

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

MARIANA BICALHO OLIVEIRA

EXPRESSÃO DE XILANASES DE *ASPERGILLUS NIDULANS* EM *PICHIA PASTORIS*: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Belo Horizonte
2015

Mariana Bicalho Oliveira

EXPRESSÃO DE XILANASES DE *ASPERGILLUS NIDULANS* EM *PICHIA PASTORIS*: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração:
Bioquímica.

Orientador:

Ronaldo Alves Pinto Nagem

Coorientadora:

Valéria Monteze Guimarães

Belo Horizonte
2015



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

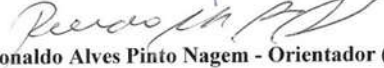


ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE MARIANA BICALHO OLIVEIRA. Aos dezoito dias do mês de março de 2015 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Expressão de xilanases de *Aspergillus nidulans* em *Pichia Pastoris*: purificação, caracterização e aplicação na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Ronaldo Alves Pinto Nagem, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Lucas Bleicher (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Valéria Monteze Guimarães - Co-Orientadora (Universidade Federal de Viçosa), aprovada; Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 18 de março de 2015.


 Dr. Lucas Bleicher (UFMG)


 Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo (UFMG)


 Dra. Valéria Monteze Guimarães - Co-Orientadora (Universidade Federal de Viçosa)


 Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem - Orientador (UFMG)


 Prof. Jader dos Santos C.
 Coordenador de Curso de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Virgem Maria que me ampararam em suas mãos durante essa caminhada e me deram forças para chegar ao final. Agradeço pelas dificuldades, pelos imprevistos e até mesmo pelas vezes em que tudo deu errado e pensei em desistir. Foram nessas situações em que aprendi, amadureci e tive forças para não desistir de meus objetivos.

Agradeço a minha mãe que esteve sempre ao meu lado, me dando apoio, carinho, colo, um ombro amigo e até mesmo broncas quando eu estava errada. Foi ela que me ensinou, através de seu próprio exemplo, que a vida não é fácil, mas que precisamos ter leveza e sabedoria suficientes para não desistirmos. Se quisermos um futuro melhor, precisamos superar as dificuldades.

Agradeço ao Pedro por estar ao meu lado em todos os momentos, mesmo que fosse no telefone. Ele que se fez presente em cada decisão, desde ir fazer o mestrado na UFMG quanto à dúvida se eu deveria falar tal coisa para o orientador. Ele que me deu apoio, aconchego e carinho, que fez meus finais de semana em Belo Horizonte mais felizes e fez a semana valer a pena só pela expectativa de vê-lo no final de semana. Obrigada por não me ter deixado desistir!

Obrigada ao professor Marcelo Matos Santoro que, apesar do grande conhecimento científico, me ensinou que é preciso ser pequeno para ser grande. Obrigada pela paciência e persistência comigo e por todo aprendizado.

Obrigada ao professor e orientador Ronaldo Alves Pinto Nagem por ter aceitado me orientar já em meados do mestrado. Agradeço pela paciência, boa vontade, pelos aprendizados e pela convivência. Sem você, a realização desse projeto não seria possível de ser feita com tamanha minuciosidade.

Agradeço à professora Valéria Monteze Guimarães pela amizade, orientação, conselhos e aprendizado científico. Obrigada por ter aberto os caminhos para que eu chegasse até aqui, sou eternamente grata por tudo.

Obrigada à professora Regina Nardi Drumond por todos os ensinamentos e pelo apoio.

Agradeço ao Cassius, Lúcia, Barbara, Larissa, Natália e Maíra pela amizade e pelo incentivo. A caminhada se torna mais fácil e alegre com pessoas como vocês.

Obrigada aos meus tios Célio, Wanda, Edgar e Luzia, a segunda família que me apoia em todos os momentos. Obrigada à vovó, que nunca se esquece de mim em suas orações.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Análises Bioquímicas da Universidade Federal de Viçosa pela companhia, pelos conselhos, pelas risadas, pelos aprendizados e por todos os bons momentos. Em especial a Gabriela, companheira de trabalho.

Obrigada aos colegas do Laboratório de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Minas Gerais por toda ajuda e companheirismo, em especial a Mariana.

Obrigada também aos amigos do Laboratório de Sinalização Celular, sem os quais a caminhada não teria sido a mesma. Saibam que vocês fizeram toda a diferença. Obrigada, em especial, ao Jammil que, além de me ajudar nos experimentos, tornou-se um amigo.

Obrigada à CAPES pelo apoio financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais por me permitirem realizar esse projeto.

Em fim, obrigada a todos aqueles que não citei mas que contribuíram, de alguma forma, para que eu pudesse alcançar meu objetivo.

*“Espera no Senhor e tem coragem.
O importante é caminhar, é
sempre caminhar.”*

BIOGRAFIA

MARIANA BICALHO OLIVEIRA, filha de Maria Imaculada Bicalho Oliveira, nasceu na cidade de Ubá-MG, em 22 de junho de 1990.

Em março de 2008, iniciou o curso de graduação em Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em janeiro de 2013.

Ingressou, em março de 2013, no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae* em março de 2015.

RESUMO

OLIVEIRA, Mariana Bicalho M. Sc., Universidade Federal de Minas Gerais, março de 2015. **Expressão de xilanases de *Aspergillus nidulans* em *Pichia pastoris*: purificação, caracterização e aplicação na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.** Orientador: Ronaldo Alves Pinto Nagem. Coorientadora: Valéria Monteze Guimarães.

O bagaço de cana-de-açúcar é o resíduo agrícola mais abundante no Brasil e apresenta elevado potencial para ser utilizado na produção de etanol de segunda geração. Entretanto, a grande complexidade da biomassa lignocelulósica requer diferentes enzimas para uma hidrólise eficiente. Neste trabalho, foi realizada a purificação, a caracterização bioquímica, a caracterização cinética e a aplicação na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar de duas xilanases de *Aspergillus nidulans* clonadas em *Pichia pastoris*: AN1818.2 e AN3613.2. A indução da expressão dos genes das xilanases foi realizada em meio BMMY contendo metanol, o qual induz a ativação do promotor AOX1, envolvido no metabolismo deste álcool. O sobrenadante do cultivo constituiu-se no extrato bruto, o qual foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna His Trap HP e, em seguida, à cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex™ 200. A temperatura ótima de atividade para a xilanase AN1818.2 foi 60 °C, já para a xilanase AN3613.2 foi 50 °C. Ambas as enzimas mostraram-se estáveis quando pré-incubadas a 50 °C e pouco estáveis quando pré-incubadas a 60 °C. A xilanase AN1818.2 apresentou um pH ótimo de atividade de 7,5 e a xilanase AN3613.2 apresentou melhor atividade em pH 6,0. Ambas as xilanases foram altamente estáveis quando pré-incubadas durante uma hora em tampões na faixa de pH de 2,5 a 13 e retornadas ao pH 5,0. As enzimas AN1818.2 e AN3613.2 foram fortemente inibidas por HgCl₂, SDS, CuSO₄ e xilotriose. A xilanase AN1818.2 hidrolisou melhor o substrato arabinoxilana de trigo e a xilanase AN3613.2 o substrato xilana *beechwood*. O valor de K_m utilizando xilana *beechwood* como substrato foi de 1,66 e 4,23 mg/mL para as xilanases AN1818.2 e AN3613.2, respectivamente. A hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com o coquetel Multifect CL Genencor® foi mais eficiente quando suplementada com a xilanase AN1818.2 em combinação com a xilanase AN3613.2. Já a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com o coquetel Accellerase 1500 Genencor® foi mais eficiente quando suplementada apenas com a xilanase AN3613.2.

ABSTRACT

Oliveira, Mariana Bicalho M. Sc., Federal University of Minas Gerais, March 2015. ***Aspergillus nidulans* xylanases expression in *Pichia pastoris*: purification, characterization and application to sugarcane bagasse hydrolysis.** Adviser: Ronaldo Alves Pinto Nagem. Co-adviser: Valéria Monteze Guimarães.

Sugarcane bagasse is the most abundant agricultural waste in Brazil and has a high potential to be used in the production of second generation ethanol. However, the high complexity of lignocellulosic biomass requires different enzymes for efficient hydrolysis. In this study, two xylanases from *Aspergillus nidulans*, AN1818.2 and AN3613.2, cloned in *Pichia pastoris* were purified, biochemically characterized, kinetically characterized and applied in sugarcane bagasse hydrolysis. BMMY medium was used to induce xylanase's gene expression. This medium contains methanol, which induces AOX1 promoter, involved in methanol metabolism. The enzymatic extract was submitted to affinity (His Trap HP) and gel filtration (Superdex™ 200) chromatographies. Xylanase AN 1818.2 is optimally active at 60 °C and in pH 7,5. AN3613.2 was optimally active at 50 °C and in pH 6,0. Both xylanases were highly thermostable at 50 °C and in pH range from 2,5 to 13 and less stable at 60 °C. HgCl₂, SDS, CuSO₄ and xylotriase inhibited enzymatic activities. Wheat arabinoxylan was the best substrate for AN1818.2 hydrolysis and AN3613.2 is better suitable for beechwood xylan hydrolysis. K_m for AN1818.2 and AN3613.2 was 1,66 and 4,23 mg/mL, respectively, using beechwood xylan as substrate. Sugarcane bagasse hydrolysis with Multifect CL Genencor® was more efficient when xylanase AN1818.2 was added with xylanase AN3613.2. Sugarcane bagasse hydrolysis with Accellerase 1500 Genencor® was more efficient when only xylanase AN3613.2 was added.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Enzimas de degradação da hemicelulose	9
Figura 2.Representação topológica dos elementos de estrutura secundária presentes nas xilanases. a.Elemento folha β - α hélice presente na estrutura do barril $(\beta/\alpha)_8$ das xilanases da família GH10. b.Elemento de folhas β presente na estrutura β -jelly-roll das xilanases da família GH11.....	10
Figura 3. Estrutura do complexo XIP-I-AN1818.2	12
Figura 4. Estrutura de uma xilanase GH10 de <i>Penicillium simplicissimum</i> ligada à β -1,4-xilotriose	13
Figura 5.a.Estrutura da xilanase GH11 de <i>Acremonium cellulolyticus</i> . b.Estrutura da xilanase GH11 de <i>Penicillium funiculosum</i> em complexo com o inibidor XIP-I	13
Figura 6. Zimograma de atividade de xilanase	47
Figura 7. Purificação com cromatografia em coluna de afinidade de níquel para a xilanase AN1818.2(a) e para a xilanase AN3613.2(b)	49
Figura 8. Gel desnaturante de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata. Xilanase AN1818.2(a) e xilanase AN3613.2(b)	49
Figura 9. Membrana de nitrocelulose do Western Blotting	50
Figura 10. Gel desnaturante de poliacrilamida 12% corado com Coomassie Blue	51
Figura 11. Espectros de MS1 para as bandas 1 e 2 da amostra AN1818.2(a) e para as bandas 1, 2 e 3 da amostra AN3613.2(b)	52
Figura 12. MS2 e sequenciamento <i>de novo</i> do íon de m/z 2221,94 da amostra AN1818.2(a) e do íon de m/z 2202 da amostra AN3613.2(b)	53
Figura 13. Efeito do pH e estabilidade ao pH xilanase para a xilanase AN1818.2(a) e para a xilanase AN3613.2(b)	55
Figura 14. Efeito da temperatura na atividade das xilanases AN1818.2 (a) e AN3613.2(b)	57
Figura 15. Atividade relativa das enzimas AN1818.2 (a) e AN3613.2 (b) quando pré-incubadas a 50 °C e a 60 °C	59
Figura 16. Avaliação de efetores na atividade enzimática das xilanases AN1818.2 (a) e AN3613.2 (b)	63

Figura 17. Efeito aditivo entre as endo- β -1,4-xilanases AN1818.2, AN3613.2 e as xilanases presentes nos coquetéis comerciais Multifect CL Genencor [®] e Accellerase 1500 Genencor [®]	66
Figura 18. Liberação de glicose (a) e de xilose (b) em função do tempo para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado alcalino utilizando o coquetel comercial Multifect CL Genencor [®]	68
Figura 19. Liberação de glicose (a) e de xilose (b) em função do tempo para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado alcalino utilizando o coquetel comercial Accellerase 1500 Genencor [®]	69
Figura 20. Perfil de eluição da proteína AN1818.2 na cromatografia de afinidade em coluna de níquel	72
Figura 21. Perfil de eluição da proteína AN3613.2 na cromatografia de afinidade em coluna de níquel	73
Figura 22. Perfil de eluição da cromatografia de gel filtração das proteínas AN1818.2 (a) e AN3613.2 (b)	74
Figura 23. Gel desnaturante de poliacrilamida 12%	77
Figura 24. Membrana de nitrocelulose do Western Blotting corada com Ponceau-S (a) e revelada com anticorpo secundário anti Ig-G de camundongo acoplado à peroxidase (b).....	78
Figura 25. Espectro de massas da amostra da proteína AN3613.2 purificada	79
Figura 26. Sequência de aminoácidos da construção clonada da proteína AN3613.2 ...	79
Figura 27. Ensaio de espalhamento dinâmico da luz	83
Figura 28. Efeito da concentração do substrato xilana <i>beechwood</i> na velocidade inicial da reação catalisada pelas xilanases AN1818.2 (a) e AN3613.2 (b)	87
Figura 29. Efeito da concentração do substrato arabinoxilana de trigo na velocidade inicial da reação catalisada pelas xilanases AN1818.2 (a) e AN3613.2 (b)	87
Figura 30. Efeito da concentração do substrato xilana de <i>spelts</i> de aveia na velocidade inicial da reação catalisada pelas xilanases AN1818.2 (a) e AN3613.2 (b)	88
Figura 31. Análise dos produtos de hidrólise da xilana <i>beechwood</i> por TLC	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> e sítios de restrição utilizados na amplificação dos genes das xilanases AN1818.2 e AN3613.2	20
Tabela 2. Composição do gel separador	23
Tabela 3. Composição do gel empilhador	23
Tabela 4. Composição do gel do zimograma	25
Tabela 5. Tampões utilizados nos ensaios de atividade enzimática	34
Tabela 6. Experimento de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar	38
Tabela 7. pH ótimo e temperatura ótima de xilanases da família GH10	55
Tabela 8. pH ótimo e temperatura ótima de xilanases da família GH11	56
Tabela 9. Termoestabilidade de xilanases da família GH10	60
Tabela 10. Termoestabilidade de xilanases da família GH11	62
Tabela 11. Efeito dos produtos xilotriose e xilotetraose na atividade enzimática das xilanases AN1818.2 e AN3613.2	65
Tabela 12. Análise da composição do bagaço de cana-de açúcar antes e após o pré-tratamento alcalino com NaOH 1%	67
Tabela 13. Taxa de conversão de glicana e de xilana da sacarificação de diferentes misturas enzimáticas após 72 horas	70
Tabela 14. Resumo dos resultados obtidos em cada etapa de purificação da xilanase AN1818.2	75
Tabela 15. Resumo dos resultados obtidos em cada etapa de purificação da xilanase AN3613.2	75
Tabela 16. Previsão <i>in silico</i> de sítios de clivagem por proteases no C-terminal da proteína AN1818.2	81
Tabela 17. Resultados de distribuição do ensaio de espalhamento da luz para a amostra da proteína AN1818.2	83
Tabela 18. Resultados de distribuição do ensaio de espalhamento da luz para a amostra da proteína AN3613.2	84
Tabela 19. Especificidade das xilanases AN1818.2 e AN3613.2 contra diferentes substratos	85

Tabela 20. Constante de Michaelis Menten, velocidade máxima de reação, constante catalítica e eficiência catalítica da xilanase AN1818.2 de *Aspergillus nidulans* utilizando diferentes tipos de xilana89

Tabela 21. Constante de Michaelis Menten, velocidade máxima de reação, constante catalítica e eficiência catalítica da xilanase AN3613.2 de *Aspergillus nidulans* utilizando diferentes tipos de xilana89

ABREVIATURAS

AC: Accellerase 1500 Genencor[®]

A_w: atividade de água

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BMGY: Meio de glicerol complexo tamponado

BMMY: Meio de metanol complexo tamponado

°C: graus Celcius

CaCl₂: cloreto de cálcio

CL: Multifect CL Genencor[®]

CMC: carboximetilcelulose

CO₂: dióxido de carbono

CuSO₄: sulfato de cobre II

DAB: tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina

DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico

DO: densidade ótica

DTT: Ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

FPU: unidade de atividade de celulases total

GH: glicosilhidrolase

HgCl₂: cloreto de mercúrio

His: histidina

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

k_{cat}: constante catalítica

kDa: Quilodalton

K_m: constante de Michaelis

L: litro

M: molar

m³: metro cúbico

MgCl₂: cloreto de mangnésio

mL: mililitro

μL: microlitro

mM: milimolar

MnCl₂: cloreto de manganês

m/z: razão massa/carga

NaCl: cloreto de sódio

Ni-NTA: níquel-ácido nitriltriacético

PCR: reação em cadeia da polimerase

PDB: Protein Data Bank

ρNP: *para*-nitofenil

p/v: peso/volume

rpm: rotação por minuto

SDS: dodecilsulfato de sódio

S/N: sinal/ruído

t_{1/2}: tempo de meia-vida

TCA: ácido tricloroacético

TEMED: Tetrametiletilenodiamina

TFA: ácido trifluoroacético

TLC: cromatografia em camada delgada

V_{max}: velocidade máxima

v/v: volume/volume

ZnCl_2 : cloreto de zinco

SUMÁRIO

1.Introdução e Justificativa	1
2.Revisão Bibliográfica	4
2.1.Etapas do Processo de Produção de Etanol Lignocelulósico: Problemas e Perspectivas	4
2.1.1.Pré-tratamento	4
2.1.2.Hidrólise	5
2.1.3.Fermentação	6
2.2.Estrutura da Parede Celular Vegetal	7
2.2.1.Celulose	7
2.2.2.Lignina	8
2.2.3.Hemicelulose	8
2.3.Xilanases	9
2.3.1.Xilanases de <i>Aspergillus nidulans</i>	11
2.3.2. Xilanases e Biotecnologia	14
2.3.2.1. <i>Pichia pastoris</i> : Microorganismo Hospedeiro para Expressão de Xilanases	14
2.3.3.Aplicações das Xilanases	16
2.3.3.1.Tecnologia de Alimentos, Bebidas e Rações	17
2.3.3.2.Indústria de Papel	17
2.3.3.3.Cosméticos	18
2.3.3.4.Biocombustíveis	18
3.Objetivos	19
3.1.Objetivo Geral	19
3.2.Objetivos Específicos	19
4 Metodologia	20
Parte I: Expressão, Purificação, Caracterização Bioquímica e Aplicação das Proteínas AN1818.2 e AN3613.2 na Hidrólise do Bagaço de Cana-de-açúcar	
4.1.Construção e Otimização da Expressão do Plasmídeo	20
4.2.Expressão das Proteínas Recombinantes	21
4.3.Ensaio para a Verificação da Expressão das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2.....	22
4.3.1.Ensaio de Atividade de Xilanase	22
4.3.2.Eletroforese em Gel Desnaturante de Poliacrilamida	22
4.3.2.1.Preparo do Gel Separador	23
4.3.2.2.Preparo do Gel Empilhador	23
4.3.2.3.Preparo das Amostras	23
4.3.2.4.Coloração com Coomassie Blue	24
4.3.2.5.Coloração com Nitrato de Prata	24
4.3.3.Zimograma	25
4.4.Purificação com Cromatografia de Afinidade em Coluna de Níquel.....	26
4.5.Quantificação de Proteínas Totais das Amostras	27
4.6.Espectrometria de Massas	27
4.6.1.Preparo das Soluções	27
4.6.1.1.Solução de Lavagem	28

4.6.1.2.Solução de Bicarbonato de Amônio 100 mM	28
4.6.1.3. Solução de Bicarbonato de Amônio 50 mM	28
4.6.1.4.Solução de DTT 10 mM	28
4.6.1.5.Solução de Iodoacetamida 100 mM	28
4.6.1.6.Solução de Tripsina	28
4.6.1.7.Tampão de Extração	28
4.6.2.Digestão em Gel para Espectrometria	29
4.6.3.Análise de Peptídeos por MALDI-TOF	30
4.6.4.Análise dos Resultados de Espectrometria de Massas	30
4.7.Western Blotting	30
4.7.1.Preparo das Soluções	30
4.7.1.1.Tampão Tris-Glicina 10X	30
4.7.1.2.Tampão de Transferência 10X	31
4.7.1.3.Ponceau-S	31
4.7.1.4.TBS 10X	31
4.7.1.5.TBS-T	31
4.7.1.6.Solução Reveladora	31
4.7.2.Eletroforese em Gel Desnaturante de Poliacrilamida	31
4.7.3.Blotting	32
4.7.4.Detecção por Ponceau-S	32
4.7.5.Bloqueio da Membrana	32
4.7.6.Reação Antígeno-Anticorpo	32
4.7.7.Revelação	33
4.8.Caracterização das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2	33
4.8.1.Efeito do pH	33
4.8.2.Estabilidade ao pH	34
4.8.3.Efeito da Temperatura	35
4.8.4.Termoestabilidade	35
4.8.5.Efeito de Íons e Agentes	35
4.8.6.Efeito dos Produtos	36
4.9.Aplicação das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2 na Hidrólise do Bagaço de Cana-de-açúcar	36
4.9.1.Pré-Tratamento da Biomassa	36
4.9.2.Efeito Aditivo das Xilanases	36
4.9.3.Hidrólise da Biomassa	37
4.9.4.Análise de Glicose e Xilose em HPLC	38
4.9.5.Cálculo do Rendimento da Sacarificação	38

Parte II: Expressão, Caracterização Estrutural e Cinética das Proteínas AN1818.2 e AN3613.2

4.10.Expressão das Proteínas Recombinantes	40
4.11.Purificação das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2	41
4.11.1.Cromatografia de Afinidade em Coluna de Níquel.....	41
4.11.2.Cromatografia de Gel Filtração.....	41
4.12.Ensaio para Verificar o Grau de Pureza das Amostras	42
4.12.1.Western Blotting	42
4.12.2.Espectrometria de Massas	42
4.12.3.Espalhamento da Luz	42
4.13.Caracterização das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2	43

4.13.1.Especificidade do Substrato	43
4.13.1.1.Substratos Sintéticos	43
4.13.1.2.Substratos Naturais	44
4.13.2.Caracterização Cinética	44
4.14.Análise da Composição dos Produtos de Hidrólise da Xilana <i>Beechwood</i>	44
5.Resultados e Discussão	46
Parte I: Expressão, Purificação, Caracterização Bioquímica e Aplicação das Proteínas AN1818.2 e AN3613.2 na Hidrólise do Bagaço de Cana-de-açúcar	
5.1.Ensaios para a Verificação da Expressão das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2	46
5.1.1.Ensaio de Atividade de Xilanase	46
5.1.2.SDS-PAGE e Zimograma	46
5.2.Purificação com Cromatografia de Afinidade em Coluna de Níquel.....	48
5.3.Western Blotting	49
5.4.Espectrometria de Massas	51
5.5.Caracterização Bioquímica das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2	54
5.5.1.Efeito do pH e Estabilidade ao pH	54
5.5.2.Efeito da Temperatura	57
5.5.3.Termoestabilidade	58
5.5.4.Efeito de Íons e Agentes	62
5.5.5.Efeito dos Produtos	64
5.6.Efeito Aditivo das Xilanases	65
5.7.Sacarificação	66
Parte II: Expressão, Caracterização Estrutural e Cinética das Proteínas AN1818.2 e AN3613.2	
5.8.Purificação das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2	72
5.8.1.Cromatografia de Afinidade em Coluna de Níquel.....	72
5.8.2.Cromatografia de Gel Filtração	74
5.8.3.Tabela de Purificação	74
5.9.Ensaios para Verificar o Grau de pureza das Amostras	76
5.9.1.SDS-PAGE	76
5.9.2.Western Blotting	77
5.9.3.Espectrometria de Massas	78
5.9.4.Espalhamento da Luz	81
5.10.Caracterização das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2	85
5.10.1.Especificidade do Substrato	85
5.10.2.Caracterização Cinética	87
5.11.Análise da Composição dos Produtos de Hidrólise da Xilana <i>Beechwood</i>	90
6.Conclusões	92
7.Perspectivas	94
8.Referências Bibliográficas	95

1.INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O setor energético tem importância estratégica e relaciona-se diretamente com o desenvolvimento das nações. A estrutura energética está inserida na economia e na geopolítica dos países e envolve fatores como produção industrial, sistema de transporte, segurança, saúde, lazer, educação, comércio e agricultura. Um colapso ou elevação nos custos dos combustíveis afeta as diversas atividades desenvolvidas no país, os custos de produção, a colocação no mercado internacional e a competitividade entre as empresas (Sene & Moreira, 2010).

O Relatório 2015 do Índice de Performance da Arquitetura Energética Global relata que, para 34% dos 125 países analisados, as fontes energéticas não fósseis, incluindo a biomassa e a nuclear, representam apenas 10% do suprimento da energia primária (Fórum Econômico Mundial, 2015). As fontes energéticas fósseis não são renováveis e são questionadas do ponto de vista ambiental, econômico e ecológico (Kamm *et al.*, 2006). O Protocolo de Quioto, em vigor a partir de 2005, estabelece medidas contra o aquecimento global visando à redução da emissão de gases de efeito estufa dos países industrializados em 5,2% em relação aos níveis de 1990. O governo brasileiro tem como meta a redução da emissão de gases de efeito estufa em 39% no período de 2010 a 2020. Trata-se do mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL), que tem como um dos principais objetivos a utilização de fontes de energia alternativas e renováveis (Empresa de Pesquisa Energética, 2009).

Diante desses fatores, os biocombustíveis apresentam-se como uma alternativa para combater às desvantagens das fontes de energia não renováveis.

Os biocombustíveis são, por definição, aqueles produzidos através de fontes renováveis e capazes de reduzir a taxa de aquecimento global. O dióxido de carbono (CO₂) liberado na queima desses combustíveis é proveniente do CO₂ assimilado pelas plantas durante o processo de fotossíntese. Logo, trata-se de um balanço neutro de carbono (Naik *et al.*, 2010).

Os biocombustíveis de primeira geração são aqueles provenientes do cultivo de plantas, como o milho e a cana. A principal desvantagem desse tipo de biocombustível é a competição das áreas de cultivo destinadas à produção alimentar e destinadas à produção de combustível. O debate combustível-versus-alimento consiste na possível

elevação do preço dos alimentos devido ao aumento da produção de combustíveis (Laursen *et al.*, 2006).

Os biocombustíveis de segunda geração referem-se àqueles produzidos a partir de materiais lignocelulósicos, tais como resíduos agrícolas, resíduos florestais e resíduos industriais capazes de gerar grandes quantidades de carboidratos (Huber & Corma, 2007).

O bioetanol pode ser misturado à gasolina a fim de reduzir a emissão de gases de efeito estufa. Os automóveis podem operar com misturas gasolina-álcool na faixa de 5 a 25% sem alterar as propriedades do equipamento (Shelley, 2006).

Segundo dados da União da Indústria da Cana-de-Açúcar (UNICA, 2014), a produção total de etanol no Brasil na safra 2013/2014 foi de $2,8 \times 10^7$ m³.

O etanol de primeira geração é produzido através de um processo de fermentação da sacarose da cana-de-açúcar. A cana é moída e, em seguida, é feito um procedimento de extração, esterilização e purificação do caldo de cana. Este é posteriormente fermentado por algumas linhagens de levedura e o etanol produzido é separado da água por destilação (Teixeira e Carneiro, 2013).

O etanol lignocelulósico apresenta a vantagem de ser um biocombustível de segunda geração, não havendo a necessidade de expandir a área plantada de cana-de-açúcar e sim, de reaproveitar os resíduos da produção de etanol e açúcar, tais como o bagaço e a palha. Esses resíduos correspondem a dois terços do potencial energético da planta. Essas biomassas representam fontes mais baratas e acessíveis de matéria-prima (Souza, 2011). O bagaço de cana é o resíduo sólido remanescente da trituração da cana-de-açúcar para obter o seu caldo e é gerado em grandes quantidades no Brasil como resultado da produção de açúcar e etanol (Nunes *et al.*, 2013). Além disso, a logística é privilegiada, pois não há a necessidade de implantação de infraestrutura de coleta e de transporte, pois estas já estão disponíveis nas usinas de cana (Araujo *et al.*, 2013). A cana é colhida anualmente durante cinco anos ou mais antes de ser replantada, havendo uma pequena utilização de adubos minerais. Um aspecto positivo é que os próprios resíduos da indústria da cana, como a vinhaça e a torta de filtro, são ricos em nutrientes e podem ser utilizados como fertilizantes orgânicos (Nastari, 2012).

Apesar das dificuldades técnicas e econômicas para a produção de etanol de segunda geração em escala industrial, este biocombustível começa a tornar-se uma realidade no Brasil. A primeira usina de produção de etanol de segunda geração foi inaugurada pela empresa Granbio Sérgio Godoy em setembro de 2014 em São Miguel

dos Campos, Alagoas. O etanol é produzido a partir do bagaço e da palha da cana-de-açúcar (Vieira, 2014).

Diversas enzimas são necessárias à hidrólise da biomassa lignocelulósica a fim de fornecer açúcares redutores que serão utilizados na fermentação a etanol: celulases, hemicelulases, ligninas-oxidase. Um dos principais tipos de hemicelulose é a xilana e endo- β -1,4- xilanases (EC 3.2.1.8) são hemicelulases que participam da hidrólise desse polímero. A maioria dessas enzimas pertencem a classe das glicosil hidrolases GH10 e GH11. As endo- β -1,4- xilanases AN1818.2 e AN3613.2 de *Aspergillus nidulans* foram descritas, purificadas e caracterizadas por Fernández-Espinar *et al.* (1992; 1994; 1996) e os genes de ambas as xilanases foram clonados em *Pichia pastoris* (Bauer *et al.*, 2006). Entretanto, o potencial dessas enzimas na hidrólise da biomassa lignocelulósica permanece inexplorado.

Neste trabalho, essas linhagens transformadas foram utilizadas com o objetivo de conseguir elevados níveis de expressão das xilanases AN1818.2 e AN3613.2. Visto que o Brasil é um grande produtor de cana-de-açúcar, este trabalho visa à purificação e a uma caracterização mais aprofundada das xilanases AN1818.2 e AN3613.2 a fim de aplicá-las na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, um dos principais resíduos agrícolas brasileiros e que possui elevado potencial para a produção de etanol de segunda geração.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1.Etapas da Produção de Etanol Lignocelulósico: Problemas e Perspectivas

A produção de etanol lignocelulósico ainda não é economicamente viável devido a inúmeras barreiras técnicas que necessitam ser superadas (Eisberg, 2006). A transição para uma tecnologia industrial madura, entretanto, requer pesquisa e desenvolvimento adicional, especialmente no que tange à melhoria da hidrólise com enzimas eficientes, no desenvolvimento de organismos fermentativos robustos, na ampliação da integração do processo para reduzir o número de etapas e a demanda energética (Galbe & Zacchi, 2010). A seguir, as principais etapas do processo de produção de etanol lignocelulósico são descritas, assim como os entraves e perspectivas encontrados em cada uma delas.

2.1.1.Pré-tratamento

O objetivo do pré-tratamento é aumentar o acesso das enzimas que podem melhorar a hidrólise da celulose e da hemicelulose (Alvira *et al.*, 2010). Os processos de pré-tratamento podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação de todos esses, variando em função do grau de separação requerido e do fim proposto (Santos & Gouveia, 2009). Cada pré-tratamento tem um efeito específico sobre a fração de celulose, hemicelulose e lignina. Portanto, os diferentes métodos do pré-tratamento devem ser escolhidos de acordo com a configuração do processo selecionado (Alvira *et al.*, 2010).

O pré-tratamento químico é uma etapa essencial para aumentar o acesso das celulases à celulose. Os pré-tratamentos que hidrolisam a hemicelulose em açúcares formam produtos que inibem a fermentação. Logo, é necessária uma separação sólido-líquido e uma purificação parcial dos açúcares a fim de separar micotoxinas e pentoses de hexoses (Geddes *et al.*, 2011). O pré-tratamento também é realizado devido ao fato da lignina restringir a hidrólise, escondendo a superfície celulósica e impedindo o intumescimento das fibras. Portanto, torna-se necessária uma etapa de pré-tratamento, tanto a fim de quebrar a estrutura cristalina da lignocelulose quanto a fim de remover a lignina, expondo as moléculas de celulose e hemicelulose à ação enzimática (Ogeda & Petri, 2010).

2.1.2.Hidrólise

A hidrólise ou sacarificação da biomassa consiste na hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentáveis.

A hidrólise enzimática é uma reação heterogênea, ou seja, apresenta um substrato insolúvel (celulose) e um catalisador solúvel (enzima). A hidrólise completa da celulose requer a ação sinérgica de diversas enzimas (celulases) com diferentes especificidades de substrato (Kovács *et al.*, 2009 *apud* Silva, 2010). Esse processo reproduz aquele existente na natureza, em que a quebra das longas cadeias das moléculas de celulose em açúcares é feita por enzimas secretadas por fungos ou bactérias, microorganismos que se alimentam de matéria orgânica (Bastos, 2007). Esses biocatalizadores (enzimas) são moléculas específicas para determinados substratos e oferecem a vantagem de não haver a formação de subprodutos indesejados.

O alto custo das enzimas lignocelulolíticas é uma das principais limitações à comercialização do etanol lignocelulósico, já que essas moléculas são essenciais ao processo de bioconversão. A tecnologia enzimática tem focado no aperfeiçoamento das propriedades dessas enzimas, tais como atividade, termoestabilidade, estabilidade ao pH e otimização das quantidades e proporções de diferentes enzimas nos coquetéis enzimáticos (Koppram *et al.*, 2014). Companhias internacionais produtoras de enzimas, como Novozymes e Genencor, têm realizado parcerias com Poet e Dupont Etanol Lignocelulósico, respectivamente, para comercializar o etanol lignocelulósico. Segundo dados do relatório do Advanced Ethanol Council (EUA), o custo das enzimas na produção do etanol é de menos de US\$ 2 por galão, indicando uma queda de 80% na última década (AEC, 2013).

Esforços têm sido realizados a fim de desenvolver novas celulases e novos coquetéis de celulases. Atualmente, *Trichoderma reesei* é o organismo mais utilizado na produção dessas enzimas (Geddes *et al.*, 2011). A técnica de *screening* de organismos tem sido utilizada para a descoberta de novas celulases (Maki *et al.*, 2009).

Baixos rendimentos e taxas de hidrólise também afetam a produção do etanol. Muitos trabalhos mostraram que altas concentrações de sólido na hidrólise reduzem a eficiência desta (Lau & Dale, 2009; Lu *et al.*, 2010). Aproximadamente um terço dos açúcares totais provenientes da hidrólise é relatado como oligômeros e polímeros que não podem ser fermentados pela levedura *Saccharomyce cerevisiae* (Koppram *et al.*, 2014).

Os glico e xilooligossacarídeos têm efeitos inibidores sobre as enzimas celulolíticas. A hidrólise dos xilooligômeros em xilose melhora o rendimento da produção de glicose. O custo e dosagem das enzimas podem ser reduzidos através da adição de xilanases e β -xilosidases nas preparações comerciais de celulases (Kim *et al.*, 2011; Quing *et al.*, 2010; De Bari *et al.*, 2013).

2.1.3.Fermentação

A fermentação consiste na transformação dos monossacarídeos redutores em etanol, gás carbônico e outros subprodutos através da ação de leveduras, tais como *Saccharomyces cerevisiae*. Essa levedura possui a capacidade de assimilar a glicose e de produzir álcool combustível (Sánchez & Cardona, 2008 *apud* Silva, 2010).

De acordo com Silva (2010), destacam-se três processos principais de fermentação:

1) Hidrólise Separada da Fermentação (SHF)

A hidrólise da celulose e a fermentação da glicose, assim como a fermentação de pentoses, são conduzidas separadamente, já que a hidrólise possui condições ótimas na faixa de 45 a 50 °C (atividade ótima das celulases) e os microorganismos fermentadores possuem uma temperatura ótima para o processo de fermentação entre 30 e 37 °C (Olsson *et al.*, 2006). Possui as desvantagens de hidrólise incompleta da celulose e rendimentos não muito altos, além de ocorrer inibição da hidrólise enzimática pelos produtos celobiose e glicose.

2) Fermentação e Sacarificação Simultânea (SSF)

A hidrólise da celulose e a fermentação da glicose ocorrem no mesmo reator e a fermentação das pentoses em outro reator. É necessária a utilização de condições intermediárias de temperatura e de agitação para a ação das celulases e dos microorganismos fermentadores. As principais vantagens do processo são a redução da inibição das celulases pelos seus produtos de hidrólise, uma vez que os monossacarídeos não se acumulam no meio e menor complexidade e custo em relação ao SHF. No entanto, uma desvantagem é o desfavorecimento da cinética enzimática devido à necessidade de conduzir o processo dentro da faixa ótima do microorganismo fermentador.

3) Sacarificação e Cofermentação Simultâneas (SSCF):

As etapas de hidrólise da celulose e de fermentação das pentoses e hexoses são realizadas em um mesmo reator. As duas últimas são fermentadas por um único microorganismo. A engenharia genética é uma ferramenta necessária a fim de produzir um microorganismo capaz de fermentar pentoses e hexoses.

Uma dificuldade ao processo de produção de etanol lignocelulósico são as condições de fermentação. O principal microorganismo fermentador é a *Saccharomyce cerevisiae*. Para um alto rendimento do processo de produção do etanol de segunda geração, esses microorganismos precisam ser resistentes aos inibidores formados durante o pré-tratamento, secretar celulasas e serem ativos sob condições próximas daquelas de atividade ótima das celulasas (pH 5, 50 °C).

Atualmente, ainda há a necessidade de fontes externas de celulasas. O desenvolvimento de biocatálise que fermenta sob condições próximas às condições ótimas das atividades de celulasas fúngicas permitiria a redução do requerimento de enzimas externas. A engenharia genética permite a criação de leveduras fermentadoras que produzem algumas ou todas as celulasas necessárias à hidrólise, diminuindo, desse modo, o custo das enzimas (Geddes *et al.*, 2011).

Outro desafio é a coutilização de pentoses (xilose) e hexoses (glicose) pelos microorganismos fermentadores, principalmente na presença de inibidores formados durante o pré-tratamento. Linhagens de *Saccharomyce cerevisiae* têm sido geneticamente modificadas a fim de melhorar o metabolismo de xilose (Bettiga *et al.*, 2009; Brat *et al.*, 2009; Runquist *et al.*, 2009).

2.2.Estrutura da Parede Celular Vegetal

2.2.1.Celulose

A celulose é o polímero que está presente em maior quantidade na natureza e constitui o principal componente da biomassa vegetal. Encontra-se associada à lignina e à hemicelulose na parede celular (Lynd, 2002). As unidades formadoras do polímero são monômeros de D-glicose unidos por ligações β -1,4. A subunidade repetitiva do polímero é a celobiose, na qual os resíduos de glicose adjacentes orientam-se em um ângulo de 180°. As microfibrilas são sintetizadas independentemente e apresentam entre 2.000 e 20.000 resíduos de D-glicose. A cadeia apresenta duas extremidades; a não

reduzida e a redutora, na qual o carbono anomérico da glicose está livre (Sandgren, 2005).

A molécula de celulose possui uma estrutura cristalina e as fibrilas unem-se através de ligações de hidrogênio intercadeias e intracadeias. A estrutura compacta da fibra é resultante da união, por meio de ligações de hidrogênio, de cadeias de celulose adjacentes. Esse fator é responsável por impedir o acesso de enzimas e moléculas pequenas. As regiões amorfas são menos compactas e apresentam fibras mais distantes entre si, intermediando as regiões cristalinas da celulose. As fibras apresentam microporos, falhas e irregularidades que aumentam a superfície de contato do polímero e permitem o acesso de moléculas de água e de enzimas celulolíticas (Lynd, 2002).

2.2.2.Lignina

A lignina é um polímero heterogêneo presente em resíduos lignocelulósicos e é composta por estruturas não fenólicas e fenólicas (Wang *et al.*, 2008). Os monômeros formadores da lignina, álcool coniferílico, sinapílico e *p*-cumárico são sintetizados no citoplasma (retículo endoplasmático ou complexo de Golgi) e liberados em vesículas como monolignóis ou monolignóis glicosilados (Donaldson, 2001). Estes monômeros sofrem reações de oxidação, acoplamento e adição que levam a unidades regulares distribuídas randomicamente na estrutura da macromolécula. Por esta razão, a lignina não é vista como um composto definido, mas como uma composição de materiais fisicamente e quimicamente heterogêneos (Dence & Lin, 1992).

A lignina constitui-se em um material de incorporação dos polímeros celulósicos da parede secundária das plantas (Boerjan *et al.*, 2003) e é mais resistente à decomposição biológica que a celulose e a hemicelulose (Wagner & Wolf, 1999). Devido a esta característica, a lignina é um empecilho à sacarificação eficiente pelas indústrias de bioenergia (Li *et al.*, 2003; Chen & Dixon, 2007).

2.2.3.Hemicelulose

A hemicelulose é uma estrutura complexa de polímeros glicosídicos, incluindo a xilana, xiloglicana (heteropolímero de D-xilose e D-glicose), glicomanana (heteropolímero de D-glicose e D-manose), galactoglicomanana (heteropolímero de D-

galactose, D-glicose e D-manose) e arabinogalactana (heteropolímero de D-galactose e arabinose) (Shallom & Shoham, 2003).

A xilana é o principal componente da hemicelulose e o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. É composta de unidades de β -D-xilopiranoses unidas por ligações β -1,4 e apresenta como substituintes da cadeia lateral O-acetil, α -L-arabinofuranosil, glicurônico α -1,2 ligado e 4-O-metilglicurônico. O grau de polimerização e os substituintes da cadeia lateral variam entre madeiras duras, madeiras macias e gramíneas (Collins *et al.*, 2008; Shallom & Shoham, 2003).

2.3.Xilanases

Devido à diversificada estrutura química da xilana, diversas enzimas com diferentes propriedades catalíticas são necessárias para despolimerizá-la e remover os grupos laterais.

Na Figura 1, é mostrada a estrutura de uma xilana e as principais enzimas envolvidas em sua hidrólise. As xilanases AN1818.2 e AN3613.2 de *Aspergillus nidulans* utilizadas nesse trabalho são endo- β -1,4-xilanases e estão representadas pelas setas brancas.

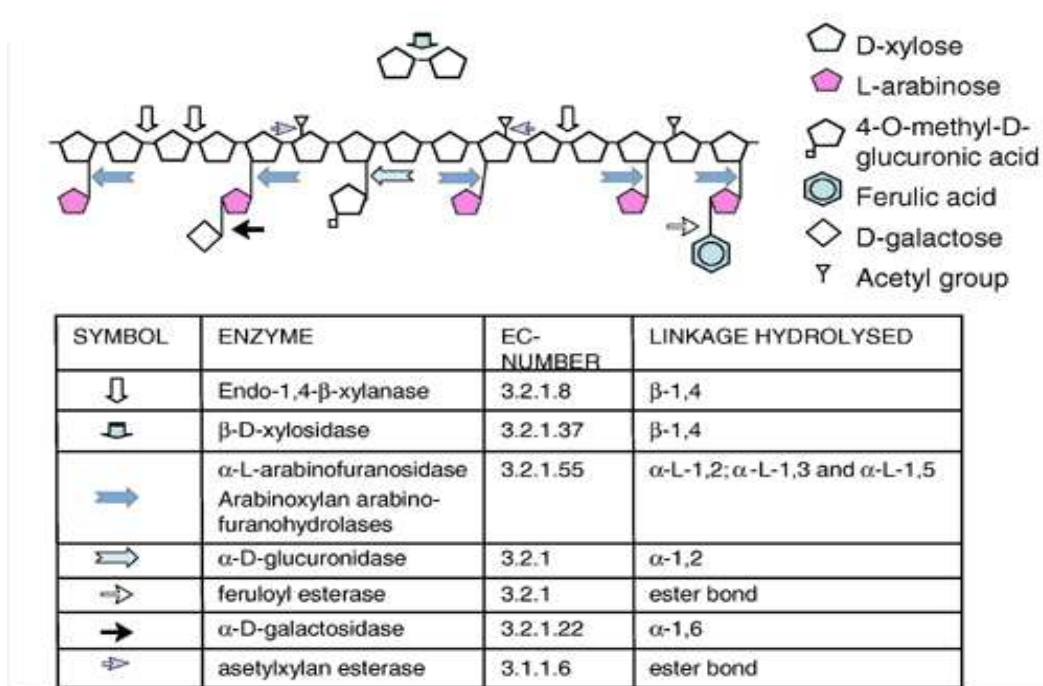


Figura 1. Enzimas de degradação da hemicelulose. Adaptada de Aro *et al.*, 2005.

Endo- β -1,4 xilanases (1,4- β -D-xilanohidrolase, EC 3.2.1.8) clivam as ligações glicosídicas do cerne de xilana, reduzindo o grau de polimerização do substrato. Inicialmente, os principais produtos de hidrólise são oligômeros β -D-xilopiranosil e, posteriormente, pequenas moléculas de mono, di e trissacarídeos de β -D-xilopiranosil são produzidas (Polizeli *et al.*, 2005).

De acordo com o banco de dados de enzimas que atuam em carboidratos (CAZY database) (Cantarel *et al.*, 2009), foi desenvolvido um sistema de classificação das glicosilhidrolases (GH) baseado nas similaridades de sequência do domínio catalítico (Henrissat, 1991; Henrissat & Bairocho, 1993). As xilanases foram classificadas em diferentes famílias: 5, 8, 10, 11, 16, 26, 30, 43 e 62. As duas principais famílias são as xilanases GH10 e GH11. Enzimas dessas famílias clivam a ligação glicosídica através de catálise assistida por ácido-base e por meio de um mecanismo de duplo deslocamento. Este compreende os dois resíduos de glutamato catalíticos, que funcionam como resíduos nucleófilo e ácido-base, respectivamente (Payan *et al.*, 2004).

As xilanases GH10 possuem uma estrutura com um dobramento em barril (β/α)₈ (Figura 2a.) e são versáteis, podendo hidrolisar muitos tipos de heteroxilanas e mesmo alguns aril-celibiosídeos (Biely *et al.*, 1997; Gilkes *et al.*, 1991). As xilanases GH11 são xilanases menores com estrutura β -jelly-roll (Figura 2b.), são altamente específicas e não toleram altos graus de substituição na cadeia lateral do substrato (Biely *et al.*, 1997).

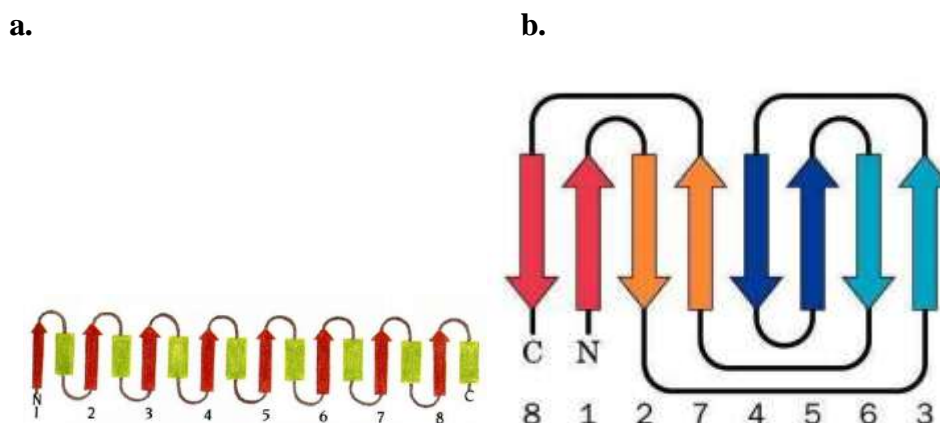


Figura 2. Representação topológica da estrutura das xilanases. **a.** Motivos β - α - β adjacentes presentes na estrutura do barril (β/α)₈ das xilanases da família GH10. **b.** Motivos chave-grega presentes na estrutura β -jelly-roll das xilanases da família GH11.

As xilanases da família 11 acomodam de cinco a sete resíduos xilopiranosídicos no sítio catalítico, já as xilanases da família 10, ligam o substrato superficialmente à base do barril (Subramaniyan *et al.*, 2002; Dood *et al.*, 2009). Xilanases da família 11 possuem pontos de clivagem mais específicos, de acordo com o tamanho da cadeia e as ramificações existentes. Já as xilanases da família 10 são capazes de hidrolisar tanto pontos próximos às ramificações quanto xilooligosacarídeos ligados a outras cadeias polissacarídicas, como a celulose (Biely *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2011). Os principais produtos finais das xilanases GH11 são arilxilobiose e xilotriose (Berrin *et al.*, 2007), ao passo que as xilanases GH10 são capazes de liberar xilose como produto final (Charnock *et al.*, 1997). Essas diferentes características são responsáveis pela especificidade catalítica de cada tipo de xilanase.

2.3.1. Xilanases de *Aspergillus nidulans*

Aspergillus nidulans é um ascomiceto e cresce rapidamente como um fungo filamentosos em meio sólido e líquido sob diversas condições nutricionais. É capaz de crescer na faixa de temperatura de 6 a 48 °C, porém, apresenta um crescimento ótimo entre 30 e 35 °C. É capaz de utilizar como fontes de carbono glicose, sacarose, rafinose e manitol. Normalmente, encontra-se sob a forma haplóide, mas também pode ser induzido a crescer como um diplóide vegetativo. Produz esporos assexuais (conídeos) e esporos sexuais (ascoporos) (Mycota, 2007).

O principal habitat do fungo são os materiais de decomposição lenta, sendo um contaminante frequente de alimentos e do solo. *Aspergillus nidulans* é responsável por causar danos respiratórios como aspergilose broncopulmonar, asma e alveolite alérgica. (Mycota, 2007).

Fernández-Espinar *et al.* (1992) relataram que o fungo *Aspergillus nidulans*, quando cultivado em meio líquido contendo xilana como única fonte de carbono, secreta três diferentes xilanases: X₂₂, X₂₄ e X₃₄. Essas xilanases possuem massa molecular de 22, 24 e 34 kDa e os genes que as codificam são denominados *xlnA*, *xlnB* e *xlnC*, respectivamente.

O tamanho do genoma do fungo *Aspergillus nidulans* é de aproximadamente 31 Mb, apresentando 8 cromossomos contendo aproximadamente de 11.000 a 12.000 genes. Aproximadamente 900 genes foram identificados por abordagens convencionais, 432 *locus* foram mapeados e 254 foram clonados e sequenciados (Mycota, 2007). Dentre os genes identificados encontram-se aqueles das endo- β -1,4-xilanases AN1818.2 (X_{34} , gene *xlnC*) e AN3613.2 (X_{24} , gene *xlnB*).

A estrutura da xilanase AN1818.2 (X_{34}) em complexo com o inibidor XIP-I (proteína I do trigo *Triticum aestivum* inibora de xilanase) foi elucidada pela técnica de raio-X (Figura 3). A estrutura dessa xilanase apresenta um barril (β/α)₈, típico de xilanases GH10. A molécula possui a forma de uma “saladeira” com um corte transversal elíptico no lado C-terminal do barril com um eixo mais curto e mais longo de 40 e 53 Å, respectivamente (Payan *et al.*, 2004).

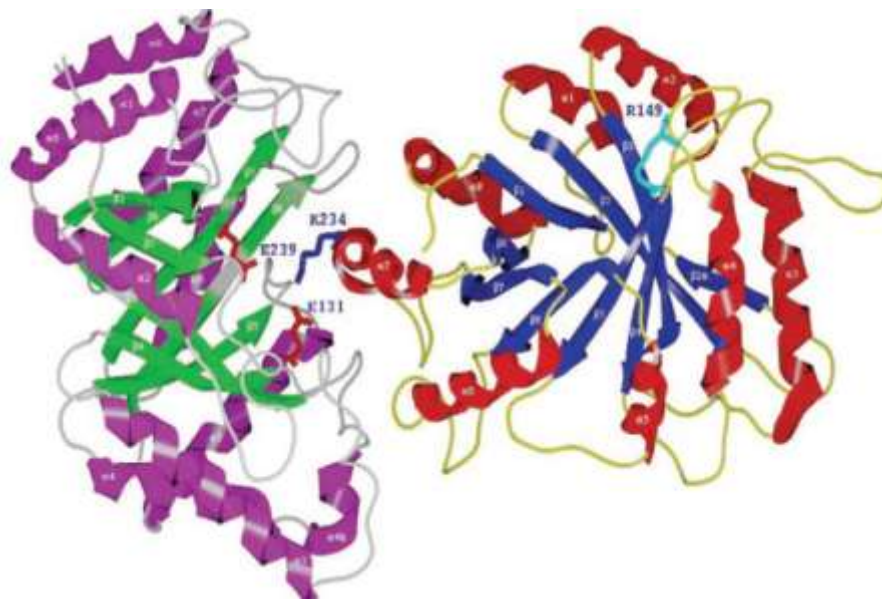


Figura 3. Estrutura do complexo XIP-I-AN1818.2. XIP-I está em vermelho e azul e a xilanase AN1818.2 está em roxo e verde. A cadeia lateral dos dois resíduos catalíticos da xilanase é mostrada em vermelho (Payan *et al.*, 2004).

Uma busca no PDB por proteínas com estrutura conhecida e sequência semelhante à da proteína AN1818.2 revelou a estrutura de uma xilanase de *Penicillium*

simplicissium ligada à β -1,4-xilotriose (Figura 4) (Schmidt *et al.*, 1999) com similaridade de 92% e identidade de 66%.

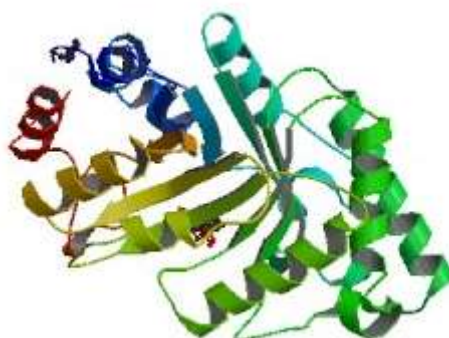


Figura 4. Estrutura de uma xilanase GH10 de *Penicillium simplicissium* ligada à β -1,4-xilotriose (Schmidt *et al.*, 1999).

A xilanase AN3613.2 não possui estrutura 3D elucidada. Entretanto, uma busca no PDB por proteínas com estrutura conhecida e sequência semelhante à da proteína AN3613.2 revelou a estrutura de uma xilanase GH11 de *Acremonium cellulolyticus* (Figura 5a.) (Kataoka *et al.*, 2014) com similaridade de 90% e identidade de 63%. Outra estrutura semelhante encontrada foi a de uma xilanase GH11 de *Penicillium funiculosum* em complexo com o inibidor XIP-I (proteína I do trigo *Triticum aestivum* inibora de xilanase) (Figura 5b.) (Payan *et al.*, 2004)) com similaridade de 82% e identidade de 68%.

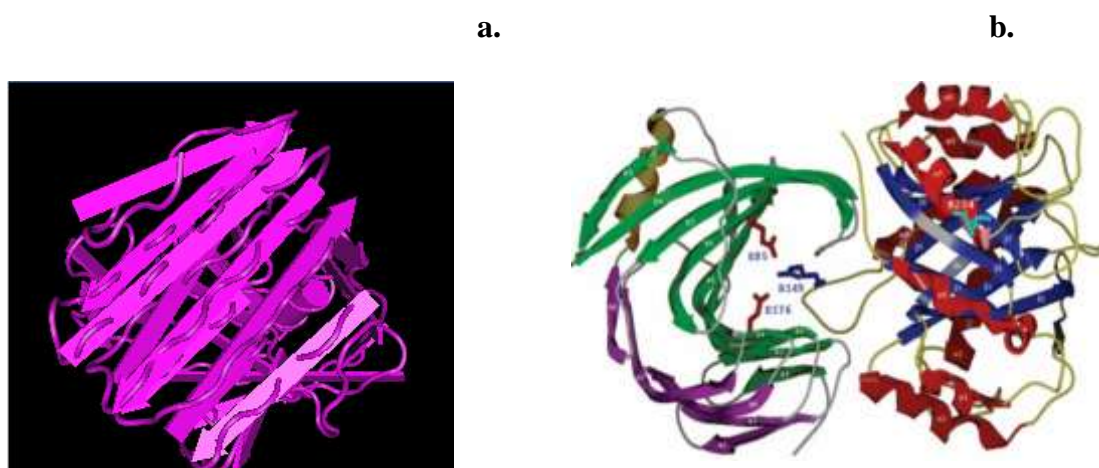


Figura 5.a. Estrutura da xilanase GH11 de *Acremonium cellulolyticus* (Kataoka *et al.*, 2014). **b.** Estrutura do complexo XIP-I- xilanase de *Penicillium funiculosum*. XIP-I está em vermelho e azul e a xilanase GH11 de *Penicillium funiculosum* está em roxo e verde (Payan *et al.*, 2004).

2.3.2.Xilanases e Biotecnologia

A indústria de enzimas cresceu nas décadas de 1980 e 1990 e as enzimas microbianas tiveram seu advento nesse mesmo período. Enzimas provenientes de microorganismos são economicamente viáveis visto que estes possuem um cultivo simples e rápido e os organismos produtores podem ser manipulados geneticamente para produzir enzimas com as qualidades desejadas e em elevadas quantidades (Demain & Vaishnav, 2009). A levedura *Pichia pastoris* é um sistema útil para a produção de miligramas a gramas de proteínas para pesquisa básica em laboratório e para processos industriais (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

2.3.2.1.*Pichia pastoris*: Microorganismo Hospedeiro para Expressão de Xilanases

Pichia pastoris é uma levedura classificada como pertencente ao Reino *Fungi*, Divisão *Eumycota*, Subdivisão *Ascomycotina*, Classe *Hemoascomycetes*, Ordem *Endomycetales*, Família *Saccharomycetaceae* e Subfamília *Saccharomycetoideae*. Atualmente foi reclassificada em um novo Gênero denominado *Komagataella* e dividida nas espécies *K. pastoris*, *K. phaffii* e *K. pseudopastoris* (Kurtzman, 2009).

A levedura *Pichia pastoris* é muito usada na expressão heteróloga de enzimas. Esse sistema de expressão apresenta como vantagens: altos rendimentos, produção estável de cepas, durabilidade, custo-efetivo, crescimento em altas densidades, alta produtividade, capacidade de produzir proteínas marcadas com isótopos, rápido crescimento em meio químico definido, processamento do produto similar ao de células de mamíferos, capacidade de formação de pontes dissulfeto, envelamento proteico, processamento de peptídeo sinal e glicosilação de proteínas (Demain & Vaishnav, 2009).

A glicosilação em *Pichia pastoris* adiciona O-oligossacarídeos a resíduos de serina e treonina das proteínas secretadas. Esses oligossacarídeos são compostos apenas de manose, enquanto que em eucariotos superiores a composição dos açúcares é mais variada. Os sítios de glicosilação podem ser diferentes em *Pichia pastoris* e no hospedeiro nativo em que determinada proteína é expressa (Cereghino & Cregg, 2000).

A purificação das proteínas secretadas é relativamente simples devido aos baixos níveis de proteínas endógenas no meio extracelular (Çelik & Çalic, 2012). Entretanto, sinais de secreção são fusionados ao N-terminal das proteínas heterólogas expressas. O

peptídeo sinal fator de acasalamento α de *Saccharomyces cerevisiae* é o sinal de secreção mais usado na expressão de xilanases e está presente no vetor pPICZ α C (Invitrogen). Esse peptídeo é uma (pre)sequência de 19 aminoácidos seguida por uma (pro)sequência de 66 resíduos. Três sítios de glicosilação N-ligados e um sítio de processamento pela endopeptidase Kex2 estão presentes na (pro)sequência (Kurjan and Herskowitz, 1982). Outro fator que facilita a purificação é a presença de uma *His tag*, que possui alta afinidade por níquel, presente na proteína heteróloga (Invitrogen, 2010).

Pichia pastoris é denominada uma levedura metiltrófica, pois é capaz de crescer na presença de metanol como única fonte de carbono.

A enzima álcool oxidase (AOX, EC 1.1.3.13) catalisa o primeiro passo da via de utilização do metanol (via MUT) (Bobrowicz *et al.*, 2004). O genoma de *Pichia pastoris* contém dois genes AOX: AOX1 compreende 30% das proteínas solúveis totais no extrato de *Pichia pastoris* crescida somente em metanol e é controlada pelo promotor forte pAOX1 (Bobrowicz *et al.*, 2004; Bos *et al.*, 2003; Boue *et al.*, 2004); AOX2 é responsável por 15% da atividade AOX total da célula e é controlado pelo promotor mais fraco pAOX2 (Boysen *et al.*, 2004). Ambos os promotores são induzidos por metanol.

Há três fenótipos de *Pichia pastoris* que são classificados de acordo com o perfil de utilização de metanol. O fenótipo Mut⁺ (*metanol utilization plus*) cresce em metanol com taxa semelhante ao tipo selvagem e requer altas taxas de suprimento de metanol em fermentações de larga escala. O fenótipo Mut^S (*methanol utilization slow*) possui uma ruptura no gene AOX1, apresentando uma menor taxa de crescimento e de utilização de metanol, visto que o promotor AOX2 é fraco. O fenótipo Mut⁻ (*metanol utilization minus*) é incapaz de crescer em metanol devido à deleção de ambos os genes AOX (Cereghino & Cregg, 2000).

O fenótipo Mut⁺ é caracterizado por maior taxa de crescimento e produtividade mais elevada (Bretthauer & Castellino, 1999; Brierley *et al.*, 1994; Brocca *et al.*, 1998; Brunel *et al.*, 2004). Entretanto, o fenótipo Mut⁺ apresenta algumas desvantagens quando utilizado em larga escala: cepas Mut⁺ são mais sensíveis a alterações na concentração de metanol (Brunel *et al.*, 2004; Callewaert *et al.*, 2001; Cereghino & Cregg, 2000); a formação de peróxido de hidrogênio durante o processo de oxidação do metanol é conhecida por causar estresse celular e induzir a morte de células (Cereghino

et al., 2001) e a combustão do metanol resulta na produção de calor (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

O oxigênio é utilizado na oxidação de metanol a formaldeído. Logo, altos níveis de oxigênio são necessários à via de utilização do metanol, levando à formação do produto (Sibirny *et al.*, 1990). Para fornecer a quantidade de oxigênio necessária, elevada agitação do meio de cultura é necessária. Fontes de carbono não fermentativas, como o glicerol, devem ser escolhidas ao invés de fontes fermentativas, como a glicose, para o crescimento. Isso ocorre porque as fontes fermentativas tem como produto o etanol, capaz de reprimir o promotor AOX até mesmo em concentrações de 10 a 50 mg/mL (Inan & Meagher, 2001a e b) . A quantidade de metanol também é uma variável importante a ser controlada, visto que altas concentrações podem ser tóxicas às células e baixos níveis podem ser insuficientes para iniciar a transcrição (Cereghino & Cregg, 2000; Zhang *et al.*, 2000).

A temperatura ótima de crescimento de *Pichia pastoris* é de 30 °C, entretanto, a temperatura para se obter maior produtividade da proteína de interesse, assim como o pH, variam de acordo com cada proteína (Inan *et al.*, 1999). Temperaturas mais altas também influenciam o rendimento da proteína recombinante devido a menor estabilidade desta, liberação de mais proteases devido à morte celular e problemas de envelhecimento (Hong *et al.*, 2002).

A levedura *Pichia pastoris* X-33, fenótipo Mut⁺, foi o microorganismo hospedeiro escolhido para a expressão heteróloga das xilanases AN1818.2 e AN3613.2 de *Aspergillus nidulans*.

2.3.3. Aplicações das Xilanases

Xilanases constituem a maior porção comercial dentre as hemicelulases e destacam-se nas seções de enzimas comerciais que figuram no mercado de alimentação e ração animal. São enzimas que possuem crescente atenção devido a sua ampla gama de aplicações em processos industriais (Bhardwaj *et al.*, 2012). Os diferentes tipos de xilanases podem ser utilizados de forma pura ou em mistura para ações sinérgicas. Assim como outras enzimas, a funcionalidade das xilanases depende de fatores como estabilidade ao pH, termoestabilidade e especificidade do substrato (Beaugrans *et al.*, 2004b; Courtin & Delcour, 2002).

2.3.3.1. Tecnologia de Alimentos, Bebidas e Rações

Na indústria de pães, misturas de xilanases de algumas famílias são usadas para promover melhora na qualidade do pão (Goesaert *et al.*, 2005) e na estrutura do miolo e reduzir a viscosidade da massa (Butt *et al.*, 2008). Xilanases da família GH11 são usadas para aumentar o tempo de prateleira do pão, assim como seu volume (Verjans *et al.*, 2010).

Xilanases das famílias GH10 e GH11 são utilizadas na separação da farinha de trigo em amido e glúten. Nesse caso, o uso de uma mistura com determinada proporção de xilanases GH10 e GH11 facilita a aglomeração de proteínas do glúten e aumenta o rendimento deste (Van Der Borght *et al.*, 2005).

Na indústria de bebidas, misturas de xilanases são utilizadas a fim de liberar oligo e monossacarídeos, diminuindo a quantidade de materiais insolúveis e facilitando a clarificação de sucos (Olfa *et al.*, 2007). Já na indústria de cervejas, as xilanases são utilizadas para facilitar a filtração, diminuindo a viscosidade da solução através da redução do teor da fração viscosa de arabinóxilana (Debyser *et al.*, 1997).

No preparo de rações animais, são usados coquetéis de xilanases devido ao sinergismo e a pequena necessidade de especificidade do substrato (Päes *et al.*, 2012). A adição de xilanases a rações favorece a digestibilidade da fibra crua e aumenta o ganho de peso do animal (Vandeplas *et al.*, 2010). Além disso, os xilooligossacarídeos produzidos podem atuar como prebióticos, estimulando o crescimento ou atividade de determinados microrganismos no trato digestivo e conferindo benefícios à saúde do animal (Lafond *et al.*, 2011).

2.3.3.2. Indústria de Papel

A utilização de xilanases pode reduzir a quantidade de clorina e de dióxido de clorina usada no bi branqueamento da polpa de madeira (Päes *et al.*, 2012). O mecanismo pelo qual as xilanases melhoram as propriedades da polpa ainda permanece obscuro, entretanto, há a hipótese de que a quebra das interações entre a xilana e a lignina provoca uma melhor abertura da estrutura ao redor da polpa celulósica. As xilanases atuam reduzindo os carboidratos ácidos da fibra e as quantidades de xilose, ambos responsáveis pelo amarelamento do produto (Päes *et al.*, 2012).

2.3.3.3.Cosméticos

As xilanases podem ser usadas em adição a outros compostos químicos a *shampoos* para pêlos e fibras capilares, sendo capazes de limpá-los sem causar danos físicos (Pães *et al.*, 2012).

2.3.3.4.Biocombustíveis

Como descrito no item 1., as xilanases desempenham um papel fundamental no processo de hidrólise da biomassa para a produção de etanol de segunda geração. Devido à recalcitrância da biomassa, as xilanases, em especial as da família GH11, são essenciais para a degradação da parede celular da planta. Devido à baixa massa molecular e à forma globular que possuem, as xilanases GH11 são enzimas que iniciam a hidrólise da parede celular, facilitando a ação posterior de enzimas maiores ou multiméricas. Logo, essas xilanases são essenciais, em combinação com outras enzimas, para a redução do custo do processo (Pães *et al.*, 2012).

3.OBJETIVOS

3.1.Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho é aumentar a eficiência da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando as endo-(β -1,4)-xilanases AN1818.2 e AN3613.2 de *Aspergillus nidulans* expressas em *Pichia pastoris*.

3.2.Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Expressar as xilanases AN1818.2 e AN3613.2 de *Aspergillus nidulans* clonadas em *Pichia pastoris*.
- Purificar as xilanases AN1818.2 e AN3613.2 por cromatografia de afinidade em coluna de níquel e por cromatografia de gel filtração.
- Caracterizar as xilanases AN1818.2 e AN3613.2 quanto ao efeito de pH, estabilidade ao pH, efeito de temperatura, termoestabilidade, efeito de íons e outros agentes, especificidade do substrato e parâmetros cinético-enzimáticos (K_m , V_{max} , k_{cat} e k_{cat}/K_m).
- Analisar a composição dos produtos de hidrólise da xilana *beechwood* pelas xilanases AN1818.2 e AN3613.2.
- Aplicar as enzimas purificadas em combinação com coquetéis enzimáticos comerciais de celulasas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

4.METODOLOGIA

Parte I

Expressão, Purificação, Caracterização Bioquímica e Aplicação das Proteínas AN1818.2 e AN3613.2 na Hidrólise do Bagaço de Cana-de-Açúcar

Na primeira parte do trabalho, foi realizada a expressão das xilanases AN1818.2 e AN3613.2 e uma purificação parcial através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel. As amostras das proteínas purificadas nessa etapa foram utilizadas para a caracterização bioquímica e aplicação na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

4.1. Construção do Plasmídeo e Otimização da Expressão

A construção do plasmídeo foi realizada por Bauer *et al.*, como descrito anteriormente na literatura (Bauer *et al.*, 2006). *Aspergillus nidulans* FGSCA4 foi obtido na Universidade de Missouri, cidade Kansas (Mccluskey, 2003). O fungo foi crescido em meio mínimo (pH 4,0) suplementado com extrato de levedura 0,5%; peptona 1,0%; glicose 2,0% e elementos-traço de Hutner a 37 °C (Barratt *et. al*, 1965). A fim de induzir a produção de xilanases, o micélio do fungo foi estéril-filtrado e transferido para um meio mínimo (pH 4,5) contendo elementos-traço de Hutner e xilana *larchwood* (Sigma) 0,5%. O RNA foi extraído utilizando-se Trizol (Invitrogen) e a síntese da primeira fita de cDNA foi performada com a transcriptase reversa SuperScript (Invitrogen) e oligo(dT)primer. O DNA codificador das xilanases AN1818.2 (GenBank ID: DQ490475) e AN3613.2 (GenBank ID: DQ490490), incluindo a sequência do peptídeo sinal nativo, foi amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase) usando *primers* e sítios de restrição específicos, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. *Primers* e sítios de restrição (em negrito) utilizados na amplificação dos genes das xilanases AN1818.2 e AN3613.2.

Enzima	<i>Primers</i> usados para amplificação por PCR (incluindo sítios de restrição)
AN1818.2	GAAAGCACGTGATATGGTCCATCTTAAAACCCT (PmlI) TACAGTCTAGAGACAGAGCGTTGACGATTG (XbaI)
AN3613.2	GAAAGCACGTGATATGGTCTCCTTCAAATCTCTC (PmlI) TACAGTCTAGATAAACAGTAATAGAAGCCGAC (XbaI)

Os fragmentos amplificados foram clonados em sítios correspondentes no vetor pPICZαC (Invitrogen) e em *frame* com o fator de secreção α de levedura, sob controle do promotor álcool oxidase AOX1 (Bauer *et al.*, 2005). As proteínas recombinantes também continham um epítipo myc e uma cauda 6-His no C-terminal. Os produtos foram transformados em células competentes TOP 10 de *Escherichia coli* (Invitrogen) e as colônias resistentes à zeocina foram sequenciadas (ABI PRISM™ Big Dye™ sequenciamento de terminação dideoxinucleotídeo, Applied Biosystems) para identificar um clone livre de erros.

O plasmídeo foi linearizado com PmeI e transformado em *Pichia pastoris* X-33 (Invitrogen) por eletroporação. Clones de *P. pastoris* zeocina-resistentes foram isolados e selecionados para a expressão das proteínas em estudos de pequena escala.

Os clones foram crescidos em 5 mL de BMGY (meio de glicerol complexo tamponado: extrato de levedura 1,0%; peptona 2,0%; YNB 1,34%; glicerol 1,0%; biotina 4×10^{-5} % e tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,0) em tubos de 50 mL a 28 °C e a 250 rpm por 24 horas. A expressão foi induzida pela transferência de células para 5 mL de meio BMMY (extrato de levedura 1,0%; peptona 2,0%; YNB 1,34%; metanol 0,5% (v/v); biotina 4×10^{-5} % e tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,0) e crescimento por mais 24 horas. O sobrenadante foi analisado por dot-blots em membrana de nitrocelulose usando anticorpo anti-myc (Sigma), anticorpo anti-IgG de coelho conjugados a peroxidase (Pierce) e o kit Est Pico Chemiluminescence (Pierce). Os transformantes que apresentaram maior concentração de enzima segundo os ensaios citados anteriormente foram selecionados (Bauer *et al.*, 2005).

4.2. Expressão das Proteínas Recombinantes

As colônias transformadas de *Pichia pastoris* foram mantidas em placas de Petri contendo meio GYPA (peptona 1,0%; extrato de levedura 0,5%; glicose 2,0% e ágar 1,5%) a 4 °C. Antes do experimento de expressão das proteínas recombinantes, as colônias contendo os genes das enzimas AN1818.2 e AN3613.2 foram repicadas para placas de Petri contendo meio GYPA novo. Essas placas foram incubadas em BOD a 28 °C por 48 horas. Após o crescimento, as colônias foram pré-inoculadas, por raspagem, em 250 mL de meio BMGY (extrato de levedura 1,0%; peptona 2,0%; YNB 1,34%; glicerol 1,0%; biotina 4×10^{-5} %; tampão fosfato de sódio pH 6,0 100 mM). Os erlenmeyers foram então acondicionados em *shaker* orbital a 28 °C e agitação de 250

rpm por um período de 16 a 18 horas. Após esse intervalo de tempo, foi realizada a medida de densidade ótica (DO) a 600 nm e calculou-se o volume de meio BMGY necessário à obtenção de uma DO final de 1,0 em um volume de 250 mL de meio BMMY (extrato de levedura 1,0%; peptona 2,0%; YNB 1,34%; metanol 0,5 % (v/v), biotina 4×10^{-5} %; tampão fosfato de sódio pH 6,0 100 mM)- meio de indução da expressão. O volume determinado de meio BMGY foi centrifugado a 2500 g por 5 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em meio BMMY. Em seguida, erlenmeyers de 1L contendo 250 mL de meio BMMY foram incubados em *shaker* orbital a 28° C e agitação de 250 rpm por um período de 72 horas, adicionando-se metanol 0,5% (v/v) a cada 24 horas. Ao final das 72 horas, os 250 mL de meio BMMY foram centrifugados a 2500 g por 5 minutos a 20 °C e o sobrenadante foi considerado o extrato bruto contendo as enzimas de interesse.

4.3.Ensaios para a Verificação da Expressão das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2

4.3.1.Ensaio de Atividade de Xilanase

O ensaio para a determinação de atividade de xilanase foi conduzido segundo o método de Bailey *et al.* (1992). Em banho de gelo, adicionaram-se 100 µL de enzima adequadamente diluída em tampão ácido acético/acetato de sódio 50 mM pH 5,0 a 400 µL de xilana *beechwood* 1,0% (Sigma). Em seguida, os tubos de ensaio foram agitados em vórtex e incubados em banho-maria a 50 °C durante 15 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 500 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e a quantificação de açúcares redutores foi realizada pelo método de Miller (1959), efetuando-se a leitura de absorvância a 540 nm no aparelho MultiskanGO Thermoscientific™. A quantidade de açúcar redutor foi estimada utilizando-se uma curva-padrão construída com solução de xilose 1 mg/mL.

A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como µmol de açúcar redutor (produto) formado por minuto de reação e sob as condições de ensaio.

4.3.2.Eletroforese em Gel Desnaturante de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise das proteínas presentes no extrato bruto foi realizada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970). A cuba para eletroforese foi

preenchida com tampão Tris/Glicina pH 8,8 contendo 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS). A corrida foi realizada aplicando-se uma voltagem constante de 100 V. A revelação do gel foi feita com nitrato de prata conforme procedimento descrito por Blum *et al.* (1987) ou com Coomassie Blue R[®].

4.3.2.1.Preparo do Gel Separador

O gel separador foi preparado de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Composição do gel separador.

Componentes	Volume (mL)
Água	3,35
Tampão Tris/Glicina pH 8,8	2,5
SDS 10% (p/v)	0,1
Bis/Acrilamida (1:36,5)	4
Persulfato de amônio 10% (p/v)	0,05
TEMED	0,01

4.3.2.2.Preparo do Gel Empilhador

O gel empilhador foi preparado de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Composição do gel empilhador.

Componentes	Volume (mL)
Água	6,1
Tampão Tris/Glicina pH 6,8	2,5
SDS 10% (p/v)	0,1
Bis/Acrilamida (1:36,5)	1,3
Persulfato de amônio 10% (p/v)	0,05
TEMED	0,02

4.3.2.3.Preparo das Amostras

Algumas amostras com altas concentrações de proteína não precisaram ser concentradas para a aplicação no gel. Nesse caso, misturou-se um volume de 20 µL da

amostra com 5 μL de tampão de extração (4,8 mL de água, 1,2 mL de tampão Tris/glicina, 2 mL de SDS 10% (p/v), 1 mL de glicerol e traço de azul de bromofenol, 475 μL de β -mercaptoetanol). Essa mistura foi fervida por 5 minutos. Logo após, 20 μL da mistura foram aplicados no gel.

Já as amostras com baixas concentrações de proteínas foram submetidas a um método de concentração de proteínas com ácido tricloroacético (TCA). Inicialmente, adicionou uma solução de TCA 50% (v/v) a dado volume de amostra a fim de obter-se uma concentração final de TCA de 12,5%. Essa mistura foi deixada em banho de gelo por duas horas. Logo após, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com acetona a fim de eliminar o excesso de TCA e a mistura foi submetida a outro passo de centrifugação sob as mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram mantidas a temperatura ambiente até a total evaporação da acetona. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em 30 μL de tampão de extração e a amostra foi fervida por 4 minutos. Foram aplicados 20 μL da amostra no gel.

4.3.2.4. Coloração com Coomassie Blue

A revelação do gel foi feita com a incubação em solução corante de Coomassie (45 mL de metanol, 45 mL de água, 10 mL de ácido acético glacial, 0,1 g de Coomassie R) por no mínimo três horas. Após este tempo, o gel foi lavado inúmeras vezes com solução descorante de Coomassie (45 mL de metanol, 45 mL de água, 10 mL de ácido acético glacial) até que as bandas fossem visualizadas.

4.3.2.5. Coloração com Nitrato de Prata

Após a corrida, o gel foi incubado em solução fixadora (50 mL de metanol 95%, 12 mL de ácido acético, 38 mL de água) por, no mínimo, duas horas. Logo após, a solução fixadora foi descartada e realizaram-se três lavagens do gel, cada uma com duração de 10 minutos, com etanol 50% (v/v). Após a lavagem, o gel foi incubado com solução 0,02% (p/v) de tiosulfato de sódio por 1 minuto e depois lavado por 20 segundos com água destilada por três vezes. Em seguida, o gel foi incubado por 20 minutos em solução de nitrato de prata (0,2 g de nitrato de prata, 0,037 mL de formaldeído 37%, 100 mL de água). O próximo passo consistiu na lavagem do gel por

20 segundos com água destilada por 3 vezes. A seguir, aplicou-se a solução reveladora (2 g de carbonato de sódio, 1 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02% (p/v), 0,025 mL de formaldeído 37%, q.s.p. 50 mL) sobre o gel e paralisou-se a reação pela adição de 3 mL de ácido acético.

4.3.3.Zimograma

Os géis de poli(acrilamida) utilizados para a determinação da atividade de xilanase também foram formados pela co-polimerização de acrilamida e bis(acrilamida) na presença de persulfato de amônio e de tetrametiletilenodiamina (TEMED), porém, adicionou-se xilana *beechwood* em uma concentração final de 13,9% (v/v) no gel de separação. Este foi preparado de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4. Composição do gel do zimograma.

Componentes	Volume (mL)
Água	2,1
Tampão Tris/Glicina pH 8,8	2,5
SDS 10% (p/v)	0,05
Bis/Acrilamida (1:36,5)	3,25
Persulfato de amônio 10% (p/v)	0,05
TEMED	0,015
Xilana <i>beechwood</i> 1,25% (p/v)	1,00

O gel empilhador foi preparado exatamente como descrito no item 4.3.2.2.

As amostras foram aplicadas duas vezes no gel, já que metade deste foi corado com Coomassie Blue e a outra metade com vermelho Congo. O preparo das amostras da parte corada com Coomassie Blue foi feito pela mistura de um volume de 15 µL da amostra com 5 µL de tampão de extração (4,8 mL de água, 1,2 mL de tampão Tris/glicina, 2 mL de SDS 10% (p/v), 1 mL de glicerol e traço de azul de bromofenol, 475 µL de β-mercaptoetanol). Essa mistura foi fervida por 5 minutos. Logo após, os 20 µL foram aplicados no gel. Já o preparo das amostras da parte corada com vermelho Congo foi feito pela mistura de um volume de 15 µL da amostra com 5 µL de tampão de extração sem β-mercaptoetanol (4,8 mL de água, 1,2 mL de tampão Tris/glicina, 2 mL de SDS 10% (p/v), 1 mL de glicerol e traço de azul de bromofenol). A mistura não foi fervida e os 20 µL foram aplicados no gel.

O gel foi colocado em cuba de eletroforese com voltagem constante de 100 V. Após o término da corrida, o gel foi incubado em tampão ácido acético/acetato de sódio 100 mM contendo isopropanol 20% (v/v). Esse procedimento teve duração de 15 minutos e foi repetido por duas vezes. Logo após, o gel foi equilibrado em tampão ácido acético/acetato de sódio 100 mM em banho-maria a 50 °C por 15 minutos. Em seguida, o gel foi mergulhado em solução de vermelho Congo 0,1% (p/v) sob agitação lenta durante 20 minutos. Após esse intervalo de tempo, o gel foi lavado com solução de NaCl 1M até a visualização das bandas de atividade. Para a observação do gel na cor azul-escuro, foi adicionado 1 mL de ácido acético glacial.

4.4.Purificação com Cromatografia de Afinidade em Coluna de Níquel

A cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA foi feita segundo o protocolo do fabricante da resina, The QIAexpressionist™ Qiagen®, porém, com algumas adaptações. Utilizou-se a purificação em *batch* e sob condições nativas.

Inicialmente, 1 mL da resina, que é armazenada em etanol, foi centrifugado a 2500 g por 5 minutos. O sobrenadante (etanol) foi descartado e adicionou-se água à resina a fim de lavá-la. A mistura de água e resina foi centrifugada a 2500 g por 5 minutos e o sobrenadante (água) foi descartado. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Em seguida, o precipitado (resina) foi ressuspensionado em tampão fosfato de sódio pH 8,0 para uma concentração final de 50 mM.

O extrato bruto foi preparado adicionando-se imidazol para uma concentração final de 10 mM e logo após, ajustando-se o pH para 8,0 com NaOH 1M.

Após o preparo do extrato bruto, 4 mL deste foram adicionados a 2 mL de resina. Essa mistura ficou sob mesa agitadora a 4 °C durante 2 horas.

A coluna cromatográfica foi montada adicionando-se ao interior de uma seringa plástica de 10 mL uma fina camada de lã de vidro e vedando-se a ponta da seringa com fita adesiva. Após a montagem da coluna, o *batch* (mistura da resina com o extrato bruto) foi adicionado à seringa e esperou-se o empacotamento da resina. Após o empacotamento, a fita adesiva foi retirada e o líquido eluído foi coletado e armazenado a 4 °C (fração FA). Em seguida, foram realizadas 4 lavagens com 4 mL de tampão *Wash* (50 mM Na_2HPO_4 , 300mM NaCl e 20mM imidazol, pH 8,0) a fim de remover as proteínas que não aderiram à coluna. Essas frações (frações *Wash* ou W) foram coletadas e armazenadas a 4 °C. Após esse procedimento, foram realizadas 20 lavagens

com 0,5 mL de tampão *Elution* (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8,0). Essas frações (frações *Elution* ou E) foram coletadas e armazenadas a 4 °C.

A análise da cromatografia foi feita através da medida de atividade de xilanase, conforme explicado no item 4.3.1, e da quantificação de proteínas totais pelo método do ácido bicinonínico, de acordo com o item 4.5. , para todas as frações cromatográficas.

4.5.Quantificação de Proteínas Totais das Amostras

A quantificação de proteínas totais das amostras foi realizada pelo método do ácido bicinonínico, segundo Smith *et al.* (1985). Uma líquota de 1 mL do reagente de trabalho (50 mL de solução de ácido bicinonínico, 1mL de solução de CuSO₄ 5 H₂O 4%) foi adicionado a 100 µL de amostra diluída em água. A mistura foi levada ao vórtex e, em seguida, incubada em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Após esse tempo, a mistura é deixada a temperatura ambiente por 20 minutos e, em seguida, é realizada a leitura de absorvância a 562 nm. A quantidade de proteína da amostra é estimada utilizando-se uma curva-padrão construída com solução de albumina sérica bovina (BSA) 0,2 mg/mL.

4.6.Espectrometria de Massas

A fim de confirmar se as bandas das amostras das proteínas purificadas presentes no gel de eletroforese correspondiam às proteínas AN1818.2 e AN3613.2 , realizou-se a excisão das bandas do gel de poliacrilamida e estas foram preparadas para serem submetidas ao experimento de espectrometria de massas.

4.6.1.Preparo das Soluções

Todos os reagentes foram preparados imediatamente antes do uso. A água utilizada foi a Mili-Q. Todos os reagentes utilizados foram de grau de pureza HPLC. A tripsina utilizada foi da Promega[®], sendo *sequencing-grade*, ou seja, modificada para inibir auto-hidrólise e para minimizar atividades não tríplicas.

4.6.1.1. Solução de Lavagem

Foram adicionados 10 mL de metanol a 5 mL de água. Em seguida, adicionou-se 1 mL de ácido acético e o volume foi completado para 20 mL com água destilada. A concentração final é de 50% (v/v) de metanol e de 5% (v/v) de ácido acético.

4.6.1.2. Solução de Bicarbonato de Amônio 100 mM

Foram dissolvidos 0,2g de bicarbonato de amônio em 20 mL de água e o pH foi ajustado para 8,0.

4.6.1.3. Solução de Bicarbonato de Amônio 50 mM

Misturaram-se 2 mL de bicarbonato de amônio 100 mM com 2 mL de água.

4.6.1.4. Solução de DTT 10 mM

Adicionou-se 1 mL da solução de bicarbonato de amônio 100 mM a 1,5 mg de DTT e agitou-se em vórtex até dissolução completa.

4.6.1.5. Solução de Iodoacetamida 100mM

Adicionou-se 1 mL de solução de bicarbonato de amônio 100 mM a 18 mg de iodoacetamida e agitou-se em vórtex até dissolução completa.

4.6.1.6. Solução de Tripsina

Adicionou-se 1 mL de bicarbonato de amônio 50 mM resfriado em gelo a 20 µg de Tripsina Promega[®]. Esta foi dissolvida ressuspendendo-se com a pipeta. A concentração final de tripsina é de 20 ng/mL. A solução foi mantida em gelo até o uso.

4.6.1.7. Tampão de Extração

Foram adicionados 10 mL de acetonitrila a 5 mL de água. Em seguida, adicionou-se 1 mL de ácido fórmico e o volume final foi ajustado com água para 20

mL. A concentração final é de 50% (v/v) de acetonitrila e de 5% de (v/v) de ácido fórmico.

4.6.2. Digestão em Gel para Espectrometria

As bandas de proteína foram cortadas do gel com uma espátula e o fragmento resultante foi dividido em pequenos pedaços que foram colocados em um *eppendorf*. Em seguida, adicionaram-se 200 μL de solução de lavagem e a mistura foi deixada em repouso *overnight* à temperatura ambiente.

No dia seguinte, a solução de lavagem foi removida e descartada. A seguir, 200 μL de solução de lavagem foram adicionados novamente e a mistura foi deixada à temperatura ambiente por 3 horas. Após esse período, a solução de lavagem foi descartada e 200 μL de acetonitrila foram adicionados a fim de desidratar o gel. Em seguida, a solução de acetonitrila foi descartada e as amostras foram secas em *speed vac* por 5 minutos. Logo após, foram adicionados 30 μL de DTT 10 mM e a mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente por meia hora. A solução de DTT foi descartada e foram adicionados 30 μL de iodoacetamida 100 mM. A mistura foi deixada à temperatura ambiente por 30 minutos e, logo em seguida, a iodoacetamida foi removida. Adicionaram-se então, 200 μL de acetonitrila e o gel foi deixado à temperatura ambiente por 5 minutos. A acetonitrila foi removida e o gel foi reidratado pela adição de 200 μL de bicarbonato de amônio 100 mM, incubando-se a amostra por 10 minutos à temperatura ambiente. O processo de desidratação foi repetido pela remoção do bicarbonato de amônio e adição consecutiva de 200 μL de acetonitrila. O gel foi deixado à temperatura ambiente por 5 minutos, a acetonitrila foi removida e a amostra foi seca em *speed vac*. Em seguida, adicionou-se 30 μL da solução de tripsina e deixou-se o gel reidratar no gelo durante 10 minutos, agitando-se ocasionalmente. A digestão ocorreu em banho-maria a 37 °C por 16 horas.

Após a digestão, os peptídeos foram extraídos pela adição de 30 μL de bicarbonato de amônio 50 mM e incubação da amostra por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 13200 g por 30 segundos. O sobrenadante foi coletado e adicionaram-se 30 μL de tampão de extração ao precipitado (pedaços de gel). O gel foi incubado à temperatura ambiente por 10 minutos com agitação ocasional lenta. Centrifugou-se a amostra a 13200 g por 30 segundos. O sobrenadante foi retirado e adicionado ao sobrenadante da primeira etapa de

centrifugação. Repetiu-se o procedimento de adição de 30 μL de tampão de extração seguido de centrifugação. A amostra foi completamente seca em *speed vac* e armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise por espectrometria de massas.

4.6.3. Análise dos Peptídeos por MALDI-TOF/TOF (Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz com Detector Baseado no Tempo de Vôo)

A análise dos peptídeos foi realizada no aparelho espectrômetro de massas tipo MALDI TOF/TOF, modelo Ultraflex III, marca BRUKER DALTONICS, do Núcleo de Biomoléculas (Nubiomol) da Universidade Federal de Viçosa. Após a tripsinização das amostras, 10 μL de uma solução de acetonitrila 50% (v/v) e ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v) foram adicionados aos *eppendorfs* contendo as mesmas. O *spot* foi feito em placa através da adição de 0,7 μL de amostra e de 1 μL de ácido α -4-ciano-hidroxicinâmico (matriz). Já a calibração do aparelho foi feita *spotando-se* 0,5 μL de padrão e 0,5 μL de ácido α -4-ciano-hidroxicinâmico. A fragmentação MS1 dos polipeptídeos foi realizada para todas as amostras. Já a fragmentação MS2 foi realizada apenas para os picos obtidos em MS1 com m/z maior que 800 e S/N maior que 50.

4.6.4. Análise dos Resultados de Espectrometria de Massas

Os fragmentos gerados em MS1 e em MS2 foram comparados às massas trípticas presentes no software Mascot[®] (banco de dados) e a busca foi restrita ao domínio *Fungi*. Já a edição dos espectros gerados e o sequenciamento *de novo* foram realizados no software Flex Analysis[®].

4.7. Western Blotting

4.7.1. Preparo das Soluções

4.7.1.1. Tampão Tris-Glicina 10X

Tris e Glicina foram dissolvidos em água destilada para uma concentração final de 0,25M e 2M, respectivamente.

4.7.1.2. Tampão de Transferência 10X

O tampão de transferência foi preparado pela mistura de 200 mL de solução de tampão tris-glicina 10X a 400 mL de metanol, completando-se o volume para 2L com água destilada.

4.7.1.3. Ponceau-S

Foi preparada uma solução de Ponceau-S 0,1% (v/v) em ácido acético 10% (v/v).

4.7.1.4. TBS 10X

Foi preparada uma solução de 0,1M de Tris e 1,4M de NaCl , ajustando-se o pH para 7,6.

4.7.1.5. TBS-T

Foi preparada uma solução de 10mM de Tris-HCl, 0,15M de NaCl, 8mM de azida de sódio e 0,05% de tween-20, ajustando-se o pH para 8,0.

4.7.1.6. Solução Reveladora

A solução reveladora foi preparada em TBS, adicionando-se tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para concentrações finais de 1mg/mL e de 1μL/mL, respectivamente.

4.7.2. Eletroforese em Gel Desnaturante de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Inicialmente, preparou-se um gel de poliacrilamida conforme descrito nos itens 4.3.2.1 e 4.3.2.2. 15 μL das amostras das proteínas AN1818.2 e AN3613.2 purificadas foram misturadas a 5 μL de tampão de extração e aplicadas no gel sob voltagem constante de 120 V. O marcador aplicado foi o Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder-Ferramentas Life Science®.

4.7.3. Blotting

Após a corrida, o gel foi equilibrado em tampão de transferência por 15 minutos. Uma membrana de nitrocelulose foi cortada para a dimensão do gel e equilibrada no tampão de transferência durante 15 minutos. A membrana foi colocada em contato com o gel e este sobre uma dupla camada de papel. Em seguida, essa montagem foi colocada em um suporte e este foi fechado, constituindo-se no “sanduíche”. O suporte foi colocado dentro de uma cuba de eletroforese e esta foi preenchida com tampão de transferência gelado. A corrida foi realizada na geladeira e sob condição de corrente constante de 250 mA.

4.7.4. Detecção por Ponceau-S

Após o término da corrida eletroforética, a membrana foi removida do “sanduíche” e incubada com o reagente de Ponceau-S até que ocorresse a visualização das bandas proteicas. Em seguida, a membrana foi lavada com água destilada até a remoção do excesso do reagente.

4.7.5. Bloqueio da Membrana

O bloqueio da membrana foi realizado através da incubação desta com leite em pó desnatado Molico[®] 5% (p/v) em tampão TBS-T durante duas horas. Após esse período, a membrana foi lavada com tampão TBS-T até a remoção das partículas de leite.

4.7.6. Reação Antígeno-Anticorpo

A membrana foi incubada com solução de anticorpo anti-His de camundongo (em tampão TBS-T) na concentração de 1:3000 por uma hora e sob agitação. Em seguida, foi lavada por três vezes com tampão TBS-T. Logo após, a membrana foi incubada com solução de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (em tampão TBS-T) na concentração de 1:5000 durante uma hora. Após esse período, foi lavada por três vezes com tampão TBS-T.

4.7.7.Revelação

A revelação foi feita na ausência de luz através da incubação da membrana com a solução reveladora.

4.8.Caracterização das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2

A caracterização bioquímica das xilanases AN1818.2 e AN3613.2 foi feita com as enzimas parcialmente purificadas pelo procedimento de purificação com cromatografia de afinidade em coluna de níquel, conforme descrito no item 4.4.

4.8.1.Efeito do pH

Ensaio enzimáticos de xilanase foram realizados, conforme descrito no item 4.3.1, utilizando-se diferentes tampões na faixa de pH de 2,5 a 13,0 e em uma concentração inicial de 50mM. Os tampões utilizados estão listados na Tabela 5.

Tabela 5. Tampões utilizados nos ensaios de atividade enzimática.

pH	Tampão
2,5	ácido cítrico/citrato de sódio
3,0	ácido cítrico/citrato de sódio
3,5	ácido cítrico/citrato de sódio
4,0	ácido acético/ acetato de sódio
4,5	ácido acético/ acetato de sódio
5,0	ácido acético/ acetato de sódio
5,5	ácido acético/ acetato de sódio
6,0	fosfato de sódio monobásico/ fosfato de sódio dibásico
6,5	fosfato de sódio monobásico/ fosfato de sódio dibásico
7,0	fosfato de sódio monobásico/ fosfato de sódio dibásico
7,5	fosfato de sódio monobásico/ fosfato de sódio dibásico
8,0	fosfato de sódio monobásico/ fosfato de sódio dibásico
8,5	ácido bórico/borax
9,0	ácido bórico/borax
9,5	Bicarbonato de sódio/ carbonato de sódio
10,0	Bicarbonato de sódio/ carbonato de sódio
10,5	Bicarbonato de sódio/ carbonato de sódio
11,0	Bicarbonato de sódio/ carbonato de sódio
11,5	fosfato de sódio monobásico/ NaOH
12,0	fosfato de sódio monobásico/ NaOH
12,5	fosfato de sódio monobásico/ NaOH
13,0	fosfato de sódio monobásico/ NaOH

A atividade enzimática considerada como 100% foi o maior valor de atividade obtido em determinado pH. As atividades enzimáticas nos demais valores de pH foram expressas como atividade relativa (% da atividade máxima).

4.8.2. Estabilidade ao pH

Uma alíquota de 100 µL das amostras das enzimas AN1818.2 e AN3613.2 foram incubadas em 300 µL dos tampões descritos na Tabela 5 por um período de uma hora e a uma temperatura de 4 °C. Após esse intervalo, uma alíquota da mistura de enzima e tampão foi retirada e ensaios enzimáticos de xilanase foram realizados, conforme descrito no item 4.3.1. A atividade considerada como 100% foi aquela do ensaio em que as enzimas não foram pré-incubadas com os tampões e em que o ensaio de atividade foi realizado em tampão ácido acético/acetato de sódio 50 mM pH 5,0,

conforme descrito no item 4.3.1. As atividades com as enzimas pré-incubadas nos diferentes tampões foram expressas como atividade relativa (% da atividade máxima).

4.8.3.Efeito da Temperatura

Ensaio enzimáticos de xilanase foram realizados, conforme descrito no item 4.3.1, porém, incubando-se a mistura reacional nas seguintes temperaturas: 25, 40, 50, 60 e 70 °C. A atividade enzimática considerada como 100% foi o maior valor de atividade obtido em determinada temperatura. As atividades enzimáticas nas demais temperaturas foram expressas como atividade relativa (% da atividade máxima).

4.8.4.Termoestabilidade

A estabilidade térmica das xilanases AN1818.2 e AN3613.2 foram determinadas em diferentes temperaturas. As enzimas foram diluídas em tampão ácido acético/acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e mantidas a 50 ou a 60 °C. Em diferentes intervalos de tempo, alíquotas foram retiradas e as atividades residuais foram determinadas utilizando-se o ensaio-padrão descrito no item 4.3.1. As atividades enzimáticas foram expressas como atividade relativa, considerando-se 100% o valor de atividade obtido pelo ensaio descrito no item 4.3.1, sem pré-incubação das enzimas.

A meia-vida ($t_{1/2}$), ou seja, o tempo médio que a enzima perde 50% de sua atividade máxima, foi calculada através de um modelo matemático de função logarítmica através do software Sigma Plot 10.0®.

4.8.5.Efeito de Íons e Outros Agentes

O efeito de íons e outros agentes na atividade das xilanases AN1818.2 e AN3613.2 foi avaliado através da adição destes à mistura reacional descrita no item 4.3.1. Os seguintes íons e agentes foram avaliados nas concentrações de 2 e 10 mM: HgCl₂, ZnCl₂, NaCl, MgCl₂, EDTA, SDS, MnCl₂ e CaCl₂. Já o agente redutor β-mercaptoetanol foi avaliado na concentração de 1mM.

4.8.6.Efeito dos Produtos

O efeito dos produtos da hidrólise da xilana, os xiloligossacarídeos, na atividade enzimática das endo-(β -1,4)-xilanases AN1818.2 e AN3616.2 foi avaliado através da adição destes à mistura reacional descrita no item 4.3.1. Os produtos xilotriose e xilotetraose foram avaliados nas concentrações de 0,1 e de 1mg/mL.

4.9.Aplicação das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2 na Hidrólise do Bagaço de Cana-de-açúcar

A hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar foi feita utilizando-se as xilanases AN1818.2 e AN3613.2 parcialmente purificadas pelo procedimento de purificação com cromatografia de afinidade em coluna de níquel, conforme descrito no item 4.4.

4.9.1.Pré-Tratamento da Biomassa

O bagaço de cana-de-açúcar moído da Usina Jatiboca foi submetido ao pré-tratamento alcalino antes da aplicação no experimento de sacarificação. A biomassa foi seca em estufa até a obtenção de um valor constante de massa. Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1% (p/v) foi usada para pré-tratar o bagaço de cana-de-açúcar. O pré-tratamento foi conduzido em autoclave a 121 °C por 60 minutos. Os materiais pré-tratados foram separados em fração sólida e líquida utilizando-se um funil de Buchner com papel de filtro. A fração sólida foi lavada com água destilada, armazenada em recipiente hermeticamente fechado e armazenada a -20 °C. A análise da composição do bagaço antes e após o pré-tratamento foi realizada na Escola de Engenharia de Lorena-EEL- USP.

4.9.2. Efeito Aditivo das Xilanases

Para verificar a presença ou não de efeito aditivo entre as xilanases AN1818.2 e AN3613.2 com as xilanases presentes nos coquetéis enzimáticos comerciais Multifect CL Genencor[®] (CL) e Accellerase 1500 Genencor[®] (AC) foram realizados os ensaios de atividade de xilanase. Alguns dos ensaios continham apenas um coquetel comercial (CL ou AC), outros continham apenas uma xilanase (AN1818.2 ou AN3613.2) ou duas xilanases (mistura de AN1818.2 e AN3613.2). Outros ensaios continham

simultaneamente um coquetel comercial (CL ou AC) e uma xilanase (AN1818.2 ou AN3613.2) ou duas xilanases (mistura de AN1818.2 e AN3613.2). As quantidades de coquetel e de extrato enzimático presentes nos ensaios foram: 10 FPU de CL, 10 FPU de AC, 15 U de AN1818.2, 15 U de AN3613.2 e a mistura de 7,5 U de AN1818.2 com 7,5 U de AN3613.2. A atividade medida foi determinada por esses ensaios.

As atividades teóricas para os ensaios enzimáticos contendo um coquetel comercial (CL ou AC) suplementado com uma xilanase (AN1818.2 ou AN3613.2) ou com a mistura de duas xilanases (AN1818.2 e AN3613.2) são dadas pela soma das atividades medidas do ensaio contendo apenas o coquetel comercial e do ensaio contendo apenas as xilanases (AN1818.2 ou AN3613.2 ou AN1818.2+AN3613.2). As atividades teóricas são dadas pela equação (I):

$$\text{atividade teórica} = (\text{volume da xilanase recombinante} \times \text{atividade enzimática da xilanase recombinante}) + (\text{volume do coquetel comercial} \times \text{atividade enzimática de xilanase no coquetel comercial}) \quad (\text{I})$$

O valor teórico de atividade foi comparado com a atividade medida e o efeito aditivo expresso como porcentagem da atividade teórica (equação II):

$$\text{efeito aditivo (\%)} = \frac{\text{atividade medida} - \text{atividade teórica}}{\text{atividade teórica}} \times 100 \quad (\text{II})$$

4.9.3.Hidrólise da Biomassa

A hidrólise foi conduzida em erlenmeyers de 125 mL com uma concentração inicial de sólido de 8% de peso seco (p/v) e em duplicata. O volume reacional foi de 20 mL e azida de sódio 10 mM e tetraciclina 40 µg/mL foram adicionados a fim de inibir a contaminação microbiana. Tampão ácido acético/acetato de sódio pH 5,0 foi adicionado para uma concentração final de 100 mM. Diferentes misturas reacionais foram feitas, conforme mostrado na Tabela 6. Em todas as misturas, a fonte de celulasas foi um coquetel enzimático comercial, Multifect CL Genencor[®] ou Accellerase 1500 Genencor[®], utilizado na proporção de 10 FPU por grama de bagaço e estes foram suplementados com 15U de xilanase (AN1818.2 ou AN3613.2) por grama de bagaço ou com a mistura de 7,5U da xilanase AN1818.2 com 7,5U da xilanase AN3613.2 por

grama de bagaço. A reação foi conduzida em *shaker* orbital a 250 rpm e a 50 °C durante 72 horas. Alíquotas de 1 mL foram retiradas nos seguintes tempos: 0, 2, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas de reação. As alíquotas foram centrifugadas em microcentrífuga a 13000 rpm durante 10 minutos e, em seguida, armazenadas a -4 °C até serem analisadas.

Tabela 6. Experimento de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. CL: Multifect CL Genencor[®]. AC: Accellerase 1500 Genencor[®]. 1818: xilanase AN1818.2. 3613: xilanase AN3613.2.

Mistura Reacional	V _{azida sódica 100mM} (mL)	V _{tetraciclina 10000µg/mL} (µL)	V _{tampão acetato 1M} (mL)	V _{coquetel} (µL)	V _{enzima} (mL)	V _{água} (mL)
CL	2	80	2	32	0	16
CL+1818	2	80	2	32	0,889	15,1
CL+3613	2	80	2	32	1,38	14,5
CL+1818+3613	2	80	2	32	0,445(1818)+0,690(3613)	14,75
AC	2	80	2	109	0	15,8
AC+1818	2	80	2	109	0,889	14,9
AC+3613	2	80	2	109	1,38	14,4
AC+1818+3613	2	80	2	109	0,445(1818)+0,690(3613)	14,68

4.9.4. Análise da Concentração de Glicose e de Xilose por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A detecção e quantificação de glicose e de xilose foram realizadas no Laboratório de Análises Bioquímicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIAGRO) da Universidade Federal de Viçosa. A detecção desses açúcares foi feita utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-10AD-Shimadzu, com detector RID-6A Shimadzu. A coluna usada foi Carbohydrate Analysis Column Aminex[®] HPX-87P Column- 300mm x 7,8mm. A fase móvel (água) foi conduzida a um fluxo de 0,6 mL/min e a condição de temperatura utilizada foi de 80 °C. Os resultados foram calculados pela média dos valores das duplicatas das amostras. O tempo de retenção da glicose e da xilose, assim como suas concentrações, foi estimado através de curvas-padrão com soluções de glicose e de xilose, respectivamente.

4.9.5. Cálculo do Rendimento da Sacarificação

A taxa de hidrólise da celulose (III) e da xilana (IV), principais componentes da biomassa pré-tratada alcalina, foram calculadas usando as seguintes equações:

$$\text{rendimento de glicose (\%)} = \frac{\text{quantidade de glicose (g)} \times 0,9 \times 100}{\text{quantidade de celulose no bagaço pré-tratado (g)}} \quad \text{(III)}$$

$$\text{rendimento de xilose (\%)} = \frac{\text{quantidade de xilose(g)} \times 0,88 \times 100}{\text{quantidade de xilana no bagaço pré-tratado (g)}} \quad \text{(IV)}$$

Parte II

Expressão, Caracterização Estrutural e Cinética das Proteínas AN1818.2 e AN3613.2

Na segunda parte do trabalho, foi realizada a expressão das xilanases AN1818.2 e AN3613.2 e uma purificação através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel e de cromatografia de gel filtração. As amostras das proteínas purificadas nessa etapa foram utilizadas para a caracterização estrutural e cinética.

4.10. Expressão das Proteínas Recombinantes

As colônias transformadas de *Pichia pastoris* foram mantidas em placas de Petri contendo meio GYP A (peptona 1,0%, extrato de levedura 0,5%, glicose 2,0% ágar 1,5%) a 4 °C. Antes do experimento de expressão das proteínas recombinantes, as colônias contendo os genes das enzimas AN1818.2 e AN3613.2 foram repicadas para placas de Petri contendo meio GYP A novo. Essas placas foram incubadas em BOD a 28 °C por 48 horas. Após o crescimento das colônias, estas foram pré-inoculadas, por raspagem, em 125 mL de meio YPD (peptona 2,0%; extrato de levedura 1,0% e glicose 2,0%). Os erlenmeyers foram então acondicionados em *shaker* orbital a 28 °C e agitação de 250 rpm por um período de aproximadamente 20 horas. Após esse intervalo de tempo, foi realizada a medida de densidade ótica (DO) a 600 nm e calculou-se o volume de meio YPD necessário à obtenção de uma DO final de 1,0 em um volume de 100 mL de meio BMGY (extrato de levedura 1,0%; peptona 2,0%; YNB 1,34%; glicerol 1,0%; biotina 4×10^{-5} %; tampão fosfato de potássio pH 6,0 100 mM). O volume determinado de meio YPD foi centrifugado a 2500 g por 5 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em meio BMGY. Os erlenmeyers foram então acondicionados em *shaker* orbital a 28 °C e agitação de 250 rpm por um período de 16 a 18 horas. Após esse intervalo de tempo, foi realizada a medida de densidade ótica a 600 nm e calculou-se o volume de meio BMGY necessário à obtenção de uma DO final de 1,0 em um volume de 400 mL de meio BMMY (extrato de levedura 1,0%; peptona 2,0%; YNB 1,34%; metanol 0,5 % (v/v); biotina 4×10^{-5} %, tampão fosfato de potássio pH 6,0 100 mM) -meio de indução da expressão. O volume determinado de meio BMGY foi centrifugado a 2500 g por 5 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em meio BMMY. Em seguida, os erlenmeyers de 2L contendo

400 mL de meio BMMY foram incubados em *shaker* orbital a 28 °C e agitação de 250 rpm por um período de 72 horas, adicionando-se metanol 0,5% (v/v) a cada 24 horas. Ao final das 72 horas, os 400 mL de meio BMMY foram centrifugados a 2500 g por 5 minutos a 20 °C e o sobrenadante foi considerado o extrato bruto contendo as enzimas de interesse. Foram realizados, para algumas frações cromatográficas, ensaios de atividade de xilanase, conforme descrito no item 4.3.1, e a concentração de proteínas foi estimada utilizando-se a leitura de absorvância a 280 nm no Nanodrop.

4.11.Purificação das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2

4.11.1.Cromatografia de Afinidade em Coluna de Níquel

O extrato bruto foi preparado acertando-se o pH para 7,0 com hidróxido de potássio (KOH) e, posteriormente, filtrando-se a vácuo com sistema de filtração Millipore® e filtro de 0,45 µm.

A purificação foi conduzida no aparelho ÄKTA Pure (gε) e com a coluna His Trap HP 5 mL gε Healthcare. O tampão A (fosfato de potássio pH 7,0-7,3 20 mM e NaCl 500 mM) foi misturado ao tampão B (fosfato de potássio pH 7,0-7,3 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM) para a obtenção de um gradiente linear de imidazol de 0 a 500 mM. Foram aplicados 800 mL de extrato bruto a um fluxo de 3,0 mL/min e foram coletadas frações de 1,5 mL. As absorvâncias a 280 nm e a 215 nm foram monitoradas, assim como a condutância.

As amostras dos *pools* dos picos de absorvância a 280 nm foram aplicadas em um gel desnaturante de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) para verificar em quais picos encontravam-se as proteínas de interesse. Foram realizados ensaios de atividade de xilanase, conforme descrito no item 4.3.1, para essas mesmas amostras e a concentração de proteínas foi estimada utilizando-se a leitura de absorvância a 280 nm no Nanodrop.

4.11.2.Cromatografia de Gel Filtração

Os picos de absorvância da cromatografia de afinidade que continham atividade de xilanase e para os quais a banda da proteína de interesse foi visualizada no gel foram aplicados em uma coluna de gel filtração.

A purificação foi conduzida no aparelho ÄKTA Prime Plus (gε) e com a coluna HiLoad 16/60 Superdex™ 200 prep grade, a um fluxo de 1 mL/min. Foram coletadas frações de 2 mL. O tampão utilizado foi fosfato de potássio pH 7,0 50 mM com NaCl 20 mM. A absorvância a 280 nm e a condutância foram monitoradas.

As amostras dos *pools* dos picos de absorvância a 280 nm foram aplicadas em um gel desnaturante de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) para verificar em quais picos encontravam-se as proteínas de interesse. Foram realizados ensaios de atividade de xilanase, conforme descrito no item 4.3.1, para essas mesmas amostras e a concentração de proteínas foi estimada utilizando-se a leitura de absorvância a 280 nm no Nanodrop.

4.12. Ensaio para Verificar o Grau de Pureza das Amostras

4.12.1. Western Blotting

A técnica de Western Blotting foi feita conforme descrito no item 4.7.

4.12.2. Espectrometria de massas

A análise da massa intacta das amostras foi realizada no aparelho espectrômetro de massas tipo MALDI-TOF. O *spot* foi feito em placa através da adição de 0,5 µL de amostra e de 0,5 µL de ácido α-4-ciano-hidroxicinâmico (matriz). Já a calibração do aparelho foi feita *spotando-se* 0,5 µL de padrão e 0,5 µL de ácido α-4-ciano-hidroxicinâmico.

4.12.3. Espalhamento da Luz

As técnicas de espalhamento dinâmico da luz e de espalhamento estático da luz foram utilizadas a fim de estimar, respectivamente, o raio hidrodinâmico médio e massa molecular média das partículas presentes em solução e de inferir a respeito da qualidade da amostra. Aproximadamente 1,2 mL de amostra do centro do pico de absorvância da gel filtração foram analisados no aparelho ZetaSizer em cubeta de vidro.

4.13. Caracterização das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2

As amostras das proteínas AN1818.2 e AN3613.2 purificadas conforme descrito no item 4.12 (Parte II) foram utilizadas para os ensaios de caracterização bioquímica e cinética descritos a seguir.

4.13.1. Especificidade do Substrato

As xilanases AN1818.2 e AN3613.2 foram avaliadas quanto à capacidade de hidrolisar outros substratos além da xilana *beechwood*.

4.13.1.1. Substratos Sintéticos

Os substratos sintéticos avaliados foram: *p*NP- β -glicopiranosídeo (*p*NP β gli), *p*NP- α -galactosídeo (*p*NP α gal), *p*NP- β -xilopiranosídeo (*p*NP β xil), *p*NP- β -celobiosídeo (*p*NP β cel), *p*NP- α -arabinosídeo (*p*NP α ara), *p*NP- β -galactosídeo (*p*NP β gal), *p*NP- β -manosídeo (*p*NP β man) e *p*NP- α -manosídeo (*p*NP α man).

O ensaio de atividade enzimática para cada um desses substratos foi realizado como descrito por Deshpande e Eriksson (1988).

Em tubos de ensaio foram adicionados 375 μ L de enzima adequadamente diluída em tampão ácido acético/acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Em seguida, foram adicionados 125 μ L dos substratos derivados do *p*NP mencionados acima na concentração inicial de 4mM. As amostras foram incubadas em banho-maria a 50 °C durante 15 minutos. Após esse período, a reação foi paralisada pela adição de 500 μ L de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 0,5 M. O branco da reação foi feito adicionando-se a enzima após o carbonato de sódio. A leitura de absorvância foi realizada em espectrofotômetro MultiskanGO Thermoscientific™ em comprimento de onda de 415 nm. As leituras de absorvância foram convertidas em μ mol de *para*-nitrofenil (*p*NP) por meio de uma curva-padrão de *p*NP.

A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como μ mol de *para*-nitrofenil (produto) liberado por minuto e sob as condições de ensaio.

4.13.1.2. Substratos Naturais

Os substratos naturais avaliados foram: xilana *beechwood* 1% (p/v), xilana *oat spelts* (xilana de *spelts* de aveia) 1% (p/v), arabinoxilana de trigo 1% (p/v), avicel 1,25% (p/v) e carboximetilcelulose (CMC) 1,25% (p/v).

Em banho de gelo, adicionaram-se 100 μL de enzima adequadamente diluída em tampão ácido acético/acetato de sódio 50 mM pH 5,0 a 400 μL de substrato. Em seguida, os tubos de ensaio foram agitados em vórtex e incubados em banho-maria a 50 °C durante 15 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 500 μL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e a quantificação de açúcares redutores foi realizada por esse reagente através do método de Miller (1959), efetuando-se a leitura de absorvância a 540 nm no aparelho MultiskanGO Thermoscientific™. A quantidade de açúcar redutor foi estimada utilizando-se uma curva padrão construída com solução de xilose 1 mg/mL.

A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como μmol de açúcar redutor (produto) formado por minuto de reação e sob as condições de ensaio.

4.13.2. Caracterização Cinética

Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} das xilanases AN1818.2 e AN3613.2 foram estimados utilizando o programa Sigma Plot® 10.0. Foram realizados ensaios de atividade enzimática de xilanase, conforme descrito no item 4.3.1, com concentrações crescentes do substrato. Os substratos utilizados foram xilana *beechwood*, arabinoxilana de trigo e xilana *oat spelts* (xilana de *spelts* de aveia). A constante catalítica (k_{cat}) foi calculada dividindo-se V_{max} pela concentração de enzima no ensaio. Esse cálculo presume que a proteína encontrava-se praticamente pura.

4.14. Análise da Composição dos Produtos de Hidrólise da Xilana *Beechwood*

A composição dos produtos de hidrólise da xilana *beechwood* 1% (p/v) foi analisada em placa de sílica gel (Sigma) por cromatografia em camada delgada (TLC).

As misturas reacionais continham 150 μL das enzimas purificadas na Parte II ou dos coquetéis Accellerase 1500® ou Multifect CL® e 300 μL de xilana *beechwood* 1% (p/v) preparada em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0. O controle negativo

continha 150 μL de tampão. A reação foi incubada a 50 °C por 20 horas e, posteriormente, 25 μL da mistura foram aplicados na placa. A cuba de vidro (15x15 cm) foi saturada com 100 mL da mistura n-propanol:ácido acético:água na proporção de 1:1:0,1 (v/v). Após a eluição, os produtos de hidrólise foram visualizados com a aplicação da solução reveladora (α -naftol 1% (p/v) em etanol contendo 10% de ácido fosfórico (v/v)). A placa foi aquecida em estufa a 120 °C durante 10 minutos. Soluções de xilose, xilotriose e xilotetraose na concentração de 5mg/mL foram usadas como padrões.

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte I

Expressão, Purificação, Caracterização Bioquímica e Aplicação das Proteínas AN1818.2 e AN3613.2 na Hidrólise do Bagaço de Cana-de-açúcar

5.1.Ensaio para a Verificação da Expressão das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2

5.1.1.Ensaio de Atividade de Xilanase

O ensaio de atividade de xilanase foi feito, conforme descrito no item 4.3.1, para o extrato bruto das amostras AN1818.2 e AN3613.2. Foram obtidas atividades de 62,6 e 49,4 U/mL, respectivamente, e atividades específicas de 1,46 e 1,09 U/mg de proteína, respectivamente.

5.1.2.SDS-PAGE e Zimograma

A fim de verificar a expressão das xilanases, realizou-se um SDS-PAGE com o gel de poliacrilamida contendo xilana *beechwood* 1,25%. Após a corrida eletroforética, o gel foi cortado e uma parte foi corada com Coomassie Blue e a outra com vermelho congo. Os resultados são mostrados na Figura 6.

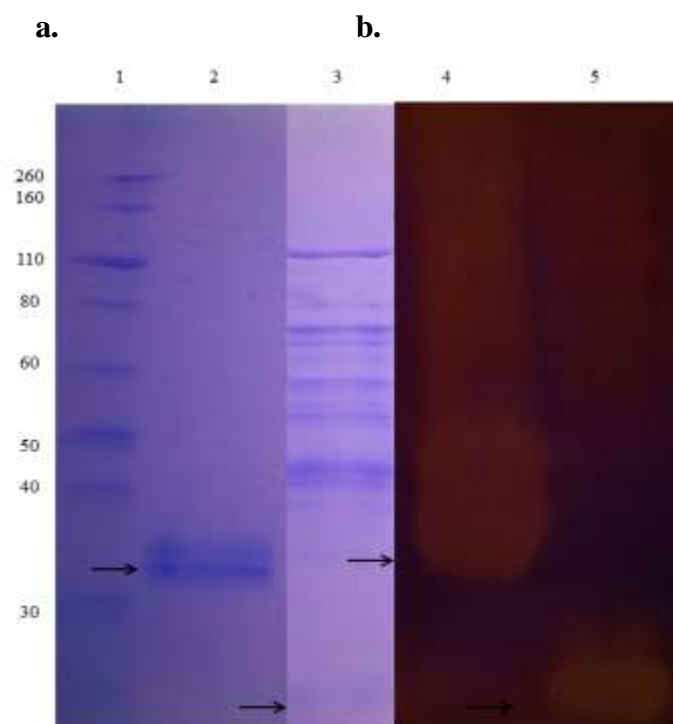


Figura 6. SDS-PAGE 12% com xilana *beechwood* 1,25% corado com Coomassie Blue (a) e revelado com vermelho congo (b). 1.Marcador molecular. 2 e 4.AN1818.2. 3 e 5.AN3613.2. As setas indicam as bandas correspondentes às xilanases.

A massa molecular da proteína AN1818.2 prevista pela sua sequência de aminoácidos é 34 kDa e a da proteína AN3613.2 é de 24 kDa. Já as massas moleculares esperadas das proteínas AN1818.2 e AN3613.2 quando são adicionados o epítipo myc e a cauda de polihistidina às sequências de aminoácidos das proteínas nativas são de 38,6 e 27,2 kDa, respectivamente.

Quando uma amostra proteica é aplicada no gel contendo xilana *beechwood*, as proteínas são separadas de acordo com sua massa molecular. Após a corrida eletroforética, o gel é incubado em tampão acetato pH 5,0 a 50 °C. Nessas condições de pH e de temperatura, a maioria das xilanases fúngicas são ativas. Logo, esse procedimento renatura as xilanases presentes no gel. Após essa etapa, o gel é incubado no corante vermelho congo. No local correspondente à banda da xilanase, esta degrada a xilana *beechwood* e forma produtos de menor tamanho, como xilooligossacarídeos. O vermelho congo não é capaz de ligar-se a esses pequenos fragmentos, havendo a formação de uma banda clara no local da banda correspondente à xilanase. Entretanto, a aplicação do extrato bruto das proteínas AN1818.2 e AN3613.2 no gel contendo xilana *beechwood* evidenciou um rastro claro que se estendeu por quase todo o gel. Isso ocorreu, provavelmente, devido a alta atividade das xilanases AN1818.2 e

AN3613.2, que apresentaram atividade enzimática durante a corrida eletroforética, mesmo sob condições adversas de temperatura e de pH. O final do rastro claro, indicado com uma seta no gel corado com vermelho congo, mostra a posição final da migração das xilanases. Quando essa parte do gel foi alinhada ao gel corado com Coomassie Blue, pode-se observar que a xilanase AN1818.2 apresentou uma massa molecular entre 30 e 40 kDa e que a xilanase AN3613.2 apresentou uma massa molecular menor que 30 kDa, de acordo com o que era previsto. A presença de duas bandas próximas e de intensidade forte para a proteína AN1818.2 (Fig. 6, coluna 2) não nos permite afirmar precisamente, por essa técnica, qual é a banda correspondente à xilanase. Entretanto, pela observação do gel corado com vermelho congo, (Fig. 6a., coluna 4) existe a possibilidade de ambas possuírem atividade sobre xilana *beechwood*.

5.2.Purificação com Cromatografia de Afinidade em Coluna de Níquel

O perfil cromatográfico da purificação das xilanases AN1818.2 e AN3613.2 é mostrado na Figura 7. Pode-se observar que a proteína AN1818.2 foi eluída principalmente nas frações E3 a E5, apresentando maior atividade específica (29,46 U/ mg de proteína) na fração E5. Já a proteína AN3613.2 foi eluída principalmente nas frações E4 a E7, apresentando maior atividade específica (31,5 U/ mg de proteína) na fração E4.

A Figura 8 mostra um gel desnaturante de poliacrilamida e as bandas protéicas presentes em cada amostra eluída na cromatografia de afinidade. Pode-se observar para a proteína AN1818.2 (Figura 8a.) que mesmo após a purificação verifica-se a presença de diversas bandas: uma banda de aproximadamente 45 kDa, a banda de interesse de aproximadamente 34 kDa e diversas bandas menores que 34 kDa. Para a proteína AN3613.2 (Figura 8b.), observa-se um perfil semelhante: uma banda de aproximadamente 45 kDa, a banda de interesse de aproximadamente 24 kDa e diversas bandas menores que 24 kDa.

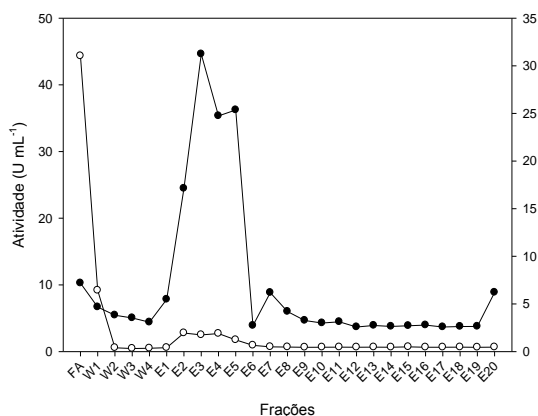
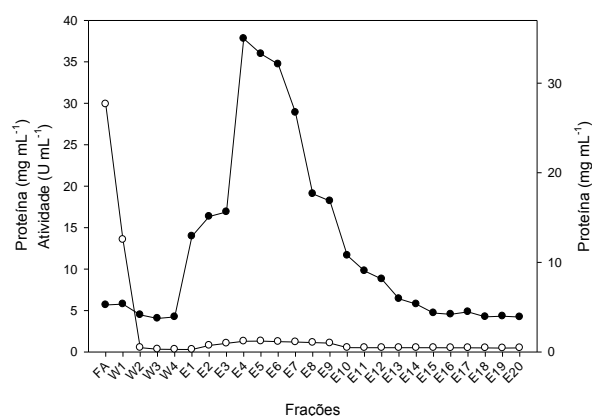
a.**b.**

Figura 7. Purificação com cromatografia em coluna de afinidade de Ni-NTA para a xilanase AN1818.2(**a**) e para a xilanase AN3613.2(**b**). (●) representa a atividade enzimática, em U mL⁻¹, e (○) representa a concentração de proteínas totais, em mg mL⁻¹. FA. Fração que sai após o empacotamento da coluna. W. Frações eluídas com tampão de lavagem. E. Frações eluídas com tampão de eluição.

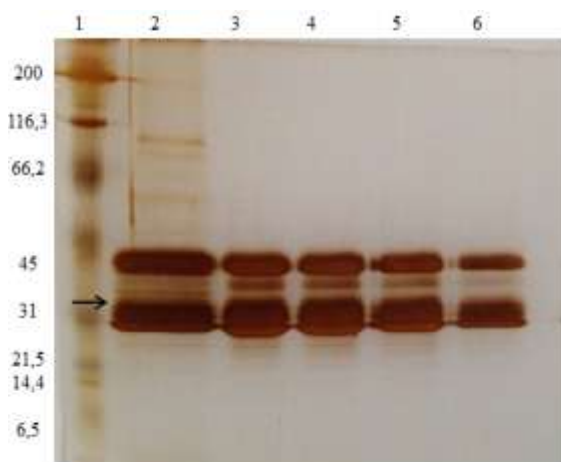
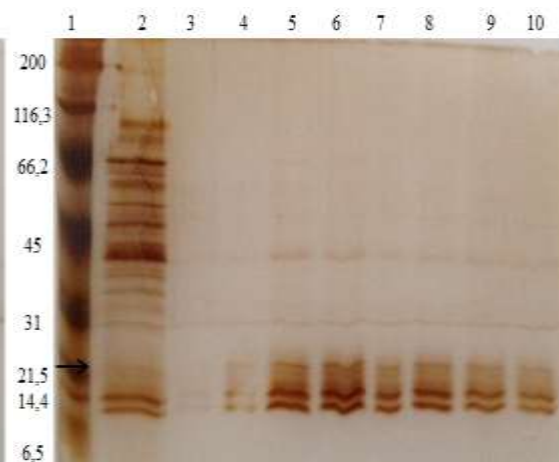
a.**b.**

Figura 8. Gel desnaturante de poliácridamida 12% corado com nitrato de prata. Xilanase AN1818.2(**a**) e xilanase AN3613.2(**b**). **1.** Marcador Molecular. **2.** Extrato Bruto. **3 a 10.** Frações E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8. As bandas de tamanho esperado das proteínas AN1818.2 e AN3613.2 são indicadas por setas.

5.3. Western Blotting

Como descrito no item 5.2, a purificação das proteínas AN1818.2 e AN3613.2 resultou na presença de mais de uma banda no gel desnaturante de poliácridamida. A fim de averiguar quais das bandas presentes no gel apresentavam a cauda de polihistidina, realizou-se um Western Blotting com anticorpo secundário anti-His (Figura 9). As

proteínas recombinantes AN1818.2 e AN3613.2 apresentam uma cauda de polihistidina na porção C-terminal.

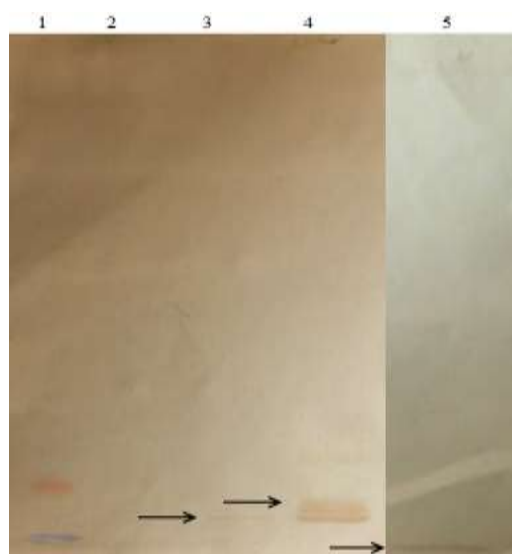


Figura 9. Membrana de nitrocelulose do Western Blotting. **1.** Marcador molecular. **2.** Controle negativo. **3.** Controle positivo. **4.** AN1818.2. **5.** AN3613.2. As setas indicam as proteínas reveladas com a enzima peroxidase.

Os resultados indicam que as bandas de aproximadamente 34 kDa e as bandas menores que 34 kDa da amostra da proteína AN1818.2 purificada apresentam cauda de polihistidina. A banda de aproximadamente 45 kDa aparece fracamente revelada, indicando que essa proteína deve conter alguns resíduos de histidina localizados. Já para a proteína AN3613.2, possivelmente a banda indicada com a seta na figura é relativa à proteína de interesse de aproximadamente 24 kDa.

Os resultados do Western Blotting indicaram que as bandas de aproximadamente 34 e 24 kDa podem tratar-se das xilanases AN1818.2 e AN3613.2, respectivamente, visto que essas proteínas apresentaram cauda de polihistidina. Os mesmos resultados também indicaram que as bandas menores do que 34 e 24 kDa deviam tratar-se de fragmentos das xilanases AN1818.2 e AN3613.2, respectivamente. Há indícios de que a fragmentação da xilanase AN1818.2 tenha ocorrido no N-terminal da proteína, pois esta possui cauda de polihistidina, que, por sua vez, está localizada no C-terminal. Esse fato também corrobora para a hipótese de que não houve problema na tradução da proteína e sim, uma proteólise parcial.

5.4. Espectrometria de Massas

A fim de confirmar a hipótese descrita no item 5.3, amostras das proteínas AN1818.2 e AN3613.2 foram aplicadas em um SDS-PAGE, o gel foi corado com Coomassie Blue e as bandas indicadas com as setas na Figura 10 foram excisadas individualmente e tripsinizadas.

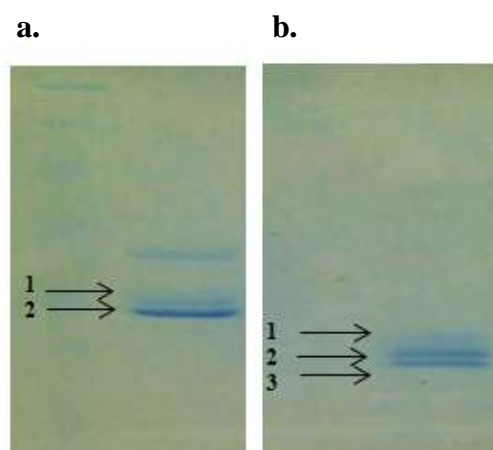
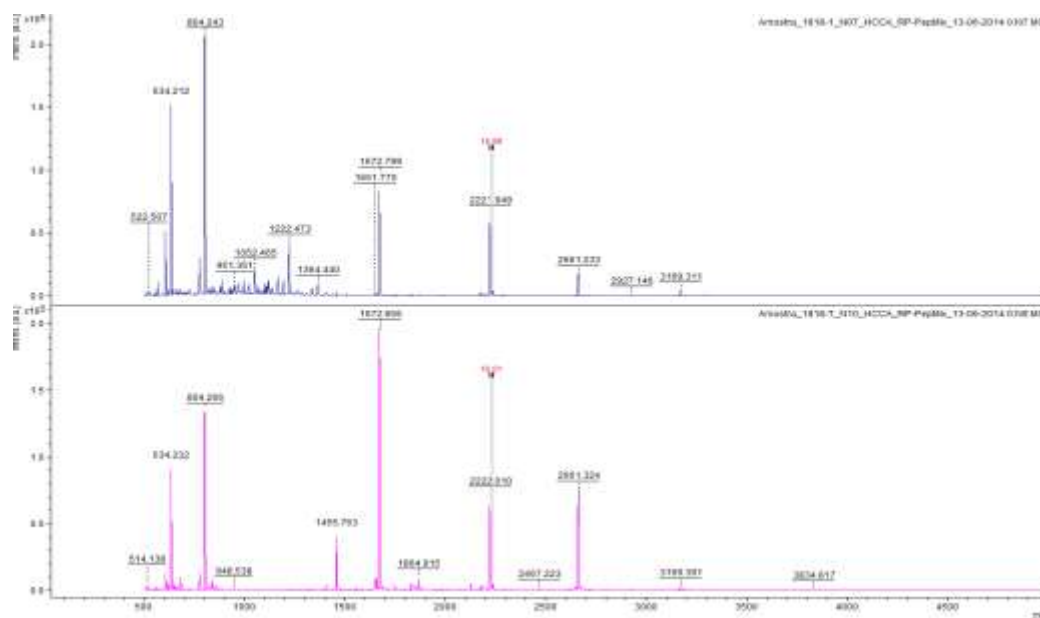


Figura 10. Gel desnaturante de poliacrilamida 12% corado com Coomassie Blue. As bandas indicadas com setas foram excisadas do gel e tripsinizadas para serem analisadas por espectrometria de massas. **a.** Amostra AN1818.2 purificada. **b.** Amostra AN3613.2 purificada.

Após a tripsinização, as amostras foram analisadas por espectrometria de massas através da técnica de MALDI-TOF (ionização e dessorção a laser assistida por matriz com detector baseado no tempo de voo). A fragmentação MS1 dos polipeptídeos foi realizada para todas as amostras e os fragmentos gerados foram comparados. Para as bandas 1 e 2 da amostra AN1818.2 foram obtidos nove fragmentos em comum com m/z de 807,4; 1455,7; 1475,7; 1651,77; 1672,83; 1794,8; 1807,86; 2222,03 e 2238 Da. Já para as bandas 1, 2 e 3 da amostra AN3613.2 foram obtidos alguns fragmentos com m/z comuns a pelo menos duas das bandas: 874,41; 1853, 85; 2076; 2203; 2206 e 2221 Da. Esses resultados são mostrados na Figura 11 e indicam que as proteínas das bandas 1 e 2 da amostra AN1818.2 possuem diversos fragmentos em comum, assim como as proteínas das bandas 1, 2 e 3 da amostra AN3613.2.

a.



b.

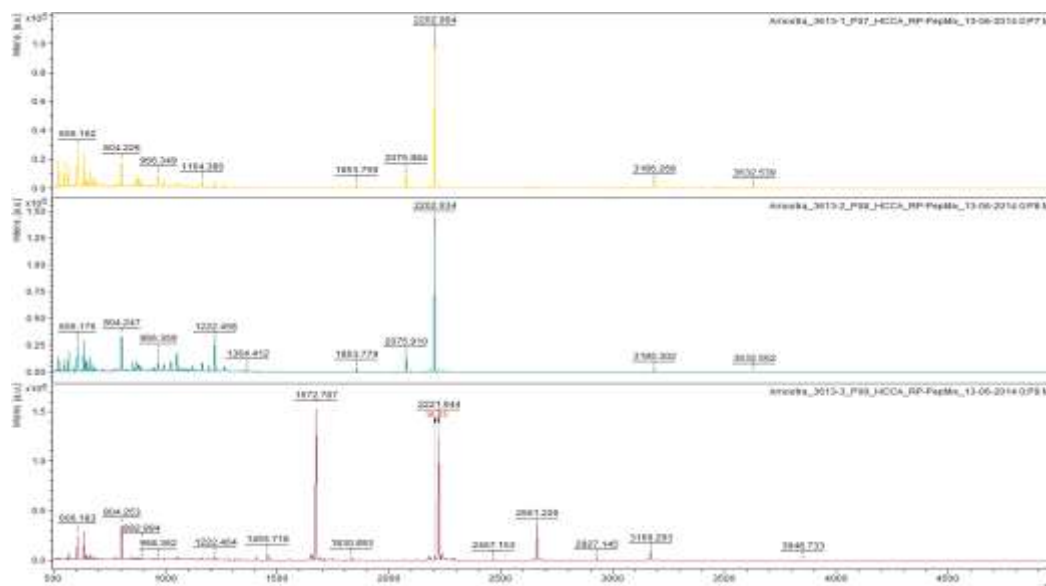


Figura 11. Espectros de MS1 para as bandas 1 e 2 da amostra AN1818.2(a) e para as bandas 1, 2 e 3 da amostra AN3613.2(b).

A fragmentação MS2 foi realizada apenas para os picos obtidos em MS1 com m/z maior que 800 e S/N (sinal/ruído) maior que 50. O íon 2221,94 proveniente das

bandas 1 e 2 da amostra AN1818.2 foi sequenciado e encontrou-se a sequência IMHWDVVNEI/LFNEDGTFR que faz parte da proteína AN1818.2 (Figura 12a.). O íon 2202 das bandas 1, 2 e 3 da amostra AN3613.2 também foi sequenciado e encontrou-se a sequência RVSWFQEFTATGEI/L que faz parte da proteína AN3613.2 (Figura 12b).

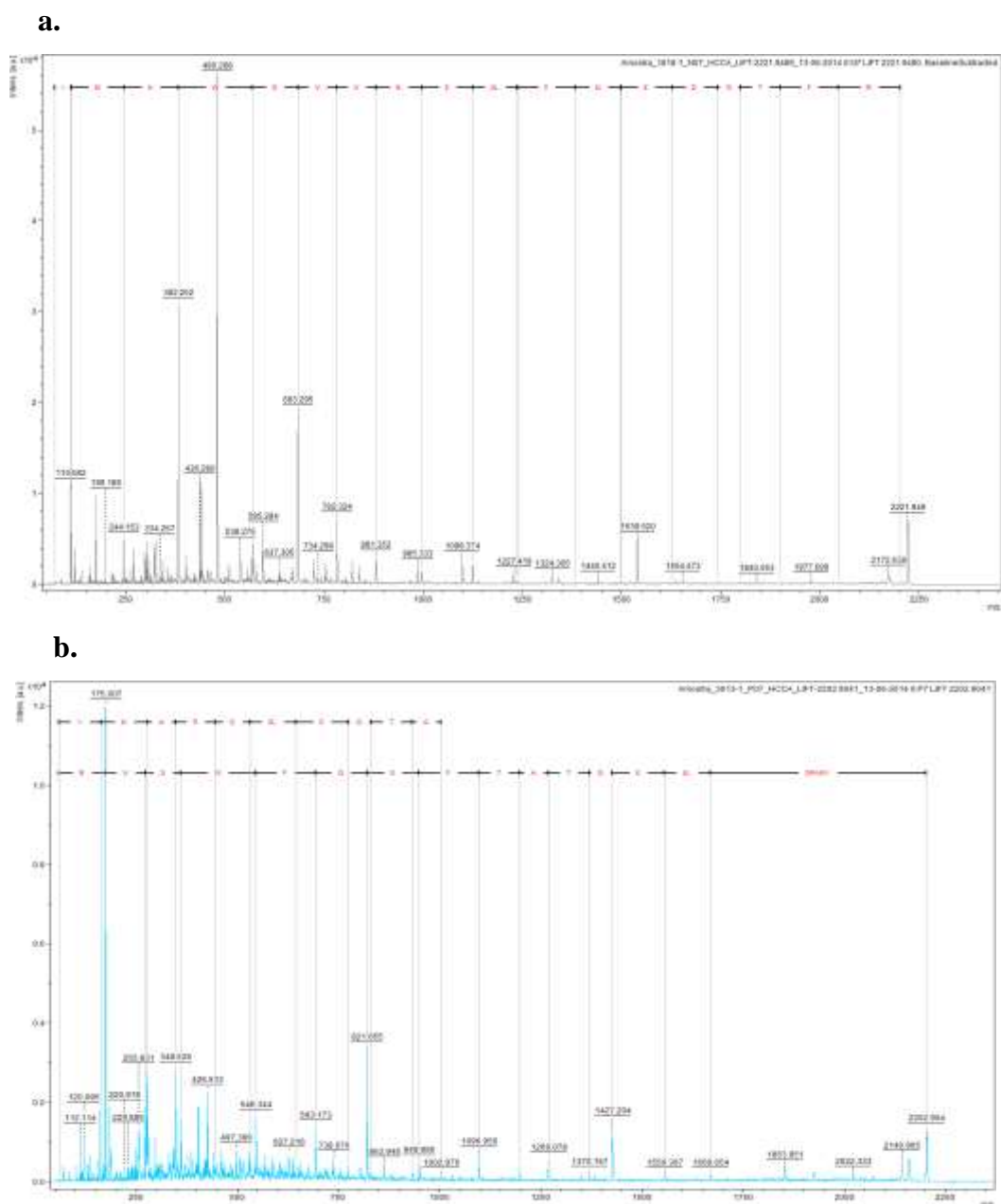


Figura 12. MS2 e sequenciamento *de novo* do íon de m/z 2221,94 da amostra AN1818.2(a) e do íon de m/z 2202 da amostra AN3613.2(b).

Os fragmentos gerados em MS1 e em MS2 foram comparados às massas trípticas presentes no software Mascot[®] (banco de dados) e a busca foi restrita ao

domínio *Fungi*. Os resultados identificaram a banda 1 da amostra AN1818.2 como a endo- β -1,4-xilanase AN1818.2 de *Aspergillus nidulans* e a banda 2 como um fragmento presente nessa mesma proteína. Para a amostra AN3613.2, os resultados identificaram a banda 1 como a endo- β -1,4-xilanase AN3613.2 de *Aspergillus nidulans* e as bandas 2 e 3 como um fragmento presente nessa mesma proteína.

De acordo com o que foi discutido nos itens 5.2, 5.3 e no presente item, há forte evidência de ocorrência de proteólise parcial das xilanases AN1818.2 e AN3613.2, resultando em fragmentos dessas proteínas. Essas evidências são suportadas por dados da literatura, cujo relato indica que proteínas recombinantes secretadas podem ser degradadas no meio de cultura por proteases extracelulares, por proteases ligadas às células e/ou por proteases intracelulares de células lisadas (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Problemas como redução do rendimento do produto, perda de atividade biológica e contaminação do produto por intermediários de degradação devido às similaridades de afinidade e características físico-químicas podem ocorrer como resultado da proteólise (Jahic, 2003). Nesse estudo, a proteólise parcial não afetou completamente a atividade biológica das proteínas AN1818.2 e AN3613.2, o que pode ser verificado a partir do zimograma e do ensaio de atividade de xilanase com o substrato xilana *beechwood*. Entretanto, experimentos adicionais utilizando-se estratégias para controlar a proteólise são necessários para verificar a possível queda de rendimento do produto.

A taxa de crescimento específica é um fator que pode ser controlado a fim de reduzir a proteólise através da adição de excesso de metanol (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). A temperatura de cultivo é outro fator importante, uma vez que altas temperaturas podem comprometer a estabilidade de proteínas pouco estáveis, além de resultar na morte de células e na consequente liberação de mais proteases (Cereghino & Cregg, 2000). Além disso, se uma proteína possui *linkers* entre os domínios de uma proteína que contenha sequências reconhecidas por proteases nativas, essas sequências, se não são essenciais à função da proteína, devem ser deletadas (Jahic *et al.*, 2003).

5.5. Caracterização Bioquímica das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2

5.5.1. Efeito do pH e Estabilidade ao pH

O efeito do pH na atividade das xilanases foi avaliado na faixa de pH de 2,5 a 13. A estabilidade das xilanases também foi avaliada, realizando-se ensaios de atividade

em pH 5,0 precedidos da incubação das enzimas em tampões na faixa de pH de 2,5 a 13 durante uma hora (Figura 13).

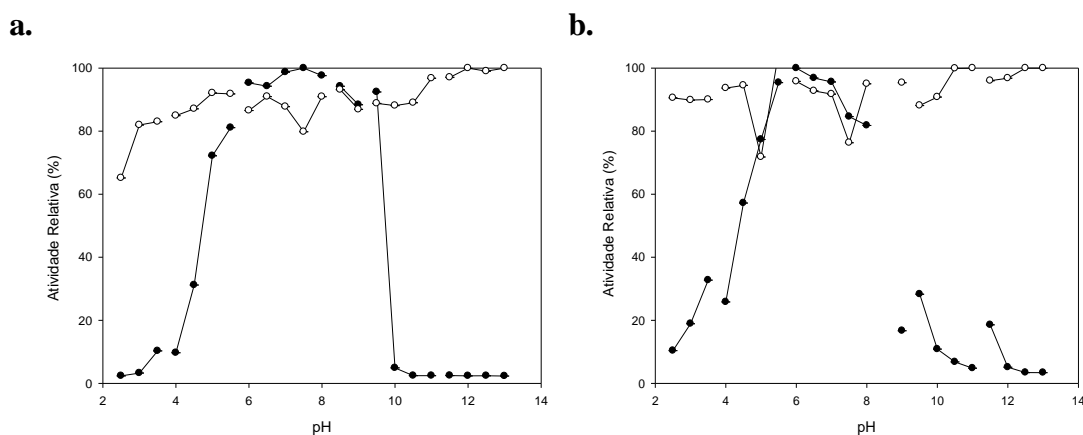


Figura 13. Efeito do pH e estabilidade ao pH. Efeito do pH na atividade enzimática (♣) e estabilidade das enzimas quando pré-incubadas durante uma hora em tampões na faixa de pH de 2,5 a 13 e retornadas ao pH 5,0 (⊙). **a.** Xilanase AN1818.2. **b.** Xilanase AN3613.2.

A xilanase AN1818.2 apresentou atividades acima de 90% na faixa de pH de 5,5 a 8,5 e pH ótimo igual a 7,5. Essa xilanase é classificada como pertencente à família GH10. Outras xilanases dessa mesma família foram descritas por vários autores e na Tabela 7 são mostradas características de xilanases GH10 provenientes de diversos microorganismos.

Tabela 7. pH ótimo e temperatura ótima (°C) de xilanases da família GH10. (*) organismo não identificado.

Organismo	pH ótimo	T ótima (°C)	Referência
<i>Bacillus sp.</i> HJ2	6,5	35	Junpei <i>et al.</i> , 2012
<i>Demequina sp.</i> JK4	5,5	55	Xin <i>et al.</i> , 2009
<i>Hypothenemus hampei</i>	5,5	37	Padilla-Hurtado <i>et al.</i> , 2012
Xilanase do rúmen*	6,0	50	Li <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium funiculosum</i>	4,0-5,5	80	Lafond <i>et al.</i> , 2011
<i>Clostridium thermocellum</i>	6,4	80	Zverlov <i>et al.</i> , 2005
<i>Paenibacillus sp.</i> NF1	6,0	60	Zheng <i>et al.</i> , 2014

Observando a tabela acima, pode-se concluir que a xilanase AN1818.2 possui alta atividade em uma faixa de pH próximo ao das xilanases GH10 mencionadas, com exceção da xilanase proveniente de *Penicillium funiculosum* (Lafond *et al.*, 2011), que possui um pH ótimo mais ácido. Fernández-Espinar *et al.* (1994) purificaram a xilanase X₃₄ (AN1818.2) do extrato bruto do fungo *Aspergillus nidulans* e encontraram pH

ótimo de 6,0. Este resultado mostra que o valor de pH ótimo da xilanase AN1818.2 nativa e da AN1818.2 expressa em *P. pastoris* são próximos, indicando que esta propriedade foi mantida.

A xilanase AN3613.2 apresentou atividade acima de 90% na faixa de 5,5 a 7,0, e máxima atividade em pH 6,0. Essa xilanase é classificada como pertencente à família GH11. Outras xilanases dessa mesma família foram descritas por vários autores e na Tabela 8 são mostradas características de xilanases GH11 provenientes de diversos microorganismos.

Tabela 8. pH ótimo e temperatura ótima (°C) de xilanases da família GH11.

Organismo	pH ótimo	T ótima (°C)	Referência
<i>Aspergillus fumigatus</i> MKU-1	6,0	60	Jeya <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus japonicus</i> UM-2	5,0	60	Wakiyama <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 90196	4,0	60	Luttig <i>et al.</i> , 1997
<i>Aspergillus niger</i> BRFM281	5,5	50	Levasseur <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus oryzae</i> KNB 616	6,0	58	Kimura <i>et al.</i> , 2000
<i>Baccillus sp.</i> 41M-1	9,0	50	Nakamura <i>et al.</i> , 1993
<i>Aspergillus nidulans</i>	5,5	62	Fernandez-Espinar <i>et al.</i> , 1993
<i>Trichoderma reesei</i>	4,5-5,5	55-60	Törrönen <i>et al.</i> , 1992; Turunen <i>et al.</i> , 2001
<i>Penicillium citrinum</i>	5,0	55	Tanaka <i>et al.</i> , 2005
<i>Streptomyces sp.</i> S38	6,5	55-60	Georis <i>et al.</i> , 2000

Observando a tabela acima, pode-se concluir que a endo- β -1,4 xilanase AN3613.2 apresenta um pH ótimo semelhante a diversas outras xilanases da família GH11, diferindo, dentre as xilanases citadas, apenas daquelas provenientes de *Aspergillus niger* ATCC 90196 (Luttig *et al.*, 1997) e de *Baccillus sp.*41M-1 (Nakamura *et al.*, 1993). Fernández-Espinar *et al.* (1996) construíram um transformante de *Aspergillus nidulans* multicópia para o gene da xilanase X₂₄ (AN3613.2), já que esta é expressa em baixos níveis pelo fungo, o que dificulta sua purificação. No referido estudo a xilanase X₂₄ purificada apresentou pH ótimo de 5,0, o que se aproxima dos resultados obtidos nesse trabalho.

Ambas as xilanases foram altamente estáveis quando pré-incubadas durante uma hora em tampões na faixa de pH de 2,5 a 13 e retornadas ao pH 5,0, sendo capazes de retomar pelo menos 70% da atividade inicial. Na faixa de pH de 12 a 13 e de 10,5 a 13,

as xilanases AN1818.2 e AN3613.2, respectivamente, foram capazes de reestabelecer 100% da atividade inicial. Esses resultados (Figura 13) indicam que a pré-incubação de ambas as xilanases em diferentes valores de pH não é suficiente para alterar drasticamente a conformação das enzimas, de modo que estas conseguem ter elevada atividade quando retornadas a pH 5,0. Segundo os trabalhos de Fernández-Espinar *et al.* (1994 e 1996), a xilanase X₃₄ foi muito estável na faixa de pH de 4,0-6,7 quando pré-incubada durante vinte horas, mantendo mais de 80% da atividade máxima e a xilanase X₂₄ foi muito estável na faixa de pH de 5,0-6,5 quando pré-incubada durante vinte horas, mantendo mais de 90% da atividade máxima.

Apesar da comparação realizada entre o pH ótimo das xilanases AN1818.2 e AN3613.2 com outras xilanases descritas anteriormente na literatura, deve-se levar em consideração que as atividades enzimáticas de xilanase foram realizadas de modo distinto por cada autor, utilizando-se diferentes substratos, tampões, temperaturas de ensaio e tempos de pré-incubação. Além disso, diferentes sistemas de expressão foram usados.

5.5.2.Efeito da Temperatura

Ensaio enzimáticos de xilanase foram realizados nas temperaturas de 25, 40, 50, 60 e 70 °C (Figura 14).

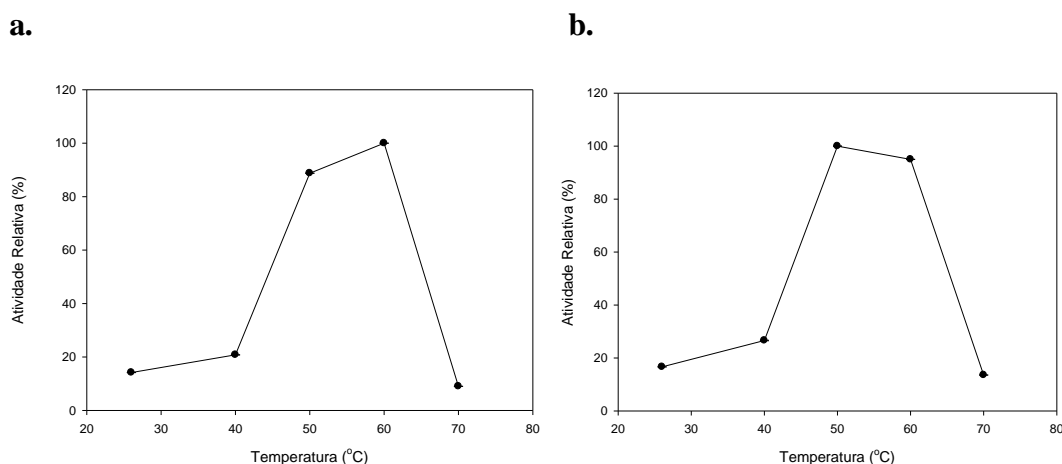


Figura 14.Efeito da temperatura na atividade das xilanases AN1818.2 (a) e AN3613.2 (b).

A temperatura ótima de atividade da xilanase AN1818.2 foi de 60 °C. Como mostrado na Tabela 7, as xilanases da família GH10 apresentam temperatura ótima de

atividade altamente discrepantes. A xilanase de *Paenibacillus sp.* NF1 (Zheng *et al.*, 2014) foi a que mais se assemelhou à xilanase AN1818.2, tanto na temperatura ótima quanto no pH ótimo. Bhardwaj *et al.* (2012) fez uma revisão de 23 xilanases GH10 e descreveu que, dependendo da fonte de xilanases (plantas, algas, protozoários, insetos, crustáceos, bactérias, fungos), a atividade enzimática destas pode variar com diferentes condições físico-químicas como temperatura, pH e alta concentração de sal. Fernández-Espinar *et al.* (1994), encontrou uma temperatura ótima de 56 °C para a xilanase X₃₄ nativa, valor muito próximo do determinado nesse estudo com a enzima expressa em *P. pastoris*.

A temperatura ótima de atividade da xilanase AN3613.2 foi de 50 °C. Como mostrado na Tabela 8, as xilanases da família GH11 apresentam temperatura ótima de atividade mais homogênea do que as xilanases da família GH10, situando-se na faixa de 50 a 60 °C. A xilanase que apresentou características de temperatura ótima e pH ótimo mais semelhante à xilanase AN3613.2 foi a xilanase de *Aspergillus niger* BRFM281 (Levasseur *et al.*, 2005). Fernández-Espinar *et al.* (1996) encontraram uma temperatura ótima de 52 °C para a xilanase X₂₄ proveniente de um transformante de *Aspergillus nidulans* multicópia para o gene da xilanase X₂₄ (AN3613.2).

Apesar da comparação realizada entre a temperatura ótima das xilanases AN1818.2 e AN3613.2 com outras xilanases descritas anteriormente na literatura, deve-se levar em consideração que as atividades enzimáticas de xilanase foram realizadas de modo distinto por cada autor, utilizando-se diferentes substratos, tampões e temperaturas de ensaio. Além disso, diferentes sistemas de expressão foram usados.

5.5.3. Termoestabilidade

A Figura 15 representa a atividade relativa das enzimas AN1818.2 (a) e AN3613.2 (b) quando pré-incubadas a 50 e a 60 °C.

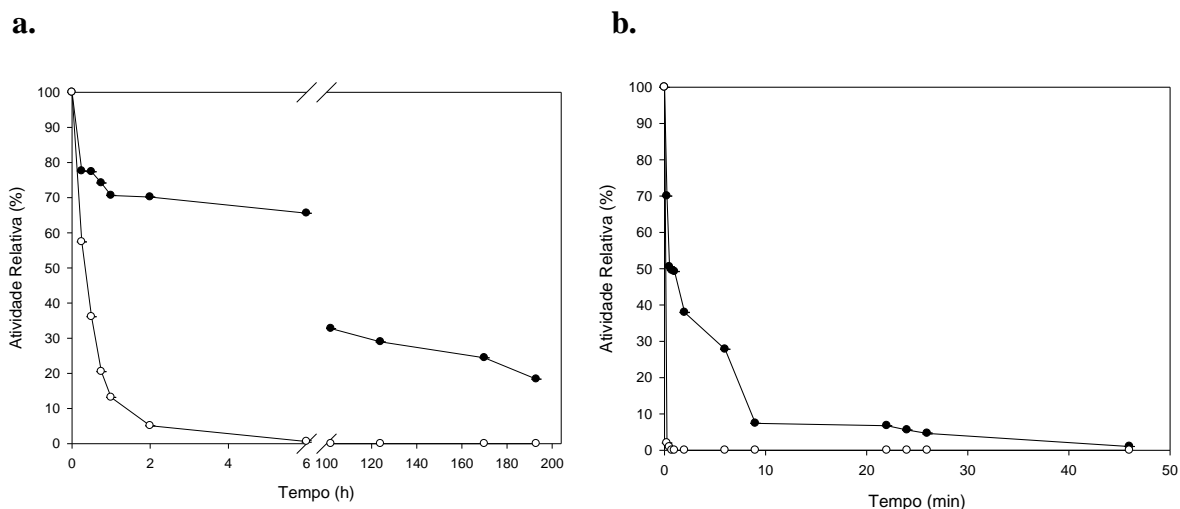


Figura 15. Atividade relativa das enzimas quando pré-incubadas a 50 °C (●) e a 60 °C (○) durante determinado tempo. **a.** Xilanase AN1818.2. **b.** Xilanase AN3613.2.

A xilanase AN1818.2 mostrou-se altamente termoestável a 50 °C, mantendo acima de 65,0 % da atividade após 6 h de incubação e mesmo após 170 horas, 24,2% da atividade foi mantida. Já a 60 °C, a enzima foi razoavelmente estável, apresentando 20,5% da atividade máxima após 45 minutos de incubação. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) calculado foi de 49,5 horas a 50 °C e de 20 minutos a 60 °C. Fernández-Espinar *et al.* (1994) em trabalhos com a AN1818.2 nativa purificada, obtiveram $t_{1/2}$ de 26 minutos a 60° C e de 3 minutos a 66 °C, além de mais de 90% da atividade máxima após 9 horas de incubação a 56 °C. A Tabela 9 mostra a termoestabilidade de xilanases GH10 de diferentes organismos.

Tabela 9. Termoestabilidade de xilanases da família GH10. $t_{1/2}$: tempo de meia-vida. min: minutos. h:horas.

Organismo	Temperatura (°C)	Termoestabilidade	Referência
<i>Bacillus sp.</i> HJ2	37 ≥45	mais que 60 min $t_{1/2} < 5$ min	Junpei <i>et al.</i> , 2012
<i>Demequina sp.</i> JK4	50 60	70-75% (60 min) < 25 % (60 min)	Xin <i>et al.</i> , 2009
<i>Hypothenemus hampei</i>	30	75% (60 min)	Padilla-Hurtado <i>et al.</i> , 2012
	37	20% (60 min)	
	40	0 (60 min)	
	50	0 (60 min)	
<i>Penicillium funiculosum</i>	70	sem perda de atividade (180 min)	Lafond <i>et al.</i> , 2011
<i>Clostridium thermocellum</i>	90	15% (15 minutos)	Zverlov <i>et al.</i> , 2005
<i>Paenibacillus sp.</i> NF1	40 a 60	≥71,07% (180 min)	Zheng <i>et al.</i> , 2014
	70	70,65 % (60 min)	
	80	42,66% (60 min)	

Os dados apresentados na Tabela 9 mostram a diversidade da termoestabilidade de xilanases GH10 provenientes de diferentes organismos. Há xilanases pouco termoestáveis, como a xilanase de *Bacillus sp.* HJ2 (Junpei *et al.*, 2012), que possui um tempo de meia-vida menor que 5 minutos em temperaturas maiores ou iguais a 45 °C e a xilanase de *Hypothenemus hampei* (Padilla-Hurtado *et al.*, 2012), que é inativa a 50 °C. A família GH10 também apresenta xilanases altamente termoestáveis, como a xilanase de *Clostridium thermocellum* (Zverlov *et al.*, 2005), que ainda retém 15% de sua atividade máxima a 90 °C após 15 minutos. Como citado anteriormente, a xilanase AN1818.2 possui termoestabilidade elevada em temperaturas até 50 °C; em temperaturas maiores, o tempo de meia vida é de apenas alguns minutos.

Enzimas com diferentes propriedades físico-químicas são produzidas por uma diversidade de organismos. Estes podem ser classificados de acordo com a temperatura ótima de crescimento como: hipertermófilos, crescem em temperaturas maiores ou iguais a 80 °C; termófilos, crescem na faixa de 45 a 80 °C, mesófilos, crescem na faixa de 15 a 45 °C e psicrófilos, que crescem na faixa de -15 a 10 °C (Bhardwaj *et al.*, 2010). Logo, espera-se que as enzimas expressas por organismos que crescem em condições tão distintas apresentem diferentes estabilidades à temperatura. De acordo com Bhardwaj *et al.* (2010), a estabilidade diferencial entre xilanases mesofílicas e termofílicas deve-se a uma combinação de fatores como o grande número de resíduos carregados na superfície, empacotamento eficiente, aumento no número de interações iônicas e

ligações de hidrogênio e introdução de pontes dissulfeto no N-terminal, no C-terminal ou em regiões de α -hélice.

A xilanase AN1818.2 pertence à família GH10. As xilanases GH10 possuem uma estrutura com um dobramento em barril (β/α)₈ (Biely *et al.*, 1997). Um estudo comparando a termoestabilidade de xilanases GH10 isoladas de organismos termofílicos e mesofílicos revelou o papel do empacotamento hidrofóbico, da interação hélice-dipolo com cadeias laterais carregadas e do elevado conteúdo de prolina no N-terminal de hélices como fatores essenciais à termoestabilidade (Lo Leggio *et al.*, 1999).

A xilanase AN3613.2 mostrou-se pouco estável a 50 e a 60 °C, apresentando apenas 7,24% da atividade máxima após 90 minutos de incubação a 50 °C e 1,98% da atividade máxima após 15 minutos a 60 °C. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) calculado foi de 70 minutos a 50 °C e de 6 minutos a 60 °C. Fernández-Espinar *et al.* (1996) em estudo com a AN3613.2 obteve $t_{1/2}$ de 5 minutos a 60 °C, 2 minutos a 65 °C e 52 minutos a 55 °C, além de mais de 95% da atividade máxima após 7 horas de incubação a 50 °C. Estes dados indicam diferença significativa na termoestabilidade da xilanase AN3613.2 nativa, determinada por Fernández-Espinar *et al.* (1996), e a determinada neste trabalho, visto que a xilanase nativa produzida pelo transformante multicópia de *Aspergillus nidulans* para o gene da X₂₄ apresentou maior estabilidade. Esse fato talvez possa ser explicado devido aos diferentes sistemas de expressão utilizados.

A Tabela 10 mostra a termoestabilidade de xilanases GH11 provenientes de diferentes organismos. Pode-se observar xilanases com diferentes graus de termoestabilidade. Todas as xilanases relacionadas são altamente estáveis em temperaturas até 55 °C. Já nas demais temperaturas, a termoestabilidade varia entre as xilanases: a 60 °C, por exemplo, a xilanase de *Aspergillus oryzae* KNB 616 (Kimura *et al.*, 2000) é estável, ao passo que a xilanase de *Streptomyces sp.*S38 (Georis *et al.*, 2000) e a xilanase AN3613.2 possuem tempos de meia-vida de 10 e 5,4 minutos, respectivamente.

Tabela 10. Termoestabilidade de xilanases da família GH11. $t_{1/2}$: tempo de meia-vida, min: minutos. h:horas.

Organismo	Temperatura (°C)	Termoestabilidade	Referência
<i>Aspergillus fumigatus</i> MKU-1	70	53%	Jeya <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus niger</i> BRFM281	50	estável (120 min)	Levasseur <i>et al.</i> , 2005
	60	$t_{1/2} = 115$ min	
	70	$t_{1/2} = 110$ min	
<i>Aspergillus oryzae</i> KNB 616	60,0	estável	Kimura <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus sp.</i> 41M-1	> 55	estável	Nakamura <i>et al.</i> , 1993
	50	$t_{1/2} = 40,6$ h	
	55	$t_{1/2} = 120$ min	
<i>Aspergillus nidulans</i>	60	$t_{1/2} =$ poucos min	Fernandez-Espinar <i>et al.</i> , 1993
	65	$t_{1/2} < 5$ min	
<i>Trichoderma reesei</i>	65	$t_{1/2} < 5$ min	Törrönen <i>et al.</i> , 1992; Turunen <i>et al.</i> , 2001
<i>Penicillium citrinum</i>	80	Inativa	Tanaka <i>et al.</i> , 2005
<i>Streptomyces sp.</i> S38	50	$t_{1/2} > 16$ h	Georis <i>et al.</i> , 2000
	60	$t_{1/2} = 10$ min	

A xilanase AN1818.2 (GH10) mostrou-se mais termoestável que a xilanase AN3613.2 (GH11). Esse fato pode ser devido às diferenças estruturais entre as famílias GH10 e GH11. A estrutura $(\beta/\alpha)_8$ das GH10 é composta principalmente de hélices e folhas, sendo uma (β/α) a unidade repetitiva. Já a estrutura β -jelly roll das GH11 é composta de muitas folhas e apenas uma hélice, sendo uma folha a unidade repetitiva. Liu *et al.* (2012) sugeriram que a maior termoestabilidade das enzimas GH10, em termos estruturais, é devido ao fato de que estruturas em hélices se dobras melhor que estruturas em folhas (Liu *et al.*, 2012).

5.5.4.Efeito de Íons e Agentes

O efeito de alguns íons e agentes na atividade das xilanases AN1818.2 e AN3613.2 foi avaliado e é apresentado na Figura 16. De acordo com Bhardwaj *et al.* (2012), íons metálicos possuem extrema importância na estabilidade e na atividade catalítica de uma enzima, influenciando diretamente tais características.

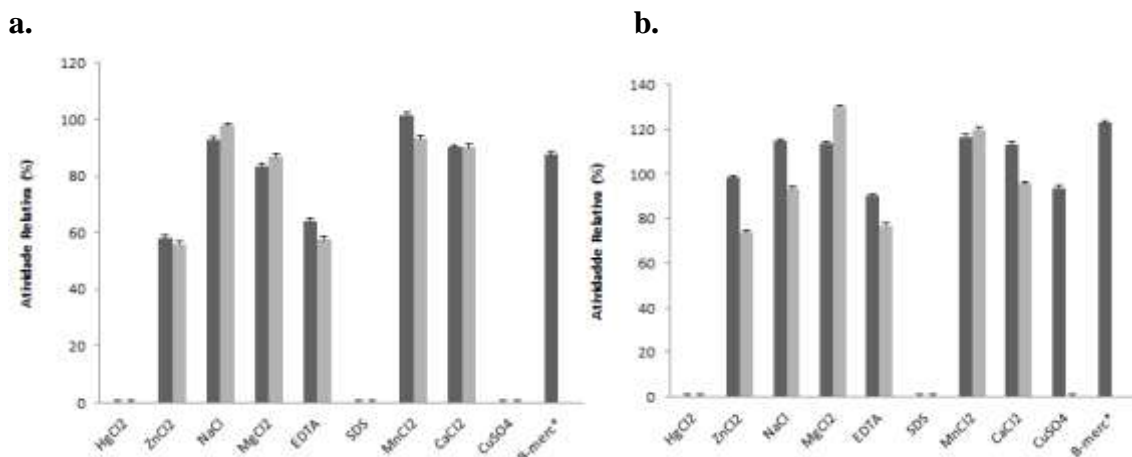


Figura 16. Avaliação de efetores na concentração de 2 mM (■) e de 10 mM (▒) na atividade enzimática. *β-mercaptoetanol: 1 mM. **a.** Xilanase AN1818.2. **b.** Xilanase AN 3613.2.

A partir dos resultados, observa-se que a xilanase AN1818.2 foi completamente inibida por HgCl₂, SDS e CuSO₄ nas concentrações de 2 e de 10 mM e por MnCl₂ na concentração de 10 mM. Fernández-Espinar *et al.* (1994) verificou que Hg⁺² na concentração de 1 mM inibia totalmente a xilanase X₃₄ e que Cu⁺² e Mn⁺² 1 mM reduziam a atividade para 37 e 87%, respectivamente. O SDS é um forte agente desnaturante e confere carga negativa às proteínas, alterando a carga líquida dessas. Takahashi *et al.* (2013) também verificou inibição da xilanase XynVII por Hg⁺², o qual causa inibição devido à interação com um anel aromático presente em um resíduo de triptofano. ZnCl₂ reduziu a atividade enzimática em 50% nas concentrações de 2 e de 10 mM. NaCl e CaCl₂ reduziram a atividade enzimática em no máximo 10% em ambas as concentrações. Já Fernández-Espinar *et al.* (1994) verificaram que Ca⁺² 1mM estimula marginalmente a atividade (105%). EDTA reduziu a atividade enzimática para 57,62 e 64,34% da atividade máxima, respectivamente, nas concentrações de 10 e de 2 mM. Já Fernández-Espinar *et al.* (1994) relataram que EDTA na concentração de 1mM estimula marginalmente a enzima (108%). O composto β-mercaptoetanol 1mM reduziu a atividade para 87,64% da atividade máxima. Isso pode indicar a presença de grupos sulfidríla importantes para a atividade catalítica, já que o β-mercaptoetanol é um forte agente redutor, sendo capaz de desfazer pontes dissulfeto. MgCl₂ reduziu as atividades enzimáticas para 86,7 e 83,65%, respectivamente, nas concentrações de 10 e de 2 mM. Fernández-Espinar *et al.* (1994), relataram que Mg⁺² 1mM estimula marginalmente a atividade (104%).

O efeito de íons e agentes na atividade de xilanases da família GH10 foi descrito por diversos autores. A xilanase de *Bacillus sp.* HJ2 (Junpei *et al.*, 2012) foi completamente inibida por Hg^{+2} e SDS 10 mM, fortemente inibida por Cu^{+2} 10 mM, parcialmente inibida por Zn^{+2} 10 mM e Na^+ 500 mM e estimulada por Mg^{+2} 10 mM, β -mercaptoetanol e EDTA 1%. Já a xilanase de *Demequina sp.* JK4 (Xin *et al.*, 2009) foi fracamente estimulada por Cu^{+2} , Zn^{+2} e Mn^{+2} 1 mM e inibida por Ca^{+2} , Hg^{+2} , EDTA e β -mercaptoetanol 1mM. Para a xilanase de *Paenibacillus sp.* NF1 (Zheng *et al.*, 2014) ocorreu pequena inibição enzimática por Zn^{+2} e Cu^{+2} nas concentrações de 1 e de 10 mM, forte inibição por SDS e EDTA nas concentrações de 1 e 10 mM e estimulação por Ca^{+2} e β -mercaptoetanol nas concentrações de 1 e de 10 mM.

A xilanase AN3613.2 foi completamente inibida por HgCl_2 e SDS nas concentrações de 2 e 10 mM e por CuSO_4 na concentração de 10 mM. Fernández-Espinar *et al.* (1996) observaram que Cu^{+2} e Hg^{+2} na concentração de 1 mM reduziam a atividade para 90 e 86%, respectivamente. Como citado anteriormente, SDS é um forte agente desnaturante e confere carga negativa às proteínas, alterando a carga líquida dessas. MnCl_2 e MgCl_2 ativaram a enzima nas concentrações de 2 e de 10 mM, assim como β -mercaptoetanol na concentração de 1mM. Fernández-Espinar *et al.* (1996) verificaram a redução da atividade para 73% na presença de Mn^{+2} na concentração de 1mM. CaCl_2 e NaCl inibiram a atividade enzimática na concentração de 10 mM e ativaram na concentração de 2mM. ZnCl_2 reduziu a atividade da xilanase AN3613.2 para 73,65% na concentração de 10mM e praticamente não afetou a atividade na concentração de 2 mM. Já o EDTA, reduziu a atividade para 73,65 e 90,17% da atividade máxima nas concentrações de 10 e de 2 mM, respectivamente. Fernández-Espinar *et al.* (1996) observou a redução da atividade para 85% na presença de EDTA 10 mM.

Comparando-se os resultados de efeito de íons e agentes sob a atividade de xilanases das famílias GH10 e GH11, pode-se observar que a maior parte delas é inibida por Hg^{+2} e por SDS.

5.5.5.Efeito dos Produtos

As endo-(β -1,4)-xilanases possuem como produto xilooligossacarídeos tais como xilotriose, xilotetraose, xilopentaose e xilohexaose. As enzimas podem ter sua atividade inibida pelo produto, o chamado mecanismo de retroinibição. O efeito dos

produtos xilotriose e xilotetraose nas atividades das xilanases AN1818.2 e AN3613.2 foi avaliado (Tabela 11).

Tabela 11. Efeito dos produtos xilotriose e xilotetraose na atividade das xilanases AN1818.2 e AN3613.2.

	Atividade Relativa (%)	
	AN1818.2	AN3613.2
Xilotriose 1 mg/mL	0	66,70
Xilotriose 0,1 mg/mL	100,00	100,00
Xilotetraose 0,1 mg/mL	100,00	93,31

A xilotriose na concentração de 0,1mg/mL não foi capaz de inibir as xilanases, porém, na concentração de 1 mg/mL inibiu totalmente a atividade da xilanase AN1818.2 e reduziu a atividade da xilanase AN3613.2 para 66,70%. Já a xilotetraose na concentração de 0,1 mg/mL não afetou a atividade da xilanase AN1818.2, porém, reduziu a atividade da xilanase AN3613.2 para 93,31%.

5.6.Efeito Aditivo das Xilanases

As atividades de xilanase medidas nos ensaios contendo um coquetel enzimático comercial (Multifect CL Genecor[®] (CL) ou Accellerase 1500 Genecor[®] (AC)) e simultaneamente uma (AN1818.2 ou AN3613.2) ou duas (AN1818.2 e AN3613.2) endo- β -1,4-xilanases foram maiores que as atividades teóricas (Figura 17).

O efeito aditivo entre as xilanases AN1818.2, AN3613.2 e as xilanases presentes nos coquetéis comerciais provavelmente se deve aos diferentes mecanismos de ação das xilanases AN1818.2 (endo- β -1,4-xilanase, GH10) e AN3613.2 (endo- β -1,4-xilanase, GH11) e das xilanases presentes nos coquetéis enzimáticos Multifect CL Genecor[®] (CL) e Accellerase 1500 Genecor[®] (AC). Esses coquetéis comerciais apresentam atividade de diferentes tipos de xilanases, como endoxilanases, α -arabinofuranosidasas, β -xilosidasas, α -galactosidasas, dentre outras. Esse resultado indica que diferentes enzimas são necessárias à desconstrução da xilana, um substrato complexo. Logo, houve um efeito aditivo das atividades enzimáticas das endo- β -1,4-xilanases AN1818.2 e AN3613.2 e das xilanases presentes nos coquetéis comerciais Multifect CL Genecor[®] e Accellerase 1500 Genecor[®]. O melhor efeito aditivo para o coquetel Multifect CL Genecor[®] (CL) ocorreu com a adição apenas da xilanase

AN1818.2 e com a combinação das xilanases AN1818.2 e AN3613.2. Já o melhor efeito aditivo para o coquetel Accellerase 1500 Genencor[®] (AC) ocorreu com a adição da xilanase AN3613.2.

O efeito aditivo entre as endo- β -1,4-xilanases AN1818.2 e AN3613.2 e as xilanases presentes nos coquetéis Multifect CL Genencor[®] e Accellerase 1500 Genencor[®] na hidrólise do substrato xilana *beechwood* fornece indícios de que a adição das enzimas AN1818.2 e AN3613.2 na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pode promover melhora da atividade xilanolítica. Entretanto, a análise feita com o substrato xilana *beechwood* não reflete exatamente o que pode ocorrer com a hidrólise do bagaço, visto que este último é um substrato com maior grau de complexidade que o primeiro.

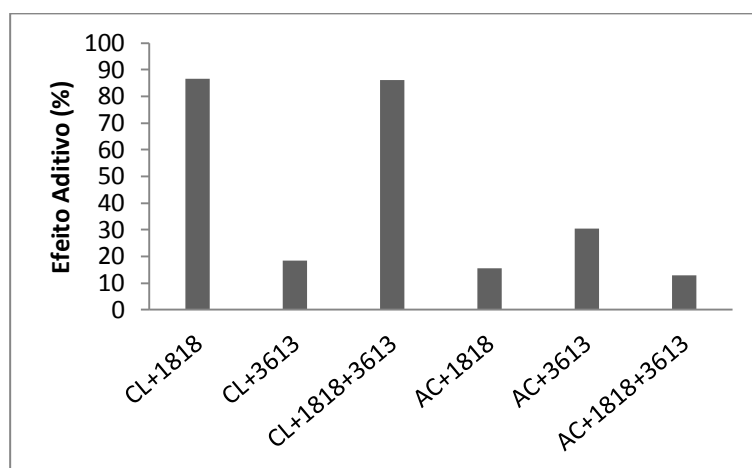


Figura 17. Efeito aditivo (%) entre as endo- β -1,4-xilanases AN1818.2 (1818), AN3613.2 (3613) e as xilanases presentes nos coquetéis comerciais Multifect CL[®] (CL) e Accellerase 1500[®] (AC) sobre o substrato xilana *beechwood*.

5.7.Sacarificação

A importância da presença de hemicelulases, especialmente as xilanases, nos coquetéis enzimáticos a fim de obter maior rendimento da hidrólise da celulose e da hemicelulose em seus respectivos monômeros já foi descrita (Hu *et al.*, 2011). Entretanto, a biomassa lignocelulósica, não pode ser sacarificada em altos rendimentos na ausência de algum tipo de pré-tratamento, pois a hemicelulose e a lignina constituem-se em uma barreira para a ação das celulasas (Falkoski *et al.*, 2012). No presente estudo, o bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado com hidróxido de sódio 1% que atua, principalmente, na redução do teor de lignina. O pré-tratamento alcalino foi

utilizado pois o presente estudo visa a avaliar o efeito das xilanases na hidrólise da hemicelulose; logo, não era desejável a redução do teor de hemicelulose durante a etapa de pré-tratamento. Os resultados da análise de composição do bagaço de cana-de-açúcar são mostrados a seguir (Tabela 12).

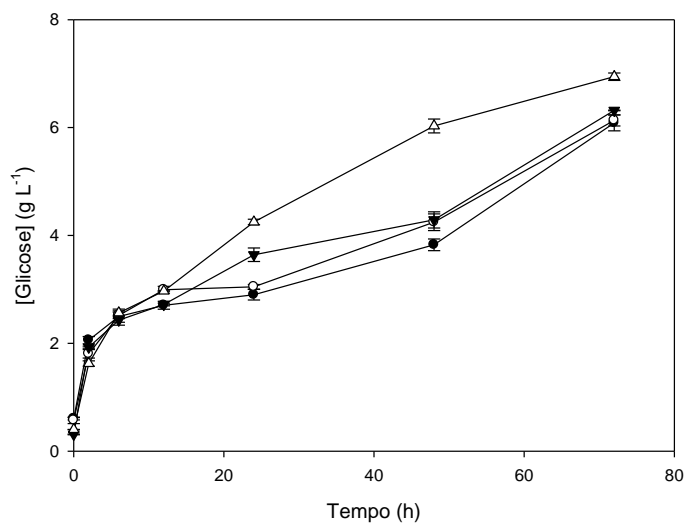
Tabela 12. Análise da composição do bagaço de cana-de açúcar antes e após o pré-tratamento alcalino com NaOH 1%.

	Composição (%)			
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinza
Bagaço de cana-de-açúcar não tratado	34,01±0,86	22,71±0,45	30,07±1,67	4,81
Bagaço de cana-de-açúcar tratado	47,99±1,89	25,47±1,05	18,52±0,10	7,17

O pré-tratamento alcalino foi efetivo na redução do teor de lignina do bagaço, como se pode observar na Tabela 12. Esse dado confirma relatos da literatura de que o pré-tratamento alcalino é mais eficiente na remoção da fração lignina (Falkoski *et al.*, 2012; Varga *et al.*, 2002). A lignina polimerizada tem a capacidade de adsorver proteínas de soluções aquosas, além de formar uma barreira que impede o acesso das enzimas às frações de celulose e hemicelulose. Portanto, a remoção da lignina estimula a hidrólise através da redução da adsorção não específica de celulases (Yang & Wyman, 2004).

As xilanases AN1818.2 e AN3613.2, assim como a combinação de ambas, foram utilizadas na quantidade de 15 U/ g de bagaço para suplementar os coquetéis enzimáticos comerciais de celulase Multifect CL Genencor[®] (CL) e Accellerase 1500 Genencor[®] (AC) na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. A concentração de biomassa foi de 8% e a carga enzimática foi de 10 FPU/ g de bagaço. Os mesmos coquetéis enzimáticos comerciais foram aplicados na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar sem a adição das xilanases, a fim de compará-los ao tratamento com as xilanases (Figuras 18 e 19).

a.



b.

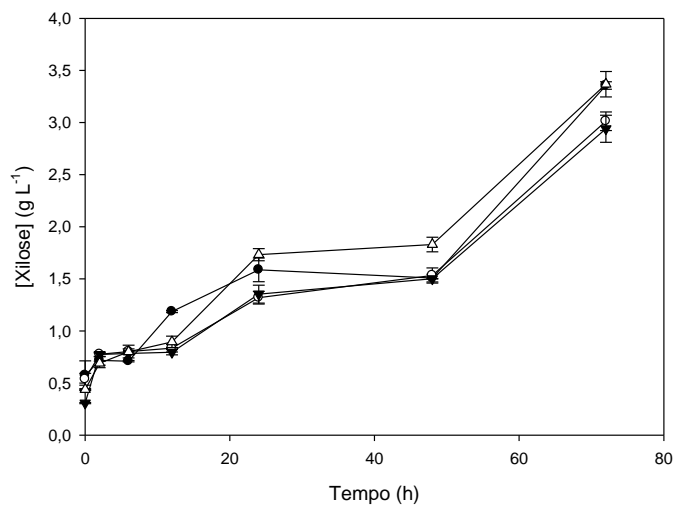


Figura 18. Liberação de glicose **(a)** e de xilose **(b)** em função do tempo para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado alcalino utilizando o coquetel comercial Multifect CL Genencor[®] (CL). (◆) Multifect CL. (◇) Multifect CL+AN1818.2. (▼) Multifect CL+AN3613.2. (△) Multifect CL+ AN1818.2+AN3613.2.

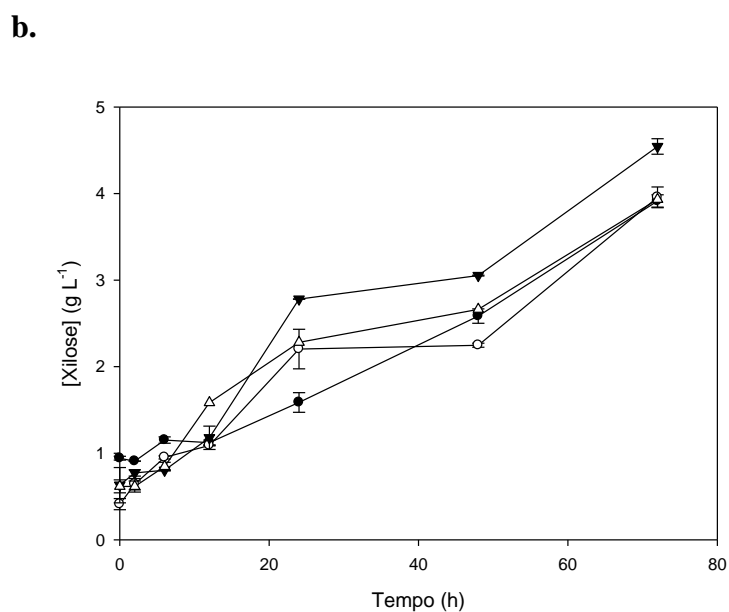
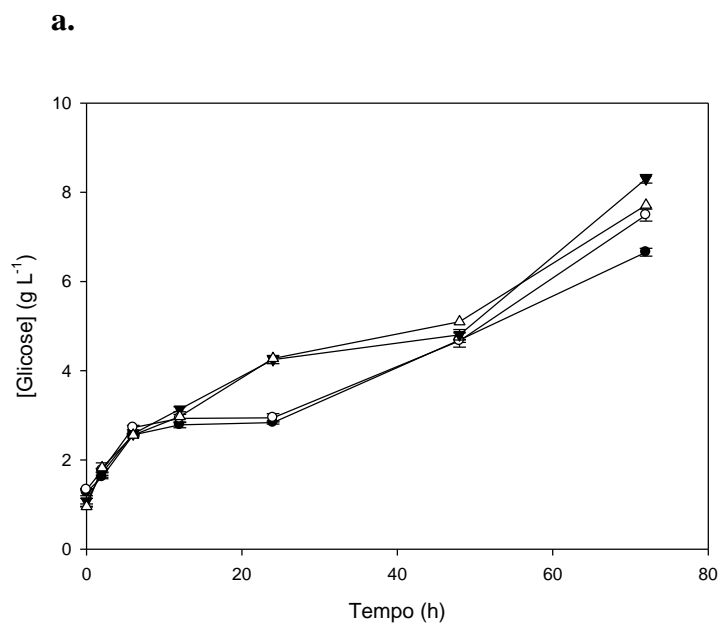


Figura 19. Liberação de glicose (a) e de xilose (b) em função do tempo para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado alcalino utilizando o coquetel comercial Acellerase 1500 Genecor[®] (AC). (◆) Acellerase 1500. (◇) Acellerase 1500+AN1818.2. (▼) Acellerase 15500+AN3613.2. (△) Acellerase 1500+AN1818.2+AN3613.2.

Os resultados para os rendimentos de glicana e de xilana após 72 horas de hidrólise são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13. Taxa de conversão de glicana e de xilana da sacarificação de diferentes misturas enzimáticas após 72 horas. 1818: AN1818.2. 3613: AN3613.2. Multifect CL: Multifect CL Genencor[®]. Accellerase: Accellerase 1500 Genencor[®]. Desvios-padrão não excederam 10%.

Mistura Enzimática	Rendimento da Sacarificação (%)	
	Glicana	Xilana
Multifect CL	14,03	14,45
Multifect CL + 1818	14,38	12,94
Multifect CL + 3613	14,73	12,73
Multifect CL + 1818 + 3613	16,25	14,45
Accellerase	15,55	16,82
Accellerase + 1818	17,53	17,25
Accellerase + 3613	19,40	19,63
Accellerase + 1818 + 3613	18,00	17,04

As taxas de conversão das frações glicana e xilana foram baixas (menores que 20%) para todos os tratamentos realizados. Essa baixa taxa de conversão provavelmente se deve à alta concentração de biomassa utilizada (8%). Estudos realizados indicam que operações em altas concentrações de sólido resultam em diminuição da taxa de conversão, entretanto, reduzem a quantidade de água necessária ao processo e geram um produto mais concentrado, fatores responsáveis por diminuir o custo do processo e torná-lo economicamente viável (Hodge *et al.*, 2008).

A partir dos resultados da Tabela 13 podemos observar que o rendimento da sacarificação da fração glicana foi melhorado pela adição da combinação de ambas as xilanases ao coquetel Multifect CL Genencor[®]. Já para a fração xilana, a adição das xilanases ao coquetel Multifect CL Genencor[®] não resultou em melhora do rendimento.

O efeito da remoção da xilana na hidrólise da fração glicana é relacionado na literatura, principalmente, à facilitação do acesso das celulases à celulose. Entretanto, esse não parece ser o fator responsável pelo aumento da eficiência de conversão da fração glicana do bagaço de cana-de-açúcar pelo coquetel Multifect CL Genencor[®] em combinação com as xilanases AN1818.2 e AN3613.2, uma vez que adição das xilanases não resultou em melhora do rendimento da fração xilana. Uma hipótese para explicar o melhor rendimento da fração glicana quando se adicionam

concomitantemente as enzimas AN1818.2 e AN3613.2 pode ser a de que essas xilanases promovem a dessorção improdutiva de celulases na celulose, como já foi relatado por Hu *et al.* (2013). Estes constataram que a adição tardia de xilanases durante a hidrólise da celulose parece promover a dessorção de celobiohidrolases I, celulases importantes para a degradação da celulose, da palha de milho e promover um uma reiniciação da hidrólise.

Os resultados da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com o coquetel enzimático comercial Accellerase 1500 Genencor[®] indicam que a adição das xilanases AN1818.2 e AN3613.2 e da combinação de ambas as xilanases ao coquetel foi eficiente em promover um melhor rendimento de conversão tanto da fração glicana quanto da fração xilana. Entretanto, o rendimento mais alto das frações glicana (19,40%) e xilana (19,63%) foi obtido com a suplementação do coquetel com 15 U da xilanase AN3613.2, pertencente à família GH11.

As xilanases GH11 possuem características como alta seletividade do substrato, elevada eficiência catalítica, pequeno tamanho (em torno de 20 kDa) e variedade de temperatura ótima e de pH ótimo que as tornam úteis em diversas aplicações (Paës *et al.*, 2012). Além disso, 25% dos membros da família de xilanases GH11 possuem, além do domínio catalítico, um domínio denominado módulo de ligação a carboidrato (CBM). Esse domínio pode ser específico para a celulose e auxilia indiretamente a localização do substrato, já que a xilana encontra-se associada à celulose (Paës *et al.*, 2012). Segundo Paës *et al.* (2012), as xilanases GH11 são denominadas “xilanases verdadeiras” devido à alta especificidade do substrato e às características peculiares que apresentam.

Devido à baixa massa molecular e à forma globular, a permeabilidade das xilanases GH11 na parede celular vegetal é facilitada. Logo, dentre as enzimas que atacam a parede celular, as xilanases GH11 devem ser as primeiras, auxiliando na desconstrução desta e facilitando a posterior ação de enzimas maiores (Paës *et al.*, 2012). Apesar das xilanases GH11 serem pouco eficientes na liberação de pequenos xilooligossacarídeos e arabinooligossacarídeos (Beaugrand *et al.*, 2004), essas enzimas são importantes, em combinação com outras, na redução dos custos do processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica (Paës *et al.*, 2012). Esse fato, provavelmente, deve-se a um aumento da eficiência da sacarificação, como demonstrado na suplementação com a xilanase GH10 AN1818.2 ao coquetel Multifect CL Genencor[®].

Parte II
Expressão, Purificação, Caracterização Cinética e Estrutural das
Proteínas AN1818.2 e AN3613.2

5.8. Purificação das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2

5.8.1. Cromatografia de Afinidade em Coluna de Níquel

As proteínas AN1818.2 e AN3613.2 foram expressas no meio BMMY, conforme verificado pelos ensaios de atividade de xilanase e pelo gel de SDS-PAGE (Tabelas 14 e 15, Figura 23). Em seguida, 800 mL do extrato bruto foram aplicados, após filtração em membrana de nitrocelulose 45 µm, em uma coluna de afinidade de níquel (His Trap HP 5 mL, ge Healthcare). As proteínas que se ligaram à coluna foram eluídas com um gradiente de imidazol de 0 a 500 mM (Figuras 20 e 21).

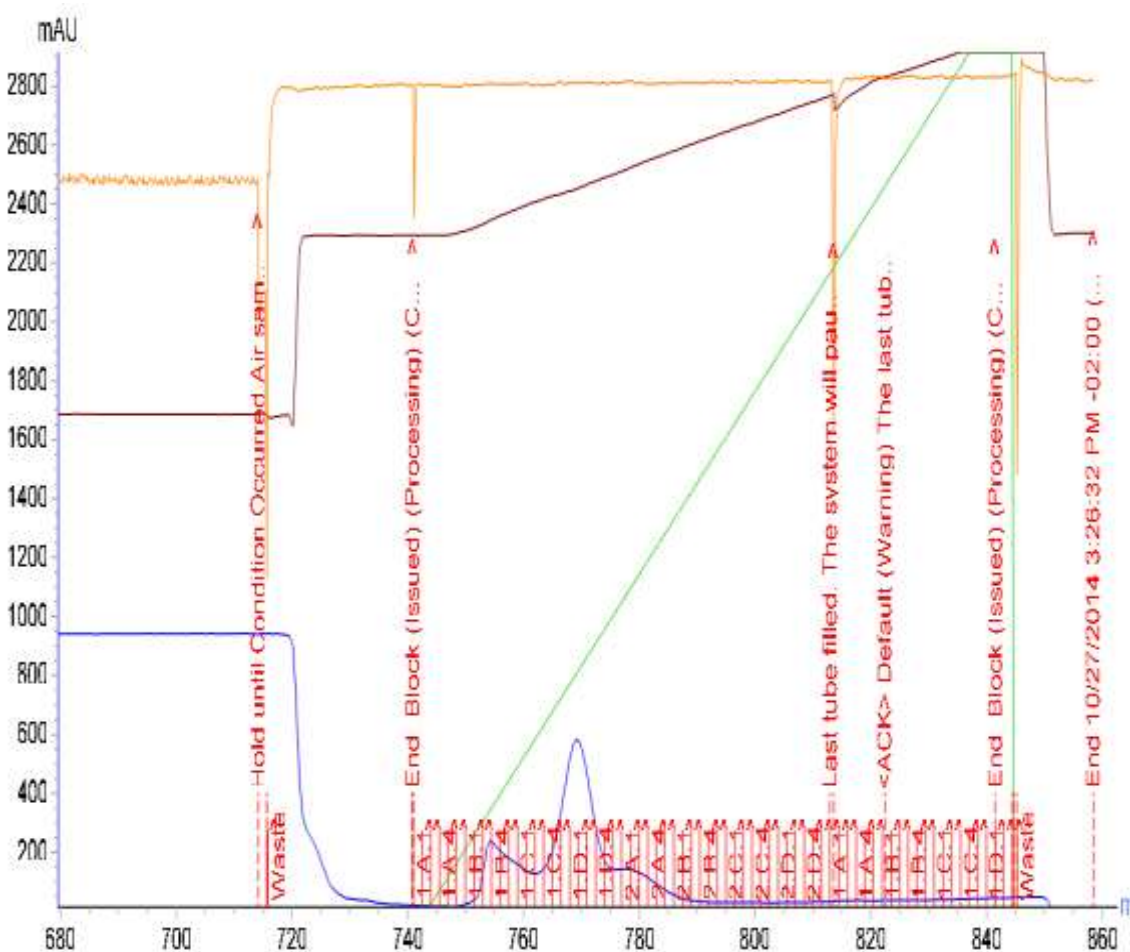


Figura 20. Perfil de eluição da proteína AN1818.2 na cromatografia de afinidade em coluna His Trap HP 5 mL . Azul: absorvância a 280 nm. Roxo: condutância. Verde: gradiente de imidazol. Vermelho: frações cromatográficas.

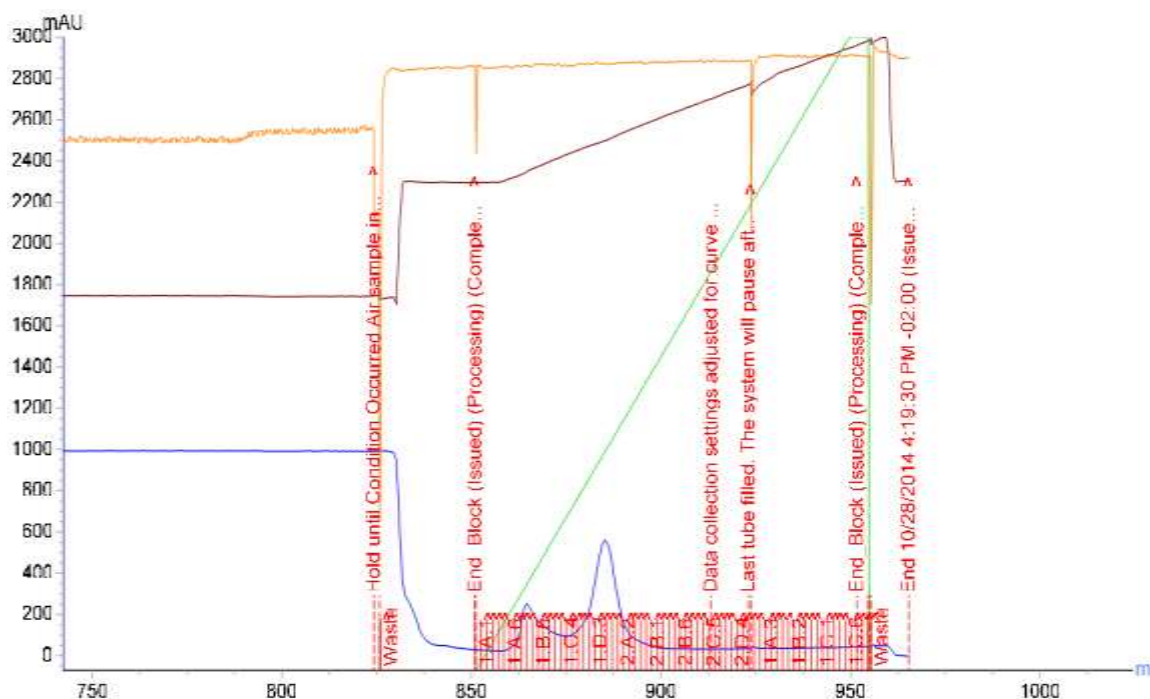


Figura 21. Perfil de eluição da proteína AN3613.2 na cromatografia de afinidade em coluna His Trap HP 5 mL. Azul: absorvância a 280 nm. Roxo: condutância. Verde: gradiente de imidazol. Vermelho: frações cromatográficas.

O perfil da cromatografia de afinidade da proteína AN1818.2 permite a visualização de 2 picos principais de absorvância a 280 nm. Através de ensaios de atividade de xilanase e da técnica de SDS-PAGE, detectou-se a xilanase AN1818.2 no segundo pico, sendo a proteína de interesse eluída no intervalo entre as frações 1.C4 e 1.D4 (volume entre 762 e 775 mL). Através da integral desse pico, a quantidade estimada da proteína AN1818.2, desconsiderando a presença de contaminantes e o erro associado a não linearidade da função entre concentração e absorvância, é de 9,3 mg. O centro deste pico, constituído das frações C6, D1 e D2 (volume total de 4,5 mL) foi aplicado em uma coluna de gel filtração (Figura 22).

O perfil da cromatografia de afinidade da proteína AN3613.2 permite a visualização de 2 picos principais de absorvância a 280 nm. Através de ensaios de atividade de xilanase e da técnica de SDS-PAGE, detectou-se a xilanase AN3613.2 no segundo pico, sendo a proteína de interesse eluída no intervalo entre as frações e 1.C6 e 2.A2 (volume entre 875 e 961 mL). Através da integral desse pico, a quantidade estimada da proteína AN3613.2, desconsiderando a presença de contaminantes e o erro associado a não linearidade da função entre concentração e absorvância, é de 8,4 mg. O

centro deste pico, constituído das frações D3, D4 e D5 (volume total de 4,5 mL) também foi aplicado em uma coluna de gel filtração (Figura 22).

5.8.2. Cromatografia de Gel Filtração

Após a etapa de cromatografia de afinidade em coluna de níquel, as três frações do centro do pico de eluição das proteínas de interesse foram reunidas em um *pool* de aproximadamente 4,5 mL e aplicadas em uma coluna de gel filtração. O perfil cromatográfico das proteínas AN1818.2 e AN3613.2 é mostrado na Figura 22.

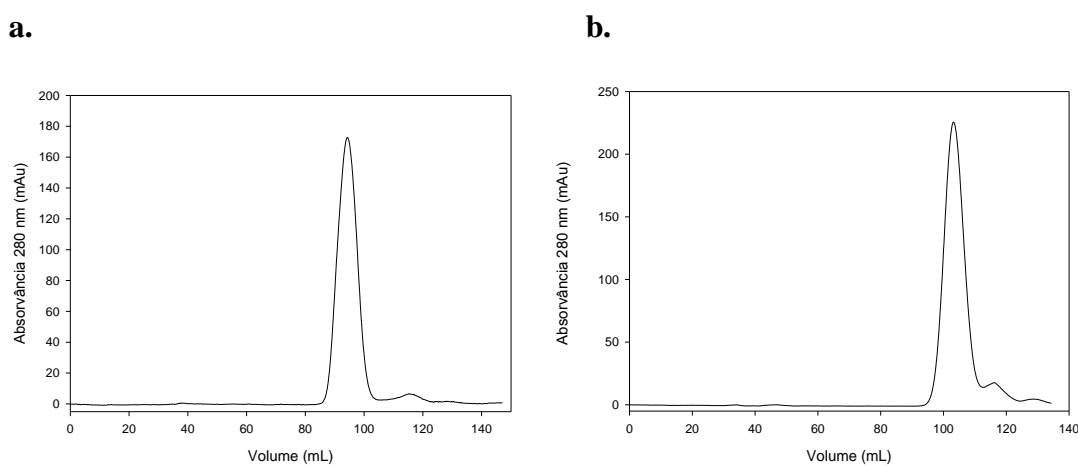


Figura 22. Perfil de eluição das proteínas AN1818.2(a) e AN3613.2(b) em coluna de gel filtração.

A Figura 22a. evidencia que a proteína AN1818.2 foi eluída próxima ao volume de 94,4 mL. Através da integral desse pico, a quantidade estimada da proteína AN1818.2, desconsiderando a presença de contaminantes e o erro associado a não linearidade da função entre concentração e absorvância, é de 3,1 mg.

A proteína AN3613.2 (Figura 22b.) foi eluída no volume 103,2 mL e a quantidade estimada de proteína, fazendo-se as mesmas considerações utilizadas na quantificação da proteína AN1818.2, é de 3,0 mg.

5.8.3. Tabela de Purificação

As tabelas de purificação das xilanases AN1818.2 (Tabela 14) e AN3613.2 (Tabela 15) são mostradas abaixo.

Tabela 14. Resumo dos resultados obtidos em cada etapa de purificação da xilanase AN1818.2.

Etapa	Volume (mL)	Atividade (U mL ⁻¹)	Atividade Específica (U mg ⁻¹)	Fator de Purificação (x)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	800	10,64	2,75	1	100
Cromatografia de Afinidade em Coluna de Níquel	4,5	173,51	79,96	29	9,17
Gel Filtração	2	181,49	324,1	118	4,26

Tabela 15. Resumo dos resultados obtidos em cada etapa de purificação da xilanase AN3613.2.

Etapa	Volume (mL)	Atividade (U mL ⁻¹)	Atividade Específica (U mg ⁻¹)	Fator de Purificação (x)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	800	19,28	4,55	1	100
Cromatografia de Afinidade em Coluna de Níquel	4,5	27,38	13,69	3	0,79
Gel Filtração	2	22,51	72,61	16	0,29

Através das Tabelas 14 e 15, pode-se observar um aumento de atividade específica após a etapa de cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Esse aumento provavelmente se deve à eliminação de contaminantes do extrato bruto que inibiam a atividade das xilanases. Esse efeito foi mais pronunciado para a xilanase AN1818.2, que, por sua vez, apresentou um elevado fator de purificação (29 vezes). Já para a xilanase AN3613.2, que apresentou um fator de purificação de 3 vezes, o efeito foi menos pronunciado.

O rendimento da etapa de cromatografia de afinidade em coluna de níquel foi subestimado, pois o volume considerado para essa etapa foi de 4,5 mL, ou seja, o volume das três frações centrais do pico da proteína de interesse que foi aplicado na gel filtração. Não foi possível o cálculo real do rendimento, pois nem todas as frações do pico de eluição da proteína foram reunidas em um único *pool* e a atividade enzimática calculada, assim como a concentração de proteínas, foi feita apenas para o *pool* das três frações centrais do pico. Esse procedimento foi feito a fim de evitar a diluição da proteína para posterior aplicação na gel filtração, visto que as frações centrais do pico de eluição apresentam maior concentração de proteínas.

O rendimento da etapa de gel filtração também foi subestimado, pois o volume considerado para essa etapa foi de 2,0 mL, ou seja, o volume da fração central do pico da proteína de interesse. Não foi possível o cálculo real do rendimento, pois nem todas as frações do pico de eluição da proteína foram reunidas em um *pool* e a atividade enzimática calculada, assim como a concentração de proteínas, foi obtida apenas para a fração central do pico de eluição. Esse procedimento foi feito pois apenas a fração central do pico foi utilizada para os ensaios de verificação do grau de pureza das amostras, assim como para a caracterização de especificidade do substrato e para a caracterização cinética de ambas as xilanases.

A etapa de gel filtração resultou em um fator de purificação mais elevado que a etapa de cromatografia de afinidade em coluna de níquel. O elevado fator de purificação se deve, provavelmente, à eliminação de sais, do imidazol e de outros interferentes de baixa massa molecular que inibiam a atividade de ambas as xilanases e, principalmente, à eliminação de proteínas contaminantes.

5.9. Ensaios para Verificar o Grau de Pureza das Amostras

5.9.1. SDS-PAGE

O grau de pureza das amostras foi avaliado pela técnica de SDS-PAGE (Figura 23). A Figura 23b. mostra que a proteína AN1818.2 foi eluída no segundo pico da cromatografia de afinidade, centrado no volume de 769,0 mL. Nesse mesmo pico, também há a presença de um contaminante com massa entre 37 e 50 kDa que, aparentemente, já estava presente no extrato bruto. Após a etapa de gel filtração, observa-se que este provável contaminante não mais aparece no gel, sugerindo sua eliminação. Observa-se, por outro lado, a presença da banda correspondente à proteína AN1818.2 e de uma banda de menor tamanho que a proteína de interesse. Essa banda, provavelmente é resultante da proteólise da proteína AN1818.2, como foi discutido no item 5.4.

A Figura 23c. revela que as etapas de cromatografia de afinidade e de gel filtração foram eficientes para obter uma banda relativa à proteína AN3613.2 e uma banda de menor tamanho, provavelmente resultante da proteólise da proteína AN3613.2, como foi discutido no item 5.4.

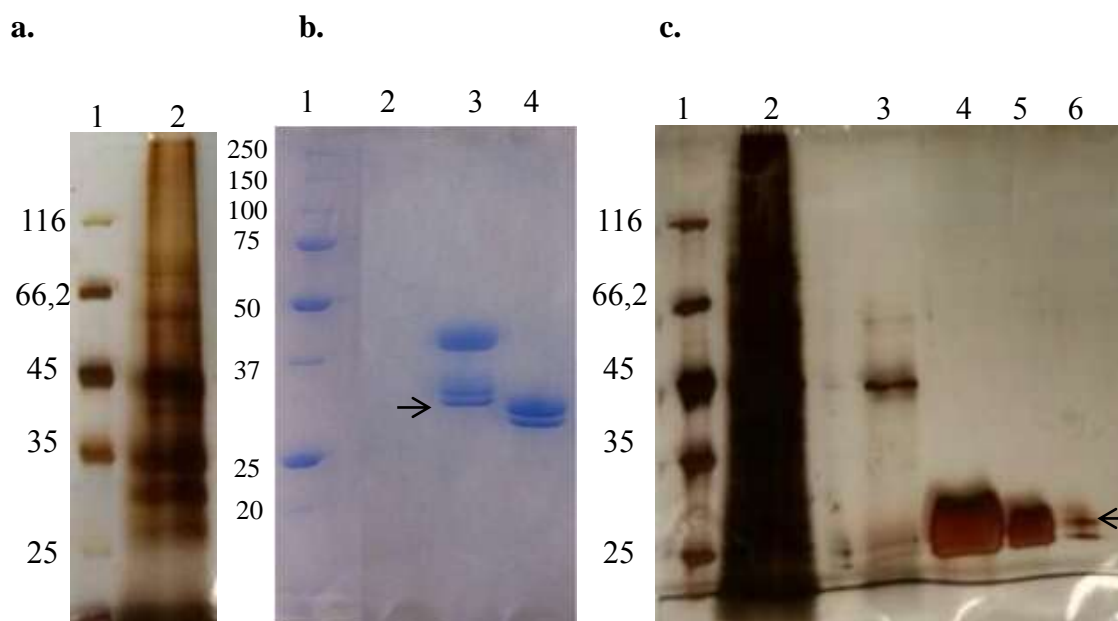


Figura 23. a. Gel desnaturante de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata. Amostra da xilanase AN1818.2. **1.** Marcador Molecular. **2.** Extrato Bruto. b. Gel desnaturante de poliacrilamida 12% corado com Coomassie Blue. Amostras da xilanase AN1818.2. **1.** Marcador Molecular. **2.** Pico 1 da cromatografia de afinidade. **3.** Pico 2 da cromatografia de afinidade. **4.** Fração 24 da gel filtração. c. Gel desnaturante de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata. Amostras da xilanase AN3613.2. **1.** Marcador Molecular. **2.** Extrato Bruto. **3.** Pico 1 da cromatografia de afinidade. **4.** Pico 2 da cromatografia de afinidade. **5.** Fração 30 da gel filtração (20 µL). **6.** Fração 30 da gel filtração (5 µL). As bandas das proteínas de interesse são indicadas por setas.

5.9.2. Western Blotting

As amostras das proteínas AN1818.2 e AN3613.2 purificadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, após a separação eletroforética por SDS-PAGE, e coradas com o reagente Ponceau-S, como se pode visualizar na Figura 24a. Entretanto, quando reveladas com anticorpo secundário anti Ig-G de camundongo, apenas a amostra do controle positivo apresentou uma banda marrom relativa à precipitação do substrato DAB. Esse fato sugere que ambas as proteínas, AN1818.2 e AN3613.2, perderam a cauda de histidina durante os passos de purificação. Entretanto, a cauda de histidina pode encontrar-se no interior da estrutura enovelada da proteína e, por isso, pode não ter sido detectada.

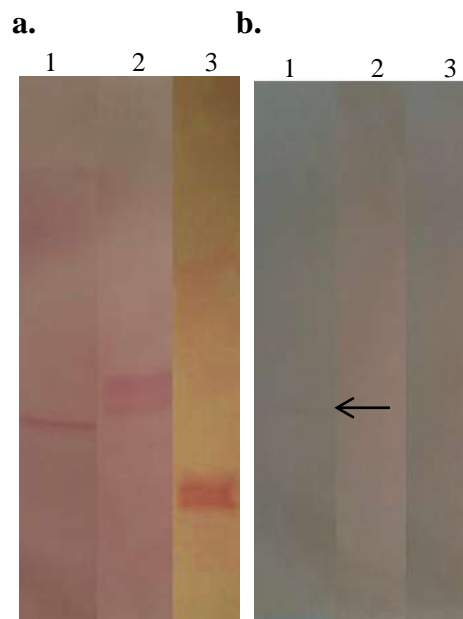


Figura 24. Membrana de nitrocelulose do Western Blotting. **a.** Membrana corada com Ponceau-S. **b.** Membrana revelada com anticorpo secundário anti Ig-G de camundongo acoplado à peroxidase. A seta indica a banda revelada com a peroxidase. **1.** Controle positivo. **2.** Proteína AN1818.2. **3.** Proteína AN3613.2.

5.9.3. Espectrometria de Massas

A análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da amostra da proteína AN1818.2 purificada não foi possível pois nenhum sinal foi evidenciado. Já a amostra da proteína AN3613.2 purificada resultou no espectro de massas mostrado na Figura 26. Sinais com razões m/z de 22112,159; 22962,886 e 23748,105 foram detectados, corroborando a hipótese proveniente do resultado do Western Blotting de que a proteína AN3613.2 perdeu a cauda de histidina C-terminal. A proteína também pode ter perdido um fragmento no N-terminal e apresentar a cauda de histidina “escondida” no interior de sua estrutura tridimensional. Apesar de não ser possível afirmar que o mesmo fato ocorreu com a proteína AN1818.2, parece ser algo similar ao que se observou para a proteína AN3613.2.

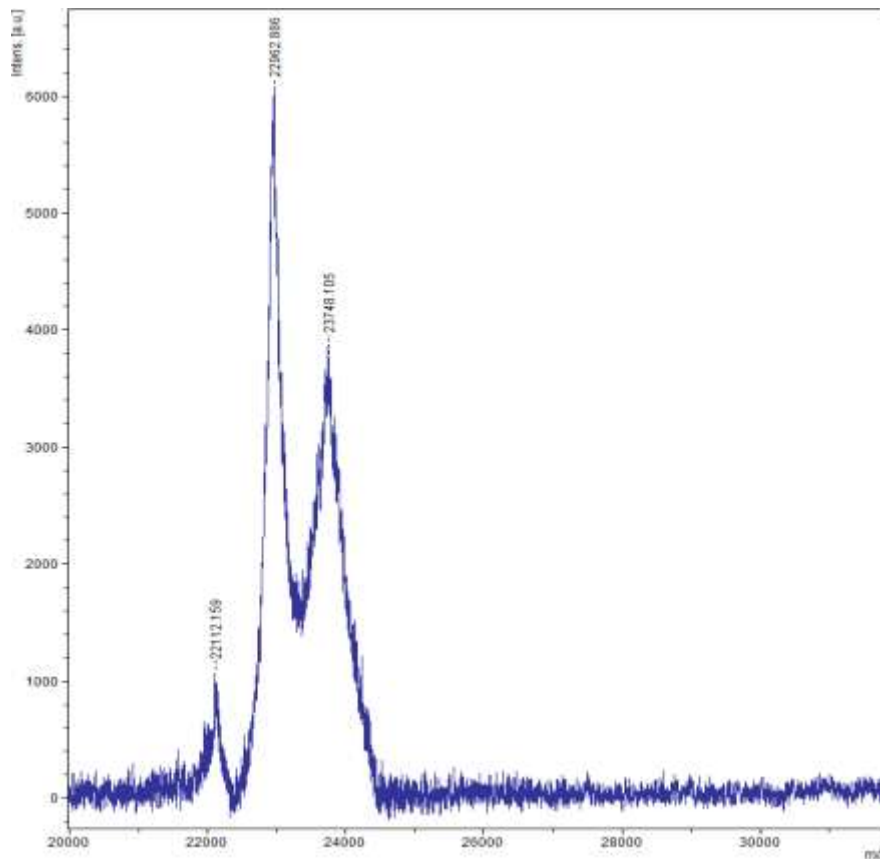


Figura 25. Espectro de massas da amostra da proteína AN3613.2 purificada.

A análise *in silico* dos sítios de clivagem por proteases na proteína AN3613.2 foi realizada através do ExPASy PeptideCutter. A ferramenta ExPASy ProtParam forneceu que a massa esperada para a sequência da proteína AN3613.2 clonada, contendo o epítipo myc e a cauda de polihistidina, é de 27198,5 Da. Essa sequência possui 250 aminoácidos. A análise dos sítios de clivagem por proteases indicou diversos pontos de clivagem no C-terminal dessa proteína por várias proteases (Figura 26). Dentre estas, encontra-se a proteinase K.

IDEFMVSFKSLLVLCCAALGAFATPVGSEDLAAREASLLERSTPSSTGWSNGYYSFWTDGGGD
 VTYTNGAGGSYTVQWSNVGNFVGGKGNPWSTRITINYGGSFNPSGNGYLAVYGWTQNPLIEY
 YIVESYGTYNPGSGGQHRGTVYSDGATYDIYTATRYNAPSIEGTATFEQFWSVRQSKRTGGTVT
 TANHFNAWAALGMRLGTHNYQIVATEGYQSSGSASITVYLEQKLISEEEDNAVDHHHHHH

Figura 26. Sequência de aminoácidos da construção clonada da proteína AN3613.2 (contendo o c-myc e a cauda de polihistidinas). A proteinase K possui sítios de clivagem nos resíduos 207, 213 e 218, fornecendo polipeptídeos indicados em vermelho.

A clivagem pela proteinase K nos resíduos 207, 213 e 218, poderia fornecer os polipeptídeos HNYQIVATEGYQSSGSASITVYLEQKLISEEEDNAVDHHHHHH, ATEGYQSSGSASITVYLEQKLISEEEDNAVDHHHHHH e QSSGSASITVYLEQKLISEEEDNAVDHHHHHH; além das xilanases recombinantes truncadas com massas de 22199,3; 22954,1 e 23476 Da, respectivamente. Essas massas possuem um valor semelhante às presentes no espectro da Figura 25, indicando que as bandas observadas no gel de SDS-PAGE e as massas encontradas no espectro de massas podem corresponder a produtos de proteólise parcial da proteína AN3613.2. As massas das proteínas resultantes da ação da proteinase K previstas *in silico* podem não apresentar o valor exato daquelas observadas experimentalmente pois a enzima de restrição usada para clonar o gene da proteína AN3613.2 possui mais de um sítio de clivagem e não se sabe exatamente qual deles foi utilizado por Bauer *et al.* (2006).

Uma análise *in silico* análoga à realizada para a proteína AN3613.2 foi feita para a proteína AN1818.2. A ferramenta ExPASy ProtParam forneceu que a massa esperada para a sequência da proteína AN1818.2 clonada, contendo o epítipo myc e a cauda de polihistidinas, é de 38569,7 Da. Essa sequência possui 353 aminoácidos. A análise dos sítios de clivagem por proteases indicou diversos pontos de clivagem no C-terminal dessa proteína por várias proteases (Tabela 16). Entretanto, não é possível afirmar que ocorreu proteólise parcial e qual resíduo foi clivado, pois não se conseguiu visualizar os picos da amostra purificada através da espectrometria de massas.

A ferramenta ExPASy PeptideCutter não fornece sítios de clivagem por proteases endógenas e extracelulares de *Pichia pastoris*, havendo a possibilidade de ocorrer proteólise parcial das proteínas AN1818.2 e AN3613.2 por outras proteases.

Tabela 16. Previsão *in silico* de sítios de clivagem por proteases no C-terminal da proteína AN1818.2.

Protease	Resíduos clivados
Asp-N endopeptidase	313,320,341,346
Asp-N endopeptidase + N-terminal Glu	313,320,332,338,339,340,341,346
Quimotripsina de alta especificidade (C-terminal a [FYW], não antes de P)	313,317,323
Quimotripsina de baixa especificidade (C prazo para [FYWML], não antes de P)	313,317,323,330,332,336,348,349,350,351,352
O ácido fórmico	314,321,342,347
Glutamil endopeptidase	333,339,340,341
LysC	320,335
LysN	319,334
Pepsina (pH > 2)	313,316,323,329,330,331,332,335,336
Proteinase K	313,317,322,323,325,326,327,329,330,332,333,336,337,339,340,341,345,346
Termolisina	324,325,326,328,329,331,335,336,344,345
Tripsina	320,335

5.9.4. Espalhamento da Luz

A técnica de espalhamento dinâmico da luz utiliza da propriedade do movimento browniano das moléculas, ou seja, do movimento randômico que estas apresentam quando se encontram em solução. Um correlator compara a intensidade da luz espalhada pelas moléculas nos tempo t , $t+x$, $t+2x$, etc. e gera uma função de correlação. Moléculas pequenas difundem-se mais rápido que moléculas grandes, causando um decaimento mais rápido na medida da função de correlação. Esta é plotada como uma exponencial múltipla para obter a distribuição do tamanho das partículas. Uma curva de uma única exponencial da função de correlação fornece a polidispersividade, que indica o desvio-padrão ou largura de uma distribuição Gaussiana composta por uma população de tamanho único. Já a % de polidispersividade define o coeficiente de variação da distribuição. A luz espalhada é função do raio hidrodinâmico da partícula. Este é

definido como o raio da esfera dura que se difunde à mesma velocidade da partícula ou molécula (Some & Kenrick, 2012).

As vantagens do ensaio de espalhamento dinâmico da luz são a rapidez, a elevada sensibilidade (concentração menor que 0,1 mg/mL para proteínas típicas), o fato de ser não invasiva e de não necessitar de informações a respeito da amostra. São necessárias apenas informações da temperatura de medida e da viscosidade do solvente nessa mesma temperatura (Some & Kenrick, 2012).

Já o espalhamento estático da luz mensura a intensidade média da luz espalhada em diversos ângulos, fornecendo o raio de giro da molécula. Nesse caso, o correlator mede o grau de similaridade entre dois sinais e permite estimar a massa molecular da partícula com uma acurácia de aproximadamente 5%. A intensidade média do espalhamento é proporcional ao produto da massa molecular média pela concentração da amostra. A desvantagem da técnica é a necessidade de um volume grande de amostra (aproximadamente 1 mL) e de uma estimativa da concentração das partículas (em g/L) na solução (Some & Kenrick, 2012).

Os resultados dos ensaios de espalhamento da luz são mostrados na Figura 27 e nas Tabelas 17 e 18.

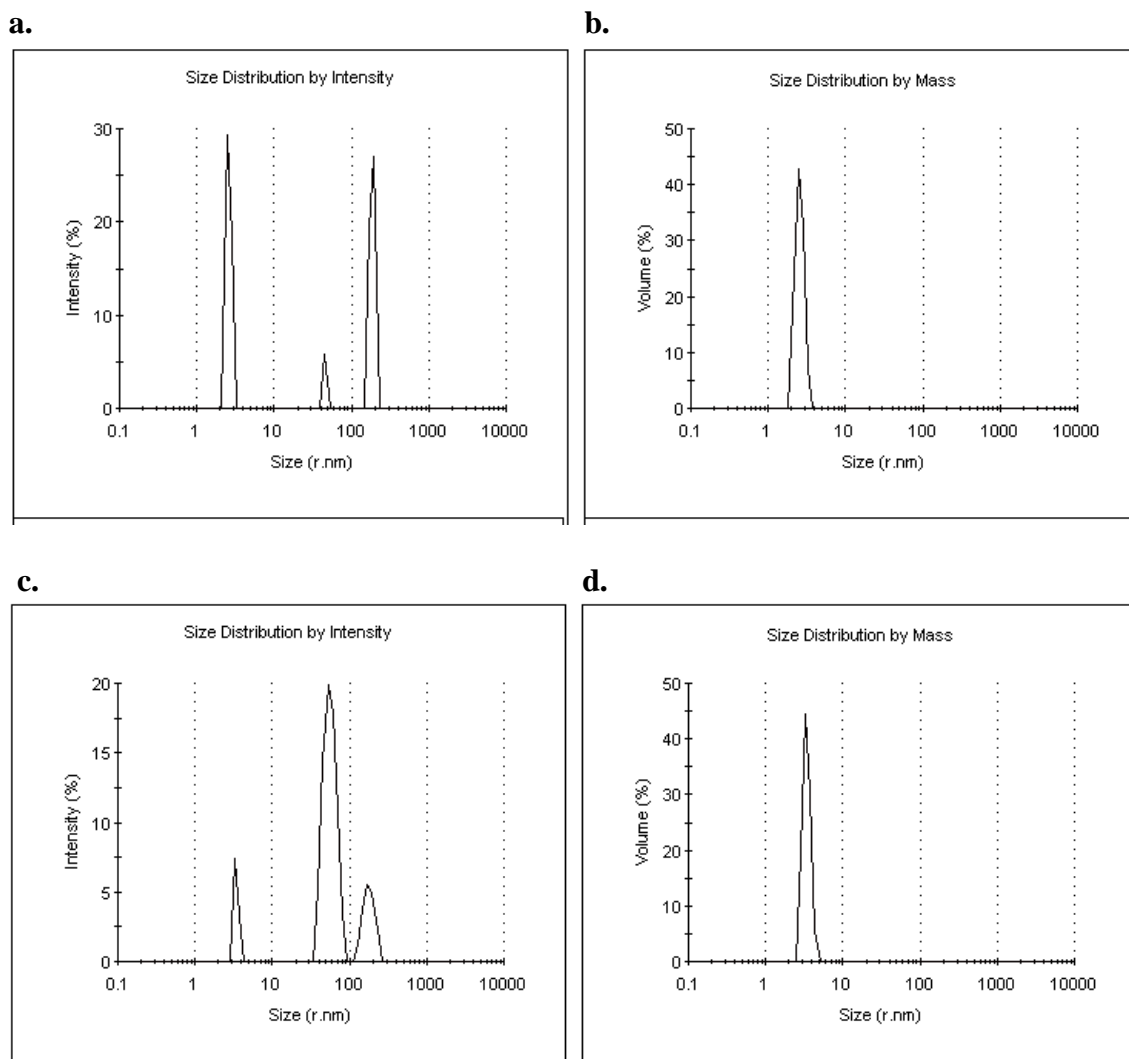


Figura 27. Ensaio de espalhamento dinâmico da luz. Distribuição de tamanho por intensidade para as amostras das proteínas AN1818.2 (a) e AN3613.2 (c) purificadas. Distribuição de tamanho por massa para as amostras das proteínas AN1818.2 (b) e AN3613.2 (d) purificadas.

Tabela 17. Resultados de distribuição no ensaio de espalhamento da luz para a amostra da proteína AN1818.2.

	Média (nm) ± DP	Polidispersividade (%)	Massa molecular esperada (kDa) ± DP	Intensidade (%)	Massa (%)	Polidispersividade do pico
Pico 1	2,6 ± 0,2	7,3	30,7 ± 2,2	47,8	100	Monodisperso
Pico 2	186,8 ± 13,3	7,1	6,9 x 10 ⁵ ± 5,0 x 10 ⁴	46,3	0	-
Pico 3	45,6 ± 6,7x 10 ⁻⁷	0	2,6 x 10 ⁴ ± 0	5,9	0	-

Os resultados de distribuição da amostra da proteína AN1818.2 indicam a presença de três picos. O pico 1 corresponde a 100% da massa presente na amostra e pode-se afirmar que a partícula responsável por esse pico apresenta uma massa

molecular média de 30,7 kDa, o que corresponde, aproximadamente, à massa prevista pela sequência de aminoácidos da proteína AN1818.2 (34 kDa). O raio médio dessa partícula é de 2,6 nm e pode-se considerar que essa distribuição apresenta partículas de um tamanho único, visto que a porcentagem de polidispersividade é menor que 20%. Esse resultado sugere que proteína AN1818.2 deve apresentar-se como um monômero em solução. Uma busca no PDB por estruturas tridimensionais de proteínas semelhantes à AN1818.2 evidenciou 141 estruturas, sendo 136 monoméricas e apenas 5 diméricas. Esse fato aumenta a possibilidade da proteína AN1818.2 apresentar a forma monomérica.

A partícula de raio 2,6 nm apresenta uma intensidade de apenas 47,8%, mesmo representando quase 100% da massa. Isso ocorre pois esse raio é pequeno e a intensidade de uma partícula esférica é proporcional à sexta potência de seu raio. Já os picos 2 e 3, apesar de representarem muito pouco da massa em solução, apresentam intensidades de 46,3 e 5,9 %, respectivamente. Essas intensidades elevadas são devido ao grande raio médio que apresentam (186,8 e 45,6 nm, respectivamente).

Tabela 18. Resultados de distribuição do ensaio de espalhamento da luz para a amostra da proteína AN3613.2.

	Média (nm) ± DP	Polidispersividade (%)	Massa molecular esperada (kDa) ± DP	Intensidade (%)	Massa (%)	Polidispersividade do pico
Pico 1	56,7 ± 10,8	19,1	$4,3 \times 10^4 \pm 0,8 \times 10^4$	71,6	0,2	-
Pico 2	178,3 ± 28,9	16,2	$6,0 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$	17,7	0	-
Pico 3	3,4 ± 0,2	6,9	59,3 ± 4,1	10,7	99,8	Monodisperso

Os resultados de distribuição da amostra da proteína AN3613.2 indicam a presença de três picos. O pico 3 corresponde a 99,8% da massa presente na amostra e pode-se afirmar que a partícula responsável por esse pico apresenta uma massa molecular média de 59,3 kDa. O raio médio dessa partícula é de 3,4 nm e pode-se considerar que essa distribuição apresenta partículas de um tamanho único, visto que a porcentagem de polidispersividade é menor que 20%. Esse resultado sugere que a proteína AN3613.2 (massa de 24 kDa prevista pela sequência de aminoácidos para o monômero e de 22.962,9 Da determinada por espectrometria de massas) encontra-se na forma dimérica ou trimérica. Uma busca no PDB por estruturas tridimensionais de proteínas semelhantes à AN3613.2 relatou 93 estruturas, sendo 89 monoméricas, 4

diméricas e nenhuma trimérica. Esse fato aumenta a possibilidade da proteína AN3613.2 apresentar a forma dimérica.

A partícula de raio 3,4 nm apresenta uma intensidade de apenas 10,7%, mesmo representando quase 100% da massa. Isso ocorre pois esse raio é pequeno e a intensidade de uma partícula esférica é proporcional a sexta potência de seu raio. Já os picos 1 e 2, apesar de representarem muito pouco da massa, apresentam intensidades de 71,6 e 17,7 %, respectivamente. Essas intensidades elevadas são devido ao elevado raio médio que apresentam (56,7 e 178,3 nm, respectivamente).

5.10. Caracterização das Xilanases AN1818.2 e AN3613.2

A caracterização de especificidade do substrato e a caracterização cinética para as xilanases AN1818.2 e AN3613.2 foram feitas com as amostras das proteínas purificadas conforme descrito anteriormente.

5.10.1. Especificidade do Substrato

A especificidade das xilanases AN1818.2 e AN3613.2 foi avaliada com diferentes substratos (Tabela 19).

Tabela 19. Especificidade das xilanases AN1818.2 e AN3613.2 contra diferentes substratos. DP: desvio-padrão.

Substrato	Concentração final	AN 1818.2	AN 3613.2
		Atividade (U mL ⁻¹) _{±DP}	Atividade (U mL ⁻¹) _{±DP}
ρNPβXil	1 mM	0	0
ρNPαGal	1 mM	0	0
ρNPβCel	1 mM	0,41 ± 0,006	0
ρNPβGli	1 mM	0	0
ρNPαAra	1 mM	0	0
ρNPβGal	1 mM	0	0
ρNPβMan	1 mM	0	0
ρNPαMan	1 mM	0	0
Xilana <i>Beechwood</i>	0,80%	31,120 ± 0,022	23,640 ± 0,014
Xilana <i>Spelts</i> de Aveia	0,80%	19,636 ± 0,043	7,320 ± 0,006
Arabinoxilana de Trigo	0,80%	47,571 ± 0,031	10,620 ± 0,007
Avicel	1,00%	0	0
Carboximetilcelulose	1,00%	0	0

Diferentes xilanases possuem atividades distintas contra várias estruturas de xilana, o que depende, principalmente, do comprimento e grau de substituição da cadeia lateral da xilana (Li *et al.*, 2000).

As xilanases utilizadas nesse trabalho apresentam estruturas e composições distintas: xilana *beechwood* (Sigma) possui mais de 90% dos resíduos de xilose (Sigma), xilana *spelts* de aveia (Sigma) apresenta mais de 70% dos resíduos de xilose, resíduos de arabinose no máximo de 10% e resíduos de glicose no máximo de 15%. Já a arabinoxilana de trigo de baixa viscosidade foi adquirida da Megazymes e apresenta uma razão arabinose:xilose de 1:1,63. Observa-se que a xilana *beechwood* é a que possui um maior conteúdo de xilose e menor quantidade de ramificações, sendo o substrato ideal para a padronização de ensaios enzimáticos de xilanases. Já a xilana *spelts* de aveia é a xilana apresentando o segundo maior conteúdo de xilose: mais de 70% dos resíduos. Apenas a arabinoxilana de trigo apresenta um teor de arabinose próximo ao de xilose: aproximadamente, a cada 2,5 resíduos do polímero, um resíduo é arabinose.

Pode-se observar que a xilanase AN1818.2 hidrolisou os substratos arabinoxilana de trigo, xilana *beechwood* e xilana *spelts* aveia e ρ NP β Cel em ordem decrescente de especificidade. Esses resultados condizem com a classificação dessa enzima como pertencente à família GH10: são arabinoxilana-específicas e podem hidrolisar diferentes tipos de heteroxilana e até mesmo alguns aril-celobiosídios (Biely *et al.*, 1997; Gilkes *et al.*, 1991).

Fernández-Espinar *et al.* (1994) obteve resultados semelhantes de especificidade do substrato para a enzima X₃₄, que não apresentou atividade significativa contra os substratos CMC, ρ NP β Xil, ρ NP β Gli, ρ NP α Ara, ρ NP β Gal e ρ NP α Man.

Já a xilanase AN3613.2 hidrolisou apenas os substratos xilana *spelts* de aveia, arabinoxilana de trigo e xilana *beechwood* em ordem crescente de especificidade. Esses resultados condizem com a classificação dessa enzima como pertencente à família GH11: são xilanases de pequeno tamanho, altamente específicas e não toleram altos graus de substituição na cadeia de xilana (Biely *et al.*, 1997). A seletividade das GH11 entre glicose, o monômero que constitui a celulose, e xilose, o principal monômero que constitui a xilana, deve-se ao impedimento estérico e a impossibilidade de formação de ligação de hidrogênio entre o sítio catalítico e o O₆ do resíduo de glicose (Sidhu *et al.*, 1999; Sulzenbacher *et al.*, 1999). Heteroxilana com altos graus de substituição, assim como aril-celobiosídeos, não são clivados, pois não podem ser acomodados na fenda

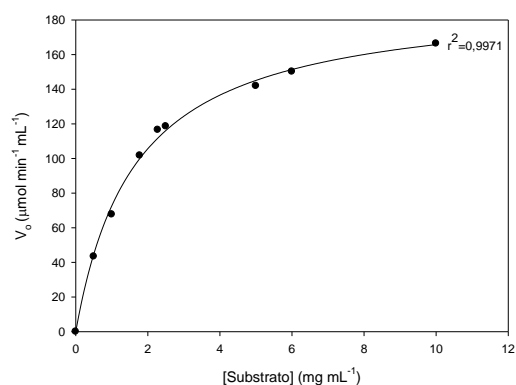
estreita do sítio ativo das xilanases GH11, ao contrário da fenda das xilanases GH10, que é aberta e larga (Paës *et al.*, 2012).

Fernández-Espinar *et al.* (1996) obteve resultados semelhantes de especificidade do substrato para a enzima X₂₄, porém, expressou-os como atividade relativa em relação ao substrato que apresentou maior atividade: xilana *oat spelt* solúvel. Xilana *birchwood*, arabinoxilana e xilana *oat spelt* insolúvel, apresentaram atividades relativas de 91,1%, 63,60%, e 15,4%, respectivamente.

5.10.2. Caracterização Cinética

O efeito da concentração dos substratos xilana *beechwood* (Figura 28), arabinoxilana de trigo (Figura 29) e xilana *spelts* de aveia (Figura 30) na velocidade das reações catalisadas pelas xilanases AN1818.2 (a) e AN3613.2 (b) foi avaliado através da curva de Michaelis-Menten.

a.



b.

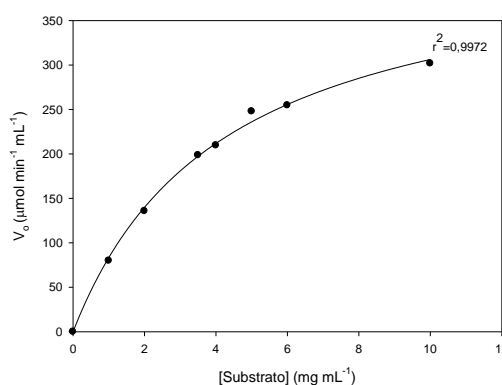
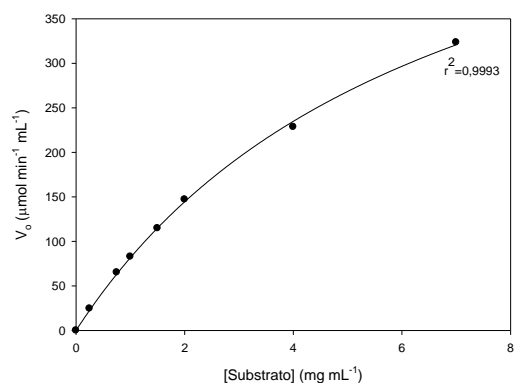


Figura 28. Efeito da concentração do substrato xilana *beechwood* na velocidade inicial (V_0) da reação catalisada pelas xilanases AN1818.2 (a) e AN3613.2 (b).

a.



b.

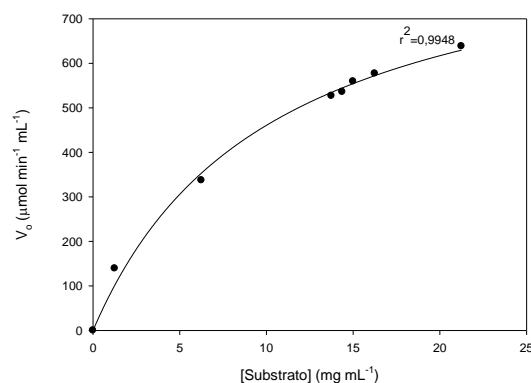


Figura 29. Efeito da concentração do substrato arabinoxilana de trigo na velocidade inicial (V_0) da reação catalisada pelas xilanases AN1818.2 (a) e AN3613.2 (b).

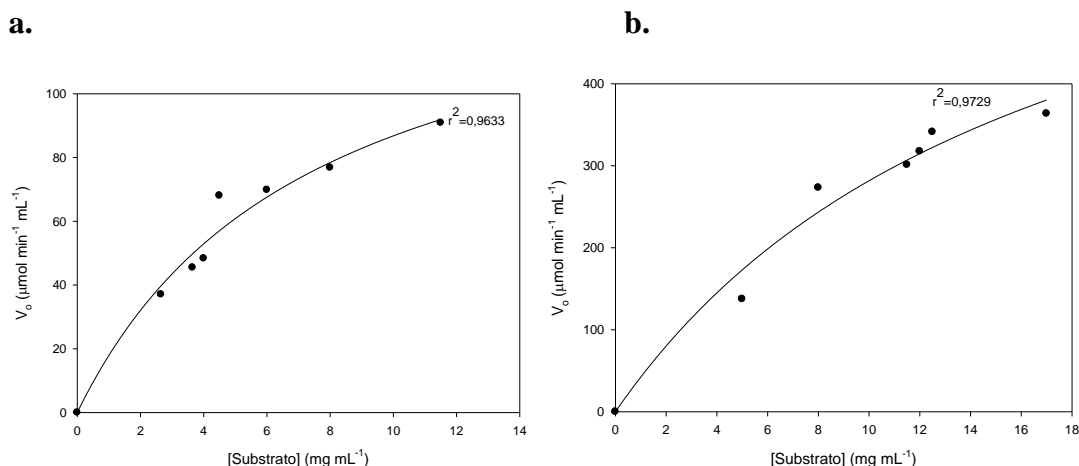


Figura 30. Efeito da concentração do substrato xilana de *spelts* de aveia na velocidade inicial (V_o) da reação catalisada pelas xilanases AN1818.2 (a) e AN3613.2 (b).

As curvas para os substratos arabinoxilana de trigo e xilana *spelts* de aveia apresentaram pontos distoantes da função hipérbole. Provavelmente, isso ocorreu porque as duas xilanas mencionadas apresentam baixa solubilidade em água. Logo, não foi possível preparar soluções com concentrações exatas, as concentrações foram aproximadas devido à perda de sólidos. Arabinoxilana e xilana *spelts* de aveia normalmente não são utilizadas na determinação de parâmetros cinéticos devido a esse fato. Arabinoxilana de trigo ainda apresenta outro aspecto que desfavorece sua utilização para esse fim: precipita facilmente em solução. Apesar desses fatores, Fernández-espinar *et al.* (1994 e 1996) determinou a contante de Michaelis (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) de conversão das xilanases X_{34} e X_{24} para os substratos arabinoxilana de trigo e xilana *spelts* de aveia. Logo, esse trabalho utilizou tais substratos, apesar das limitações citadas, a fim de comparar os valores com dados da literatura e a fim de confirmar os dados obtidos de especificidade do substrato, podendo, desse modo, relacionar a estrutura das xilanases GH10 e GH11 com as funções desempenhadas pelas mesmas.

Os valores calculados de K_m , V_{max} , k_{cat} e k_{cat}/K_m para as xilanases AN1818.2 (Tabela 20) e AN3613.2 (Tabela 21) são mostrados abaixo.

Tabela 20. Constante de Michaelis Menten (K_m), velocidade máxima de reação (V_{max}), constante catalítica (k_{cat}) e eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) da xilanase AN1818.2 de *Aspergillus nidulans* expressa em *P. pastoris* utilizando diferentes tipos de xilana.

Substrato	K_m (mg mL ⁻¹)	V_{max} (μ mol min ⁻¹ mL ⁻¹)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mL mg ⁻¹ min ⁻¹)
Xilana <i>beechwood</i>	1,66	193,27	$9,76 \cdot 10^{-12}$	$5,88 \cdot 10^{-12}$
Arabinoxilana de trigo	6,67	626,55	$3,16 \cdot 10^{-11}$	$4,74 \cdot 10^{-12}$
Xilana de <i>spelts</i> de aveia	7,45	151,5	$7,65 \cdot 10^{-12}$	$1,03 \cdot 10^{-12}$

Os valores de K_m obtidos para a xilanase AN1818.2 com diferentes substratos foram semelhantes. Fernández-Espinar *et al.* (1994) obtiveram valores de K_m de 1,78; 1,50 e 4,15 mg mL⁻¹, respectivamente, para xilana *birchwood*, arabinoxilana e xilana de *spelts* de aveia. A xilana *birchwood* e a xilana *beechwood* são provenientes de madeira dura e ambas apresentam uma estrutura semelhante, sendo produzidas pela empresa Sigma[®]. Esses resultados estão de acordo com a característica das xilanases da família GH10 de hidrolisarem substratos amplamente diferentes. A enzima AN1818.2 apresentou valores próximos de eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) para os três substratos utilizados. A constante catalítica (k_{cat}) foi maior para o substrato arabinoxilana de trigo.

Tabela 21. Constante de Michaelis Menten (K_m), velocidade máxima de reação (V_{max}), constante catalítica (k_{cat}) e eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) da xilanase AN3613.2 de *Aspergillus nidulans* expressa em *P. pastoris* utilizando diferentes tipos de xilana.

Substrato	K_m (mg mL ⁻¹)	V_{max} (μ mol min ⁻¹ mL ⁻¹)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mL mg ⁻¹ min ⁻¹)
Xilana <i>beechwood</i>	4,23	435,82	$2,79 \cdot 10^{-11}$	$6,6 \cdot 10^{-12}$
Arabinoxilana de trigo	10,27	934,03	$1,82 \cdot 10^{-10}$	$1,77 \cdot 10^{-11}$
Xilana de <i>spelts</i> de aveia	16,95	759,31	$9,76 \cdot 10^{-11}$	$5,76 \cdot 10^{-12}$

Os valores de K_m obtidos para a xilanase AN3613.2 com diferentes substratos foram semelhantes. Fernández-Espinar *et al.* (1994) obtiveram valores de K_m 4,37; 12,14; e 12,43 mg mL⁻¹, respectivamente, para xilana *birchwood*, arabinoxilana e xilana de *spelts* de aveia. A enzima AN1818.2 apresentou valores maiores de constante catalítica (k_{cat}) e de eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) para o substrato arabinoxilana de trigo.

5.11. Análise da Composição dos Produtos de Hidrólise da Xilana *Beechwood*

As xilanases apresentam a capacidade de hidrólise de ligações β -(1,4) do polímero de xilana. Devido a essa habilidade, a composição dos produtos de hidrólise da xilana *beechwood* 1% (p/v) foi analisada por cromatografia em camada delgada (TLC). A Figura 31 elucida os resultados obtidos após a revelação da placa.

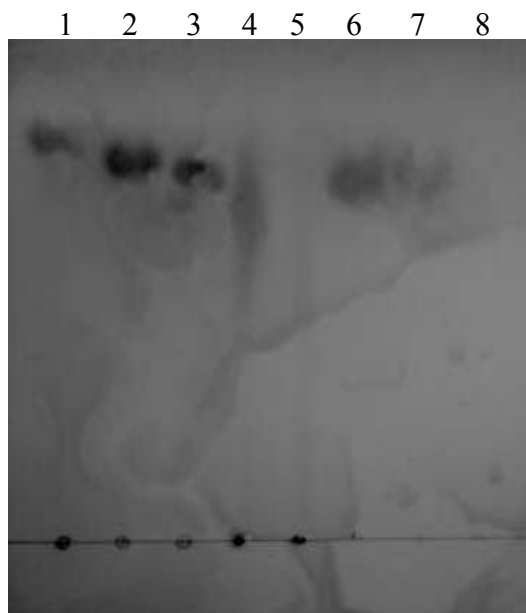


Figura 31. Análise em TLC dos produtos de hidrólise da xilana *beechwood* 1% (p/v) a 50 °C e após 20 horas de reação. **1, 2 e 3.** Padrões xilose, xilotriose e xilotetraose, respectivamente. **4.** Accellerase 1500®. **5.** Multifect CL®. **6.** AN1818.2. **7.** AN3613.2. **8.** Controle negativo.

A análise da TLC revela que o principal produto de hidrólise da xilana *beechwood* pelas xilanases AN1818.2 (6) e AN3613.2 (7) é a xilotetraose; xilotriose aparece em menor concentração. A hidrólise da xilana pelos coquetéis Accellerase 1500® (4) e Multifect CL® (5) liberou xilotriose, xilotetraose e oligossacarídeos com grau de polimerização maior que quatro, como pode ser observado pelo rastro. A ausência de padrões com grau de polimerização maior que a xilotetraose e de padrões substituídos impediu a identificação de alguns produtos de hidrólise da xilana pelos coquetéis Accellerase 1500® e Multifect CL®. O controle negativo (8) não foi hidrolisado, já que não possuía nenhum tipo de xilanase.

A ocorrência de oligossacarídeos, como xilotriose e xilotetraose, como produto final da hidrólise da xilana *beechwood* e a ausência de xilose indica uma hidrólise do tipo endo, ou seja, das ligações internas da cadeia principal da xilana. Esse fato

corroborar com a classificação das enzimas AN1818.2 e AN3613.2 como endo- β (1,4)-xilanasas e a aplicação destas como prebióticos na indústria alimentícia.

Wu *et al.* (2013) também analisou os produtos de hidrólise da xilana *beechwood* por meio de TLC e relatou a presença de xilobiose, xilotriose, xilotetraose e xilose, ressaltando a importância da produção de xilooligossacarídeos para a indústria de alimentos. O mesmo autor observou que diferentes proporções de enzima:substrato resultam em diferentes padrões de hidrólise.

Decelle (2006) relatou a hidrólise da xilana *beechwood* por endoxilanasas das famílias GH10 e GH11. A xilanase da família GH10 teve como produtos de hidrólise xilobiose, xilotriose, xilotetraose e xilopentaose. Ao final da reação, os produtos mais abundantes foram xilobiose e xilotetraose. Já a xilanase da família GH11 liberou os produtos xilobiose, xilotriose, xilopentaose e outros oligossacarídeos com grau de polimerização maior que 5. Após o término da reação, os principais produtos foram xilobiose e xilopentaose. Os produtos de hidrólise das endoxilanasas do estudo de Decelle assemelham-se aos produtos das endoxilanasas AN1818.2 e AN3613.2, visto que não há liberação de xilose e há a liberação de oligossacarídeos.

A xilanase GH10 de *Aspergillus niger* E-1 XynVII hidrolisou a xilana *beechwood* 1,7% liberando, inicialmente, oligossacarídeos com grau de polimerização maior que 5. Com o tempo de reação, foram detectados oligossacarídeos menores com grau de polimerização entre 1 e 6. Os produtos finais convergiram para xilose, xilobiose e X α (entre xilopentaose e xilohexaose) (Takahashi *et al.*, 2013). Esses resultados de padrão de hidrólise diferem daqueles obtidos para a xilanase GH10 AN1818.2.

Os resultados obtidos por TLC não foram suficientemente conclusivos devido à limitação do uso de poucos padrões e devido ao fato de a análise ser visual, sendo difícil a separação dos *spots*, que parecem misturar-se. Para uma análise mais acurada e resultados mais consistentes sobre o mecanismo de ação das xilanasas AN1818.2 e AN3613.2, seria necessária a avaliação de diferentes tempos de hidrólise e uma detecção e quantificação de xilose e de xilooligossacarídeos em HPLC.

6. CONCLUSÕES

- As xilanases AN1818.2 e AN3613.2 foram eficientemente expressas em *Pichia pastoris* X-33, porém, houve proteólise parcial das proteínas.
- A purificação das xilanases pelas etapas de cromatografia de afinidade em coluna de níquel seguida de gel filtração foi mais eficiente que a purificação manual através da cromatografia de afinidade em *batch*.
- As técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS) sugeriu que a proteína AN1818.2 deve apresentar a forma monomérica e que a proteína AN3613.2 deve ser encontrada como um dímero ou um trímero em solução.
- A temperatura ótima de atividade para a xilanase AN1818.2 foi 60 °C, já para a xilanase AN3613.2 foi 50 °C. Ambas as xilanases mostraram-se estáveis quando pré-incubadas a 50° C e pouco estáveis quando pré-incubadas a 60 °C.
- A xilanase AN1818.2 apresentou um pH ótimo de 7,5, enquanto a xilanase AN3613.2 apresentou um pH ótimo de 6,0. Ambas as xilanases foram altamente estáveis quando pré-incubadas durante uma hora em tampões na faixa de pH de 2,5 a 13 e retornadas ao pH 5,0, sendo capazes de retomar pelo menos 70% da atividade inicial.
- As enzimas AN1818.2 e AN3613.2 foram fortemente inibidas por HgCl₂, SDS, CuSO₄ nas concentrações de 2 e de 10 mM e pelo produto xilotriose na concentração de 1 mg/mL.
- A xilanase AN1818.2 hidrolisou melhor o substrato arabinoxilana de trigo, uma xilana altamente ramificada; o que caracteriza o amplo mecanismo de ação das xilanases da família GH10. Já a xilanase AN3613.2 hidrolisou melhor o substrato xilana *beechwood*, uma xilana pouco ramificada; o que caracteriza a alta especificidade de xilanases da família GH11.
- O valor de K_m utilizando a xilana *beechwood* como substrato foi de 1,66 e 4,23 mg/mL, respectivamente, para as xilanases AN1818.2 e AN3613.2.

- A hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com o coquetel Multifect CL Genencor[®] foi mais eficiente quando suplementada com a endo-(β -1,4)-xilanase AN1818.2 (família GH10) em combinação com a endo-(β -1,4)-xilanase AN3613.2 (família GH11). Já a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com o coquetel Accellerase 1500 Genencor[®] foi mais eficiente quando suplementada apenas com a xilanase AN3613.2.
- Um elevado efeito aditivo entre as atividades das endo-(β -1,4)-xilanases AN1818.2 e AN3613.2 com as atividades das xilanases presentes nos coquetéis enzimáticos comerciais Multifect CL Genencor[®] e Accellerase 1500 Genencor[®] foi observado.
- A hidrólise de xilana *beechwood* 1% a 50 °C pelas enzimas AN1818.2 e AN3613.2 liberou como produtos principais xilotetraose e xilotriose após 20 horas de reação.

7.PERSPECTIVAS

- Teste do uso de inibidores de proteases durante a indução da expressão das xilanases AN1818.2 e AN3613.2.
- Início de experimentos de cristalização das proteínas AN1818.2 e AN3613.2.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Advanced Ethanol Council (AEC). **Cellulosic Biofuel Industry Progress Report 2012-2013**. EUA. 2013. Disponível em: <http://www.uagro.com.br/editorias/agroenergia/energia-eletrica/2012/09/07/aluz-da-palha-da-cana.htm>. Acessado em 10 de dezembro de 2014.

Alvira, P. *et al.* Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

Araujo, G.J.F., Navarro, L.F.S., Santos, B.A.S. O etanol de segunda geração e sua importância estratégica ante o cenário energético internacional contemporâneo. **IX Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, p. 1-11, 2013.

Aro, N.; Pakula, T.; Penttilä, M. A regulação da transcrição de degradação da Parede celular de plantas por fungos filamentosos. **FEMS Microbiology**, v. 29, p. 719-739, 2005.

Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270, 1992.

Barratt, R.W., Johnson, G.B, Ogata, W.N. Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 52, p. 233-246, 1965.

Bastos, V. D. Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias. **BNDES Setorial**, n. 25, p. 5-38, 2007.

Bauer, S., Vasu, P., Mort, A.J., Somerville, C.R. Cloning, Expression and characterization of an oligoxyloglucan reducing end-specific xyloglucanobiohydrolase from *Aspergillus nidulans*. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2590–2597, 2005.

Bauer, S., Vasu, P., Persson, S., Mort, A.J., Somerville, C. R. Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analysing plant cell walls. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 11417-11422, 2006.

Beaugrand, J., Crônier, D., Thiebeau, P., Schreiber, L., Debeire, P., Chabbert, B. Structure, chemical, composition, and xylanase degradation of external layers isolated from developing wheat grain. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 52, p. 7108-7117, 2004.

Berrin, J.G., Ajandouz, E.H., Georis, J., Arnaut, F., Juge, N. Substrate and product hydrolysis specificity in family 11 glycoside hydrolases: an analysis of *Penicillium funiculosum* and *Penicillium griseofulvum* xylanases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 1001-1010, 2007.

Bettiga, M., Bengtsson, O., Hahn-Hagerdal, B., Gorwa-Grauslund, MF. Arabinose and xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a fungal pentose utilization pathway. **Microbial Cell Factories**, v. 8, p. 40, 2009.

- Bhardwaj, A., Mahanta, P., Ramakumar, S., Ghosh, A., Leelavathi, S., Reddy, V.S. Emerging role of N- and C-terminal interactions in stabilizing (β/α)₈ fold with special emphasis on family 10 xylanases. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, p. 1-10, 2012.
- Biely, P., Vrřanská, M., Tenkanen, M., Kluepfel, D. Endo- β -1,4-xylanases families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, p 151-166, 1997.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.
- Bobrowicz P, Davidson RC, Li H, *et al.* Engineering of an artificial glycosylation pathway blocked in core oligosaccharide assembly in the yeast *Pichia pastoris*: production of complex humanized glycoproteins with terminal galactose. **Glycobiology**, v. 14, p. 757-766 , 2004.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. Lignin biosynthesis. **Plant Biology**, v. 4, p. 519-546, 2003.
- Bos, I.G.A, de Bruin, E.C., Karuntu, Y.A, *et al.* Recombinant human C1-inhibitor produced in *Pichia pastoris* has the same inhibitory capacity as plasma C1-inhibitor. **Biochimica et Biophysica Acta** , v. 36, p. 1-9, 2003.
- Boue, O., Farnos, O., Gonzalez, A., *et al.* Production and biochemical characterization of the recombinant *Boophilus microplus* BM95 antigen from *Pichia pastoris*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 32, p. 119–128, 2004.
- Boysen, S., Fogh-Schultz, B., Andersen, I., *et al.* Recombinant human serum amyloid P component from *Pichia pastoris*: production and characterisation. **Protein Expression and Purification**, v. 35, p. 284–292, 2004.
- Brat, D., Boles, E., Wiedemann, B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 2304-2311, 2009.
- Bretthauer, R.K., Castellino, F.J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 30, p. 193-200, 1999.
- Brierley, R.A., Davis, R.G., Holtz, C.G. Production of insulin-like growth factor-I in methylotrophic yeast cells. **US Patent No. 5,324,639**, 1994.
- Brocca, S., Schmidt-Dannert, C., Lotti, M., Alberghina, L., Schmid, R.D. Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa lip1* gene coding for a major industrial lipase. **Protein Science**, v.7, p. 1415-1422, 1998.
- Brunel, L., Neugnot, V., Landucci, L., *et al.* High-level expression of *Candida parasilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 111, p. 41-50, 2004.

- Butt, M.S., Tahir-Nadeem, M., Ahmad, Z., Sultan, M.T. Xylanases and their applications in baking industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, p. 22-31, 2008.
- Callewaert, N., Laroy, W., Cadirgi, H., *et al.* Use of HDEL-tagged *Trichoderma reesei* mannosyl oligosaccharide 1,2- α -Dmannosidase for *N*-glycan engineering in *Pichia pastoris*. **FEBS Letters**, v. 503, p. 173-178, 2001.
- Cantarel, B.L, Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 233-238, 2009.
- Çelik, E., Çalik, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1108-1118, 2012.
- Cereghino, G.P.L., Cereghino, J.L., Sunga, A.J., *et al.* New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 263, p. 159-169, 2001.
- Cereghino, J.L., Cregg, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.
- Charnock, S.J., Lakey, J.H., Virden, R., Hughes, N., Sinnott, M.L., Hazlewood, G.P., Pickersgill, R., Gilbert, H.J. Key residues in subsite F play a critical role in the activity of *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa* xylanase A against xylooligosaccharides but not against highly polymeric substrates such as xylan. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 2942-2951, 1997.
- Chen, F., Dixon, R.A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. **Natural Biotechnology**, v. 25, p. 759-761, 2007.
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G. Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005.
- Courtin, C.M., Delcour, J.A. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour breadmaking. **Journal of Cereal Science**, v. 35, p. 225-243, 2002.
- De Bari, I. *et al.* Hydrolysis of concentrated suspensions of steam pretreated *Arundo donax*. **Applied Energy**, v. 102, p. 179-189, 2013.
- Decelle, B. Cloning, functional expression and characterization of three *Phanerochaete chrysosporium* endo-1,4-xylanases. **Dissertação de mestrado**. Concordia University, Montreal, Canada, 2006.
- Debyser, W., Derdelinckx, G., Delcour, J.A. Arabinoxylan solubilization and inhibition of the barley malt xylanolytic system by wheat during mashing with wheat wholemeal adjunct: evidence for a new class of enzyme inhibitors in wheat. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 55, p. 153-156, 1997.

- Demain, A.L., Vaishnav, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 297-306, 2009.
- Dence, C.W., Lin, S.Y. **Methods in Lignin Chemistry**. New York: Springer Verlag, 1992.
- Donaldson, L.A. Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v. 57, p. 859-873, 2001.
- Dood, D., Cann, I.K. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 1, p. 2-17, 2009.
- Ebringerová, A. and Heinze, T. Xylan and xylan derivatives-biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylan structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communication**, v. 21, p. 542-556, 2000.
- Eisberg N. Harvesting energy. **Chemical Industry**, v. 17, p. 24-25, 2006.
- Empresa de Pesquisas Energéticas. **Estudos EPE: Estudo das Condições Estabelecidas no Tratado de Quioto e Resoluções Internacionais de sua Atualização**, 2009.
- Falkoski, D.L., Guimarães, V.M., De Almeida, M.N., Alfenas, A.C., Colodette, J.L., De Rezende, S.T. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 1586-1603, 2012.
- Fernández-Espinar, M.T., Piñaga, F., de Graaff, J., Visser, J., Ramón, D., Vallés, S. Construction of an *Aspergillus nidulans* multicopy transformant for the *xlnB* gene and its use to purify the minor X₂₄ xylanase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 555-562, 1994.
- Fernández-Espinar, M.T., Piñaga, F., de Graaff, J., Visser, J., Ramón, D., Vallés, S. Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 555-562, 1994.
- Fernández-Espinar, M.T., Ramón, D., Piñaga, F., Vallés, S. Xylanase production by *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 91, p. 91-96, 1992.
- Fórum Econômico Mundial. **Global Energy Architecture Performance Index Report 2015**. Disponível em: http://www3.weforum.org/docs/WEF_GlobalEnergyArchitecture_2015.pdf. Acessado em 21 de janeiro de 2015.
- Galbe, M., Zacchi, G. Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**, p. 697-716, 2010.
- Geddes, C.C., Nieves, I.U., Ingram, L.O. Advances in ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 312-319, 2011.

Georis, J., Giannotta, F., De Buyl, E., Granier, B., Frère, J.M. Purification and properties of the three endo- β -1,4-xylanases produced by *Streptomyces sp.* strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 178-186, 2000.

Gilkes, N.R., Claeysens, M., Aebersold, R., Henrissat, B., Meinke, A., Morrisson, H.D., *et al.* Structural and functional relationships in two families of beta-1,4-glycanases. **European Journal of Biochemistry**, v. 202, p. 367-377, 1991.

Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W.S., Courtin, C.M., Gebruers, K., Delcour, J.A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 12-30, 2005.

Henrissat, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 16, p. 280-309, 1991.

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

Hodge, D.B., Karim, M.N., Schell, D.J., McMillan, J.D. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8940-8948, 2008.

Hong, F., Meinander, N.Q., Jonsson, L.J. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, p. 438-449, 2002.

Huber, G.W., Corma, A. Synergies between bio- and oil refineries for the production of fuels from biomass. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, p. 7184-7187, 2007.

Hu, J., Arantes, V., Pribowo, A., Saddler, J.N. The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a “cellulase mixture” but is highly substrate specific. **Biotechnology fuels**, v.6, p. 112, 2013.

Inan, M., Meagher, M.M. The effect of ethanol and acetate on protein expression in *Pichia pastoris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p. 337-341, 2001a.

Inan, M., Meagher, M.M. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p. 585-589, 2001b.

Inan, M., Chiruvolu, V., Eskridge, K.M., Vlasuk, G.P., Dickerson, K., Brown, S., *et al.* Optimization of temperature–glycerol–pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostomacanthum*) anticoagulant peptide (ACAP-5) production by *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 8-45, 1999.

Invitrogen. **Easy Select Pichia Expression Kit for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZa in *Pichia pastoris***, 2010.

Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A.K, Martinelle, M., Enfors, S.O. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. **Biotechnology**, v. 102, p. 42-53, 2003.

Jahic M. **Process Techniques for Production of Recombinant Proteins with *Pichia pastoris***. PhD Thesis, Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology, S-10 691 Stockholm, Sweden; ISBN 91-7283-522-2, 2003.

Jespersen, H.M., MacGregor, E.A., Sierks, M.R., Svensson, B. Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. **Biochemical Journal**, v. 280, p. 51-55, 1991.

Junpei, Z., Dong, Y., Tang, X., Li, J., Xu, B., Wu, Q., Gao, Y., Pan, L., Huang, Z. Molecular and Biochemical Characterization of a Novel Intracellular Low-Temperature-Active Xylanase. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 501-509, 2012.

Kamm B, Gruber PR, Kamm M. Biorefinery industrial processes and products. **Status and future direction**, vols. 1 and 2. Weinheim:Wiley-Verlay GmbH and Co KGaA; 2006.

Kataoka, M., Akita, F., Maeno, Y., Inoue, H., Ishikawa, K. Crystal structure of *Talaromyces cellulolyticus* (formely known as *Acremonium cellulolyticus*) GH family 11 xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, p. 1599-1612, 2014.

Kimura, T., Suzuki, H., Furuhashi, H., Aburatani, T., Morimoto, K., Karita, S., *et al.* Molecular cloning, overexpression, and purification of a major xylanase from *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 2734-2738, 2000.

Kim, Y. *et al.* Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 408–415, 2011.

Koppram, R., S-Pejo, E.T., Xiros, C., Olsson, L. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 32, p. 46-53, 2014.

Kurjan J, Herskowitz I. Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha): a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor. **Cell**, v. 30, p. 933-943, 1982.

Kurtzman, C.P. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1435-1438, 2009.

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

Lafond, M., Tauzin, A., Desseaux, V., Bonnin, E., Ajandouz, E-H., Giardina, T. GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production. **Microbial Cell Factories**, v. 20, p. 1-8, 2011.

Lau, M.W. and Dale, B.E. Cellulosic ethanol production from AFEX-treated corn stover using *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH- ST). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 1368-1373, 2009.

Laursen, W. Students take a green initiative. **Chemical Engineering**, p. 32-34, 2006.

Levasseur, A., Asther, M., Record, E. Overproduction and characterization of xylanase B from *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 177-183, 2005.

Li, K., Azadi, P., Collins, R., Toland, J., Kim, J.S., Eriksson, K-E.L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 89-94, 2000.

Li, L., Zhou, Y., Cheng, X., Sun, J., Marita, J., Chiang, V. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 4939-4944, 2003.

Liu, L., Sun, X., Yan, P., Wang, L., Chen, H. Non-Structured Amino-Acid Impact on GH11 Differs from GH10 Xylanase. **Plos One**, v. 7, p. 1-6, 2012.

Li, Z., Xue, X., Zhao, H., Yang, P., Luo, H., Zhao, J., Huang, H., Yao, B. A C-Terminal Proline-Rich Sequence Simultaneously z-Broadens the Optimal Temperature and pH Ranges and Improves the Catalytic Efficiency of Glycosyl Hydrolase Family 10 Ruminant Xylanases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 3426-3432, 2014.

Lo Leggio, L., Kalogiannis, S., Bhat, M.K., Pickersgill, R.W. High resolution structure and sequence of *T. aurantiacus* xylanase I: implications for the evolution of thermostability in family 10 xylanases and enzymes with (beta)alpha-barrel architecture. **Proteins**, v. 36, p. 295-306, 1999.

Luttig, M., Pretorius, I.S., vanZyl, W.H. Cloning of two beta-xylanase-encoding genes from *Aspergillus niger* and their expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 411-445, 1997.

Lu, Y.F. *et al.* Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 360-369, 2010.

Lynd, L.R., Weimer, P.L., Van, Z.Y.L., W.H., Pretorius, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B., Harvey, L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p. 249-270, 2005.

Mccluskey, K. The Fungal Genetics Stock Center: from molds to molecules. **Advances in Applied Microbiology**, v. 52, p. 245-262, 2003.

Maki, M., Leung, K.T., Qin, W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 500-516, 2009.

Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

Mycota, 2007. Disponível em <http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/espece.php?idE=93#ancre13>. Acessado em 22 de novembro de 2014.

Naik, S.N., Goud, V.V., Rout, P.K., Dalai, A.K. Production of first and second generation biofuels : a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 578-597, 2010.

Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Aono, R., Horikoshi, K. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus sp.* strain-41M-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2311-2316, 1993.

Nastari, P.M. A importância do setor sucroenergético no Brasil. **Agroanalysis**, março de 2012.

Nunes, R.M., Guarda, E.A., Serra, J.C.V., Martins, A.A. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, v. 14, p. 113-238, 2013.

Ogeda, T. L., Petri, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, p. 1549-1558, 2010.

Olfa, E., Mondher, M., Issam, S., Ferid, L., Nejib, M.M. Induction, properties and application of xylanase activity from *Sclerotinia sclerotiorum* S2 fungus. **Journal of Food Biochemistry**, v. 31, p. 96-107, 2007.

Olsson, L. *et al.* Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129, p. 117-129, 2006.

Padilla-Hurtado, B., Flórez-Ramos, C., Aguilera-Gálvez, C., Medina-Olaya, J., Ramírez-Sanjuan, A., Rubio-Gómez, J., Acuña-Zornosa, R. Cloning and expression of an endo-1,4-b-xylanase from the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. **BMC Research Notes**, v. 23, p. 1-9, 2012.

Pães, Gabriel., Berrin, J.G., Beaugrand, J. GH11 xylanases: Structure /function /properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 564-592, 2012.

Payan, F., Leone, P., Porciero, S., Furniss, C., Tahir, T., Williamson, G., Durand, A., Manzanares, P., Gilbert, H.J., Juge, N., Roussel, A. The Dual Nature of the wheat Xylanase Protein Inhibitor XIP-I: Structural Basis for the Inhibition of Family 10 and Family 11 Xylanases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 36029-36037, 2004.

Pérez-Gonzalez, J.A., de Graaf, L.H., Visser, J., Ramon, D. Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2179-2182, 1996

Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S. Xilanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.

Qing, Q. *et al.* Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9624-9630, 2010.

Runquist, D., Fonseca, C., Radstrom, P., Spencer-Martins, I., Hahn- Hagerdal, B. Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 123-130, 2009.

Sandgren, M., Sahlberg, J., Mitchinson, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 89, p. 246-291, 2005.

Santos, J. R. A.; Gouveia, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana de açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 11, p. 27-33, 2009.

Schmidt, A., Gubtiz, G.M., Krakty, C. Xylan binding subsite mapping in the xylanase from *Penicillium simplicissimum* using xylooligosaccharides as cryo-protectant. **Biochemistry**, v. 38, p. 2403-2412, 1999.

Sene, E., Moreira, J.C. **Geografia Geral e do Brasil: Espaço Geográfico e Globalização**. 4.Ed. São Paulo. Editora Scipione, 2010.

Shallom, D., Shoham, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 219-228, 2003.

Shelley M. **Alcoholic fuels**. Boca Raton, FL 33487-2742, USA: CRC Taylor and Francis Group; 2006.

Sibirny, A.A., Ubiyovk, V.M., Gonchar, M.V., Titorenko, V.I., Voronovsky, A.Y., Kapultsevich, Y.G.,*et al.* Reaction of direct formaldehyde oxidation to CO₂ are not essential for energy supply of yeast methylotropic growth. **Archives in Microbiology**, v. 154, p. 566-575, 1990.

Sidhu, G., Withers, S.G., Nguyen, N.T., McIntosh, L.P., Ziser, L., Brayer, G.D. Sugar ring distortion in the glycosyl-enzyme intermediate of a family GH11 xylanase. **Biochemistry**, v. 38, p. 5346-5354, 1999.

Silva, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

Silva, O. G. **Produção de etanol com a utilização do bagaço de cana de açúcar**. 2010. 45 f. Dissertação (Graduação em Tecnologia de Biocombustíveis) – Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba-SP, 2010.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.

Some, D., Kenrick, S. Characterization of Protein-Protein Interactions via Static and Dynamic Light Scattering, Protein Interactions, Dr. Jianfeng Cai (Ed.), ISBN: 978-953-51-0244-1, **InTech**, (2012). Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/protein-interactions/characterization-of-protein-proteininteractions-via-static-and-dynamic-light-scattering>. Acessado em 6 de janeiro de 2015.

Souza, V.F. **Análise da cadeia produtiva do etanol e do biodiesel**. Monografia apresentada na Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Formas Alternativas de Energia, 2011.

Subramaniyan, S., Prema, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 33-64, 2002.

Sulzenbacher, G., Mackenzie, L.F., Wilson, K.S., Withers, S., Dupont, C., Davies, G.J. The crystal structure of a 2-fluorocellotriosyl complex of the *Streptomyces lividans* endoglucanase CelB2 at 1.1 Å resolution. **Biochemistry**, v. 33, p. 4826-4833, 1999.

Takahashi, Y., Kawabata, H., Murkami, S. Analysis of functional xylanases in xylan degradation by *Aspergillus niger* E-1 and characterization of the GH family 10 xylanase XynVII. **Springer Plus**, v. 2, p. 447-458, 2013.

Tanaka, H., Nakamura, T., Hayashi, S., Ohta, K. Purification and properties of an extracellular endo-1,4-β-xylanase from *Penicillium citrinum* and characterization of the encoding gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 623-630, 2005.

Teixeira, L.P.B; Carneiro, R.A.F. Bioetanol: novos rumos e os desafios de sua regulação. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, n. 1, p. 59-72, 2013.

Törrönen, A., Mach, R.L., Messner, R., Gonzalez, R., Kalkkinen, N., Harkki, A., *et al.* The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: characterization of both enzymes and genes. **Biotechnology**, v. 10, p. 1461-1465, 1992.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

Turunen, O., Etuaho, K., Fenel, F., Vehmaanperä, J., Wu, X., Rouvinen, J., *et al.* A combination of weakly stabilizing mutations with a disulfide bridge in the α -helix region of *Trichoderma reesei* endo-1,4- β -xylanase II increases the thermal stability through synergism. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 37-46, 2001.

Vandeplas, S., Dauphin, R.D., Thonart, P., Thewis, A., Beckers, Y. Effect of the bacterial or fungal origin of exogenous xylanases supplemented to a wheat-based diet on performance of broiler chickens and nutrient digestibility of the diet. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 90, p. 221-228, 2010.

Van Der Borcht, A., Goesaert, H., Veraverbeke, W.S., Delcour, J.A. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. **Journal of Cereal Science**, v. 41, p. 221-237, 2005.

Varga, E. Szengyel, Z., Réczey, K. Chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. **Applied Biochemistry and Biotechnology- Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 98, p. 73-87, 2002.

Verjans, P., Dornez, E., Delcour, J.A., Courtin, C.M. Selectivity for water-unextractable arabinoxylan and inhibition sensitivity govern the strong bread improving potential of an acidophilic GH11 *Aureobasidium pullulans* xylanase. **Food Chemistry**, v. 123, p. 331-337, 2010.

Vieira, C. Usina em Alagoas começa a produzir o etanol de segunda geração. **Globo Rural**. Disponível em: <http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2014/12/usina-em-alagoas-comeca-produzir-o-etanol-de-segunda-geracao.html>. Acessado em 12 de dezembro de 2014.

Wagner, G.H., Wolf, D.C. Carbon transformations and soil organic matter formation. In: Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G., Zuberer, D.A. **Principles and Applications of Soil Microbiology**. New Jersey: Prentice Hall, p. 218-256, 1999.

Wakiyama, M., Yoshihara, K., Hayashi, S., Ohta, K. An extracellular endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus japonicus*: purification, properties, and characterization of the encoding gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, p. 227-229, 2010.

Wang, L., Yan, W., Chen, J., Huang, F., Gao, P. Function of the iron-binding helator produced by *Coriolus versicolor* in lignin biodegradation. **Science China Life Sciences**, v. 51, p. 214-221, 2008.

Wu, Q., Li, Y., Li, Y., Gao, S., Wang, M., Zhang, T., Chen, J. Identification of a novel fungus, *leptosphaerulina chartarum* SJTU59 and characterization of its xylanolytic enzymes. **Plos One**, v. 8, p. 1-14, 2013.

Yang, B., Wyman, C.E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, p. 88-95, 2004.

Xin, M., Shao, Z., Hong, Y. Lin, L., Li, C., Liu, Z. A Novel pH-Stable, Bifunctional Xylanase Isolated from a Deep-Sea Microorganism, *Demequina sp.* JK4. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 1077-1084, 2009.

Zhang, L., Zhao, H., Gan, M., Jin, Y.L., Gao, X., Chen, Q., Wang, Z.Y. Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4573-4579, 2011.

Zhang, W., Bevins, M.A., Plantz, B.A., Smith, L.A., Meagher, M.M. Modelling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. **Biotechnololy and Bioengineering**, v. 70, p. 1-8, 2000.

Zheng, H-C., Sun, M-Z., Meng, L-C., Pei, H-S., Zhang, X-Q., Yan, Z., Zeng, W-H., Zhang, J-S., Hu, J-R., Lu, F-P., Sun, J-S. Purification and Characterization of a Thermostable Xylanase from *Paenibacillus sp.* NF1 and its Application in Xylooligosaccharides Production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 489-496, 2014.

Zverlov, V.V., Schantz, N., Schmitt-Kopplin, P., Schwarz, W.H. Two new major subunits in the cellulosome of *Clostridium thermocellum*: yloglucanase Xgh74A and endoxylanase Xyn10D. **Microbiology**, v. 151, p. 3395-3401, 2005.