Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação Em Biologia

Dissertação de Mestrado

Expressão heteróloga do gene Hxyn2 do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* em *Pichia pastoris*: Produção e purificação da enzima HXYN2r e aplicação em testes de panificação.

Fernando Medeiros Bastos

Goiânia
2008

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação Em Biologia

Expressão heteróloga do gene Hxyn2 do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* em *Pichia pastoris*: Produção e purificação da enzima HXYN2r e aplicação em testes de panificação.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Em Biologia da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Aluno: Fernando Medeiros Bastos
Orientadora: Profa.Dra. Fabrícia Paula de Faria

Goiânia
2008

Trabalho realizado nos Laboratórios de Enzimologia e Biotecnologia de Fungos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás e na Unidade de panificação da Escola SENAI - Vila Canaã.

Orientadora: Profa. Dra. Fabrícia Paula de Faria

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Fabrícia Paula de Faria
Prof. Dr. Manoel Soares Soares Júnior
Prof. Dra. Kátia Flávia Fernandes Silva

"O que eu quero, vou conseguir"

(Raul seixas/ Paulo Coelho)

Dedico este trabalho aos meus pais, Ary e Virgínia, minha irmã Raquel. A meu sogro, João e a minha sogra Luzia. E especialmente a minha querida esposa Juliana.

AGRADECIMENTOS

À minha Família por todo apoio, compreensão e paciência.

À minha orientadora por ter me recebido como aluno de PIBIC e posteriormente me concedido a oportunidade de realizar esse trabalho, pela orientação e por todo apoio e paciência nesses anos.

Ao Professor Cirano, que gentilmente permitiu a utilização do laboratório para o desenvolvimento dos experimentos, concedendo toda liberdade e autonomia necessária para a realização do trabalho. E agradeço também pelas contribuições, correções e considerações realizadas no projeto de Mestrado.

À professora Maria do Livramento pela boa receptividade, pelas discussões e por tornar possível a realização dos testes de panificação disponibilizando a Unidade de panificação da Escola SENAI/Vila Canaã.

Ao Professor Márcio pelas contribuições, correções e considerações realizadas no projeto de Mestrado e durante a realização dos testes de panificação.

À Professora Rosália pelo apoio oferecido no desenvolvimento do trabalho.

Ao Professor André Kipinis por conceder a utilização do laboratório de uso comum do IPSTP para a realização de parte dos trabalhos de produção.

Ao Julimar e Natália pela imensa ajuda nos trabalhos de panificação.

Ao Wagner por todos os ensinamentos em todos esses anos e por sempre ter atendido com boa vontade aos pedidos de ajuda.

Ao Rafael pela colaboração nos trabalhos de bancada.

À Gisele por sempre estar pronta para ajudar no que eu precisasse.

Aos companheiros do Laboratório de Biotecnologia de Fungos, Guilhermar, Lorena, Sulamita, Sid, Wesley e Bruno.

Aos companheiros do laboratório de Enzimologia, Andrei, Valdirene, Vanessa, Regiane, Roberto, Mário, Cibele, Fabiano, Marcelo, Marcelo (DF), Alex, Cristine, Christiany, Sonáide, Fausto e Lucas por proporcionarem um ambiente ideal de trabalho e por toda a ajuda fornecida.

À Gleizlene, secretária da coordenação de pós-graduação, por sempre atender com simpatia e disposição os alunos do programa.

À Dona Dora pela colaboração no laboratório de enzimologia, facilitando o trabalho.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

Lista de figuras i
Lista de Tabelas iii
Lista de abreviaturas iv
Resumo vi
Abstract viii

1.INTRODUÇÃO 1
1.1.Biomassa vegetal 1
1.1.1.Arabinoxilana 2
1.2.Enzimas do Sistema xilanolítico 5
1.2.1. Endoxilanases 7
1.2.1.1. Classificação das endoxilanases 7
1.2.1.2. Estrutura tridimensional das endoxilanases 8
1.2.1.3. Mecanismo de hidrólise 10
1.2.1.4. Propriedades bioquímicas 11
1.3.Aplicações biotecnológicas de xilanases 12
1.3.1.Aplicação de xilanases na panificação 15
1.4. Endoxilanases fúngicas 19
1.4.1. Genes de endoxilanases fúngicas 20
1.4.1.1. Expressão heteróloga de genes de endo-xilanase em *P. pastoris* 21
1.4.1.2. Purificação de xilanases recombinantes expressas em *P. pastoris* 25
1.5. *Humicola grisea var. thermoidea* 28
1.5.1. Sistema Xilanolítico do fungo termofílico *H. grisea* 28
1.5.2. Genes de xilanase do *H. grisea* 30
1.5.3. Expressão heteróloga do gene *Hxyn2* 31
2. OBJETIVOS 34
2.1. Objetivo geral 34
2.2. Objetivos específicos 34
3. MATERIAL E MÉTODOS 35
3.1. Material 35

3.1.1. Linhagem utilizada e cultivo dos transformantes 35

3.1.2. Meios de cultura 35
3.1.3. Soluções estoque 36
3.1.4. Soluções para determinação de atividade enzimática 37
3.1.5. Soluções para a quantificação de proteínas 38
3.1.6. Soluções para eletroforese desnaturante em gel poliacrilamida (SDS-PAGE) 38
3.1.6.1. Soluções para a coloração de proteínas com azul de "Coomassie" 40
3.1.6.2. Soluções para a coloração de proteínas com Nitrato de Prata 41
3.1.7. Soluções e material para o gel de atividade para xilanase (zimograma) 41
3.1.8. Soluções para purificação 42
3.1.9. Soluções utilizadas no tratamento térmico 43
3.1.10. Ingredientes utilizados na formulação da panificação 43
3.1.11. Marcador de massa molecular (MMM) 43
3.1.12. Amostras enzimáticas comerciais 44
3.2. Métodos 44
3.2.1. Produção da enzima HXYN2r em frasco de 250 mL 44
3.2.2. Dosagem da atividade xilanolítica pelo teste de DNS 45
3.2.3. Dosagem protéica 45
3.2.4. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida 46
3.2.4.1. Precipitação de proteínas por TCA 46
3.2.4.2. Concentração das amostras por liofilização 46
3.2.4.3. Corrida eletroforética 46
3.2.4.4. Coloração com nitrato de prata 46
3.2.4.5. Análise da secreção de HXYN2r por densitometria 47
3.2.5.Purificação da proteína HXYN2r 47
3.2.5.1. Concentração da amostra para o fracionamento das proteínas em cromatografia 47
3.2.5.2. Fracionamento das proteínas em cromatografia de peso molecular 48
3.2.5.3. Purificação parcial por tratamento térmico 48
3.2.6. Preparo das amostras para aplicação em testes de panificação 49

3.2.7. Teste de panificação 50
3.2.7.1. Volume específico 51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 52
4.1. Produção da enzima HXYN2r 52
4.2. Purificação da enzima HXYN2r por fracionamento em coluna cromatográfica 56
4.2.1. Concentração da xilanase por liofilização 56
4.2.2. Fracionamento das proteínas do S96 em cromatografia de peso molecular ("Sephacryl S-100™ de alta resolução", Amersham®, 87 x 1,5 cm 56
4.3. Purificação parcial da enzima HXYN2r por tratamento térmico 60
4.4. Aplicação da endo-xilanase HXYN2r na panificação 61
4.4.1. Aplicação da endo-xilanase HXYN2r purificada 61
4.4.2. Aplicação da endo-xilanase HXYN2r parcialmente purificada . 63
4.4.2.1. Teste de panificação nas concentrações de 500-6000 U . 63
4.4.2.2. Comparação da suplementação de HXYN2r e xilanase comercial em panificação 67
5-CONCLUSÕES 71
6-PERSPECTIVAS 72
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Composição da arabino-4-O-metilglucuronoxilana (madeira mole)3

Figura 2. Elementos estruturais da AX 3

Figura 3. Classificação das frações da AX da farinha de trigo de acordo com a sua solubilidade..... 4

Figura 4. Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana. Hidrólise de xilooligossacarídeos pela enzima ß-xilosidase..... 5

Figura 5. Representação das estruturas de algumas enzimas das famílias das glicosil hidrolases..... 9

Figura 6. Mecanismo de hidrólise enzimática..... 11

Figura 7. Representação esquemática do mecanismo de ação das xilanases na panificação 16

Figura 8. Modelo tridimensional da xilanase HXYN2..... 31

Figura 9. Cinética da produção da enzima HXYN2r por fermentação submersa 53

Figura 10. Perfil protéico do sobrenadante de cultura da levedura *P. pastoris* em condições de indução com metanol observado em gel de poliacrilamida... 55

Figura 11. Perfil de cromatografia da coluna Sephacril S-100 57

Figura 12. Gel de poliacrilamida 13% (p/v)..... 58

Figura 13. Efeito da adição de HXYN2r na massa no volume específico dos pães 63

Figura 14. Representação do volume específico do pão de forma em função da adição na massa de HXYN2r parcialmente purificada 66

Figura 15. Perfil protéico das amostras aplicadas nos testes de panificação 67

Figura 16. Efeito da suplementação da massa com o extrato protéico do transformante C4, HXYN2r e xilanase comercial no volume específico dos pães. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Purificação de xilanases de diferentes fungos 26

Tabela 2. Rendimento e colunas usadas na purificação de xilanases expressas em *P. pastoris*. 27

Tabela 3. Etapas de purificação da enzima HXYN2r e os respectivos rendimentos 59

Tabela 4. Valores médios de atividade enzimática, atividade total e rendimentos obtidos na purificação parcial da enzima HYN2r por tratamento térmico... 61

Tabela 5. Determinação do volume específico dos pães com a massa suplementada com HXYN2r purificada.. 62

Tabela 6. Determinação do volume específico dos pães com suplementação da massa com HXYN2r parcialmente purificada..... 64

Tabela 7. Determinação do volume específico dos pães com suplementação da massa com o extrato protéico do transformante C4, HXYN2r e a xilanase comercial..... 68

LISTA DE ABREVIATURAS

AO: álcool oxidase

AX: arabinoxilana

AX-IA: fração da ararbinoxilana insolúvel em água

AX-SA: fração da arabinoxilana solúvel em água

BMM: Meio mínimo tamponado contendo metanol

BMMY: Meio complexo tamponado contendo metanol

BMGY-U: Meio de cultura complexo contendo glicerol e uréia

BMMY-U: Meio de cultura complexo contendo metanol e uréia

BSA: albumina bovina sérica

cDNA: ácido deoxirribonucléico complementar

CMC: carboximetilcelulose

DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico

g: velocidade de sedimentação em unidade gravitacional

Kb: quilobases

kDa: quilodalton

MES: ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico

MGM: Meio de cultura mínimo contendo glicerol

MMM: Marcador de massa molecular

MMY : Meio de cultura complexo contendo metanol

nm: nanômetro

OD: densidade óptica

pb: pares de base

pI: ponto isoelétrico

p/v: peso por volume

q.s.p: quantidade suficiente para

rpm: rotações por minuto

RT-PCR: reação de polimerização em cadeia - transncrição reversa

S96: Sobrenadante de cultura após 96 h de indução

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

TCA: ácido tricloroacético

TEMED: tetrametil-etilenodiamina

Tris: tris (hidroximetil) aminometano

U: unidade de atividade enzimática

V: volts

$V_{o:}$ volume vazio

v/v: volume por volume

YNB: Nitrogênio proveniente de levedura

YPD: Extrato de levedura e glicose

YPTM: Meio de cultura contendo extrato de levedura, peptona e triptona de caldo de soja

RESUMO

As endoxilanases formam o principal grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da xilana. Estas enzimas têm vasta aplicação no setor industrial, como nas indústrias de bebidas, alimentícia, têxtil, de rações e de celulose (biobranqueamento). As xilanases têm sido empregadas na panificação para melhorar o processamento e a qualidade do pão, levando a obtenção de uma massa mais macia, pães com maior volume e com melhor estrutura de miolo. As enzimas xilanolíticas produzidas por fungos constituem um conjunto enzimático com atividades distintas, dificultando a sua utilização direta nos processos industriais. Uma estratégia utilizada atualmente se baseia na obtenção de microrganismos recombinantes que produzam enzimas com atividades específicas e adequadas aos diferentes processos industriais. O fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* tem sido uma boa fonte de enzimas xilanolíticas. O gene *Hxyn*2 deste fungo codifica uma endoxilanase de 23 kDa pertencente a família G/11 das glicosil hidrolases. Para a produção da enzima recombinante HXYN2r, o cDNA correspondente ao gene *Hxyn*2 (cDNA-xyn2) foi clonado no vetor pHILD2 e expresso na levedura *P. pastoris* sob o controle do promotor AOX1. Os transformantes foram selecionados quanto à estabilidade genética e capacidade de produzir e secretar a enzima HXYN2r ativa para o meio de cultura. A enzima HXYN2r purificada apresentou temperatura ótima a 60°C e pH ótimo de 6,5. O presente trabalho teve como objetivo a produção, purificação e aplicação da enzima HXYN2r em testes de panificação. A produção da enzima foi realizada em condições ótimas, obtendo 100 mg de proteína/L de meio BMMY-U (Meio de cultura complexo contendo metanol e uréia), sendo que a quantidade de enzima no meio de cultura representou 40% do total das proteínas secretadas. Para a purificação de HXYN2r, as proteínas do sobrenadante de cultura foram concentradas por liofilização e fracionadas por cromatografia de gel filtração S-100. A enzima purificada apresentou uma atividade específica de 2250 U/mg, com um rendimento de purificação de 6,4%. A proteína de aproximadamente 23 kDa foi confirmada pela presença de uma banda de xilanase no gel de zimograma. A enzima pura foi adicionada à massa para testes de panificação nas concentrações de 45 e 90 U /kg de farinha, nestas concentrações não foi observado alteração no volume específico dos pães e nem na estrutura do miolo. A enzima HXYN2r também foi

parcialmente purificada por tratamento térmico (60 °C por 45 min) e concentrada por liofilização, obtendo um rendimento de 17,9 %. A enzima HXYN2r parcialmente purificada foi testada na panificação nas concentrações de 500, 1500, 3000, 4500 e 6000 U/Kg de farinha. A suplementação da xilanase aumentou o volume específico dos pães, melhorou a estrutura do miolo e não foi observada nenhuma alteração no conteúdo de umidade dos pães em relação ao pão controle. O melhor resultado apresentado foi o aumento de 16,0 % no volume específico dos pães suplementados com 3000 U de HXYN2r por quilo de farinha, resultado semelhante ao obtido com a adição de uma preparação enzimática comercial contendo xilanase nas mesmas concentrações.

Os resultados apresentados sugerem que a xilanase do H. grisea pode ser usada na panificação para a melhoria do volume específico dos pães.

ABSTRACT

Endoxylanases are the main group of enzymes involved in the hydrolysis of xylan. This enzymes have application in industrial proposes, like as drink, food, feed, clothes industries and for bleaching cellulose paper pulps. In bread making the xylanases have been used to improve processing and product quality of loaf, leading soft dough and loaf with larger volume as well as an improved crumb structure. The xylanolitic enzymes produced by filamentous fungi constitute an enzymatic pool with distinct activities which make their use in industrial process more difficult, the obtainment of recombinant microorganisms constitutes a strategy to achieve suitable enzymes to industrial process. The thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* has proved to be a good source of xylanolitic enzymes. The gene *Hxyn*2 from *H. grisea* codes a xylanase with 23 kDa that belongs to G/11 family of glycosil-hydrolases. Its cDNA was cloned in the vector pHILD2 and expressed in yeast *Pichia pastoris* under the control of the promoter AOX1. The transformants were chosen trough genetic stability and capacity to produce and secrete the enzyme HXYN2r into culture medium. The purified HXYN2r showed a high xylanolitic activity with an optimum temperature of 60 ºC and an optimum pH value of 6.5. The aim of this project was the production, purification and application of HXYN2r enzyme in bread making tests. The production in the optimized medium obtained 100 mg of active xylanase per liter of medium BMMY-U. This quantify of enzyme presented 40% of the total proteins in culture supernatants. The proteins of culture supernatants was concentrated by liofylization and fractionated by into a chromatographic column of gel filtration Sephacryl S-100. The purified xylanase presented specific activity of 2250 U/mg and the purification profit was 6.4%. The 23 kDa protein was confirmed by the activity on Zymogram assay. The pure xylanase was added at the rate of 45 and 90 U/Kg of wheat flour in the bread making tests. In this rates it was not observed any effect of xylanase in specific volume either in crumb structure. The HXYN2r enzyme was partially purified by a heat treatment (45 min at 60 °C) and was concentrated by liofylization and a yield of 17.9% was obtained. The partially purified HXYN2r was added at the rates of 500, 1500, 3000, 4500 and 6000 U/kg of wheat flour. The added xylanase improved the specific volume and the crumb structure, but any effect

was observed in the moisture content of the loaf. The best result was the rise of 16.0 % in loaf specific volume with the dose of 3000 U/kg of wheat flour. This effect was similar to the obtained with a commercial xylanase added to the dough in equal dose.

The results presented suggest that the xylanase from H. grisea can be used in bread making to improve specific volume.

1. INTRODUÇÃO

1.1. BIOMASSA VEGETAL

Aproximadamente 150 a 200 bilhões de toneladas de matéria orgânica seca são produzidas anualmente no mundo na forma de vegetação nas florestas, pastagens, oceanos, estuários, lagos, rios, pântanos, entre outros. Esta biomassa vegetal é composta principalmente por materiais lignocelulósicos formados por celulose (40-50%), hemicelulose (15-30%) e lignina (10-30%) (Dekker, 1985).

Estruturalmente, a celulose é um homopolissacarídeo formado por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β-1,4. Em média, uma cadeia de celulose tem grau de polimerização entre 9.000 e 10.000 unidades. Aproximadamente 65% da celulose é altamente orientada, cristalina e não se encontra acessível à água ou aos outros solventes. A celulose restante é composta de cadeias menos orientadas e parcialmente acessível, como resultado de sua associação com hemicelulose. Nenhum dos tipos de celulose encontra-se diretamente ligado à lignina, na parede celular, por ligações químicas do tipo covalente (Rowell, 1992).

A lignina é um polímero tridimensional, de estrutura não uniforme, composta basicamente de unidades fenil propano. A lignina é composta por 9 unidades de carbono, derivadas do álcool cinamil substituído, que são cumaril, coniferil e álcool siringil. As ligninas são altamente ramificadas, não cristalinas, com estrutura e composição química variando de acordo com a fonte. As ligninas encontram-se associadas à hemicelulose e colaboram na resistência à deterioração natural dos lignocelulósicos (Fengel & Wegener, 1989).

A hemicelulose encontra-se em associação com a celulose na parede das células vegetais (Timell, 1967). É formada por heteropolissacarídeos contendo diferentes resíduos de carboidratos (D-xilose, D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose, L-raminose, ácido D-galacturônico e ácido D-glucurônico) (Janes, 1969), sendo normalmente formada por dois a seis açúcares diferentes unidos na maioria por ligações do tipo β-1,4. As hemiceluloses são classificadas, de acordo com a identidade dos principais açúcares presentes, como glucanas, xilanas, mananas, galactanas e galacturanas (Thompson, 1983; Bastawde *et al.*, 1992; Collins *et al*., 2005).

A xilana constitui o principal componente da hemicelulose e é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza após a celulose, contribuindo com aproximadamente um terço de todo carbono orgânico reciclado na terra. A celulose, a hemicelulose e a liginina interagem através de ligações covalentes e não covalentes, sendo a xilana o polissacarídeo encontrado na interface entre a lignina e a celulose, acredita-se que sua importância está na coesão da fibra e na integridade da parede celular das plantas (Collins *et al.*, 2005).

A xilana é um heteropolissacarídeo formado por uma cadeia principal de resíduos de D-xilano piranose unidos por ligações ß-1,4, com ramificações nas posições 2 e 3 de resíduos de α-L-arabinofuranose, ácido glucurônico ou grupamento acetil (Aspinall, 1959; Coughlan & Hazlewood, 1993). Nas angiospermas é encontrada na forma de O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana – madeira dura (15-30%), nas gimnospermas na forma de arabino-4-O-acetilarabinoglucoxilana – madeira mole (7-10%) e nas gramíneas na forma de arabinoxilanas (Collins *et al*., 2005).

1.1.1. Arabinoxilana

As arabinoxilanas (AX) juntamente com as ß-glucanas representam os principais polissacarídeos após o amido dos grãos dos cereais (Egi *et al*., 2004). O conteúdo de AX varia de 2-3% na farinha de trigo, sendo maior que 5% na de trigo integral e 8% na de centeio (Collins *et al*., 2006).

As AX são polissacarídeos formados por uma cadeia principal de resíduos de D-xilanopiranosil unidos por ligações ß-1,4, com ramificações nas posições 2 e 3 dos carbonos de resíduos de α-L-arabinofuranose (Figura 1) (Sunna & Antranikian, 1997). A estrutura da arabinoxilana pode apresentar moléculas de ácido ferúlico unidas por ligações ésteres no carbono cinco dos monômeros de α-L-arabinofuranose (Figura 2) (Courtin & Delcour, 2002).

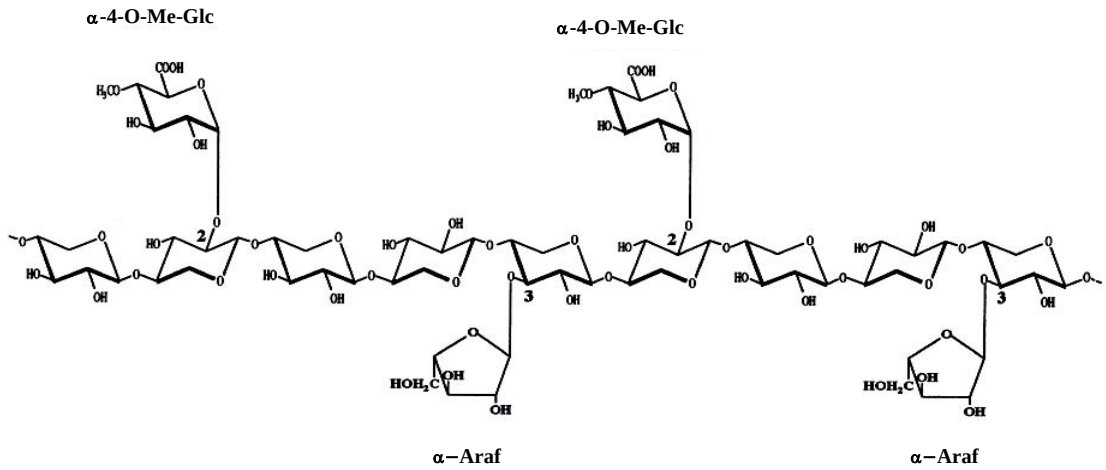


Figura 1: Composição da arabino-4-O-metilglucuronoxilana (madeira mole). α-Araf: α -arabinofuranose; α -4-O-Me-Glc: α -4-O-ácido metil glucurônico Fonte: Sunna & Antranikian, 1997.

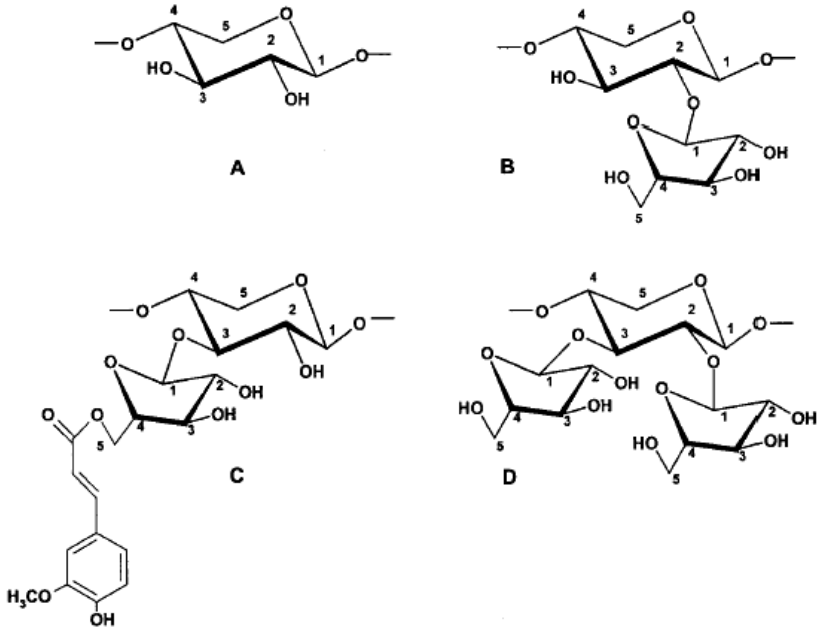


Figura 2: Elementos estruturais da AX: **A** Resíduo não ramificado de D-xilanopiranosil. **B** Resíduo de D-xilanopiranosil com resíduo de L-arabinofuranose ligado na posição 2. **C** Resíduo de D-xilanopiranosil com resíduo de L-arabinofuranose ligado na posição 3 e uma molécula de ácido ferúlico ligado no carbono 5 do resíduo de L-arabinofuranose. **D** Resíduo de D-xilanopiranosil com resíduos de L-arabinofuranose ligados nas posições 2 e 3

Fonte: Courtin & Delcour (2002).

A estrutura da AX apresenta regiões altamente ramificadas alternadas por regiões que não apresentam ramificações (Courtin & Delcour 2002; Egi *et al*., 2004). Na região onde a cadeia não é ramificada, estas se ligam por pontes de hidrogênio e apresenta a tendência de formar agregados, tornando o polímero menos solúvel em água. Já nas regiões que apresentam a cadeia ramificada, os substituintes de arabinofuranose dificultam as ligações inter-moleculares e o polímero apresenta solubilidade em água (Egi *et al*., 2004).

A fração de AX que é solúvel em água (AX-SA) representa 25 a 30 % do total da molécula e se liga fracamente à superfície da parede celular. A fração de AX que não é solúvel em água (AX-IA) está ligada à parede celular das plantas tanto por ligações covalentes como por interações não covalentes com outras moléculas de AX ou com outros constituintes da parede celular. A AX-IA pode ser extraída parcialmente por bases e enzimas formando frações solúveis (Figura 3) (Courtin & Delcour, 2002).

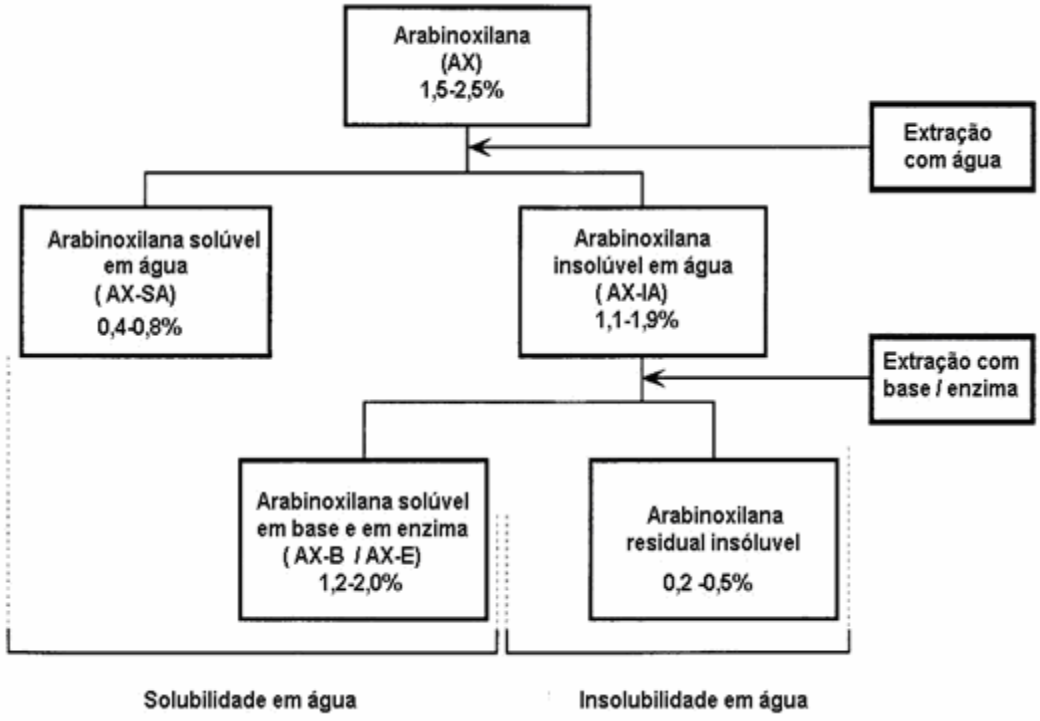


Figura 3: Classificação das frações da AX da farinha de trigo de acordo com a sua solubilidade. A porcentagem apresentada utiliza como referência o peso da farinha de trigo

Fonte:Courtin & Delcour (2002).

1.2. ENZIMAS DO SISTEMA XILANOLÍTICO

Devido à heterogeneidade da xilana, sua hidrólise requer a ação de um complexo sistema enzimático (Figura 4). As enzimas envolvidas na degradação da xilana são: ß-xilosidases, ß-1,4-endoxilanases, α-L-arabinofuranosidases, α-glucuronidases, acetil-xilana esterases, ácido fenólico esterases e p-cumárico esterases. Todas estas enzimas atuam cooperativamente para converter a xilana em unidades de xilose (revisto por Sunna & Antranikian, 1997).

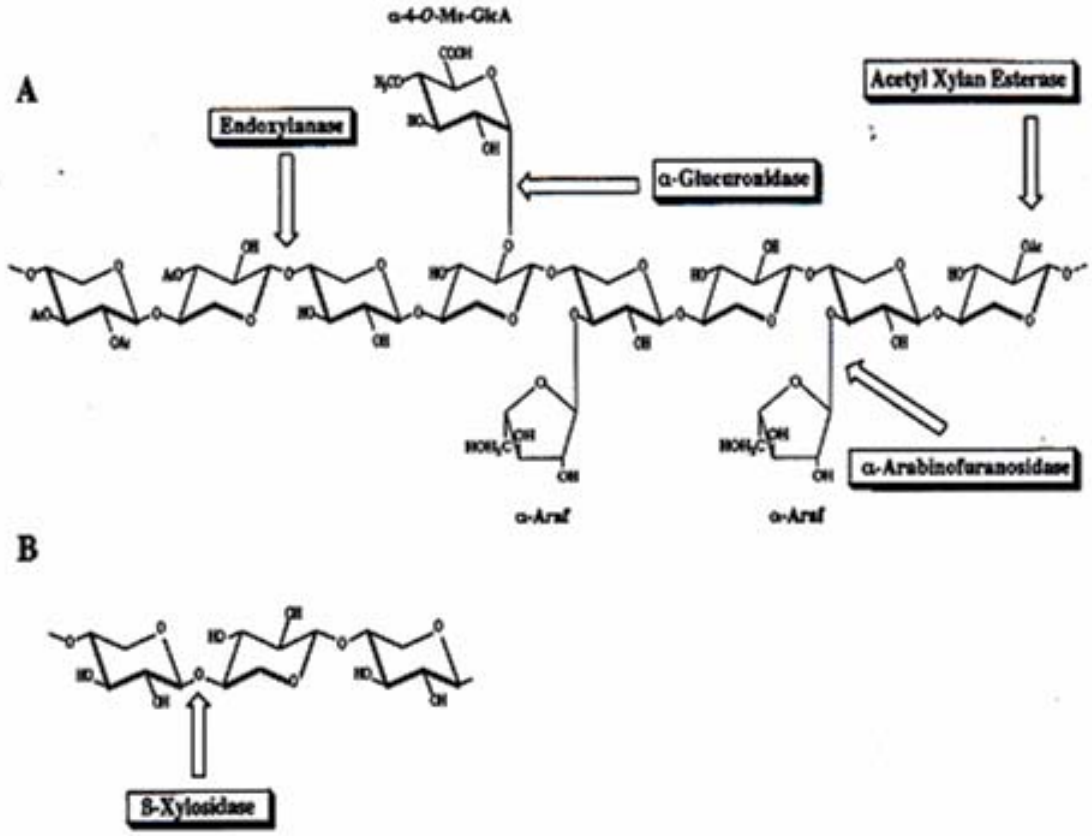


Figura 4: **(A)** Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana. AC grupo acetil. α-Araf: α-arabinofuranose, α-4-*O*-Me-GlcA: ácido α-4-*O*-metilglucurônico. **(B)** Hidrólise de xilooligossacarídeos pela enzima ß-xilosidase
Fonte: Sunna & Antranikian (1997).

As exo-enzimas, do tipo α-L-arabinofuranosidase, α-glucuronidase, acetil-xilana esterase e ácido fenólico esterase, removem do polímero os substituintes arabinofuranose, ácido glucurônico, grupo acetil e ácidos fenólicos, respectivamente. A endoxilanase hidrolisa as ligações glicosídicas do tipo ß-1,-4

dentro da cadeia de xilana, produzindo xilooligossacarídeos, os quais são convertidos em xilose pela ß-xilosidase (Biely, 1985).

As ß-D-xilosidases são enzimas que hidrolisam xilooligossacarídeos e xilobiose de extremidade não redutora para liberar xilose (Wong *et al*., 1988). Estas enzimas não conseguem hidrolisar a xilana e a sua afinidade aos xilooligossacarídeos é inversamente proporcional ao grau de polimerização. As acetilxilana esterases (EC 3.1.1.6) removem os grupos O-acetil das xilanas acetiladas. Estas enzimas representam um importante papel na hidrólise da xilana, uma vez que os grupos acetil podem interferir na clivagem da cadeia central pelas endoxilanases por impedimento estereoquímico (Polizeli *et al*., 2005).

As arabinofuranosidases removem os resíduos de α-arabinofuranose ligados nas posições 2 e 3 dos resíduos e xilose. Quando usadas juntamente, endoxilanases e α-L-arabinofuranosidases, ocorre um aumento de xilose, xilobiose e arabinose, o que ressalta o efeito de sinergismo das duas enzimas. A enzima α-D-glicuronidase hidrolisa as ligações α-1,2 entre o ácido glucurônico e os resíduos de xilose nas glucuronoxilanas (Sunna & Antranikian, 1997).

As endoxilanases podem formar complexos com enzimas celulolíticas. Foi descrito um complexo extracelular do microrganismo *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c com massa molecular de 669 kDa formado por 11 bandas de proteínas com atividade xilanolítica e 3 bandas com atividade de endoglucanase (Lin & Thomson, 1991).

O sistema xilanolítico já foi descrito em bactérias marinhas, bactérias do solo e do rúmen, em fungos, algas marinhas, protozoários, crustáceos, insetos e sementes de plantas terrestres. As enzimas xilanolíticas encontram-se envolvidas na biodegradação de diferentes substratos para fornecimento de uma fonte de energia renovável, degradação da parede celular de células vegetais, degradação de xilanas durante a germinação de sementes e digestão de vegetais presentes na dieta (Sunna & Antranikian, 1997).

1.2.1. Endoxilanases

As endoxilanases formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da xilana. As características da enzima, modo de ação

e os produtos da hidrólise variam de acordo com sua origem, já que as endoxilanases podem ser produzidas em condições variadas por diferentes microrganismos, como fungos e bactérias (Bastawde, 1992).

Essas enzimas foram reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) em 1961 e receberam o código enzimático de EC 3.2.1.8. O nome oficial é endo-β-1,4-xilanase e os seguintes sinônimos são comumente utilizados: xilanase, endoxilanase, 1,4 –β-D- xilana-xilanohidrolase, endo-1,4-β-D-xilanase, β-1,4-xilanase e β-xilanase (Collins *et al.*, 2005).

1.2.1.1. Classificação das endoxilanases

Há na literatura basicamente três classificações para endo-xilanases, elas podem ser classificadas de acordo com suas características físicas, com o seu modo de ação ou de acordo com a estrutura primária do sítio catalítico. (Polizeli *et al*., 2005).

As endo-xilanases são classificadas em enzimas desramificadoras ou não, de acordo com a capacidade de retirar as ramificações de α-arabinofuranose ligada aos resíduos de xilose, liberando assim a arabinose.

Wong e colaboradores (1988) sugeriram que as endoxilanases fossem classificadas de acordo com a suas propriedades físicas, tais como, massa molecular e ponto isoelétrico (pI). Nesta classificação as endoxilanases foram divididas em dois grupos. O primeiro é formado pelas endoxilanases ácidas que apresentam massa molecular maior que 30 kDa e pI ácido enquanto o segundo grupo é formado pelas endoxilanases básicas com massa molecular menor que 30 kDa e pI básico. Entretanto, esta classificação é apropriada somente em 70% dos casos (Polizeli *et al*., 2005).

As endo-xilanases são classificadas juntamente com as glicosil-hidrolases em famílias de acordo com a similaridade da estrutura primária do domínio catalítico (Henrissat & Bairoch, 1993). Como a estrutura primária é relacionada com a estrutura tridimensional e o mecanismo de ação da enzima, esta classificação reflete características estruturais e funcionais. Atualmente o grupo das glicosil-hidrolases abrange 106 famílias, sendo que as endoxilanases são classificadas nas famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43. Os membros destas famílias diferem em suas propriedades físico-químicas, estruturais, modo de ação e especificidade ao substrato. As xilanases das famílias 10 e 11 são as mais

estudadas até o momento, sendo que a família 11 é formada somente por xilanases verdadeiras, pois hidrolisam somente polímeros de xilose (Collins *et al.*, 2005).

1.2.1.2. Estrutura tridimensional das endoxilanases

A família 10 é constituida de endo 1,4-ß-xilanases, endo 1,3 ß-xilanases e celobiohidrolases. As principais enzimas dessa família são as endo 1,4-ß-xilanases que clivam a xilana e substratos de celulose de baixa massa molecular. Essas enzimas são altamente ativas em pequenos xilooligossacarídios indicando a presença de um sítio de ligação pequeno. Os membros dessa família possuem altas massas moleculares (> 30 kDa), baixo pI, conformação de barril (α/ß)$_8$ e a estrutura lembra uma travessa de salada (Figura 5) (Collins *et al.*, 2005).

A estrutura geral das endoxilanases da famíla 11 consiste de um domínio catalítico único formado por folhas β antiparalelas organizadas de forma regular e uma única estrutura do tipo hélice (alfa hélice). O modelo geral destas proteínas lembra uma mão semi-aberta onde as folhas β-1 e β-2 se encontram organizadas formando o "polegar". A folha β-3 se encontra em continuação às folhas 1 e 2, porém situada perpendicular a estas, formando a "palma" da mão. O sítio de ligação ao substrato se situa na cavidade formada entre o "polegar" e a "palma da mão". A única alfa hélice se localiza na parte superior da "palma" no lado oposto à cavidade do sítio catalítico (Faria, 2000). As enzimas da família 11 são geralmente caracterizadas por pI alto e baixa massa molecular. Estas enzimas são mais ativas em xilo-oligossacarídeos de cadeias longas e apresentam fendas largas de ligação ao substrato (Figura 5) (Collins *et al.*, 2005).

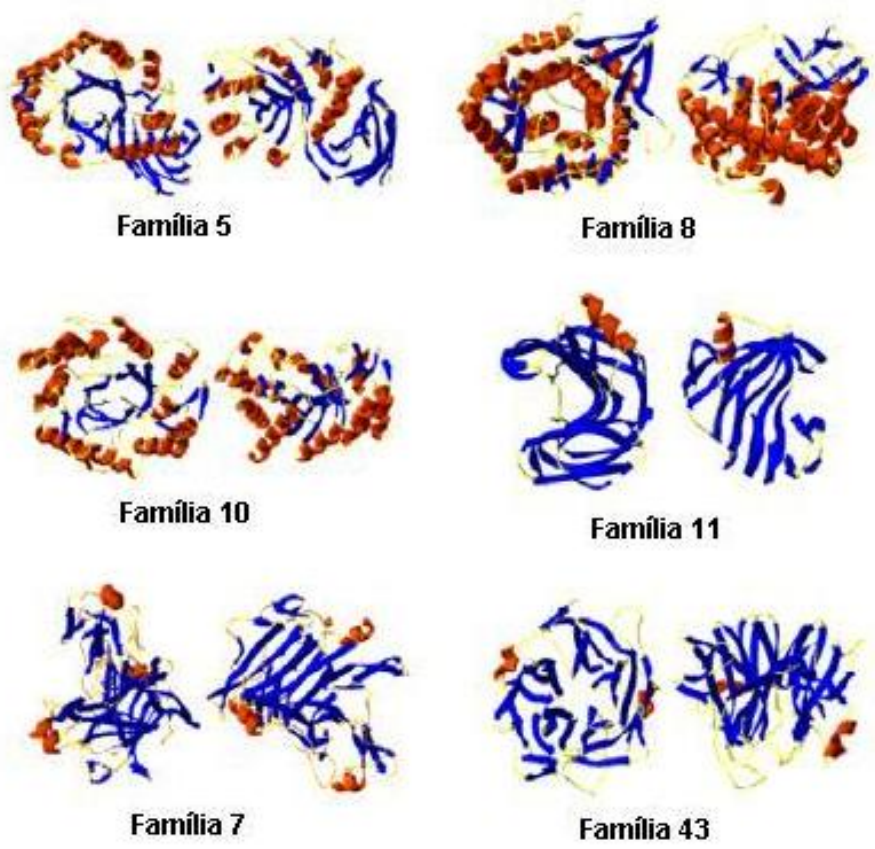


Figura 5: Representação das estruturas de algumas enzimas das famílias das glicosil hidrolases.
Fonte: Collins *et al* (2005)

As famílias 5, 7, 8 e 43 apresentam poucas enzimas com atividade xilanolítica. As enzimas da família 5 apresentam estrutura tridimensional marcada por uma estrutura de barril α/ß se assemelhando com a estrutura tridimensional das xilanases da família 10. As xilanases da família 8 apresentam similaridade com a estrutura da família 11 pois apresentam um fissura larga de ligação ao substrato , como estrutura tridimensional apresentam em conformação distorcida de barril (α/α), formada por 6 α-hélices internas e 6 α-hélices externas. As famílias 43 e 7 compartilham características semelhantes à família 10, devido a sua alta massa molecular e baixo pI enquanto apresentam uma estrutura tridimensional semelhante as enzimas da família 11 (Figura 5) (Collins *et al.*, 2005).

1.2.1.3. Mecanismo de hidrólise

O mecanismo de catálise das ligações glicosídicas ocorre através de um mecanismo de catálise ácido/base, havendo participação crítica de dois resíduos de aminoácidos, normalmente aspartil e glutamil: o primeiro age como catalisador ácido, doando próton para o oxigênio da ligação glicosídica e o segundo como nucleófilo ou base (revisto por Davies & Henrissat, 1995). A hidrólise é estéreo-seletiva, uma reação de deslocamento simples ou duplo que leva respectivamente à inversão ou retenção da configuração do carbono anomérico após clivagem.

O mecanismo de retenção mantém a configuração do carbono anomérico da seguinte maneira: o aminoácido básico reage diretamente com o carbono anomérico, enquanto o par de elétrons da ligação glicosídica remove um próton do aminoácido ácido; nessa etapa, forma-se o intermediário enzima-carbohidrato. No restabelecimento do sítio ativo, o aminoácido ácido desprotonado reage com uma molécula de água do meio, formando uma hidroxila que reage com o carbono anomérico liberando o carboidrato com a configuração original, ou seja, o anômero beta (β) (Sandgren *et al*., 2005). No mecanismo de inversão uma molécula de água atua como doadora de um próton para o aminoácido básico, gerando uma hidroxila que atua como nucleófilo e reage com o carbono anomérico, ao mesmo tempo em que o par de elétrons da ligação glicosídica retira um próton do aminoácido ácido. Nessa via catalítica, a ligação glicosídica é hidrolisada em apenas uma etapa e ocorre a inversão da configuração do carbono anomérico, gerando um anômero alfa (α) (Figura 6) (Sandgren *et al*., 2005).

O mecanismo catalítico divide as xilanases em dois grupos. Um grupo que realiza a catálise em duas etapas com retenção de configuração do carbono anomérico compreendendo as xilanases da família 5, 7, 10 e 11. O outro grupo que realiza a catálise em uma única etapa com mudança da configuração anomérica, sendo representado pelas xilanases da família 8 e 43 (Collins *et al.*, 2005).

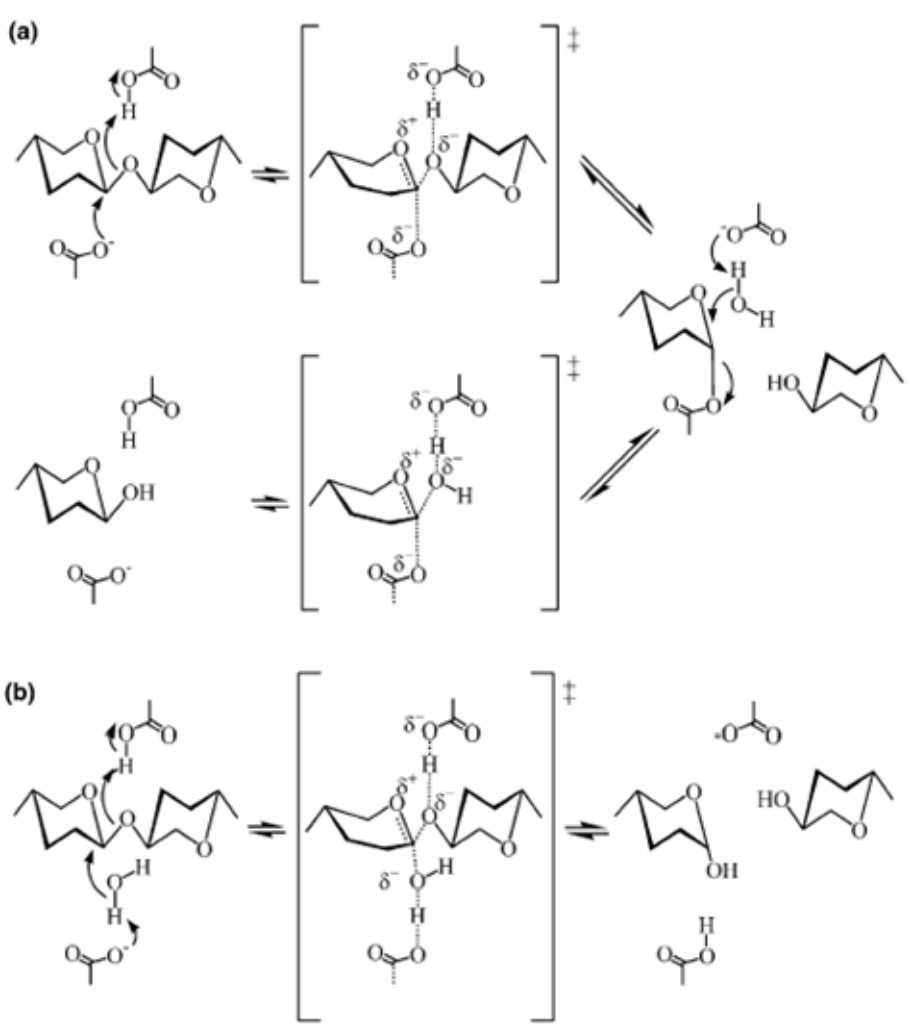


Figura 6: Mecanismo de hidrólise enzimática. **A.** mecanismo de retenção. **B.** mecanismo de inversão. O mecanismo de retenção mantém a configuração β e o mecanismo de inversão converte a configuração β para α

Fonte: Collins *et al*., (2005)

1.2.1.4. Propiedades bioquímicas

As informações disponíveis sobre as propriedades bioquímicas das endoxilanases são originárias predominantemente de estudos com as endoxilanases bacterianas e fúngicas. As xilanases microbianas constituem-se em enzimas monoméricas com massa molecular geralmente entre 8 e 145 kDa (Sunna & Antranikian, 1997).

As xilanases bacterianas apresentam massa molecular entre 20-40 kDa, mas há xilanases com massa moleculares mais elevadas de 266 kDa

(*Thermotoga thermarum*), 99 kDa (*Bacillus sp*) e 85 kDa (*Bacillus circulans*). As enzimas fúngicas apresentam massas moleculares entre 20-40 kDa (Subramaniyan & Prema, 2002).

Em geral as endoxilanases apresentam temperatura ótima de atividade entre 40-80 °C. Entretanto as xilanases de *Bacillus amyloliquefacius*, *Thermotoga maritima* e *Thermotoga thermarum* apresentam atividades ótimas entre 80-100 °C (Subramaniyan & Prema, 2002).

As endoxilanases de diferentes microrganismos são usualmente estáveis em uma faixa ampla de pH (3-10), sendo que apresentam atividade ótima em pH variando entre 4 e 7. Há algumas variações, como o caso das endoxilanases de *Aspergillus kawachii* e *Penicillium herque* que apresentam pH ótimo entre 2 e 6. O ponto isoelétrico para as endoxilanases varia de 3 a 10 (Kulkarni *et al*., 1999).

1.3. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE XILANASES

O mercado global de enzimas industriais cresceu de um bilhão de Euros em 1995 para quase dois bilhões de Euros em 2001, e continua a crescer à medida que novas enzimas e aplicações são descobertas. As enzimas hidrolases que englobam as glicosil-hidrolases, como celulases, amilases e hemicelulases constituem aproximadamente 75% do mercado de enzimas industriais, sendo que as xilanases constituem a maior proporção de hemicelulases comerciais (Collins *et al*., 2005).

O uso industrial das xilanases começou nos anos 80 inicialmente na fabricação de rações e posteriormente na indústria alimentícia, têxtil e de papel e celulose. Atualmente países como Japão, Finlândia, Alemanha, Dinamarca, República Irlandesa, Canadá e Estados Unidos produzem industrialmente xilanases que são usadas em vários setores industriais (Polizeli *et al.*, 2005).

A produção de ração animal é muito importante no agronegócio, com uma produção anual mundial que excede 600 milhões de toneladas, resultando em ganhos de mais de 50 bilhões de dólares. As xilanases são usadas nas rações juntamente com glicanases, pectinases, celulases, proteases, amilases, fitases, galactosidades e lípases, e degradam a porção de arabinoxilana presente na

ração, reduzindo a viscosidade do material bruto e aumentando a digestibilidade da ração (Polizeli *et al*., 2005).

As xilanases termoestáveis e com estabilidade em pH 5,0 são mais adequadas a esta aplicação já que a ração passa pelo processo de peletização (conduzido em temperaturas entre 70-95 °C) e devem ser estáveis às condições do trato digestivo dos animais (pH de aproximadamente 4,8 e temperatura de 40 °C) (Collins *et al.*, 2005; Chantasingh *et al*., 2006).

A indústria de sucos e bebidas é responsável pela utilização de uma boa parte do mercado de enzimas. Na indústria de sucos, as xilanases em conjunto com as celulases, as amilases e as pectinases reduzem a viscosidade da polpa de fruta, hidrolisando os polissacarídeos que interferem na clarificação do suco, e assim, levam à estabilização das polpas de fruta e ao aumento da recuperação de aromas, óleos essenciais, vitaminas, sais minerais e corantes comestíveis. Na indústria de cerveja, as xilanases são usadas para hidrolisar a porção de arabinoxilana da bebida, reduzindo a viscosidade e a turbidez da cerveja (Polizeli *et al*., 2005).

Os produtos de hidrólise da xilana, como os resíduos de β-D- xilopiranosil, podem ser convertidos em combustíveis líquidos (etanol), solventes e doces de baixa caloria. Um primeiro passo é a deslignificação do material lignocelulósico, seguido da hidrólise realizada por hemicelulases, para produzir açúcares como as unidades β-D-xilopiranosil. Posteriormente esses produtos são fermentados por leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* e *Candida shehatae* para a produção de etanol ou xilitol. O xilitol é um poliálcool com poder adoçante comparável com a sacarose, utilizado como adoçante não cancerígeno recomendável para diabéticos e indivíduos obesos (Polizeli *et al*., 2005).

Para a indústria têxtil, a xilanase pode ser utilizada nos processos de maceração do linho, da juta e do sisal e refinamento de polpas para a produção de tecidos como a viscose "rayon". Nestes processos, as enzimas xilanolíticas são empregadas para facilitar a separação das fibras de celulose da matriz celular e a remoção da lignina. Para estes propósitos a xilanase deve ser livre de enzimas celulósicas. Em alguns processos, as fibras têxteis são extraídas de troncos macios que contêm uma menor quantidade de lignina, de forma que o tratamento enzimático já é suficiente para a recuperação das fibras de celulose sem a necessidade de nenhum processo adicional para o branqueamento da polpa (Milagres & Prade, 1994).

Uma das principais aplicações da xilanase está no branqueamento da polpa da celulose. Atualmente, em vários países incluindo o Brasil, os processos químicos, utilizando dióxido de cloro e cloro, de branqueamento da polpa da celulose são preferencialmente usados. O efluente gerado não pode ser reciclado facilmente e contém grande quantidade de compostos organoclorados, os quais têm efeitos tóxicos e carcinogênicos. A aplicação das xilanases neste processo se deve ao fato da enzima hidrolisar a xilana e consequentemente facilitar a remoção da lignina que se encontra ligada a ela por ligações físicas e químicas. A utilização da xilanase no branqueamento pode reduzir em até 34% a quantidade de cloro utilizado nesta etapa e uma redução entre 15 -20% de organoclorados nos efluentes. As xilanases empregadas na indústria de papel e celulose devem apresentar atividade em altas temperaturas e em pHs alcalinos, e serem livres de celulase para preservarem as fibras da celulose (Viikari, 1991; Viikari *et al*., 1994; Paice *et al.,* 1988; Polizeli *et al*., 2005).

A xilanase em combinação com a celulase pode ser utilizada na reciclagem de papeis impressos por impressoras a laser. A celulase libera as fibras da matriz de celulose na qual a tinta está embebida, enquanto a xilanase cliva a cadeia de xilana, liberando a lignina do complexo carboidrato-lignina, liberando a tinta. A utilização dessas enzimas é responsável pela remoção de 62% da tinta. A utilização das enzimas reduz o uso de compostos químicos tais como: carbonato de sódio, hidróxido de sódio, silicato de sódio, peróxido de hidrogênio, hipocloritos, agentes quelantes e surfactantes, que geram efluentes que necessitam de sistemas caros de tratamento de água (Lee *et al.*, 2007).

Outra aplicação das xilanases é na conversão de sub-produtos industriais e resíduos agroindustriais, tais como farelo de trigo e haste de algodão, em xilooligossacarídeos. Os xilooligossacarídeos são aditivos de alto valor em alimentos funcionais, utilizados para beneficiar o desenvolvimento seletivo de microrganismos da microbiota gastrointestinal, tais como o *Bifidobacterium spp*. Os efeitos benéficos desses microrganismos incluem: supressão da atividade e prevenção da proliferação de enterobactérias patogênicas e facilitação da digestão e absorção dos nutrientes (Liu *et al*., 2006; Akpinar *et al*., 2007).

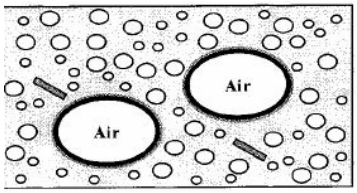
Outros processos que empregam as xilanases são: extração de café, formulação de detergentes e na produção de polissacarídeos com atividade farmacológica para o uso como agentes antimicrobianos e/ou anti-oxidantes (Collins *et al.*, 2005).

1.3.1. Aplicação de xilanases na panificação

O uso das xilanases foi introduzido na indústria da panificação nos anos 70. Kulp (1968) descreveu os efeitos benéficos da utilização de xilanases fúngicas no processo de panificação. A partir desse trabalho o mecanismo de atuação das xilanases neste processo tem sido estudado, estabelecendo as condições de uso dessas enzimas na indústria de panificação (Harbak & Thygesen, 2002). O conhecimento a respeito do mecanismo de ação das xilanases na massa e nos pães continua limitado, provavelmente por causa das AX na farinha variarem com os tipos de trigo, somado com a especificidade das xilanases em relação aos diferentes substratos (Martinez-Anaya & Jimenez, 1997).

A AX é o principal tipo de hemicelulose encontrada na farinha de trigo (2-3%), sendo responsável por mais de 30% da capacidade de ligação da farinha com a água. A AX encontrada na farinha é dividida em duas frações, uma solúvel em água (20-25%) e a outra insolúvel. A solubilidade das diferentes frações da AX encontradas na farinha de trigo é determinante no processo de panificação. A AX-SA tem efeitos positivos na panificação. Sua solubilidade, alto peso molecular e interação entre suas próprias moléculas e as proteínas do glúten garantem a formação de uma rede secundária que auxilia a rede de glúten na estabilização da estrutura das bolhas de CO_2 produzidas durante a fermentação. Essa ação das AX-SAs está relacionada ao aumento do volume dos pães, com a estrutura fina e homogênea do miolo e menor firmeza inicial do miolo. A AX-IA devido a sua natureza física pode atrapalhar por meio de barreiras físicas, a formação da rede de glúten durante o desenvolvimento da massa, se relacionando com uma menor estabilidade da bolha de CO_2 produzida durante a fermentação fermentação (Figura 7) (Courtin & Delcour, 2002).

1



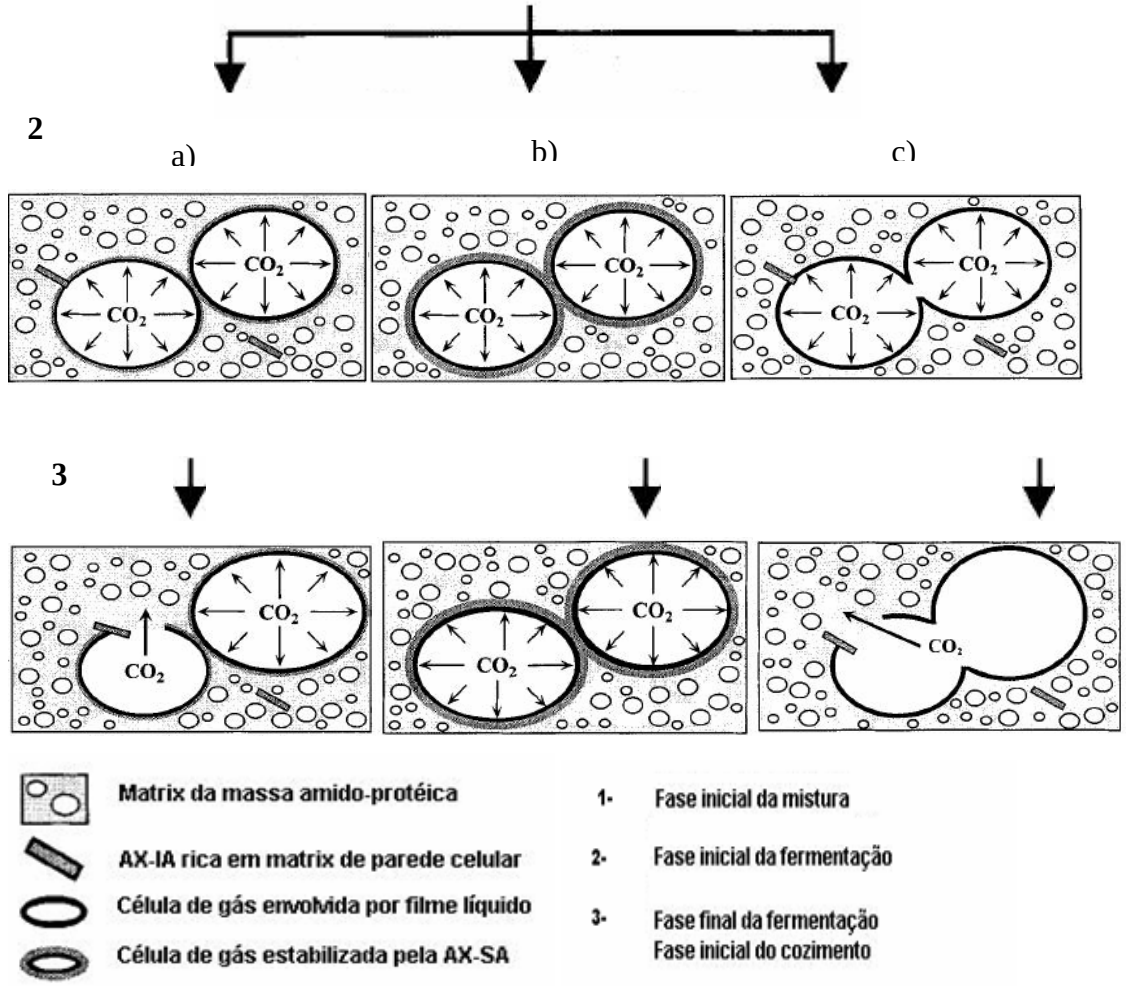


Figura 7: Representação esquemática do mecanismo de ação das xilanases na panificação. a) representa a situação controle, sem adição de xilanases. b) representa a ação de xilanases com ações seletiva sobre AX-IA c) representa as xilanases com ação seletiva sobre AX-SA.

Fonte: Adaptado de Courtin & Delcour (2002)

Em seu trabalho Roau e colaboradores (1994) formularam uma hipótese para a ação das xilanases na massa formada por farinha de trigo, que postula o seguinte: a enzima causa a conversão parcial da AX-IA em oligossacarídeos solúveis em água. A liberação da água inicialmente absorvida pela AX-IA juntamente com aumento da AX-SA resulta em maior distribuição e interação da água com o glúten, facilitando as interações moleculares entre os constituintes da massa. O subseqüente aumento da viscosidade na fase aquosa da massa está relacionado com um efeito positivo na reologia, na maior retenção de gás e expansão da massa durante o cozimento (Maat *et al*., 1992).

Assim os estudos têm demonstrado que a hidrólise enzimática da arabinoxilana presente na massa do pão leva a obtenção de uma massa mais macia e estável, com maior facilidade de manuseio e pães com maior volume, umidade e melhor estrutura de miolo, além de retardar o endurecimento dos pães. Entretanto, a hidrólise excessiva pode gerar uma massa pegajosa e frouxa (Gruppen et al., 1993). O uso da xilanase pode eliminar o uso de aditivos químicos, como o bromato (Camacho & Aguilar, 2003).

Shah e colaboradores (2006) utilizando uma xilanase de Aspegillus foetidus, parcialmente purificada na preparação de pães com farinha integrais, observaram uma melhor expansão da massa na fermentação, aumento de 56% do volume específico dos pães, diminuição de 30% da firmeza dos miolos e aumento da umidade dos pães. A análise sensorial demonstrou que os pães suplementados com 12 U de xilanase por grama de farinha apresentaram melhores escores nos atributos como: volume, aroma, maciez, estrutura do miolo sendo mais aceitos pelos provadores do que os pães não suplementados. Concluíram que as xilanases podem ser responsáveis por uma expansão da massa notavelmente maior em relação a pães não suplementados, possivelmente pela liberação de açúcares fermentáveis na massa, que elevou a taxa uma alta taxa de dióxido de carbono produzido pela levedura.

Em trabalho realizado por Jiang e colaboradores (2005 b), a adição de 40 ppm de xilanase purificada de Thermomyces lanuginosus na massa resultou em pães com média de volume específico 41,4% maior que o controle e firmeza do miolo 21,4% menor. A xilanase também apresentou um efeito anti-envelhecimento, reduzindo a taxa de firmeza do miolo dos pães, com os melhores resultados alcançados no segundo e terceiro dia de armazenamento.

Camacho e Aguilar (2003) estudaram a aplicação de uma endoxilanase purificada de 22 kDa de *Aspergillus* sp. na panificação com as concentrações de 25 a 200 ppm (em relação ao peso da farinha de trigo). O aumento do volume dos pães após a adição da enzima purificada foi 2,5 vezes maior que o aumento obtido com a enzima presente no sobrenadante de cultura. A adição de 25, 50 e 100 ppm de enzima purificada proporcionou um aumento de 30%, enquanto que a adição de 150 a 200 ppm de enzima não levou ao aumento dos pães, concluindo que a adição de 25 ppm de enzima purificada é suficiente para obter o efeito desejado.

O volume dos pães é considerado o parâmetro tecnológico mais importante devido a sua relação com as propriedades organolépticas (Camacho & Aguilar, 2003). O uso de xilanases no preparo da massa está relacionado com o aumento de 14-60 % no volume específico em comparação com pães não suplementados. (Gruppen *et al*., 1993; Camacho & Aguilar, 2003; Jiang *et al*., 2005 a; Jiang *et al*., 2005b ; Shah *et al* 2006). O aumento de 60% no volume específico está relacionado com uso da xilanase termoestável de *T. maritma* que tem uma ação prolongada na hidrólise da arabinoxilana até o cozimento, sua ação pode ocorrer até a temperatura do interior da massa ultrapassar 90 °C, contribuindo para uma maior expansão dos pães no forno (Jiang *et al*., 2005a).

Collins e colaboradores (2006) compararam a eficiência em teste de panificação de xilanases da família 8 (mesófila e psicrófila), 10 (psicrófila) e 11 (mesófila). Foi verificado que enquanto as xilanases da família 8 e 11 tiveram efeitos positivos no aumento do volume dos pães a enzima da família 10 não teve efeito significativo nas concentrações testadas. Houve uma melhor eficiência da xilanase da família 8, adaptada a atividade em baixas temperaturas, em pães que necessitam de um maior tempo de fermentação como os baguetes argentinos. Os autores sugerem que devido à excessiva hidrólise das frações solúveis e insolúveis realizada pela xilanase da família 10 houve a produção de massas com viscosidade indesejáveis e perda da capacidade de ligação com a água.

1.4. ENDOXILANASES FÚNGICAS

O amplo potencial de aplicação biotecnológico das enzimas xilanolíticas estimula principalmente pesquisas envolvendo microrganismos xilanolíticos termofílicos e extremofílicos, pois estes produzem enzimas com maior estabilidade. Notadamente os fungos termofílicos compreendem: *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Humicola grisea*, *Melanocarpus albomyces*, *Paecylomyces variotii*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces emersonni*, *T. lanuginosus* e *Thermoascus aurantiacus* (Polizeli *et al.*, 2005).

As enzimas xilanolíticas produzidas por estes fungos apresentam temperatura ótima entre 60 a 80°C, atividade em pH ácido (4,5 a 6,5) e massa molecular na faixa de 6-38 kDa (Polizeli *et al*., 2005).

Entre as endoxilanases microbianas há uma grande multiplicidade de isoenzimas o que é comprovado pela detecção de quinze diferentes xilanases nos filtrados de cultura de *Aspergillus niger*, treze nos filtrados de cultura do fungo *Trichoderma vivide* e de onze a treze nos de *Talaromyces emersoni* (Coughlan *et al.*, 1993; Biely *et al.*, 1985). A multiplicidade das endoxilanases se deve a dois fatores: 1. diferentes genes que codificam endoxilanases com funções similares ou 2. um único gene que codifica diferentes endoxilanases a partir do processamento diferencial da molécula de mRNA e/ou processamento pós-traducional diferencial como glicosilação, proteólise e auto-agregação (Subramanyan & Prema, 2002).

A produção das enzimas microbianas como um conjunto enzimático com atividades distintas dificulta a utilização direta destas enzimas em alguns processos industriais. Para a obtenção de enzimas de pureza maior, uma das estratégias consiste no isolamento de genes que codificam enzimas do sistema xilanolítico e a expressão em sistemas heterólogos para a obtenção de microorganismos recombinantes que expressem atividades específicas (Harkki *et al*., 1991).

1.4.1. Genes de endoxilanases fúngicas

Os estudos sobre a biologia molecular dos microrganismos xilanolíticos de bactérias e fungos têm-se desenvolvido rapidamente. Inicialmente, as xilanases do gênero *Bacillus* e das bactérias do rúmen foram extensivamente estudadas. Mais de setenta genes que codificam enzimas xilanolíticas foram isolados de trinta diferentes espécies bacterianas, utilizando a estratégia de expressão heteróloga. Alguns genes codificadores destas enzimas foram expressos em *Escherichia coli* visando sua caracterização e produção da enzima recombinante (Hazlewood & Gilbert, 1993).

Atualmente o interesse pelas enzimas fúngicas se justifica pelas características próprias destas proteínas, como maior termoestabilidade. Vários

genes de xilanases fúngicas foram descritos, codificando endoxilanases com massa molecular em torno de 20 a 35 kDa, altamente glicosiladas (Coughlan & Hazlewood, 1993). A maioria destes genes apresentam íntrons pequenos (em torno de 60 pb) e ladeados por sequências GT/AG. O gene *xyl*P do fungo filamentoso *Penicillium chrysogenum* foi clonado e possui uma seqüência codificadora de 1,6 Kb interrompida por nove íntrons (Haas *et al.*, 1993). O gene xynA do fungo *Aspergillus sulphureus* foi clonado e possui uma seqüência de 636 nucleotídeos, codificando uma proteína de 22,40 kDa (Cao *et al* ., 2006).

Zhang e colaboradores (2007) clonaram um gene de xilanase do fungo nematófago *Plectosphaerella cucumerina*, primeiro gene funcional relatado, a seqüência contém 780 pb como região codificadora separada por dois íntrons com tamanho de 50 pb e 46 pb. Foram descritas a clonagem e expressão de um gene do fungo *Scytalidium acidophilum*, adaptado a ambientes ácidos e a temperaturas altas. O gene apresentou uma seqüência de 673 pb de região codificadora com a presença de um íntron de 55 pb, o gene codifica um polipeptídeo de 205 aminoácidos. A seqüência deduzida da proteína correspondeu a uma xilanase da família 11 (Balaa *et al*., 2006).

O fungo filamentoso *A. niger* expressa duas xilanases, sendo que os genes *xyn*NA e *xyn*NB foram clonados, demonstrando que ambos codificam endoxilanases da família G/11 (Van der Broeck *et al.*, 1992). O gene clonado xynB de *streptomyces olivaceoviris* A1 codifica uma proteína processada com 191 resíduos de aminoácidos, de massa teórica de 20,839 kDa similar com as xilanases da famíla 11 (Wang et al., 2007). O gene Xyn11A do fungo *Lentinula edodes* apresenta 849 pb e codifica uma proteína de 283 aminoácidos com peso molecular de 29,5 kDa e pI de 4,6, o gene foi indentificado como codificador de uma proteína da família 11 (Lee *et al*., 2005).

Genes que codificam enzimas xilanolíticas bacterianas e fúngicas têm sido clonados e expressos em sistemas heterólogos. Os sistemas de expressão heterólogos mais utilizados são os de bactérias *(E. coli* e *Bacillus sp*), fungos filamentosos *(Aspergillus nidulan* e *Trichoderma reesei*) e leveduras (*S. cerevisia*e e *P. pastoris*) (Faria, 2000). A maioria dos genes de xilanases fúngicas foi expressa em leveduras, como a *S. cerevisiae* e *Pichia* sp (Kulkarni *et al.*, 1999). Estes sistemas de expressão apresentam as vantagens dos sistemas eucarióticos como processamento pós-transcricional e pós traducional, além de apresentar facilidade de manipulação e alta produtividade (Romanos, 1992).

Várias enzimas comumente utilizadas na alimentação são derivadas de microrganismos recombinantes, entre as xilanases recombinantes comerciais utilizadas na alimentação estão as xilanases recombinantes produzidas por *Aspergillus sp.*, *Thermomyces sp*, *Bacillus sp.*, *Tricoderma sp.* (Pariza & Johnson, 2001; Olempska-Beer *et al*., 2006).

1.4.1.1. Expressão heteróloga de genes de endo-xilanase em *P. pastoris*

A levedura metilotrófica *P. pastoris* é comumente utilizada para a produção de proteínas recombinantes de interesse industrial, pois apresenta vantagens como: processo fermentativo bem estabelecido e economicamente viável, padrão de glicosilação compatível com proteínas eucarióticas, metodologia de manipulação genética bem estabelecida e controle de expressão dos genes heterólogos por promotores fortes e induzíveis (Cregg *et al*., 1993). Durante o crescimento de *P. pastoris* em metanol, a enzima álcool oxidase (AO) constituí a proteína mais abundante da célula chegando a representar 30% das proteínas celulares totais (Couderc & Baratti, 1980). A expressão de AO é induzida na presença de metanol e reprimida na presença de glicose ou glicerol.

A levedura *P. pastoris* possuí dois genes que codificam a enzima AO no genoma, AOX1 e AOX2. Os vetores de expressão mais utilizados são os integrativos, que contêm a região promotora e terminadora do gene AOX1, assim o cassete de expressão pode substituir o locus de AOX1 levando a um crescimento lento em metanol (transformante $AOX1^{-}$/ $AOX2^{+}$ – fenótipo Mut^{s}), ou o cassete pode se integrar em outra parte do genoma, apresentando crescimento normal em metanol (transformante $AOX1^{+}$/$AOX2^{+}$ – fenótipo Mut^{+}) (Cregg *et al.*,1993). Uma vez que o promotor de AOX1 é controlado pela fonte de carbono adicionado ao meio de cultura, a indução da expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* é facilmente obtida em todas as escalas, desde frascos até grandes fermentadores. Para uma produção economicamente viável de proteínas recombinantes, a concentração de proteínas no meio deve ser proporcional à quantidade de células, necessitando assim atingir alta densidade celular, o que não pode ser obtido facilmente com culturas de *S. cerevisiae.* Em contraste, as cepas recombinantes de *P. pastoris* são facilmente cultivadas à densidade celular de aproximadamente 100 g/L de peso seco (Siegel *et*

al.,1989).

A utilização de *P. pastoris* para a expressão de xilanases recombinantes é ideal, pois este microrganismo não produz xilanase e secreta pouca proteína para o meio de cultura sob indução com metanol (Berrin *et al*., 2000; Damaso *et al*., 2003; Tanaka *et al*., 2004; Ramchuran *et al*., 2005).

Essas vantagens fazem com que esse microrganismo seja escolhido para expressão heteróloga de genes de xilanases fúngicas e bacterianas. Existem vários trabalhos na literatura em que foram bem sucedidas as expressões de genes de xilanases utilizando *P. pastoris* como hospedeiro (Berrin *et al*., 2000; Damaso *et al*., 2003; Tanaka *et al*., 2004; Cheng *et al*., 2005; Lee *et al.,* 2005; Ramchuran *et al*., 2005; Balaa *et al*., 2006; Chantasingh *et al*., 2006; Deng *et al*., 2006; Korona *et al*., 2006; Liu *et al*., 2006; Cao *et al*., 2007; Ruanglek *et al*., 2007; Sun *et al*., 2007; Wang *et al*., 2007; Zhang *et al*., 2007).

A produção e secreção correta de xilanases recombinantes pela *P. pastoris* depende da escolha do peptídeo sinal. A levedura *P. pastoris* tem capacidade de processar corretamente diferentes sinais de secreção, tais como seqüência sinal da proteína heteróloga, peptídio sinal do fator α de *S. cerevisiae* ou o peptídeo sinal da fosfatase ácida de *P. pastoris*. Entretanto, a escolha de um sinal de secreção heterólogo em vetores de expressão comerciais é limitada ao sinal de secreção do fator α da levedura *S. cerivisiae* (Korona *et al*., 2006; Cereghino & Cregg, 2000). A maioria dos trabalhos de expressão heteróloga de genes de xilanase em *P. pastoris* empregaram vetores de expressão contendo esse peptídeo sinal (Damaso *et al*., 2003; Cheng *et al*., 2005; Lee *et al*., 2005; Ramchuran *et al.*, 2005; Balaa *et al.*, 2006; Chantasingh *et al.*, 2006; Deng *et al*., 2006; Liu *et al*., 2006; Cao *et al*., 2007; Ruanglek *et al.*, 2007; Sun *et al*., 2007 ; Wang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007).

No trabalho de Korona e colaboradores (2006) o gene de xilanase de *A. niger* contendo o peptídeo sinal selvagem foi expresso corretamente em *P. pastoris*. A produção e secreção da enzima foi compatível com a obtida com o peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae* e superior a expressão obtida com o peptídio sinal da invertase do *S. cerevisiae* (SUC 2) obtida. No trabalho de Tanaka e colaboradores (2004) foi verificada a secreção eficiente da xilanase recombinante de *Aureobasidium pullulans* pelo seu próprio peptídeo sinal em comparação com a secreção de xilanase recombinante fusionada aos peptídeos sinais da *P. pastoris* ou de *S. cerevisiae*.

A levedura *P. pastoris* tem capacidade de glicosilar corretamente as proteínas recombinantes, por O ou N-glicosilação. A cadeia de oligossacarídeos adicionada pela levedura geralmente é de comprimento menor do que as adicionadas pela levedura *S. cerevisiae* (Ramchuran *et al*., 2005). Balaa e colaboradores (2006) observaram uma banda dupla após a coloração do gel de SDS com "Coomassie brillant blue", a massa molecular aparente apresentava-se um pouco maior que a deduzida da seqüência dos aminoácidos, posteriormente através de espectrometria de massa, confirmou-se que as 2 bandas dos géis eram xilanases, resultantes da glicosilação diferencial realizada pela *P. pastoris*. Proteínas heterólogas com diferentes perfis de glicosilação foram produzidas quando o gene de xilanase de *Thermobifida fusca* foi expresso em *P. pastoris*, entretanto a glicosilação não afetou as propriedades da xilanase. Após o tratamento com endo-N acetilglicosaminidase H para remover os carboidratos, foi verificada uma única banda de 36 kDa (Cheng et al., 2005).

A produção em frasco de xilanases recombinantes pela levedura *P. pastoris* normalmente é obtida por fermentação submersa empregando os meios de cultura recomendados pela empresa Invitrogen: meio mínimo, meio completo tamponado e meio mínimo tamponado, contendo YNB (Nitrogênio proveniente de levedura) peptona e extrato de levedura como fontes de nitrogênio e metanol como fone de carbono.

Ramchuran e colaboradores (2005) descreveram a produção da xilanase recombinante da bactéria *Rhodothermus marinus* em *P. pastoris* em diferentes meios de cultura. Analisaram a produção em frasco nos meios de cultura recomendados pela empresa Invitrogen e no meio YPTM. O meio YPTM não apresenta YNB na sua formulação e têm uma concentração de 0,5% (p/v) de extrato de levedura, 2 % (p/v) de peptona e 0,04% (p/v) de triptona de caldo de soja. Os resultados demonstraram que os meios de cultura suplementados com extrato de levedura e peptona apresentaram uma maior produção enzimática.

Em trabalho realizado por Damaso e colaboradores (2003) foi realizada a otimização do meio de cultura (BMM) para a produção de uma endoxilanase recombinante do fungo *T. lanuginosus* através de um planejamento fatorial de 2^3. Nesse planejamento foram avaliados os fatores: influência da OD inicial, concentração de metanol e de fonte de nitrogênio (YNB). O parâmetro mais importante encontrado foi a OD inicial. A quantidade secretada da enzima

recombinante *xyn*A após 90h de indução foi de 126 U/mL, após a otimização a produção foi elevada ao valor de 360 U/mL, obtendo 148 mg/L de xilanase no meio de cultura.

Em trabalho realizado por Berrin e colaboradores (2000) foi obtida a produção de 60 mg/L de xilanase utilizando o meio de cultura não tamponado. Já no trabalho realizado por Tanaka e colaboradores (2004) foi obtida a produção de 178 mg/L de xilanase recombinante utilizando o meio de cultura completo tamponado. Em trabalho realizado por Chantasingh e colaboradores (2006) uma xilanase recombinante da família 10 do fungo *Aspergillus terreus* (BCC129) foi secretada para o meio de cultura na quantidade 238,5 mg/L utilizando o meio completo tamponado com a concentração final de 3% de metanol.

1.4.1.2. Purificação de xilanases recombinantes expressas em *P. pastoris*

Pode-se considerar a secreção de proteínas heterólogas por *P. pastoris* como um primeiro passo de purificação, visto que a levedura secreta baixos níveis das suas próprias proteínas enquanto a proteína heteróloga é predominante no meio de cultura (Cereghino & Cregg, 2000).

Técnicas de colunas cromatográficas, principalmente de troca iônica e filtração em gel, são as mais utilizadas para a purificação de xilanases, mas também podem ser utilizadas colunas cromatográficas de interação hidrofóbica. Há relatos de purificação de xilanases, entretanto, o rendimento e a taxa de purificação variam em diferentes casos (Tabela 1) (Carvalho, 2003). Em todos os casos, o sobrenadante da cultura é inicialmente concentrado utilizando técnicas de precipitação ou ultrafiltração e posteriormente fracionado em uma seqüência de colunas cromatográficas até a purificação final (Subramaniyan & Prema, 2002).

Em diversos trabalhos que obtiveram a expressão heteróloga de xilanases em *P. pastoris* (Berrin *et al*., 2000; Damaso *et al*., 2003; Tanaka *et al*., 2004; Cheng *et al*., 2005; Chantasingh *et al*., 2006; Deng *et al*., 2006; Liu *et* al., 2006; Sun *et al*., 2007) a purificação das xilanases recombinantes foi obtida empregando diferentes protocolos de purificação. Nestes trabalhos foram utilizados os seguintes protocolos para a concentração da amostra:

• Precipitação com sulfato de amônio (Berrin *et al*., 2000; Deng *et al*., 2006; Liu *et al*., 2006; Sun *et al*., 2007; Zhang *et al*., 2007).

• Ultrafiltração (Tanaka *et al*., 2004; Cheng *et al*., 2005).

• Liofilização (Damaso *et al*., 2003).

Posteriormente as xilanases recombinantes foram purificadas com a utilização de cromatografia de troca iônica e gel filtração e coluna de afinidade, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 1: Purificação de xilanases de diferentes fungos.

Microrganismo	**MM kDa**	**F.P**	**R (%)**	**Referência**
Aspergillus awamori	39	-------	------	Kormelink *et al*., (1993)
	23	-------	------	Kormelink *et al.*, (1993)
	26	-------	------	Kormelink *et al.*, (1993)
A. pullulans Y-2311-1	25	5,8	10,3	Li *et al*., (1993)
A. pullulans	21	38	6,3	Vadi *et al*., (1996)
Cephalosporium sp.	35	17,3	9,9	Kang *et al*., (1996)
	24	22,9	15,0	Kang *et al*., (1996)
Erwinia chrysanthemi	42	19,9	3,12	Braun & Rodríguez (1993)
Humicola insolens	6,0	-------	-----	Dusterhoft *et al.*, (1997)
	21	-------	-----	Dusterhoft et *al*.,(1997)
Penicillium purpurogenum	33	15,8	5,7	Belancic *et al*., (1995)
	23	5	4,3	Belancic *et al*., (1995)

Trichoderma longibrachiatum	37,7	55,8	5,1	Chen *et al*., (1997)
T. viride	22	16	12,5	Ujiie et al., 1991
T. harzianum	20	7,5	------	Tan et al (1985)

F.P- fator de purificação; R- rendimentos

Fonte: Carvalho (2003)

Tabela 2: Rendimento e colunas usadas na purificação de xilanases expressas em *P. pastoris*.

Xilanase recombinante	Cromatografia	F. P	R (%)	Referência
T. fusca	Sepharose CL-6B	6,9	23	Cheng *et al.*, (2005)
A. terreus	Superose 12 GL	1,3	84,4	Chantasingh *et al*., (2006)
A. niger	DEAE-sephadex A-50	3,8	-------	Deng *et al.*, (2006)
T. lanuginosus	Superdex G-75 HR	--------	--------	Damaso *et al.*, (2003)
A. niger	Sephacryl S -300	2,7	21,5	Berrin *et al.*, (2000)
A. pullulans	Q-sepharose HP Superdex 75 pg	--------	27,9	Tanaka *et al*., (2004)
P. cucumerina	DEAE-biosephar Fast-Flow	--------	--------	Zhang *et al*., (2007)
S. acidophilum	Matrix TAXI.	--------	--------	Balaa *et al*., (2006)
A. niger	Sephadex G-100	4,1	------ --	Liu *et al*., (2006)
Thermonospora fusca	Sephadex G-100	--------	--------	Sun *et al*., (2007)

F.P- fator de purificação; R- rendimentos

1.5. *HUMICOLA GRISEA VAR. THERMOIDEA*

Várias espécies do gênero *Humicola* têm sido isoladas do solo, de compostagem e madeira em decomposição (White & Dooowning, 1953; Tansey, 1971; Abou-Heilah, 1985). A maioria dos trabalhos descritos sobre esse gênero

trata da capacidade de degradação da celulose apresentada por algumas de suas espécies, como *Humicola grisea* var. *thermoidea* (Fergus, 1969; Tansey, 1971; Yoshida, 1982). Em 1982, foi isolada uma linhagem de *H. grisea* var. *thermoidea* por Chaves a partir de compostagem (Universidade Federal de Viçosa/UFV). Diversos trabalhos têm sido realizados no Brasil utilizando essa linhagem e tem sido demonstrado que o fungo tem a capacidade de produzir várias enzimas termoestáveis, como celulases, β- glicosidases, xilanases, amilases, trealases, β-xilosidase, entre outras (Azevedo *et al.*, 1990; Monti *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 1991; Araújo *et al.*, 1993; Cardello *et al.*, 1994; Almeida *et al.*, 1995 Peralta *et al.*, 1997)

1.5.1. Sistema Xilanolítico do fungo termofílico *H. grisea*

O fungo *H. grisea* produz um "pool" enzimático com atividade xilanolítica quando crescido em vários substratos como: bagaço de cana de açúcar, sabugo de milho, farelo de trigo, palha de cereal, além de substratos menos complexos como a xilana. Nos trabalhos realizados por Monti e colaboradores (1991) e Rana e colaboradores (1996) com o fungo *H. grisea* foram caracterizadas quatro endoxilanases extracelulares com massa molecular de 13, 23, 25 e 95 kDa.

Faria (2000) e Moraes e colaboradores (2002) identificaram a presença de três xilanases de massa molecular de 23, 25 e 35 kDa de *H. grisea* no sobrenadante de cultura do fungo cultivado na presença de bagaço de cana de açúcar e palha de cereal.

Carvalho (2003) purificou e caracterizou a xilanase de 23 kDa obtida de bagaço de cana de açúcar, com uma etapa de cromatografia de troca iônica ("Q-Sepharose") e posteriormente uma cromatografia de filtração em gel ("Sephacryl S-100™"). O procedimento de purificação obteve 4,4 % de recuperação e a enzima apresentou temperatura ótima de 65 °C, pH ótimo de 5,5 e pI de 6,5.

Mandalari e colaboradores (2007) detectaram a produção de xilanases e feruloil esterases com o crescimento do fungo *H. grisea* em meio de cultura utilizando resíduos industriais da fabricação de cerveja e da indústria de farinha de trigo.

Em trabalho realizado por Lucena-Neto & Ferreira-Filho (2004) foi verifado que o fungo *H. grisea* secreta xilanases quando cultivado em meios sólido e

líquido, contendo farelo de trigo e engaço de bananeira como substratos, respectivamente. Nesse trabalho foi purificada e caracterizada uma nova xilanase de 29 kDa, nomeada de X2, obtida do meio sólido de farelo de trigo. No processo de purificação foi observada a presença de pelo menos 5 picos com atividade xilanolíticas. A xilanase apresentou uma temperatura ótima de 55-60 °C e atividade em faixa ampla de pH (4,5-6,5). A enzima reteve 50% de sua atividade após 5,5 h em 60 °C, mas apresentou pequena atividade em CMC.

Monti e colaboradores (2003) purificaram uma xilanase do *H. grisea*, de massa molar aparente de 61,8 kDa, usando o método de eletroeluição, através de gel de eletroforese não desnaturante, complementando os resultados descritos por Monti e colaboradores (1991) que relataram a existência de duas xilanases, e purificaram apenas a xilanase predominante de 25,5 KDa.

A capacidade de degradação da xilana pela xilanase (xyl II) de *H. grisea* foi investigada através da hidrólise da polpa Kraft e sulfite. A hidrólise da polpa Kraft foi acompanhada de liberação de xilobiose e xilohexose enquanto a ação da enzima na polpa sulfite gerou uma mistura de xilobiose, xilopentose e xilooligossacarídeos de alta massa molecular, sugerindo que essa enzima age por meio de um mecanismo do tipo endo (Silva *et al*., 2000).

Salles e colaboradores (2004) purificaram uma endoxilanase de *H. grisea* de 25 kDa (xyn III) produzida por engaço de bananeira, utilizando uma estratégia de purificação que compreendeu a concentração do material por liofilização, ultrafiltração e colunas de cromatografia de gel filtração e troca iônica . A enzima purificada foi utilizada no tratamento de polpa kraft de celulose obtida de eucaliptos, e foi demonstrada a capacidade da enzima em alterar morfologicamente as fibras de celulose da polpa e a liberação de materiais cromóforos.

Almeida e colaboradores (1995) purificaram e caracterizaram bioquímicamente uma β xilosidase de 43 kDa, de pH ótimo de 6,0 e temperatura ótima de 50 °C. Lembo e colaboradores (2006) descreveram a produção, purificação e caracterização parcial de uma nova β xilosidase associada ao micélio do fungo *H. grisea*, a enzima apresentou temperatura ótima de 55 °C, pH ótimo de 6,5 e 55 % de retenção de atividade após 4 h de incubação em 55 °C.

1.5.2. Genes de xilanase do *H. grisea*

Em trabalho realizado por Iikura e colaboradores (1997) foi isolado o gene *xyn*1 de *H. grisea*. Este gene codifica uma xilanase com 429 resíduos de aminoácidos e massa molecular predita de 47 kDa. A proteína XYN1 apresenta um domínio de ligação à celulose (CBD) e homologia com xilanases da família F/10. O gene *xyn*1 foi expresso quando o fungo foi cultivado na presença de xilana e celulose microcristalina (Avicel) e reprimido na presença de glicose.

Em trabalho realizado por Faria (2000) foi clonado e caracterizado o gene *Hxyn2*. O gene *Hxyn2* possui uma região codificadora composta de três exons com 278, 331 e 75 pb e dois íntrons com 74 e 75 pb, totalizando 815 pb. A seqüência de aminoácidos predita de HXYN2 descreve uma proteína com 227 resíduos de aminoácidos, massa molecular estimada em 23 kDa e um possível sítio de N-glicosilação. A partir da seqüência de aminoácidos predita foi construído o modelo tridimensional de HXYN2, o qual apresentou alta identidade com endoxilanases fúngicas termoestáveis da família G/11 (Figura 8) (De Freitas *et al.*, 2003).

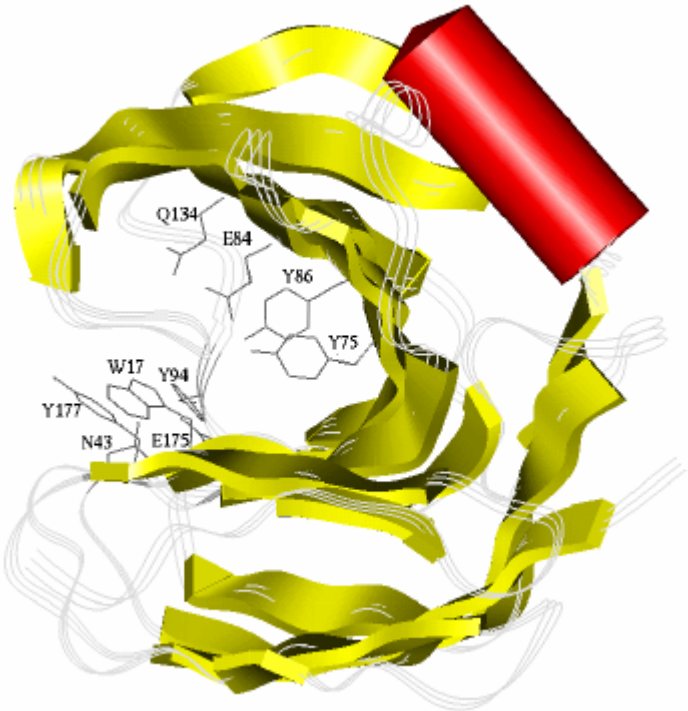


Figura 8: Modelo tridimensional da xilanase HXYN2. A enzima lembra uma mão semi-aberta contendo principalmente folhas beta (amarelas) e uma alfa-hélice (vermelho)
Fonte: De Freitas *et al.*, (2003).

1.5.3. Expressão heteróloga do gene *Hxyn2*

O gene H*xyn*2 foi inicialmente expresso em *E. coli*, neste sistema a proteína HXYN2 recombinante (HXYN2r) foi produzida fusionada a enzima glutationa S-transferase (GST) e apresentou atividade contra xilana extraída de aveia. Entretanto, a maior parte da proteína recombinante foi precipitada intracelularmente como corpo de inclusão, dificultando a purificação e posterior caracterização de HXYN2 a partir de células bacterianas (Faria, 2000).

A proteína HXYN2 expressa em *T. reesei* apresentou atividade contra xilana extraída de aveia e massa molecular de 25 kDa (Bergquist *et al.,* 2002a , 2002 b, 2002c), entretanto, a metodologia de produção de proteínas heterólogas em *T. reesei* ainda não está otimizada o que limitou os estudos a partir desse modelo.

Com objetivo de produzir, purificar e caracterizar a xilanase HXYN2, o gene *Hxyn*2 foi expresso na levedura *P. pastoris*. Para a expressão heteróloga o cDNA correspondente ao gene (cDNA-xyn2) foi obtido por RT-PCR, clonado no vetor de expressão pHILD2 (pHILD2-xyn2) e introduzido em células de *P. pastoris* por eletroporação. Os transformantes foram selecionados quanto à estabilidade genética, caracterização do fenótipo Mut^s e capacidade de produzir e secretar a enzima HXYN2r para o meio de cultura na forma ativa (Banhe *et al*., 2004).

Em trabalho realizado por Carvalho e colaboradores (2005) a produção da enzima HXYN2r expressa em *P. pastoris* foi analisada, por atividade em placa, após cultivo da levedura em meios de cultura com variações da fonte de nitrogênio. O meio de cultura contendo combinações de uréia, extrato de levedura e peptona apresentou os maiores halos de hidrólise. Posteriormente foi realizado um planejamento fatorial 2^3 para avaliar a influência da densidade celular inicial, concentração de metanol e fonte de nitrogênio na produção da

enzima em frasco. Dos fatores analisados a densidade celular inicial foi o fator que mais influenciou a produção de HXYN2 pela levedura.

Moriya e colaboradores (2005) testaram a aplicação da xilanase HXYN2 recombinante produzida pela *P. pastoris* no biobranqueamento da polpa Organosolv obtida de bagaço de cana-de-açúcar em comparação com uma enzima utilizada comercialmente. Foi verificada que a enzima pode ser utilizada como alternativa comercial para o branqueamento já que a mesma não afetou a viscosidade da polpa e reduziu pouco o número Kappa.

Em trabalho realizado por Carvalho e colaboradores (2007) a enzima HXYN2 recombinante foi purificada a partir do sobrenadante de cultura da levedura *P. pastoris* utilizando apenas um passo de purificação. O sobrenadante de cultura foi concentrado por liofilização e posteriormente aplicado em uma coluna de gel filtração (Sephacryl S-100™ de alta resolução", Amersham®, 87x1,5 cm). A 50 ºC a enzima manteve 100% de sua atividade após 180 min de incubação, quando incubada a 60 °C a enzima apresentou meia vida de 20 min. A atividade enzimática não foi alterada na presença da enzima em pH de 5,5 ; 6,5 e 7,5 e na temperatura ambiente por 240 min. A atividade e o pH ideal da enzima foi respectivamente 6,5 e 60 °C. A xilanase HXYN2 apresentou estabilidade frente a diversas soluções de íons, a atividade enzimática foi reprimida por cloreto de mercúrio II, cloreto de manganês e por SDS, e induzida por glicose e sulfato de magnésio.

Como descrito anteriormente as xilanases apresentam grande potencial biotecnológico, diante disto, o projeto visa à produção, purificação e aplicação em testes de panificação da xilanase HXYN2 recombinante produzida pela levedura *P. pastoris*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho consiste em produzir, purificar e aplicar em testes de panificação a endo-xilanase recombinante (HXYN2r).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

• Produzir endo-xilanase HXYN2r por meio de cultura da levedura *P. pastoris* em frasco por fermentação submersa.

• Purificar a enzima HXYN2r por meio de técnicas de cromatografia e de tratamento térmico.

• Avaliar a influência da adição da adição de diferentes concentrações da enzima HXYN2r na massa do pão e o aumento de volume específico dos mesmos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1 Linhagem utilizada e Cultivo dos transformantes

O transformante da levedura *P. pastoris* GS115-xyn2 (transformado com o vetor pHILD2-xyn2) e o controle negativo (transformado com o vetor pHILD2) foram utilizados neste trabalho para a produção da xilanase recombinante HXYN2r, segundo metodologia descrita por Carvalho e colaboradores (2005).

Para a preservação das células de *P. pastoris*, a cada três meses, estas foram repicadas em meio YPD sólido, incubadas por três dias a 30 °C e posteriormente mantidas a 4 °C. Para a seleção das células que mantêm o cassete de expressão integrado no genoma, a cada seis meses estas foram repicadas em meio de seleção (meio mínimo sem histidina) e incubadas a 30°C por três dias.

3.1.2. Meios de cultura

Os meios de cultura foram esterilizados por autoclavação (120 °C, 1 atm, 20 min), a glicose foi autoclavada separadamente (20 min, 0,5 atm). As soluções de metanol, glicerol, biotina, ampicilina, foram esterilizadas por filtração em membrana com poros de 0,2 μm (Millipore®).

YPD (Extrato de levedura e glicose)

Peptona caseína	2 % (p/v)
Extrato de levedura	1 % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)
Ampicilina	50 μg/mL
Ágar bacteriológico	2 % (p/v)

BMGY-U/BMMY-U

Uréia	1,34% (p/v)
Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Fosfato de potássio pH 5,0	100 mM
Biotina	4 x 10^{-5} % (p/v)
Glicerol/Metanol	1% (p/v)
Ampicilina	50 µg/mL

MGM (Meio de cultura mínimo contendo glicerol)

YNB (Nitrogênio proveniente de levedura)	1,34 % (p/v)
Glicerol	1 % (p/v)
Biotina	4. 10^{-5} % (p/v)

3.1.3. Soluções estoque

Biotina 0,02% (p/v)

Biotina	20 mg
Água destilada (q.sp)	100 mL

Ampicilina 100 µg/mL

Ampicilina	1 g
Água destilada (q.sp)	10 mL

Glicerol 10% (v/v)

Glicerol	10 mL
Água destilada	90 mL

Metanol 50% (v/v)

Metanol	50 mL
Água destilada (q.s.p)	50 mL

3.1.4. Soluções para determinação da atividade enzimática

Tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8

Ácido cítrico 0,2 M	230 mL
Citrato trissódico 0,2 M	270 mL
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

Solução de Xilana 1% (p/v)

Xilana extraída de aveia (Sigma®)	1 g
Tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8	100 mL

Para a solubilização da xilana em água, esta foi aquecida em microondas por 3 min e posteriormente submetida à centrifugação a 3000 *g* por 15 min e filtrada em papel de filtro. O filtrado foi estocado a -20 °C e utilizado nos testes enzimáticos.

Solução de ácido dinitrosalicílico - DNS

Ácido dinitrosalicílico (DNS)	7,5 g
NaOH	14 g
Tartarato de sódio e potássio	216,1 g
Fenol	5,4 mL
Metabissulfito de sódio	5,8 g
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

Inicialmente, o DNS e o NaOH foram dissolvidos em água destilada. Posteriormente adicionou-se o tartarato de sódio e potássio, o fenol (aquecido a 50 ^{o}C) e o metabissulfito de sódio. A solução final foi titulada com HCl 0,1 M, usando fenolftaleína como indicador.

Solução de Xilose - 4,2 mg/mL

Xilose	0,21 g
Tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8	50 mL

3.1.5. Soluções para a quantificação de proteínas

Reagente de Bradford

"Coomassie Blue"	100 mg
Etanol 95% (v/v)	50 mL
Ácido Fosfórico	100 mL
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

Solução de Soroalbumina Bovina 100 µg/mL

Soro albumina Bovina (Sigma®)	1 mg
NaOH 0,1 M	10 mL

3.1.6. Soluções para a eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE)

Solução de Dodecil sulfato de sódio (SDS) – 10% (p/v)

SDS	10 g
Água destilada (q.s.p)	100 mL

Ácido tricloroacético (TCA)

O ácido tricloroácetico foi dissolvido em água destilada (q.s.p.) para a concentração de 99% (p/v).

Solução de Persulfato de amônio

Persulfato de amônio	10% (p/v)
Água destilada (q.s.p)	100 mL

Solução de Acrilamida / Bis – acrilamida (29:1)

Acrilamida	29 g
Bis-acrilamida	1 g
Água destilada (q.s.p)	100 mL

A solução foi preparada em água destilada, filtrada em papel de filtro Whatman n.1 e estocada a 4 °C.

Tampão de Corrida (Estoque)

Trizma Base	22,7 g
Glicina	112,5 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

Foi adicionado, no momento do uso, 1 mL de SDS 10% para cada 100 mL de tampão de corrida diluído 5 x com água destilada.

Gel Separador - 13% (p/v)

Acrilamida/bis 29:1	3 mL
Tris-HCl 1,5 M-pH 8,8	1,75 mL
Água destilada	1,4 mL
SDS 10% (p/v)	700 μL
Persulfato de amônio 10% (p/v)	140 μL
TEMED	7 μL

Gel Concentrador - 4% (p/v)

Acrilamida/bis 29:1	333 μL
Tris-HCL 1 M pH 6,8	250 μL
Água destilada	1,175 mL
SDS 10% (p/v)	200 μL
Persulfato de amônio 10% (p/v)	140 μL
TEMED	3 μL

Tampão de amostra

Tris-HCl 1 M-pH 6,8	2 mL
SDS 10% (p/v)	4 mL
β-mercaptoetanol	2 mL
Glicerol	2 mL
Azul de bromofenol	0,01 g

3.1.6.1. Soluções para a coloração de proteínas com azul de "Coomassie"

Solução Corante

Azul de Coomassie	0,5 g
Metanol	225 mL
Ácido acético glacial	50 mL
Água destilada q.s.p	500 mL

Solução Descorante

Metanol	150 mL
Ácido acético	35 mL
Água destilada q.s.p	500 mL

3.1.6.2. Soluções para a coloração de proteínas com Nitrato de Prata

Solução de Fixação

Metanol	500 mL
Ácido Acético Glacial	120 mL
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

No momento do uso, adiciona-se 1 µL de Formaldeído 37% (v/v) para cada 1 mL de solução usada.

Solução de Parada

Metanol	500 mL
Ácido Acético Glacial	120 mL
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

Solução de Tiossulfato de sódio

Tiossulfato de Sódio	20 mg
Água destilada (q.s.p.)	100 mL

Preparado no momento do uso.

Solução de Nitrato de prata

Nitrato de Prata	0,2 g
Formaldeído 37% (v/v)	75 µL

Água destilada (q.s.p.)	100 mL

Solução de Carbonato de Sódio 6% (p/v)

Carbonato de sódio	60 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

Solução de Revelação

Solução de Carbonato 6% (p/v)	98 mL
Solução de Tiossulfato de sódio	2 mL
Formaldeído 37% (v/v)	50 µL

Solução Descorante

Ferrocianeto de Potássio	1,56 g
Tiossulfato de Sódio	0,61 g
Carbonato de Sódio	0,33 g
Água destilada (q.s.p.)	100 mL

3.1.7. Soluções e material para o gel de atividade para xilanase (Zimograma)

Gel do zimograma

Para o preparo do gel de atividade adicionou-se 0,1% (p/v) de xilana extraída de aveia (Sigma®) em água ao gel separador 13% (p/v) (item 3.1.6).

Solução de Xilana 1% em água

Xilana extraída de aveia (Sigma®)	1 g
Água destilada q.s.p	100 mL

A solução de xilana foi preparada conforme descrito no item 3.1.4 substituindo o tampão citrato 50 mM pH 5 pela água destilada.

Triton X-100 10%

A solução foi preparada em água bidestilada.

Tampão MES (ácido 2-[N-Morfolino] etanosulfônico)

MES	100 mM
pH 6,0	

A solução foi preparada em água bidestilada.

Solução de Vermelho de Congo

Vermelho de Congo	1 g
Água destilada (q.s.p)	100 mL

3.1.8. Soluções para a purificação

Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 7,0

Trizma Base	60,5 g
Água destilada(q.s.p)	1000 mL

O pH foi acertado com HCl fumegante.

Tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0

Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 7,0	20 mL
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

Tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0

Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 7,0	100 mL
Água destilada (q.sp)	1000 mL

Tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0 adicionado de NaCl 0,1 M

Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 7,0	100 mL
NaCl	5,84 g
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

3.1.9. Soluções utilizadas no tratamento térmico

Tampão Fosfato de potássio 0,5 M pH 7,0

Fosfato de potássio monobásico 1 M	430 mL
Fosfato de potássio dibásico 1 M	680 mL
Água destilada (q.s.p)	2000 mL

Tampão Fosfato de potássio 10 mM pH 7,0

Tampão Fosfato de potássio 0,5 M pH 7	20 mL
Água destilada q.s.p	1000 mL

3.1.10. INGREDIENTES PARA OS TESTES DE PANIFICAÇÃO

Formulação da massa (Pão de forma)

Farinha de trigo	1000 g
Cloreto de sódio	20 g
Açúcar	60 g
Margarina	80 g
Fermento seco	14 g
Leite em pó	20 g
Água gelada	500 mL

Para os testes de panificação foram utilizados os ingredientes com as seguintes especificações: 1. farinha de trigo especial para panificação Soberana (BUNGE), 2. sal comum (Cisne), 3. açúcar cristal (Ecoçucar), 4. leite em pó integral (Itambé), 4. Margarina (Qualy) e 5. fermento biológico instantâneo seco do tipo Fermipan red (GB Ingredients).

3.1.11. Marcador de Massa Molecular (MMM)

Para os experimentos de eletroforese em gel desnaturante de proteína (SDS-PAGE) foi utilizado o marcador de massa molecular (Fermentas Life Sciences®) com os seguintes padrões:

ß-galactosidase de *E. coli*	116,0 kDa
Soroalbumina bovina	66,2 kDa

Ovoalbumina de ovo branco de galinha	45,0 KDa
Lactato desidrogenase de músculo de porco	35,0 kDa
RNAse Bsp98l de *E. coli*	25,0 kDa
ß-lactoglobulina de leite bovino	18,4 kDa
Lisozima de ovo branco de galinha	14,4 kDa

3.1.12. Amostras enzimáticas comerciais

Nos testes de panificação foi utilizada como controle positivo a amostra enzimática comercial, contendo xilanase, Pentomax 191 (Prozyn Biosolutions).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Produção da enzima HXYN2r em frasco de 250 mL

Para a produção da enzima HXYN2r em frasco de 250 mL, o transformante de *P. pastoris* foi inoculado no meio BMGY-U, incubado a 30 ºC sob constante agitação (180 rpm) até atingir a OD ideal. As culturas do foram precipitadas por centrifugação a 3000 *g* por 15 min, lavadas com água destilada estéril, ressuspensas em água destilada estéril e inoculadas no meio BMMY-U. As culturas foram incubadas a 30 ºC sob constante agitação (180 rpm) durante 96 h. A cada 24 h adicionou-se 1% de metanol ao meio de cultura e foram retiradas alíquotas para o monitoramento do crescimento celular (leitura espectrofotométrica a 600 nm), dosagem de proteínas totais (Bradford, 1976), perfil de proteínas por SDS-PAGE (Laemli, 1970) e dosagem da atividade xilanolítica pelo método de açúcares redutores – DNS (Miller, 1959). As dosagens de atividade xilanolítica e proteínas totais foram realizadas em triplicata. Após 96 h a cultura foi submetida à centrifugação (3000 *g*, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante de cultura foi armazenado a – 20 °C. Nos experimentos de produção o controle negativo foi cultivado nas mesmas condições.

3.2.2. Dosagem da atividade xilanolítica pelo teste de DNS

A atividade xilanolítica foi determinada pelo método de detecção de açúcares redutores liberados a partir da xilana "oat-spelt" – DNS (Miller, 1959). Este ensaio foi realizado utilizando-se como substrato a solução de xilana extraída de aveia 1% (p/v) (item 3.1.4). Adicionou-se 50 μL da amostra em 450 μL do substrato seguindo-se incubação a 50 ºC por 30 min. A quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método do DNS, onde foi adicionado 750 μL de DNS (item 3.1.4), as amostras foram fervidas por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm. Os resultados foram expressos em unidades enzimáticas, definidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto sobre as condições do experimento.

Para a determinação da atividade de HXYN2r pelo método de DNS, primeiramente foi realizada uma curva padrão de xilose nas concentrações de 0,3 a 4,2 mg/mL.

3.2.3. Dosagem protéica

A concentração de proteínas das amostras foi determinada por método colorimétrico conforme descrito por Bradford (1976). A curva de calibração padrão foi determinada utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA-Sigma®). Neste método, 100 μL de amostra foi homogeneizado com 1 mL de Reagente de Bradford e, após incubação a temperatura ambiente por 15 min, a quantidade de proteína foi determinada por leitura de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

A concentração de proteínas também foi monitorada por leitura de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm.

3.2.4. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida

3.2.4.1. Precipitação de proteínas por TCA

As amostras a serem analisadas no gel de poliacrilamida (0,9 mL) foram incubadas com 0,1 mL de TCA 99% (p/v) (item 3.1.6) por 1 h a 4 °C em banho de gelo e água. Após a incubação, as amostras foram submetidas à

centrifugação (10 min, 10000 *g*, 4 ºC), o precipitado foi lavado com acetona gelada, seco e ressuspenso em tampão de amostra.

3.2.4.2. Concentração das amostras por liofilização

Para a liofilização, inicialmente as amostras foram dialisadas contra tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 ou tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 por 24 h e posteriormente liofilizados em alíquotas de 1 mL.

3.2.4.3. Corrida eletroforética

As amostras a serem analisadas no gel de poliacrilamida foram preparadas como descrito acima, ressuspensas em tampão de amostra e fervidas por 5 min. A corrida eletroforética foi conduzida em tampão de corrida (1x) acrescido de 0,1% de SDS com voltagem de 100 V, as amostras foram preparadas como descrito acima, fervidas por 5 min, resfriadas em banho de gelo e posteriormente aplicadas em gel de poliacrilamida (itens 3.1.6 e 3.1.7). Foi utilizado o sistema de eletroforese vertical.

Após o término da eletroforese o gel foi corado com Solução Corante de Azul de Coomassie ou pela coloração com prata pelo Método de Blum *e* colaboradores (1987).

3.2.4.4. Coloração com nitrato de prata

Após a corrida, as bandas protéicas presentes no gel foram reveladas utilizando-se o método descrito por Blum e colaboradores (1987). O gel foi incubado, sob agitação, por 1 h na solução fixadora, em seguida, por 20 min na solução de lavagem, por 3 vezes. Após as lavagens o gel foi incubado na solução de tiossulfato de sódio por 1 min, em água destilada durante 20 seg por duas vezes e, em seguida, incubado por 20 min na solução de nitrato de prata. Novamente o gel foi lavado com água destilada por duas vezes de 2 min cada e revelado com a solução de revelação (item 3.1.6.2). A reação foi interrompida, após o aparecimento das bandas, transferindo-se o gel para a solução de parada.

3.2.4.5. Análise da secreção de HXYN2r por densitometria

Para a quantificação da enzima HXYN2r presente no sobrenadante de cultura, a amostra protéica foi aplicada em SDS-PAGE (3.2.4), o gel foi corado com "Coomassie blue", fotografado utilizando o sistema DNR Minibis e a intensidade da banda correspondente à enzima foi analisada por densitometria utilizando o software Image-J (http://rsb.info.nih.gov/ij/). Como controle para o teste utilizou-se uma solução padrão de BSA de 161 mg/L.

3.2.5. Purificação da proteína HXYN2r

Para a purificação da enzima HXYN2r, inicialmente as proteínas do sobrenadante de cultura após 96 h de indução (S96) foram concentradas por liofilização e posteriormente fracionadas por cromatografia de gel filtração.

3.2.5.1. Concentração da amostra para o fracionamento das proteínas em cromatografia

A liofilização foi o método escolhido para a concentração das proteínas para posterior fracionamento em coluna de gel filtração, conforme trabalho de Carvalho e colaboradores (2007)

Inicialmente, o sobrenadante de cultura resultante da produção da enzima HXYN2r em frasco foi dialisado (Saco de diálise-25 x 16 mm, poro com 25 Å de diâmetro) contra tampão Tris 10 mM pH 7,0 por 24 h, após a diálise as proteínas foram concentradas por liofilização e ressuspensas em tampão Tris 50 mM pH 7,0 para uma concentração equivalente a 1500 U de enzima, obtendo o extrato enzimático. O material resultante de cada processo foi monitorado pela atividade enzimática pelo método de açúcares redutores (DNS) e o método de concentração de proteínas descrito por Bradford (1976).

3.2.5.2. Fracionamento das proteínas em cromatografia de peso molecular

O extrato enzimático (1,0 mL) foi aplicado na coluna de cromatografia ("Sephacryl S-100™ High Resolution", Amersham®, 87x1,5 cm) equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 adicionado de NaCl 0,1 M. O extrato foi eluído a uma vazão de 0,5 mL/min, utilizando-se como eluente, o tampão Tris adicionado de NaCl 0,1 M. Foram coletadas 50 frações de 2 mL, a partir do volume de 140

mL (V0 = 140 mL), e todas frações foram analisadas quanto à concentração protéica por leitura de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm e a cada 3 frações quanto à atividade enzimática pelo método de açúcares redutores (item 3.2.2).

As frações com atividade xilanolítica foram reunidas e analisadas quanto ao perfil de proteínas em SDS-PAGE (item 3.2.4).

3.2.5.3. Purificação parcial por tratamento térmico

O sobrenadante de cultura obtido da produção da enzima HXYN2r foi incubado a 60 °C por 45 min. As proteínas desnaturadas foram precipitadas por centrifugação (10000 *g* por 10 min). O sobrenadante foi dialisado contra tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 por 24 h e concentrado por liofilização. O extrato obtido foi ressuspenso e analisado quanto ao perfil de proteínas em SDS-PAGE (item 3.2.4). As amostras enzimáticas obtidas em cada etapa da purificação foram monitoradas quanto à atividade enzimática por DNS (item 3.2.2) e quantificação de proteínas por Bradford (item 3.2.3).

O sobrenadante de cultura obtido do cultivo do controle negativo foi submetido ao tratamento térmico nas mesmas condições citadas acima.

3.2.6. Preparo das amostras para aplicação em testes de panificação

A enzima HXYN2 purificada proveniente da cromatografia (S100) foi dialisada contra tampão Tris 10 mM pH 7,0 por 24 h, concentrada por liofilização e ressuspensa em água destilada. A amostra foi analisada quanto à atividade xilanolítica pelo método de DNS (item 3.2.2) e diluída de acordo com a concentração enzimática necessária para os testes de panificação. A amostra foi adicionada na formulação juntamente à água.

A enzima HXYN2r parcialmente purificada proveniente do tratamento térmico (item 3.2.5.3) foi ressuspensa em água, analisada quanto á atividade xilanolítica pelo método de DNS (item 3.2.2) e diluída de acordo com a concentração enzimática necessária para os testes de panificação. A amostra foi adicionada na formulação juntamente à água.

Foi utilizado como controle negativo o transformante de *P. pastoris* com o pHILD2 sem o gene *Hxyn*2 (C4). O transformante C4 foi cultivado sob indução com metanol por 96 h (item 3.2.1). Foi verificado pelo método do DNS que o transformante não produz xilanase no meio de cultura. O sobrenadante de cultura do C4 foi submetido ao mesmo tratamento térmico que o sobrenadante de cultura contendo HXYN2r (item 3.2.5.3). A amostra do controle negativo resultante do tratamento térmico foi ressuspensa em água para o mesmo volume utilizado para a diluição da enzima parcialmente purificada. A amostra foi adicionada na formulação juntamente à água.

A amostra enzimática comercial Pentomax 191 (Prozyn Biosolutions) foi diluída em água e analisada quanto à atividade enzimática por DNS (item 3.2.2) e perfil de proteínas por SDS-PAGE (item 3.2.4). Para a aplicação desta amostra nos testes de panificação como controle positivo, foi utilizada 10 g da amostra por quilo de farinha de trigo, o que corresponde a 3000 U de xilanase/kg de farinha de trigo.

3.2.7. Teste de panificação:

Nos experimentos de panificação, o preparo dos pães e a análise de umidade foram realizados na Unidade de panificação da Escola SENAI/Vila Canaã sob a orientação da pesquisadora Maria do Livramento de Paula e com a ajuda do técnico em panificação Julimar Assunção e da aluna de iniciação científica Natália de Sousa Resio. A análise do volume dos pães foi realizada em colaboração com o Prof. Marcio Caliari da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos - UFG. O preparo dos pães foi realizado em escala de padaria utilizando 1 Kg de farinha de trigo em cada preparação.

Para a análise estatística dos experimentos de panificação estes foram realizados de acordo com o Delineamento Inteiramente Casual (DIC), considerando cada pão como uma unidade experimental. Os experimentos estão indicados abaixo:

1) Para o ensaio da aplicação da endo-xilanase HXYN2r purificada utilizou-se DIC com 3 tratamentos e 6 repetições. As dosagens enzimáticas testadas foram: Controle (sem enzima), 45 U/Kg e 90 U/Kg de farinha de trigo.
2) Para o ensaio da aplicação da endo-xilanase HXYN2r parcialmente purificada nas concentrações de 500-6000 U utilizou-se DIC com 5 tratamentos e 6 repetições. As dosagens enzimáticas testadas foram: Controle (sem enzima), 500, 1500, 3000 e 6000 U/kg de farinha de trigo.
3) Para o ensaio da comparação da suplementação de HXYN2r e xilanase comercial em panificação utilizou-se DIC com 4 tratamentos e 6 repetições. Os tratamentos utilizados foram: Controle (sem enzima), C4, xilanase HXYN2r e xilanase comercial.

Foram calculadas as médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos dados obtidos para o volume específico dos pães. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System). Para a comparação entre as médias, foi utilizado o Teste de Tukey ao nível de significância de 5% e 1% de probabilidade de erro. Para o ensaio de aplicação de diferentes dosagens da enzima HXYN2r parcialmente purificada além das análises referidas acima , os dados foram submetidos a análise de regressão.

O preparo dos pães constituiu-se nas seguintes etapas:

- Mistura dos ingredientes até o ponto de véu por 4 min a 286 rpm utilizando amassadeira AR 15 G Paniz.
- Divisão da massa em amostras de 300 g (4 amostras)
- Descanso das amostras por 10 min
- Modelagem utilizando modeladora de pães MPS 350 G.Paniz.
- Fermentação a 38 °C por 1 h e 15 min em armário de fermentação.
- Cozimento por 12 min a 170-180 °C em forno TEDESCO FLEX .

Os pães obtidos com a adição da enzima HXYN2r na massa e os pães-controle foram analisados segundo metodologia descrita a seguir:

3.2.7.1. Volume específico

O volume específico foi determinado pelo método de deslocamento de sementes de painço (Silva *et al*., 1998). O pão a ser analisado foi colocado no centro de uma caixa de isopor, a qual foi preenchida com as sementes. O volume de sementes de painço presente na caixa de isopor, com e sem a presença do pão, foi medido através de proveta. Para cada amostra foi determinado o volume em cinco repetições. O volume específico dos pães foi calculado no dia posterior ao da realização dos testes de panificação conforme a seguinte equação:

Volume específico (cm^3/g) = Volume do pão (cm^3) /massa do pão (g)

Volume do pão = Volume da caixa de isopor (cm^3) - Volume da caixa com o pão (cm^3)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No intuito de verificar a ação da endo-xilanase HXYN2 recombinante (HXYN2r) do fungo *H. grisea* em testes de panificação, o presente trabalho se dividiu nas seguintes etapas: 1. Produção da enzima HXYN2r pela levedura *P. pastoris* por fermentação submersa; 2. Purificação da enzima HXYN2r por cromatografia e 3. Aplicação da enzima HXYN2r em testes de panificação para analisar a correlação entre a adição da enzima na massa e aumento de volume do pão.

4.1. PRODUÇÃO DA ENZIMA HXYN2r

Para a produção e secreção da enzima HXYN2r pelas células de *P. pastoris*, estas foram cultivadas sob indução com metanol nas condições já descritas por Carvalho e colaboradores (2005) (item 3.2.1).

Para o monitoramento da produção de HXYN2r, foram retiradas alíquotas do cultivo a cada 24 h e analisadas quanto ao número de células de levedura (item 3.2.1), perfil de proteínas no meio de cultura (itens 3.2.3, 3.2.4) e dosagem da atividade xilanolítica (item 3.2.2). As dosagens de atividade xilanolítica e de proteínas totais foram realizadas em triplicata e os resultados são apresentados na Figura 9.

Observa-se pela análise do gráfico da Figura 9 que a levedura *P. pastoris* apresentou uma taxa de crescimento celular baixa quando cultivada no meio de indução, resultado compatível com o fenótipo Mut^s do transformante. Já as dosagens da concentração de proteínas e atividade xilanolítica apresentaram aumento acentuado durante a indução, resultado esperado para a produção e secreção da enzima HXYN2r pela levedura. No trabalho de Carvalho e colaboradores (2005) foi realizada a cinética de produção de HXYN2r em frasco, e o resultado obtido indicou que a produção máxima da enzima ocorreu após 96 h de indução. No presente trabalho a produção da enzima HXYN2r foi realizada até 96 h onde se obteve 249,8 µg/mL de proteínas e 675 U/mL de xilanase. A atividade enzimática obtida está de acordo com trabalhos que descrevem a expressão de outros genes de xilanase em *P. pastoris*, nos quais se obtiveram

de 38 U/mL a 362 U/mL (Berrin *et al*., 2000; Damaso *et al*., 2003; Tanaka *et al*., 2004; Cheng *et al*., 2005; Balaa *et al*., 2006; Chantasingh *et al*., 2006; Deng *et al*., 2006; Korona *et al*., 2006; Zhang *et al*., 2007)

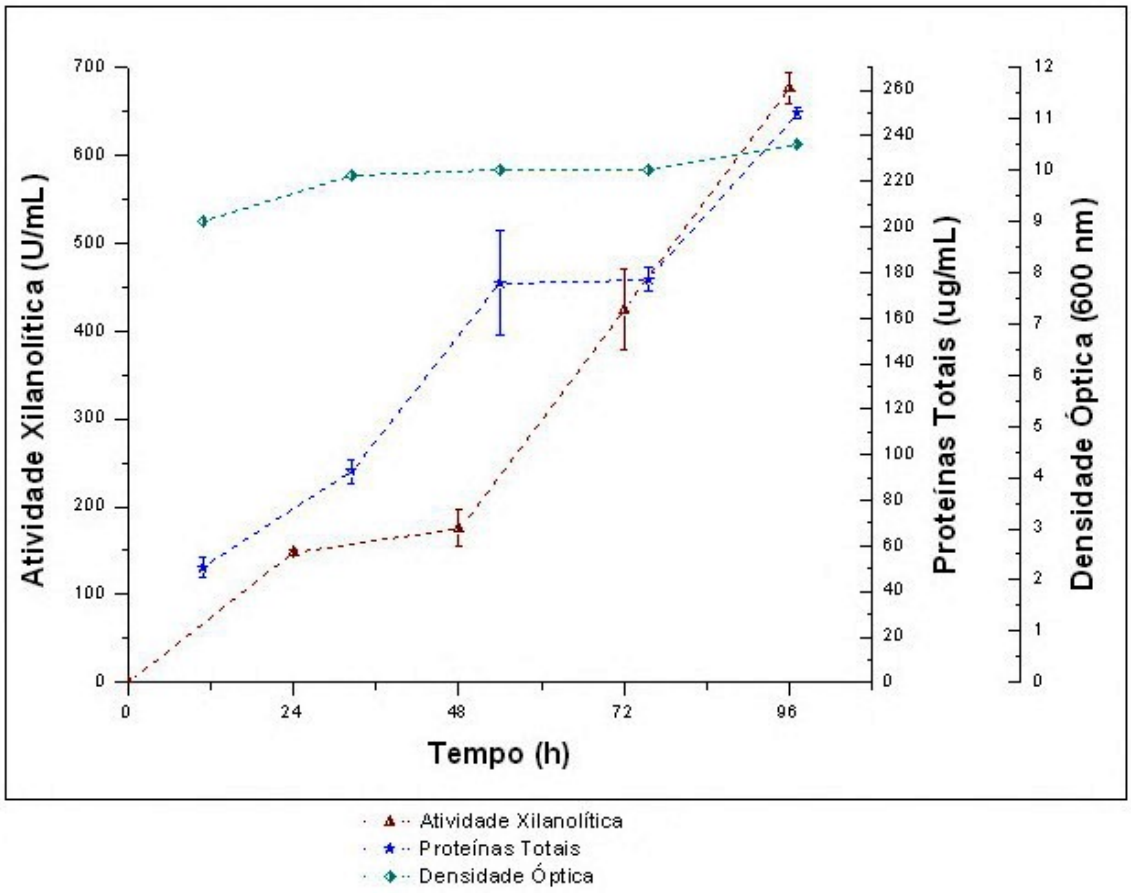


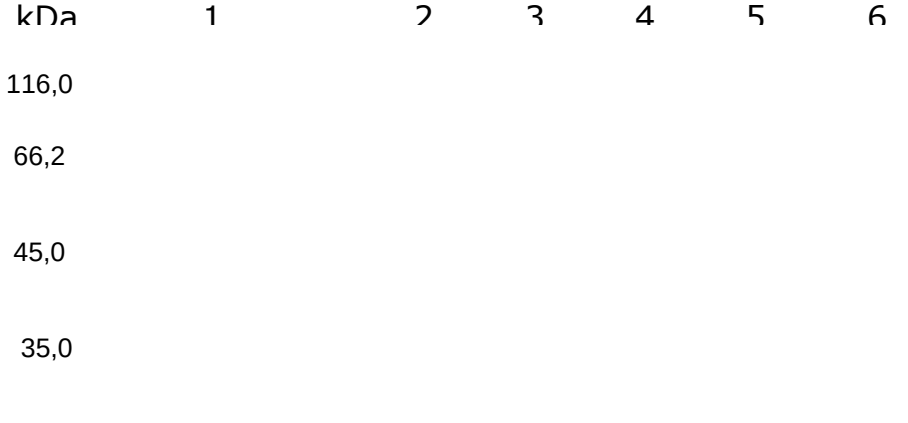
Figura 9: Cinética da produção da enzima HXYN2r por fermentação submersa.

A produção de HXYN2r pela levedura *P. pastoris* após a otimização do meio de cultura foi aproximadamente 17 vezes superior à atividade máxima obtida no trabalho realizado por Banhe e colaboradores (2004), no qual se obteve 40 U/mL com o mesmo transformante. Quando se compara a produção de HXYN2r pela *P. pastoris* com a produção de xilanases totais pelo fungo *H. grisea* (Carvalho, 2003) observa-se um aumento de 47 vezes.

A figura 10 apresenta o perfil de proteínas no sobrenadante de cultura do transformante de *P. pastoris* durante a indução. Verifica-se uma banda protéica de aproximadamente 23 kDa após 24 h de indução com máximo de intensidade

após 96 h de cultivo. Estes resultados indicam que a banda de 23 kDa observada durante a indução representa a enzima HXYN2r.

A concentração da enzima HXYN2r no sobrenadante de cultura após 96h de indução foi estimada por densitometria (item 3.2.4.5). Os resultados indicam que a endo-xilanase HXYN2r foi secretada para o meio de cultura na concentração de 100 mg/L de meio. O resultado obtido está de acordo com trabalhos que analisaram a produção e secreção de xilanases recombinantes pela levedura *P. pastoris* por fermentação submersa. No trabalho realizado por Tanaka e colaboradores (2004) obteve-se a secreção de 178 mg/L da xilanase de *A. pullulans*. No trabalho realizado por Damaso e colaboradores (2003) realizou-se a otimização do meio de cultura e obteve-se a secreção de 148 mg/L da xilanase de *T. lanuginosus*, enquanto no trabalho de Chantasingh e colaboradores (2006) obtiveram a produção de 238,5 mg/L de xilanase de *A. terreus*, utilizando o meio com 3 % (v/v) de metanol. A produção da xilanase recombinante de *A. niger* foi de 60 mg/L (Berrin *et al*., 2000) e a produção da xilanase de *P. cucumerina* foi de 0,9 mg/L (Zhang *et al*., 2007).



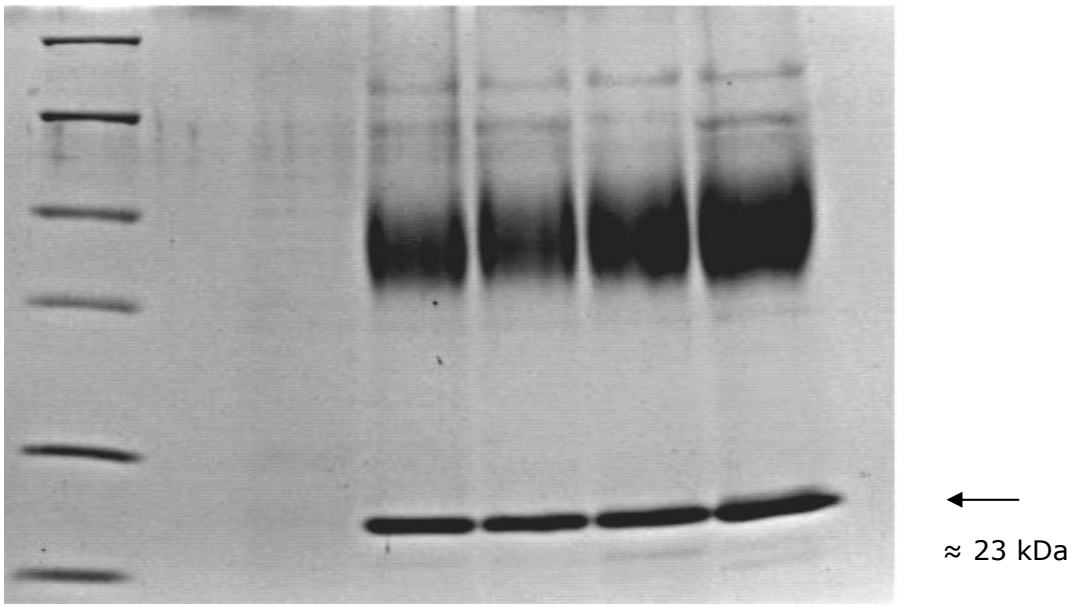


Figura 10: Cultivo da levedura *P. pastoris* em condições de indução com metanol. Perfil protéico do sobrenadante de cultura após diferentes tempos de cultivo observado em gel de poliacrilamida 13% corado com solução de Coomassie. Poço 1: Marcador de massa molecular "Unstained Protein Molecular Weight Marker" (Fermentas Life sciences®); Poço 2-6: sobrenadante de cultura após 0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h de cultivo.

Como descrito na introdução, pode-se considerar a secreção de proteínas heterólogas por *P. pastoris* como um primeiro passo de purificação, visto que a levedura secreta pouca proteínas endógenas enquanto a proteína heteróloga é predominante no meio de cultura (Cereghino & Cregg, 2000). Esta afirmação está de acordo com o obtido nos experimentos de indução (96 h) e densitometria. Após 96 h de indução a enzima HXYN2r representou 40% das proteínas totais secretadas pela levedura. A secreção de proteínas pela levedura após a indução é menor do que pelo fungo *H. grisea* em BCA (Carvalho, 2003), o que facilitou a purificação da enzima HXYN2r a partir do sobrenadante de cultura após 96 h de indução. Nos trabalhos realizados por Damaso e colaboradores (2003) e Cheng e colaboradores (2005) em que foi analisada a produção pela *P. pastoris* das xilanases de *T. lanuginosus* e *T. fusca* após indução com metanol e observou-se que a quantidade de proteínas secretadas pela levedura era menor do que obtido da fermentação semi-sólida dos microrganismos nativos. Estes pesquisadores sugerem a aplicação do sobrenadante de cultura de *P. pastoris*

em processos industriais sem a necessidade de uma purificação posterior da enzima.

4.2. PURIFICAÇÃO DA ENZIMA HXYN2r POR FRACIONAMENTO EM COLUNA CROMATOGRÁFICA

4.2.1. Concentração das xilanases por liofilização

A liofilização foi o método escolhido para a concentração das proteínas para posterior fracionamento em coluna de gel filtração, conforme trabalho de Carvalho e colaboradores (2007).

Inicialmente, o S96 foi dialisado por 24h contra tampão Tris-HCL 10 mM (item 3.2.5.1) e posteriormente liofilizado (item 3.2.5.1). Após cada etapa a amostra foi analisada quanto à atividade xilanolítica (item 3.2.2) e proteínas totais (item 3.2.3) para a verificação do rendimento do procedimento em relação a concentração das proteínas. Pelas análises de atividade xilanolítica observou-se que após a diálise foi recuperada 73,74% de atividade e 39,6% após a liofilização. No trabalho descrito por Berrin e colaboradores (2000) a xilanase recombinante e de *A. niger* foi concentrada após precipitação com saturação de sulfato de amônio obtendo um rendimento de apenas 25,6%. No trabalho descrito por Cheng e colaboradores (2005) foi utilizado o processo de ultrafiltração para a concentração de proteínas do sobrenadante e recuperaram 77% da atividade inicial.

4.2.2. Fracionamento das proteínas do S96 em cromatografia de peso molecular ("Sephacryl S-100™ de alta resolução", Amersham®, 87x1,5 cm)

O extrato enzimático obtido no item anterior (1500 Unidades) foi aplicado na coluna de gel filtração, Sephacryl S-100™ e eluído com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0 (3.13.5.2). Foram coletados 50 frações de 2 mL, após um volume vazio de 140 mL, em um fluxo de 0,5 mL/min. Todas as frações foram analisadas quanto à concentração protéica por leitura de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm (3.13.3) e a cada 3

frações quanto à atividade enzimática pelo método de açúcares redutores (3.13.2). O perfil desse fracionamento está representado na Figura 11.

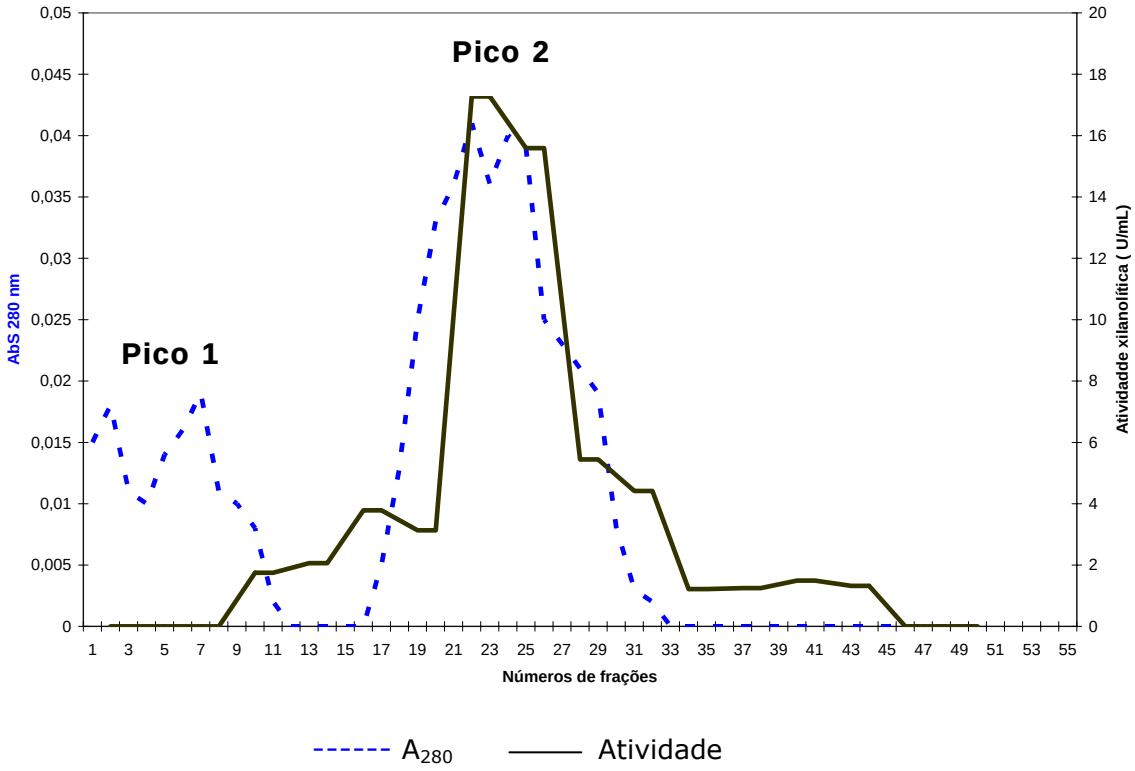


Figura 11: Perfil da cromatografia da coluna Sephacryl S-100. Volume vazio de 140 mL, fluxo de 0,5 ml/min, cada fração contém 2 mL.

O perfil cromatográfico das frações eluídas da coluna de filtração em gel "Sephacryl S-100™" mostra a presença de um pico de atividade xilanolítica e dois picos de proteínas, sendo que o segundo pico coincide com o pico de proteínas. Pelo resultado sugere-se que a enzima HXYN2r foi corretamente eluída da coluna e encontra-se nas frações do pico 2.

Com o objetivo de analisar a purificação da xilanase nas frações correspondentes ao pico 2, as frações de 18 a 33 foram reunidas, concentradas com TCA (item 3.13.4.1) e aplicadas em um gel de SDS-PAGE (3.13.4.3) . Pela análise do gel da Figura 12 verifica-se que nas frações do pico 2 a enzima HXYN2r encontra-se pura.

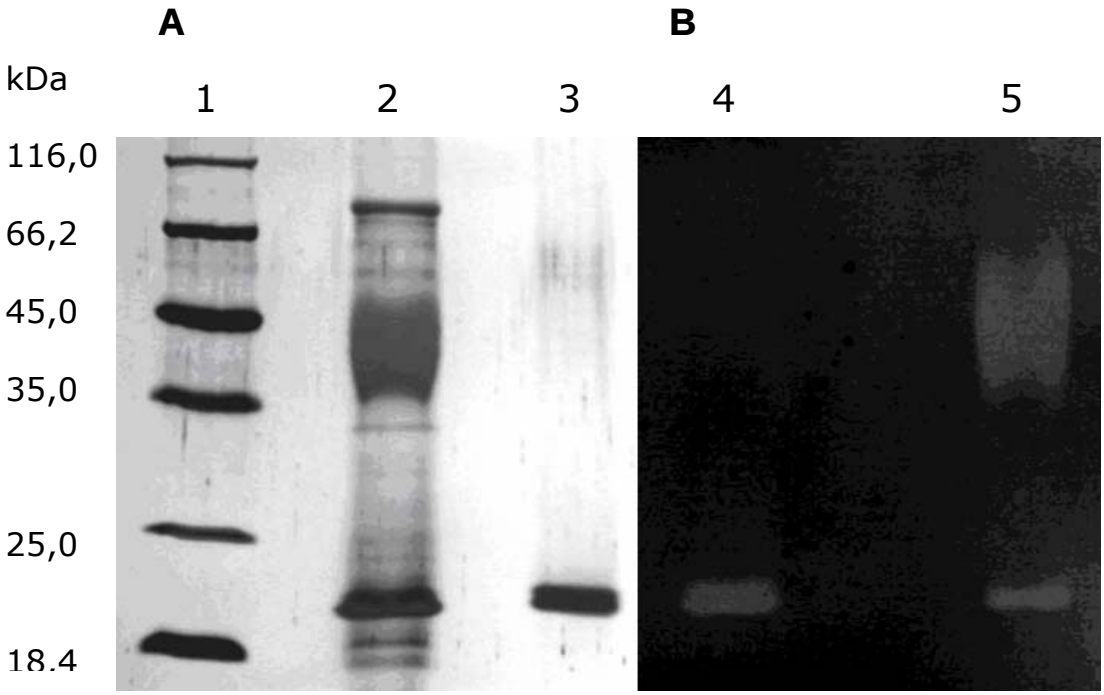


Figura 12: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE (13%) **A**. Perfil de proteínas secretadas pela levedura *P. pastoris* sob indução com metanol, 1. MM; 2. S96 e 3. Frações de 18 a 33 do pico 2. **B.** Zimograma, 4. Frações de 18 a 33 do pico 2 e 5. S96.

O gel de atividade (Zimograma) (item 3.1.7) foi realizado com a finalidade de confirmar a atividade xilanolítica da banda protéica de 23 kDa presente nas frações do pico 2. Pela análise do gel da figura 12.B observa-se que a proteína de 23 kDa apresentou atividade xilanolítica contra xilana extraída de aveia confirmando ser esta proteína a enzima HXYN2r.

O resumo das etapas de purificação está representado na Tabela 3.

Tabela 3: Etapas de purificação da enzima HXYN2r e os respectivos rendimentos.

Etapa	Volume (ml)	Proteínas Totais (mg)	Atividade Total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
S96	15	5,0	9930,0	1998,8	1,0	100,0
Diálise	16	3,1	7322,4	2356,0	1,2	73,7
Liofilização	4	2,9	3935,2	1380,3	0,7	39,6
Gel Filtração	64,2	0,3	635,8	2250,0	1,1	6,4

Nos resultados apresentados na Tabela 3 destaca-se o rendimento total da purificação que foi de 6,4%. Resultado baixo quando comparado com outros trabalhos que apresentaram a purificação de xilanases recombinantes produzidas pela *P. pastoris*. Nos trabalhos que realizaram a concentração das proteínas do sobrenadante de cultura antes da cromatografia, o rendimento da purificação variou de 23 a 27,9%. Já no trabalho em que o sobrenadante de cultura contendo a enzima foi aplicado diretamente na coluna de cromatografia o rendimento foi de 84,4% (Chantasingh *et al.*, 2006).

A atividade específica da HXYN2r de 2.250 U/mg está de acordo com as atividades específicas obtidas nos trabalhos de purificação de xilanases recombinantes produzidas pela *P. pastoris*. Nesses trabalhos foram encontradas atividades específicas entre 213-7.846 U/mg (Berrin *et al*., 2000; Tanaka *et al*., 2004; Cheng *et al*., 2005; Chantasingh *et al*., 2006; Liu *et al.*, 2006; Sun *et al*., 2007). Há ainda relatos nesses trabalhos que as atividades específicas das xilanases recombinantes apresentaram atividades específicas menores do que a atividade específica das xilanases produzidas pelos dos microrganismos nativos, sugerindo a presença de modificações pós-traducionais incorretas ocorridas na expressão das enzimas recombinantes (Tanaka *et al*., 2004).

Nos trabalhos de Tanaka e colaboradores (2004) a enzima recombinante de *A. pullulans* apresentou uma atividade específica de 213 U/mg, o que é 2,4 vezes menor do que a atividade específica da enzima nativa (512 U/mg), nos trabalhos de Damaso e colaboradores (2003) a enzima recombinante apresentou 272 U/mg de atividade específica enquanto a enzima nativa apresentou 350 U/mg. Nos trabalhos de Berrin e colaboradores (2000) a enzima recombinante apresentou uma atividade de 350 U/mg, o que é maior do que a enzima nativa

(272U/mg). Foi verificado que a enzima recombinante do *H. grisea* apresentou uma atividade específica de 2.250 U/mg o que é 4 vezes maior do que a atividade específica obtida da xilanase purificada nativa do fungo *H. grisea* (Carvalho, 2003), sugerindo a ausência de modificações pós-traducionais incorretas no processamento da enzima recombinante pela levedura *P. pastoris*.

4.3. PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA HXYN2r POR TRATAMENTO TÉRMICO

Para a purificação de HXYN2r por tratamento térmico, inicialmente o S96 foi incubado a 60°C por 45 min, submetido a centrifugação, dialisado e finalmente concentrado por liofilização (item 3.2.5.3). A Tabela 4 abaixo mostra o rendimento de cada etapa da purificação parcial da enzima HXYN2r por tratamento térmico.

Tabela 4: Valores médios de atividade enzimática, atividade total e rendimentos obtidos na purificação parcial da enzima HYN2r por tratamento térmico.

Etapa	Volume (mL)	Atividade (U/mL)	Atividade Total (U)	Rendimento (%)
S96	627,00	380,00	238.260,00	100,00
Tratamento Térmico	569,00	129,00	73.401,00	30,81

Diálise	569,00	84,70	48.194,30	20,23
Liofilização	569,00	75,18	42.777,42	17,95

Observa-se na tabela que após o tratamento térmico recuperou-se 30,81% de atividade xilanolítica, 20,23% após a diálise e 17,95% após a liofilização.

A estratégia de tratamento térmico foi relatada por de Almeida (1995) e colaboradores no protocolo de purificação da β-xilosidase do *H. grisea*, neste trabalho o tratamento térmico foi realizado a 50°C por 20 min, obtendo-se um fator de purificação de 1,8 vezes nesta etapa.

4.4. APLICAÇÃO DA ENDO-XILANASE HXYN2r NA PANIFICAÇÃO

4.4.1. Aplicação da endo-xilanase HXYN2r purificada

A aplicação da xilanase pura na panificação foi inteiramente limitada pelo baixo rendimento da purificação associado com a escala do preparo dos pães, ultrapassando os limites de bancada em que sempre foi o ambiente de trabalho utilizado.

Devido às diferenças nas especificidades ao substrato e características bioquímicas das xilanases, cada trabalho estabelece uma faixa de unidades enzimáticas para a aplicação em testes de panificação. Jiang e colaboradores (2005b) testaram a xilanase purificada de *T. lanuginosus* na quantidade de 2,5 mg a 100 mg por kg de farinha. Na aplicação da xilanase pura de *Aspergillus sp*, Camacho e colaboradores (2003) testaram de 25 mg a 200 mg de xilanase pura enquanto Jiang e colaboradores (2005b) testaram de 10 mg a 200 mg por Kg de farinha de xilanase de *T. maritima*. Gebruers e colaboradores (2005) testaram a enzima pura de A. niger na concentração de 500 U/kg de farinha enquanto Gruppen e colaboradores (1993) utilizaram 2 U da enzima de *A. awamori* em 1 Kg de farinha e Gottschalk e colaboradores (1994) utilizaram 45 U de xilanase de *B. subtilis* por Kg de farinha.

Diante das variações da literatura e da disponibilidade de material de HXYN2r pura para as análises foram testadas duas concentrações da enzima nos testes de panificação: 45 U e 90 U/Kg de farinha.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores médios do volume específico dos pães com a massa suplementada com HXYN2r purificada.

Tabela 5: Determinação do volume específico dos pães com a massa suplementada com HXYN2r purificada.

Dosagem enzimática (U/Kg)[1]	Volume específico (mL/g)[2]
0	3,87A
45	4,02 A
90	4,08 A

[1] Unidade enzimática por quilograma de farinha de trigo adicionada a massa

[2] Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Como mostrado na Tabela 5 não houve diferença significativa de volume específico entre os resultados obtidos, entretanto ocorreu um ligeiro aumento de 5% de volume específico entre 90 U/kg em relação ao controle. Não foi observada diferença entre o formato dos pães (Figura 14).

Controle 45 U/Kg 90 U/Kg

Figura 13: Efeito da adição de HXYN2r na massa no volume específico dos pães.

Pelos resultados obtidos observamos que as concentrações utilizadas foram muito baixas para causar um aumento do volume específico, portanto seria necessário o aumento da concentração enzimática utilizada nos testes. Devido à impossibilidade da utilização da enzima pura, pelo baixo rendimento da purificação. Os experimentos com maiores concentrações enzimáticas foram realizados com a enzima HXYN2r parcialmente purificada.

4.4.2. Aplicação da endo-xilanase HXYN2r parcialmente purificada

4.4.2.1. Teste de panificação nas concentrações de 500-6000 U

Os testes de panificação utilizando a enzima HXYN2r parcialmente purificada foram realizados nas concentrações de 500, 1.500, 3.000 e 6.000 Unidades enzimáticas/kg de farinha de trigo. Este ensaio determinou a melhor concentração da xilanase no aumento do volume específico. Na Tabela 6 podemos observar o volume específico médio dos pães preparados com a adição de HXYN2r parcialmente purificada nas concentrações entre 500 a 6.000 U/Kg.

Tabela 6: Determinação do volume específico dos pães com suplementação da massa com HXYN2r parcialmente purificada

Dosagem enzimática (U/Kg) [1]	Volume específico (mL/g)[2]
0	3,26 [B]
500	3,48 [AB]
1500	3,70 [A]
3000	3,80 [A]
6000	3,42 [AB]

[1] Unidade enzimática por quilograma de farinha de trigo adicionada a massa

[2] Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Na tabela 6 observa-se que adição de HXYN2r nas concentrações de 500 U e 6000 U acarretou aumento do volume específico dos pães de 7% e 5% respectivamente, entretanto esses resultados não foram significativamente

diferentes do volume específico médio obtido para o pão controle. Nas concentrações de 1.500 U e 3.000 U o aumento do volume específico foi de 13 e 16% respectivamente, estes resultados apresentaram aumento significativo em relação ao volume médio específico do pão controle. O melhor resultado apresentado foi o aumento de 16% no volume específico dos pães de 3.000 U de HXYN2r por quilo de farinha.

A resposta do aumento da dosagem enzimática de HXYN2r em relação ao volume específico dos pães foi analisada por regressão linear simples e múltipla. O modelo proposto para representar o volume específico do pão de forma em função da adição de HXYN2r parcialmente purificada é o seguinte (modelo quadrático):

$$y = 3{,}33 + 0{,}00034x - 0{,}000000052\,x^2$$

O modelo apresentou regressão significativa, com coeficiente de variação igual a 3,12 e com R2 igual a 0,7764, evidenciando que o modelo explicou 77,64% da variação dos dados experimentais.

Analisando a Figura 14 com a respectiva equação verifica-se que em concentrações menores de enzima o efeito linear é mais predominante que o efeito quadrático no volume específico dos pães, entretanto com o aumento da dosagem enzimática ocorre predomínio do efeito quadrático causando a redução do volume específico em valores abaixo do volume específico do pão sem suplementação enzimática.

Diversos artigos demonstraram o efeito positivo no volume específico dos pães com a adição de xilanase purificada na massa no volume específico dos pães. A aplicação das xilanases de *Aspergillus* sp (Camacho & Aguilar, 2003), *T. lanuginosa* (Jiang *et al*., 2005b) e *T. marítima* (Jiang *et al*., 2005a) em testes de panificação levou a um aumento de 30%; 41,4% e 60,3% respectivamente no volume dos pães em relação ao controle. Nestes artigos foram analisadas várias concentrações de xilanase purificada na panificação (2,5 a 200 ppm) e observou-se um padrão semelhante no aumento de volume específico. Em concentrações mínimas de xilanase ocorre pouco ou nenhum aumento de volume específico quando se compara com o volume específico dos pães não suplementados (2,5 a 20 ppm) . Em concentrações maiores de enzima (25 a 120

ppm) observa-se aumento no volume específico dos pães. Em concentrações mais elevadas da ideal (120 a 200 ppm), os pães não apresentam aumento de volume devido à excessiva hidrólise acompanhada da formação de massas extremamente viscosas (Camacho & Aguilar, 2003; Jiang *et al*., 2005a; 2005b).

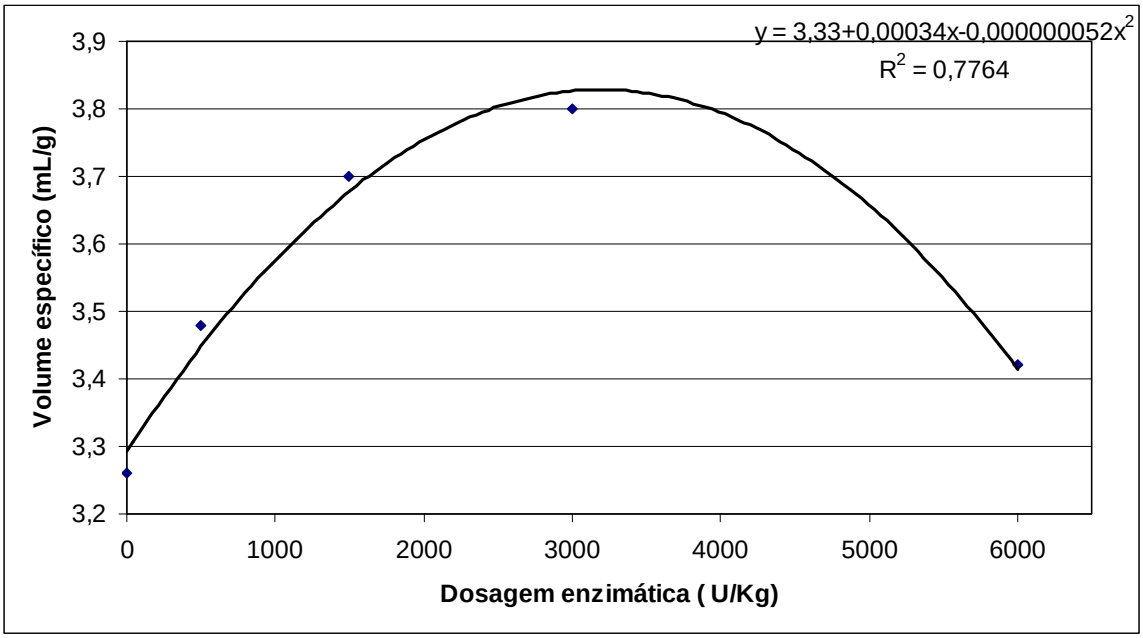


Figura 14: Representação do volume específico do pão de forma em função da adição na massa de HXYN2r parcialmente purificada

No trabalho de Camacho & Aguilar (2003) foi verificado o aumento de 12% no volume dos pães, utilizando o filtrado de cultura contendo xilanase do fungo *Aspergillus sp*. Em concentrações enzimáticas maiores o volume obtido foi similar aos pães que não foram suplementados com xilanases, entretanto quando se adicionou 25 ppm de xilanase pura de *Aspergillus* sp. Observou-se um aumento de volume de 30%. Gebruers e colaboradores (2005) obtiveram um aumento de volume de 17% utilizando 500 Unidades do filtrado de cultura contendo xilanases da família 10 e 11 de *A. niger*, por quilo de farinha de trigo, enquanto foi obtido 30% utilizando 500U de xilanase pura da família 11 por quilo de farinha de trigo e nenhuma melhora no volume dos pães utilizando 500 U da xilanase pura da família 10 por quilo de farinha.

No trabalho realizado por Gottschalk e colaboradores (1994) o filtrado de cultura liofilizado contendo a xilanase recombinante de *B. subtillis* foi aplicado

nas concentrações de 15, 30 e 45 U /Kg de farinha de trigo obtendo respectivamente um aumento no volume de 7, 13 e 14 %.

4.4.2.2. Comparação da suplementação de HXYN2r e xilanase comercial em panificação

A Figura 15 apresenta o perfil das proteínas das amostras testadas (Transformante C4, Preparação de xilanase comercial, HXYN2r parcialmente purificada proveniente do tratamento térmico) analisadas em gel de poliacrilamida. (item 3.2.4). Observa-se que a preparação comercial não está pura e além da xilanase foi verificada a presença de outras proteínas. O extrato protéico C4 não apresenta a enzima HXYN2r entre as proteínas secretadas. A amostra proveniente do tratamento térmico apresentou menos proteínas quando comparado com o S96, confirmando a eficiência do tratamento térmico como alternativa para a purificação parcial da enzima HXYN2r.

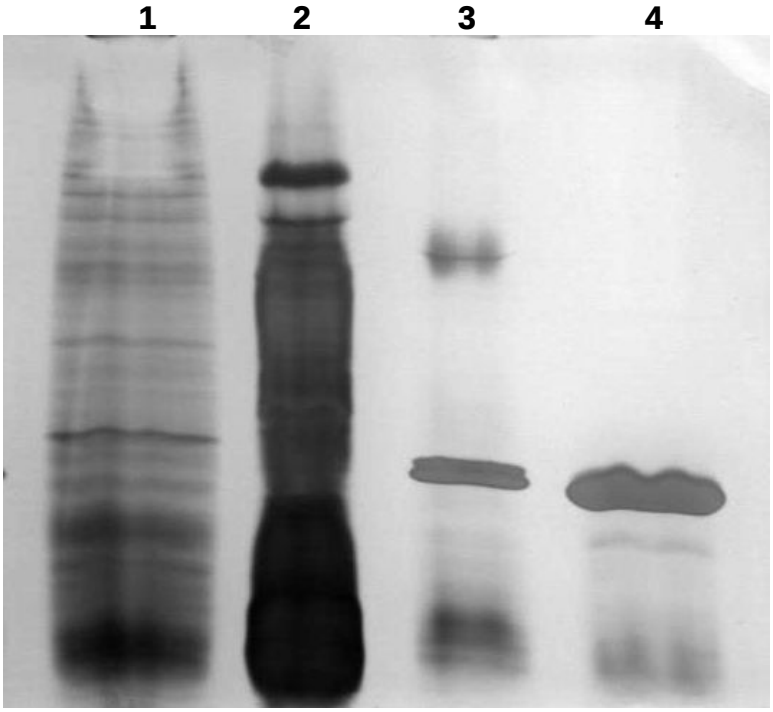


Figura 15: Perfil protéico das amostras aplicadas nos testes de panificação. 1- Transformante C4, 2- Preparação de xilanase comercial, 3- S96, 4- HXYN2r parcialmente purificada proveniente do tratamento térmico.

Na Tabela 7 estão representados os resultados médios do volume específico obtido nos testes de panificação. Verifica-se que enquanto o efeito da suplementação da massa com o extrato protéico do transformante C4 não alterou significativamente o volume específico dos pães, a suplementação com a endo-xilanase HXYN2r parcialmente purificada e a preparação comercial aumentaram o volume específico dos pães respectivamente de 14 e 11%.

Infere-se que como as proteínas excretadas pelo transformante da *P. pastoris* deficiente do gene de xilanase - Transformante C4 não tem efeito significativo no aumento do volume específico dos pães, pode atribuir-se a enzima HXYN2r o efeito do aumento no volume específico.

Embora o efeito da HXYN2r no aumento do volume específico apresentou-se aquém dos obtidos em outros trabalhos (30% a 60% de aumento no volume específico), esse aumento foi estatisticamente significativo quando comparado com o pão controle, além de não diferir estatisticamente do efeito apresentado pela a adição da xilanase comercial.

Tabela 7: Determinação do volume específico dos pães com suplementação da massa com o extrato protéico do transformante C4, HXYN2r e a xilanase comercial

Amostras	Volume específico (mL/g)[1]
Controle	3,87 [B]
C4	3,94 [B]
HXYN2r	4,36 [A]
Xilanase Comercial	4,29 [A]

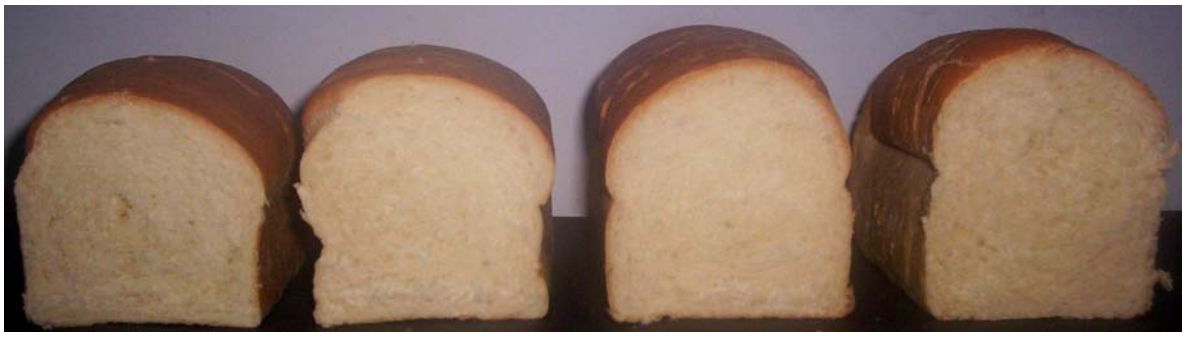
[1] Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade de erro.

Na Figura 16 pode-se observar o efeito da suplementação da massa com o extrato protéico do transformante C4, HXYN2r e xilanase comercial no volume específico dos pães. Concluiu-se que a xilanase HXYN2r tem ação positiva no aumento específico dos pães.

A

Controle C4 HXYN2 Comercial

B



Controle C4 HXYN2 Comercial

Figura 16: Efeito da suplementação da massa com o extrato protéico do transformante C4, HXYN2r e xilanase comercial no volume específico dos pães. **A**. Pães inteiros; **B**. Pães cortados.

As seguintes hipóteses podem ser levantadas a respeito da ação da HXYN2r na panificação:

A enzima é responsável por melhorar a redistribuição de água absorvida pela hemicelulose para o glúten e o amido, o que pode gerar uma maior extensibilidade da rede de glúten (Camacho e Aguilar 2003).

A enzima por ter 50% da sua atividade após 22 min em 60 °C atua na fase inicial do cozimento em que a temperatura do interior apresenta 60 °C,

resultando em uma maior expansão da massa no cozimento e uma hidrólise mais eficiente de AX-IA (Jiang *et al* 2005 b).

As hipóteses podem ser levantadas pelas características semelhantes da xilanase HXYN2r com as xilanases de *Aspergillus sp* e *T. lanuginosus* e pela hidrólise da AX-IA pela HXYN2r confirmada pelo trabalho de Borges e colaboradores (2007). O quadro abaixo resume as características das xilanases relatadas.

Características	HXYN2r	*T. lanuginosus*	*Aspergillus* sp
Massa Molecular	23 kDa	25,6 kDa	22 kDa
pH ótimo	6,5	6,2	5,5
Atividade ótima	60°C	75°C	60°C
Estabilidade térmica	60°C/20 min	65°C/30 min	50°C/150 min
Referências (*et al*)	Carvalho *et al.*, (2007)	Jiang *et al.*, (2005b)	Camacho *et al.*, (2003)

5. CONCLUSÕES

Os dados obtidos por neste trabalho permitem chegar as seguintes conclusões:

- A xilanase recombinante do fungo *H. grisea* (HXYN2r) foi eficientemente produzida e secretada pela *P. pastoris* para o meio de cultura após 96h de indução por metanol apresentando aproximadamente 670 U/mL
- A HXYN2r foi purificada por um simples passo de purificação por cromatografia de filtração em gel com rendimento de 6,4%.
- A HXYN2r foi secretada pele P.pastoris na concentração aproximada de 100 mg por litro de meio de cultura BMMY-U, representando 40% da concentração das proteínas totais secretadas pela *P.pastoris*.
- A enzima HXYN2r parcialmente purificada na concentração de 3000 U/Kg de farinha tem ação positiva na aumento do volume específico dos pães (16 %).
- A ação da enzima pode ser devido a hidrólise da fração de arabinoxilana insolúvel em água.

6. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho abrem as seguintes perspectivas:

• Produção da enzima HXYN2r em grande escala, utilizando fermentador

• Testes toxicológicos com a enzima parcialmente purificada HXYN2r utilizada na panificação

• Análise sensorial dos pães suplementados com a enzima HXYN2r

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-HEILAH, A. N. Soil mycoflora of Saudi Arabia: 2. Some microfungi in the forest soils of Asian region. **J. Biol. Sci. Res**. v.16 , p.1-16, 1985.

AKPINAR, O.; AK, O.; KAVAS, A.; BAKIR, U; YILMAZ, L. Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks. **J. Agric. Food Chem.** v.55 (14), p. 5544-5551, 2007.

ALMEIDA, E.M.; POLIZELI, M.L.; JORGE, J.A; TERENZI, H.F. Purification and biochemical characterization of ß-xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **FEMS Microbiol. Lett.,** v.130, p.171-176, 1995.

ARAÚJO, E.F.; BARROS, E.G.; CALDAS, R.A; SILVA, D.O. ß-glycosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungus *Humicola* sp. **Biotechnol. Lett.,** v.5, p.781-784.1993.

ASPINALL, G.O. Structural chemistry of the hemicelluloses. **Adv. Carbohydr. Chem.** v.14, p.429-468, 1959.

AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S.; ASTOLFI, S.F; RADFORD, A. Cloning, sequencing and homologies of the *cbh*-1 (exoglycanase) gene of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **J. Gen. Microbiol.** v.136, p.2569-2576. 1990.

BALAA, B.A.; WOUTERS, J.; DOGNE, S.; ROSSINI, C.; SCHAUS, J.M.; DEPIEREUX, E.; VANDENHAUTE, J; HOUSEN, I. Identification, cloning and expression of the *Scytalidium acidophilum* XYL1 gene encoding for an acidophilic xylanase. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v.70(1), p.269-272, 2006.

BANHE, A.A.; MORAES, L.P. & FARIA, F.P. Expressão do Gene HXYN2 em *Pichia pastoris*. Análise da estabilidade genética dos transformantes. In: Reunião de Genética de Microrganismos, 24, Gramado, 2004.

BASTAWDE, K.B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World J. of Microbiol. and Biotechnol.** v.8, p.353-368, 1992.

BELANCIC, A.; SCARPA, J.; PEIRANO, A.; DIAZ, R.; STEINER, J. & EYZAGUIRRE, J. Penicillium purpurogenum produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. **J. Biotechnol,** v.21, p. 91, 1995.

BERGQUIST, P.; TÉO, V.S.J.; CZIFERSKY, A.; GIBBS, M.; FARIA, F.P.; AZEVEDO, M.O, NEVALAINEN, H. Expression of xylanase enzymes from thermophilic microorganisms in fungal hosts. **Extremophiles,** 6: 3. 2002a.

BERGQUIST, P.; TÉO, V.S.J.; CZIFERSKY, A.; GIBBS, M.; FARIA, F.P.; AZEVEDO, M.O; NEVALAINEN, H. Production of recombinant bleaching enzymes from thermophilic microorganisms in fungal hosts. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.98(100), p.165-76, 2002b.

BERGQUIST, P.; TÉO, V.S.J.; CZIFERSKY, A.; GIBBS, M.; FARIA, F.P.; AZEVEDO, M.O; NEVALAINEN, H. Production of recombinant bleaching enzymes from thermophilic microorganisms in fungical hosts. In: Liisa Viikari and Raija Lantto (orgs.). Progress in Biotechnol., 21. Ed.Elsevier. 2002c

BERRIN**,** J.G.; WILLIAMSON, G.; PUIGSERVER, A.; CHAIX, J.C.; MCLAUCHLAN, W.R. & JUGE, N. High-level production of recombinant fungal endo-beta-1,4-xylanase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein. Express. Purif.** v.19, p.179-87, 2000.

BIELY, P. Microbial xylanolitic systems. **Trends in Biotechnology.** v.3, p. 286-290, 1985.

BIELY, P.; MARKOVIK, O; MISLOVICOVÁ, D. Sensitive detection of enco-1,4 ß-glycanases in gels. **Anal. Biochem.** v.144, p.147-151, 1985.

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

BORGES, R.A; CARVALHO, W.R; BASTOS, F.M; FARIA, F.P. Application of recombinant xylanase from *Humicola grisea* for production of feruloyl oligosaccharides. In: Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto, 2007, **anais**

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-glye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p.248-254,1992.

BRAUN, E. J. & RODRÍGUEZ, C. A. Purification and properties of an endoxylanase from a corn stalk rot strain of *Erwinia chrysanthemi*. **Phytopathology.** v.83, p.332, 1993.

CAMACHO, N.A & AGUILAR, G.O. Production, purification and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus sp* and its application in baking. **Applied biochemistry and biotechnology.** v.104, p.159-171. 2003.

CAO, Y.; QIAO, J.; LI, Y. & LU W. De novo syntesis, constitutive expression of *Aspergillus sulphureus* β-xylanase gene in *Pichia pastoris* and partial enzymic characterization. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.76, p.579-585, 2007.

CAO, Y.N.; CHEN, X.L; HE, P.L; LU, W.Q. Cloning, expression and enzyme characterization analysis of *Aspergillus sulphureus* xylanase gen xynA. **Lett. Biotechnol.** v.17, p.858-861, 2006.

CARDELLO, L.; TERENZI, H. F. & JORGE, J. A. A cytosolic trehalase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Microbiol.,** v.140, p.1671-1677, 1994.

CARVALHO, W.R. BASTOS, F.M.; BORGES, R.A; FARIA, F.P. BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT HXYN2 PURIFIED FROM *PICHIA PASTORIS* SUPERNATANT CULTURE. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 7, 2007, Curitiba, **anais**...

CARVALHO, W.R.; BASTOS, F.M; FARIA, F.P. HETEROLOGUS EXPRESSION OF HXYN2R GENE FROM THE FUNGUNS HUMICOLA GRISEA IN PICHIA PASTORIS : OPTIMIZATION OF HXYN2R PRODUCTION IN FLASKS. VIII symposium on enzymatic hydrolysis of biomass, 8, 2005,Maringá, **anais**…

CARVALHO, Wagner Rodrigues. **Produção e Purificação da Xilanase de 23 kDa do Fungo Termofílico *Humicola grisea var. thermoidea*.** 2003. .117f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial)- Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2003.

CEREGHINO, J. L; CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. **FEMS Microbiol. Rev.** v.24(1), p.45-66, 2000.

CHANTASINGH, D.; POOTANAKIT, K.; CHAMPREDA, V.; KANOKRATANA, P. & EURWILAICHITR, L. Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*. **Protein expression and Purification.** v.46, p.143-149, 2006.

CHAVES, V.M.G. **Algumas características fisiológicas e propriedades do complexo celulase de um fungo termófilo isolado de compostagem.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa- MG. 1982.

CHEN, C.; CHEN, J-L; LIN, T-Y. Purification and characterization of a xylanase from Trichoderma longibrachiatam for xylooligosaccharide production. **Enzyme Microb. Technol.** v.21, p.91,1997.

CHENG, Y.-F.; YANG, C.-H; LIU, W.-H. Cloning and expression of *Thermobifida* xylanase gene in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris.* **Enzyme and Microbial technology.** v.37, p.541-546, 2005.

COLLINS, T.; HOYOUX , A.; DUTRON, A.; GEORIS, J.; GENOT, B.; DAUVRIN, T.; ARNAUT, F.; GERDAY, C; FELLER, G. Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking. **Journal of Cereal Science.** v.43, p.79–84, 2006.

COLLINS, T; GERDAY, C; Feller, G. Xylanases, Xylanase familes and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews.** v.29, p.5-23, 2005.

COUDERC**,** R; J. BARATTI. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris.* Purification and properties of alcohol oxidase. **Agric. Biol. Chem**. v.44, p.2279-89, 1980.

COUGHLAN, M.P.; TUOHY, MG.; FILHO, E.X.F.; PULS, J.; CLAEYSSENS, M.; VRSASKA, M. & HUGHES, M.H. Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems. In: Coughlan, M.P & Hazlewood, G.P. Hemicelluloses and Hemicellulases. Eds. Portland Press, London. p. 53-84. 1993.

COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. β-1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v.17; p.259-289.1993.

COURTIN, C.M.; DELCOUR, A. Arabinoxylans and Endoxylanases in Wheat Flour Bread-Making. **Journal of Cereal Science.** v.35; p.225-243, 2002.

CREGG, J.M.; VEDVICK, T.S.; RASCHKE, W.C. Recent Advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Biotechnology.** v.11, p.905-10. 1993.

DAMASO, M.C.T.; ALMEIDA, M.S.; KURTENBACH, E.; MARTINS O.B; JÚNIOR N.P.; ANDRADE, C.M.M.C ; ALBANO R.M. Optimized Expression of a Thermostable Xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris.* **Appl. Environ.Microbiol.** v**.** 69. p.6064-72. 2003.

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure.** v.3, p.853-859. 1995

DE FREITAS, S.M.; TREPTOW, W. L.; FARIA, F. P.; AZEVEDO, M.O.; MAIGRET, B. Structural contributions for thermostability of a new endo-1,4-ß-xylanase from the fungus *Humicola grisea*. **Internet Eletronic Journal of Molecular Design.** v, 2 (12), p. 835-851, 2003.

DEKKER, R.F.H. The enzymatic hydrolysis of biomass. IN: Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa 2, Maringá. 1985.

DENG, P.; LI, D.; CAO, Y.; LU, W; WANG, C. Cloning of a gene encoding and acidophilic endo-β-1,4-xylanase obtained from *Aspergillus niger* CGMCC1067 and constitutive expression in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 39, p.1096-1102, 2006.

DUSTERHOFT, E. M.; LINSSEN, V. A. J. M.; VORAGEN, A. G. J; BELDMAN, G. Purification characterization and properties of two xylanases from *Humicola insolens*. **Enzyme Microb. Technol**; v.20, p.437.1997.

EGI, A.; SPEERS, R; ASCHWARZ, P.B. Arabinoxylans and Their Behavior During Malting and Brewing. **MBAA TQ.** v.41(3), p.248–267, 2004.

FARIA, Fabrícia Paula de. **Clonagem, Caracterização e Expressão do gene de xilanase *Hxyn*2 do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea***,2000, Tese (Doutorado em Biologia Molecular) Universidade de Brasília.

FENGEL, D; WEGENER, G. Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Walter de Gryuter, ed., New York, USA. 1989.

FERGUS, C. L. The cellulolytic activity of thermophilic fungi and actinomycetes. **Mycology**. v. 61, p.120-129, 1969.

GEBRUERS, K.; COURTIN, C.M.; MOERS, K.; NOOTS, I.; TROGH, I; DELCOUR, J.A. The bread-making functionalities of two *Aspergillus niger* endoxylanases are strongly dictated by their inhibitor sensitivities. **Enzyme and Microbial Technology.** v.36, p. 417–425. 2005.

GOTTSCHALK, M.; SCHUSTER, E.; SPROSSLER, B. United Stated Patent 5.306.633. 1994

GRUPPEN, H.; KORMELINK, J.M; VORAGEN, A.G.J. Enzymic degradation of Water-unextractable cell wall material and arabinoxylans from Wheat Flour. **Journal of Cereal Science.** v.18, p.129-143, 1993.

HAAS, H.; FRIEDLIN, E.; STOFFLER; REDL, B. Cloning and structural organization of a xylanase-encoding gene from *Penicillium chrysogenum.* **Gene.** v.126, p.237-242, 1993.

HARBAK, L. ; THYGESEN H.V. Safety evaluation of a xylanase expressed in *Bacillus subtilis*. **Food and Chemical Toxicology. v.**40, p.1-8, 2002.

HARKKI, A.; MANTYLA, A.; PENTILLA, M.; MUTTILAINEM, S.; BAHLER, R.; SUOMINEN, P.; KNOWLES, J; NEVALAINEN, H. Genetic engineering of *Trichoderma reesei* to produce strains with novel cellulase profiles. **Enzyme Microb. Technol.** v.13, p. 227-33. 1991.

HAZLEWOOD, G.P. ; GILBERT, H.J. Molecular biology of hemicellulases. In: Coughlan, M.P. & Hazlewood, G.P. Hemicellulose and Hemicellulases, Portland Press, London, pp. 103-126. 1993.

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

IIKURA, H.; TAKASHIMA, S.; NAKAMURA, A.; MASAKI, H. ; UOZUMI, T. Cloning of a gene encoding a putative xylanase with a cellulose-binding domain from *Humicola grisea*. **Biosci. Biotech. Biochem. v.**61, p.1593-1595, 1997.

JANES, R.L. The chemistry of wood and fibers. In: MacDonald, R.G. & Franklin, J.N. The Pulping of Wood. Mc Graw-Hill, New York, USA. 1969.

JIANG, Z.; LI, X.; YANG, S.; LI, L; TAN, S. Improvement of the bread making quality of wheat flour by the hyperthermophilic xylanase from *Thermatoga maritima.* **Food Research International.** v.38, p.37-43, 2005a.

JIANG, Z.Q.; YANG,S.Q.; TAN, S.S; LI, L.T.; LI, X.T. Characterization of xylanase from the newly isolated thermophilic *Thermomyces lanugiosus* CAU 44 and its application in bread making. **Letter in applied microbiology.** v.41; p.69-76, 2005b.

KANG, M. K.; MAENG, P. J.; RHEE, Y. H. Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic *Cephalosporium sp*. strain RYM-202. **Appl. Environ. Microbiol.** v.62, p.3480, 1996.

KORMELINK, F. J. M.; LEEUWEN, M. G. F.S.-L.; WORD, T. M. & VORAGEN, A. G. J. Purification and characterization of three endo-(1,4)-β-xylanases and one β-xylosidase from *Aspergillus awamori*. **J. Biotechnol**, v.27, p. 249-265. 1993.

KORONA, B.; KORONA, D.; BIELECKI, S. Efficient expression and secretion of two co-produced xylanases from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* directed by their native signal peptides and the *Saccharomyces cerevisiae* α-mating factor. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 39, p.683-689. 2006.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews.** v.23, p.411-456, 1999.

KULP, K. Enzymolysis of pentosans of wheat flour. **Cereal Chemistry**. v.45, p.339–350, 1968.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature, v.2227, p.680-685.

LEE, C.K.; DARAH.I; IBRAHIM,C.O. Enzymatic deinking of laser printed office wate papers: Some governing parameters on deinking efficiency. **Bioresource Technology.** v.98, p.1684-1689, 2007.

LEE, C.C.; WONG, D.W.S; ROBERTSON, G.H. Cloning and characterization of the Xyn11A gene from *Lentinula edodes*. **The protein Journal.** v.24(1), p.21-26. 2005.

LEMBO, T.; AZEVEDO, M.O.; BLOCH, C. JR; FILHO E.X.F. Purification and partial characterization of a new ß-xylosidase from *Humicola grisea* var*. thermoidea*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology,** 22: 475–479. 2006.

LI, S. L.; ZHANG, A. Q.; DEAN, J. F. D.; ERIKSSON, K. E. L; JUNGDAHL, L. G.. Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. **App. Environ. Microbiol.** v.59, p.3212-3218, 1993.

LIN, L.L; THOMSON, J.A. An analysis of the extracellular xylanases and cellulases of *butyrivibrio fibrisolvens* H17c. **FEMS Microbiol. Lett**. v.84, p.197-204,1991

LIU, M.Q.; WENG, X.Y.; SUN, J.Y. Expression of recombinant *Aspergillus niger* xylanase A in *Pichia pastoris* and its action on xylan. **Protein Expression and Purification,** v.48, p.292-299. 2006.

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

MAAT, J.; ROZA, M.; VERBAKEL, J.; STEM, H.; SANTOS DA SILVA, M.J.; BOSSE, M.; EGMOND, M.R.; HAGEMANS, M.L.D.; GORCOM, R.F.M; HESSING, J.G.M.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J.; VAN ROTTERDAM, C. In: Visser, J.; Beldman, G.; Austers-van Someran, M.A. & Voragen, A.G.J. Xilan and xylanases. Elsevier, Amsterdam. p.349-360. 1992.

MANDALARI, G.; BISIGNANO, G.; LO CURTO R.B; WALDRON K.W. & FAULDS K.W. Production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on industrial food processing by-products. **Bioresource Technology,** xxx :xxx–xxx. 2007.

MARTINEZ-ANAYA, M.A.; JIMENEZ, T. Functionality of enzymes that hydrolyse starch and non-starch plysaccharide in breadmaking. **Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.,** v.205, p.209-214,1997.

MILAGRES, A.M.F.; Prade, R.A. Production of xylanases from *Penicillium janthinellum* and its use in the recovery of cellulosic textile fibers. **Enzyme and Microbial Technology,** v.16, p.627-32, 1994.

MILLER, G. L. Use of dinitrossalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. **Analytical Chem.,** v.31, p.426-428,1959.

MONTI, R.; CARDELLO, L.; CUSTÓDIO, M.F.; GOULART, A. J.; SAYAMA, A.H. & CONTIERO, J. Production and Purification of an endo-1,4ß- xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* by electroelution. **Brazilian Journal of Microbiology,** v.34, p.124-128, 2003.

MONTI, R.; TERENZI, H.F.; JORGE, J.A. Purification of an extracellular xylanase from *Humicola grisea* var*. thermoidea*. **Can. J. Microbiol.,** v.37, p.675-68, 1991.

MORAES, W. P.; FARIA, F. P.; AZEVEDO, M. O. Produção de Enzimas xilanolíticas pelo Fungo Termofílico *Humicola grisea var. thermoidea* em diferentes Substratos. In: 5º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. p.121. Brasília DF. 2002.

MORIYA, R.Y.; GONÇALVES, A.R. & FARIA, F.P. Enzymatic Bleaching of Organosolv Sugarcane Bagasse Pulps with Recombinant Xylanase of the Fungus *Humicola grisea* and with Commercial Cartazyme HS Xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v.121–124 (12), p.195-204, 2005.

OLEMPSKA-BEER, Z.S.; MERKER, R.I.; DITTO, M.D. & DINOVI, M. J. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms-a review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology,** v.45, p.144-158, 2006.

OLIVEIRA, A.R.; XIMENES, E.A; FELIX, C.R. Amylolytic activity of *Humicola sp*. **An. Acad. Bras. Ci.,** v.63, p.409-414. 1991.

PAICE, M.G.; Bernier, R.; JURASEK, L. Viscosity enhancing bleaching of hardwood Kraft pulp with xylanase from a cloned gene. **Biotechnol. Bioeng.,** v.32, p.235-39, 1988.

PARIZA, M.W.; JOHNSON, E.A. Evaluating the Safety of Microbial Enzyme Preparations Used in Food Processing: Update for a New Century. **Regulatory Toxicology and Pharmacology,** v.33, p.173-186, 2001.

PERALTA, R.M.; KADOWAKI, M.K.; TERENZI, H.F; JORGE, J.A. A highly thermostable ß-glycosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea var. thermoidea*: purification and biochemical characterization. **FEMS Microbiol. Lett.,** v.146, p.291-295, 1997.

POLIZELI, ML; RIZZATTI, A.C.; MONTI, R.; TERENZI. H.F.; JORGE J. A. AMORIM D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.,** 67: 577-591, 2005.

RAMCHURAN, S.O, MATEUS, B, HOLST, O. KARLSSON, E.N. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as a host for the expression and production of thermostable xylanase from the bacterium *Rhodothermus marinus*. **FEMS Yeast Research,** v.5; p.839-850, 2005.

RANA, B. K.; JOHRI, B. N.; THAKUR, I.S. Formation and activities of xylan-hydrolyzing enzymes of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **World J. Microbiol. & Biotechnol,** v.12, p.12-15, 1996.

ROMANOS, M.A.; SCORER, C.A.; CLARE, J.J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast,** v.8, p.423-488,1992.

ROUAU, X.; EL-HAYEK, M.L. & MOREAU, D. Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread-making quality of flours in relation to changes in pentosan properties. **Journal of cereal science,** v.19, p.259-272, 1994.

ROWELL, R. M.; Opportunities for lignocellulosic materials and composites. In: Rowell, R.M.; Schultz, T.P. & Narayan, R. Emerging technologies for materials and chemicals from biomass. Cap. 2. ACS symposium series. 1992

RUANGLEK, V.; SRIPRANG, R.; RATANAPHAN, N.; TIRAWONGSAROJ, P.; CHANTASIGH, D.; TANAPONGPIPAT, S.; POOTANAKIT, K.; EURWILAICHITR, L. Cloning, expression, characterization, and high cell-density production of recombinant endo-1,4-β-xylanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, p.19-25, 2007.

SALLES BC, MEDEIROS RG, BÁO SM, SILVA FG Jr, FILHO EXF . Effect of cellulase-free xylanases from *Acrophialophora nainiana* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on eucalyptus kraft pulp. **Process Biochem.,** v.40, p.343-349, 2004.

SANDGREN, M.; SAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases : improved thermal stability, and ligand complexes. **Prog. Bioph. Mol. Biol.,** v.89, p.246-291, 2005.

SHAH, A.R.; SHAH, R.K. & MADAMWAR, D. Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from *Aspergillus foetidus*. **Bioresource Technology,** v.97, p.2047-2053, 2006.

SIEGEL, R.S. ; BRIERLEY,R.A. Methylotrophic yeast *Pichia Pastoris* produced in High-cell-density fermentations With high cell yields as vehicle for recombinant protein production. **Biotechnology Bioengineeering,** v.34, p.403-404, 1989.

SILVA, C.H.C.; FONSECA, A.S.; LUCENA NETO, S.A.; XIMENES, E.A; PULS, J. ; FERREIRA-FILHO E,X. Evaluation of hydrolysis products of xylans by xylan-degrading enzymes from *Humicola grisea* var. *thermoidea* and *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**,

v.16, p.81-83, 2000.

SILVA, M.R.; SILVA, M.A.A.P.; CHANG, Y.K. Utilização da farinha de jatobá (*Hymenaea strigonocarpa* Mart) na elaboração de biscoitos tipo cookie e avaliação de aceitação por testes sensoriais afetivos univariados e multivariados. **Ciência e Tecnologia de alimentos,** v.18 (1), p.25-34. 1998.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application. **Critical Reviews in Biotechnol,** v.22, p.33-64, 2002.

SUN, J.-Y.; LIU, M.-Q.; WENG, X.-Y.; QIAN, L.-C.; GU, S.-H. Expression of recombinant *Thermomonospora fusca* xylanase A in *Pichia pastoris* and xylooligosaccharides released from xylans by it. **Food Chemistry,** v.104: p. 1055-1064, 2007.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology,** v.17, p.39-67.

TAN, L. U. L.; WONG, K. K. Y.; YU, E. K. C.; SADLER, J. N. Purification and characterization of two D-xylanases from *Trichoderma harzianum*. **Enzyme Microb. Technol.,** v. 7, p.425. 1985.

TANAKA, H.; OKUNO, T.; MORIYAMA, S.; MUGURUMA, M.; OHTA, K. Acidophilic Xylanase from *Aureobasidium pullulans*: Efficient Expression and Secretion in *Pichia pastoris* and Mutational Analysis. **J. Biosci. Bioeng**. v.98(5), p.338-343, 2004.

TANSEY, M.R. Isolation of thermophilic fungi from self-heated, industrial wood chip piles. **Mycologia,** v.63, p.537-547, 1971.

THOMPSON, N.S. Hemicellulose as a biomass resource. In: Soltes, J. Wood and Agricultural Residues; research on use for feed, fuels and chemicals. New York, Academic Press. p. 101-119. 1983.

TIMELL, T. E. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. **Wood Sci. Technol.,** v.1, p.45-70,1967.

UJIIE, M.; ROY, C., YAGUCHI, M. Low molecular weight xylanase from *Trichoderma viride*. **App. Environ. Microbiol.,** v.57, p.1860, 1991.

VADI, R. M.; STROHFUS, B. R.H; WEST, T. P. Characterization of a xylanase from *Aureobasidium pullalans* Y-2311-1. **Microbios,** v.85, p.179, 1996

VAN DER BROECK, H.C.; DE GRAAFF, L.L.; HILLE, J.D.R.; VAN OOYN, A.J.J.; VISSER, J. & HARDER, A. Cloning and expression of xylanase genes from fungal origin. European Patent Nº 0.463.706.A1.1992

VIIKARI, L. Pulp and the environment. Paperi ja Puu- **Paper and Timber,** v.73, p.384-89, 1991.

VIIKARI, L.; Kantelinem, A.; Sundquist, J.; Linko, M. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. **FEMS Microbiol. Rev.,** v.13, p. 335-50, 1994.

WANG, Y.; ZHANG, H.; HE, Y.; LUO, H; YAO,B. Characterization, gene cloning, and expression of a novel xylanase XYNB de *Streptomyces olivaceoviridis* A1. **Aquaculture,** v.267, p.328-334, 2007.

WHITE, W. L.; DOWNING, M. H. *Humicola grisea*, a soil-inhabiting cellulolytic Hypomycete. **Mycologia**, v.45, p.951-963, 1953

WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L. & SADDLER, J.N. Multiplicity of β-1,4-Xylanase in Microrganisms: functions and applications. **Microbiological Reviews**, 52: 305-317. 1988.

YOSHIDA, H.; ANRAKU, S.I.; HAYASHIDA, S. Production and purification of a novel type of CMCase from Humicola grisea var. thermoidea YH-78. **Agric. Biol. Chem.,** v.46, p. 75-82, 1982.

ZHANG, G.M; HUANG, J.; HUANG, G.R; MA, L.X.; ZHANG X.E. Molecular cloning and heterologous expression of a new xylanase gene from *Plectosphaerella cucumerina*. **Appl Microbiol Biotechnol.,** v.74, p.339-346, 2007.