

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

WAGNER RODRIGUES DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENDOXILANASE
RECOMBINANTE (HXYN2r) DO FUNGO TERMOFÍLICO
Humicola grisea VAR. *thermoidea* E SUA APLICAÇÃO
NA SACARIFICAÇÃO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabrícia Paula de Faria

TESE DE DOUTORADO

Goiânia-GO, 2008

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

WAGNER RODRIGUES DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENDOXILANASE
RECOMBINANTE (HXYN2r) DO FUNGO TERMOFÍLICO
Humicola grisea VAR. *thermoidea* E SUA APLICAÇÃO
NA SACARIFICAÇÃO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabrícia Paula de Faria

Tese de Doutorado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Tropical da
Universidade Federal de Goiás
como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em
Medicina Tropical

Goiânia-GO, 2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

C331c Carvalho, Wagner Rodrigues de.
Caracterização bioquímica da endoxilanase recombinante (HXYN2r) do fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* e sua aplicação na sacarificação de resíduos agrícolas [manuscrito] / Wagner Rodrigues de Carvalho. – 2008.
ix, 122 f. : il., figs., tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabrícia Paula de Faria.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2008.

Bibliografia: f.108-122.

Inclui lista de tabelas, figuras e de abreviaturas.

1. Microbiologia aplicada 2. Endoxilanases 3. *Humicola grisea*
4. Hidrólise enzimática 5. Resíduos agrícolas 6. Enzimas de fungos
I. Faria, Fabrícia Paula de II. Universidade Federal de Goiás, **Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública** III. Título.

CDU: 579.6

Trabalho realizado nos Laboratórios de Biotecnologia de Fungos, Enzimologia e Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, com o apoio financeiro da CAPES e CNPq.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabrícia Paula de Faria

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

Prof^a. Dr^a. Telma Alves Garcia

Prof^a. Dr^a. Kátia Flávia Fernandes Silva

Prof. Dr. Luiz Arthur Mendes Bataus

Cada pensamento,
Cada palavra,
Cada sussurro,
Cada porém de estar aqui agora,
Me faz acreditar,
Que vivemos muito além do que pensamos.
Cada amanhecer,
Cada entardecer,
Cada anoitecer,
Me faz perceber que a vida é muito mais,
Do que somos capazes de imaginar.
Cada lágrima,
Cada dor,
Cada momento,
Me faz entender que por mais
Que fugimos,
O acaso sempre nos encontra,
Pois algumas coisas são certas
E uma delas é de que
Sofrer também faz parte da história de cada um.
Cada vitória,
Cada sorriso,
Cada nova vida,
Me faz amar as melhores coisas que existem,
E a superar aquelas
Que por mais que aparentam invencíveis,
Acabam por si,
Quando abraçamos a fé.

Dedico este trabalho à minha amada mãe Arlete, o meu porto seguro e exemplo de força e vida a ser seguido sempre. Aos meus irmãos Eliane e Paulo que tanto amo, e a meus avós Joaquim[†] e Rosa[†] que sempre foram muito importantes em nossas vidas e estarão sempre no meu coração. Ao meu sobrinho Eduardo pela alegria e luz que trás à minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre guiou minha vida e concedeu-me paciência, sabedoria, coragem e força para atingir meus objetivos.

À minha orientadora, Fabrícia, um agradecimento especial pela oportunidade que me foi dada, pela paciência, compreensão e força em todos os momentos. Obrigado por tudo o que fez e continua fazendo por mim.

À professora Rosália pela amizade, simpatia e por toda sua ajuda.

Ao professor Cirano por toda a ajuda no desenvolvimento do trabalho, pelas dúvidas tiradas e ensinamentos transmitidos. Pelo exemplo de cooperação, disponibilizando o laboratório e nos recebendo para a realização dos experimentos.

À professora Kátia, pela ajuda nos experimentos, discussão dos resultados e principalmente pela amizade.

Ao meu amigo Júlio, que mesmo a distância sempre me auxilia nos momentos que mais preciso, e a quem sempre serei grato por tudo que faz por mim e por ter sua amizade.

Ao Fernando, que tem participação direta neste trabalho, muito obrigado pela ajuda e companheirismo.

À Gisele, muito obrigado pela ajuda e tão agradável convívio.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia de Fungos, Rafael, Guilhermar, Lorena, Sulamita, Syd, Wesley e Bruno pelo convívio e ajuda.

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia, pela recepção, ajuda nos experimentos e excelente ambiente para se trabalhar, Cibele, Cristine, Sonáide, Valdirene, Roberto, Andrei, Regiane, Marcelo, Vanessa, Christiany e Fausto.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular, em especial Alexandre, Clayton, Nádia e Lidiane pela ajuda nos experimentos e amizade.

Ao José Clementino e a Karinne (secretários da pós-graduação do IPTSP) e a Gleizlene (secretária da pós-graduação em Biologia), muito obrigado por toda a ajuda e pela simpatia.

Às pessoas que passaram pela minha vida deixando suas marcas, ajuda ou ensinamentos, e que de alguma forma sempre serão especiais.

A CAPES pela bolsa de estudo concedida.

A todos os que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de Abreviaturas.....	vi
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Xilana.....	1
1.2. Sistema Xilanolítico.....	2
1.2.1. Endoxilanases.....	3
1.2.1.1. <i>Propriedades Bioquímicas.....</i>	<i>3</i>
1.2.1.2. <i>Classificação.....</i>	<i>4</i>
1.2.1.3. <i>Especificidade ao Substrato.....</i>	<i>5</i>
1.2.1.4. <i>Estrutura Tridimensional.....</i>	<i>6</i>
1.3. Produção de Endoxilanases Microbianas.....	8
1.4. Produção de Endoxilanases Recombinantes.....	11
1.4.1. Sistema de Expressão Heteróloga em <i>P. pastoris</i>	11
1.4.1.1. <i>Metabolismo de Metanol.....</i>	<i>12</i>
1.4.1.2. <i>Vetores e Linhagens de P. pastoris.....</i>	<i>13</i>
1.4.1.3. <i>Peptídio Sinal e Glicosilação em P. pastoris.....</i>	<i>14</i>
1.4.1.4. <i>Produção de Endoxilanases Recombinantes por P. pastoris.....</i>	<i>16</i>
1.4.1.5. <i>Purificação de Endoxilanases Recombinantes Expressas em P. pastoris.....</i>	<i>17</i>
1.5. Aplicações Biotecnológicas.....	19
1.5.1. Aplicação das Endoxilanases Microbianas na Sacarificação de Substratos Lignocelulósicos.....	22

1.5.1.1. Métodos de Pré-tratamento.....	23
1.5.1.2. Hidrólise Enzimática pelas Hemicelulases.....	24
1.5.1.3. Fermentação do Hidrolisado Hemicelulósico.....	25
1.6. Sistema Xilanolítico do Fungo Termofílico <i>H. grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	26
1.6.1. Genes de Endoxilanase do Fungo <i>H. grisea</i>	29
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Linhagens Utilizadas.....	32
3.1.1. Linhagem do Fungo <i>H. grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	32
3.1.2. Linhagem da Levedura <i>P. pastoris</i>	32
3.2. Meios de Cultura.....	33
3.2.1. Meios e Substrato para Cultivo do Fungo <i>H. grisea</i>	33
3.2.2. Meios para Cultivo da Levedura <i>P. pastoris</i>	34
3.3. Substratos para Dosagem Enzimática e Sacarificação.....	36
3.3.1. Dosagem Enzimática.....	36
3.3.2. Sacarificação por Hidrólise Enzimática.....	36
3.4. Soluções.....	37
3.4.1. Determinação da Atividade Xilanolítica em Placa.....	37
3.4.2. Determinação da Atividade Enzimática pelo Método de DNS.....	37
3.4.2.1. Atividade Xilanolítica.....	38
3.4.2.2. Atividade Celulolítica.....	38
3.4.3. Eletroforese de Proteínas em Gel Desnaturante de Poliacrilamida.....	39
3.4.3.1. Revelação das Proteínas por Coloração com Azul de Coomassie.....	41
3.4.3.2. Revelação das Proteínas por Coloração com Nitrato de Prata.....	41
3.4.4. Zimograma para Atividade de Endoxilanase.....	43
3.4.5. Soluções Tampões para Caracterização Enzimática.....	43
3.4.6. Soluções Gerais.....	45

3.5. Metodologia.....	47
3.5.1. Produção da Enzima HXYN2r pelos Transformantes de <i>P. pastoris</i> Cultivados em Diferentes Fontes de Nitrogênio.....	47
3.5.2. Otimização da Produção de HXYN2r por Planejamento Fatorial.....	48
3.5.3. Produção da Enzima HXYN2r para a Etapa de Purificação.....	50
3.5.4. Dosagem de Glicose.....	50
3.5.5. Dosagem da Atividade Xilanolítica pelo Método de Açúcares Redutores.....	50
3.5.6. Dosagem da Atividade Celulolítica pelo Método de Açúcares Redutores.....	52
3.5.6.1. Dosagem de FPase.....	52
3.5.6.2. Dosagem de CMCase.....	53
3.5.6.3. <i>Dosagem de Avicelase</i>	55
3.5.7. Dosagem de Proteínas.....	56
3.5.8. Eletroforese de Proteínas em Gel Desnaturante de Poliacrilamida.....	57
3.5.9. Zimograma para Atividade de Endoxilanase.....	58
3.5.10. Determinação da Massa Molecular das Proteínas em Gel.....	59
3.5.11. Purificação da Enzima HXYN2r.....	59
3.5.11.1. <i>Obtenção do Extrato Enzimático</i>	59
3.5.11.2. <i>Fracionamento das Proteínas por Cromatografia</i>	60
3.5.12. Caracterização Bioquímica da Enzima HXYN2r.....	60
3.5.12.1. <i>Determinação do pH Ótimo</i>	60
3.5.12.2. <i>Determinação da Temperatura Ótima</i>	61
3.5.12.3. <i>Determinação da Estabilidade da Enzima em Diferentes Valores de pH</i>	61
3.5.12.4. <i>Determinação da Termoestabilidade</i>	62
3.5.12.5. <i>Determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$</i>	62
3.5.12.6. <i>Efeito de Íons, Açúcares e Agentes Desnaturantes</i>	62
3.5.13. Sacarificação de Substratos Lignocelulósicos por Hidrólise Enzimática.....	63
3.5.13.1. <i>Produção de Enzimas pelo <i>H. grisea</i></i>	63

3.5.13.2. Pré-tratamento.....	64
3.5.13.3. Hidrólise Enzimática.....	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4.1. Características Bioquímicas da Enzima HXYN2r.....	67
4.1.2. Produção da Enzima HXYN2r.....	67
4.1.2.1. Influência de Diferentes Fontes de Nitrogênio.....	67
4.1.2.2. Influência da Concentração das Fontes de Carbono e Nitrogênio e da Densidade Óptica Inicial a 600 nm.....	70
4.1.2.3. Produção da Enzima HXYN2r para a Etapa de Purificação.....	74
4.1.3. Purificação da HXYN2r.....	76
4.1.4. Caracterização Bioquímica da Endoxilanase HXYN2r Purificada.....	80
4.1.4.1. Determinação da Massa Molecular da HXYN2r Purificada.....	80
4.1.4.2. Efeito do pH na Atividade da HXYN2r.....	81
4.1.4.3. Efeito da Temperatura na Atividade da HXYN2r.....	82
4.1.4.4. Efeito do pH na Estabilidade da HXYN2r.....	83
4.1.4.5. Efeito da Temperatura na Estabilidade da HXYN2r.....	84
4.1.4.6. Determinação de Km e V _{máx}	85
4.1.4.7. Efeito de Íons, Açúcares e Agentes Desnaturantes.....	86
4.2. Aplicação de Enzimas do Fungo <i>H. grisea</i> para a Sacarificação de Substratos Lignocelulósicos.....	88
4.2.1. Produção e Caracterização de Enzimas do Fungo <i>H. grisea</i>	88
4.2.1.1. Produção de Enzimas Xilanolíticas e Celulolíticas.....	88
4.2.1.2. Caracterização Bioquímica das Endoxilanases do Fungo <i>H. grisea</i> para a Hidrólise Enzimática.....	91
4.2.3. Hidrólise Enzimática.....	94
4.2.3.1. Hidrólise Enzimática dos Substratos Moídos (Substratos brutos).....	94
4.2.3.2. Pré-tratamento dos Substratos.....	97
4.2.3.3. Hidrólise Enzimática dos Substratos Moídos após Pré-tratamento...	101
5. CONCLUSÕES.....	106

6. PERSPECTIVAS.....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Estrutura da xilana e os pontos de clivagem pelas enzimas xilanolíticas.....	2
Figura 02. Estrutura representativa das enzimas de várias famílias de glicosídeo hidrolases.....	5
Figura 03. Estrutura tridimensional da endoxilanase <i>NpXyn11A</i> , de <i>N. patriciarum</i>	7
Figura 04. Modelo tridimensional de HXYN2 e os resíduos do sítio ativo.....	8
Figura 05. Metabolismo de metanol pela <i>P. pastoris</i>	13
Figura 06. Atividade xilanolítica em placa dos transformantes de <i>P. pastoris</i> contra xilana oat-spelt.....	68
Figura 07. Atividade xilanolítica dos transformantes 12.3, 43.1 e 43.4 de <i>P. pastoris</i> , crescidos em meio BMM-L e BMMY-U por 120 h a 30°C e 250 rpm.....	69
Figura 08. Cinética da produção da enzima HXYN2r pelo transformante 12.3 de <i>P. pastoris</i> em meio BMMY-U de acordo com o planejamento fatorial.....	71
Figura 09. Gráfico de Pareto do efeito da composição do meio na produção da HXYN2r pela <i>P. pastoris</i>	73
Figura 10. SDS-PAGE e Gel de atividade (13%) do sobrenadante de cultura da produção de HXYN2r em frasco corado com Azul de Coomassie e Vermelho do Congo, respectivamente.....	75
Figura 11. Perfil da cromatografia do EHXYN2r, eluído da coluna de gel filtração Sephacryl S-100.....	76
Figura 12. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE (13%) corado com nitrato de prata.....	77
Figura 13. Determinação da massa molecular da HXYN2r pura, por SDS-PAGE com o uso de marcadores de massa molecular, por meio de regressão linear.....	80

Figura 14. Efeito do pH sobre a atividade da HXYN2r purificada por gel filtração e na PpHXYN2r, produzida pela <i>P. pastoris</i> em meio BMMY-U a 30°C e 150 rpm.....	81
Figura 15. Efeito da temperatura sobre a atividade da HXYN2r purificada por gel filtração e no sobrenadante de cultura, produzida pela <i>P. pastoris</i> em meio BMMY-U a 30°C e 150 rpm.....	82
Figura 16. Efeito do pH na estabilidade da HXYN2r purificada por gel filtração e no sobrenadante de cultura, produzida pela <i>P. pastoris</i> em meio BMMY-U a 30°C e 150 rpm.....	83
Figura 17. Efeito da temperatura na estabilidade da HXYN2r purificada por gel filtração e no sobrenadante de cultura, produzida pela <i>P. pastoris</i> em meio BMMY-U a 30°C e 150 rpm.....	84
Figura 18. Efeito da concentração de xilana "oat-spelt" na velocidade da reação da HXYN2r purificada por gel filtração, produzida pela <i>P. pastoris</i> em meio BMMY-U a 30°C e 150 rpm.....	85
Figura 19. Efeito de íons, açúcares e agentes desnaturantes na atividade enzimática da HXYN2r purificada por gel filtração, produzida pela <i>P. pastoris</i> em meio BMMY-U a 30°C e 150 rpm.....	87
Figura 20. Cinética da produção de endoxilanas e celulasas pelo fungo <i>H. grisea</i> crescido em MM a 42°C e 120 rpm.....	90
Figura 21. Efeito do pH sobre a atividade das endoxilanas totais do fungo <i>H. grisea</i> cultivado em MM a 42°C e 120 rpm.....	91
Figura 22. Efeito da temperatura sobre a atividade das endoxilanas totais do fungo <i>H. grisea</i> cultivado em MM a 42°C e 120 rpm.....	92
Figura 23. Efeito do pH na estabilidade das endoxilanas totais do fungo <i>H. grisea</i> cultivado MM a 42°C e 120 rpm.....	93
Figura 24. Efeito da temperatura na estabilidade das endoxilanas totais do fungo <i>H. grisea</i> cultivado MM a 42°C e 120 rpm.....	94
Figura 25. Obtenção de ART do BCA pela hidrólise enzimática por 48 h a 42°C e 130 rpm.....	95
Figura 26. Obtenção de ART do SM pela hidrólise enzimática por 48 h a 42°C e 130 rpm.....	96

Figura 27. Concentração de glicose e ART liberados pela ação dos ácidos sulfúrico e clorídrico agindo sobre BCA pré-tratado, por diferentes intervalos de tempo, a 121°C e 1 atm.....	98
Figura 28. Concentração de glicose e ART liberados pela ação dos ácidos sulfúrico e clorídrico agindo sobre SM pré-tratado, por diferentes intervalos de tempo, a 121°C e 1 atm.....	98
Figura 29. Concentração de glicose e ART liberados pela ação dos ácidos sulfúrico e clorídrico agindo sobre RB72454 pré-tratado, por diferentes intervalos de tempo, a 121°C e 1 atm.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Rendimento e colunas usadas na purificação de endoxilanasas expressas em <i>P. pastoris</i>	19
Tabela 02. Aplicações potenciais das endoxilanasas.....	21
Tabela 03. Codificação de níveis para os parâmetros avaliados.....	48
Tabela 04. Matriz para o planejamento fatorial 2 ³	49
Tabela 05. Ensaio de Atividade Xilanólítica pelo Método de Açúcares Redutores.....	51
Tabela 06. Determinação da Curva de Calibração de Xilose para Açúcares Redutores.....	51
Tabela 07. Ensaio de Atividade de FPase pelo Método de Açúcares Redutores	52
Tabela 08. Ensaio de Atividade de CMCase pelo Método de Açúcares Redutores.....	53
Tabela 09. Determinação da Curva de Calibração de Glicose para FPase e CMCase.....	54
Tabela 10. Ensaio de Atividade Avicelase pelo Método de Açúcares Redutores.....	55
Tabela 11. Determinação da Curva de Calibração de Glicose para Avicelase	56
Tabela 12. Tampões utilizados na determinação do pH ótimo.....	61
Tabela 13. Experimentos do planejamento fatorial variando as condições de cultivo do transformante 12.3 em meio BMMY-U e a respectiva produção máxima da endoxilanasase HXYN2r.....	72
Tabela 14. Etapas do protocolo de purificação da enzima HXYN2r.....	79
Tabela 15. Porcentagem em peso da composição de materiais lignocelulósicos.....	97
Tabela 16. Recuperação de massa dos substratos lignocelulósicos após pré-tratamento com ácido sulfúrico 0,25% (p/v) por 30 min.....	100
Tabela 17. Concentração de glicose e ART presente no hidrolisado dos substratos lignocelulósicos.....	101

Tabela 18. Conversão da fração celulósica dos substratos BCA, SM e RB 72454 em glicose por hidrólise enzimática a 50°C.....	102
Tabela 19. Conversão da fração celulósica dos substratos RB 835486, RB 867515 e SP 832847 em glicose por hidrólise enzimática a 50°C.....	102
Tabela 20. Conversão da fração celulósica dos substratos BCA, SM e RB 72454 em ART por hidrólise enzimática a 50°C.....	102
Tabela 21. Conversão da fração hemicelulósica dos substratos RB 835486, RB 867515 e SP 832847 em ART por hidrólise enzimática a 50°C.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

ART	açúcares redutores totais
AO	enzima álcool oxidase
AOX1	gene que codifica a enzima álcool oxidase 1
Avicel	celulose microcristalina
Avicelase	atividade enzimática em avicel
BCA	bagaço de cana-de-açúcar
BMG-L/BMM-L	meio mínimo tamponado com glicerol/metanol e extrato de levedura ("buffered minimal with glycerol/methanol and yeast extract")
BMG-U/BMM-U	meio mínimo tamponado com glicerol/metanol e uréia ("buffered minimal with glycerol/methanol and urea")
BMGY-L/BMMY-L	meio mínimo tamponado com glicerol/metanol e extrato de levedura e peptona ("buffered minimal with glycerol/methanol and yeast extract and peptone")
BMGY-U/BMMY-U	meio mínimo tamponado com glicerol/metanol e extrato de levedura e uréia ("buffered minimal with glycerol/methanol and yeast extract and urea")
CMC	carboximetilcelulose
CMCase	atividade enzimática em CMC
Da	Dalton
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
DO ₆₀₀	densidade óptica medida a 600 nm
EHg	sobrenadante de cultura contendo enzimas do <i>Humicola grisea</i>
EHXYN2	sobrenadante de cultura da <i>P. pastoris</i> contendo a enzima HXYN2r concentrada
FC	fonte de carbono
FN	fonte de nitrogênio

FPase	atividade enzimática em papel de filtro
FPU	unidades de papel de filtro
<i>g</i>	velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
HIS4	histidinol desidrogenase
MES	ácido N-morfolinoetanolsulfônico
MM	meio mínimo
PAm	persulfato de amônia
PpHXYN2r	sobrenadante de cultura da <i>Pichia pastoris</i> contendo a enzima HXYN2r
p/v	peso por volume
q.s.p.	quantidade suficiente para
rpm	rotações por minuto
SDS	duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida
SM	sabugo de milho
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina
Tris	tri(hidroximetil) aminometano
U	unidade de atividade enzimática
v/v	volume por volume
YNB	nitrogênio levedura base ("Yeast Nitrogen Base")
YPD	meio contendo extrato de levedura, peptona e dextrose ("Yeast Extract Peptone Dextrose Medium")
YPTM	meio contendo extrato de levedura, peptona e triptona de caldo de soja ("Yeast Peptone Triptone Medium")

RESUMO

As endoxilanases têm sido utilizadas no biobranqueamento da polpa de papel, na bioconversão da biomassa de plantas, nas indústrias alimentícias e de ração animal, entre outras. Para a seleção de endoxilanases que possam ser empregadas em processos industriais específicos é importante caracterizar enzimas isoladas de diferentes fontes. O fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* é um bom produtor de endoxilanases extracelulares e o gene que codifica uma das endoxilanases (HXYN2) deste fungo foi isolado e expresso na levedura *Pichia pastoris*. O presente trabalho se concentrou na produção, purificação e caracterização bioquímica da endoxilanase recombinante HXYN2 e na sua aplicação na hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos. As condições de cultivo da levedura *P. pastoris* em frascos, utilizando o transformante 12.3 e o meio BMMY-U foram otimizadas e obteve-se uma atividade xilanolítica de 478,2 U/mL após 96 h de cultivo, com uma concentração de 100 mg/L de proteínas, utilizando 2,34% (p/v) de fontes de nitrogênio (extrato de levedura e urea – 1,34:1,0% - p/v), 1% (v/v) de metanol e DO₆₀₀ de 10. A enzima HXYN2r foi purificada por cromatografia de filtração em gel com um rendimento de 6,4% e apresentou pH e temperatura ótimos de 6,5 e 60°C, respectivamente, mantendo 100% da atividade inicial após 4 h de incubação nos pH's 5,5, 6,5 e 7,5. O tempo de meia-vida foi de 18 min a 60°C e a enzima manteve 100% da atividade após 3 h de incubação a 50°C. Os valores de K_m e $V_{máx}$ foram 7,9 mg/mL e 235,4 $\mu\text{mol}/(\text{mL}.\text{min})$, respectivamente. A enzima HXYN2r foi aplicada na hidrólise enzimática de sabugo de milho (SM), bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e palha de cana-de-açúcar (PCA) sozinha ou em conjunto com as enzimas do sistema xilanolítico e celulolítico produzidas pelo fungo *H. grisea*. Para os experimentos de hidrólise enzimática os substratos testados foram moídos e submetidos a uma etapa de pré-tratamento com 0,25% (p/v) de H₂SO₄ por 30 min. Nos ensaios de hidrólise enzimática as melhores taxas de conversão da fração hemicelulósica dos substratos foram obtidas utilizando-se a PpHXYN2r suplementado com o EHg: 42,8% para o SM; 9,6% para o BCA e, em média 20% para as amostras foliares.

ABSTRACT

Xylanases have been used in the biobleaching of paper pulps, in bioconversion of plant biomass, for food and feed industries, among others. For successful selection of xylanases suitable for specific industrial applications it is important to characterize enzymes isolated from different sources. The thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* is described as a good producer of extracellular endoxylanases and the *Hxyn2* gene from this fungus was isolated and expressed in yeast *Pichia pastoris*. The aim of this project was focused on the production, purification and biochemical characterization of the recombinant HXYN2 (HXYN2r) enzyme and application on enzymatic hydrolysis of lignocellulosics substrates. The culture conditions of *P. pastoris* in flasks, using the 12.3 transformant and BMMY-U medium, were optimized and the best xylanolytic activity was 478.2 U/mL after 96 h, with a protein concentration of 100 mg/L, using 2.34% (w/v) of nitrogen sources (yeast extract plus urea – 1.34:1.0% - w/v), 1% (v/v) of methanol, and OD₆₀₀ of 10. The HXYN2r enzyme was purified by gel filtration chromatography with a yield of 6.4% and showed optimum pH and temperature values of 6.5 and 60°C, respectively, maintaining 100% of initial activity after 4 h of incubation at pH 5.5, 6.5 and 7.5. The half-life time was 18 min at 60°C and the enzyme was 100% stable after 3 h of incubation at 50°C. K_m and V_{max} values were 7.9 mg/mL e 235.4 $\mu\text{mol}/(\text{mL}.\text{min})$, respectively. The HXYN2r enzyme were used on the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse (SCB), corn cob (CC) and foliar sample of sugarcane (FSC) alone or with the enzymes of xylanolytic and cellulolytic system produced by *H. grisea* fungus. For enzymatic hydrolysis experiments, the substrates were milled and pretreated with 0.25% (w/v) of H₂SO₄ by 30 min. On the enzymatic hydrolysis the best conversion yield of hemicellulosic fractions were obtained using PpHXYN2r supplemented with EHg: 42.8% to CC, 9.6% to SCB and, a mean of 20% to foliar samples.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Xilana

A hemicelulose, a celulose e a lignina são os principais constituintes poliméricos da parede celular das plantas (Kulkarni *et al.*, 1999). A xilana constitui o principal componente da hemicelulose, um complexo de carboidratos poliméricos incluindo xilana, xiloglucana (heteropolímero de D-xilose e D-glicose), glucomanana (heteropolímero de D-glicose e D-manose), galactoglucomanana (heteropolímero de D-galactose, D-glicose e D-manose) e arabinogalactana (heteropolímero de D-galactose e arabinose) (Shallom & Shoham, 2003). A xilana é o principal polissacarídeo estrutural nas células de plantas e é o segundo mais abundante na natureza, sendo responsável por aproximadamente um terço de todo carbono orgânico renovável na terra (Prade, 1995). A xilana é encontrada na interface entre a lignina e a celulose onde é importante na ligação das fibras e na integridade da parede celular (Beg *et al.*, 2001).

A cadeia principal da xilana é formada por unidades de 1,4- β -D-xilanopiranosil que podem ser substituídas em vários graus com ácido glucurônico, 4-O-metil-D-glucuronopiranosil, α -L-arabinofuranose e grupamento acetil (Figura 1). A xilana apresenta ainda pequenas quantidades de ácido ferúlico e *p*-cumárico ligados aos seus resíduos de L-arabinose (Kulkarni *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000). Dependendo das ramificações presentes na cadeia central, as xilanas podem ser denominadas como arabinoxilanas, glucuronoxilanas, glucuronoarabinoxilanas ou homoxilanas. Xilanas de diferentes fontes apresentam considerável variação em sua composição e estrutura. Por exemplo, elas representam aproximadamente 15 a 30% do conteúdo da parede celular em madeira dura, onde existe como metilglucuronoxilana, e de 7 a 10% em madeira macia, onde existe como arabino-4-O-metilglucuronoxilana. O grau de polimerização geralmente varia de 150 a 200 resíduos de β -xilopiranosose em madeira dura e de 70 a 130 resíduos em madeira mole (Kulkarni *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2003).

A xilana do tipo O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana consiste de pelo menos 70 resíduos de xilopiranosose com ramificações ligadas ao C-2 a cada dez resíduos de xilose em média, pelo ácido glucurônico (Woodward, 1984). Essa xilana é altamente acetilada, sendo que a acetilação ocorre mais usualmente no C-3 do que

no C-2 (Beg *et al.*, 2001; Bouveng, 1961; Lindberg *et al.*, 1973). Os grupos acetil são responsáveis pela solubilidade parcial da xilana em água (Whistler & Richards, 1970), e são facilmente removidos quando ela é sujeita à extração alcalina (Dekker, 1989; Sunna & Antranikian, 1997).

A arabino-4-O-metilglucuronoxilana contém geralmente um resíduo de ácido 4-O-metil-glucurônico a cada 5-6 resíduos de xilose e um resíduo de L-arabinofuranose a cada 5-12 resíduos de D-xilose ligado ao C-2 e C-3, respectivamente (Beg *et al.*, 2001; Hon & Shiraishi, 1991).

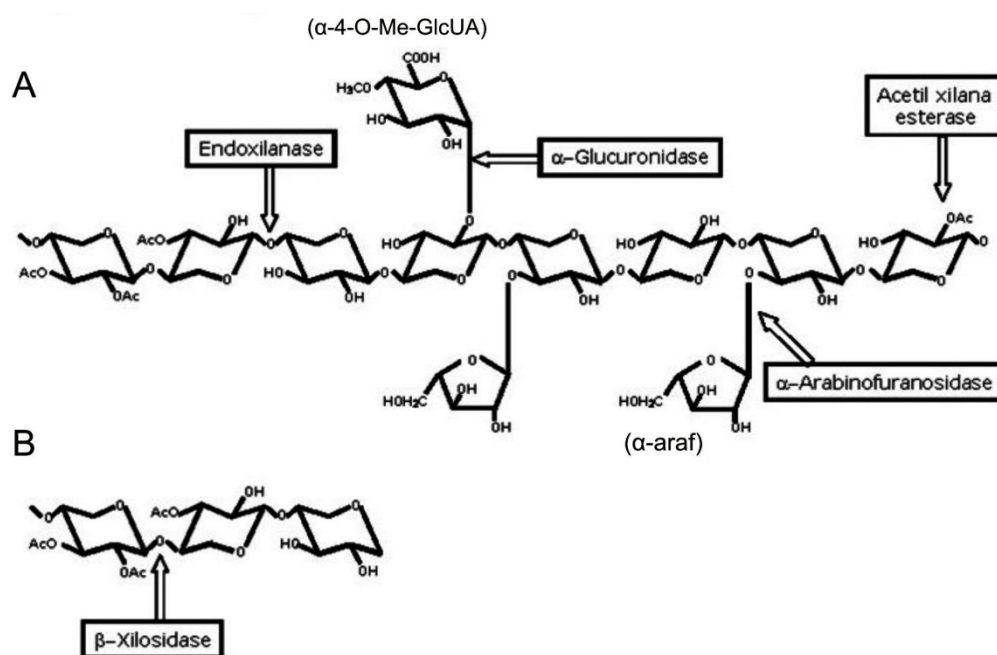


Figura 1. (A) Estrutura da xilana e os pontos de clivagem pelas enzimas xilanolíticas. Ac: grupo acetil; α-araf: α-arabinofuranose; α-4-O-Me-GlcUA: ácido α-4-O-metilglucurônico. (B) Hidrólise de xilo-oligossacarídeo por β-xilosidase. Adaptada de (Sunna & Antranikian, 1997).

1.2. Sistema Xilanolítico

Devido à heterogeneidade e complexidade da xilana, a sua completa hidrólise requer uma ampla variedade de enzimas agindo cooperativamente para convertê-la em unidades de xilose. As arabinofuranosidases hidrolisam o grupo terminal não redutor de arabinofuranose de arabinanas, arabinoxilanas e arabinogalactanas. As glucuronidases hidrolisam as ligações α-1,2-glicosídicas entre

a xilose e o ácido glucurônico. A completa hidrólise de glucuronoxilanas requer esterases para remover os grupos acetil e ácidos fenólicos. As esterases quebram as ligações da xilose com o ácido acético (acetil-xilana esterase), resíduos da cadeia de arabinose com ácido fenólico (ácido fenólico esterase) e resíduos da cadeia de arabinose com ácido cumárico (ácido cumárico esterase). As endoxilanases hidrolisam as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 dentro da cadeia da xilana produzindo xilo-oligossacarídeos, os quais são convertidos em xilose pela β -xilosidase. Todas estas enzimas atuam cooperativamente para converter a xilana em unidades de xilose (Puls *et al.*, 1987; Subramaniyan & Prema, 2002).

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).

Estas 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, β -1,4-D-xilana-xilanohidrolase, endo- β -1,4-D-xilanase, β -1,4-xilanase e β -xilanase (Collins *et al.*, 2005).

1.2.1.1. Propriedades Bioquímicas

As endoxilanases microbianas constituem-se em enzimas monoméricas com massa molecular entre 8 e 145 kDa. Usualmente, estas enzimas apresentam atividade ótima em temperaturas entre 40 e 60°C (mesofílicas), pH ótimo de 4 a 7 e ponto isoelétrico variando de 3 a 10 (Kulkarni *et al.*, 1999; Subramaniyan & Prema, 2002). As endoxilanases fúngicas apresentam maior estabilidade, incluindo um pequeno número de enzimas com atividade ótima em temperaturas acima de 80°C (Dusterhoft *et al.*, 1997; Sunna & Antranikian, 1997). Entretanto, foram descritas endoxilanases ativas em temperaturas de 5 a 105°C (Collins *et al.*, 2002, 2003; Kulkarni *et al.*, 1999) e pH de 2 a 11 (Fushinobu *et al.*, 1998; Kimura *et al.*, 2000; Kulkarni *et al.*, 1999).

A ocorrência de enzimas glicosiladas é um fenômeno comum entre as endoxilanases fúngicas (Funaguma *et al.*, 1991; Kulkarni *et al.*, 1999) e entre algumas endoxilanases bacterianas como as de *Clostridium stercorarium* (Berenger *et al.*, 1985), *Streptomyces sp* (Marui *et al.*, 1985) e *Bacillus sp* (Dey *et al.*, 1992). A glicosilação implica na estabilização da estrutura da enzima bem como na sua atividade e termoestabilidade (Kulkarni *et al.*, 1999; Merivuori *et al.*, 1985). Os resíduos de carboidratos mais comumente encontrados nas endoxilanases glicosiladas são a manose, glicose e fucose (Yoshioka *et al.*, 1981).

1.2.1.2. Classificação

As endoxilanases são classificadas como glicosidases (O-glicosídio hidrolases - EC 3.2.1.x) e catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo β -1,4 entre os resíduos de xilose na xilana (Prade, 1995).

Um sistema de classificação baseado na comparação da estrutura primária dos domínios catalíticos foi proposto por Henrissat e colaboradores (1989) e permitiu a classificação não só das endoxilanases, mas das glicosil hidrolases em famílias. Dentre as 106 famílias descritas até o momento, as endoxilanases encontram-se principalmente nas famílias 10 (41%) e 11 (55%) (Singh *et al.*, 2003; Subramaniyan & Prema, 2002; Sunna & Antranikian, 1997). Entretanto foi descrito recentemente o enquadramento de endoxilanases nas famílias 5, 7, 8 e 43 (Collins *et al.*, 2005). As endoxilanases da família 10 apresentam alta massa molecular (> 30 kDa) e pI ácido, e as da família 11 apresentam baixa massa molecular (< 30 kDa) e pI básico ou ácido (Henrissat & Bairoch, 1993; Subramaniyan & Prema, 2002). A estrutura tri-dimensional de cada uma destas famílias pode ser observada na Figura 2.

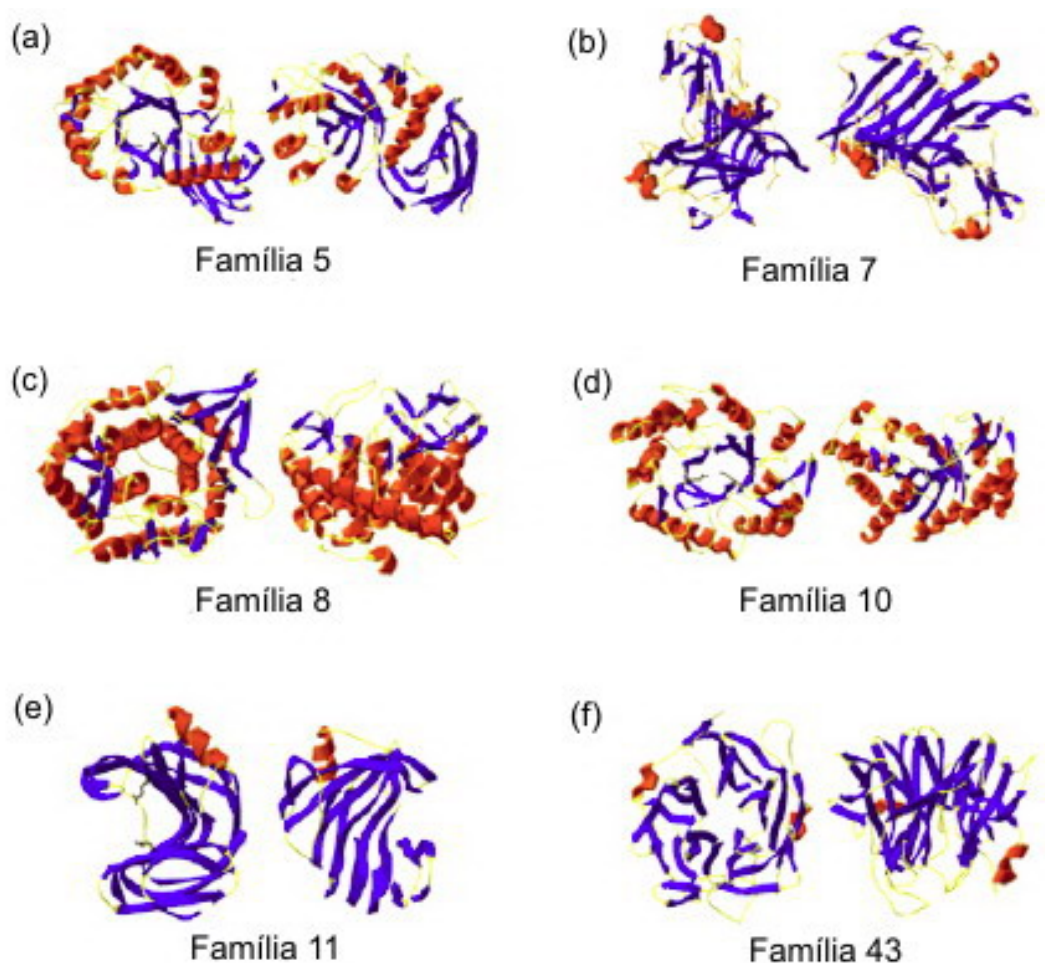


Figura 2. Estrutura representativa das enzimas de várias famílias de glicosídeo hidrolases (Collins *et al.*, 2005). (a) Estrutura de uma enzima da família 5, XynA, de *Erwinia chrysanthemi* (Larson *et al.*, 2003); (b) Estrutura da família 7, *Trichoderma reesei* (Kleywegt *et al.*, 1997); (c) Estrutura da família 8, pXyl, *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAH3a (Van Petegem *et al.*, 2002); (d) Estrutura da família 10, *Streptomyces lividans* (Derewenda *et al.*, 1994); (e) Estrutura da família 11, endoxilanase de *T. reesei* (Torronen *et al.*, 1994); (f) Estrutura da família 43, α -L-arabinase de *Cellvibrio japonicus* (Nurizzo *et al.*, 2002).

1.2.1.3. Especificidade ao Substrato

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 glutamyl (em pH ácido/neutro): um resíduo age como catalisador ácido, doando próton para o oxigênio da ligação glicosídica e

o outro como nucleófilo ou base. A hidrólise é estéreo-seletiva, uma reação de deslocamento simples ou dupla que leva respectivamente à inversão ou retenção da configuração do carbono anomérico após clivagem (Davies & Henrissat, 1995).

As endoxilanases podem hidrolisar restritamente as ligações β -1,4 da xilana ou podem exibir reação cruzada e hidrolisar as ligações β -1,4 de outros polímeros, como as da celulose microcristalina. Algumas enzimas somente atuam nas regiões lineares da cadeia de xilana, enquanto outras hidrolisam as regiões ramificadas também, liberando resíduos de arabinose durante a hidrólise (Coughlan, 1992).

Em relação às propriedades catalíticas, as endoxilanases da família 10 têm menor especificidade ao substrato (frequentemente tendo atividade de endoglucanase) e hidrolisam heteroxilanas em uma maior proporção quando comparadas com as da família 11 (Collins *et al.*, 2002). Biely (1985) concluiu que as endoxilanases da família 10, em contraste com as da família 11, são capazes de atacar as ligações glicosídicas próximas aos pontos de ramificação e da extremidade não redutora.

As endoxilanases da família 11 atuam exclusivamente em substratos contendo resíduos de D-xilose. Elas apresentam menor versatilidade catalítica do que as endoxilanases da família 10 e os produtos de hidrólise liberados pela ação desta classe de enzimas contém fragmentos de xilo-oligossacarídeos maiores, os quais podem ser hidrolisados pelas enzimas da família 10 (Biely *et al.*, 1993, 1997).

1.2.1.4. Estrutura Tridimensional

A estrutura tridimensional de algumas endoxilanases fúngicas da família 11 tem sido reportada, como as de *Trichoderma harzianum* (Campbell *et al.*, 1993; Törrönen *et al.*, 1994; Törrönen & Rouvinen, 1995). A estrutura tridimensional dessas enzimas consiste de um domínio único de folhas β antiparalelas organizadas de uma forma regular e uma única α -hélice que se assemelha a uma mão semi-aberta onde as folhas β -1 e β -2 se encontram organizadas formando o “polegar” e a folha β -3 encontra-se 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”. A única estrutura do tipo hélice (α -hélice) se localiza na parte superior da “palma” no lado oposto à cavidade do sítio catalítico (Harris *et al.*, 1997; Törrönen & Rouvinen, 1997).

Os resíduos de aminoácidos conservados entre as endoxilanases da família 11 incluem os dois resíduos catalíticos de ácido glutâmico descritos por Wararchuk e colaboradores (1994) e localizados em lados opostos da cavidade da “palma”. Foi descrito também um conjunto conservado de resíduos aromáticos (triptofano e tirosina) que se situam dentro da cavidade e que estão envolvidos na ligação ao substrato (Harris *et al.*, 1997; Törrönen & Rouvinen, 1997). O sítio catalítico acomoda uma cadeia de cinco a sete unidades de xilopirranose. Vardakou e colaboradores (2008) descreveram uma endoxilanase de *Neocallimastix patriciarum* pertencente à família 11 que contém um único domínio composto de 14 folhas β antiparalelas formando uma estrutura côncava, uma α -hélice unindo as folhas β -13 e β -14 e três α -hélices entre β -6 e β -7 (Figura 3). No centro do sítio ativo estão dois resíduos catalíticos, Glu 113 (nucleófilo) e Glu 201 (ácido-base), localizados nas folhas β -9 e β -14, respectivamente.

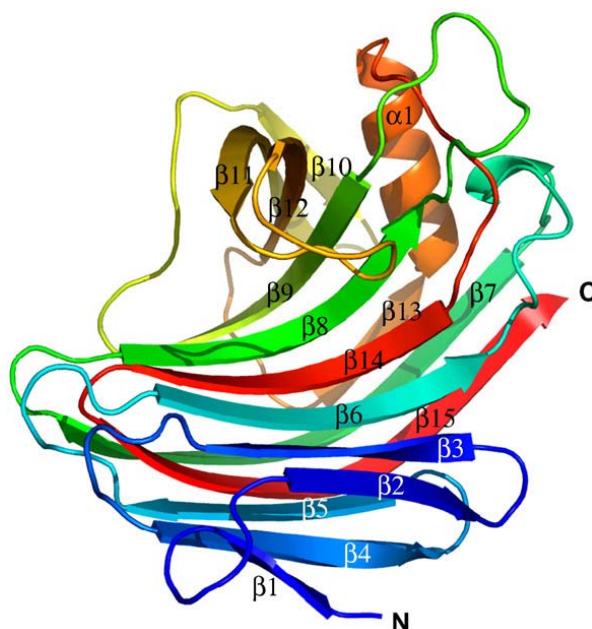


Figura 3. Estrutura tridimensional da endoxilanase *NpXyn11A*, de *N. patriciarum*. O N-terminal da proteína é representado em azul e o C-terminal em vermelho. Fonte: (Vardakou *et al.*, 2008).

A estrutura tridimensional da endoxilanase HXYN2 do fungo termofílico *Humicola grisea* foi construída por homologia com endoxilanases da família 11 depositadas no banco de dados pdb - “protein data bank” (<http://www.pdb.org>). O modelo tridimensional exibiu a estrutura comum das endoxilanases da família 11 com 14 fitas β antiparalelas e uma α -hélice lembrando a forma de uma mão direita semi-aberta. A conformação do sítio ativo é representada por um grande arcabouço contendo os dois resíduos catalíticos de ácido glutâmico (E84 e E175) estabilizados

por pontes de hidrogênio com resíduos aromáticos (Y75, Y88, W77 e Y169) (Figura 4). A enzima HXYN2 recombinante foi produzida pelo fungo *T. reesei* e apresentou-se estável a 70°C por 20 min (Bergquist *et al.*, 2002a, b; Faria *et al.*, 2000, 2002). O modelo tridimensional de HXYN2 revelou que apesar da termoestabilidade observada, a enzima não apresenta nenhuma ponte dissulfeto como é comum entre as endoxilanases termofílicas da família 11, entretanto a comparação da estrutura tridimensional de HXYN2 com endoxilanases termofílicas e mesofílicas apresentou características típicas que devem estar envolvidas com a termoestabilidade observada, como elevado número de pares iônicos e resíduos aromáticos expostos na superfície (Freitas *et al.*, 2003).

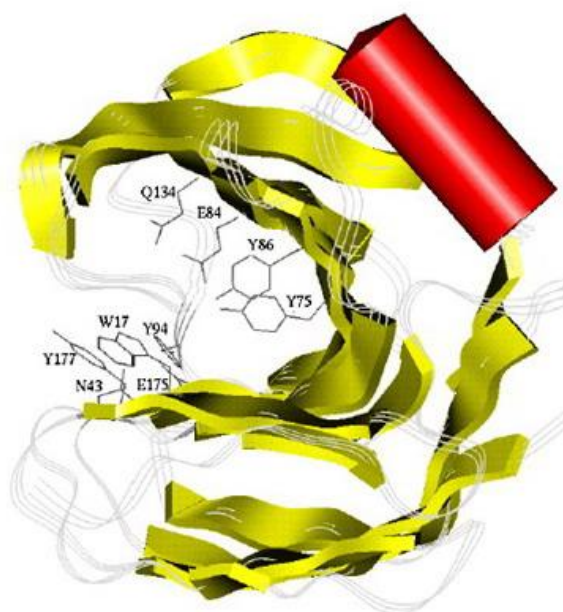


Figura 4. Modelo tridimensional de HXYN2 e os resíduos do sítio ativo. O modelo de HXYN2 é formado por fitas β antiparalelas (amarelas) e uma α -hélice (vermelho). As cadeias laterais dos resíduos catalíticos e aromáticos são representadas no sítio ativo. Fonte: (Freitas *et al.*, 2003).

1.3. Produção de Endoxilanases Microbianas

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*, *H. grisea*, *Melanocarpus albomyces*,

Paecylomyces variotii, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces emersonni*, *T. lanuginosus* e *Thermoascus aurantiacus* (Polizeli et al., 2005).

Substratos lignocelulósicos como sabugo de milho, farelo de aveia, farelo de arroz, palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar têm se mostrado eficientes indutores para a produção de enzimas xilanolíticas por alguns fungos como *Aspergillus awamori*, *Penicillium purpurogenum*, *H. grisea*, entre outros (Beg et al., 2001; Carvalho, 2003; De Paula et al., 1998; Faria, 2000; Haltrich et al., 1996; Moraes et al., 2002). O bagaço de cana-de-açúcar é o principal sub-produto da indústria açucareira e contém aproximadamente 40% de celulose, 24% de hemicelulose e 25% de lignina. Devido a sua abundante disponibilidade, ele pode servir como o substrato ideal para processos microbianos na obtenção de produtos de maior valor agregado (Pandey et al., 2000).

Os meios de cultura utilizados para a produção de endoxilanases por fungos contém, além do substrato indutor, sais minerais (KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , NH_4^+ ou de NO_3^-), íons metálicos (Fe^{2+} , CO^{2+} , Zn^{2+}) e complexas fontes de nitrogênio orgânico, que são mais eficientes para a produção de endoxilanases do que fontes inorgânicas. De uma forma geral a produção de endoxilanases encontra-se relacionada ao controle nutricional dos microrganismos. O crescimento de um microrganismo em uma fonte de carbono favorável, como a glicose, reprime a síntese de enzimas requeridas para o metabolismo de fontes de carbono alternativas, como a xilana, reprimindo a produção das endoxilanases. Assim a presença de glicose no meio de cultura reprime a síntese das enzimas xilanolíticas pelo mecanismo de repressão catabólica, o que pode ocorrer por inibição da transcrição ou por exclusão dos indutores destas enzimas durante o transporte através da membrana da célula (Kulkarni et al., 1999).

A regulação da indução e secreção de endoxilanases pelos microrganismos não é completamente entendida. Uma vez que a xilana é incapaz de entrar na célula microbiana, a produção de endoxilanases é induzida inicialmente por fragmentos de xilana de baixa massa molecular (FXBMM) como a xilose, xilobiose, xilotriose, resultante da ação de uma pequena quantidade de endoxilanase produzida constitutivamente e secretada para o meio. Para a indução da produção de endoxilanases pelos fragmentos de baixa massa molecular há duas possíveis explicações baseadas nos relatos de Gomes e colaboradores (1994), Wang e colaboradores (1992) e Zhao e colaboradores (1997). Uma das explicações é que os FXBMM formados pela hidrólise da xilana são diretamente transportados para dentro da matriz celular. Em seguida, esses oligômeros são degradados pela β -xilosidase intracelular que libera resíduos de xilose. Este conceito é apoiado

pela ocorrência universal de β -xilosidases intracelulares em microrganismos. A outra possibilidade é que os oligômeros são hidrolisados em monômeros durante seu transporte através da membrana celular para dentro da matriz celular (Subramaniyan & Prema, 2002).

A regulação por nitrogênio (repressão catabólica por nitrogênio) é um mecanismo para prevenir ou reduzir a capacidade das células de formar enzimas ou permeases para a utilização de compostos que não são as fontes preferenciais de glutamato e glutamina quando uma fonte preferencial de nitrogênio está disponível. Em ensaios realizados por Kalogeris e colaboradores (1998), foi observado que a utilização de fontes de nitrogênio inorgânico, principalmente o sulfato de amônia, aumentou significativamente a atividade xilanolítica. Lemos e colaboradores (2001) analisaram a influência de diversas fontes de nitrogênio na produção de enzimas xilanolíticas por *A. awamori* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar, e obtiveram altas atividades para endoxilanasas utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio e, ainda maiores quando utilizando também extrato de levedura. Em estudo realizado por Monti (1989), foi verificado que a adição de 0,8% de extrato de levedura aumentou significativamente a produção de enzimas xilanolíticas pelo fungo *H. grisea*. Carvalho (2003) observou um aumento de aproximadamente quatro vezes na produção de endoxilanasas quando o fungo *H. grisea* foi cultivado em meio contendo extrato de levedura e sulfato de amônia, comparado ao meio sem suplementação.

Outros importantes fatores que afetam a produção das endoxilanasas são: pH, temperatura e aeração. Cada organismo se desenvolve e produz endoxilanasas em uma faixa de pH ótimo, assim, cultivando o organismo em um pH desfavorável, ocorrerá uma diminuição na taxa de crescimento, resultando em queda na produtividade de endoxilanasas (Haltrich *et al.*, 1996). A temperatura do meio de crescimento é um fator muito importante a ser levado em consideração durante o cultivo de fungos, pois cada microrganismo tem sua faixa de temperatura ótima, na qual se obterá a maior taxa de crescimento e melhor produtividade de endoxilanasas (Sunna & Antranikian, 1997). Por exemplo, o *H. grisea* tem um pH ótimo de 5,5 e uma temperatura ótima de 42°C para a produção da enzima (Monti *et al.*, 1991; Rana *et al.*, 1995).

1.4. Produção de Endoxilanases Recombinantes

Uma grande variedade de formas isoenzimáticas de endoxilanases é usualmente produzida pelos microrganismos, os quais as secretam ou as mantém associadas às células microbianas. Estas múltiplas enzimas são codificadas por diferentes genes ou são geradas pela expressão diferencial de um mesmo gene (Li & Ljungdahl, 1994; Wong *et al.*, 1988). Causas adicionais como glicosilação diferencial, proteólise e auto-agregação ajudam a explicar a detecção de cinco diferentes endoxilanases nos filtrados de cultura de *Streptomyces* sp. B-12-2 crescido em xilana "oat-spelt", quinze nos filtrados de *Aspergillus niger*, treze nos filtrados do fungo *Trichoderma viride* e treze nos de *Trichoderma emersoni* (Biely *et al.*, 1985; Li & Ljungdahl, 1994; Subramaniyan & Prema, 2002).

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

Nas últimas décadas, tem sido utilizado um número cada vez maior de proteínas recombinantes em processos biotecnológicos, assim vários estudos têm se concentrado na produção eficiente destas proteínas em sistemas heterólogos. 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 (*Escherichia coli* e *Bacillus* sp), fungos filamentosos (*Aspergillus nidulans* e *T. reesei*) e leveduras (*Sacharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*) (Faria, 2000). A maioria dos genes de endoxilanases fúngicas foi expressa em leveduras, como a *S. cerevisiae* e *Pichia* sp (Kulkarni *et al.*, 1999). Estes sistemas de expressão apresentam vantagens como processamento pós-transcricional e pós-traducional, além de apresentar facilidade de manipulação genética e alta produtividade (Romanos, 1992).

1.4.1. Sistema de Expressão Heteróloga em *P. pastoris*

A levedura metilotrófica *P. pastoris* tem sido um dos sistemas de expressão mais utilizados. Entre as vantagens desta levedura estão: 1) um eficiente promotor

regulado por metanol (gene que codifica a enzima álcool oxidase - AO), responsável por cerca de 30% do total de proteínas produzidas; 2) menor grau de glicosilação devido às curtas cadeias de oligossacarídeos com ligações de manose; 3) integração de múltiplas cópias do gene heterólogo no cromossomo da levedura; 4) a capacidade de secretar altos níveis de proteínas heterólogas; 5) alta densidade celular durante a fase de crescimento e facilidade de aumento de escala na produção (Bretthauer & Castellino, 1999; Dale *et al.*, 1999; Gellissen *et al.*, 1992; Romanos, 1995; Romanos *et al.*, 1992).

1.4.1.1. Metabolismo de Metanol

Um limitado número de espécies pertencentes aos gêneros *Hansenula*, *Candida*, *Turolopsis* e *Pichia* tem a capacidade de crescer em metanol (Barnett *et al.*, 1990; Gelissen, 2000; Hazeu *et al.*, 1972; Tani *et al.*, 1978). Na década de 70 o interesse na produção de biomassa celular a partir de metanol como única fonte de carbono e energia intensificou os estudos destas espécies por duas razões: explorar suas possíveis aplicações comerciais e estudar os compartimentos celulares envolvidos na utilização de metanol (peroxissomas).

As leveduras metilotróficas são capazes de utilizar o metanol como única fonte de carbono e energia. Elas têm uma via metabólica específica para a utilização de metanol envolvendo várias enzimas. As reações iniciais ocorrem no peroxissoma, seguidas por subsequentes etapas metabólicas no citoplasma (Figura 5). Os peroxissomas têm função indispensável durante o crescimento, uma vez que abrigam três enzimas chaves para o metabolismo do metanol, sendo elas, a AO, a catalase e a dihidroxiacetona sintase. O metanol entra no peroxissoma e é oxidado por oxidases específicas para gerar formaldeído e peróxido de hidrogênio o qual é decomposto para água e oxigênio molecular por uma catalase. O formaldeído gerado é direcionado tanto para a via catabólica, onde é utilizado como energia, quanto para a via anabólica, para a geração de biomassa. A reação inicial chave desta última via é catalisada pela dihidroxiacetona sintase, liberando dihidroxiacetona e gliceraldeído-3-fosfato. Estes compostos com três carbonos são posteriormente assimilados dentro do citosol. A dihidroxiacetona é fosforilada por uma dihidroxiacetona quinase e, em uma posterior reação de aldolase com gliceraldeído-3-fosfato ela forma frutose-1,6-bifosfato que é convertida para glicose-6-fosfato por uma fosfatase. Dentro da via catabólica o formaldeído é oxidado para formato por uma formaldeído desidrogenase que

é subsequentemente oxidado para dióxido de carbono pela enzima formato desidrogenase (Cereghino & Cregg, 2000; Gellissen, 2000; Jahic, 2003).

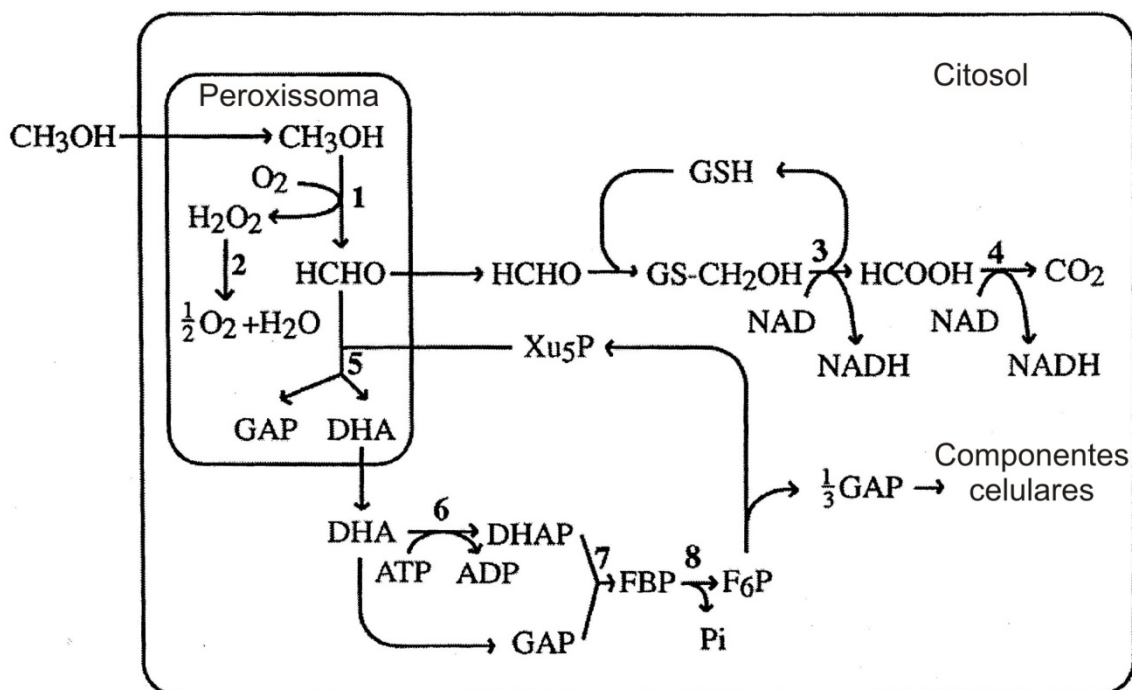


Figura 5. Metabolismo de metanol pela *P. pastoris*. 1- álcool oxidase; 2- catalase; 3- formaldeído desidrogenase; 4- formato desidrogenase; 5- dihidroxiacetona sintase; 6- dihidroxiacetona quinase; 7- frutose 1,6-bifosfato aldolase; 8- frutose 1,6-bifosfato. Fonte: (Veenhuis *et al.*, 1983)

Durante o crescimento de *P. pastoris* em metanol, a enzima AO constitui a proteína mais abundante da célula chegando a representar 30% das proteínas celulares totais. A expressão do gene AOX é induzida na presença de metanol e reprimida na presença de glicose ou glicerol. A levedura *P. pastoris* possui dois genes que codificam a enzima AO no genoma, AOX1 e AOX2 (Couderc & Baratti, 1980). O gene AOX2 produz álcool oxidase, porém com um rendimento 10 a 20 vezes inferior ao obtido pelo gene AOX1 (Cereghino & Cregg, 2000).

1.4.1.2. Vetores e linhagens de *P. pastoris*

Dentre as espécies metilotróficas citadas, a levedura *P. pastoris* tem sido uma das mais estudadas e tem sido empregada como hospedeira para a

expressão heteróloga de diversas proteínas. Atualmente, mais de 500 proteínas têm sido clonadas e expressas utilizando este sistema (Cregg, 2004; Faber *et al.*, 1995; Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

Os vetores mais utilizados permitem a integração do gene heterólogo no genoma da levedura em diferentes regiões ou especificamente no locus do gene AOX1, neste caso o gene heterólogo é clonado no vetor entre a região promotora e terminadora do gene AOX1, ocorrendo a substituição deste gene. De acordo com a integração destes vetores, existem três fenótipos de cepas hospedeiras de *P. pastoris* com relação a utilização de metanol. O fenótipo Mut⁺ possui os genes AOX1 e AOX2 e requer altas taxas de suplementação de metanol em fermentações de grande escala. O Mut^S não tem o gene AOX1, possuindo apenas o gene AOX2, o qual metaboliza o metanol mais lentamente, resultando em um crescimento mais lento. O Mut⁻ é incapaz de crescer em metanol, uma vez que ambos os genes AOX1 e AOX2 foram deletados (Cereghino & Cregg, 2000; Cregg & Madden, 1988).

Mesmo a variante Mut^S tendo uma taxa de crescimento menor que a Mut⁺, a concentração final de produto geralmente é maior, como resultado das corretas modificações pós-traducionais (Chen *et al.*, 1997; Loewen *et al.*, 1997). No caso da Mut⁺ ocorre a formação de proteínas recombinantes muito rapidamente, entretanto, a proteína pode não ser totalmente secretada ou permanecer no citosol na forma de agregados (De Hoop *et al.*, 1991).

Dentre as linhagens de *P. pastoris* utilizada nos experimentos de expressão heteróloga, uma das mais utilizadas é a linhagem GS115 que não sintetiza o aminoácido histidina, pois é mutante para a enzima histidinol desidrogenase da via de síntese de histidina. Este fenótipo é utilizado como marca de seleção auxotrófica, pois os vetores empregados possuem o gene *His4* de *P. pastoris* funcional. Os vetores de expressão possuem também o gene de resistência a ampicilina (Amp) e a origem de replicação de *E. coli*, características importantes para a manipulação dos vetores nessa bactéria.

1.4.1.3. Peptídio Sinal e Glicosilação em *P. pastoris*

A levedura *P. pastoris* pode ser usada para a produção de proteínas heterólogas que podem ficar retidas no citoplasma ou secretadas para o meio de cultura (Cereghino & Cregg, 2000). A secreção de proteínas em *P. pastoris* pode ser direcionada pelo peptídeo sinal da proteína heteróloga ou pelo peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae*. 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. cerevisiae* (Cereghino & Cregg, 2000; Korona *et al.*, 2006). A maioria dos trabalhos de expressão heteróloga de genes de endoxilanase em *P. pastoris* empregaram vetores de expressão contendo este peptídeo sinal (Cao *et al.*, 2007; Chantasingh *et al.*, 2006; Damaso *et al.*, 2003; Ramchuran *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Na maioria dos experimentos de expressão heteróloga, a secreção da proteína a partir do peptídeo sinal do fator α é superior em quantidade, entretanto a proteína pode não ser corretamente processada levando a perda da atividade. A secreção da fitohemaglutinina humana foi superior a partir do peptídeo sinal do fator α , entretanto o peptídeo sinal não foi corretamente processado levando à inativação da proteína. Já a proteína contendo o próprio peptídeo sinal foi secretada e corretamente processada (Raemaekers *et al.*, 1999). Há ainda exemplos onde o próprio peptídeo sinal apresenta desempenho igual ou superior, como a enzima recombinante lacase de *Trametes versicolor* que apresentou atividade sete vezes superior a partir desta construção (Jonsson *et al.*, 1997).

A levedura *P. pastoris* tem a capacidade de glicosilar corretamente as proteínas recombinantes, por O ou N-glicosilação. Balaa e colaboradores (2006) expressaram o gene que codifica uma endoxilanase de *Thermobifida fusca* em *P. pastoris*, após a indução com metanol observaram a produção de duas proteínas com massa molecular muito próxima. A massa molecular aparente apresentava-se um pouco maior que a deduzida da sequência dos aminoácidos e, posteriormente, através de espectrometria de massa, confirmou-se que as duas proteínas eram endoxilanasas, resultantes da glicosilação diferencial realizada pela *P. pastoris*. Proteínas heterólogas com diferentes perfis de glicosilação foram produzidas quando o gene de endoxilanase de *Thermobifida fusca* foi expresso em *P. pastoris*, entretanto a glicosilação não afetou as propriedades da endoxilanase. Após o tratamento com endo-N acetilglicosaminidase H para remover os carboidratos, foi verificada uma única banda de 36 kDa (Cheng *et al.*, 2005).

Uma característica importante da levedura *P. pastoris* é o seu perfil de glicosilação, que é mais compatível com o de proteínas de outros eucariotos. Observou-se que o tamanho da cadeia de carboidratos adicionada pela levedura *P. pastoris* (8 a 14 resíduos de manose) é bem menor que a cadeia adicionada por *S. cerevisiae* (50 a 150 resíduos de manose). A estrutura desses oligossacarídeos é muito similar aos adicionados em mamíferos e, por não ser capaz de adicionar manoses terminais com ligações β -1,3 como em *S. cerevisiae*, as proteínas secretadas por *P. pastoris* são menos imunogênicas (Cregg, 1999).

1.4.1.4. Produção de Endoxilanases Recombinantes por *P. pastoris*

A utilização da levedura *P. pastoris* para a expressão de genes de endoxilanase é ideal, pois este microrganismo não produz endoxilanases e secreta poucas proteínas para o meio de cultura sob indução com metanol (Berrin *et al.*, 2000; Damaso *et al.*, 2003; Ramchuran *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2004).

A levedura *P. pastoris* é capaz de crescer em uma ampla faixa de pH (3,0 a 7,0) sem afetar significativamente o seu crescimento. Esta característica possibilita o ajuste do pH do meio para um valor que minimize a ação das proteases de *P. pastoris* que estão ativas em pH neutro (Brierley *et al.*, 1994) e consequentemente diminui a degradação das proteínas recombinantes extracelulares. A estabilidade da proteína recombinante pode ser aumentada pela adição de suplementos ricos em aminoácidos ao meio de cultura, como a peptona, uma vez que este suplemento será utilizado como substrato alternativo para a ação das proteases (Clare *et al.*, 1991; Siegel *et al.*, 1990; Werten *et al.*, 1999).

Essas vantagens fazem com que esse microrganismo seja escolhido para a expressão heteróloga de genes de endoxilanases fúngicas e bacterianas. Há vários trabalhos na literatura em que foi bem sucedida a expressão de genes de endoxilanases utilizando *P. pastoris* como hospedeiro (Cao *et al.*, 2007; Chantasingh *et al.*, 2006; Damaso *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2006; Korona *et al.*, 2006; Ramchuran *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007).

A produção em frasco de endoxilanases recombinantes pela levedura *P. pastoris* normalmente é obtida por fermentação submersa empregando os meios de cultura recomendados pela Invitrogen, contendo "Yeast Nitrogen Base" (YNB), peptona e extrato de levedura como fontes de nitrogênio e metanol como fonte de carbono.

Cao e colaboradores (2007) expressaram uma endoxilanase do fungo *Aspergillus sulphureus* em *P. pastoris*, utilizando o promotor GAP (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) que possibilita a expressão constitutiva da proteína recombinante. Estes autores demonstraram a estabilidade genética da integração do vetor no genoma da levedura cultivando o transformante por 20 repiques em meio não seletivo. Estes autores observaram que a produção da endoxilanase recombinante se manteve constante após a cultura da vigésima rodada com relação à cultura inicial.

Korona e colaboradores (2006) clonaram o gene da endoxilanase do fungo *A. niger* em *P. pastoris* em dois vetores diferentes, em ambos a expressão ocorreu sob controle do promotor AOX1 e para a secreção utilizou-se o peptídeo sinal nativo da enzima recombinante e o peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae*. A quantidade de xilanases recombinantes secretadas para o meio pela *P. pastoris* utilizando o peptídeo sinal nativo foi três vezes maior do que utilizando o peptídeo sinal do fator α .

Ramchuran e colaboradores (2005) descreveram a produção da endoxilanase recombinante da bactéria *Rhodothermus marinus* em *P. pastoris* em diferentes meios de cultura, analisando a produção em frasco nos meios recomendados pelo fabricante e no meio YPTM (fonte de nitrogênio: 0,5% de extrato de levedura, 2% de peptona e 0,04% de triptona de caldo de soja). Os resultados demonstraram que quando a levedura foi cultivada nos meios de cultura suplementados com extrato de levedura e peptona obteve-se maior produção da enzima recombinante.

Damaso e colaboradores (2003) expressaram uma endoxilanase do fungo *T. lanuginosus* em *P. pastoris* e otimizaram sua produção por meio de um planejamento fatorial 2^3 , variando os níveis da concentração de metanol (0,5 a 1,0%, v/v), da concentração de YNB (0,9 a 1,8%, p/v) e a DO_{600} inicial (0,5 a 5,0). A máxima atividade xilanolítica foi obtida utilizando 1,0% de metanol, 0,9% de YNB e DO_{600} inicial de 5,0. Por análise estatística observou-se que o metanol e o YNB não exerceram efeito significativo na produção da endoxilanase recombinante. Por outro lado, a DO_{600} (densidade óptica a 600 nm) inicial foi o fator que mais afetou a produção da enzima, causando um aumento de 194% na atividade xilanolítica quando se utilizou a DO_{600} de 5 em relação a de 0,5.

1.4.1.5. Purificação de Endoxilanases 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 de interesse é predominante no meio de cultura (Cereghino & Cregg, 2000). Nos trabalhos realizados por Cheng e colaboradores (2005) e Damaso e colaboradores (2003) foi analisada a produção das endoxilanases de *T. lanuginosus* e *T. fusca* pela *P. pastoris* após indução com metanol e observou-se que a quantidade de proteínas

secretadas pela levedura era menor do que o obtido na 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.

Técnicas cromatográficas, principalmente de troca iônica e filtração em gel, são as mais utilizadas para a purificação de endoxilanases, mas também podem ser utilizadas resinas cromatográficas de interação hidrofóbica e de afinidade.

Em diversos trabalhos que obtiveram a expressão heteróloga de endoxilanases em *P. pastoris*, a sua purificação foi obtida empregando diferentes protocolos. Nestes trabalhos foram utilizadas algumas estratégias para a concentração de proteínas:

- 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 (Cheng *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2004)
- Liofilização (Damaso *et al.*, 2003)

Posteriormente as endoxilanases recombinantes foram purificadas com a utilização de cromatografia de troca iônica, gel filtração ou coluna de afinidade (Tabela 1).

As endoxilanases nativa e recombinante de *T. lanuginosus* foram purificadas por gel filtração apresentando massa molecular estimada em 25,5 e 26,9 kDa, respectivamente. Apesar de a massa molecular apresentar diferenças, as características enzimáticas foram similares, ambas apresentaram temperatura ótima (75°C) e termoestabilidade idêntica (retiveram 60% da atividade inicial após 80 min de incubação a 70°C). Pelo trabalho conclui-se que a enzima recombinante produzida pela *P. pastoris* compartilhou características enzimáticas com a enzima selvagem (Damaso *et al.*, 2003).

Tabela 1. Rendimento da purificação de endoxilanases expressas em *P. pastoris*

Microrganismo	Fator de Purificação	Rendimento	Referência (et al.)
<i>A. niger</i>	3,8	-	Deng, 2006
<i>A. niger</i>	2,7	21,5%	Berrin, 2000
<i>A. niger</i>	4,1	-	Liu, 2006
<i>Aspergillus terreus</i>	1,3	84,4 %	Chantasingh, 2006
<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	27,9%	Tanaka, 2004
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	-	-	Zhang, 2007
<i>Scytalidium acidophilum</i>	-	-	Balaa, 2006
<i>T. fusca</i>	6,9	23%.	Cheng, 2005
<i>T. lanuginosus</i>	-	-	Damaso, 2003
<i>Thermonospora fusca</i>	-	-	Sun, 2007

1.5. Aplicações Biotecnológicas

As hidrolases compreendem aproximadamente 75% do total de enzimas comercializadas, com as glicosidases, incluindo celulasas, amilases e hemicelulasas, constituindo o segundo maior grupo, após as proteases. As endoxilanases constituem as principais hemicelulasas comerciais, atraindo atenção devido ao seu potencial para uso em diversas aplicações, cobrindo os três setores do mercado de enzimas industriais (Tabela 2) (Bhat, 2000). Outras aplicações menos documentadas incluem: fermentação da cerveja (Tikhomirov *et al.*, 2003); na extração de café e na preparação de café solúvel (Wong *et al.*, 1988); em detergentes (Kamal *et al.*, 2004); na produção de polissacarídeos farmacologicamente ativos para uso como agentes antimicrobianos (Ryttersgaard *et al.*, 2002) ou antioxidantes (Katapodis *et al.*, 2003). As endoxilanases são frequentemente utilizadas sozinhas, mas podem também ser empregadas em conjunto com outras enzimas, em particular com outras hidrolases.

Na produção de cerveja, as endoxilanases podem ser empregadas no pré-tratamento da arabinoxilana contidas no substrato, diminuindo a viscosidade da bebida e facilitando o processo de filtração. Em cereais como a cevada, a arabinoxilana é o principal polissacarídeo após o amido, constituindo 4 a 8% das sementes da cevada e representam aproximadamente 25 e 70% dos polissacarídeos da parede celular do endosperma e da aleurona, respectivamente. A arabinoxilana é parcialmente solúvel em água, este polímero na forma hidratada resulta em uma solução aquosa altamente viscosa, o que prejudica o processo de filtração e leva ao escurecimento da cerveja, assim o pré-tratamento com endoxilanases degrada a arabinoxilana e facilita o processo (Subramaniyan & Prema, 2002; van der Broeck *et al.*, 1990). A aplicação das endoxilanases no processo de clarificação de sucos e vinhos também diminui a presença de polissacarídeos de parede, facilitando o processo de filtração e clarificação (Biely, 1985; Wong *et al.*, 1988).

As endoxilanases também podem ser aplicadas no preparo do pão, onde tornam a massa mais macia e solta, aumentando significativamente o volume do pão (Subramaniyan & Prema, 2002). Na indústria têxtil, as endoxilanases podem ser empregadas nos processos de maceração do linho, da juta e do sisal e refinamento de polpas na 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 (Milagres & Prade, 1994).

A principal aplicação das endoxilanases está na indústria de polpa e papel onde as elevadas temperaturas (55 a 70°C) e pH alcalino requerem enzimas termo-alcalifílicas para um eficiente bi branqueamento (Beg *et al.*, 2001; Viikari, 1994). O uso das endoxilanases, que devem estar livre de celulasas, nos processos de pré-tratamento da polpa de papel, facilita a extração da lignina por processos químicos convencionais reduzindo em até 34% a quantidade de cloro utilizada (Paice *et al.*, 1988; Viikari, 1991) minimizando o impacto ambiental dos resíduos químicos gerados pelas indústrias papeleiras.

As enzimas xilanolíticas podem ser empregadas na sacarificação da hemicelulose para otimizar a utilização da biomassa vegetal, particularmente de resíduos agroindustriais. Resíduos lignocelulósicos, tais como bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, bagaço de laranja, palha de cereal e serragem constituem-se em materiais para a sacarificação e fermentação industrial. Para a agroindústria é de interesse aumentar o valor protéico desses resíduos quando utilizados como ração animal, pois a hidrólise parcial da xilana melhora

a acessibilidade da celulose para a digestão realizada pelos animais ruminantes, aumentando o valor nutritivo da ração e agregando valor à matéria (Dekker & Richards, 1976; Wong *et al.*, 1988). Além disso, o hidrolisado obtido pode ser fermentado por leveduras e utilizado na obtenção de produtos de alto valor agregado, tais como xilitol e bioetanol.

Tabela 2. Aplicações potenciais das endoxilanases

Mercado	Aplicação	Referência
Alimentação	Suco de frutas e vegetais, néctar, óleos e vinhos	Galante <i>et al.</i> , 1998; Wong & Saddler, 1993
	Farinha e pães	Bhat, 2000; Dutron <i>et al.</i> , 2004
Ração	Monogástrico (suínos e aves) e ruminantes	Mathlouthi <i>et al.</i> , 2002, 2003
Técnico	Biobranqueamento de polpas kraft	Beg <i>et al.</i> , 2001 ; Viikari, 1994
	Biomodificação de fibras	Bhat, 2000
	Indústria têxtil	Beg <i>et al.</i> , 2001; Prade, 1995
	Tratamento de resíduos da agricultura, municípios e indústria alimentícia	Prade, 1995; Saha, 2003

Moriya e colaboradores (2005) testaram a aplicação da endoxilanase HXYN2 recombinante produzida pela *P. pastoris* no biobranqueamento da polpa Organosolv 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.

1.5.1. Aplicação das Endoxilanases Microbianas na Sacarificação de Substratos Lignocelulósicos

A lignocelulose é uma mistura complexa de biopolímeros encontrada na parede de células vegetais e sua degradação para açúcares monoméricos por meio da ação de enzimas hidrolíticas como endoxilanases e celulases é muito importante, uma vez que estes açúcares podem servir como matéria-prima em processos biotecnológicos. Por exemplo, podem ser fermentados por leveduras como *Pichia stipitis* e *Candida guilhermondii* e convertidos em xilitol (Rao *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2005; Tada *et al.*, 2004), etanol (Lawford & Rousseau, 2003) e ácido láctico (El-Hawary *et al.*, 2003).

As hemiceluloses são polímeros heterogêneos e muitas enzimas são necessárias para sua degradação. As endoxilanases e mananases degradam a cadeia principal dos dois principais componentes da hemicelulose, enquanto β -xilosidases e β -manosidases degradam os xilo-oligosacarídeos. As α -arabinosidases e α -galactosidases liberam arabinose e galactose, enquanto acetil xilana esterase (AXE) cliva grupos acetil das unidades de açúcar da xilana (Kubicek & Penttilä, 1998; Margolles-Clark *et al.*, 1997).

A hidrólise da celulose requer a ação cooperativa das endoglicanases e celobiohidrolases para solubilizar sua estrutura cristalina. As celobiohidrolases liberam unidades de celobiose e degradam preferencialmente celulose cristalina. As endoglicanases por outro lado, agem mais aleatoriamente ao longo da cadeia de celulose e são mais ativas em celulose amorfa (Bothwell *et al.*, 1993).

O acesso das enzimas à hemicelulose é dificultado pela presença da lignina, uma macromolécula altamente ramificada composta de muitos tipos de ácidos aromáticos que tem uma importante função nas características físicas da parede celular, bem como na prevenção contra ataques biológicos (Xie *et al.*, 2000). Usualmente vários pré-tratamentos são aplicados para quebrar a estrutura da lignocelulose objetivando facilitar a degradação de sua estrutura e, consequentemente, aumentar a degradação enzimática. As hemiceluloses estabelecem associações entre a lignina e a celulose, assim, em muitos métodos de pré-tratamento as hemiceluloses são removidas. Contudo, parte das hemiceluloses ainda permanece na fração sólida, a qual é utilizada como substrato seja para a sacarificação ou para a produção de enzimas celulolíticas (Hsu, 1996).

1.5.1.1. Métodos de Pré-tratamento

A conversão de biomassa lignocelulósica é desafiante devido à complexa estrutura da parede celular das plantas. O pré-tratamento é necessário para alterar a composição estrutural e química da biomassa lignocelulósica e para facilitar uma rápida e eficiente hidrólise dos carboidratos para açúcares fermentáveis (Chang & Holtzaple, 2000).

Uma variedade de técnicas de pré-tratamento tem sido desenvolvida para aumentar a acessibilidade das enzimas às fibras da lignocelulose com o objetivo de fracionar, solubilizar, hidrolisar e separar os componentes da celulose, hemicelulose e lignina. Podem ser utilizadas as seguintes técnicas: físicas (trituração e hidrotermólise), químicas (ácida, alcalina, solventes, ozônio), físico-químicas (explosão a vapor, explosão com amônia) e biológicas, entre outras. Em cada opção a biomassa é reduzida em tamanho e sua estrutura física é aberta (Moiser *et al.*, 2005).

Para ser efetivo, o pré-tratamento deve preservar a utilidade das pentosanas (hemicelulose) e limitar a extensão no qual o material pré-tratado inibe o crescimento do microrganismo responsável pela fermentação. Para ser econômico, o processo deve minimizar a demanda de energia e limitar os custos associados com a redução de tamanho da matéria-prima e tratamentos de resíduos do processo (Lynd, 1996; Walsum *et al.*, 1996).

O pré-tratamento com ácido diluído a altas temperaturas normalmente hidrolisa a hemicelulose em seus açúcares (xilose, arabinose e outros) (Sun & Cheng, 2002). O uso de SO₂ como catalisador durante o pré-tratamento com vapor resulta na acessibilidade enzimática da celulose e aumento na recuperação dos açúcares derivados da hemicelulose (Brownell & Saddler, 1984). Por explosão a vapor, ocorre a solubilização e degradação de uma alta porcentagem da hemicelulose, utilizando alta temperatura e curto tempo de residência (270°C, 1 min) ou baixa temperatura e longo tempo de residência (190°C, 10 min) (Duff & Murray, 1996).

Compostos fenólicos provenientes da degradação da lignina, derivados de furano (furfural e hidroximetilfurfural) da degradação de açúcares e ácidos alifáticos (ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico) são considerados como sendo inibidores da fermentação gerados da biomassa lignocelulósica pré-tratada. Vários métodos para detoxificação do hidrolisado tem sido desenvolvidos. Estes incluem tratamento com resinas de troca iônica, carvão vegetal, remoção de

compostos não voláteis, tratamento com óxido de cálcio, entre outros (Palmqvist & Hahn-Hagerdal, 2000).

O efeito inibitório do furfural e do hidroximetilfurfural parece estar relacionado ao fato de que estes compostos interferem na atividade de algumas enzimas da via glicolítica (Sanches & Bautista, 1988). O ácido acético, que pode ser encontrado nos hidrolisados hemicelulósicos em níveis de concentração de alguns gramas por litro, tem seu efeito inibitório relacionado ao pH (Parajó *et al.*, 1998a), pois em meios mais ácidos a forma não dissociada deste ácido está presente em maiores concentrações. Esta forma (não dissociada) é capaz de difundir-se através da membrana celular, atingindo o citoplasma e, ao encontrar no interior da célula valores mais elevados de pH, dissocia-se diminuindo o pH intracelular a valores abaixo dos limites fisiológicos (Herrero *et al.*, 1985; Lohmeier-Vogel *et al.*, 1998; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000; Parajó *et al.*, 1998b).

1.5.1.2. Hidrólise Enzimática pelas Hemicelulases

Devido à heterogeneidade da xilana, sua hidrólise requer a ação de um complexo sistema enzimático, composto por enzimas como: β -xilosidases, endoxilanases, α -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 (Sunna & Antranikian, 1997).

As endoxilanases formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da xilana e hidrolisam as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 dentro da cadeia de xilana, produzindo xilo-oligossacarídeos, os quais são convertidos em xilose pela β -D-xilosidase (Biely, 1985).

As β -D-xilosidases são enzimas que hidrolisam xilo-oligossacarídeos e xilobiose de extremidade não redutora para liberar xilose. Essas enzimas não conseguem hidrolisar a xilana e a sua afinidade aos xilo-oligossacarídeos é inversamente proporcional ao grau de polimerização (Wong *et al.*, 1988).

As acetilxilana esterases (EC 3.1.1.6) removem os grupos O-acetil das xilanas acetiladas. Essas 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 estérico (Polizeli *et al.*, 2005).

As arabinofuranosidases removem os resíduos de α -arabinofuranose ligados nas posições 2 e 3 dos resíduos de xilose. Quando usadas em conjunto com endoxilanases há um aumento na hidrólise da xilana e produção de xilose, xilobiose e arabinose, o que ressalta o efeito de sinergismo das duas enzimas (Sunna & Antranikian, 1997).

A enzima α -D-glucuronidase hidrolisa as ligações α -1,2 entre o ácido glucurônico e os resíduos de xilose nas glucuronoxilanas (Sunna & Antranikian, 1997).

Muitos fungos como *Penicillium capsulatum* e *Trichoderma emersonii* possuem um sistema xilanolítico composto por todas as diferentes enzimas (Moloney & Coughlan, 1983). Em trabalho desenvolvido por Bachmann & McCarthy (1991) foi demonstrado o sinergismo entre endoxilanases, β -xilosidases, α -arabinofuranosidases e acetil-xilana esterases do actinomiceto termofílico *Thermomonospora fusca*. A ação sinérgica entre exo-xilanases e endoxilanases tem sido verificada uma vez que muitas endoxilanases não clivam as cadeias laterais, as quais precisam ser inicialmente clivadas pelas exo-xilanases para permitir uma hidrólise completa da xilana.

1.5.1.3. Fermentação do Hidrolisado Hemicelulósico

O hidrolisado hemicelulósico pode ser utilizado para a obtenção de produtos de alto valor agregado, como o etanol combustível, obtido por fermentação pela levedura *S. cerevisiae* e pela bactéria *Zymomonas mobilis*. Ambas fermentam glicose para etanol rapidamente e eficientemente, mas não podem fermentar outros açúcares tais como xilose e arabinose para etanol. Alguns microrganismos têm sido geneticamente modificados para aumentar significativamente a produção de etanol a partir de uma mistura de açúcares (Bothast & Saha, 1997; Schneider *et al.*, 1981; Wang *et al.*, 1980).

Outro produto obtido a partir do hidrolisado hemicelulósico é o xilitol, um adoçante dietético indicado para pessoas diabéticas, pois seu metabolismo é independente de insulina (Heikilla *et al.*, 1991; Pepper & Olinger, 1988). Possui também propriedades anti-cariogênicas (Alanen *et al.*, 2000; Autio, 2002), uma vez que os microrganismos normalmente encontrados na cavidade oral não são capazes de metabolizá-lo, o que impede que os mesmos produzam ácidos que ataquem o esmalte dos dentes. Ele é atualmente produzido pela redução química em condições alcalinas, da xilose. As desvantagens do processo químico

é o requerimento do uso de alta pressão (acima de 50 atm) e temperatura (80 a 140°C), uso de um catalisador caro e de extensas etapas de separação e purificação para remover os subprodutos. A maior parte do xilitol produzido é consumida em vários produtos alimentícios tais como goma de mascar, balas, bebidas e sorvetes. A produção de xilitol por fermentação tem se tornado mais atrativa, devido aos problemas associados com sua produção química (Malaja & Hamalainen, 1977).

Muitas leveduras e fungos filamentosos possuem a xilose redutase dependente do NADPH, a qual catalisa a redução da xilose para xilitol em um primeiro passo do metabolismo da xilose (Chiang & Knight, 1960). O xilitol pode ser subsequentemente oxidado para xilulose pela ação da xilitol desidrogenase. Um excedente de NADH e limitação de oxigênio inibem a atividade da xilitol desidrogenase resultando em um acúmulo de xilitol (Granstorm *et al.*, 2001).

A demanda de xilitol nas indústrias alimentícias e farmacêuticas como um adoçante alternativo tem criado uma forte demanda para o desenvolvimento de processos de produção de baixo custo. Vários substratos hemicelulósicos ricos em xilose podem ser utilizados para a produção de xilitol por fermentação e a fração celulósica pode ser convertida para glicose, a qual é fermentada para etanol combustível.

Outros produtos podem ser obtidos pela fermentação do hidrolisado hemicelulósico, como o 2,3-butanodiol, o qual é utilizado como solvente, combustível líquido, e como precursor de muitos polímeros e resinas sintéticas, e o ácido láctico, utilizado pelas indústrias alimentícias, farmacêutica e de cosméticos (Saha, 2003).

1.6. Sistema Xilanolítico do Fungo Termofílico *H. grisea* var. *thermoidea*

A maioria das endoxilanases comerciais são enzimas mesofílicas produzidas pelos fungos filamentosos *T. reesei* e *A. niger*. Este processo reflete bem o fato de que fungos filamentosos são excelentes secretores de proteínas e podem produzir enzimas em altas quantidades para aplicações industriais. Entretanto, endoxilanases fúngicas podem não ser eficientes em condições nas quais altas temperaturas sejam necessárias. Consequentemente, enzimas de microrganismos

termofílicos têm se destacado devido ao seu emprego em diferentes setores industriais, como o emprego no biobranqueamento da polpa na indústria do papel (Kulkarni, 1999; Maheshwari *et al.*, 2000).

A maioria dos trabalhos descritos inicialmente sobre o gênero *Humicola* trata da capacidade de degradação da celulose apresentada por algumas de suas espécies como *H. grisea* var. *thermoidea* (Fergus, 1969; Tansey, 1971; Yoshida *et al.*, 1982). Em trabalho realizado por Chaves (1982), foi isolada de compostagem uma linhagem de fungo celulolítico que apresentou produção de celulasas a alta temperatura. Este fungo foi classificado como sendo *H. grisea* var. *thermoidea*.

Diversos trabalhos realizados no Brasil utilizaram linhagens obtidas a partir desse isolado, sendo demonstrado que o fungo *H. grisea* tem a capacidade de produzir várias enzimas termoestáveis, como celulasas, β -glicosidasas, endoxilanases, amilases, trealases, β -xilosidase, entre outras (Almeida *et al.*, 1995; Araújo *et al.*, 1993; Azevedo *et al.*, 1990; Cardello *et al.*, 1994; Carvalho, 2003; De Paula *et al.*, 1998; Monti *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 1991; Peralta *et al.*, 1997).

Quando o fungo *H. grisea* é cultivado na presença de substratos lignocelulósicos como bagaço de cana-de-açúcar (BCA), sabugo de milho, farelo de trigo, palha de cereal (BMS) além de substratos menos complexos como a xilana, este produz um complexo enzimático com atividade xilanolítica. Dentre as enzimas do sistema xilanolítico já foram descritas cinco endoxilanases e uma β -xilosidase (Almeida *et al.*, 1995; Carvalho *et al.*, 2003; De Paula *et al.*, 1998; Lucena-Neto & Ferreira-Filho, 2004; Monti *et al.*, 1991; Rana *et al.*, 1995).

No trabalho realizado por Monti e colaboradores (1991) foram purificadas e caracterizadas duas endoxilanases extracelulares com massa molecular estimada em 23,0 e 25,5 kDa. A endoxilanase de 25,5 kDa apresentou-se como uma glicoproteína estável a 50°C por 30 min, com um tempo de meia-vida de 20 minutos a 60°C, comparável com o observado para endoxilanases de fungos mesofílicos e termofílicos, estáveis entre 40 e 60°C. O pH ótimo foi de 5,0, próximo ao de outras endoxilanases microbianas, que apresentam pH ótimo entre 4,0 e 6,0. A temperatura ótima foi de 70°C, próxima ao do fungo *H. lanuginosa* que foi de 65°C. A endoxilanase de 23,0 kDa apresentou termoestabilidade semelhante à de 25,5 kDa e atividade sobre xilana e celulose.

Nos estudos realizados por Faria (2000) e Moraes e colaboradores (2002) foi descrito que o fungo *H. grisea* produziu um complexo enzimático com atividade xilanolítica quando crescido em vários substratos como: BCA, farelo de cereal BMS, sabugo de milho, farelo de trigo além de substratos menos complexos como a

xilana "oat-spelt" (Sigma®) e xilana "birch-wood" (Sigma®). Quando o fungo foi cultivado em BMS e BCA foram detectadas três bandas de atividade xilanolítica por ensaio de zimograma, correspondendo a proteínas com massa molecular aproximada de 23, 25 e 35 kDa. Em trabalho realizado por Carvalho (2003), o fungo *H. grisea* foi cultivado na presença de BCA como fonte de carbono e a endoxilanase extracelular com massa molecular de 23 kDa foi purificada por cromatografia em resina cromatográfica "Sephacryl S-100". Esta enzima apresentou pH ótimo de 5,5, ponto isoelétrico de 6,1, temperatura ótima de 65°C, tempo de meia-vida de 27 min a 65°C e 35 min a 60°C. Esta mesma endoxilanase de 23 kDa do fungo *H. grisea* foi purificada por Monti e colaboradores (1989), sendo que Carvalho (2003) a purificou e finalizou a caracterização bioquímica.

O fungo *H. grisea* var. *thermoidea* foi cultivado em meio líquido contendo palha de trigo e duas endoxilanas foram purificadas por cromatografia, apresentando massa molecular de 95 (Xyl I) e 13 (Xyl II) kDa, e os produtos de hidrólise foram analisados por cromatografia em papel (Rana *et al.*, 1995). Para a endoxilanase I foram observados os seguintes produtos de hidrólise: xilotetrose, xilotriose, xilobiose e traços de xilose. Para a endoxilanase II, os mesmos produtos foram obtidos, mas com menor quantidade de xilose. A liberação de pequenas quantidades de xilose e xilobiose indica que estas enzimas requerem oligossacarídeos maiores para uma efetiva hidrólise e formação de oligossacarídeos de cadeia curta. Assim, os resultados indicaram que Xyl I e Xyl II são endoxilanas do tipo endo.

Lucena-Neto & Ferreira-Filho (2004) verificaram que o fungo *H. grisea* secreta endoxilanas quando cultivado em meios sólidos e líquidos contendo, respectivamente, farelo de trigo e engaço de bananeira (suporte que sustenta o cacho de bananas) como substratos. Nesse trabalho foi purificada e caracterizada uma nova endoxilanase 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 cinco picos com atividade xilanolíticas. A endoxilanase apresentou uma temperatura ótima de 55 a 60°C e atividade em uma ampla faixa de pH, de 4,5 a 6,5. A enzima reteve 50% de sua atividade após 5,5 h a 60°C.

De Paula e colaboradores (1998, 1999) analisaram o potencial de sacarificação das enzimas secretadas pelo fungo *H. grisea* durante o cultivo do fungo na presença de 1% (p/v) de BCA. No sobrenadante de cultura foram detectadas atividades de celulase total, endo-glucanase, endoxilanase e β -glicosidase, destacando-se a atividade xilanolítica que foi aproximadamente

vinte vezes superior à de celulase total. O “pool” enzimático do fungo se mostrou eficiente para a sacarificação de substratos lignocelulósicos.

1.6.1. Genes de Endoxilanase do Fungo *H. grisea*

Iikura e colaboradores (1997) isolaram o gene *xyn1* de *H. grisea*, o qual codifica uma endoxilanase 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 endoxilanases da família 10. O gene *xyn1* 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 um dos genes de endoxilanase do fungo *H. grisea*, o gene *Hxyn2*. A sequência de resíduos de aminoácidos deduzida da proteína HXYN2 apresentou alta identidade com endoxilanases fúngicas da Família 11 como XYN1 do *H. insolens* (97,8%) (Dalboege & Heldt-Hansen, 1994) e XYL1 do *C. carbonun* (63,5%) (Apel *et al.*, 1993). A predição da sequência de aminoácidos de HXYN2 descreve uma proteína com 227 resíduos de aminoácidos, massa molecular estimada de 23 kDa e pI 8,0.

Em análises de RT-PCR observou-se que o gene *Hxyn2* é expresso quando o fungo é cultivado em MM contendo 1% de BCA e BMS (Faria, 2000) e reprimido na presença de glicose, o que indica que sua expressão deve ser regulada pela fonte de carbono em nível transcricional. A detecção dos transcritos de *Hxyn2* durante o cultivo do fungo em substratos complexos (BMS e BCA), mas não em glicose, reforça a hipótese de que este gene codifica a proteína de 23 kDa detectada no gel de atividade para endoxilanase (Faria, 2000).

Com o objetivo de alcançar um melhor entendimento e possível exploração do sistema xilanolítico deste fungo, o cDNA correspondente ao gene *Hxyn2* foi obtido e expresso em *E. coli* e *T. reesei*. A proteína recombinante obtida nos dois sistemas apresentou massa molecular de 23 kDa e atividade contra xilana “oat-spelt”, confirmando a atividade xilanolítica de HXYN2 (Bergquist *et al.*, 2002a,b,c; Faria *et al.*, 2002).

Com objetivo de produzir, purificar e caracterizar a endoxilanase HXYN2, o gene *Hxyn2* 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. O gene foi expresso sob o controle do promotor AOX1 e a secreção da enzima recombinante foi direcionada pelo peptídeo sinal da enzima HXYN2. Os transformantes foram selecionados quanto à estabilidade genética por cultivo em meio não seletivo por dez repiques e determinado o fenótipo Mut^S por PCR com os primers que anelam na região promotora e terminadora do gene AOX1 e cultivo em metanol (Banhe *et al.*, 2004). Posteriormente os transformantes foram selecionados quanto a capacidade de produzir e secretar a enzima HXYN2r para o meio de cultura na forma ativa (Ferreira *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Caracterizar a endoxilanase recombinante HXYN2 do fungo *H. grisea* produzida pela levedura *P. pastoris* e aplicá-la na hidrólise enzimática de substratos hemicelulósicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir, purificar e caracterizar a endoxilanase recombinante HXYN2r do fungo *H. grisea* produzida pela levedura *P. pastoris* por fermentação submersa
 - Estabelecer as condições ótimas para a produção da HXYN2r pela levedura *P. pastoris* em frasco;
 - Purificar a enzima HXYN2r por técnicas cromatográficas;
 - Caracterizar bioquimicamente a enzima HXYN2r.
- Aplicar a endoxilanase HXYN2r na hidrólise enzimática de sabugo de milho, bagaço e palha de cana-de-açúcar
 - Produzir a enzima HXYN2r pela levedura *P. pastoris* por fermentação submersa;
 - Produzir as enzimas lignocelulolíticas pelo fungo *H. grisea* por fermentação submersa utilizando BCA como fonte de carbono;
 - Aplicar a enzima HXYN2r na hidrólise enzimática de sabugo de milho, bagaço e palha de cana-de-açúcar sozinha e em conjunto com as enzimas lignocelulolíticas produzidas pelo fungo *H. grisea*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens Utilizadas

3.1.1. Linhagem do Fungo *H. grisea* var. *thermoidea*

A amostra do fungo *H. grisea* var. *thermoidea* utilizada neste trabalho foi isolada de compostagem na Universidade Federal de Viçosa (MG) por Chaves (1982).

O fungo *H. grisea* foi cultivado em meio Ágar Aveia — AA (3.2.1) durante quatro dias a 42°C e posteriormente a temperatura ambiente durante três dias. As placas com os esporos foram estocadas a 4°C.

3.1.2. Linhagem da Levedura *P. pastoris*

A linhagem da levedura *P. pastoris* utilizada neste trabalho foi a GS115 (Invitrogen), deficiente na produção de histidina, pelo fato do gene HIS4 (codifica a enzima histidinol desidrogenase: uma das enzimas da via biossintética de histidina) apresentar uma mutação que inativa a enzima HIS4. Os transformantes da levedura *P. pastoris* GS115-xyn2 (transformado com o vetor pHILD2-xyn2) foram utilizados neste trabalho para a produção da endoxilanase recombinante HXYN2r. Como controle negativo foi utilizado o transformante contendo apenas com o vetor pHILD2, sem o inserto.

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.

A linhagem celular foi estocada a -80°C em meio YPD (3.2.2) contendo 25% (v/v) de glicerol estéril.

3.2. Meios de Cultura

Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave durante 20 min a 120°C.

3.2.1. Meios e Substrato para Cultivo do Fungo *H. grisea*

Meio Ágar Aveia – AA

Farinha de aveia infantil (Quaker)	4,0% (p/v)
Ágar	1,5% (p/v)
Água destilada	q.s.p.

Meio Mínimo – MM (Pontecorvo *et al.*, 1953).

NaNO ₃	0,6% (p/v)
KCl	0,05% (p/v)
KH ₂ PO ₄	0,15% (p/v)
ZnSO ₄	0,001% (p/v)
FeSO ₄	0,001% (p/v)
Água destilada	q.s.p.

O pH foi acertado para 6,8 com solução de NaOH 1 M.

Para o cultivo do fungo *H. grisea* foi utilizado como fonte de carbono o bagaço de cana-de-açúcar (BCA) — cedido pela Usina Guarany, Olímpia - SP. O BCA foi pré-tratado para sua utilização, sendo submerso em água durante 5 min, lavado em água corrente e, em seguida, seco a 80°C durante 24 h. O BCA foi moído em moinho de facas utilizando-se uma peneira de 20 *mesh*.

3.2.2. Meios para Cultivo da Levedura *P. pastoris*

Para o preparo dos meios de cultura sólidos, adicionou-se 2% (p/v) de ágar bacteriológico, exceto o meio YPD-Ágar. Os meios de cultura e a solução estoque de tampão fosfato de potássio foram esterilizados por autoclavagem durante 20 min a 1 atm e a glicose durante 20 min a 0,5 atm. As soluções de metanol, glicerol, biotina, YNB ("Yeast Nitrogen Base") e ampicilina foram esterilizados por filtração em membrana Durapore GV de 0,22 µm (Millipore®).

Meio YPD ("Yeast Extract Peptone Dextrose")

Peptona	2,0% (p/v)
Extrato de Levedura	1,0% (p/v)
Glicose	2,0% (p/v)
Água destilada	q.s.p.

Meio YPD-Ágar

Meio YPD acrescido de ágar bacteriológico a 1,2% (p/v).

Meio MD ("Minimal Dextrose")

YNB	1,34% (p/v)
Dextrose	1,0% (p/v)
Biotina	4x10 ⁻⁵ % (v/v)
Água destilada	q.s.p.

Meio BMG-L / BMM-L

Extrato de levedura	1,34% (p/v)
Tampão fosfato de potássio pH 5,0	0,1 M
Biotina	4x10 ⁻⁵ % (v/v)
Glicerol/Metanol	1,0% / 0,5% (v/v)
Ampicilina	50 µg/mL
Água destilada	q.s.p.

Meio BMG-U / BMM-U

Uréia	1,34% (p/v)
Tampão fosfato de potássio pH 5,0	0,1 M
Biotina	4×10^{-5} % (v/v)
Glicerol /Metanol	1,0% / 0,5% (v/v)
Ampicilina	50 µg/mL
Água destilada	q.s.p.

Meio BMGY-L / BMMY-L

Extrato de levedura	2,34% (p/v)
Peptona	2,0% (p/v)
Tampão fosfato de potássio pH 5,0	0,1 M
Biotina	4×10^{-5} % (v/v)
Glicerol /Metanol	1,0% / 0,5% (v/v)
Ampicilina	50 µg/mL
Água destilada	q.s.p.

Meio BMGY-U / BMMY-U

Uréia	1,34% (p/v)
Extrato de levedura	1,0% (p/v)
Peptona	2,0% (p/v)
Tampão fosfato de potássio pH 5,0	0,1 M
Biotina	4×10^{-5} % (v/v)
Glicerol /Metanol	1,0% / 0,5% (v/v)
Ampicilina	50 µg/mL
Água destilada	q.s.p.

3.3. Substratos para Dosagem Enzimática e Sacarificação

3.3.1. Dosagem Enzimática

Para a dosagem da atividade xilanolítica foi utilizado como substrato a xilana "oat-spelt" (xilana extraída de aveia - Sigma®).

Para a dosagem da atividade celulolítica foram utilizados os seguintes substratos: Celulose micro-cristalina (CMC de baixa viscosidade - Sigma®), Celulose semi-cristalina (Avicel - Sigmacell - Sigma®), e papel de filtro quantitativo Whatman nº1 (1 x 6 cm).

3.3.2. Sacarificação por Hidrólise Enzimática

Os substratos utilizados na hidrólise enzimática foram:

- Bagaço de cana-de-açúcar (BCA)
- Sabugo de milho (SM)
- Amostra foliar de cana-de-açúcar (CA) – RB72454
- Amostra foliar de CA – RB835486
- Amostra foliar de CA – RB867515
- Amostra foliar de CA – SP832847

Preparo dos Substratos

O BCA foi preparado como descrito no item 3.2.1.

Para o preparo do sabugo de milho, os resíduos de milho foram retirados por raspagem, o sabugo foi cortado em pedaços pequenos e submerso em água durante 24 h, lavado em água corrente por 3 vezes e, em seguida, seco a 80°C durante 24 h.

O BCA e as amostras foliares utilizados neste experimento foram doadas pelo Prof. Dr. Américo José dos Santos Reis, da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás.

Todos os substratos foram moídos em moinho de facas utilizando uma peneira de 20 *mesh*.

3.4. Soluções

As soluções e tampões foram preparados com água bidestilada e quando necessário foram esterilizadas em autoclave a 120°C por 20 min ou por filtração em membrana "millipore" (0,2 µm). As soluções foram agrupadas de acordo com a metodologia na qual foram empregadas.

3.4.1. Determinação da Atividade Xilanolítica em Placa

Solução agarose / xilana

Agarose	1,0% (p/v)
Xilana "oat spelt"	0,5% (p/v)
Água destilada	q.s.p.

Solução Vermelho do Congo 1,0 % (p / v)

A solução foi preparada em água destilada.

3.4.2. Determinação da Atividade Enzimática pelo Método de DNS

Reagente de DNS

Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)	7,5 g
NaOH	14,0 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°C e o metabissulfito de sódio. A solução final foi titulada com HCl 0,1 M

utilizando fenolftaleína como indicador. Deverá ser gasto um volume de 5 a 6 mL de ácido. Para cada 1 mL de ácido gasto a menos, adicionar 2 g de NaOH para corrigir o pH da solução de DNS.

Tampão Citrato de Sódio 0,05 M – pH 4,8

Ácido cítrico 0,1 M	230 mL
Citrato Trissódico 0,1 M	270 mL
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

3.4.2.1. Atividade Xilanolítica

Solução de Xilana “oat spelt” 1 % (p/v)

A xilana “oat-spelt” foi dissolvida em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8 após aquecimento da solução em microondas durante 1 min, agitação manual e repouso durante 1 min. Este procedimento foi repetido três vezes e após, a solução foi submetida a centrifugação a 5.000 *g* durante 10 min. O sobrenadante foi estocado a -20°C e utilizado para a dosagem da atividade enzimática.

Solução de Xilana “oat spelt” 2 % (p/v) em Água

A solução foi preparada seguindo o mesmo protocolo utilizado no preparo da solução de xilana 1%.

Solução de Xilose 4,2 mg/mL

A solução foi preparada em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8.

3.4.2.2. Atividade Celulolítica

Solução de Carboximetilcelulose 4 % (p/v) (CMC)

CMC	4% (p/v)
Tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8	q.s.p.

Solução de Avicel 1 % (p / v)

Avicel	1,0% (p/v)
Tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8	q.s.p.

Solução de Glicose 20 $\mu\text{mol} / \text{mL}$ e 1,5 mg / mL

As soluções foram preparadas em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8.

3.4.3. Eletroforese de Proteínas em Gel Desnaturante de Poliacrilamida (SDS-PAGE)**Acrilamida:Bis-acrilamida (39:1)**

Acrilamida	39,0% (p/v)
Bis-acrilamida	1,0% (p/v)
Água destilada	q.s.p.

A solução foi filtrada em papel de filtro e estocada ao abrigo da luz a 4°C.

Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Tris	18,2 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

O pH foi corrigido com HCl.

Tris-HCl 1,0 M pH 6,8

Tris	12,1 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

O pH foi acertado com HCl.

Duodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10 % (p / v)

A solução foi preparada em água destilada.

Persulfato de Amônia (PAm) 1,0 % (p/v)

A solução foi preparada em água destilada e estocada a -20 °C.

Ácido Tricloroacético (TCA) 100 % (p/v)

Um volume de 1 mL de água destilada foi adicionado a 50 g de ácido tricloroacético. Após todo o ácido ser dissolvido, adicionou-se água destilada suficiente para um volume final de 50 mL e a solução obtida foi estocada a 4°C.

Tampão de Amostra para Proteína (estoque - duas vezes concentrado)

Tris-HCl 1,0 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

Tampão de Corrida – Tris-Glicina (estoque - cinco vezes concentrado)

Trizma Base	15,1 g
Glicina	72,0 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

No momento do uso, foi adicionada solução de SDS (10% - p/v) para a concentração final de 0,1% (p/v).

Marcador de Massa Molecular para Proteínas

Foi utilizado o kit de calibração para eletroforese, de baixa massa molecular (Amersham®). O marcador foi dissolvido em 100 µL de tampão de amostra e fervido durante 15 min.

94,0 kDa – Fosforilase B – músculo de coelho

67,0 kDa – Soroalbumina bovina

43,0 kDa – Ovoalbumina – ovo branco

30,0 kDa – Anidrase carbônica – eritrócitos bovinos

20,1 kDa – Inibidor de tripsina - soja

14,2 kDa – α-Lactoalbumina – leite bovino

3.4.3.1. Revelação das Proteínas por Coloração 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 para Azul de Coomassie

Metanol	30 mL
Ácido Acético Glacial	7 mL
Água destilada (q.s.p.)	100 mL

3.4.3.2. Revelação das Proteínas por Coloração com Nitrato de Prata

Solução de Fixação

Metanol	500 mL
Ácido Acético Glacial	120 mL
Formaldeído	1 mL
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

Solução de Lavagem

Etanol	500 mL
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

Solução de Tratamento

Tiosulfato de Sódio	20 mg
Água destilada (q.s.p.)	100 mL
Preparado no momento do uso.	

Solução de Equilíbrio

Nitrato de Prata	0,2 g
Formaldeído	75 µL
Água destilada (q.s.p.)	100 mL

Solução de Revelação

Carbonato de Sódio	6,0% (p/v)
Tiosulfato de Sódio	0,4 mg
Formaldeído	0,05% (v/v)
Água destilada	q.s.p.

Solução de Parada

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

Solução Descorante para Nitrato de Prata

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

3.4.4. Zimograma para Atividade de Endoxilanase

Tampão MES 50 mM, pH 6,0

MES (USB®)	2,2 g
Água destilada (q.s.p.)	100 mL

A solução foi preparada no momento do uso.

Corante Vermelho do Congo 0,1 % (p/v)

A solução foi preparada em água destilada.

Triton X-100 10 % (v/v)

A solução foi preparada em água destilada.

Solução de Xilana “oat spelt” 1,0 % (p/v) em Água

A solução foi preparada em água destilada conforme descrito no item 3.4.2.1.

3.4.5. Soluções Tampões para Caracterização Enzimática

Tampão Citrato de Sódio 0,05 M

Reagente	pH			
	3,0	4,0	5,0	5,5
Ácido cítrico 0,1 M (mL)	46,4	33,0	20,4	14,8
Citrato de Trisódio 0,1 M (mL)	3,6	17,0	29,6	35,2
Água destilada (q.s.p.) (mL)	100	100	100	100

Tampão Fosfato 0,05 M

Reagente	pH			
	6,0	6,5	7,0	7,4
Fosfato de Sódio monobásico 0,2 M (mL)	43,8	34,2	19,5	9,5
Fosfato de Sódio dibásico 0,2 M (mL)	6,2	15,8	30,5	40,5
Água destilada (q.s.p.) (mL)	100	100	100	100

Tampão Tris-HCl 0,05 M

Reagente	pH	
	7,7	8,2
Trizma Base 0,2 M (mL)	25,0	25,0
HCl 0,2 M (mL)	18,8	11,0
Água destilada (q.s.p.) (mL)	100	100

Tampão Carbonato 0,05 M

Reagente	pH		
	9,2	10,2	10,9
Carbonato de Sódio 0,2 M (mL)	4,0	28,5	44,5
Bicarbonato de Sódio 0,2 M (mL)	46,0	21,5	5,5
Água destilada (q.s.p.) (mL)	100	100	100

3.4.6. Soluções Gerais

Reagente de Bradford

Azul de Coomassie G-250	100 mg
Etanol	50 mL
Ácido Fosfórico	100 mL
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

Etanol foi adicionado ao Azul de Coomassie e a solução deixada sob agitação durante 1 h. Transferiu-se a solução para balão volumétrico para observar se houve evaporação de etanol. Quando necessário, acertou-se o volume de etanol para 50 mL e foram adicionados o ácido fosfórico e a água. A solução obtida foi filtrada duas vezes em papel de filtro.

Solução de Soroalbumina Bovina 100 µg / mL

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

Tampão Tris-HCl 0,05 M – pH 8,0

Trizma Base	0,605 g
Água destilada (q.s.p.)	100 mL

O pH foi acertado com HCl

Tampão Tris-HCl 0,01 M – pH 7,0

Trizma Base	0,121 g
Água destilada (q.s.p.)	100 mL

O pH foi acertado com HCl

Tampão Citrato de Sódio 0,05M – pH 6,0

Ácido Cítrico 0,1 M	95 mL
Citrato de Trisódio 0,1 M	415 mL
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

HCl 0,1 M

HCl	0,84 mL
Água destilada (q.s.p.)	100 mL

NaCl 1 M

NaCl	40 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

HCl 5 % (p / v)

HCl	29,75 mL
Água destilada (q.s.p.)	500 mL

H₂SO₄ 5 % (p / v)

H ₂ SO ₄	46,0 mL
Água destilada (q.s.p.)	500 mL

NaOH 1 M

NaOH	40 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

Solução Salina 0,15 M

NaCl	6 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

3.5. Metodologia

3.5.1. Produção da Enzima HXYN2r pelos Transformantes de *P. pastoris* Cultivados em Diferentes Fontes de Nitrogênio

Em trabalho realizado por Faria (2001), foram selecionados os transformantes 12.3, 43.1 e 43.4 de *P. pastoris*, os quais expressam o gene *Hxyn2* do *H. grisea*, e o controle negativo (C4). Estes transformantes foram capazes de produzir a enzima HXYN2r quando cultivados em meio de cultura contendo YNB como fonte de nitrogênio. No presente trabalho o objetivo foi analisar se estes transformantes eram capazes de crescer e produzir a enzima quando cultivados em meios de cultura contendo outras fontes de nitrogênio mais baratas (extrato de levedura, peptona e uréia).

Inicialmente, os transformantes foram analisados quanto a capacidade de crescimento em diferentes meios de cultura sólidos em placa. A atividade enzimática foi determinada pelo teste de atividade em placa, de acordo o protocolo descrito a seguir: as células dos transformantes foram inoculadas nos meios BMGY-U, BMGY-L, BMG-U e BMG-L (3.2.2) e incubadas a 30°C durante 3 dias, sem agitação. Após, as células foram transferidas para os respectivos meios com metanol (BMMY-U, BMMY-L, BMM-U ou BMM-L) (3.2.2) e incubadas a 30°C durante 3 dias, adicionando-se 200 µL de metanol P.A. (3.2.2) sobre a placa a cada 24 h. Após, as culturas foram sobrepostas com solução de xilana/agarose (3.4.1) e incubadas durante 3 h a 42°C. Para a revelação dos halos de atividade, foi adicionada a solução de vermelho do Congo (3.4.1) e as placas foram agitadas suavemente durante 10 min. Então, a solução de vermelho do Congo foi descartada, as placas lavadas com solução de NaCl 1 M (3.4.6) e o contraste obtido pela adição de HCl 0,1 M (3.4.6) sobre a solução de NaCl 1 M utilizada na lavagem das placas. A atividade enzimática foi visualizada como um halo claro ao redor da cultura. Utilizou-se o transformante C4 como controle negativo do experimento.

Posteriormente, os transformantes foram analisados quanto a capacidade de crescimento nos diferentes meios de cultura por fermentação submersa. Os transformantes foram inoculados em Erlenmeyers de 50 mL de capacidade contendo 10 mL de meio BMG-L ou BMGY-U (3.2.2) e incubados a 30°C e 250 rpm até atingirem a DO_{600} entre 2 e 3. As células foram sedimentadas por centrifugação

a 3.000 *g* durante 15 min, lavadas com água destilada estéril e, em seguida, ressuspendidas em 5 mL dos meios BMM-L, BMMY-U ou BMM-U (3.2.2). Não foi utilizado o meio BMG-U para o crescimento celular, pois neste meio as células não atingiram a DO₆₀₀ desejada mesmo após longo período de cultivo.

As células ressuspendidas foram inoculadas em Erlenmeyers de 50 mL de capacidade contendo seu respectivo meio de cultura (BMM-L, BMMY-U ou BMM-U), para um volume final de 20 mL e uma DO₆₀₀ inicial de 1. A seguir, foram incubadas a 30°C e 250 rpm durante 5 dias e a cada 24 h acrescentou-se 1 mL de metanol a 10% (v/v) (3.2.2) e retirou-se alíquotas de 1 mL. As alíquotas foram centrifugadas a 10.000 *g* durante 10 min e o sobrenadante analisado quanto a atividade xilanolítica pelo método de açúcares redutores (3.5.5).

3.5.2. Otimização da Produção de HXYN2r por Planejamento Fatorial

A produção da enzima HXYN2r foi otimizada para o crescimento do transformante selecionado, no meio BMMY-U, seguindo um planejamento fatorial 2³, com três repetições no ponto médio (utilizadas para o cálculo do erro padrão do experimento). Os seguintes fatores foram analisados: concentração da fonte de carbono (FC - metanol), concentração da fonte de nitrogênio (FN - extrato de levedura e uréia - 1,34:1,00% - p/v) e DO₆₀₀ inicial. Os experimentos foram realizados de acordo com os valores dos níveis dos parâmetros e matriz do planejamento fatorial 2³ apresentados nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3. Codificação de níveis para os parâmetros avaliados

Parâmetros	Níveis		
	-	0	+
FC (%; v/v)	0,5	0,75	1,0
FN (%; p/v)	2,34	3,51	4,68
DO ₆₀₀ inicial	1,0	5,5	10,0

Tabela 4. Matriz para o planejamento fatorial 2^3

Experimento	Níveis		
	FC	FN	DO ₆₀₀ inicial
1	+	+	+
2	+	+	-
3	+	-	+
4	+	-	-
5	-	+	+
6	-	+	-
7	-	-	+
8	-	-	-
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

A influência dos parâmetros foi avaliada pela análise dos efeitos principais e de interação entre os parâmetros (calculados utilizando-se o programa *Statgraphics Centurion XV* versão 15.2.06 para Windows). A significância estatística foi determinada de acordo com o teste *t* de Student (Box *et al.*, 1978). Considerou-se como variável resposta a atividade xilanolítica máxima (em U/mL) de cada experimento.

Inicialmente, o transformante selecionado foi inoculado em Erlenmeyer de 125 mL de capacidade contendo 25 mL de meio BMGY-U e incubado a 30°C e 250 rpm até atingir a DO₆₀₀ ideal. As células foram sedimentadas a 3.000 *g* durante 15 min, lavadas e ressuspensas em água destilada estéril. Posteriormente, foram inoculadas em Erlenmeyer de 125 mL de capacidade contendo 25 mL de meio BMMY-U, preparado de acordo com o planejamento fatorial, e incubadas a 30°C e 250 rpm durante 192 h. A cada 24 h foi adicionado metanol conforme a concentração desejada (Tabela 4) e foram retiradas alíquotas de 1 mL para o monitoramento da DO₆₀₀ e atividade enzimática.

Por meio da disposição dos valores de atividade em gráficos e tabelas, com posterior análise do comportamento desta variável durante a fermentação,

foi possível determinar a atividade xilanolítica máxima e consequentemente definiu-se as melhores concentrações dos componentes do meio de cultura para a produção das enzimas a serem utilizadas nas subseqüentes etapas do trabalho.

3.5.3. Produção da Enzima HXYN2r para a Etapa de Purificação

Com o objetivo de obter enzimas para a etapa de purificação, assim como para os testes de sacarificação, o transformante da *P. pastoris* foi inoculado em Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio BMGY-U e incubado a 30°C e 250 rpm durante 96 h. Após, as células foram sedimentadas a 3.000 g durante 15 min, lavadas com água destilada estéril e ressuspensas no meio BMMY-U nas condições otimizadas (3.5.2). Posteriormente foram inoculadas no meio BMMY-U, para um volume final de 50 mL, e incubadas a 30°C e 250 rpm durante 96 h. A cada 24 h foi adicionado 1 mL de metanol a 50% (v/v) e foram retiradas alíquotas de 1 mL para a dosagem de atividade enzimática por DNS (3.5.5), e perfil proteico por SDS-PAGE (3.5.8). O sobrenadante de cultura obtido foi estocado a -20°C.

3.5.4. Dosagem de Glicose

A glicose foi dosada utilizando-se o "Kit" diagnóstico: Glicose Enzimática Líquida (Dole Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda – Goiânia-GO).

3.5.5. Dosagem da Atividade Xilanolítica pelo Método de Açúcares Redutores

Definição de unidade enzimática: Uma unidade enzimática é definida como sendo a quantidade de enzima capaz de produzir 1 µmol de açúcar redutor por minuto sob as condições do ensaio.

A atividade xilanolítica foi determinada pela metodologia de açúcares redutores (DNS – Miller, 1959), conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Ensaio de Atividade Xilanolítica pelo Método de Açúcares Redutores

Reagentes	Teste	Branco Experimento	Branco Aparelho
Amostra	50 µL	—	—
Tampão citrato de sódio (3.4.2)	—	—	500 µL
Xilana 1% (3.4.2.1)	450 µL	450 µL	—

A mistura reacional foi incubada a 50°C durante 5 min e, em seguida, interrompida em banho de água fria e adicionados os reagentes a seguir:

Reagentes	Teste	Branco Experimento	Branco Aparelho
Amostra	—	50 µL	—
DNS (3.4.2)	750 µL	750 µL	750 µL

A mistura reacional foi incubada a 100°C durante 5 min e, em seguida, a reação foi interrompida por incubação em banho de água fria. Realizou-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro (UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec 2000 – Amersham®) no comprimento de onda de 540 nm.

Curva Padrão

A curva padrão foi estabelecida a partir de uma solução padrão de xilose, realizando diluições em triplicata, nas concentrações de 0,3 a 4,2 mg/mL, conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6. Determinação da Curva de Calibração de Xilose para Açúcares Redutores

Reagentes	Teste	Branco Aparelho
Solução de xilose (3.4.2.1)	50 µL	—
Tampão citrato de sódio (3.4.2)	450 µL	500 µL
DNS (3.4.2)	750 µL	750 µL

A mistura reacional foi incubada a 100°C durante 5 min e, em seguida, a reação foi interrompida por incubação em banho de água fria. Realizou-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro (540 nm) e os valores obtidos foram plotados em um gráfico (Absorvância X Concentração de xilose). A equação da reta obtida foi utilizada no cálculo da atividade xilanolítica.

3.5.6. Dosagem da Atividade Celulolítica pelo Método de Açúcares Redutores

Foram dosadas as seguintes atividades celulolíticas:

- FPase – expressa a atividade de celulase total;
- CMCase – expressa a atividade de endoglicanase;
- Avicelase – expressa a atividade de exoglicanase.

As atividades celulolíticas de FPase, CMCase e Avicelase foram dosadas utilizando-se a metodologia de DNS, conforme descrito nas Tabelas 7, 8 e 10, respectivamente.

3.5.6.1. Dosagem de FPase

Tabela 7. Ensaio de Atividade de FPase pelo Método de Açúcares Redutores

Reagentes	Teste	Branco Experimento	Branco Aparelho
Amostra	500 µL	—	—
Tampão citrato de sódio (3.4.2)	1000 µL	—	500 µL
Papel de Filtro*	1 fita	—	—

* Papel Whatman nº1, 1,0 x 6,0 cm (50 mg), enrolado na forma de espiral.

A mistura reacional foi incubada a 50°C durante 1 h e a reação interrompida em banho de água fria. Após, foi transferida para novos tubos como especificado abaixo, exceto o “Branco do Aparelho” que permaneceu no mesmo tubo.

Reagentes	Teste	Branco Experimento	Branco Aparelho
Amostra	—	500 µL *	—
Tubo teste	500 µL	—	—
DNS (3.4.2)	500 µL	500 µL	500 µL

* 500 µL de amostra, diluída com tampão citrato de sódio (3.4.2) na proporção de 1:3, é adicionada ao branco do teste para a reação com o DNS, uma vez que a amostra contida no tubo teste também está diluída na proporção de 1:3.

A mistura reacional foi incubada a 100°C durante 5 min e, em seguida, a reação foi interrompida por incubação em banho de água fria. Realizou-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

3.5.6.2. Dosagem de CMCase

Tabela 8. Ensaio de Atividade de CMCase pelo Método de Açúcares Redutores

Reagentes	Teste	Branco Experimento	Branco Aparelho
Amostra	500 µL	—	—
Carboximetilcelulose 4% (3.4.2.2)	500 µL	—	500 µL

A mistura reacional foi incubada a 50°C durante 1 h e a reação interrompida em banho de água fria. Após, foi transferida para novos tubos como especificado abaixo, exceto o “Branco do Aparelho” que permaneceu no mesmo tubo.

Reagentes	Teste	Branco Experimento	Branco Aparelho
Amostra	—	500 µL *	—
Tubo Teste	500 µL	—	—
DNS (3.4.2)	500 µL	500 µL	500 µL

* 500 µL de amostra, diluída com tampão citrato de sódio (3.4.2) na proporção de 1:2, é adicionada ao branco do teste para a reação com o DNS, uma vez que a amostra contida no tubo teste também está diluída na proporção de 1:2.

A mistura reacional foi incubada a 100°C durante 5 min e, em seguida, a reação foi interrompida por incubação em banho de água fria. Realizou-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

Curva Padrão

A curva padrão para as dosagens de FPase e CMCase foi estabelecida a partir de uma solução padrão de glicose (3.4.2.2), realizando diluições em triplicata, nas concentrações de 1 a 20 µmoles/mL, conforme descrito na Tabela 9.

Tabela 9. Determinação da Curva de Calibração de Glicose para FPase e CMCase

Reagentes	Teste	Branco Aparelho
Solução de glicose (3.4.2.2)	50 µL	—
Tampão citrato de sódio (3.4.2)	450 µL	500 µL
DNS (3.4.2)	500 µL	500 µL

A mistura reacional foi incubada a 100°C durante 5 min e, em seguida, a reação foi interrompida por incubação em banho de água fria. Realizou-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm e os valores obtidos foram plotados em um gráfico (Absorvância X Concentração de glicose). A equação de reta obtida foi utilizada no cálculo da atividade enzimática.

3.5.6.3. Dosagem de Avicelase

Tabela 10. Ensaio de Atividade Avicelase pelo Método de Açúcares Redutores

Reagentes	Teste	Branco Experimento	Branco Aparelho
Amostra	125 µL	—	—
Tampão citrato de sódio (3.4.2)	—	—	375 µL
Avicel 1% (3.4.2.2)	250 µL	250 µL	—

A mistura reacional foi incubada a 50°C durante 1 h sob agitação e, em seguida, interrompida em banho de água fria, submetida a centrifugação a 10.000 *g* durante 10 min, coletado o sobrenadante e adicionados os reagentes a seguir, em novos tubos, exceto o “Branco do Aparelho” que permaneceu no mesmo tubo.

Reagentes	Teste	Branco Experimento	Branco Aparelho
Amostra	—	125 µL	—
Sobrenadante coletado	375 µL	250 µL	—
DNS (3.4.2)	1000 µL	1000 µL	1000 µL

A mistura reacional foi incubada a 100°C durante 5 min e, em seguida, a reação foi interrompida por incubação em banho de água fria. Realizou-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

Curva Padrão

A curva padrão para a dosagem de Avicelase foi estabelecida a partir de uma solução padrão de glicose, realizando diversas diluições em triplicata, nas concentrações de 0,15 a 1,5 mg/mL, conforme descrito na Tabela 11.

Tabela 11. Determinação da Curva de Calibração de Glicose para Avicelase

Reagentes	Teste	Branco Aparelho
Solução de glicose (3.4.2.2)	125 µL	—
Tampão citrato de sódio (3.4.2)	250 µL	375 µL
DNS (3.4.2)	1000 µL	1000 µL

A mistura reacional foi incubada a 100°C durante 5 min e, em seguida, a reação foi interrompida por incubação em banho de água fria. Realizou-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm e os valores obtidos foram plotados em um gráfico (Absorvância X Concentração de glicose). A equação de reta obtida foi utilizada no cálculo da atividade enzimática.

3.5.7. Dosagem de Proteínas

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 (3.4.6) e, após incubação a temperatura ambiente durante 15 min, a quantidade de proteínas foi determinada por leitura de absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Para “zerar” o espectrofotômetro foi utilizada uma solução contendo 100 µL de água destilada e 1 mL de Reagente de Bradford.

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

Para a quantificação da enzima HXYN2r presente no sobrenadante de cultura, a amostra protéica foi aplicada em SDS-PAGE (3.5.8), o gel foi corado com Azul de Coomassie, 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.

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

A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel desnaturante de poliacrilamida segundo a descrição de Laemmli (1970) em um sistema de eletroforese da Amersham® (Mighty Small™ SE245 – Dual Gel Caster).

Preparo dos Géis

Os géis foram preparados conforme descrito a seguir:

Soluções	Concentração		
	4%	12%	13%
Acrilamida:Bis-acrilamida (39:1)	500 µL	7,5 mL	8,2 mL
Tris-HCl 1 M pH 6,8	630 µL	—	—
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	—	6,2 mL	6,2 mL
Água destilada (q.s.p.)	3,8 mL	11,0 mL	10,3 mL
SDS 10% (p/v)	50 µL	250 µL	250 µL
PAm 10% (p/v)	50 µL	250 µL	250 µL
TEMED	5 µL	10 µL	10 µL

Preparo das Amostras

As amostras protéicas foram precipitadas na presença de 10% (p/v) de TCA (3.4.3), homogeneizadas e incubadas em banho de água e gelo durante 1 h, em seguida, foram submetidas a centrifugação a 8.000 *g* a 4°C durante 10 min. O sedimento foi lavado duas vezes com 500 µL de acetona P.A. gelada e centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sedimento obtido foi ressuspenso em 15 a 30 µL de tampão de amostra 2x (3.4.3), fervido durante 5 min e aplicado imediatamente no gel ou estocado a -20 °C.

Corrida Eletroforética

A corrida foi conduzida em tampão de corrida 1x (3.4.3) com uma voltagem constante de 100 V utilizando o sistema de eletroforese vertical.

Coloração com Azul de Coomassie

Ao término da corrida, as bandas protéicas presentes no gel foram visualizadas após a incubação deste durante 2 h sob agitação, na solução corante Azul de Coomassie (3.4.3.1), seguida pela descoloração, incubando o gel durante 30 min sob agitação, na solução descorante (3.4.3.1).

Coloração com Nitrato de Prata

Ao término da corrida, as bandas protéicas presentes no gel foram reveladas utilizando-se o método descrito por Blum *et al.* (1987). O gel foi incubado, sob agitação, durante 1 h na solução fixadora (3.4.3.2), em seguida, lavado 3 vezes com solução de lavagem durante 20 min cada vez. Após as lavagens o gel foi incubado na solução de tratamento durante 1 min, lavado 3 vezes com água destilada durante 30 seg cada uma e, em seguida, incubado durante 20 min na solução de equilíbrio. Novamente o gel foi lavado com água destilada por duas vezes de 20 seg cada e revelado com a solução de revelação. A reação foi interrompida, após o aparecimento das bandas, transferindo-se o gel para a solução de parada.

Quando necessário, foi utilizada a solução descorante para nitrato de prata (3.4.3.2) para descorar o gel de poliacrilamida e reiniciou-se a coloração a partir da solução de lavagem.

3.5.9. Zimograma para Atividade de Endoxilanase

O protocolo para o Zimograma segue o mesmo procedimento descrito no item 3.5.8, utilizando 0,1% de xilana "oat-spelt" (3.4.4) na malha do gel separador.

As amostras protéicas foram concentradas por liofilização, ressuspensas em tampão de amostra 2x, fervidas durante 5 min e submetidas a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida conforme descrito no item 3.5.8. Ao término da corrida, o gel foi tratado para a revelação da atividade xilanolítica, seguindo

método descrito por Teather & Wood (1982), com modificações. O gel foi incubado durante 1 h, sob agitação, em solução de Triton X-100 2,5% (3.4.4) e, em seguida, lavado 3 vezes com água destilada e incubado a 50°C durante 1 h em tampão MES (3.4.4) pré-aquecido a 50°C. Após a incubação em tampão MES o gel foi lavado com água destilada, incubado em solução de Vermelho do Congo 0,1% (3.4.4) sob agitação durante 20 min e lavado com NaCl 1 M (3.4.6) até o aparecimento dos halos de atividade enzimática. Para uma melhor visualização, adicionou-se HCl 0,1 M (3.4.6) sobre a solução de NaCl. As bandas de atividade xilanolítica foram visualizadas como halos claros no gel.

3.5.10. Determinação da Massa Molecular das Proteínas em Gel

Foi construída a curva de calibração padrão plotando-se as massas moleculares de proteínas padrões versus sua mobilidade relativa no gel.

As massas moleculares das bandas protéicas foram determinadas correlacionando-se, sua migração no gel com a migração das proteínas padrão.

3.5.11. Purificação da Enzima HXYN2r

Inicialmente, foi realizada a produção da enzima HXYN2r nas condições descritas no item 3.5.3. Após o cultivo, o sobrenadante de cultura (PpHXYN2r) foi submetido a centrifugação a 3.000 *g* durante 15 min. O PpHXYN2r foi estocado a -20°C e utilizado como fonte da enzima HXYN2r nos subsequentes testes de purificação.

3.5.11.1. Obtenção do Extrato Enzimático

A primeira etapa do procedimento de purificação foi a diálise do PpHXYN2r, utilizando saco de diálise com diâmetro de poro que permite a passagem de proteínas com até 18 kDa, contra tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 (3.4.6) por 24 h a 4°C, para a retirada do excesso de sais, seguida pela posterior concentração até pó por liofilização. Para a aplicação em coluna cromatográfica, foi ressuspendido

com o tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 (3.4.6) (extrato enzimático concentrado contendo a enzima HXYN2r – EHXYN2).

3.5.11.2. Fracionamento das Proteínas por Cromatografia

O EHXYN2 (3.5.11.1) foi fracionado por cromatografia em resina de separação por massa molecular, "Sephacryl S-100™ High Resolution" (Amersham®), utilizando uma coluna de 87 x 1,5 cm equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0 (3.4.6) adicionado de NaCl 0,1 M (3.4.6). Foi aplicado 1 mL do EHXYN2 com atividade xilanolítica de 1.500 U/mL e este foi eluído a uma vazão de 30 mL/h a 4°C, utilizando-se como eluente, o tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de 0,1 M de NaCl. Frações de 2 mL foram coletadas a partir do volume vazio de 80 mL e todas foram monitoradas quanto à concentração protéica por leitura de absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm e quanto à atividade xilanolítica, de 3 em 3 frações, pelo ensaio de DNS (3.5.5). As frações com atividade xilanolítica foram analisadas quanto ao perfil protéico por SDS-PAGE (3.5.8) e as frações contendo a HXYN2r pura foram estocadas a -20°C para posterior caracterização bioquímica.

3.5.12. Caracterização Bioquímica da Enzima HXYN2r

3.5.12.1. Determinação do pH Ótimo

O efeito do pH na atividade da endoxilanase HXYN2r foi determinado realizando o ensaio de DNS por meio da incubação de 50 µL da enzima em 225 µL de xilana 2% (3.4.2.1) e 225 µL de tampão com diferentes valores de pH, e seguiu-se o procedimento descrito em 3.5.5. Os tampões utilizados e seus respectivos valores de pH estão dispostos na Tabela 12.

Tabela 12. Tampões utilizados na determinação do pH ótimo

Tampão (50 mM)	pH
Citrato de Sódio	3,0; 4,0; 5,0 e 5,5
Fosfato de Sódio	6,0; 6,5; 7,0 e 7,4
Tris-HCl	7,7 e 8,2
Carbonato de Sódio	9,2; 10,2 e 10,9

Para cada valor de pH foi determinada a atividade xilanolítica e, o maior valor de atividade foi considerado como 100%. Os demais valores foram correlacionados a este, determinando assim a atividade xilanolítica relativa para cada valor de pH. O pH ótimo foi conhecido plotando-se os valores da atividade xilanolítica relativa versus o valor do pH. O mesmo procedimento foi seguido nos protocolos abaixo.

3.5.12.2. Determinação da Temperatura Ótima

A temperatura ótima foi determinada incubando-se 50 μ L da endoxilanase com 225 μ L de xilana 2% (3.4.2.1) e 225 μ L de tampão citrato de sódio 50 mM (3.4.5) no pH ótimo. A primeira etapa do ensaio de DNS foi realizada incubando-se as amostras durante 5 min nas temperaturas de 0, 16, 25, 37, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 e 100°C e seguiu-se o procedimento descrito em 3.5.5.

A temperatura ótima foi determinada plotando-se os valores da atividade xilanolítica relativa versus o valor da temperatura.

3.5.12.3. Determinação da Estabilidade da Enzima em Diferentes Valores de pH

Um volume de 50 μ L da enzima foi incubado à temperatura ambiente com 225 μ L de tampão no pH ótimo, um ponto acima e um ponto abaixo durante os tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75 e 120 minutos. Alíquotas foram retiradas e analisadas quanto à atividade xilanolítica residual pelo método de DNS (3.5.5).

A estabilidade no pH foi determinada plotando-se os valores da atividade xilanolítica relativa versus o tempo de incubação.

3.5.12.4. Determinação da Termoestabilidade

Um volume de 50 μL da enzima foi pré-incubado a 50°C e a 60°C durante 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75 e 80 minutos. Alíquotas foram retiradas e analisadas quanto à atividade xilanolítica residual pelo método de DNS (3.5.5) utilizando o tampão no pH ótimo, por diferentes intervalos de tempo.

A termoestabilidade foi determinada plotando-se os valores da atividade xilanolítica relativa versus o tempo de incubação.

3.5.12.5. Determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$

As propriedades cinéticas da enzima HXYN2r purificada foram determinadas realizando-se o ensaio de atividade xilanolítica (3.5.5) nas condições ótimas de pH e temperatura, variando a concentração da solução de xilana "oat-spelt" de 1 a 25 mg/mL. A constante de Michaelis-Menten (K_m) foi determinada como a concentração de substrato no qual metade da taxa máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) foi atingida e calculada plotando as atividades xilanolíticas versus a concentração de substrato. A velocidade da reação foi expressa em μmoles de açúcar redutor liberado por minuto.

3.5.12.6. Efeito de Íons, Açúcares e Agentes Desnaturantes

O efeito de íons, açúcares e agentes desnaturantes sobre a atividade da HXYN2r purificada foi determinado pré-incubando 100 μL da enzima purificada na presença de 10 μL de SDS, EDTA, glicose, xilose, MgSO_4 , LiSO_4 , CuSO_4 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ZnSO_4 , ZnCl_2 , CuCl_2 , FeCl_3 , HgCl_2 , CaCl_2 , MgCl_2 , KCl , MnCl_2 , BaCl_2 e acetato de cobre (concentração final de 10 mM), exceto o HgCl_2 , para o qual testou-se também as concentrações de 1 e 5 mM, a 25°C durante 10 min. O ensaio de atividade xilanolítica (3.5.5) sem a adição desses foi considerado o controle e sua atividade definida como 100%. A dosagem da atividade xilanolítica foi realizada nas condições ótimas de pH e temperatura.

3.5.13. Sacarificação de Substratos Lignocelulósicos por Hidrólise Enzimática

O experimento de sacarificação visou a liberação de xilose a partir de substratos lignocelulósicos utilizando a endoxilanase HXYN2r do fungo *H. grisea* produzida pela levedura *P. pastoris*. Para aumentar ainda mais o contato e ação da enzima sobre o substrato, nas reações de hidrólise utilizou-se também o extrato enzimático (EHg) produzido pelo fungo *H. grisea* que possui endoxilanases e celulasas (dentre elas a endoxilanase HXYN2 selvagem) em baixas concentrações. Os substratos testados foram: sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar e palha de cana-de-açúcar dos cultivares RB72454, RB835486, RB867515 e SP832847 (3.3.2).

3.5.13.1. Produção de Enzimas pelo *H. grisea*

Para a produção do EHg o fungo *H. grisea* foi cultivado por fermentação submersa nas condições descritas por Carvalho (2003) como sendo adequadas para a produção de endoxilanases: cultivo do fungo em MM contendo 1% de BCA como fonte de carbono e 0,05% de fonte de nitrogênio (extrato de levedura e sulfato de amônia, 1:1). No trabalho citado acima o BCA foi descrito como um ótimo indutor da produção de xilanasase e, com o objetivo de aumentar a produção dessas enzimas foi testado no presente trabalho o cultivo do fungo em MM contendo de 1 a 5% de BCA como fonte de carbono.

Para o cultivo do fungo nas condições descritas acima, os esporos do fungo *H. grisea* foram coletados em solução de NaCl 0,15 M (3.4.6) e quantificados em câmara de "Newbauer". Foram inoculados $0,35 \cdot 10^6$ esporos/mL em Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 100 mL de MM (3.2.1), acrescido de 1 a 5% (p/v) de BCA e 0,05% (p/v) de FN (extrato de levedura e sulfato de amônia na proporção de 1:1). O cultivo foi realizado a 42°C e 120 rpm durante 120 h e a cada 24 h foram retiradas alíquotas de 0,7 mL, as quais foram centrifugadas a 8.000 g durante 10 min e o sobrenadante analisado quanto à atividade xilanolítica (3.5.5) e atividade celulolítica (3.5.6). Ao final da fermentação, o meio de cultura foi filtrado em papel de filtro e o sobrenadante analisado quanto ao perfil protéico por SDS-PAGE (3.5.8), quanto às atividades xilanolítica (3.5.5) e celulolíticas (3.5.6). Devido à baixa concentração de endoxilanases e celulasas presentes no EHg,

o sobrenadante de cultura foi concentrado por liofilização e estocado a -20°C , em pequenas alíquotas, para ser utilizado na sacarificação.

3.5.13.2. Pré-tratamento

Inicialmente os substratos empregados na etapa de hidrólise enzimática passaram por um único tipo de pré-tratamento físico: fracionamento por moagem em moinho de facas com peneira de 20 *mesh*. Este substrato foi considerado como substrato bruto.

Posteriormente, para um melhor rendimento nas reações de hidrólise enzimática, os substratos passaram também por um método de pré-tratamento ácido com o objetivo de separar os polímeros de celulose, hemicelulose e lignina facilitando a ação das enzimas.

Para a escolha do método de pré-tratamento ácido, foram realizados testes onde os substratos foram autoclavados a 121°C e 1 atm na presença de H_2SO_4 ou HCl (3.4.6) nas concentrações de: 0% (controle); 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5% de ácido. Para cada uma das concentrações, os substratos foram autoclavados a 121°C e 1 atm, nos tempos de: 30 min, 60 min, 90 min e 120 min.

Os testes de pré-tratamento foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL de capacidade, adicionando-se 20 mL de solução ácida, nas concentrações descritas anteriormente em 8% (p/v) de substrato. Os substratos foram então autoclavados por diferentes tempos e após, analisados quanto à concentração de glicose (3.5.4) e de açúcares redutores totais liberados (ART) pelo método de DNS (3.5.5). Todos os ensaios de pré-tratamento e análises foram realizados em duplicata.

Uma vez definido o pré-tratamento, os substratos foram autoclavados na condição escolhida e a fração sólida recuperada por filtração a vácuo. O sobrenadante da filtração foi analisado quanto à presença de glicose (3.5.4) e ART (3.5.5). O substrato pré-tratado foi lavado com água destilada e tampão citrato de sódio 50 mM pH 6,0 (3.4.6) com o objetivo de retirar o excedente de ácido e ajustar o pH para o valor próximo ao utilizado na etapa de hidrólise enzimática. Posteriormente, o substrato pré-tratado foi seco a 80°C por 16 h para ser utilizado na etapa de hidrólise enzimática.

3.5.13.3. Hidrólise Enzimática

Na hidrólise enzimática foi utilizado o sobrenadante de cultura da levedura *P. pastoris* (PpHXYN2r) contendo a enzima HXYN2r (3.5.3) e o sobrenadante de cultura do fungo *H. grisea* (EHg) cultivado na presença de BCA (3.5.13.1). A definição das condições de realização dos testes de sacarificação como pH e temperatura foram definidas de acordo com as características bioquímicas das enzimas contidas no PpHXYN2r e EHg.

Hidrólise dos Substratos Brutos

Inicialmente, foi realizada a hidrólise enzimática dos substratos brutos (BCA e SM) sem pré-tratamento. A Erlenmeyers de 500 mL de capacidade, adicionou-se 20 mL da solução estoque de tampão citrato de sódio 500 mM pH 5,0 (3.4.5) ao PpHXYN2r e/ou ao EHg, em quantidades suficientes para fornecer a concentração de enzima a ser utilizada em cada experimento e completou-se o volume para 200 mL. Após, adicionou-se 120 µL de ampicilina (100 mg/mL) e 8% (p/v) de substrato. Os frascos foram incubados a 42°C e 130 rpm por 48 h. Alíquotas foram retiradas a cada 12 h e analisadas quanto a concentração de ART (3.5.5) em duplicata. Foram realizados quatro experimentos, em duplicata:

- Controle - sem adição de enzimas
- EHg - 100 U endoxilanase/g substrato
- PpHXYN2r - 100 U endoxilanase/g substrato
- EHg + PpHXYN2r - EHg- 100 U endoxilanase/g substrato + PpHXYN2r- 100 U endoxilanase/g substrato

Hidrólise dos Substratos Pré-tratados

Os substratos pré-tratados com ácido foram submetidos a hidrólise enzimática em Erlenmeyers de 500 mL de capacidade. Adicionou-se 20 mL da solução estoque de tampão citrato de sódio 500 mM pH 6,0 (3.4.6) ao PpHXYN2r e/ou ao EHg, em quantidades suficientes para fornecer a concentração de enzima a

ser utilizada em cada experimento e completou-se o volume para 200 mL. Após, adicionou-se 120 µL de ampicilina (100 mg/mL) e 8% (p/v) de substrato. Os frascos foram incubados a 50°C e 130 rpm por 72 h. Alíquotas foram retiradas a cada 12 h e analisadas em duplicata quanto a concentração de glicose (3.5.4) e ART (3.5.5). Foram realizados três experimentos, em duplicata:

- Controle - sem adição de enzimas
- PpHXYN2r - 500 U endoxilanase/g substrato
- EHg + PpHXYN2r - EHg- 50 U endoxilanase/g substrato + PpHXYN2r- 500 U endoxilanase/g substrato

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características Bioquímicas da Enzima HXYN2r

Com o objetivo de analisar as características bioquímicas da enzima HXYN2r se fez necessária a produção da enzima pela levedura *P. pastoris* por fermentação submersa e a posterior purificação da enzima por cromatografia líquida.

4.1.2. Produção da Enzima HXYN2r

Como descrito na introdução, o gene *Hxyn2* que codifica a endoxilanase HXYN2 foi inserido no genoma da levedura *P. pastoris* e expresso sob o controle do promotor do gene AOX1, que é induzido por metanol. Os transformantes produtores da enzima recombinante foram selecionados quanto a estabilidade genética e capacidade de produzir e secretar a enzima ativa. Dos transformantes obtidos, os transformantes 12.3, 43.1 e 43.4 foram selecionados como produtores da enzima HXYN2r ativa e apresentaram estabilidade da integração do cassete de expressão no genoma.

Com o objetivo de aumentar a produção da endoxilanase HXYN2r por fermentação submersa, inicialmente realizou-se a seleção dos transformantes capazes de produzir a enzima ativa quando cultivados em meios de cultura com diferentes fontes de nitrogênio. Após esta seleção, realizou-se um planejamento fatorial para a otimização da produção enzimática, variando as concentrações de metanol, concentração das fontes de nitrogênio e a DO₆₀₀ inicial. Os resultados obtidos em cada experimento são apresentados e discutidos a seguir.

4.1.2.1. Influência de Diferentes Fontes de Nitrogênio

Os transformantes 12.3, 43.1 e 43.4 da levedura *P. pastoris* foram capazes de produzir a enzima quando cultivados em meio de cultura contendo YNB como única fonte de nitrogênio. No presente trabalho, o objetivo foi analisar se estes

transformantes seriam capazes de crescer e produzir a enzima quando cultivados em meios de cultura contendo outras fontes de nitrogênio: BMM-U (uréia), BMM-L (extrato de levedura), BMMY-L (extrato de levedura e peptona) e BMMY-U (extrato de levedura, peptona e uréia) (3.2.2).

Os transformantes 12.3, 43.1 e 43.4 de *P. pastoris* foram cultivados nos meios BMG-U, BMG-L, BMGY-L e BMGY-U (3.5.1). A atividade enzimática foi detectada pelo método de atividade em placa (3.5.1) como demonstrado na Figura 6.

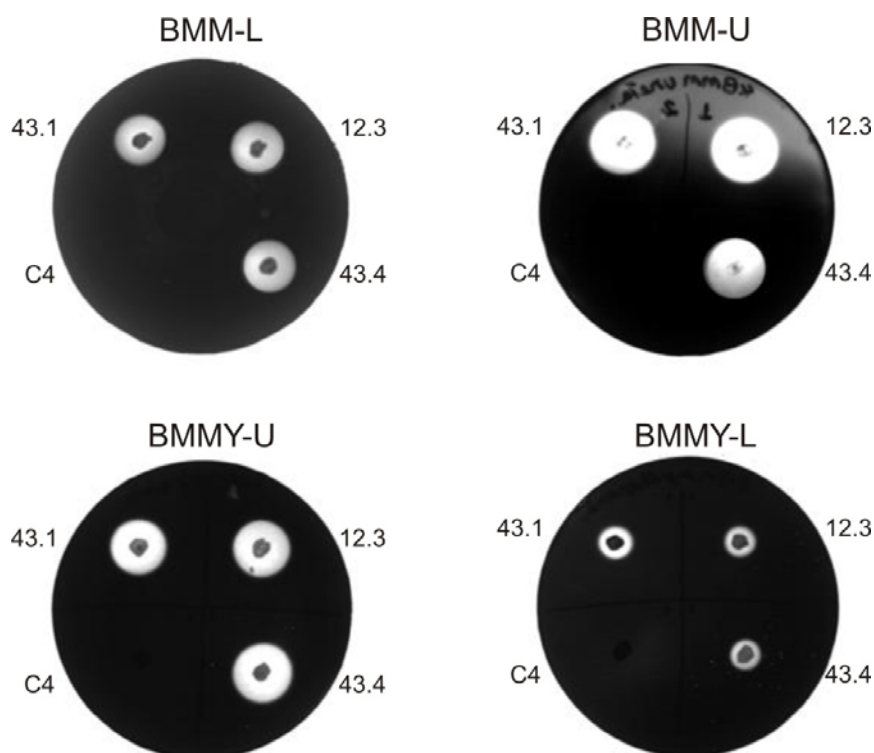


Figura 6. Atividade xilanólítica em placa dos transformantes de *P. pastoris* contra xilana "oat-spelt". Os transformantes 12.3, 43.1 e 43.4 foram obtidos da transformação de células de *P. pastoris* com o vetor pHILD2-xyn2 e, o transformante C4, com o vetor pHILD2 (controle negativo). A placa foi corada com Vermelho do Congo e o contraste obtido pela adição de HCl.

Os melhores meios para a produção de xilanase pelos transformantes foram os meios BMM-U e BMMY-U, onde foram visualizados os maiores halos de atividade, seguido pelos meios BMM-L e BMMY-L. Não houve diferença entre os transformantes testados, uma vez que no meio BMM-U os melhores transformantes foram o 12.3 e o 43.1 e no meio BMMY-U foi o transformante 43.4. Enquanto que

nos meios BMM-L e BMMY-L os resultados foram muito próximos para todos os transformantes testados.

Com o objetivo de selecionar o melhor transformante e o melhor meio de cultura para a produção da enzima HXYN2r em frasco foi realizada a cinética de produção da enzima por fermentação submersa (3.5.1). O sobrenadante de cultura foi monitorado a cada 24 h quanto à atividade xilanolítica e os resultados são apresentados na Figura 7.

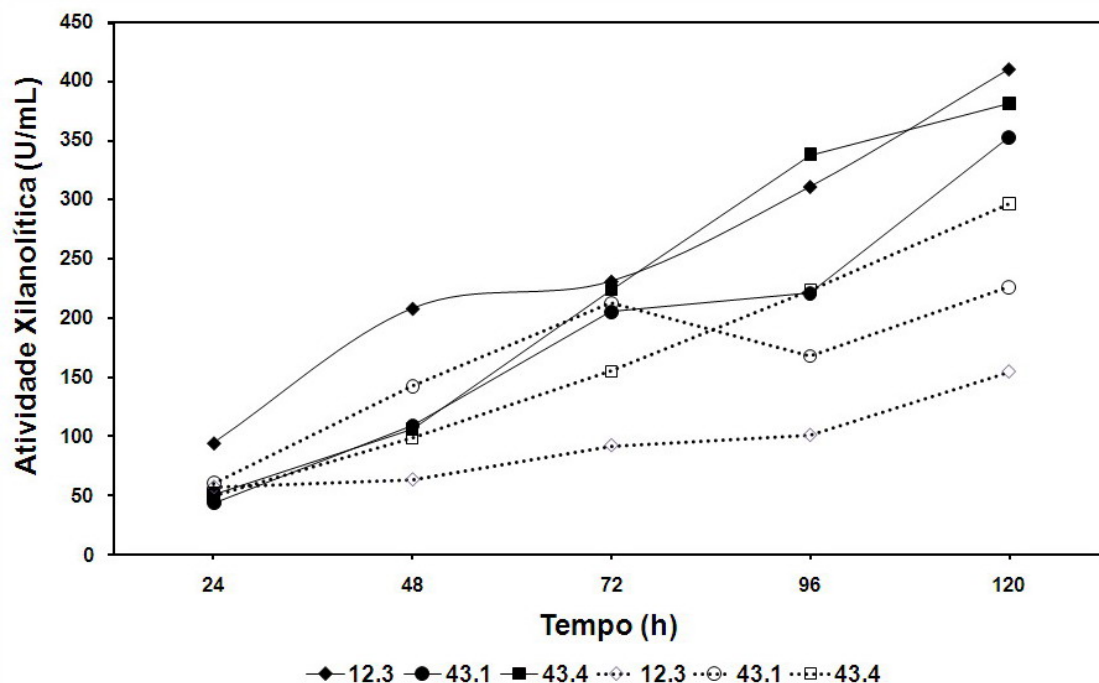


Figura 7. Atividade xilanolítica dos transformantes 12.3, 43.1 e 43.4 de *P. pastoris*, crescidos em meio BMM-L e BMMY-U por 120 h a 30°C e 250 rpm. Símbolos fechados: meio BMMY-U; Símbolos abertos: meio BMM-L.

O meio BMMY-U apresentou uma baixa atividade xilanolítica (2,6 U/mL) em relação aos demais, provavelmente devido à baixa quantidade de nitrogênio presente neste meio, uma vez que utiliza-se apenas uréia. Devido à baixa atividade neste meio, para todos os clones, seu resultado foi omitido da Figura 7. Os resultados obtidos na cinética de produção da enzima HXYN2r em frasco demonstram que o meio BMMY-U foi o melhor para todos os transformantes testados, seguido pelo meio BMM-L.

A produção máxima da enzima HXYN2r foi obtida com 120 h de cultivo por todos os transformantes e em todos os meios de cultura testados. No meio BMMY-U, o transformante 12.3 apresentou a maior atividade (409,2 U/mL), seguido pelo 43.4 (380,3 U/mL) e pelo 43.1 (352,0 U/mL). Entretanto, no cultivo

no meio BMM-L, o transformante 43.4 apresentou a maior atividade (296,5 U/mL), seguido pelo 43.1 (225,5 U/mL) e pelo 12.3 (154,0 U/mL).

A maior produção da enzima HXYN2r por todos os transformantes sob cultivo no meio BMMY-U pode ser explicada pela maior disponibilidade de fontes de nitrogênio presente neste meio em relação aos demais, e da presença de peptona, a qual tem a função de tamponamento do meio e pode agir como substrato alternativo para a ação das proteases (Clare *et al.*, 1991; Siegel *et al.*, 1990; Werten *et al.*, 1999). Este mesmo meio de cultura, porém utilizando YNB ao invés de uréia, foi utilizado por Fierens e colaboradores (2004) para a produção de um inibidor da endoxilanase (TAXI-I) do *Triticum aestivum* expresso em *P. pastoris*, por Minning e colaboradores (2001) na otimização da produção de lipase do *Rhizopus oryzae* por *P. pastoris*, por Ramchuran e colaboradores (2005) na produção da endoxilanase de *R. marinus* em *P. pastoris* e por Ruanglek e colaboradores (2007) na produção de uma endoxilanase de *A. niger* em *P. pastoris*, o qual obteve uma atividade xilanolítica de 663 U/mL e 46,3 g/L de biomassa, utilizando 200 mL de meio em Erlenmeyer de 1 L de capacidade.

Baseado nos resultados obtidos pelo cultivo da *P. pastoris* em frascos, selecionou-se o transformante 12.3 e o meio BMMY-U para a produção da enzima HXYN2r.

4.1.2.2. Influência da Concentração das Fontes de Carbono e Nitrogênio e da Densidade Óptica Inicial a 600 nm

Com o objetivo de aumentar a produção da enzima HXYN2r pela levedura *P. pastoris* realizou-se um planejamento fatorial 2^3 (3.5.2). Foi realizada a produção da enzima HXYN2r pelo transformante 12.3 no meio BMMY-U por 120 h. A cada 24 h foram retiradas alíquotas para monitoramento da DO_{600} e da atividade xilanolítica pelo método de DNS (3.5.5). Os gráficos da cinética de produção da enzima HXYN2r segundo o planejamento fatorial (3.5.2) são apresentados nas Figuras 8A e 8B. Na Tabela 13 são apresentados os resultados da máxima atividade xilanolítica obtida para cada condição de cultivo testada.

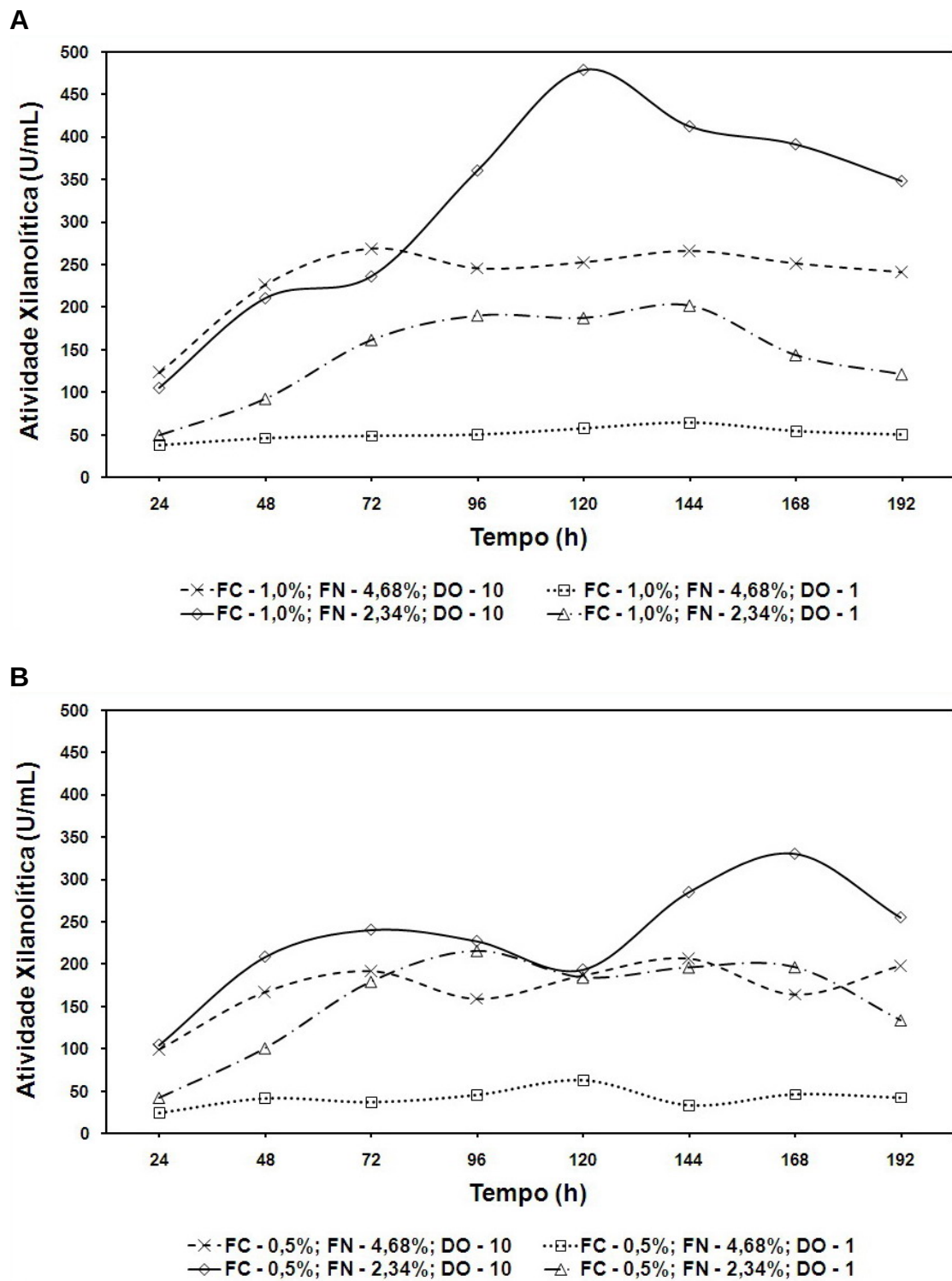


Figura 8. Cinética da produção da enzima HXYN2r pelo transformante 12.3 de *P. pastoris* em meio BMMY-U de acordo com o planejamento fatorial. **A**- Experimentos 1 a 4 da Tabela 13; **B**- Experimentos 5 a 8 da Tabela 13. FC - Fonte de carbono; FN - Fontes de nitrogênio; DO - Densidade óptica inicial a 600 nm.

Tabela 13. Experimentos do planejamento fatorial variando as condições de cultivo do transformante 12.3 em meio BMMY-U e a respectiva produção máxima da endoxilanase HXYN2r

Experimento	Níveis			Atividade Máxima (U/mL)
	FC* (%)	FN** (%)	DO ₆₀₀ Inicial	
1	1,0	4,68	10	269,1
2	1,0	4,68	1	64,7
3	1,0	2,34	10	478,2
4	1,0	2,34	1	202,3
5	0,5	4,68	10	207,1
6	0,5	4,68	1	62,7
7	0,5	2,34	10	330,8
8	0,5	2,34	1	215,9
9	0,75	3,51	5,5	189,3
10	0,75	3,51	5,5	348,0
11	0,75	3,51	5,5	363,1

(*) metanol (%; v/v)

(**) uréia e extrato de levedura na proporção de 1,34:1,00 (%; p/v)

Os resultados do planejamento fatorial apresentados na Figura 8 e Tabela 13 demonstram que para esta série de experimentos a maior produção da enzima HXYN2r (478,2 U/mL) foi obtida utilizando-se a maior concentração da fonte de carbono (1% de metanol), a maior DO₆₀₀ inicial (10) e a menor concentração das fontes de nitrogênio (2,34%). Resultados similares foram obtidos por Damaso e colaboradores (2003). Estes autores realizaram um planejamento fatorial para otimizar a produção da endoxilanase de *T. lanuginosus* expressa em *P. pastoris* e variaram os fatores concentração de metanol (0,5 a 1,0%; v/v), concentração da fonte de nitrogênio YNB (0,9 a 1,8%; p/v) e DO₆₀₀ inicial (0,5 a 5,0). O melhor resultado para a produção da enzima recombinante foi obtido utilizando a concentração máxima de metanol e mínima de YNB, com a máxima

DO₆₀₀ e, as análises estatísticas demonstraram que apenas a DO₆₀₀ inicial exerceu influência significativa e positiva sobre a produção da endoxilanase, corroborando com os resultados obtidos neste experimento.

O gráfico de Pareto foi utilizado para comparar a produção da HXYN2r em todos os meios testados no planejamento fatorial. O gráfico mostra os valores dos efeitos (teste *t* de Student) para cada parâmetro avaliado e a linha tracejada indica a mínima magnitude dos efeitos que é significativa estatisticamente com um nível de confiança de 95% (Figura 9).

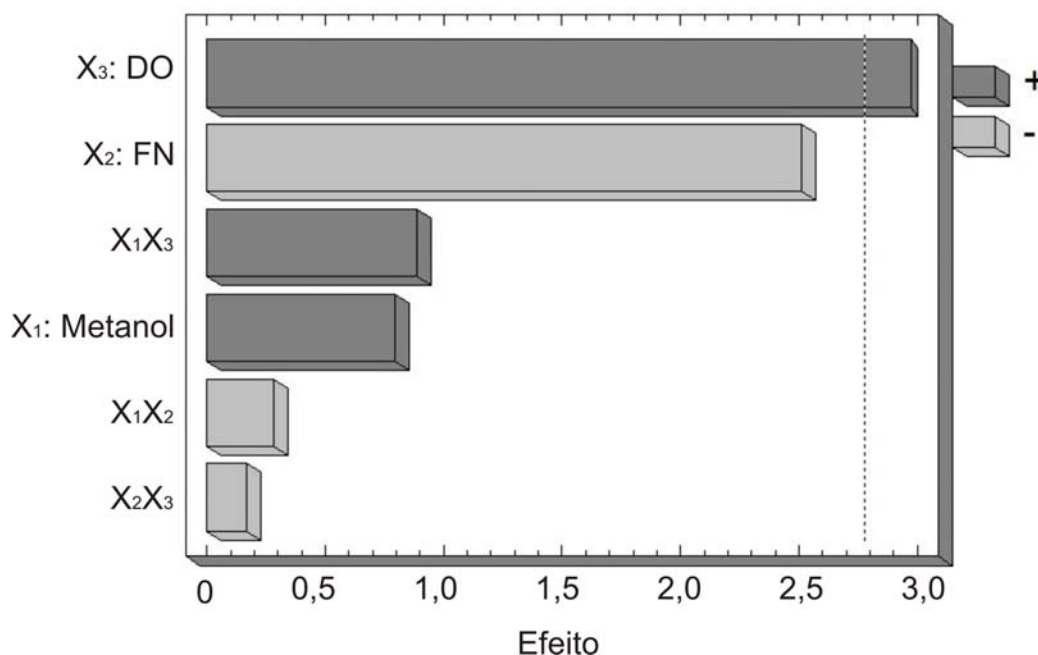


Figura 9. Gráfico de Pareto do efeito da composição do meio na produção da HXYN2r pela *P. pastoris*. Valores do lado direito da linha tracejada são estatisticamente significativos (95% confiança). A influência da interação entre os parâmetros sobre a produção da HXYN2r é representada por X_1X_2 , X_1X_3 e X_2X_3 . DO= densidade óptica a 600 nm; FN= Fontes de Nitrogênio.

O gráfico de Pareto mostra claramente que a concentração de metanol e das fontes de nitrogênio não tem efeito significativo sobre a produção da HXYN2r, enquanto que a DO₆₀₀ inicial mostrou ser o fator mais importante que afetou a produção da enzima. Observa-se também que não houve interação entre as variáveis estudadas e que a fonte de nitrogênio exerceu um efeito negativo sobre a produção da HXYN2r, comprovando as observações realizadas a partir dos resultados apresentados na Tabela 13. Portanto, somente a DO₆₀₀ inicial exerceu efeito significativo sobre a produção da HXYN2r, sendo que este efeito foi positivo e, um aumento na DO₆₀₀ de 1 para 10, acarretou um aumento de 236% na produção da HXYN2r (experimentos 3 e 4).

4.1.2.3. Produção da Enzima HXYN2r para a Etapa de Purificação

Baseado nos resultados obtidos no planejamento fatorial definiu-se como condições ótimas o cultivo do transformante 12.3 no meio BMMY-U com as seguintes variações: 1,0% metanol, 2,34% de fontes de nitrogênio e DO₆₀₀ inicial de 10. Como observado na Figura 8A, nas concentrações definidas como ótimas, a enzima HXYN2r foi detectada no sobrenadante de cultura a partir do tempo de 24 h e atingiu o valor máximo no tempo de 120 h. Para a produção da enzima HXYN2r o cultivo foi realizado por 96 h, como uma tentativa de se obter um sobrenadante de cultura com menor contaminação por proteases. Damaso e colaboradores (2003) obtiveram a produção máxima da endoxilanase do *T. lanuginosus* expressa em *P. pastoris* com 96 h de cultivo. Shi e colaboradores (2003) detectaram a presença de três proteases no sobrenadante de cultura da *P. pastoris* quando cultivada no meio BMMY, sendo proteases do tipo aspártico (pH 3,5 a 4,5), cisteína (pH 5,5 a 7,0) e serina (pH 10,0). Nessas condições o transformante 12.3 foi cultivado por 96 h, sendo que a cada 24 h foram retiradas alíquotas para analisar o perfil de proteínas totais secretadas pela levedura por SDS-PAGE e Zimograma. Os resultados são apresentados na Figura 10.

Após a otimização das condições de cultivo, a produção da HXYN2r pela *P. pastoris* atingiu o valor máximo de 696 U/mL o qual é aproximadamente 45 vezes maior que o máximo obtido para a produção de endoxilanses selvagens pelo fungo *H. grisea* na presença de 3% (p/v) de BCA. A concentração de proteínas foi quantificada por densitometria (3.5.7) e atingiu o rendimento de 100 mg/L, o que correspondeu a 37% das proteínas totais secretadas no sobrenadante de cultura. Berrin e colaboradores (2000) obtiveram um rendimento de 60 mg/L na produção da endoxilanase de *A. niger* expressa na *P. pastoris* enquanto Chantasingh e colaboradores (2006) obtiveram um rendimento de 238,5 mg/L na produção da endoxilanase de *A. terreus* expressa na *P. pastoris*. Fierens e colaboradores (2004) obtiveram um rendimento de 75 mg/L na produção do inibidor TAXI-I pela *P. pastoris* contra 1,9 mg/L quando produzido pela *E. coli*. Estes resultados demonstram que a expressão do gene *HXYN2* do *H. grisea* na *P. pastoris* para a obtenção de altos níveis de proteínas recombinantes foi realizada de forma eficiente.

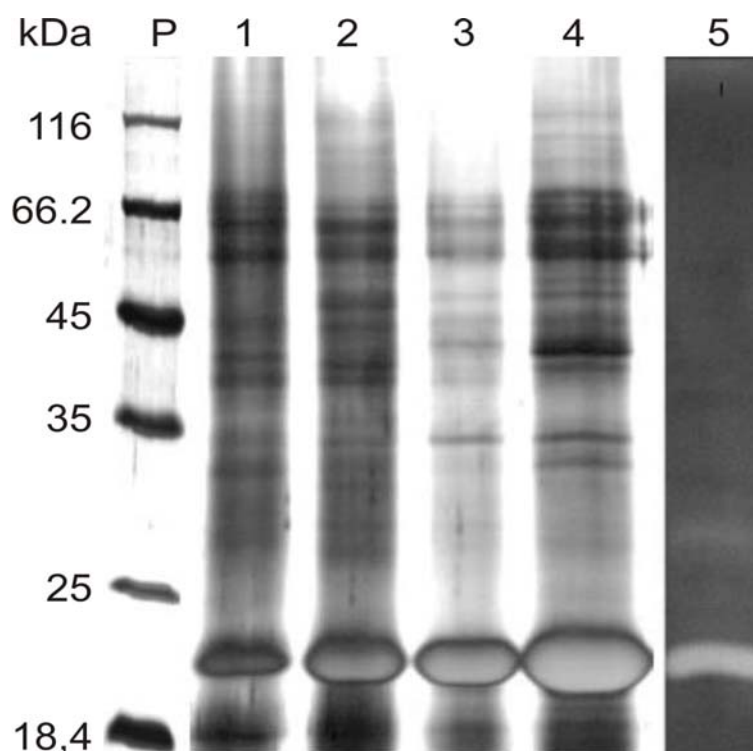


Figura 10. SDS-PAGE e Gel de atividade (13%) do sobrenadante de cultura da produção de HXYN2r em frasco corado com Azul de Coomassie e Vermelho do Congo, respectivamente. P- Marcador de massa molecular; 1- 24h; 2- 48h; 3- 72h; 4- 96h; 5- Gel de atividade do tempo de 96 h. Marcadores de massa molecular: β -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 Bsp98I de *E.coli*: 25,0 kDa; β - lactoglobulina de leite bovino: 18,4 kDa e Lisozima de ovo branco de galinha: 14,4 kDa.

Na Figura 10 observou-se a presença de poucas proteínas totais no sobrenadante de cultura da *P. pastoris* e a presença de uma forte banda protéica após 24 h de indução em metanol, atingindo a intensidade máxima no tempo de 96 h de cultivo. No zimograma observou-se que esta banda correspondeu a uma proteína de mesma massa molecular, estimada em 23 kDa, a qual apresentou atividade contra xilana "oat-spelt". Estes resultados indicam que a banda de 23 kDa observada durante a indução representa a enzima HXYN2r, a qual foi a principal proteína secretada no sobrenadante de cultura pela *P. pastoris*.

Os resultados obtidos demonstram que os processos de produção, processamento pós-traducional e a secreção da enzima HXYN2r foram corretamente realizados pela levedura *P. pastoris*, uma vez que a massa molecular

da HXYN2r é similar a massa da endoxilanase de 23 kDa produzida pelo fungo *H. grisea* (Carvalho, 2003).

4.1.3. Purificação da HXYN2r

Inicialmente o sobrenadante de cultura produzido pela *P. pastoris* foi dialisado e liofilizado, perdendo nestes dois processos, aproximadamente 60% da atividade inicial. Diversos protocolos de diálise, utilizando diferentes tampões e valores de pH foram estudados e o que apresentou o melhor resultado foi dialisando contra o tampão Tris-HCl pH 7,0 por 24 h a 4°C. Shi e colaboradores (2003) não observaram atividade de scFv (anticorpo) após diálise a 4°C, devido a ação de proteases liberadas pela levedura *P. pastoris*, o que pode sugerir que o baixo rendimento obtido na etapa de diálise no presente trabalho pode ter sido em função da ação de proteases presentes no sobrenadante de cultura.

Para a purificação da HXYN2r, o EHXYN2r (3.5.11.1) foi aplicado na resina cromatográfica "Sephacryl" S-100 e o cromatograma correspondente é apresentado na Figura 11.

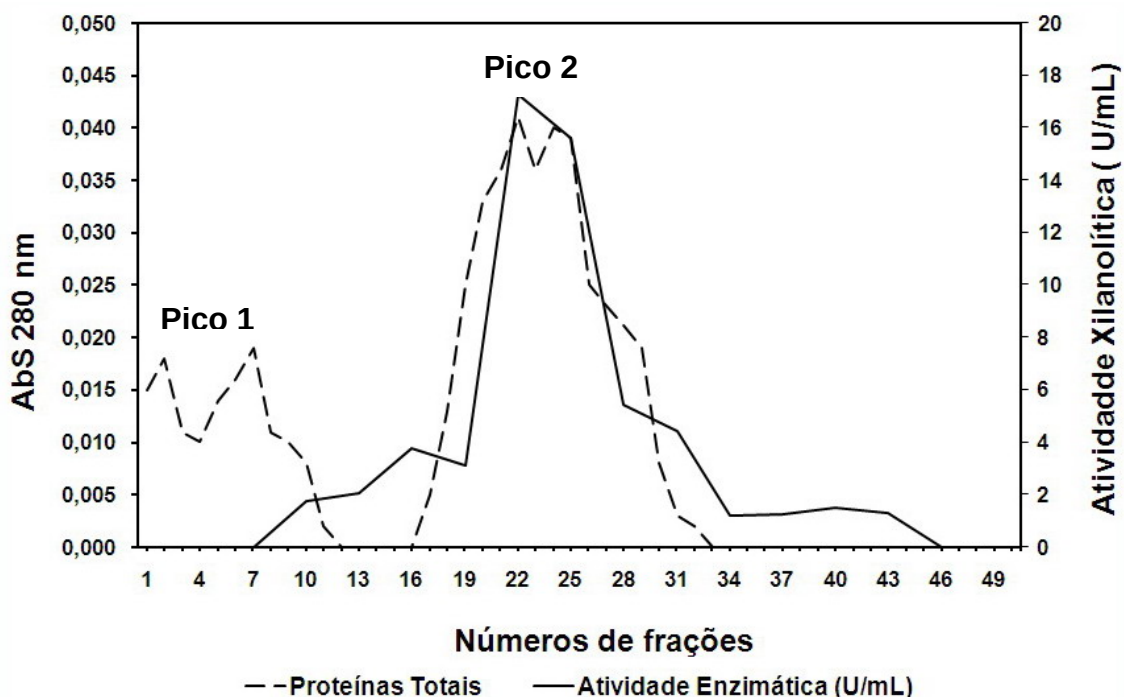


Figura 11. Perfil da cromatografia do EHXYN2r, eluído da coluna de gel filtração Sephacryl S-100. $V_0 \sim 80$ mL e fluxo de 30 mL/h.

O perfil cromatográfico das frações eluídas da coluna de filtração em gel "Sephacryl S-100™" do EHXYN2r mostrou a presença de dois principais picos de proteínas, sendo o maior deles coincidente com o único pico de atividade xilanolítica, sugerindo que as proteínas presentes no Pico 2 correspondem em sua maioria à HXYN2r. Com o objetivo de verificar se ocorreu a purificação da HXYN2r, as frações correspondentes ao pico de atividade foram reunidas em grupos e aplicadas em gel desnaturante de poliacrilamida (3.5.8) como apresentado na Figura 12.

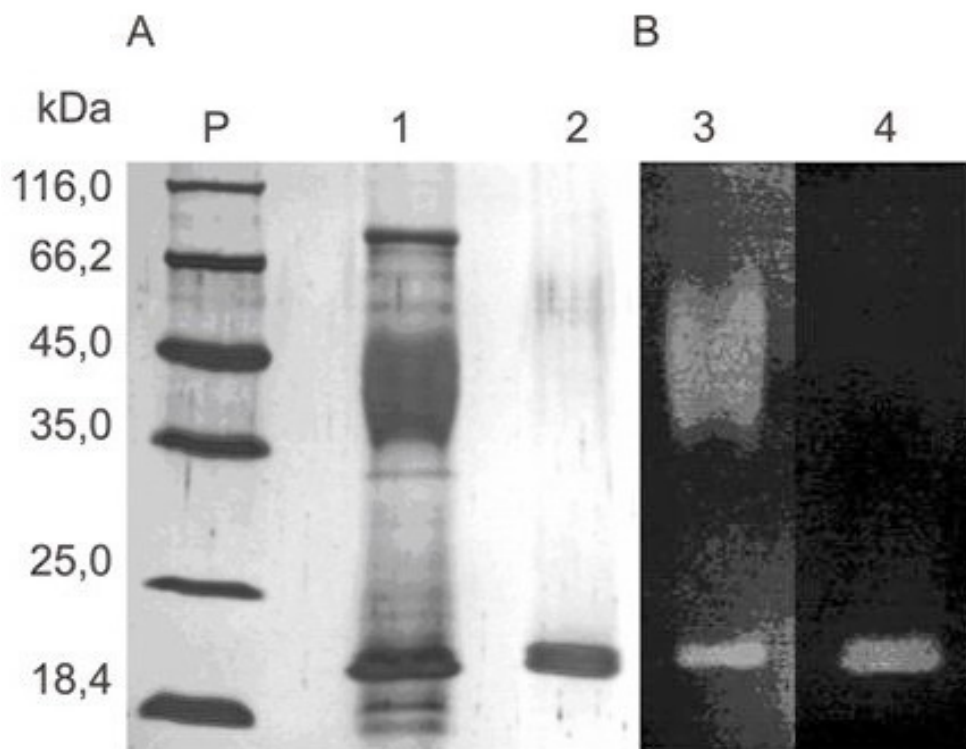


Figura 12. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE (13%) corado com nitrato de prata. **A.** Perfil de proteínas secretadas pela levedura *P. pastoris* sob indução com metanol. P- Marcador de Massa Molecular; 1- Sobrenadante de cultura da *P. pastoris* coletado no tempo de 96 h e 2- Frações 22 a 25 eluídas da cromatografia. **B.** Zimograma. 3- Sobrenadante de cultura da *P. pastoris* coletado no tempo de 96 h e 4- Frações 22 a 25 da cromatografia.

Pela análise da Figura 12A, observou-se que ocorreu um eficiente fracionamento das proteínas eluídas da resina "Sephacryl S-100" e verificou-se a purificação de uma proteína de massa molecular estimada em 23 kDa. No Zimograma correspondente (Figura 12B), observou-se que esta banda de 23 kDa corresponde a uma proteína com atividade xilanolítica, confirmando portanto, a purificação da HXYN2r. Berrin e colaboradores (2000) purificaram uma

endoxilanase de 19,893 kDa de *A. niger* expressa em *P. pastoris* e Damaso e colaboradores (2003) purificaram uma endoxilanase de 26,9 kDa de *T. lanuginosus* expressa em *P. pastoris*, ambos utilizando um único passo de purificação, por gel filtração.

A purificação da endoxilanase de 23 kDa do fungo *H. grisea* foi obtida por Carvalho (2003) após duas etapas cromatográficas (Q-Sepharose e Sephacryl S-100). Esta mesma proteína foi purificada por Monti e colaboradores (1991) também após duas etapas cromatográficas, utilizando a DEAE-celulose seguida pela Sephadex G-200. O processo foi mais trabalhoso devido à baixa produção de endoxilanas em relação às proteínas totais secretadas por este fungo.

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 poucas proteínas endógenas enquanto a proteína heteróloga é predominante no meio de cultura (Cereghino & Cregg, 2000). Esta afirmação está de acordo com o resultado obtido no experimento de indução por 96 h, uma vez que a enzima HXYN2r representou 37% das proteínas totais secretadas pela levedura. A secreção de proteínas pela levedura *P. pastoris* 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. Damaso e colaboradores (2003) e Cheng e colaboradores (2005) analisaram a produção pela *P. pastoris* das xilanases de *T. lanuginosus* e *T. fusca* após indução com metanol e observaram que a quantidade de proteínas secretadas pela levedura era menor do que o 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.

Um resumo das etapas envolvidas no processo de purificação da enzima HXYN2r é apresentado na Tabela 14.

Tabela 14. Etapas do protocolo de purificação da enzima HXYN2r

Etapas	Proteínas Totais (mg)	Atividade Total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
Filtrado de Cultura	4,97	9.930,0	1.998,0	1,0	100,0
Diálise	3,10	7.322,4	2.362,1	1,2	73,7
Liofilização	2,85	3.935,2	1.380,8	0,7	39,6
Gel Filtração	0,28	635,8	2.270,7	1,1	6,4

Após a diálise e liofilização, a HXYN2r foi purificada por gel filtração, obtendo um rendimento final de 6,4%, com um fator de purificação de 1,1 vezes. A HXYN2 selvagem produzida pelo *H. grisea* foi purificada por Carvalho (2003), com um fator de purificação maior, de 12,2 vezes, porém com um rendimento menor, de 4,4%, e também por Monti e colaboradores (1991), com um fator de purificação de 18,7 vezes, porém com um rendimento inferior, de apenas 2,3%.

O fator de purificação de 1,1 vezes obtido neste trabalho é inferior ao obtido por Berrin e colaboradores (2000) quando purificaram uma endoxilanase de 19,893 kDa de *A. niger* expressa em *P. pastoris*, que foi de 2,7 vezes e ao obtido por Deng e colaboradores (2006), que foi de 3,8 vezes para a endoxilanase de 21 kDa de *A. niger* expressa em *P. pastoris* e de 6,9 vezes obtido por Cheng e colaboradores (2005) que purificaram a endoxilanase de 36 kDa de *T. fusca* expressa em *P. pastoris*.

O rendimento obtido na purificação da enzima HXYN2r no presente trabalho foi de 6,4%, superior ao obtido para a HXYN2 selvagem, que foi de 4,4% (Carvalho, 2003) e inferior ao de Berrin e colaboradores (2000) que purificaram uma endoxilanase de 19,893 kDa de *A. niger* expressa em *P. pastoris* com um rendimento de 21,5% e ao de Cheng e colaboradores (2005) que purificaram a endoxilanase de 36 kDa de *T. fusca* expressa em *P. pastoris* com um rendimento de 23%.

4.1.4. Caracterização Bioquímica da Endoxilanase HXYN2r Purificada

Com o objetivo de conhecer melhor a endoxilanase HXYN2r, a enzima recombinante purificada foi caracterizada quanto a massa molecular, pH e temperatura ótimos e estabilidade em diferentes faixas de pH e temperatura. Com o objetivo de definir as condições de temperatura e pH que poderiam ser utilizadas nas reações de hidrólise enzimática a enzima HXYN2r presente no sobrenadante de cultura (PpHXYN2r) foi também caracterizada.

4.1.4.1. Determinação da Massa Molecular da HXYN2r Purificada

A massa molecular da enzima HXYN2r purificada foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida (3.5.8). O valor da massa molecular dos padrões utilizados no gel em função de sua mobilidade foi plotada em um gráfico juntamente com a mobilidade da proteína correspondente à HXYN2r para se estimar sua massa molecular (Figura 13).

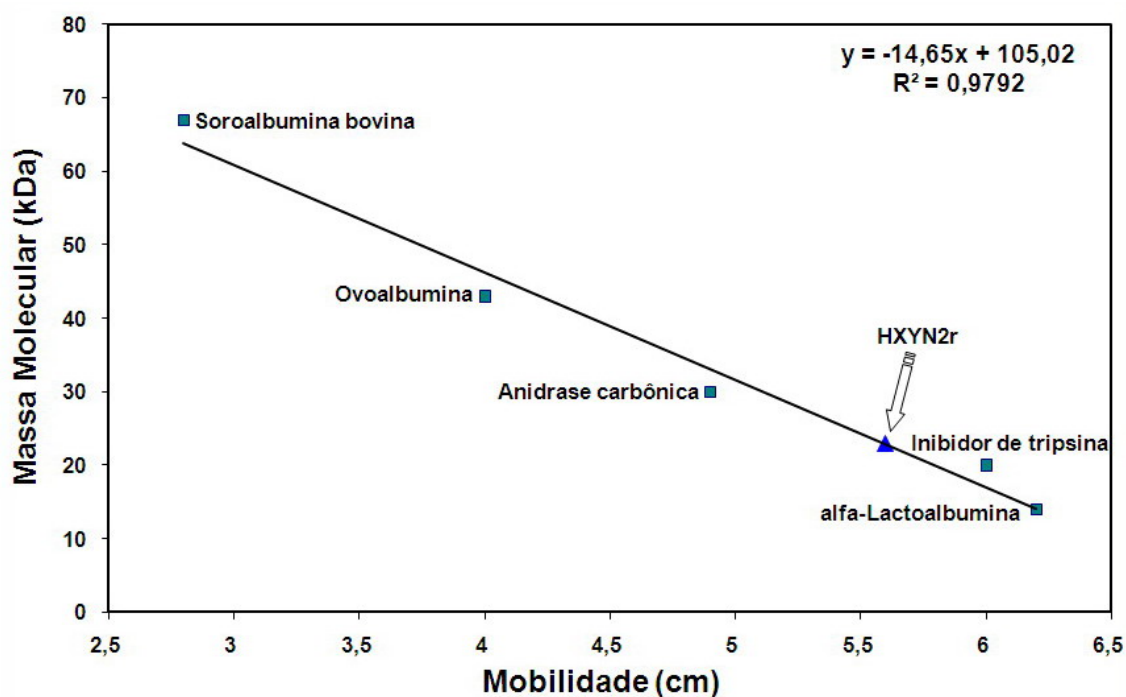


Figura 13. Determinação da massa molecular da HXYN2r pura, por SDS-PAGE com o uso de marcadores de massa molecular, por meio de regressão linear. Marcadores de massa molecular: 1) α -Lactoalbumina – 14,2 kDa; 2) Inibidor de tripsina – 20,1 kDa; 3) Anidrase carbônica - 30,0 kDa; 4) Ovalbumina – 43,0 kDa; 5) Soroalbumina bovina – 67,0 kDa.

Pela análise da Figura 13 confirmou-se que a HXYN2r tem massa molecular estimada de 23 kDa, assim como a HXYN2 selvagem produzida pelo *H. grisea*, purificada por Monti e colaboradores (1991) e por Carvalho (2003), demonstrando ser a mesma proteína.

4.1.4.2. Efeito do pH na Atividade da HXYN2r

A influência do pH sobre a atividade da HXYN2r purificada foi analisada na faixa de pH 3 a 11 e a atividade xilanólica relativa é apresentada na Figura 14.

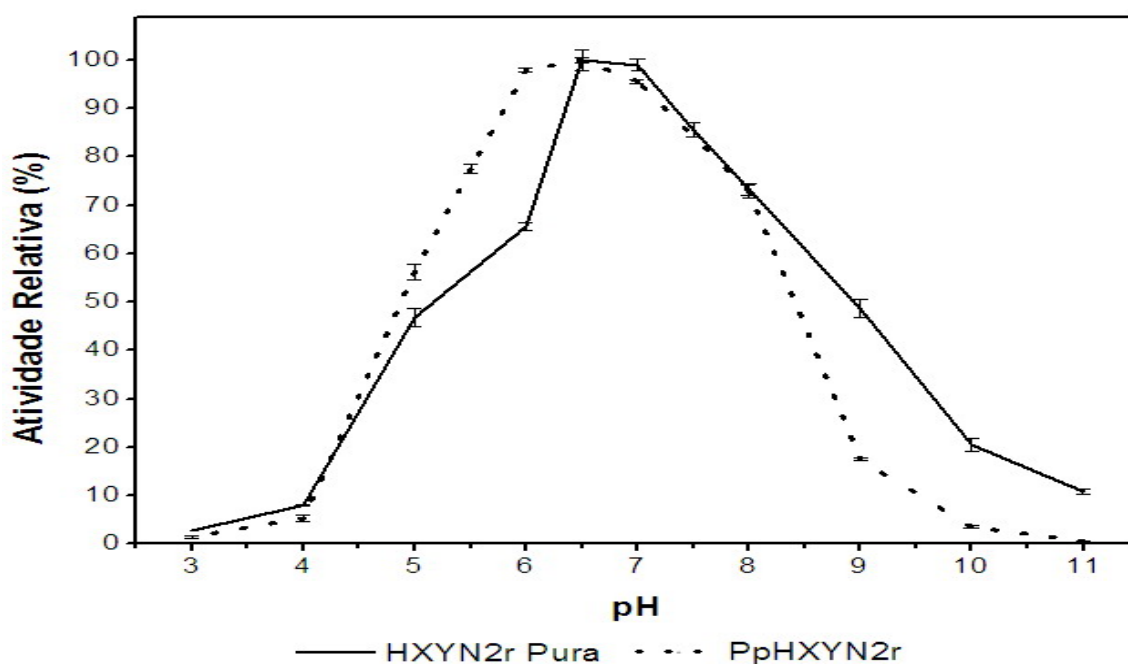


Figura 14. Efeito do pH sobre a atividade da HXYN2r purificada por gel filtração e na PpHXYN2r, produzida pela *P. pastoris* em meio BMMY-U a 30°C e 150 rpm.

Observou-se que a enzima HXYN2r purificada apresentou atividade xilanólica em toda a faixa de pH estudada (3 a 11), sendo que na faixa de pH 5 a 9 obteve-se os melhores resultados, apresentando um pH ótimo de 6,5, o qual difere daquele encontrado para a endoxilanase de 23 kDa do *H. grisea*, que foi de 5,5. A xilanase de 23 kDa também apresentou boa atividade xilanólica na faixa de pH 5 a 9 (Carvalho, 2003; Monti *et al.*, 1991).

A endoxilanase de *A. niger* produzida pela *P. pastoris* apresentou pH ótimo de 5,0 (Deng *et al.*, 2006), a de *Cellulomonas sp.* produzida pela *E. coli*, de 5,0 (Chaudhary & Deobagkar, 1997), a de *T. fusca* produzida pela *P. pastoris*, de 6,0

(Sun *et al.*, 2007) e a de *T. fusca* produzida pela *P. pastoris* apresentou pH ótimo de 7,0 (Cheng *et al.*, 2005).

4.1.4.3. Efeito da Temperatura na Atividade da HXYN2r

A influência da temperatura sobre a atividade da HXYN2r purificada foi analisada na faixa de 20 a 100°C e a atividade xilanolítica relativa é apresentada na Figura 15.

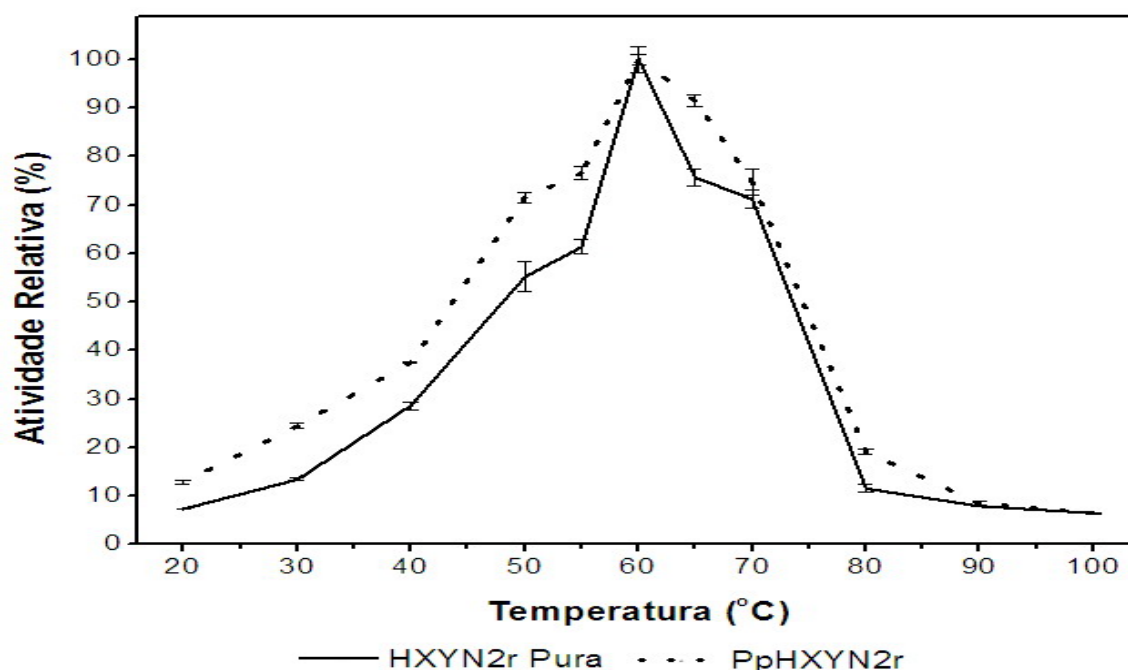


Figura 15. Efeito da temperatura sobre a atividade da HXYN2r purificada por gel filtração e no sobrenadante de cultura, produzida pela *P. pastoris* em meio BMMY-U a 30°C e 150 rpm.

Observou-se maior atividade xilanolítica na faixa de temperatura de 50 a 75°C para a HXYN2r purificada, apresentando temperatura ótima de 60°C. Este valor é próximo ao obtido para a endoxilanase de 23 kDa do *H. grisea*, que apresentou temperatura ótima de 65°C (Carvalho, 2003) e de 70°C (Monti *et al.*, 1991).

A endoxilanase de *Cellulomonas sp.* produzida pela *E. coli* apresentou temperatura ótima de 55°C (Chaudhary & Deobagkar, 1997), a de *T. fusca* produzida pela *P. pastoris* apresentou uma temperatura ótima de 70°C

(Cheng *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2007), enquanto que para a de *T. lanuginosus* produzida pela *P. pastoris*, foi de 75°C (Damaso *et al.*, 2003).

4.1.4.4. Efeito do pH na Estabilidade da HXYN2r

O efeito do pH na estabilidade da HXYN2r purificada foi analisado incubando a enzima por 4 h nos valores de pH 5,5, 6,5 e 7,5. A atividade xilanolítica relativa é apresentada na Figura 16.

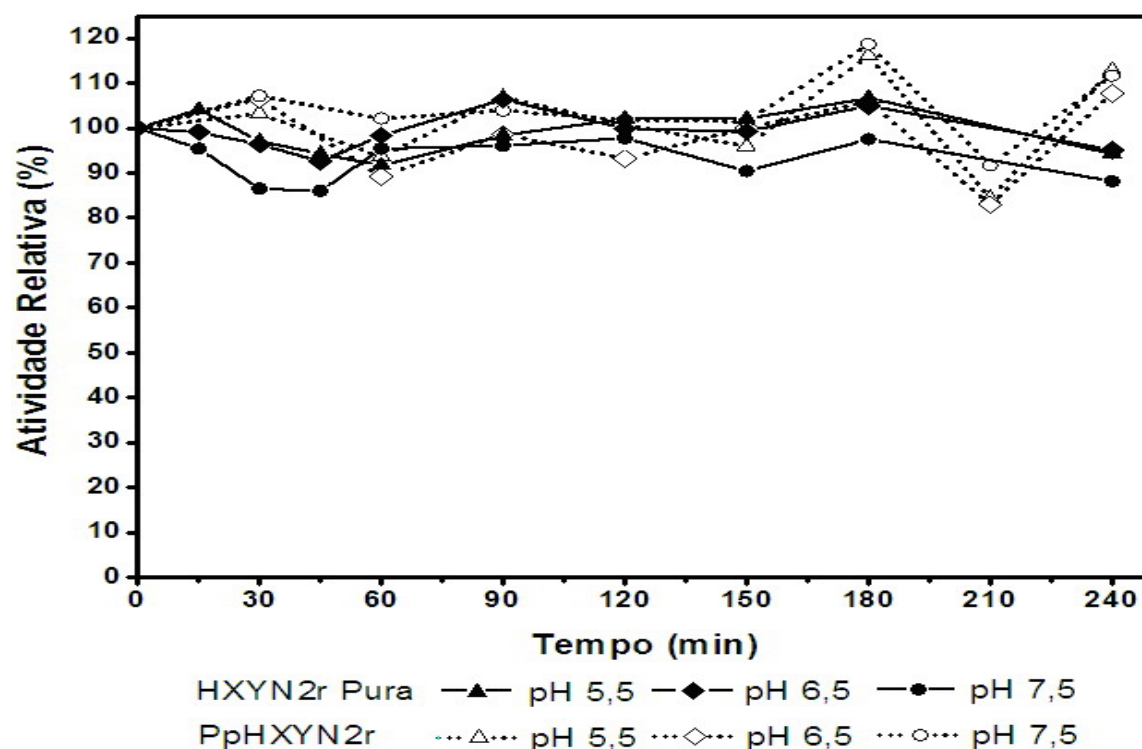


Figura 16. Efeito do pH na estabilidade da HXYN2r purificada por gel filtração e no sobrenadante de cultura, produzida pela *P. pastoris* em meio BMMY-U a 30°C e 150 rpm.

Na faixa de pH estudada, a enzima HXYN2r apresentou praticamente 100% de recuperação da atividade xilanolítica após 4 h de incubação, demonstrando sua alta estabilidade para aplicações industriais. Este resultado é similar ao obtido para a endoxilanase de 23 kDa do *H. grisea*, (Carvalho, 2003), a qual também apresentou ótima estabilidade na faixa de pH 5 a 6. Sun e colaboradores (2007) obtiveram uma recuperação da atividade xilanolítica acima de 80% após 1 h de incubação da enzima na faixa de pH 5 a 9 e Deng e colaboradores (2006)

obtiveram uma recuperação acima de 90% após 30 min de incubação na faixa de pH 4 a 5.

4.1.4.5. Efeito da Temperatura na Estabilidade da HXYN2r

O efeito da temperatura na estabilidade da HXYN2r foi determinado por vários períodos de tempo, em diferentes temperaturas. A atividade xilanolítica relativa é apresentada na Figura 17.

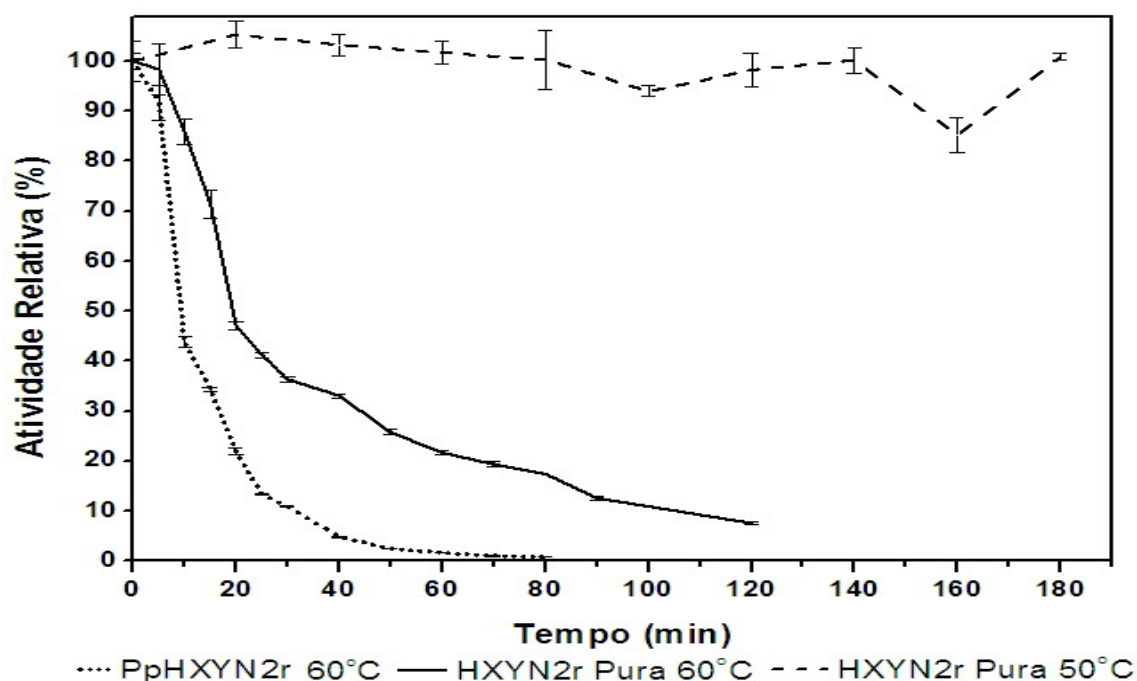


Figura 17. Efeito da temperatura na estabilidade da HXYN2r purificada por gel filtração e no sobrenadante de cultura, produzida pela *P. pastoris* em meio BMMY-U a 30°C e 150 rpm.

A enzima HXYN2r apresentou um tempo de meia-vida de 20 min na temperatura ótima (60°C) e uma excelente estabilidade a 50°C, com um tempo de meia-vida acima de 3 h. O tempo de meia-vida na temperatura ótima, da HXYN2r foi similar ao obtido para a endoxilanase de 23 kDa purificada por Carvalho (2003), que apresentou um tempo de meia-vida de 23 min na temperatura ótima (65°C).

Há vários fatores estruturais que podem conferir esta termoestabilidade às endoxilanasas termofílicas, como interações hidrofóbicas (Connerton *et al.*, 1999), oligomerização devido à exposição dos resíduos aromáticos a solventes

(Harris *et al.*, 1997) e pontes dissulfeto (Wakarchuk *et al.*, 1994). Embora a sequência do perfil hidrofóbico da HXYN2 seja similar às endoxilanases mesofílicas e termofílicas, verificou-se que esta proteína não contém pontes dissulfeto. Entretanto a enzima HXYN2 apresenta alto número de ligações iônicas entre os resíduos e um grande número de resíduos hidrofóbicos na superfície da proteína que podem ajudar na formação de oligômeros (Freitas *et al.*, 2003). A termoestabilidade de uma endoxilanase de *Bacillus* D3 foi explicada pela oligomerização da proteína devido a contatos hidrofóbicos entre os resíduos aromáticos expostos (Harris *et al.*, 1997).

Damaso e colaboradores (2003) também obtiveram uma maior termoestabilidade para a endoxilanase recombinante na sua forma pura, do que no sobrenadante de cultura e a enzima reteve 60% da atividade após 40 min a 80°C e após 80 min na temperatura ótima (70°C), enquanto que no meio de cultura a enzima perdeu 95% da atividade inicial após 40 min de incubação nestas temperaturas. Cheng e colaboradores (2005) obtiveram uma recuperação da atividade de aproximadamente 70% após 3 h de incubação na temperatura ótima (70°C) e praticamente 100% de recuperação após 3 h a 60°C. A endoxilanase purificada por Chaudhary e colaboradores (1997) foi inativada a 60°C após 15 min de incubação e a purificada por Deng e colaboradores (2006) apresentou aproximadamente 90% de recuperação da atividade na temperatura ótima (50°C) e 100% de recuperação a 40°C, após incubação por 30 min.

4.1.4.6. Determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$

A velocidade de reação da HXYN2r purificada foi determinada em função da concentração do substrato (3.5.12.5) nas condições ótimas de pH e temperatura. Os valores das constantes cinéticas da HXYN2r purificada foram determinados e estão demonstrados na Figura 18.

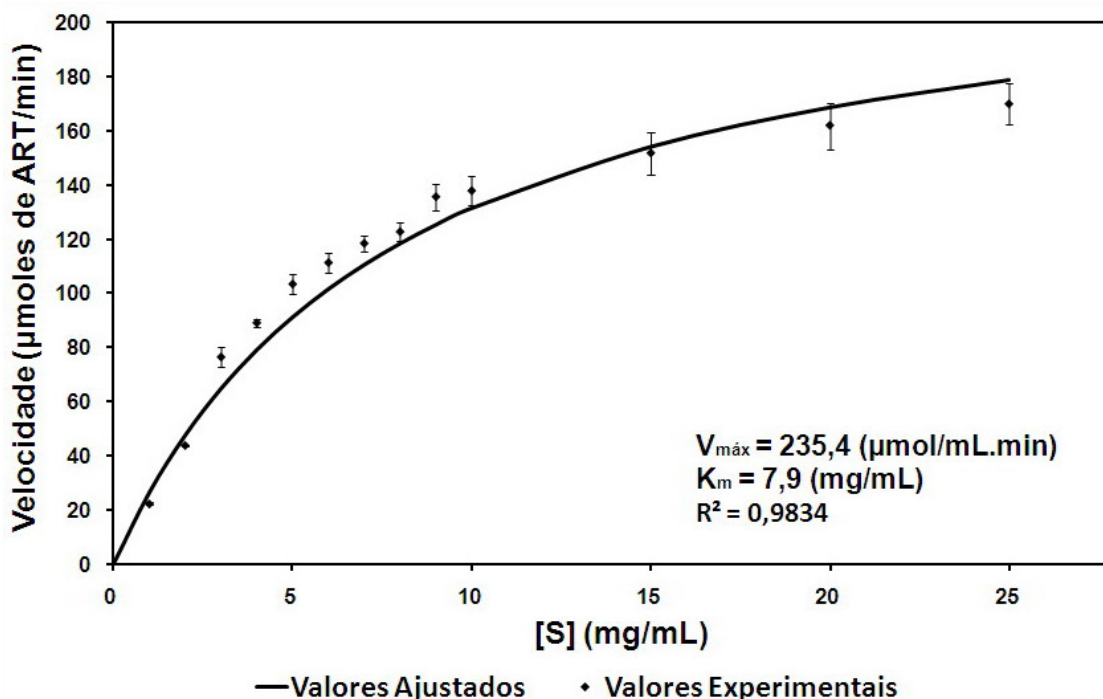


Figura 18. Efeito da concentração de xilana “oat-spelt” na velocidade da reação da HXYN2r purificada por gel filtração, produzida pela *P. pastoris* em meio BMMY-U a 30°C e 150 rpm.

A HXYN2r purificada apresentou os valores de 7,9 mg/mL e 235,4 $\mu\text{mol}/(\text{min.mL})$ para k_m e $V_{\text{máx}}$, respectivamente. Os resultados obtidos para a HXYN2 selvagem purificada por Carvalho (2003) foram de 4,38 mg/mL e 3,32 $\mu\text{mol}/(\text{min.mL})$ para o K_m e $V_{\text{máx}}$, respectivamente, sendo este resultado de K_m próximo ao obtido por Monti e colaboradores (1991), de 3,3 mg/mL.

O valor de K_m da HXYN2r purificada é próximo ao obtido para a endoxilanase recombinante de *T. fusca* expressa em *P. pastoris*, de 2,45 mg/mL (Sun *et al.*, 2007) e ao da endoxilanase de *Cellulomonas sp.* expressa em *E. coli*, de 3,0 (Chaudhary *et al.*, 1997), e inferior ao obtido para a endoxilanase de *A. niger* expressa em *P. pastoris* por Berrin e colaboradores (2000), que foi de 12,6 mg/mL.

4.1.4.7. Efeito de Íons, Açúcares e Agentes Desnaturantes

A HXYN2r purificada foi incubada na presença de diversos íons, açúcares e agentes desnaturantes e a atividade xilanolítica residual foi medida. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 19.

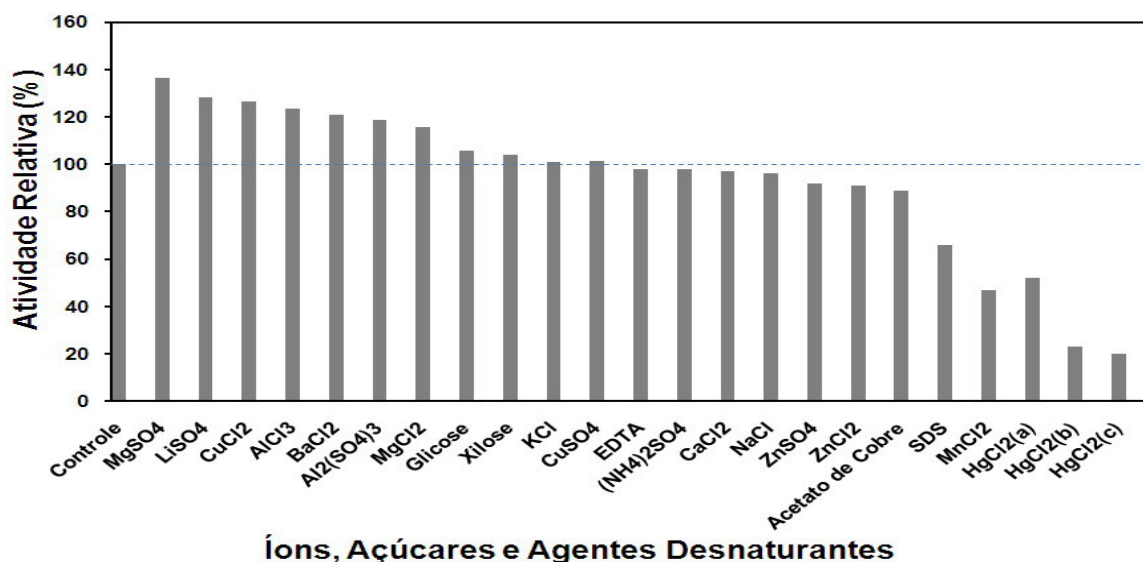


Figura 19. Efeito de íons, açúcares e agentes desnaturantes na atividade enzimática da HXYN2r purificada por gel filtração, produzida pela *P. pastoris* em meio BMMY-U a 30°C e 150 rpm. a) 2 mM de HgCl₂; b) 5 mM de HgCl₂; c) 10 mM de HgCl₂.

A atividade da HXYN2r foi aumentada pela presença de MgSO₄, LiSO₄, CuCl₂, AlCl₃, BaCl₂, Al₂(SO₄)₃ e MgCl₂, com um aumento médio entre 20 e 40%, e reprimida por SDS, MnCl₂ e HgCl₂ (1 a 10 mM), com uma perda máxima de 80% da atividade. Observa-se que, quando se incubou a enzima na presença dos íons SO₄⁻² geralmente ocorreu um aumento na atividade, ocorrendo uma inibição apenas quando se utilizou o ZnSO₄, sugerindo que esta inibição foi em função da presença do íon Zn⁺. Os íons Cl⁻ em geral aumentaram a atividade da HXYN2r, sugerindo que a inibição causada pelo MnCl₂ e pelo HgCl₂ ocorreu em função dos íons Mn⁺² e Hg⁺². Tem sido sugerido que o íon Mn⁺² pode interagir com alguns resíduos de aminoácidos no sítio ativo, o qual pode sofrer algumas mudanças e até mesmo inativar a enzima (Javier *et al.*, 1998).

A endoxilanase de *Cellulomonas sp.* expressa em *E. coli* no trabalho de Chaudhary & Deobagkar (1997) não apresentou perda de atividade na presença de EDTA e foi totalmente inibida pela presença de 5 mM de íons Hg²⁺. Além disso, 5 mM de ZnCl₂ inibiu 13% da atividade da enzima e os íons CaCl₂, KCl, MgCl₂ e MnSO₄ não exerceram efeito sobre a atividade da enzima. A endoxilanase purificada por Deng e colaboradores (2006) foi mais fortemente inibida por íons cobre, perdendo 74% de sua atividade, enquanto manganês e cálcio estimularam a atividade da enzima em 16 e 17%, respectivamente.

➤ **Características Bioquímicas da PpHXYN2r:**

A PpHXYN2r apresentou as seguintes características, como demonstrado nas Figuras 14 a 17 anteriores:

- pH ótimo de 6,5, com maior atividade na faixa de pH 5,0 a 8,5;
- 100% de recuperação da atividade após 4 h de incubação em pH 5,5, 6,5 e 7,5;
- Temperatura ótima de 60°C, com maior atividade na faixa de temperatura de 45 a 75°C;
- Tempo de meia-vida de 9 min a 60°C.

4.2. Aplicação de Enzimas do Fungo *H. grisea* para a Sacarificação de Substratos Lignocelulósicos

Para a realização do experimento de sacarificação, inicialmente foi realizada a produção de enzimas pelo fungo termofílico *H. grisea* var. *thermoidea*. Posteriormente, realizou-se testes de hidrólise enzimática dos substratos hemicelulósicos, utilizando a HXYN2r e o complexo enzimático do *H. grisea* utilizando os substratos moídos, sem pré-tratamento e com pré-tratamento ácido.

4.2.1. Produção e Caracterização de Enzimas do Fungo *H. grisea*

4.2.1.1. Produção de Enzimas Xilanolíticas e Celulolíticas

A produção de enzimas pelo fungo *H. grisea*, entre elas, as enzimas xilanolíticas e celulolíticas, foi obtida pelo cultivo do fungo em meio mínimo acrescido de BCA nas concentrações finais de 1 a 5% por 168 h (3.5.13.1), com o objetivo de escolher a melhor concentração de BCA para a produção das enzimas xilanolíticas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Atividade xilanolítica em função da concentração de BCA

Concentração de BCA (%)	Atividade Xilanolítica (U/mL)
1,0	11,6
1,5	13,4
2,0	15,9
3,0	23,0
4,0	25,1
5,0	27,5

Observou-se que a concentração de 5% de BCA foi a que proporcionou a maior produção de enzimas xilanolíticas (23, 25 e 34 kDa – Carvalho, 2003) pelo *H. grisea*, entretanto, o BCA libera altas quantidades de pigmento do tipo melanina (Jacobson, 2000) no meio de cultura e, quanto maior a concentração de BCA utilizada, maior a liberação deste pigmento, o qual interfere nas análises de DNS e no preparo da amostra para aplicação em SDS-PAGE. Observou-se também que um aumento na concentração de BCA de 1,0 para 3,0% provocou um aumento significativo na atividade xilanolítica (198,3%), enquanto que a partir de 3,0% o aumento observado foi menor (19,6%). Baseado nos resultados obtidos optou-se por utilizar a concentração de 3% de BCA para a produção de enzimas pelo *H. grisea*, uma vez que nesta concentração obtém-se uma alta atividade xilanolítica e a pigmentação do meio de cultura não é tão intensa.

Diversos autores relataram a produção de enzimas xilanolíticas com valores próximos aos obtidos pelo *H. grisea* neste trabalho. Kholi e colaboradores (2001) obtiveram uma produção de 18 U/mL com o *Thermoactinomyces thalophilus* enquanto Maheswari & Chandra (2000) obtiveram 22 U/mL com o *Streptomyces cuspidosporous*. Já Antanopoulus e colaboradores (2001) e Beg e colaboradores (2000), obtiveram atividades de 12 U/mL com o *Streptomyces albus* e 7,5 U/mL com o *Streptomyces sp.*, respectivamente.

Após a definição da concentração de BCA ideal para a indução da produção de enzimas xilanolíticas pelo fungo *H. grisea*, foi realizada a cinética de produção de celulases e endoxilanases na presença de 3% de BCA. Os resultados são apresentados na Figura 20.

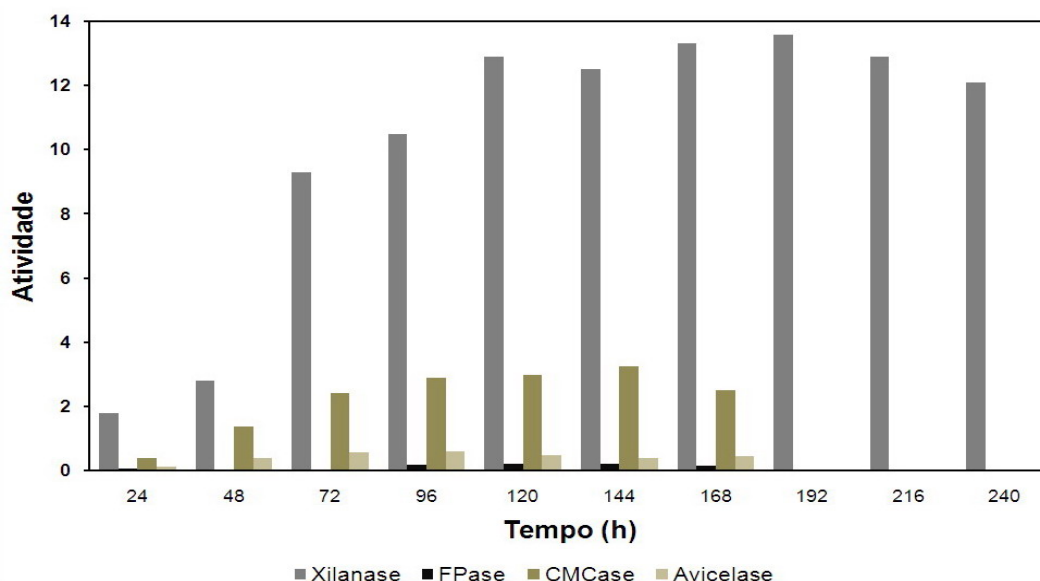


Figura 20. Cinética da produção de endoxilanases e celulasas pelo fungo *H. grisea* crescido em MM adicionado de 3% de BCA, a 42°C e 120 rpm.

Observou-se que a partir de 24 h de cultivo foi detectada atividade xilanolítica no sobrenadante de cultura do *H. grisea*, sendo que no tempo de 120 h obteve-se uma alta atividade (13,5 U/mL), a qual manteve-se praticamente constante após este período. A máxima atividade de FPase (0,207 FPU/mL) e Avicelase (0,593 U/mL) foi detectada após 96 h de cultivo enquanto que a de CMCase (3,253 U/mL) foi obtida após 144 h.

Diversos trabalhos relataram a baixa atividade em papel de filtro justificando este fato pela dificuldade de acesso das enzimas ao substrato, uma vez que a área superficial é muito menor que a dos demais substratos utilizados. Por outro lado, o CMC tem uma grande solubilidade, favorecendo o incremento da atividade celulolítica. De Castro e colaboradores (2007) observaram atividade de FPase de 0,028 U/mL e CMCase de 0,32 U/mL para *A. niger* cultivado na presença de BCA. Silva & Brandellu (2007) obtiveram atividades de FPase de 0,04 UI/mL e CMCase de 0,4 UI/mL para o *A. phoenics* na presença de resíduo de uva como fonte de carbono. Adsul e colaboradores (2004) obtiveram atividades de FPase de 0,28 FPU/mL e CMCase de 4,2 U/mL com o *T. viride* e FPase de 0,27 FPU/mL e CMCase de 5,7 U/mL com o *Penicillium janthinellum*, utilizando BCA como fonte de carbono. Oliveira (2008) obteve uma atividade de avicelase de 0,19 U/mL com o *H. grisea*, utilizando 1% de BCA e Martins e colaboradores (2007) obtiveram uma produção de 0,10 U/mL de avicelase com o fungo *Penicillium echinulatum* cultivado na presença de 0,5% de farinha de trigo.

O complexo enzimático produzido pelo fungo *H. grisea* cultivado na presença 3% de BCA por 120 h foi utilizado nos experimentos de hidrólise enzimática.

Entretanto, para sua melhor aplicação, foi realizada a caracterização bioquímica das endoxilanases.

4.2.1.2. Caracterização Bioquímica das Endoxilanases do Fungo *H. grisea* para a Hidrólise Enzimática

A influência do pH sobre a atividade das enzimas xilanolíticas do *H. grisea* foi analisada na faixa de pH de 3 a 11 e a influência da temperatura foi analisada na faixa de 20 a 100°C e a atividade xilanolítica relativa é apresentada nas Figuras 21 e 22 , respectivamente.

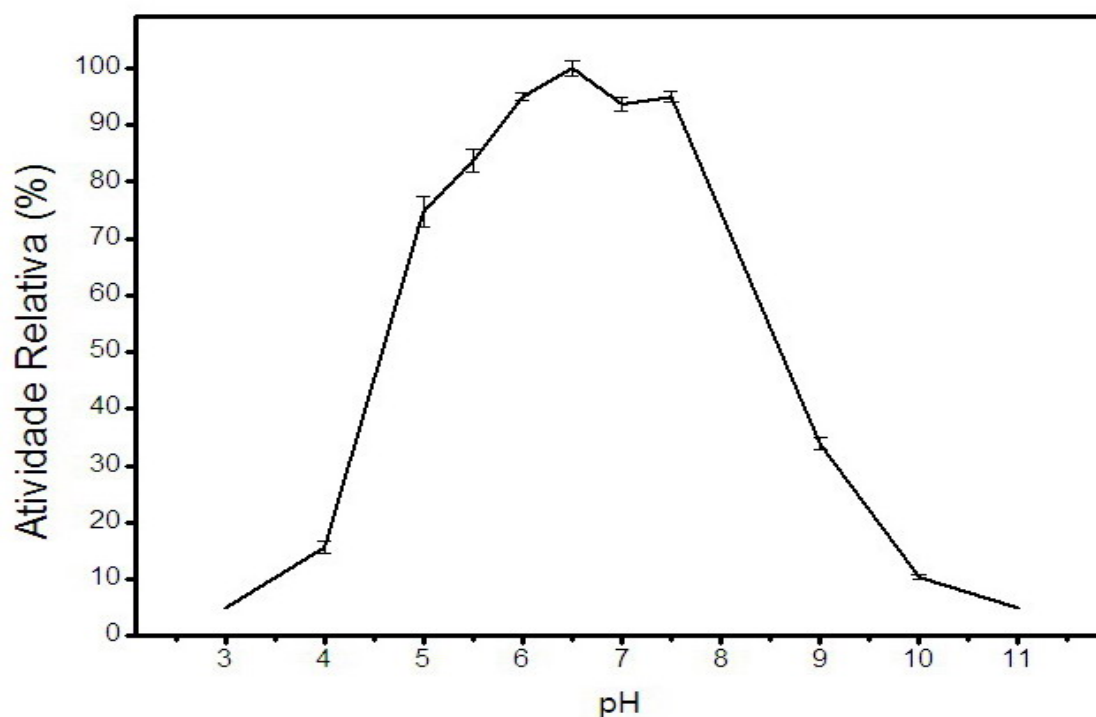


Figura 21. Efeito do pH sobre a atividade das endoxilanases totais do fungo *H. grisea* cultivado em MM a 42°C e 120 rpm.

As enzimas xilanolíticas do fungo *H. grisea* apresentaram atividade xilanolítica em toda a faixa de pH estudada, apresentando maior atividade na faixa de pH 5 a 8, com o pH ótimo de 6,5, similar aos encontrados para outras endoxilanases microbianas (Dekker & Richard, 1976; Wong *et al.*, 1988), porém diferente daquele obtido para a HXYN2 purificada do *H. grisea*, que foi de 5,5 (Carvalho, 2003). Resultado próximo foi obtido para a endoxilanase produzida

por *T. fusca* que apresentou pH ótimo de 6,0 (Sun *et al.*, 2006), assim como a endoxilanase produzida por *P. cucumerina* (Ma & Zhang, 2007).

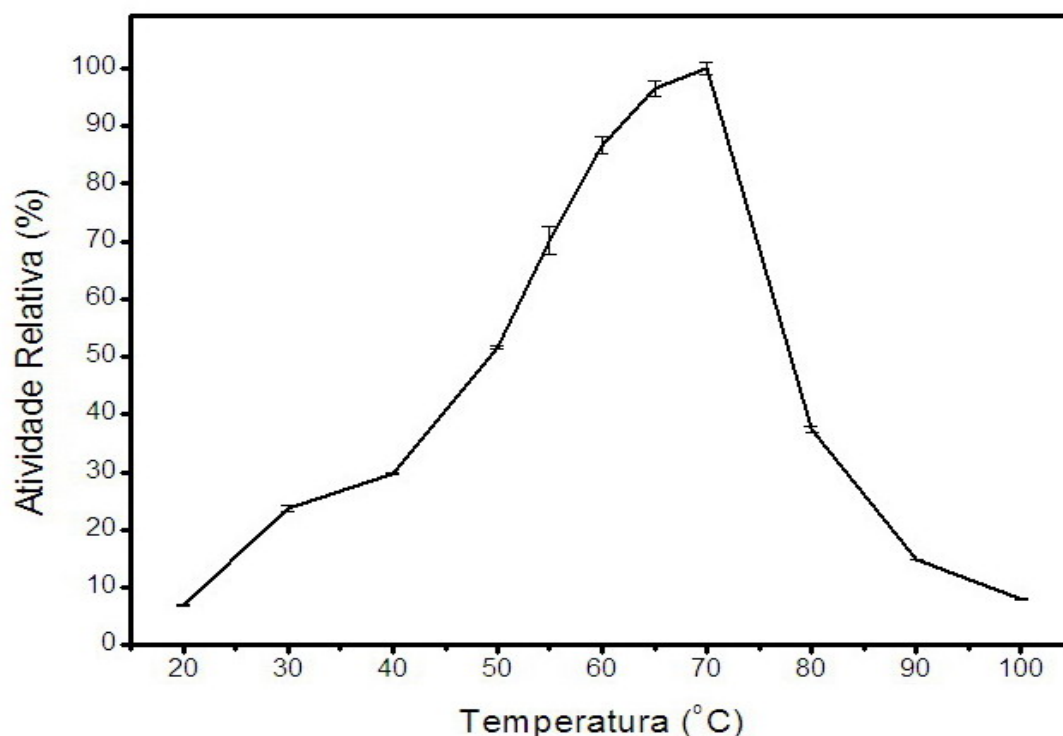


Figura 22. Efeito da temperatura sobre a atividade das endoxilanases totais do fungo *H. grisea* cultivado em MM a 42°C e 120 rpm.

As enzimas xilanolíticas produzidas pelo fungo *H. grisea* apresentaram maior atividade xilanolítica na faixa de 50 a 75°C, observando-se uma acentuada queda a partir de 70°C. A temperatura ótima foi de 70°C, resultado próximo ao obtido para a HXYN2 purificada (Carvalho, 2003), que apresentou temperatura ótima de 65°C e idêntico ao obtido para a mesma enzima purificada por Monti e colaboradores (1991). Jiang e colaboradores (2005) purificaram uma endoxilanase produzida pelo *T. lanuginosus* que apresentou temperatura ótima de 75°C. Sun e colaboradores (2006) obtiveram uma temperatura ótima de 60°C para a endoxilanase produzida por *T. fusca*.

O efeito do pH na estabilidade das enzimas xilanolíticas do *H. grisea* foi analisado por 4 h nos valores de pH 5,5, 6,5 e 7,5 e a atividade xilanolítica relativa é apresentado na Figura 23.

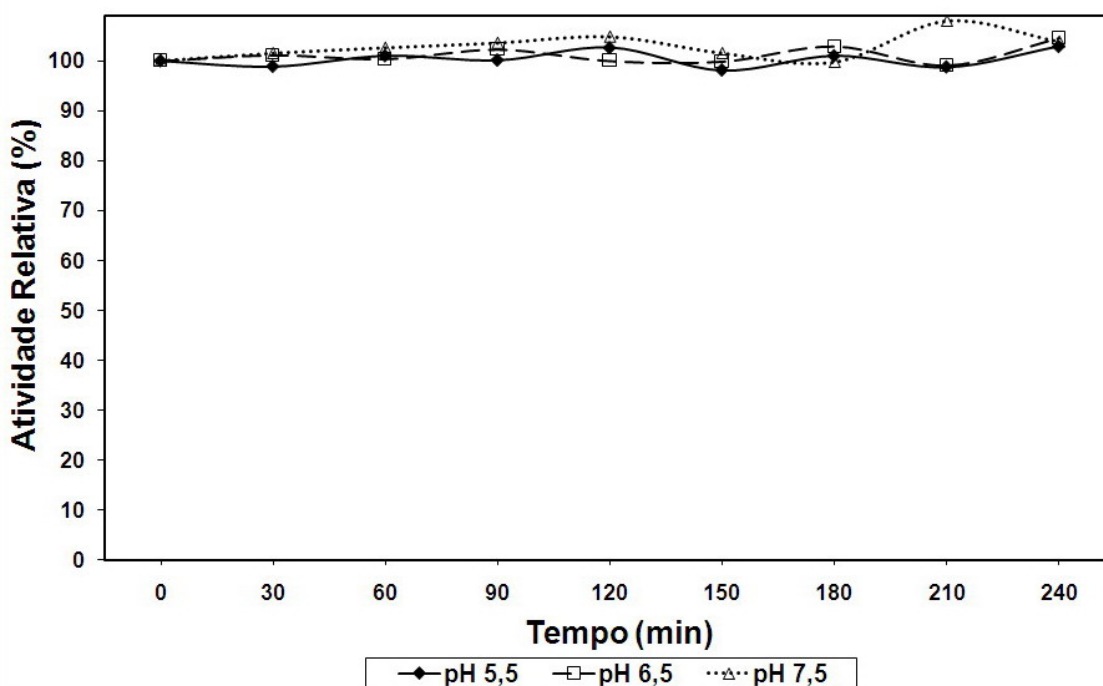


Figura 23. Efeito do pH na estabilidade das endoxilanases totais do fungo *H. grisea* cultivado MM a 42°C e 120 rpm.

Na faixa de pH estudada, as enzimas xilanolíticas apresentaram 100% de recuperação da atividade após 4 h de incubação, assim como ocorreu para a HXYN2r produzida pela *P. pastoris*, demonstrando mais uma vez sua alta estabilidade para aplicações industriais. Este resultado corrobora com os obtidos por Anand e colaboradores (1990) e Kitpreechavanich e colaboradores (1984) que obtiveram similar estabilidade para a endoxilanase produzida pelo *H. lanuginosa*. A endoxilanase produzida por *T. lanuginosus* apresentou 100% de recuperação da atividade quando incubada por 30 min na faixa de pH 6 a 10 (Jiang *et al.*, 2005).

O efeito da incubação das endoxilanases do *H. grisea* à temperatura de 70°C foi analisado pelo período de 80 min e a atividade xilanolítica relativa é apresentada na Figura 24.

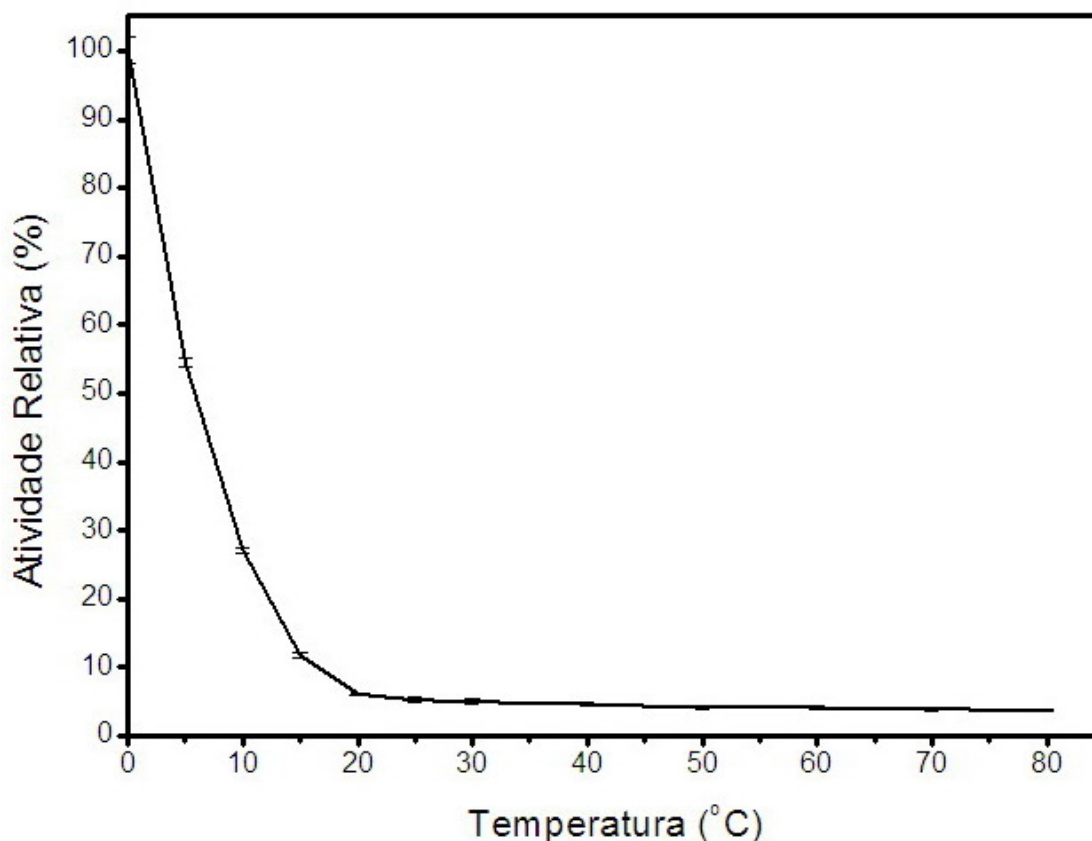


Figura 24. Efeito da temperatura na estabilidade das endoxilanases totais do fungo *H. grisea* cultivado MM a 42°C e 120 rpm.

A termoestabilidade das enzimas xilanolíticas do *H. grisea* na temperatura ótima foi baixa, apresentando um tempo de meia-vida de apenas 6 min. Este resultado é inferior ao obtido para as endoxilanases de muitos fungos mesofílicos e termofílicos, que apresentam boa estabilidade em temperaturas de 40 a 60°C.

4.2.3. Hidrólise Enzimática

4.2.3.1. Hidrólise Enzimática dos Substratos Moídos (Substratos brutos)

Com o objetivo de obter açúcares fermentáveis a partir dos substratos lignocelulósicos, foi realizada a hidrólise enzimática utilizando o extrato enzimático

do fungo *H. grisea* (EHg) e a enzima HXYN2r produzida pela levedura *P. pastoris* (PpHXYN2r).

Em uma primeira etapa do trabalho, o BCA e o SM foram submetidos a hidrólise enzimática sem receber um pré-tratamento para a abertura das fibras, uma vez que foram apenas moídos. A hidrólise foi realizada pelo período de 48 h e alíquotas foram retiradas para análise da concentração de ART pelo método de DNS (3.5.5). A concentração de ART produzido em cada experimento da hidrólise enzimática, para o BCA e o SM, é apresentada nas Figuras 25 e 26, respectivamente. Os resultados de ART apresentados nas Figuras 25 e 26 já estão deduzidos do controle (3.5.13.3).

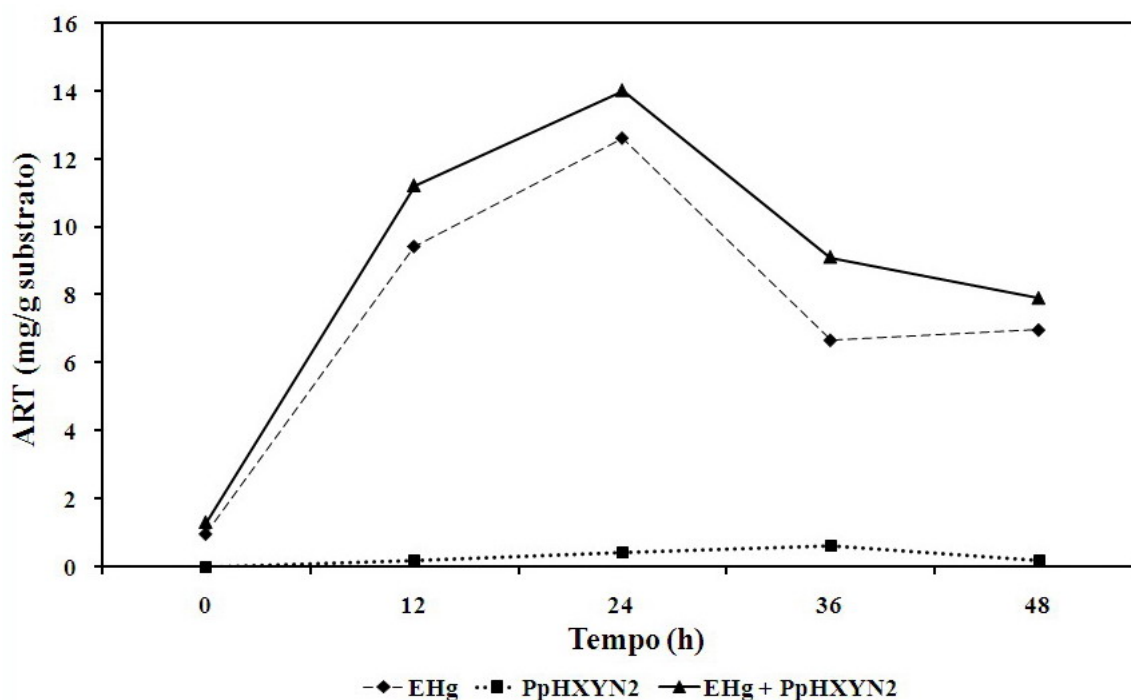


Figura 25. Obtenção de ART do BCA pela hidrólise enzimática por 48 h a 42°C e 130 rpm.

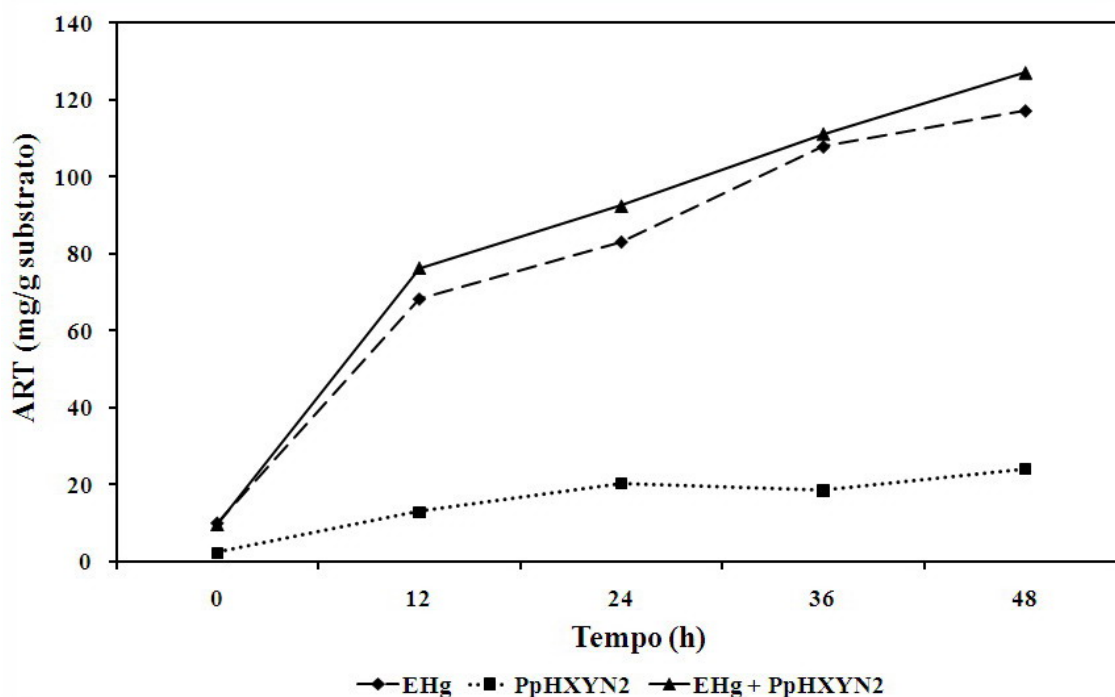


Figura 26. Obtenção de ART do SM pela hidrólise enzimática por 48 h a 42°C e 130 rpm.

Observou-se nas Figuras 25 e 26 que a concentração de ART aumentou ao longo do tempo de hidrólise atingindo o valor máximo após 24 h de incubação para o BCA e 48 h para o SM, exceto quando se utilizou a PpHXYN2r, com a qual a concentração de ART não aumentou significativamente após 24 h de incubação. O SM apresentou as maiores concentrações de ART em todos os experimentos, sendo que a concentração de ART foi aproximadamente 10 vezes superior àquela obtida incubando o BCA na presença da EHg e da EHg + PpHXYN2r e 50 vezes superior quando se utilizou somente a PpHXYN2r.

Para fins de cálculos de porcentagem de açúcares convertidos a partir de cada fração dos substratos lignocelulósicos, foram consideradas as composições estimadas de cada substrato, apresentadas na Tabela 15, baseado no trabalho de Saha (2003). Como para as amostras foliares não foram encontrados dados na literatura sobre sua composição, estimou-se que os valores sejam próximos aos do BCA.

Tabela 15. Porcentagem em peso da composição de materiais lignocelulósicos (Saha, 2003)

	Composição (%)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
SM	45	35	15
BCA	40	24	25

De acordo com a composição de cada substrato apresentada na Tabela 15, e com as concentrações de ART apresentados nas Figuras 25 e 26, observou-se que o SM apresentou uma taxa de conversão em açúcares das frações celulósica e hemicelulósica, de 14,6% (gramas de açúcares redutores liberados por grama de substrato) quando se utilizou o EHg e 15,9% utilizando o EHg + PpHXYN2r. O BCA apresentou uma taxa de conversão de 1,1% utilizando o EHg e 1,2% utilizando o EHg + PpHXYN2r.

Uma vez que a conversão de açúcares a partir dos substratos lignocelulósicos não foi eficiente, optou-se por realizar o pré-tratamento destes substratos com o objetivo de aumentar a taxa de conversão e, consequentemente, a concentração de açúcares fermentáveis liberados.

4.2.3.2. Pré-tratamento dos Substratos

Para a escolha da melhor condição de pré-tratamento, os substratos BCA, SM e RB72454 preparados como descrito no item 3.3.2, foram pré-tratados com H₂SO₄ e HCl (3.4.6) em diferentes concentrações e tempos (3.5.13.2), com o objetivo de obter a abertura das fibras, facilitando o acesso das enzimas às cadeias de xilana. Após o pré-tratamento, o hidrolisado obtido foi analisado quanto à presença de glicose e de ART. Nas Figuras 27, 28 e 29 são apresentados os resultados obtidos para o BCA, o SM e o RB72454, respectivamente.

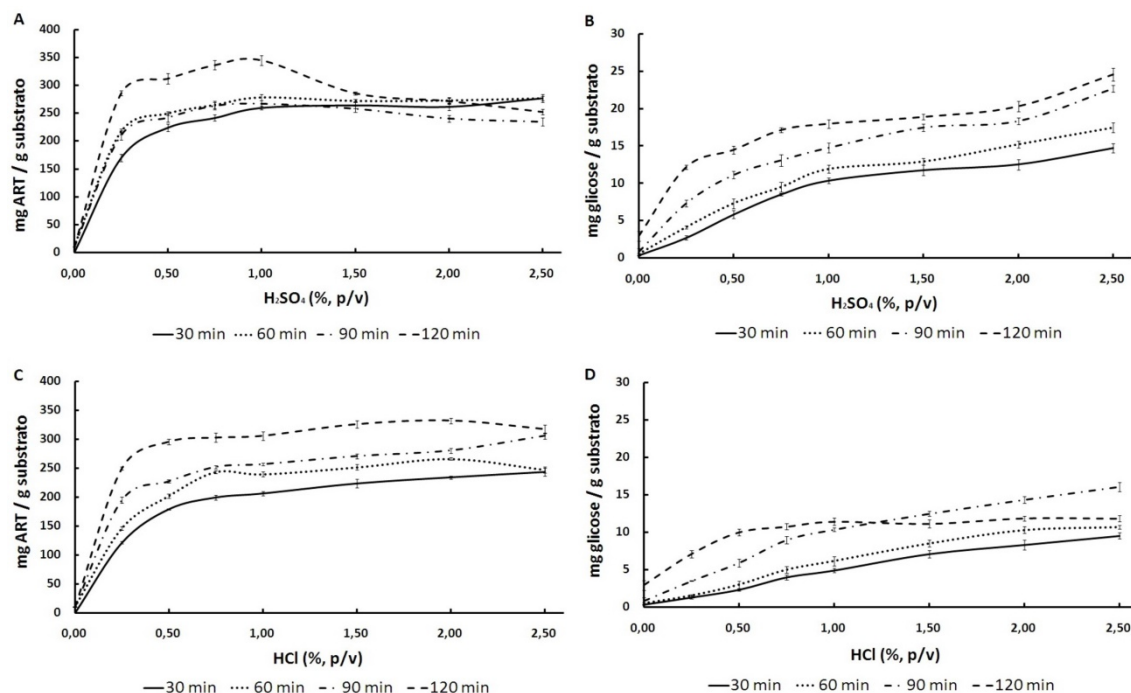


Figura 27. Concentração de glicose e ART liberados pela ação dos ácidos sulfúrico e clorídrico agindo sobre BCA pré-tratado, por diferentes intervalos de tempo, a 121°C e 1 atm. A- ART liberado pela ação do H₂SO₄; B- Glicose liberada pela ação do H₂SO₄; C- ART liberado pela ação do HCl; D- Glicose liberada pela ação do HCl.

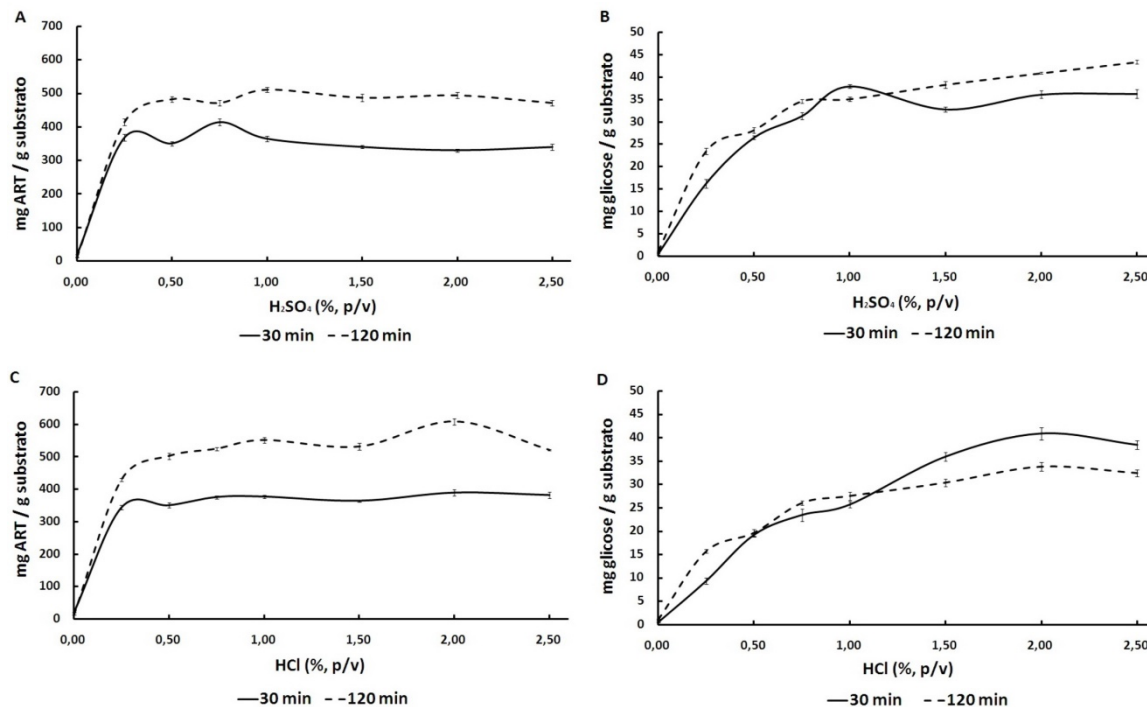


Figura 28. Concentração de glicose e ART liberados pela ação dos ácidos sulfúrico e clorídrico agindo sobre SM pré-tratado, por diferentes intervalos de tempo, a 121°C e 1 atm. A- ART liberado pela ação do H₂SO₄; B- Glicose liberada pela ação do H₂SO₄; C- ART liberado pela ação do HCl; D- Glicose liberada pela ação do HCl.

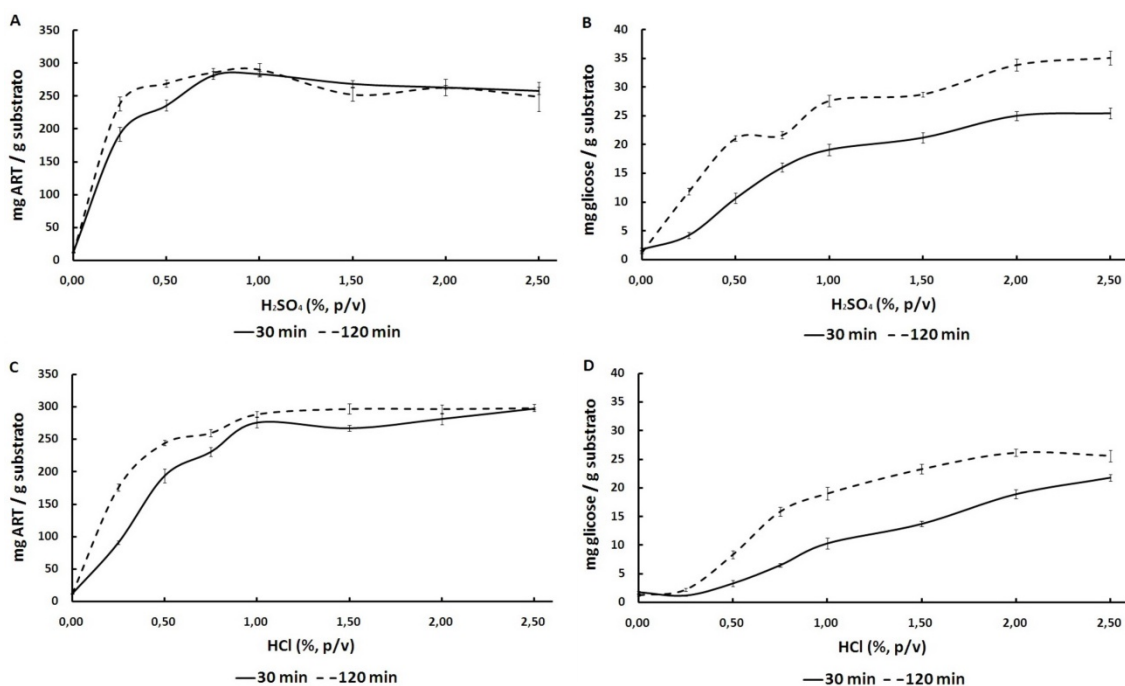


Figura 29. Concentração de glicose e ART liberados pela ação dos ácidos sulfúrico e clorídrico agindo sobre RB72454 pré-tratado, por diferentes intervalos de tempo, a 121°C e 1 atm. A- ART liberado pela ação do H₂SO₄; B- Glicose liberada pela ação do H₂SO₄; C- ART liberado pela ação do HCl; D- Glicose liberada pela ação do HCl.

Observou-se nas Figuras 27, 28 e 29 que os dois ácidos utilizados agiram sobre os substratos testados aumentando a liberação de ART, até a concentração de 1% destes ácidos, para o BCA e o RB72454 e até 0,5% de ácido para o SM. Para concentrações mais elevadas, não houve aumento significativo na liberação de ART, demonstrando ser desnecessário utilizar concentrações elevadas de ácido para o pré-tratamento destes substratos. Observou-se que a concentração de glicose, liberada dos substratos durante o pré-tratamento, aumentou com o aumento da concentração do ácido, porém, este aumento foi baixo a partir da concentração de 1% de ácido. Outra observação é que, tanto a liberação de ART quanto a de glicose foi maior, proporcionalmente ao tempo de pré-tratamento. Observou-se também que a liberação de glicose foi aproximadamente 50% maior quando se utilizou o ácido sulfúrico sugerindo que este ácido agiu mais rigorosamente sobre a fração celulósica dos substratos testados.

A concentração máxima de ART liberados no pré-tratamento do BCA foi próxima à liberada pelo RB72454, porém aproximadamente 50% menor do que a liberada pelo SM, o que pode ser explicado pela maior concentração de celulose e hemicelulose em sua composição.

Uma vez que o objetivo do pré-tratamento foi promover uma abertura branda das fibras para facilitar o acesso das enzimas à fração hemicelulósica, optou-se por utilizar a concentração de 0,25% (p/v) de ácido sulfúrico e o tempo de 30 min para realizar o pré-tratamento dos substratos, uma vez que foi a condição mais suave, sugerindo não ter provocado uma alta degradação da fração hemicelulósica. O pré-tratamento com ácido sulfúrico é amplamente utilizado, fornecendo bons resultados na etapa de hidrólise enzimática (Dawson & Boopathy, 2007; Kim & Lee, 2002; McMillan, 1992).

Os substratos lignocelulósicos foram pré-tratados na condição escolhida e a fração sólida recuperada por filtração, seca e pesada. A porcentagem de massa recuperada após o pré-tratamento é apresentada na Tabela 16. A fração líquida obtida após o pré-tratamento foi analisada quanto à presença de glicose e ART (3.5.4 e 3.5.5) e os resultados são apresentados na Tabela 17.

Tabela 16. Recuperação de massa dos substratos lignocelulósicos após pré-tratamento com ácido sulfúrico 0,25% (p/v) por 30 min

Substrato	Massa degradada (%)
BCA	24,0
SM	53,3
RB 72454	23,1
RB 835486	38,7
RB 867515	38,2
SP 832847	35,5

Tabela 17. Concentração de glicose e ART presente no hidrolisado dos substratos lignocelulósicos

Substrato	ART	Glicose
	(mg/ g substrato)	(mg/ g substrato)
BCA	113,3	1,8
SM	170,5	10,3
RB 72454	137,1	2,4
RB 835486	226,5	3,9
RB 867515	223,6	3,0
SP 832847	196,5	2,0

Os resultados observados na Tabela 16 demonstram que o SM foi o substrato que apresentou maior perda de massa (53%) em função do pré-tratamento enquanto o BCA e o RB 72454 apresentaram os menores valores, resultados confirmados pelos demonstrados na Tabela 17, uma vez que a concentração de glicose no hidrolisado do SM foi muito elevada em relação aos demais substratos, demonstrando a presença de uma maior concentração de componentes celulósicos neste substrato, enquanto que os substratos RB 835486, RB 867515 e SP 832847 apresentaram a maior liberação de ART com baixa liberação de glicose.

4.2.3.3. Hidrólise Enzimática dos Substratos Moídos após Pré-tratamento

Os substratos pré-tratados com o ácido sulfúrico foram hidrolisados pela enzima HXYN2r e pelo extrato enzimático do *H. grisea*. Nas Tabelas 18 a 21 são apresentadas as taxas de conversão em açúcares, das frações celulósica e hemicelulósica em função da ação das enzimas sobre os substratos.

Tabela 18. Conversão da fração hemicelulósica dos substratos BCA, SM e RB 72454 em glicose por hidrólise enzimática a 50°C

Tempo (h)	Conversão da fração celulósica (%)					
	BCA		SM		RB 72454	
	P*	H + P**	P*	H + P**	P*	H + P**
24	0	4,3	0,1	7,9	0,1	4,8
48	0	5,5	0,1	13,2	0,2	7,3
72	0	5,6	0,2	15,0	0,3	8,9

* P: PpHXYN2r; ** H + P: EHg + PpHXYN2r

Tabela 19. Conversão da fração hemicelulósica dos substratos RB 835486, RB 867515 e SP 832847 em glicose por hidrólise enzimática a 50°C

Tempo (h)	Conversão da fração celulósica (%)					
	RB 835486		RB 867515		SP 832847	
	P*	H + P**	P*	H + P**	P*	H + P**
24	0,1	6,7	0,1	5,9	0,1	6,2
48	0,2	9,8	0,1	9,1	0,1	8,7
72	0,1	12,1	0,2	12,1	0,2	11,3

* P: PpHXYN2r; ** H + P: EHg + PpHXYN2r

Tabela 20. Conversão da fração hemicelulósica dos substratos BCA, SM e RB 72454 em ART por hidrólise enzimática a 50°C

Tempo (h)	Conversão da fração hemicelulósica (%)					
	BCA		SM		RB 72454	
	P*	H + P**	P*	H + P**	P*	H + P**
24	3,4	8,5	11,3	30,7	8,1	17,0
48	4,2	8,2	12,8	35,6	9,2	30,7
72	5,2	9,6	15,3	42,8	10,5	33,3

* P: PpHXYN2r; ** H + P: EHg + PpHXYN2r

Tabela 21. Conversão da fração hemicelulósica dos substratos RB 835486, RB 867515 e SP 832847 em ART por hidrólise enzimática a 50°C

Tempo (h)	Conversão da fração hemicelulósica (%)					
	RB 835486		RB 867515		SP 832847	
	P*	H + P**	P*	H + P**	P*	H + P**
24	6,3	17,6	6,4	18,6	6,7	17,8
48	8,2	20,0	8,0	20,7	9,0	21,6
72	8,8	18,5	8,5	20,8	8,9	23,9

* P: PpHXYN2r; ** H + P: EHg + PpHXYN2r

De acordo com a quantidade total de carboidratos estimada para os substratos testados no experimento de hidrólise enzimática (Tabela 15), o BCA obteve uma taxa de conversão máxima da fração hemicelulósica de 9,6% quando incubado na presença das enzimas EHg + PpHXYN2r e de 5,2% quando incubado na presença da PpHXYN2r, sendo o substrato que obteve a menor taxa de conversão. O melhor resultado foi obtido utilizando o SM, onde se atingiu uma taxa de conversão de 42,8% utilizando as enzimas EHg + PpHXYN2r e de 15,3% utilizando a PpHXYN2r. As amostras foliares obtiveram taxas de conversão da fração hemicelulósica de 33% para a RB 72454 e, em média, 20% para as demais, quando se utilizou as enzimas EHg + PpHXYN2r e uma conversão média de 9,0% para todas as amostras foliares utilizando a enzima PpHXYN2r.

O SM apresentou uma taxa de conversão da fração celulósica para glicose de 15%, as amostras foliares apresentaram uma taxa média de 11% e o BCA de somente 5,6%. Embora a composição da fração celulósica dos substratos testados seja próxima, possivelmente a maior concentração de lignina presente no BCA tenha dificultado a ação das enzimas sobre este substrato, provocando uma menor liberação de glicose.

Os resultados obtidos demonstram que as maiores taxas de conversão da fração hemicelulósica foram obtidas utilizando a endoxilanase HXYN2r em conjunto com o EHg, o qual contém além das endoxilanasas, as celulasas e β -xilosidasas, sugerindo que a ação destas enzimas ao hidrolisar a fração celulósica, provocaram uma abertura das fibras, facilitando o acesso das endoxilanasas e consequentemente, uma maior conversão da fração hemicelulosósica a açúcares, como a xilose, por exemplo.

A taxa de conversão do BCA pré-tratado, utilizando as enzimas EHg + PpHXYN2r, foi 8 vezes superior à taxa do BCA sem pré-tratamento e, para o SM, a taxa de conversão nestas mesmas condições foi 2,7 vezes superior. Os resultados obtidos utilizando os substratos pré-tratados apresentaram uma taxa de conversão da fração hemicelulósica muito superior aos resultados obtidos utilizando-se os substratos sem um pré-tratamento, comprovando a necessidade e importância do pré-tratamento.

Em trabalho realizado por Gokhale e colaboradores (1997), sabugo de milho e polpa de bagaço de cana-de-açúcar foram moídos em peneira de 40 *mesh* e tratados com NaOH 0,1 M. Testou-se diferentes concentrações de endoxilanas e o maior rendimento de conversão da fração lignocelulósica foi obtido utilizando 2.060 U de endoxilase por grama de substrato, no tempo de 24 h de incubação, atingindo 26,6% para o bagaço de cana-de-açúcar, resultado superior ao obtido no presente trabalho enquanto que para o SM foi de apenas 12,0%. Foi verificado também que utilizando menores concentrações de substrato e realizando o pré-tratamento, se obteve um maior rendimento na hidrólise enzimática.

Em trabalho realizado por Yoon e colaboradores (2006) verificou-se que o SM pré-tratado com NaOH 1,25 M foi eficientemente hidrolisado pelas enzimas Rapidase Polimaq (1941 U/mL endoxilase), Cytolase ML (1801 U/mL de endoxilase) e Validase X (98,4 U/g de endoxilase), sendo que a Rapidase Polimaq forneceu o maior rendimento de açúcares e o aumento na concentração de substrato causou uma diminuição no rendimento, sugerindo que altas concentrações de substrato podem reduzir o conteúdo de água no meio aquoso, prejudicando a hidrólise. A melhor temperatura para a ação das enzimas foi de 50°C no pH 5,0 onde atingiu-se 27,0% de rendimento.

Hang & Woodams (2001) testaram três enzimas comerciais para a hidrólise enzimática de SM pré-tratado com NaOH 1,25 M: Rapidase Polimaq (2.600 U/mL de CMCase e 490 U/mL de endoxilase), Celluclast 1.5 L (1.637 U/mL de CMCase e 270 U/mL de endoxilase) e Clarex ML (694 U/mL de CMCase e 1480 U/mL de endoxilase). A melhor preparação enzimática foi a Rapidase Polimaq, a qual rendeu 47,4% de açúcares contra 36,0% da Clarex ML e 19,3% da Celluclast 1.5L, sugerindo a importância de se utilizar uma maior concentração de CMCase na hidrólise. As melhores condições para ação deste complexo enzimático foram: pH 5,0, temperatura 50°C, 10% de substrato e tempo de 48 h. Nestas condições ideais estabelecidas, atingiu-se um rendimento de 68,8% de conversão em açúcares.

Estes resultados demonstram que as taxas de conversão da hidrólise enzimática obtidas no presente trabalho foram melhores quando se realizou o pré-tratamento dos substratos, mas ainda estão abaixo dos valores encontrados na literatura, demonstrando a necessidade de otimizar o pré-tratamento para um maior acesso das enzimas aos substratos.

Martín e colaboradores (2006) utilizaram uma cepa de *S. cerevisiae* modificada geneticamente para a utilização do BCA pré-tratado com ácido sulfúrico e hidrolisado por enzimas, contendo altas concentrações de inibidores (compostos fenólicos, furaldeídos e ácidos), e obtiveram boa produtividade de etanol a partir deste hidrolisado.

Os açúcares obtidos a partir da hidrólise enzimática podem, por exemplo, ser fermentados a xilitol pela levedura *S. cerevisiae*, substituindo a hidrólise química normalmente utilizada. Pode-se também realizar o processo de sacarificação e fermentação simultaneamente (SSF) para a produção de etanol (Zheng *et al.*, 1998). Dawson & Boopathy (2007) também produziram etanol a partir de BCA pré-tratado com ácido sulfúrico, obtendo uma boa remoção da lignina presente no substrato.

5. CONCLUSÕES

- A enzima HXYN2r foi produzida e secretada pela levedura *P. pastoris* utilizando o transformante 12.3 e o meio BMMY-U nas condições otimizadas (1% metanol, 1,34% uréia, 1,0% extrato de levedura e DO₆₀₀ 10), atingindo uma atividade xilanolítica de 696 U/mL e concentração protéica de 100 mg/mL após 96 h de cultivo;
- A HXYN2r foi purificada após ser dialisada e concentrada por liofilização, utilizando a resina cromatográfica Sephacryl S-100 e apresentou um rendimento de 6,4%;
- A HXYN2r pura foi caracterizada bioquimicamente e apresentou as seguintes características: massa molecular estimada de 23 kDa; pH ótimo de 6,5; temperatura ótima de 60°C; tempo de meia-vida de 18 min a 60°C e maior do que 3 h a 50°C; estabilidade de 100% após 4 h de incubação no pH ótimo; K_m de 7,9 mg/mL e V_{máx} de 235,4 μmol/(mL.min); Sua ação foi induzida pela presença de MgSO₄, LiSO₄, CuCl₂, AlCl₃, BaCl₂, Al₂(SO₄)₃ e MgCl₂ e reprimida por SDS, MnCl₂ e HgCl₂;
- Para a produção do EHg o fungo *H. grisea* foi cultivado na presença de 3% (p/v) de BCA e produziu: 13,5 U/mL de endoxilanase, 0,207 FPU/mL de FPase, 3,253 U/mL de CMCase e 0,593 U/mL de Avicelase;
- Nos ensaios de hidrólise enzimática as melhores taxas de conversão da fração hemicelulósica dos substratos foram obtidas utilizando-se a PpHXYN2r suplementado com o EHg: 42,8% para o SM; 9,6% para o BCA e, em média 20% para as amostras foliares.

6. PERSPECTIVAS

- Analisar a enzima HXYN2r quanto a capacidade de formar oligômeros e apresentar maior termoestabilidade;
- Analisar os hidrolisados obtidos na sacarificação de SM, BCA e PCA quanto ao conteúdo de açúcares por HPLC;
- Realizar testes de fermentação dos hidrolisados com a levedura *C. guilhermondii* para a conversão de xilose em xilitol;
- Melhorar o processo de sacarificação testando diferentes substratos lignocelulósicos, diferentes métodos de pré-tratamento e diferentes extratos enzimáticos;
- Produzir a enzima HXYN2r em fermentador, otimizando as condições de cultivo para obter uma elevada produtividade enzimática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADSULA, M. G.; GHULEB, J. E.; SINGHB, R.; SHAIKHB, H.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALEA, D. V. & VARMA, A. J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production, **Carbohydrate Polymers**, 57: 67-72, 2004.
- ALANEN, P.; HOLSTI, M. L. & PIENIHAKKINEN, K. Sealants and xylitol chewing gum are equal in caries prevention. **Acta Odontologica Scandinavica**, 58: 279- 84, 2000.
- ALMEIDA, E. M.; POLIZELI, M. L.; JORGE, J. A. & TERENCE, H. F. Purification and biochemical characterization of β -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **FEMS Microbiology Letters**, 130:171-176, 1995.
- ANAND, L.; KRISHNAMURTHY, S. & VITHAYATHIL, P. J. Purification and Properties of Xylanase from the Thermophilic Fungus, *Humicola lanuginosa* (Griffon and Maublanc) Bunce. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 276: 546-553, 1990.
- ANTANOPOULUS, V. T.; HERNANDEZ, M.; ARIAS, M. E.; MAVRAKOS, E. & BALL, A. S. The use of extracellular enzymes from *Streptomyces albus* ATCC 3005 for the bleaching of eucalyptus kraft pulp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 57: 92-97, 2001.
- APEL, P. C.; PANACCIONE, D. G.; HOLDEN, F. R. & WALTON, J. D. Cloning and targeted gene disruption of xyl1, a β -1,4-xylanase gene from the maize pathogen *Cochliobolus carbonum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 6:467-473, 1993.
- ARAÚJO, E. F.; BARROS, E. G.; CALDAS, R. A. & SILVA, D. O. β -glycosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungus *Humicola* sp. **Biotechnology Letters**, 5: 781-784, 1993.
- AUTIO, J. T. Effect of xylitol chewing gum on salivary *Streptococcus mutans* in preschool children. **ASDC Journal of Dentistry for Children**, 69: 81-6, 2002.
- AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M.S.S.; ASTOLFI, S.F. & RADFORD, A. Cloning, sequencing and homologies of the cbh-1 (exoglucanase) gene of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Journal of General Microbiology**, 136: 2569-2576, 1990.
- BACHMANN S. L. & MCCARTHY A. J. Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-degrading system of *Thermomonospora fusca*. **Applied and Environmental Microbiology**, 57:2121- 2130, 1991.
- 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. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 70: 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: XXIV Reunião de Genética de Microrganismos, Gramado-RS. 2004.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W. & YARROW, D. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge University Press, Cambridge, 1990, 2nd edition.

- BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 8: 353-368, 1992.
- BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; KAPOOR, M. & HOONDAL, G. S. Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, 27: 459-466, 2000.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L. & HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 56, 326-338, 2001.
- BERENGER, J. F.; FRIXON, C.; BIGLIARDI, J. & CREUZET, N. Production, purification, and properties of thermostable xylanase from *Clostridium stercorarium*. **Canadian Journal of Microbiology**, 31: 635-643, 1985.
- 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. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 98(100): 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 fungal hosts. In: Liisa Viikari and Raija Lantto (orgs.). **Progress in Biotechnology**, 21. Ed.Elsevier, 2002c
- BERRIN, J-G; WILLIAMSON, G; PUIGSERVER, A.; CHAIX, J-G; MCLAUCHLAN, W. R. & JUGE, N. High-Level Production of Recombinant Fungal Endo- β -1,4-xylanase in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, 19: 179-187, 2000.
- BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances** 18: 355-383, 2000.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, 3:286-290, 1985.
- BIELY, P.; KLUEPFEL, D.; MOROSOLI, R. & SHARECK, F. Mode of action of three endo-beta-1,4-xylanases of *Streptomyces lividans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1162, 246-254, 1993.
- BIELY, P.; VRSANSKA, M.; TENKANEN, M. & KLUEPFEL, D. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, 57, 151-166, 1997.
- BLUM, H.; BIER, H. & GROSS, H. Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**. 8: 93-99, 1987.
- BOTHAST R. J. & SAHA B. C. Ethanol production from agricultural biomass substrates. **Advances in Applied Microbiology**, 44:261-286, 1997.
- BOTHWELL, M. K.; WALKE, L. P.; WILSON, D. B.; IRWIN, D. C. & PRICE, M. Synergism between pure *Thermomonospora fusca* and *Trichoderma reesei* cellulases. **Biomass and Bioenergy**, 4: (293-299), 1993.

- BOUVENG, H. O. Phenylisocyanate derivatives of carbohydrates. II. Location of O-acetyl groups in birch xylan. **Acta Chemica Scandinavica**, 15: 96-100, 1961.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G. & HUNTER, J. S. Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building. New York: John Wiley & Sons, 1978, 635p.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-glycine binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, 1976.
- BRETTHAUER R. K. & CASTELLINO F. J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 30:193-200, 1999.
- BRIERLEY, R. A.; DAVIS, G. R. & HOLTZ, G. C. Production of insulin-like growth factor-1 in methylotrophic yeast cells. United States Patent 5, 324, 639, 1994.
- BROWNELL H. H. & SADDLER J. N. Steam explosion pretreatment for enzymatic hydrolysis. **Biotechnology & Bioengineering Symposium**, 14:55-68, 1984.
- CAMPBELL, R. L.; ROSE, D. R.; WAKARCHUK, W. W.; TO, R.; SUNG, W. & YAGUCHI, M. A comparison of the structures of the 20 kDa xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Bacillus circulans*. **Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research Publication**, 8: 63-72, 1993.
- CAO, Y.; QIAO, J.; LI, Y. & LU, W. De novo synthesis, constitutive expression of *Aspergillus sulphureus* β -xylanase gene in *Pichia pastoris* and partial enzymic characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 76: 579-585, 2007.
- CARDELLO, L.; TERENCE, H. F. & JORGE, J. A. A cytosolic trehalase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Microbiology**, 140:1671-1677, 1994.
- CARVALHO, W.R. Produção e Purificação da Xilanase de 23 kDa do Fungo Termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química de Lorena-SP. 2003.
- CEREGHINO J. L. & CREGG J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, 24: 45-66, 2000.
- CHANG, V. & HOLTZAPPLE, M., Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 84-86, 5-37, 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**, 46: 143-149, 2006.
- CHAUDHARY, P. & DEOBAGKAR, D. N. Characterization of Cloned Endoxylanase from *Cellulomonas* sp. NCIM 2353 Expressed in *Escherichia coli*. **Current Microbiology**, 34: 273-279, 1997.
- CHAUDHARY, P.; KUMAR, N. N. & DEOBAGKAR, D. N. The glucanases of *Cellulomonas*, **Biotechnology Advances**, 15: 315-331, 1997.

- CHAVES, V. M. G. "Algumas características fisiológicas e propriedades do complexo celulase de um fungo termófilo isolado de compostagem" Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa-MG, 1982.
- CHEN, C.; CHEN, J-L & LIN, T-Y. Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production. **Enzyme and Microbial Technology**. 21: 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**, 37: 541–546, 2005.
- CHIANG C. & KNIGHT S. G. Xylose metabolism by cell-free extract of *Penicillium chrysosporium*. **Nature**, 188:79–81, 1960.
- CLARE J. J.; RAYMENT F. B.; BALLANTYNE S. P.; SREERKRISHNA K. & ROMANOS M. A.. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. **BioTechnology**, 9: 455–460, 1991.
- COLLINS, T.; MEUWIS, M-A.; STALS, I.; CLAEYSSENS, M.; FELLER, G. & GERDAY, C. A Novel Family 8 Xylanase, functional and Physicochemical Characterization. **Journal of Biological Chemistry**, 277: 35133-35139, 2002.
- COLLINS, T.; GERDAY, C. & Feller, G. Xylanases, Xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, 29: 5-23, 2005.
- CONNERTON, I.; CUMMINGS, N.; HARRIS, G. W.; DEBEIRE, P. & BRETON, C. Promoter analysis of the acetate-inducible isocitrate lyase gene (*acu-3*) from *Neurospora crassa*, **Biochimica et Biophysica Acta**, 1433: 110–121, 1999.
- COUDERC, R. & J. BARATTI. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*. Purification and properties of alcohol oxidase. **Agricultural and Biological Chemistry**, 44: 2279-89, 1980.
- COUGHLAN, M. P. Towards an understanding of the mechanism of action of main chain-hydrolyzing xylanases. In: Xylans and xylanases. (Visser, J., Beldman, G.; Kusters- van Someren, M.A. & Voragen, A.G.J., eds.), pp. 111-139, Elsevier, Amsterdam. 1992.
- CREGG, J. M. Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene Expression Systems**, 157-191, 1999.
- CREGG J. M. & MADDEN K. R. Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. **Developments in Industrial Microbiology**, 29: 23–42, 1988.
- DAMASO, M. C. T.; ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E.; MARTINS, O. B.; PEREIRA-J, N.; ANDRADE, C.M.M.C. & ALBANO, R. M. Optimized Expression of a Thermostable Xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. **Applied and Environmental Microbiology**, 69: 6064-6072, 2003.
- DALBOEGE, H. & HELDT-HANSEN, H. P. A novel method for efficient expression cloning of fungal enzyme genes. **Molecular and General Genetics**, 243: 253-260, 1994.

- DALE, C.; ALLEN, A. & FOGARTY, S. *Pichia pastoris*: a eukaryotic system for the large-scale production of biopharmaceuticals. **BioPharm International**, 12:36-42, 1999.
- DAVIES, G. & HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, 3: 853-859, 1995.
- DAWSON, L. & BOOPATHY, R. Use of post-harvest sugarcane residue for ethanol production, **Bioresource Technology**, 98: 1695-1699, 2007.
- DE CASTRO, A. M. C.; PEDRO, K. C. N. R.; FERREIRA, M. C.; CRUZ, J. C.; FERREIRA, S. G. & PEREIRA, N. Produção e Caracterização das Celulases de *Aspergillus niger* Obtidas a Partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar. In: Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, Curitiba. 2007.
- DE HOOP, M. J.; CREGG, J.; KEIZER-GUNNINK, I.; SJOLLEMA, K. & VEENHUIS, M., A. B. G. Overexpression of Alcohol Oxidase in *Pichia Pastoris*. **FEBS Letters**, 291-299, 1991.
- 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**, 39: 1096-1102, 2006.
- DEKKER, R. F. H. & RICHARDS, G. N. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, 32:277-352, 1976.
- DEKKER, R. F. H.. Biodegradation of the hetero-1,4-linked xylans. **ACS Symposium Series**, 399: 619-629, 1989.
- DEREWENDA, U.; SWENSON, L.; GREEN, R; WEI, Y.; DODSON, G. G.; YAMAGUCHI, S.; HAAS, M. J. & DEREWENDA, Z. S. An unusual buried polar cluster in a family of fungal lipases, **Nature Structural Biology**, 1: 36-47, 1994.
- DE PAULA, E. H.; RAMOS, L. P. & AZEVEDO, M. O. The potential of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, 68:35-41, 1999.
- DE PAULA, E. H.; FARIA, F. P.; BARBOSA, C. D.; CORNELIO, I. N.; PEREIRA, L. R. & AZEVEDO, M. O. Sacarificação de Compostos Lignocelulósicos pelo extrato enzimático do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Anais da Enzitec, Rio de Janeiro, Brasil, 1998.
- DEY, D.; HINGE, J.; SHENDYE, A. & RAO, M. Purification and properties of extracellular endoxylanases from an alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. **Canadian Journal of Microbiology**, 38:436-442. 1992.
- DUFF, S. J. B. & MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulotics to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, 55:1-33, 1996.
- DUSTERHOFT, E. M.; LINSEN, V. A. J. M.; VORAGEN, A. G. J. & BELDMAN, G. Purification characterization and properties of two xylanases from *Humicola insolens*. **Enzyme and Microbial Technology**, 20: 437, 1997.
- DUTRON, A.; GEORIS, J.; GENOT, B.; DAUVIRIN, T.; COLLINS, T.; HOYOUX, A. & FELLER, G. Use of family 8 enzymes with xylanolytic activity in baking. In: World Intellectual Property Organization, PCT, WO 2004/023879 A1. 2004.

- EL-HAWARY, F. I., MOSTAFA, Y. S. & LASZLO, E. Cellulase production and conversion of rice straw to lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation, **Acta Alimentaria Hungarica**, 30: 281–95, 2003.
- FABER, K. N., HARDER, W., AB, G. & VEENHUIS, M. Review: Methylophilic yeasts as factories for the production of foreign proteins, **Yeast**, 11: 1331-1344, 1995.
- FARIA, F. P. Clonagem, Caracterização e Análise de Expressão de um gene de xilanase (Hxyn2) do Fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília. 2000.
- FARIA, F. P.; TEÓ, V. S. J.; AZEVEDO, M. O. & NEVALAINEN, H. Expression and processing of a major xylanase (XYN2) from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Trichoderma reesei*. **Letters in Applied Microbiology**, 34:119-123, 2002.
- FERGUS, C. L. The cellulolytic activity of thermophilic fungi and actinomycetes. **Mycologia**, 61:120-129, 1969.
- FIERENS, K.; GEUDENS, L.; BRIJS, K.; COURTIN, C. M.; GEBRUERS, K.; ROBBEN, J.; CAMPENHOUT, S. V.; VOLCKAERT, G. & DELCOUR, J. A. High-level expression, purification, and characterization of recombinant wheat xylanase inhibitor TAXI-I secreted by the yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, 37: 39–46, 2004.
- FREITAS, S. M.; TREPTOW, W. L.; FARIA, F. P.; AZEVEDO, M. O. & MAIGRET, B. Structural contributions for thermostability of a new endo-1,4- β -xylanase from the fungus *Humicola grisea*. **Internet Electronic Journal of Molecular Design**, 2 (12): 835-851, 2003.
- FUNAGUMA, T.; NAITO, S.; MORITA, M.; OKUMARA, M.; SUGIURA, M. & HARA, A. Purification and some properties of xylanase from *Penicillium herque*, Banier and Sartory. **Agricultural and Biological Chemistry**, 55:1163-1165, 1991.
- FUSHINOBU, S.; ITO, K.; KONNO, M.; WAKAGI, T.; & MATSUZAWA, H. Crystallographic and mutational analyses of an extremely acidophilic and acid-stable xylanase: biased distribution of acidic residues and importance of Asp37 for catalysis at low pH. **Protein Engineering**, 11: 1121–1128, 1998.
- GALANTE, Y. M.; DE CONTI, A. & MONTEVERDI, R. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries In: *Trichoderma and Gliocladium – Enzymes, Biological Control and Commercial Applications* (Harman, G.E. and Kubicek, C.P., Eds.), pp. 327–342. Taylor and Francis, London, 1998.
- GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 54: 741–750, 2000
- GELLISSEN, G.; JANOWICZ, Z. A.; WEYDEMANN, U.; MELBER, K.; STRASSER, A. W. M. & HOLLENBERG, C. P. High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. **Biotechnology Advances**, 10:179–189, 1992.
- GOKHALE, D. V.; PATIL, S. G. & WASTAWDE, K. B. Potential application of yeast cellulase-free xylanase in agrowaste material treatment to remove hemicellulose fractions, **Bioresource Technology**, 63: 187-191, 1998.

- GOMES, D. J.; GOMES, J. & STEINER, W. Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Biotechnology**, 33: 87-94, 1994.
- GRANSTORM, T.; OJAMA, H. & LEISOLA, M. Chemostat study of xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied and Microbiology Biotechnology**, 55:36-42, 2001.
- HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W. & ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, 58:137-161, 1996.
- HANG, Y. D. & WOODAMS, E. E. Enzymatic production of reducing sugars from corn cobs, **Lebensm.-Wiss. u.-Technology**, 34: 140-142, 2001.
- HARKKI, A.; MANTYLA, A.; PENTILLA, M.; MUTTILAINEN, S.; BAHLER, R.; SUOMINEN, P.; KNOWLES, J. & NEVALAINEN, H. Genetic engineering of *Trichoderma reesei* to produce strains with novel cellulase profiles. **Enzyme and Microbial Technology**, 13:227-233, 1991.
- HARRIS, G. W.; PICCKERSGILL, R. W.; CONNERTON, I.; DEBEIRE, P.; TOUZEL, J.; BRETON, C. & PÉREZ, S. Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, 29: 77-86, 1997.
- HAZEU, W.; DE BRUYN, J. C. & BOS, P. Methanol assimilation by yeasts. **Archives furer Mikrobiologie**, 87: 185-188, 1972.
- HEIKKILÄ, H.; HYÖKY, G.; RAHKILA, L.; SARKKI, M. L. & VILJAVA, T. A. Process for the simultaneous production of xylitol and ethanol. FI patent WO 91/10740, 25/7/1991.
- HENRISSAT, B. & BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, 293, 781-788, 1993.
- HERRERO, A. A.; GOMEZ, R. F. & ROBERTS, M. F. ³¹P NMR studies of *Clostridium thermocellum* mechanism of end product inhibition by ethanol, **Journal of Biological Chemistry**. 260: 7442-7451, 1985.
- HON, D. N. S. & SHIRAISHI, N. Wood and cellulosic chemistry. Marcel Dekker, Inc. New York, 1991.
- HSU, T-A. Pretreatment of biomass. In: Wyman CE, editor. Hand book on ethanol: production and utilization. Washington, DC: Taylor and Francis; p. 179-212, 1996.
- 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*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 61, 1593-1595, 1997.
- JACOBSON, E. S. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clinical Microbiology Reviews**. 13: 708-717, 2000.
- JAHIC, M. Process Techniques for Production of Recombinant Proteins with *Pichia pastoris*. PhD Thesis, Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology, S-10 691 Stockholm, Sweden; ISBN 91-7283-522-2, 2003.

JAVIER, D. B.; FAUSTINO, S.; MARIO, D. B.; GUILLERMO, R. C.; RAJNI, H. K. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*, **Enzyme Microbiology and Technology**, 22: 42–49, 1998.

JIANG, Z. Q.; YANG, S. Q.; TAN, S. S.; LI, L. T. & LI, X. T. Characterization of a xylanase from the newly isolated thermophilic *Thermomyces lanuginosus* CAU44 and its application in bread making. **Letters in Applied Microbiology**, 41: 69–76, 2005.

JONSSON, L. J.; SALOHEIOMO, M. & PENTTILA, M. Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of lcc1 and expression in *Pichia pastoris*. **Current Genetics**, 32: 425–30, 1997.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D. & MACRIS, B. J. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isozymes. **Journal of Biotechnology**, 60: 155–163, 1998.

KAMAL KUMAR, B.; BALAKRISHNAN, H. & RELE, M.V. Compatibility of alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* NCL (87-6-10) with commercial detergents and proteases. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Epub ahead of print, 2004.

KATAPODIS, P.; VRSANSKA, M.; KEKOS, D.; NERINCKX, W.; BIELY, P.; CLAEYSSENS, M.; MACRIS, B. S. & CHRISTAKOPOULOS, P. Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Sporotrichum thermophile*, **Carbohydrate Research**, 338: 1881–1890, 2003.

KIM, S. B. & LEE, Y. Y. Diffusion of sulfuric acid within lignocellulosic biomass particles and its impact on dilute-acid pretreatment, **Bioresource Technology**, 83: 165–171, 2002.

KIMURA, T.; MIZUTANI, T.; SAKKA, K. & OHMIYA, K. Stable Expression of a Thermostable Xylanase of *Clostridium thermocellum* in Cultured Tobacco Cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 95: 397–400, 2003.

KITPREECHAVANICH, V.; HAYASHI, M. & NAGAI, S. Purification and Properties of endo-1,4- β -xylanase from *Humicola lanuginosa*. **Journal of Fermentation Technology**, 62: 415–420, 1984.

KLEYWEGT, G. J.; ZOU, J.-Y.; DIVNE, C.; DAVIES, G. J.; SINNING, I.; STÅHLBERG, J.; REINIKAINEN, T.; SRISODSUK, M.; TEERI, T. T. & JONES, T. A.. The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes, **Journal of Molecular Biology**, 272: 383–397, 1997.

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**, 39: 683–689, 2006.

KUBICEK, C. P. & Penttila, M. E. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*, p. 49–72. In G. E. Harman and C. P. Kubicek (ed.), *Trichoderma and Gliocladium*, vol. 2 ed. Taylor & Francis Ltd., London, United Kingdom. 1998.

- KULKARNI, N.; SHENDYE, A. & R. A. O, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, 23:411-456, 1999.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.
- LARSON, S. B.; DAY, J.; BARBA DE LA ROSA, A. P.; KEEN, N. T. & MCPHERSON, A. First crystallographic structure of a xylanase from glycoside hydrolase family 5: implications for catalysis, **Biochemistry**, 42: 8411-8422, 2003.
- LAWFORD, H. G. & ROUSSEAU, J. D. Cellulosic fuel ethanol—alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 105: 457-69, 2003.
- LEARMONTH, R. P. Textbook vs. practice: the use of non-linear regression for enzyme kinetic data. **Biochemical Education**, 23: 34-35, 1995
- LEMOES, J. L.; FONTES, M. C. & PEREIRA, N. JR. Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation and influence of different nitrogen sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 91-93:681-9, 2001.
- LI, X. & LJUNGDAHL, L. G. Cloning, sequencing and regulation of a xylanase gene from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. **Applied and Environmental Microbiology**, 60:3160-3166, 1994.
- LINDBERG, B.; ROSSEL, K. G. & SVENSSON, S. Position of the O-acetyl groups in birch xylan. **Svensk Papperstid**, 76: 30-32, 1973.
- 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**, 48: 292-299, 2006.
- LOEWEN, M. C.; LIU, X.; DAVIES, P. L. & DAYUGULIS, A. J., Biosynthetic Production of Type II Antifreeze Protein: Fermentation by *Pichia pastoris*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 48 : 480, 1997.
- LOHMEIER-VOGEL, E. M.; SÖPHER, C.R. & LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 20: 75-81, 1998.
- LUCENA-NETO, S. A. & FERREIRA-FILHO, E. X. Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea* var *thermoidea*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 35:86-90, 2004.
- LYND, L. R., ELANDER, R. T. & WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 57/58: 741-761, 1996.
- MAHESWARI, M. U. & CHANDRA, T. S. Production and potential applications of a xylanase from a new strain of *Streptomyces cuspidosporus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 16: 257-263, 2000.
- MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; McNEIL, B. & HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system, **YEAST**, 22: 249-270, 2005.

- MALAJA, A. & HAMALAINEN, L. Process for making xylitol. US Patent 4,008,285, 1977.
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G. & BHAT, M. K. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes, **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, 64: 461–488, 2000.
- MARGOLLES-CLARK, E.; ILMEN, M. & PENTTILA, M. Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Journal of Biotechnology**, 57:167–179, 1997.
- MARTÍN, C.; MARCET, M.; ALMAZÁN, O. & JONSSON, L. J. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors, *Bioresource Technology*, 98: 1767–1773, 2007.
- MARUI, M.; NAKANISHI, K. & TSUEN, E. O. Immunological properties and constituent amino acids of three xylanase produced inductively from *Streptomyces* sp. Ito 241. **Agricultural and Biological Chemistry**, 49: 3409–3413, 1985.
- MATHLOUTHI, N.; LALLES, J.P.; LEPERCQ, P.; JUSTE, C. & LARBIER, M. Xylanase and beta-glucanase supplementation improve conjugated bile acid fraction in intestinal contents and increase villus size of small intestine wall in broiler chickens fed a rye-based diet. **Journal of Animal Science**, 80, 2773–2779, 2002.
- MATHLOUTHI, N.; MOHAMED, M. A. & LARBIER, M. Effect of enzyme preparation containing xylanase and betaglucanase on performance of laying hens fed wheat/barley or maize/soybean meal-based diets. **British Poultry Science**, 44, 60–66, 2003.
- MCMILLAN, J.D., 1992. Processes for Pretreating Lignocellulose Biomass: A Review. NREL/TP-421-4978, November, Golden, CO.
- MERIVUORI, H.; SANDS, J. A. & MONTENECOURT, B. S. Effects of tunicamycin on secretion and enzymatic activities of cellulase from *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 23:60–66, 1985.
- 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**, 16:627–632, 1994.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, 31: 426–428, 1959.
- MINNING, S.; SERRANO, A.; FERRER, P.; SOLÁ, C.; SCHMID, R. D. & VALERO, F. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, 86: 59–70, 2001.
- MOISER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M. & LADISCH, M., Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 96, 673–686, 2005.
- MOLONEY, A. & M. P. COUGHLAN. Sorption of *Talaromyces emersonii* cellulase on cellulosic substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, 25:271–280, 1983.

- MONTI, R.; TERENCE, H. F. & JORGE, J. A. Purification of an extracellular xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Canadian Journal of Microbiology**, 37: 675-681, 1991.
- MONTI, R. Produção de celulasas e xilanasas pelo fungo termófilo *Humicola grisea* variedade *thermoidea* RP-17: Fatores que afetam a produção e propriedades bioquímicas das enzimas. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 1989.
- MORAES, W. P.; FARIA, F. P. & AZEVEDO, M. O. Produção de Enzimas Xilanólíticas pelo Fungo Termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* em diferentes Substratos. 5º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. p.121, 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**, 121-124, 195-203, 2005.
- NURIZZO, D.; NAGY, T.; GILBERT, H. J. & DAVIES, G. J. The structural basis for catalysis and specificity of the *Pseudomonas cellulosa* alpha-glucuronidase, GlcA67A, **Structure**, 10: 547-556, 2002.
- OLIVEIRA, A. R.; XIMENES, E. A. & FELIX, C. R. Amylolytic activity of *Humicola* sp. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 63: 409-414, 1991.
- PAICE, M. G.; BERNIER, R. & JURASEK, L. Viscosity-enhancing bleaching of hardwood Kraft pulp with xylanase from a cloned gene. **Biotechnology and Bioengineering**, 32: 235-239, 1988.
- PALMQVIST, E. & HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates. I. Inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, 74:17-24, 2000.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. & SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, 74: 69-80, 2000.
- PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H. & DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v. 65, p. 191-201, 1998a.
- PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H. & DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolisates. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 25-40, 1998b.
- PEPPER, T. & OLINGER, P. M. Xylitol in sugar-free confections. **Food Technology**, 42: 98-106, 1988.
- PERALTA, R. M.; KADOWAKI, M. K.; TERENCE, H. F. & JORGE, J. A. A highly thermostable β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*: purification and biochemical characterization. **FEMS Microbiology Letters**, 146: 291-295, 1997.
- POLIZELI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. & AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 67: 577-591, 2005.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.; HEMMONS, L. H.; MCDONALD & BUFTON, W. J. The Genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, 5:141-238, 1953.

PRADE, R.A. Xylanases: from biology to biotechnology. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, 13, 100–131, 1995.

RAEMAEKERS, R. J.; DE MURO, L.; GATEHOUSE, J. A. & FORDHAM-SKELTON, A. P. Function phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris* correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. **European Journal of Biochemistry**, 265: 394-403, 1999.

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**, 5: 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 Journal of Microbiology & Biotechnology**, 12: 12-15, 1995.

RAO, R. S.; JYOTHY, C. P.; PRAKASHAM, R. S.; SARMA, P. N. & RAO, L. V. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. **Bioresource Technology**, 97: 1974-1978, 2006.

ROCHA, J. R.; CATANA, R.; FERREIRA, B. S.; CABRAL, J. M. S. & FERNANDES, P. Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. **Food Chemistry**, 95: 77-82, 2006.

ROMANOS, M. A. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level expression. **Current Opinion in Biotechnology**, 6:527–533, 1995.

ROMANOS, M. A.; SCORER, C. A. & CLARE, J. J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, 8:423–488, 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**, 41: 19-25, 2007.

RYTTERSGAARD, C., Lo Leggio, L., Coutinho, P.M., Henrissat, B. & Larsen, S. *Aspergillus aculeatus* beta-1,4-galactanase: substrate recognition and relations to other glycoside hydrolases in clan GH-A, **Biochemistry** 41: 15135–15143, 2002

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 30, 279–291, 2003.

SANTOS, J. C.; CONVERTI, A.; CARVALHO, W.; MUSSATTO, S. I. & SILVA, S. S. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate in immobilized-cell fluidized bed reactor. **Process Biochemistry**, 40: 113-118, 2005.

SCHNEIDER, H.; WANG, P. Y.; CHAN, Y. K. & MALESZKA, R. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**, 3:89–92, 1981.

SHALLOM, D. & SHOHAM, Y. Microbial Hemicellulases, **Current Opinion in Microbiology**, 6: 219-228, 2003.

- SHI, X.; KARKUT, T.; CHAMANKHAH, M.; ALTING-MEES, M.; HEMMINGSEN, S. M. & HEGEDUS, D. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*, **Protein Expression and Purification**, 28: 321-330, 2003.
- SIEGEL, R. S.; BUCKHOLZ, R. G.; THILL, G. P. & WONDRACK, L. M. Production of epidermal growth factor in methylotrophic yeasts. International Patent Application, Publ. No. WO 90/10 697, 1990.
- SUBRAMANIYAN, S. & PREMA, P. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, 22(1):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**, 104: 1055-1064, 2007.
- SUN, Y. & CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, 83:1-11, 2002.
- SUNNA, A. & ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, 17: 39-67, 1997.
- TADA, K.; HORIUCHI, J.-I.; KANNO, T. & KOBAYASHI, M. Microbial Xylitol Production from Corn Cobs Using *Candida magnolia*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 98: 228-230, 2004.
- 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. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 98(5): 338-343, 2004.
- TANSEY, M. R. Isolation of thermophilic fungi from self-heated, industrial wood chip piles. **Mycologia**, 63:537-547, 1971.
- TEATHER, R. M. & WOOD, P. J. Use of Congo Red polysaccharide interaction in numeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, 43: 777-780, 1982.
- TIKHOMIROV, D. F., SINITSYN, A. P., ZOROV, I. N. & WILLIAMS, C. Non-starch polysaccharide hydrolysing microbial enzymes in grain processing In: Recent Advances in Enzymes in Grain Processing (Courtin, C.M., Veraverbeke, W.S. and Delcour, J.A., Eds.), pp. 413-418. Kat. Univ. Leuven, Leuven. 2003.
- TÖRRÖNEN, A. & ROUVINEN, J. Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4- β -xylanases. **Journal of Biotechnology**, 57: 137-149, 1997.
- TÖRRÖNEN, A. & ROUVINEN, J. Structural comparison of two major endo-1,4-xylanases from *Trichoderma reesei*. **Biochemistry**, 34: 847-856, 1995.
- TÖRRÖNEN, A.; HARKKI, A. & ROUVINEN, J. Three-dimensional structure of endo-1,4- β -xylanase II from *Trichoderma reesei*: two conformational states in the active site. **EMBO Journal**, 13: 2493-2501, 1994.
- VAN DER BROECK, H. C.; DE GRAAF, L. L.; HILLE J. D. R.; VAN OOYN, A. J. J.; VESSER, J. & HARDER, A. A cloning and expression of fungal xylanase genes and

use of the xylanase in bread making and in preparation of feed and paper products. European Patent Ap., 90/202,020, 1990.

VEENHUIS, M.; van DIJKEN, J. P. & HARDER, W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeast. **Advance in Microbial Physiology**, 24: 1-82, 1983.

VIIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J. & LINKO, M. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. **FEMS Microbiology Reviews**, 13: 335-350, 1994.

VIIKARI, L. Pulp and the environment. Paperi ja Puu- Paper and Timber, 73:384-389, 1991.

VAN WALSUM, G. P., Alien, S. G., Spencer, M. J., Laser, M. S., Antal Jr., M. J. & Lynd, L. R. Conversion of lignocellulosics pretreated with liquid hot water to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 57/58: 157-170. 1996.

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**, 267: 328-334, 2007.

WANG, P.; ALI, S.; MASON, J. C.; SIMS, P. F. G. & BRODA, P. Xylanases from *Streptomyces cyaneus*, in Xylans and Xylanases. Visser, J.; Kusters-van Someren, M. A. & Voragen, A. G. J. Eds., Elsevier Science Publishers, Amsterdam BV, p. 225, 1992.

WANG, P. Y.; SHOPSIS, C. & SCHNEIDER, H. Fermentation of a pentose by yeasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 94:248-254, 1980.

WARARCHUK, W. W.; CAMPBELL, R. L.; SUNG, W. L.; DAVOODI, J. & YAGUCHI, M. Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. **Protein Science**, 3: 467-475, 1994.

WERTEN, M. W. T.; VAN DEN BOSCH, T. J.; WIND, R. D.; MOOIBROEK, H. & DE WOLF, F. A. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. **Yeast** 15(11): 1087-1096, 1999.

WHISTLER, R. L. & RICHARDS, E. L. Hemicelluloses. In: The Carbohydrates. pp. 447-469. Vol. 2a. Pigman, W. & Horton, D., Eds., Academic Press, New York, 1970.

WONG, K. K. Y. & SADDLER, J. N. Applications of hemicellulases in the food, feed and pulp and paper industries In: Hemicelluloses and Hemicellulases (Coughlan, M.P. and Hazlewood, G.P., Eds.), pp. 127-143. Portland Press, London, 1993

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

WOODWARD, J. Xylanases: functions, properties and applications. Top. **Enzyme and Fermentation Biotechnology**, 8: 9-30, 1984.

YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E. & HANG, Y. D. Enzymatic production of pentoses from the hemicellulose

fraction of corn residues, LWT, 39: 387-391, 2006.

YOSHIDA, H.; ANRAKU, S. I. & HAYASHIDA, S. Production and purification of a novel type of CMCase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* YH-78. **Agricultural and Biological Chemistry**, 46:75-82, 1982.

YOSHIOKA, H.; NAGATO, N.; CHAVANICH, S.; NILUBOL, N. & HAYASHIDA. Purification and properties of thermostable xylanases from *Talaromyces byssoclamydoides* YH-50. **Agricultural and Biological Chemistry**, 45:2425-2432, 1981.

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*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 74: 339-346, 2007.

ZHAO, Y.; CHANY, C. J.; SIMS, P. F. G. & SINNOTT, M. L. Definition of the substrate specificity of the 'sensing' xylanase of *Streptomyces cyaneus* using xylooligosaccharide and celooligosaccharide glycosides of 3,4-dinitrophenol. **Journal of Biotechnology**, 57: 181, 1997.

ZHENG, Y.; LIN, H.-M. & TSAO, G. T. Pretreatment for Cellulose Hydrolysis by Carbon Dioxide Explosion, **Biotechnology Progress**, 14: 890-896, 1998.