5 kDa de *Streptomyces cyaneus* SN32. Também foram reportados xilanases purificadas com massa molecular maior ao descrito em nosso trabalho, JIE *et al.*, (2014) uma xilanase de 43 kDa e CHI *et al.* (2013) uma xilanase de 52 kDa de *Streptomyces thermocarboxydus*.

A amostra do extrato bruto apresentou 4 bandas com atividade xilanase com massas moleculares estimadas de 45, 42, 37 e 33 kDa como se evidencia no zimograma da figura 11B. A maioria dos *Streptomyces* produzem pelo menos duas xilanases. A produção de múltiplas xilanases é atribuída principalmente à heterogeneidade da xilana, que precisa de várias xilanases com especificidades diferentes para sua completa hidrólise (KULKARNI *et al.*, 1999).

Do mesmo modo, CUNHA-BRITO *et al.* (2013) observaram 4 bandas com atividade de xilanase em *Streptomyces* no extrato bruto; SHARMA & BAJAJ, (2005) reportaram 3 xilanases no extrato bruto (69, 63 e 43 kDa) produzidos por *Streptomyces* sp cultivado em farelo de trigo. Também RAJ *et al.* (2013)

identificaram 7 xilanases no extrato bruto (33, 35, 40, 48, 60, 75 e 95 kDa) quando *Providencia sp* foi cultivado em farelo de trigo.

A caracterização das enzimas é um passo importante para entender o comportamento e posterior utilização nos processos biotecnológicos. Na figura 12, pode-se observar o efeito do pH na atividade xilanolítica da enzima purificada. O extrato bruto (EB) e a enzima purificada (Xyl), tiveram uma atividade superior a 85 % na faixa de pH 5 a 7. Semelhante ao trabalho de XIUTING *et al* (2010) que purificaram uma xilanase de *Streptomyces rameus* com pH ótimo de 5,3 e se manteve estável na faixa de pH 4,3 – 6,7.

O efeito da temperatura também é um fator importante nos processos biotecnológicos. Na figura 13 pode-se observar que o extrato bruto mostra 3 picos de atividade a diferentes temperaturas, possivelmente pela ação de enzimas xilanolíticas com características semelhantes, fato que é comum em cultivos induzidos com resíduos lignocelulósicos, como é relatado no trabalho do NASCIMENTO *et al.* (2002), que observaram 4 isoformas de endoxilanases quando foram cultivados em gérmen e farelo de trigo. A enzima purificada (Xyl) mostrou maior atividade a 50°C. No trabalho de NADIA *et al.*, (2010) está relatada a presença de uma xilanase purificada com temperatura ótima de 50°C. Outros autores NINAWA *et al.* (2008); XIUTING *et al.* (2010); JIE *et al.* (2014); WARIN *et al.* (2013), também relatam enzimas purificadas de *Streptomyces* com temperaturas ótimas de 65, 70, 60 e 40°C, respectivamente.

A avaliação da termoestabilidade é um fator importante levado em consideração na hidrólise enzimática para aplicações biotecnológicas. O extrato bruto nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C, incubado durante 8 horas demonstrou que as xilanases mantiveram sua estabilidade acima de 85% por 2 horas, após diminui para 40% (Figura 14). No caso da termoestabilidade da enzima purificada, esta permaneceu com atividade xilanolítica superior a 80 % por 2 horas quando incubado a temperatura de 40 e 50 °C, após 2 horas diminui a 25%, e o ensaio realizado a 60°C a atividade foi reduzida até 20% (Figura 15). Segundo VINHA *et al.*, (2011) o extrato bruto de *Streptomyces viridobrunneus*, manteve 76% da atividade de xilanase quando incubada a 50°C por 2 horas. No

trabalho de SHI et al., (2012) a xilanase purificada, permaneceu com atividade superior a 80% por 1 hora a temperatura de 50 e 60°C.

A inibição da enzima purificada pelos íons metálicos também foi estudada neste trabalho e se mostra na tabela 3. A atividade de xilanase foi fortemente inibida pelos íons Hg^{2+} , Ag^{3+} , e Fe^{3+} , e esta inibição pode ser atribuída a interação destes metais com agrupamentos sulfidríla (como os presentes nos resíduos de cisteína), bem como com resíduos nitrogenados (como lisina e histidina) associados a centros ativos de enzimas (NIEBOER & RICHARDSON, 1980). O trabalho de BRITO-CUNHA et al. (2013) também descreve inibição da atividade xilanase por Hg^{2+} e Ag^{3+} ; NASCIMENTO et al. (2002) observou inibição por Fe^{3+} .

Os níveis de atividade xilanolítica da enzima purificada aumentaram na presença de 1 mM de Co^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} em 189, 159 e 215%, respectivamente (tabela 3). Estes resultados também foram descritos no trabalho de SHI et al., (2013). O íon Ca^{2+} tem sido reportado como ativador enzimático na estabilização do complexo enzima-substrato melhorando a atividade enzimática (JUTURU & WU, 2012). No trabalho de XIUTING et al. (2010) reportaram um aumento da atividade de xilanase de *S. rameus* L2001 purificada na presença de Co^{2+} a 329%; NADIA et al. (2010) reportou aumento de atividade com Mn^{2+} . O efeito do EDTA sobre a xilanase não demonstrou uma importante diminuição da atividade.

Foram realizados também ensaios enzimáticos de xilanase para definir os valores de K_m e $V_{\text{máx}}$ (Figura 16 e 17). Os valores encontrados para a enzima purificada foram de 3,5 mg ml^{-1} para K_m e $V_{\text{máx}}$ de 0,5955 $\mu\text{mol min}^{-1}$. O valor de K_m encontrado neste trabalho é inferior ao de outras xilanases de espécies do gênero *Streptomyces* purificadas, demonstrando um ponto positivo, uma vez que a enzima apresenta uma alta afinidade pelo substrato. NINAWA et al., (2008) verificaram K_m correspondente a 11,1 mg ml^{-1} para a xilanase de *Streptomyces cyaneus* SN32. A xilanase de *Streptomyces rameus* apresentou um K_m de 5,8 mg ml^{-1} (LI et al., 2010). A xilanase de um actinomiceto caracterizada por WANG et al., (2012) apresentou um K_m de 3,6 mg ml^{-1} .

6. CONCLUSÕES

- A linhagem de *S. thermocerradoensis* isolado a partir do bagaço de cana-de-açúcar seco em contato com solo de Cerrado, foi capaz de crescer em bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo utilizando estes materiais lignocelulósicos como fonte de carbono;
- A cinética de produção enzimática foi avaliada, determinando o farelo de trigo como melhor indutor de xilanase;
- Uma xilanase foi purificada através de cromatografias de troca aniônica (AXN-Sepharose) e troca catiônica (CM-Sepharose);
- Esta enzima purificada apresentou maior atividade a 50°C, bem como em pH 5,0.
- A termoestabilidade da enzima manteve em 85% a temperatura de 40 e 60°C por 2 horas.
- A atividade desta enzima purificada foi inibida por Fe^{3+} , Ag^{3+} e Hg^{2+} e ativada por Co^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} .
- Foram encontrados K_m e $V_{\text{máx}}$ de 3,5 mg ml⁻¹ e 0,5955 μmol min⁻¹, respectivamente.

7. PERSPECTIVAS

- Dar continuidade na purificação e caracterização das outras xilanases presentes no extrato bruto.
- As enzimas purificadas serão submetidas à identificação por espectrometria de massas (LC-MS/MS)
- Com os resultados gerados, planejar uma estratégia de sacarificação de biomassa com a enzima purificada e a mistura das diferentes xilanases.
- Avaliar os tipos de açúcares liberados na sacarificação de biomassa com as misturas enzimáticas.
- Comparar as misturas enzimáticas produzidas no laboratório com preparações enzimáticas industriais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO D M, WETTSTEIN S G, MELLMER M A, GURBUZ E I, DUMESIC J A (2013) Integrated conversion of hemicellulose and cellulose from lignocellulosic biomass. *Energy Environ. Sci.* 6:76-80.

ANDERSON A S, WELLINGTON E M H (2001) The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal Systematic and evolutionary Microbiology*, v. 51, p. 797-814.

ANTHONY CG, THOMAS WJ (1991) Production, purification, and characterization of α -(1,4)-endoxylanase of *Streptomyces roseiscleroticus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 57:987–992.

BAYRAM I, SADICETINGUL A, AKKAYA B, UYARLAR C (2008). Effects of bacterial xylanase on egg production in the laying quail (*Coturnixcoturnix japonica*) diets based on corn and soybean meal. *Arch. Zootech.* 11, 69–74.

BAJAJ BK, SINGH (2010) Production of xylanase from an alkali tolerant *Streptomyces* sp. 7b under solid-state fermentation, its purification, and characterization. *ApplBiochemBiotechnol.* 162:1804-18.

BEG QK, KAPOOR M, MAHAJAN L, HOONDAL GS (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *ApplMicrobiolBiotechnol.* 56:326–338.

BRADFORD M (1976) 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.

BRITO-CUNHA CC, CAMPOS I T N, FARIA F P, BATAUS L A M. Screening and Xylanase Production by *Streptomyces* sp. Grown on Lignocellulosic Wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 170, p. 598-608, 2013.

CASTRO AM, PEREIRA M (2010) Produção, propriedades e aplicações de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. 33:181-188.

CHI W-J, LIM JH, PARK Y, PARK JS, HONG S-K (2013) Production and characterization of a thermostable endo-type β -xylanase produced by a newly-isolated *Streptomyces thermocarboxydus* subspecies MW8 strain from Jeju Island. 48:1736–1743.

COUGHLAN MP, HAZLEWOOD GP. (1993) β -1,4-D-xylan degrading enzyme system: biochemistry, molecular biology, and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 17:259-289.

DILLON A, GUPTA JK, KHANA AS (2000) A cellulose-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. *Bioresource technology*. 73:273-277.

ELEGIR G, SZAKÁCS G, JEFFRIES TW (1994). Purification, characterization, and substrate specificities of Multiple Xylanases from *Streptomyces* sp. Strain B-12-2. *Appl Environ Microbiol*. 60:2609-15.

ELLIOT M A, FLARDH K. *Streptomycete Spores* (2012) In: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

FARINAS C S, LEMO V, RODRIGUES U F, NETO V B, COURI S. (2008) Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para produção de celulasas por fermentação semi-sólido. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento—EMBRAPA* 22.

FLARDH K, BUTTNER M. (2009) *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature*. 7:46-29.

JIE H, LINGQIA S, XIAOJUN S, JIAJIA F, JIAN C, JING W (2014). A novel xylanase from *Streptomyces* sp. FA1: Purification, characterization, identification,

and heterologous expression. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*.19:8-17.

JUTURU V, WU JC (2014). Microbial Exo-xylanases: A Mini Review. *ApplBiochemBiotechnol*. 174:81–92.

JUTURU V, WU JC (2013). Insight into microbial hemicellulases other than xylanases: a review. *J ChemTechnolBiotechnol*. 88: 353–363.

JUTURU V, WU JC (2012). Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances* 30:1219–1227.

KULKARNI N, SHENDYE A, RAO M (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanase.*FEMS Microbiol Rev*. 23:411– 56.

KUMAR R, SINGH S, SINGH OV (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J IndMicrobiolBiotechnol*. 35:377–391.

LAEMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins assembly of the head of bacteriophage T4.*Nature*. 227: 680-685.

LI PP, WANG XJ, YUAN XF, WANG XF, CAO YZ, CUI ZJ (2011). Screening of a composite microbial system and its characteristics of wheat straw degradation. *Agric. Sci. China* 10, 1586–1594.

LI X, SHE Y, SUN B, SONG H, ZHU Y, LV Y, SONG H (2010). Purification and characterization of a cellulase-free, thermostable xylanase from *Streptomyces rameus* L2001 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. *Biochemical Engineering Journal*.52:71–78.

LYND LR, WEIMER PJ, ZYL WHV, PRETORIUS IS (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*. 3:506-577.

MAGNUSON TS, CRAWFORD DL. Purification and characterization of an alkaline xylanase from *Streptomyces viridosporus* T7A (1997) *Enzyme Microb. Technol.* 2:160–164.

MARTINEZ AT, SPERANZA M, RUIZ DFJ, FERREIRA P, CAMARERO S, GUILLÉN F (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *IntMicrobiol.* 8:195–204.

MILLER L (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 31:426-428.

NASCIMENTO RP, COELHO RRR, MARQUES S, ALVES L, GÍLIO FM, BOM EPS, AMARAL-COLLAÇO MT (2002). Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology.* 31:549–555.

NADIA H, EL-NASSER A, AMAL MA, KEERA KA (2010) Xylanase Production by *Streptomyces Lividans* (NRC) and Its Application on Waste Paper. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4:1358-1368.

NINAWA S, KAPOOR M, KUHAD RC (2008) Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32, *Bioresour. Technol.* 99:1252–1258.

NIEBOER E, RICHARDSON DHS (1980) The replacement of the nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ Poll Series B - Chem Phys.* 1:3–26.

PATRA AK, MADHU A (2010). Studies on enzymatic pretreatment of linen. *Indian J. Fibre Text.* 35, 337–341.

PÉREZ J, MUÑOZ D J, DE LA RUBIA T, MARTÍNEZ J (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. *International Microbiology.* 5:53-63.

PRIDHAM TG, ANDERSON P, FOLEY C, LINDENFELSER LA, HESSETINE CW, BENEDICT RG (1956) A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. *Antibiotics Annu.* 57: 947–953.

RAHMAN MA, CHOI YH, PRADEEP GC, CHOI YS, CHOI EJ, CHO SS, YOO JC (2014) A Novel Low Molecular Weight Endo-xylanase from *Streptomyces* sp. CS628 cultivated in Wheat Bran. *ApplBiochemBiotechnol.* 173:1469–1480.

RAJ A, KUMAR S, SINGH SK, KUMAR M (2013) Characterization of a new *Providencia* sp. strain X1 producing multiple xylanases on wheat bran.

REHM H J, REED G, PUHLER A, STADLER P (1993) *Biotechnology: A Multi-volume Comprehensive Treatise*. Eds, VCH: New York 1, cap, 13.

REISINGER M, TIRPANALAN O, PRUCKLER M, HUBER F, KNEIFEL W, NOVALIN S (2013). Wheat bran biorefinery – A detailed investigation on hydrothermal and enzymatic treatment. *Bioresource Technology*.144:179–185.

RUIZ AA, FERNANDEZ JM, SANCHEZ P, GARDA A, SANTAMARIA RI (1995) Overproduction, purification, and biochemical characterization of a xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8, *Appl. Environ. Microbiol.* 6:2414–2419.

SAHA D C (2003) Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.30:279-291.

SÁNCHEZ C (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27:185–194.

SARKAR N, GHOSH S K, BANNERJEE S, AIKAT K (2012) Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. 37:19–27.

SCHREMPF H. Streptomycetaceae: Life Style, Genome, Metabolism and Habitats. (2008). In: Encyclopedia of Life Sciences (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

SHARMA P & BAJAJ B (2005). Production and partial characterization of alkali-tolerant xylanase from alkalophilic *Streptomyces* sp. CD3. *Journal of scientific and industrial research*. 64:688-797.

SHI K, ZHANG Y, LI X, HUANG Y, WANG L, WANG Y, DING L H, WANG F (2013). A novel highly thermostable xylanase stimulated by Ca^{2+} from *Thermotoga thermarum*: cloning, expression and characterization. *Biotechnology for Biofuels*. 6:26.

SHI P, QIU Z, BAI Y, YUAN T, HUANG H, PAN X, YANG P, ZHANG W, YAO B (2012). A new xylanase from *Streptomyces megasporus* DSM 41476 with high yield of xylobiose. *World J Microbiol Biotechnol* (2012) 28:687–692.

SIQUEIRA FG, FILHO EX. Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications (2010) *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. 7:54-60.

SINGHANIA R R, SUKUMARAN R K, PATEL A K, LARROCHE C, PANDEY A (2010) Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*. 46:541-549.

SINGH S, TIWARI R, RENUSE S, PRANAW K, NAIN L (2014) Proteomic analysis of *Streptomyces* sp. ssr-198 grown on paddy straw. *J. Basic Microbiol*. 54:1–8.

SINGH R, KAPOOR V, KUMAR V (2012). Utilization of agro-industrial wastes for the simultaneous production of amylase and xylanase by thermophilic actinomycetes. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43: 1545-1552

SONI H, KANGO N (2013) Hemicellulases in Lignocellulose Biotechnology: Recent Patents. *Recent Patents on Biotechnology*.7:207-218.

SUBRAMANIYAN S, PREMA P (2002). *Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application. Critical Reviews in Biotechnology*. 22:33–64.

SUJIBO T, MIYAMOTO HK, KUDA T, MINAMI K, SAKAMOTO T, HASEGAWA T, INAMORI Y (1992) Purification, properties and partial amino acid sequences of thermostable xylanase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520, *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 58:371–375.

TUOMELA M, Vikman M, Hatakka A, Itavaara M (2000) Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *BioresourceTechnology*.72:169-183.

ÚNICA. 2014, Produção de cana de açúcar do Brasil Safra 2013/2014. Disponível em: <http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem>.

VERMA D, SATYANARAYANA T (2012). Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases. *Bioresource Technology*. 117:360–367.

WANG YR, ZHANG HL, HE YZ, LUO HY, YAO B (2007) Characterization, gene cloning, and expression of a novel xylanase XYNB from *Streptomyces olivaceoviridis* A1, *Aquaculture*. 267:328–334.

WANG M, ZHONGHAI L, FANG X, WANG L, QU Y (2012). Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production. *AdvBiochemEngin/Biotechnol*. 128: 1–24.

WANG W, WANG Z, CHENG B, ZHANG J, LI C, LIU X, YANG C (2014). High secretory production of an alkaliphilic actinomycete xylanase and functional roles of some important residues. *World J MicrobiolBiotechnol* 30:2053–2062.

WANG SL, YEN YH, SHIH IL, CHANG AC, CHANG WT, WU WC, CHAI YD (2002) Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151, *Enzyme Microb. Technol.* 33:917–925.

WARIN D, YUICHI N, TATSUJI S, WASANA S (2013) Purification, Characterization of GH11 Endo-b-1,4-xylanase from Thermotolerant *Streptomyces* sp. SWU10 and Overexpression in *Pichia pastoris* KM71H. *MolBiotechnol.* 54:37–46.

WILLEY J M, WILLINAS A, KODANI S, NODWELL J R (2006) Morphogenetic surfactants and their role in the formation of aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology.* 59:731-742.

XIUTING L, YUANLI S, BAOGUO S, HUANLU S, YUNPING Z, YUENGANG L, HONGXIA S (2010) Purification and characterization of a cellulase-free, thermostable xylanase from *Streptomyces rameus* L2001 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. *Biochemical Engineering Journal.*52:71–78.

YAN QJ, HAO SS, JIANG ZQ, ZHAI Q, CHEN WW (2009) Properties of a xylanase from *Streptomyces matensis* being suitable for xylooligosaccharides production, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 58:72–77.

YANG B, DAI Z, DING S-Y, WYMAN CE. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels* (2011) 2(4), 421–450.