



**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ENDO-
1,4- β -XILANASE PRODUZIDA POR *Aspergillus niger* COM
CARACTERÍSTICAS DE INTERESSE INDUSTRIAL**

NATÁLIA VON GAL MILANEZI

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Molecular da
Universidade de Brasília como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre.

**Brasília-DF
MARÇO 2010**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, por ter me recebido e me incentivado, sempre deixando as portas de sua sala aberta para dúvidas acadêmicas e conversas sobre a vida. Mais do que um orientador, é um grande amigo.

Ao Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart, por desfazer meu medo da Bioquímica com suas palavras calmas e seu jeito paciente. Essa foi uma grande oportunidade de aprendizado ao lado de uma pessoa muitíssimo competente e delicada.

Aos pesquisadores Sônia Bão, Sônia Freitas, Adriane Milagres, Luciano Paulino, Carlos Roberto Félix e Eliane Noronha, pela imensa ajuda no desenvolvimento deste trabalho, seja pelo acesso a tecnologias, seja por palavras sábias ou de estímulo. Obrigada também ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, pela qualidade e estrutura oferecidas.

Às técnicas, Marísia Côrtes e Margarete Gomes, obrigada pelos incontáveis favores e por serem pessoas tão fáceis de conviver. Sentirei falta de encontrá-las todos os dias!

Agradecimentos especiais aos doutorandos Félix Siqueira e Diana Mendoza por me ensinarem sobre a arte de trabalhar com proteínas e por sempre atenderem prontamente aos meus pedidos de socorro. Eu não teria conseguido sem vocês!

Aos amigos Leonora, Liana, Ingrid, Sheila, Alan, Gaspar, Gilvan, Luís Vale e Natália Gurgel, obrigada por tornarem as horas no subsolo ensolaradas. Com vocês, a hora do lanche se transforma em muitas horas de conversa e alegria!

Aos colegas da Bioquímica, agradeço pelas vezes em que rimos, trabalhamos e tomamos café juntos. Obrigada Rayner, Gabriel, Rafael, Jax, Adriana, Anne, Elaine, Pedro, Carol, Humberto, Miguel e Nuno.

Ao grupo de Virologia da professora Cláudia Renata, pois se não fosse pelo exemplo de vocês talvez eu não estivesse aqui. Além de aprender muito sobre seriedade e competência, ganhei amigos para a vida toda.

Aos meus amigos e amigas de diversos cantos, obrigada pelas palavras de incentivo nas horas em que precisei. Levo um pedaço de cada um de vocês em meu coração.

Ao Rafael Brügger, meu grande companheiro, obrigada por sempre segurar minha mão e me fazer crer que sou capaz.

Finalmente, à minha amada família, que acreditou na minha paixão pelas Ciências da Vida e que me deu o suporte para que eu me tornasse uma pessoa plena e feliz. Pai, mãe, Catarina e Guilherme, vocês são o que eu tenho de mais importante nesta vida!

APOIO FINANCEIRO

Esta pesquisa foi desenvolvida com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio do fornecimento da bolsa de estudos, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), do INCT do Bioetanol e da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
ABREVIATURAS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A Biomassa Lignocelulósica e sua Degradação Enzimática	1
1.1.1 Xilanas	4
1.1.2 O Bagaço de Cana	6
1.2 Classificação e Aplicação de Xilanases	8
1.3 <i>Aspergillus niger</i>	12
1.4 Ferramentas do Estudo de Enzimas	14
2. JUSTIFICATIVAS	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo Geral	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Reagentes	18
4.2 Microrganismos e Condições de Cultivo	18
4.3 Preparo do Bagaço de Cana	18
4.4 Produção de Enzimas Xilanolíticas	19
4.5 Purificação da Xilanase	19
4.5.1 Ultrafiltração	19
4.5.2. Precipitação com Sulfato de Amônio	20
4.5.3 Cromatografia	20
4.6 Caracterização Enzimática	21
4.6.1 Quantificação de Proteínas	21
4.6.2 Determinação da Atividade Xilanolítica	21

4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	25
4.8 Eletroforese.....	26
4.8.1 SDS-PAGE.....	26
4.8.2 2-DE.....	27
4.8.3 Zimograma	28
4.9 Identificação de Proteínas por Espectrometria de Massa	28
4.10 Microscopia de Força Atômica	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Curva de Indução Enzimática	31
5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura	33
5.3 Cromatografia e Rendimento da Purificação.....	35
5.4 Caracterização Enzimática.....	38
5.5 Perfis Bidimensionais	51
5.6 Espectrometria de Massa.....	53
5.7 Microscopia de Força Atômica (MFA)	59
6. CONCLUSÕES	62
7. PERSPECTIVAS.....	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição da lignina, hemicelulose e celulose na parede celular de vegetais.....	1
Figura 2- Degradação enzimática de lignocelulose.....	3
Figura 3- Xilana hipotética mostrando os diferentes sítios de ataque para as xilanases microbianas.....	6
Figura 4- Estrutura da parede celular de resíduos agrícolas.....	7
Figura 5- Esquema das etapas de purificação de amostra contendo atividade xilanólítica produzida por <i>A. niger</i> crescido em meio líquido com bagaço de cana a 1%.....	21
Figura 6- Curva de indução ao longo do tempo da atividade xilanólítica de <i>A. niger</i> em meio líquido contendo bagaço de cana a 1 %.....	31
Figura 7- Eletroforese em gel de poliacrilamida (8-15%), sob condições desnaturantes, das alíquotas da curva de indução enzimática de <i>A. niger</i> em meio líquido contendo bagaço de cana a 1%, do início da incubação até o 16º dia.....	33
Figura 8- Microscopia eletrônica de varredura de amostras de bagaço de cana.....	34
Figura 9- Perfil cromatográfico do UFPM10 em coluna de exclusão molecular do tipo Sephadex G-50.....	35
Figura 10- Análise eletroforética por SDS-PAGE 12% e zimograma das etapas de purificação do Extrato Bruto de <i>A. niger</i> crescido em meio líquido contendo bagaço de cana a 1%.....	37

Figura 11- Efeito da temperatura na atividade xilanolítica de EB, UFPM10 e Xyl.....	41
Figura 12- Efeito do pH na atividade xilanolítica de EB, UFPM10 e Xyl a 45°C.....	42
Figura 13- Efeito do pH na atividade xilanolítica de EB, UFPM10 e Xyl a 50°C.....	42
Figura 14- Termoestabilidade a 45°C de EB e EB incubado com tampão acetato de sódio pH 4,5, L-triptofano e β -mercaptoetanol.....	48
Figura 15- Termoestabilidade a 45°C de UFPM10 e UFPM10 incubado com tampão acetato de sódio pH 4,5, L-triptofano e β -mercaptoetanol.....	49
Figura 16- Termoestabilidade a 45°C de Xyl e Xyl incubado com tampão acetato de sódio pH 4,5, L-triptofano e β -mercaptoetanol.....	49
Figura 17- Perfis bidimensionais de EB e de Xyl.....	52
Figura 18- Espectro de massa de Xyl por MALDI-TOF.....	53
Figura 19- Espectros de massas obtidos a partir do processamento do <i>spot</i> 1 do gel 2-DE da amostra Xyl.....	55
Figura 20- Estrutura de xilanase de <i>Streptomyces lividans</i> , característica da família GH10, e de <i>Trichoderma reesei</i> , com a típica estrutura da família GH11.....	58
Figura 21- Imagens de microscopia de força atômica de Xyl.....	60
Figura 22- Distribuição normal dos raios das partículas da figura 21, mensurados como a altura das estruturas obtidas por meio de microscopia de força atômica.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Etapas de purificação de uma amostra contendo atividade xilanolítica do fungo <i>A. niger</i> crescido em líquido contendo bagaço de cana a 1%.....	36
Tabela 2- Xilanases caracterizadas de fungos de diversas espécies.....	39
Tabela 3- Determinação da termoestabilidade das amostras de EB, UFPM10 e Xyl, a 45 e 50°C, e na presença de tampão acetato de sódio pH 4,5.....	43
Tabela 4- Efeito dos íons metálicos e SDS a 2 e 10 mM na atividade de Xyl.....	45
Tabela 5- Efeito dos modificadores químicos de aminoácidos na atividade de Xyl.....	46
Tabela 6- Efeito da incubação de EB, UFPM10 e Xyl com L-triptofano e β -mercaptoetanol.....	48
Tabela 7- Proteínas identificadas por PMF (<i>spot</i> 4) e PFF (<i>spots</i> 1 e 3) a partir do perfil bidimensional da amostra Xyl, proveniente do fungo <i>A. niger</i> crescido em bagaço de cana a 1%	54
Tabela 8- Resultado parcial da busca no programa MASCOT para os <i>spots</i> 1, 3 e 4.....	56

ABREVIATURAS

2-DE	Eletroforese Bidimensional
BDA	Batata Dextrose Ágar
CBM	Módulo de Ligação ao Carboidrato
CMC	Carboxi Metil Celulose
DEPC	Diethyl pirocarbonato
DNS	Ácido Dinitro Salicílico
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
DTP	Ditiodipiridina
DTT	Ditiotreitol
EB	Extrato Bruto
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDC	1-ethyl-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide
FP	Papel de Filtro
GH	Glicosil Hidrolase
HCA	Análise dos <i>clusters</i> hidrofóbicos
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidoxicinâmico
IEF	Focalização Isoelétrica
KM	Constante de Michaelis-Menten
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFA	Microscopia de Força Atômica
NBS	N-bromo-succinimide
PFF	<i>Peptide Fragment Fingerprinting</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprinting</i>
pNPG	Para-nitro-fenil- β -glicopiranosídeo
pNPX	Para-nitro-fenil- β -xilopiranosídeo
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - Poliacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TFA	Ácido Trifluoroacético
UFPM10	Ultrafiltrado da PM10
UI	Unidade Internacional
Vmax	Velocidade Máxima
Xyl	Xilanase purificada

RESUMO

A holocelulose é o componente mais abundante da biomassa vegetal e é composto principalmente por celulose, hemicelulose e pectina. O bagaço de cana é o maior resíduo da agroindústria brasileira e é uma fonte de carbono economicamente viável para microrganismos produzirem enzimas holocelulolíticas de aplicação industrial. Os fungos filamentosos são eficientes produtores de xilanases, e suas enzimas têm sido utilizadas em todo o mundo em processos industriais. No presente estudo, uma xilanase (Xyl) do fungo *Aspergillus niger* crescido sobre bagaço de cana foi purificada e caracterizada visando a sua aplicação industrial. A curva de indução enzimática do fungo indicou alta atividade xilanolítica a partir do segundo dia, mantendo-se constante ao longo de 50 dias. A enzima teve sua maior atividade a 50°C e pH 4,5. A meia-vida aumentou 2,3 vezes quando Xyl foi incubada com tampão acetato de sódio pH 4,5. Estes resultados apontam para a possibilidade de aproveitamento desta xilanase na indústria têxtil, na panificação e em biorefinarias. Diversos íons foram testados, mas nenhum foi capaz de estimular a atividade de Xyl. Dentre os modificadores químicos de aminoácidos, o NBS foi o maior inibidor da atividade de Xyl, sugerindo o envolvimento de L-triptofano na ligação ao substrato ou na catálise. O β -mercaptoetanol e o L-triptofano foram os maiores ativadores da enzima. Os valores de K_M e V_{max} encontrados foram de 47,08 mg/mL e 3,02 UI/mL, respectivamente, e há indícios de que Xyl dependa das ramificações da xilana para se ancorar ao substrato. A massa molecular estimada foi de cerca de 33 kDa, e o perfil bidimensional revelou a presença de isoformas ou enzimas múltiplas na amostra. Os resultados da espectrometria de massa sugerem que as xilanases são conservadas entre as espécies do gênero *Aspergillus*. As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostram a degradação do bagaço de cana por enzimas de *A. niger*. As imagens de microscopia de força atômica sugerem que Xyl pertença à família GH10, mas sua atividade holocelulolítica residual a classificam com GH11.

ABSTRACT

Holocelulose is the most abundant component of biomass and it is basically composed of cellulose, hemicellulose and pectin. Sugar cane bagasse is the major waste of Brazilian agroindustry and it is a cheap carbon source for microorganisms to produce holocellulolytic enzymes of industrial application. Filamentous fungi are good xylanase producers and their enzymes have been used in industrial processes all over the world. In this study a xylanase (Xyl) produced by the fungus *Aspergillus niger* over sugar cane bagasse was purified and characterized aiming its biotechnological application. The fungus produces higher amounts of xylanolytic activity from the second day on, and this activity remains relatively constant up to the 50th day. The enzyme presented the best activity at 50°C and pH 4,5. The half-life increased 2,3 times when Xyl was incubated with sodium acetate buffer pH 4,5. The results point out to the application of this enzyme in the textile industry, bakery and biorefineries. None of the tested ions was capable of increasing Xyl activity. NBS was Xyl major inhibitor, suggesting that L-tryptophan is involved in the substrate linkage or catalysis. β -mercaptoethanol and L-tryptophan were the best enzyme activators. The K_M and V_{max} values were 47,08 mg/mL and 3,02 UI/mL, respectively, and it is possible that Xyl depends on xylan side chains to stabilize over the substrate structure. The estimated molecular mass was about 33 kDa, and the 2D-electrophoresis analysis suggested the existence of multiple forms of xylanases. The mass spectrometry results suggest that the xylanases are conserved among the *Aspergillus* species. The electron scanning microscopy images show the degradation of sugar cane bagasse by *A. niger* enzymes. The atomic force microscopy images suggest that Xyl belongs to GH10, but its residual holocellulolytic activity classifies Xyl as a member of GH11 family.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Biomassa Lignocelulósica e sua Degradação Enzimática

A lignocelulose é o mais abundante componente da biomassa vegetal, compondo cerca de metade da matéria produzida pela fotossíntese (revisto por Pérez *et al.*, 2002). Ela representa uma importante fonte de matéria orgânica renovável e consiste, predominantemente, de uma mistura de polímeros de carboidratos (celulose e hemicelulose) e lignina (figura 1).

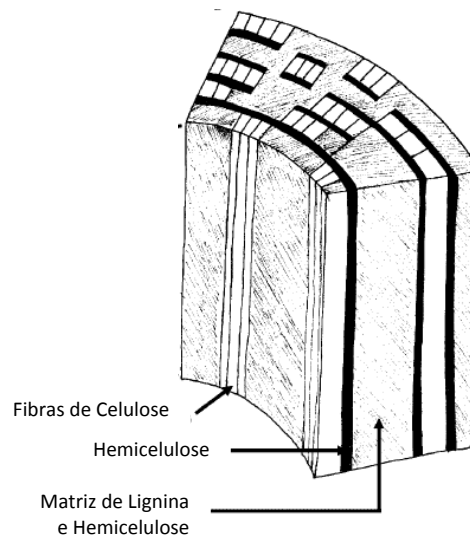


Fig.1. Distribuição da lignina, hemicelulose e celulose na parede celular de vegetais (adaptado de Pérez *et al.*, 2002)

A celulose é o componente mais abundante, correspondendo de 40 a 45% do peso seco das plantas. Geralmente, suas fibras encontram-se embebidas em uma matriz de hemicelulose (30-35%) e lignina (20-23%). Este polímero é linear e não-ramificado, formado por monômeros de glicose (figura 2) unidos por ligações β -1,4, o que confere uma estrutura primária

simples, e terciária complexa (Bhat & Hazlewood, 2001). O comprimento da molécula de celulose é determinado pelo número de unidades de glicana no polímero, chamado de grau de polimerização, e que varia de 2.000 a 27.000 unidades (Khandeparker & Numan, 2008).

As cadeias de celulose apresentam forte tendência de se agregarem em estruturas altamente ordenadas devido à sua constituição química e à sua conformação espacial. Além destas regiões cristalinas, a celulose também apresenta regiões amorfas, que são as mais suscetíveis ao ataque enzimático (Zhao *et al.*, 2007). Sua hidrólise completa requer a ação de três enzimas: endo- β -1,4-glicanase (EC 3.2.1.4, endocelulase), cuja ação randômica cria extremidades redutoras e não-redutoras por meio da quebra de ligações glicosídicas; exo- β -1,4-glicanase (EC 3.2.1.91, exo-glicosidase ou celobiohidrolase), que cliva moléculas de celobiose a partir da celulose ou de oligossacarídeos derivados de celulose, sendo específica para extremidades redutoras e não-redutoras; e β -glicosidase (EC 3.2.1.21, celobiase), que libera D-glicose das extremidades não-redutoras de oligossacarídeos provenientes da celulose, especialmente a celobiose (Jovanovic *et al.*, 2009).

A hemicelulose, por sua vez, é composta por um grande grupo de polissacarídeos heterogêneos (Wong *et al.*, 1988), de alta massa molecular, insolúveis em água, mas solúveis em soluções alcalinas (Nakamura, 2003). Apesar do baixo grau de polimerização (entre 100 e 200) (Andreaus *et al.*, 2008), a hidrólise deste grupo de carboidratos é mais complexa devido à natureza de seus polímeros, que contêm xilana, glicomanana ou estruturas de glicana.

A característica estrutural comum entre os diferentes tipos de hemiceluloses está na configuração da estrutura piranosídica, com a presença de hexoses ou pentoses com ligações do tipo β -1,4 na hidroxila do C-4 em orientação equatorial. Por essa razão, sua estrutura é linear, similar à da celulose. No entanto, diferentemente desta, as hemiceluloses apresentam grande variedade de açúcares nas ramificações (figura 2), o que

impede a formação de grandes regiões cristalinas como no caso da celulose. Apesar de serem mais acessíveis ao ataque químico ou enzimático, as ramificações do esqueleto do polissacarídeo bloqueiam a clivagem em determinados locais do polissacarídeo, tornando a hemicelulose muito mais complexa de ser degradada enzimaticamente. As enzimas xilanase (EC 3.2.1.8) e β -xilosidase (EC 3.2.1.37) atuam sobre esse substrato de forma análoga às celulases, mais especificamente endo-glicanase e β -glicosidase, respectivamente. As enzimas α -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α -glucuronidase (EC 3.2.1.139), acetilxilana esterase (EC 3.1.1.6), feruloil esterase (EC 3.1.1.73) e coumaroil esterase (EC 3.1.1.x) também devem estar presentes para desconstruir a estrutura da xilana e tornar efetiva a sua hidrólise (Jovanovic *et al.*, 2009).

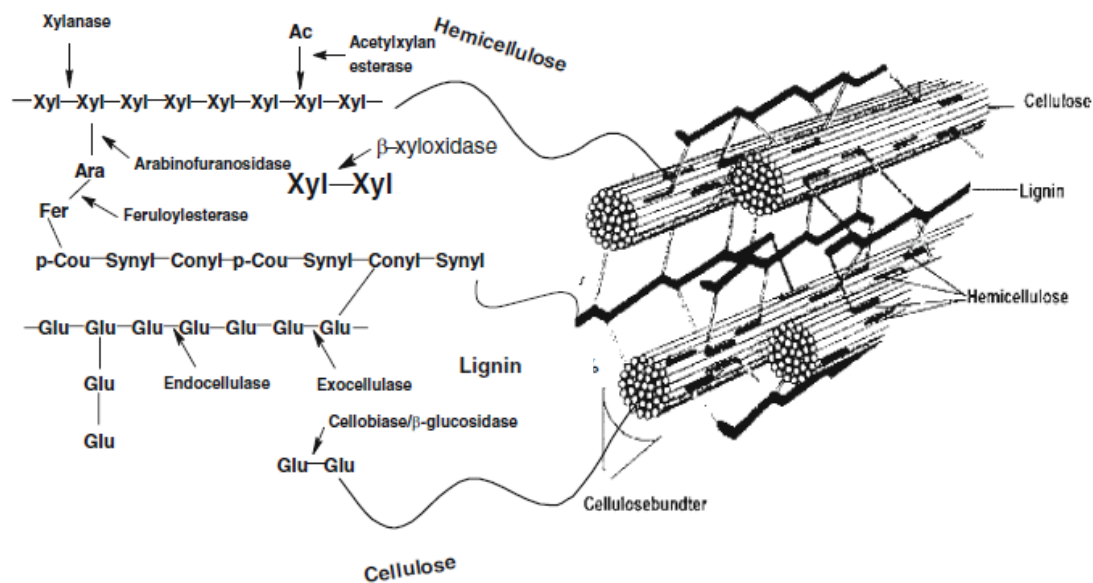


Fig.2. Degradação enzimática de lignocelulose (Khandeparker & Numan, 2008).

A lignina é uma estrutura complexa formada por unidades de fenilpropano (C_9) e está localizada na lamela média das células vegetais, agindo como um cimento entre elas (Andreaus *et al.*, 2008). A lignina apresenta diferentes grupos químicos ligados à sua estrutura de acordo com a espécie da planta, o que torna sua morfologia bi- ou tridimensional (Pereira *et al.*, 2007). O papel da lignina na parede celular das plantas é conferir

suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e o estresse oxidativo. Há evidências de que sua degradação ocorra por meio da ação de enzimas oxidativas (Jovanovic *et al.*, 2009).

A maior limitação para a conversão da biomassa lignocelulósica em produtos finais viáveis é a recalcitrância à sacarificação (Zhang *et al.*, 2006; Himmel *et al.*, 2007), causada pelo arranjo complexo da parede celular das plantas. O termo holocelulose é usado para descrever o conteúdo total de carboidrato da lignocelulose que se obtém após a remoção da lignina (Zhang *et al.*, 2006). Os resíduos florestais e agrícolas, o lixo sólido urbano, os restos de processamentos industriais e as plantas com alto teor energético são fontes de material holocelulósico que podem ser usadas para a obtenção de produtos químicos, combustíveis, alimentícios e de nutrição animal (Filho, 1998).

1.1.1 Xilanas

A hemicelulose é um polissacarídeo complexo, formado por unidades de D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose, L-arabinose e pelos ácidos 4-*O*-metil-glicurônico, D-galacturônico e metil-galacturônico. A união dos açúcares se dá por meio de ligações glicosídicas β -1,4 e, ocasionalmente, β -1,3 (Pérez *et al.*, 2002), mas ligações do tipo α -1,2, α -1-3 e α -1,5 também são encontradas entre resíduos de açúcares e a cadeia principal (Uffen, 1997). As hemiceluloses podem ser denominadas de xilanas, glicomananas, galactanas ou arabinanas, de acordo com o principal resíduo de açúcar presente em sua estrutura polimérica (Bhat & Hazlewood, 2001).

As xilanas são a principal classe de hemiceluloses em angiospermas, contribuindo com 15-30% do peso úmido total, mas são menos abundantes em gimnospermas, que contêm 7-12% de xilanas (Haltrich *et al.*, 1996). O seu principal componente é a D-xilose, um açúcar de cinco carbonos que pode ser convertido em fonte de energia em diversas células microbianas

(Biely, 1985). De acordo com as ramificações encontradas no esqueleto da xilana, esta pode ser denominada homoxilana, arabinoxilana, glicuronoxilana ou glicuronoarabinoxilana. As cadeias laterais determinam a solubilidade, a conformação física e a reatividade da molécula de xilana com outros componentes hemicelulósicos. Além disso, também apresentam grande influência no modo e na extensão da clivagem enzimática (Kulkarni *et al.*, 1999).

Consistente com sua química estrutural e cadeias laterais, as xilanas estão intercaladas, entremeadas e covalentemente ligadas a vários pontos da camada de lignina. Essa conformação favorece a formação de uma capa ao redor das fibras de celulose por meio de pontes de hidrogênio (Biely, 1985), limitando o acesso individual de enzimas para sua degradação (Murashima *et al.*, 2003). Esta camada de xilana pode ser importante para a manutenção da integridade da celulose *in situ* e para proteger as fibras contra a ação de celulases (Uffen, 1997).

Devido à sua estrutura heterogênea, a degradação da xilana exige, não apenas uma enzima, mas um complexo enzimático, como demonstrado na figura 3. As endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8) despolimerizam a xilana pela hidrólise randômica de sua estrutura, e as 1,4- β -D-xilosidases hidrolisam xilooligossacarídeos e xilobiose, liberando β -D-xilopiranosil. As cadeias laterais presentes na xilana são liberadas por α -L-arabinofuranosidases, α -D-glicuronidases, galactosidases e acetil-xilana esterases (Subramaniyan & Prema, 2002; Polizeli *et al.*, 2005). Estudos mostram que efeitos sinérgicos entre as enzimas xilanolíticas aumentam a susceptibilidade do polímero de xilana ao ataque enzimático (de Vries *et al.*, 2000). Da mesma forma, as xilanases provenientes de microrganismos crescidos sobre diferentes fontes de carbono também atuam em sinergia sobre a xilana, aumentando a quantidade de açúcares liberados durante a hidrólise (Moreira *et al.*, 2008). Esta característica se mostra vantajosa, pois, a acessibilidade de algumas ligações pode mudar durante o curso da hidrólise (Wong *et al.*, 1988).

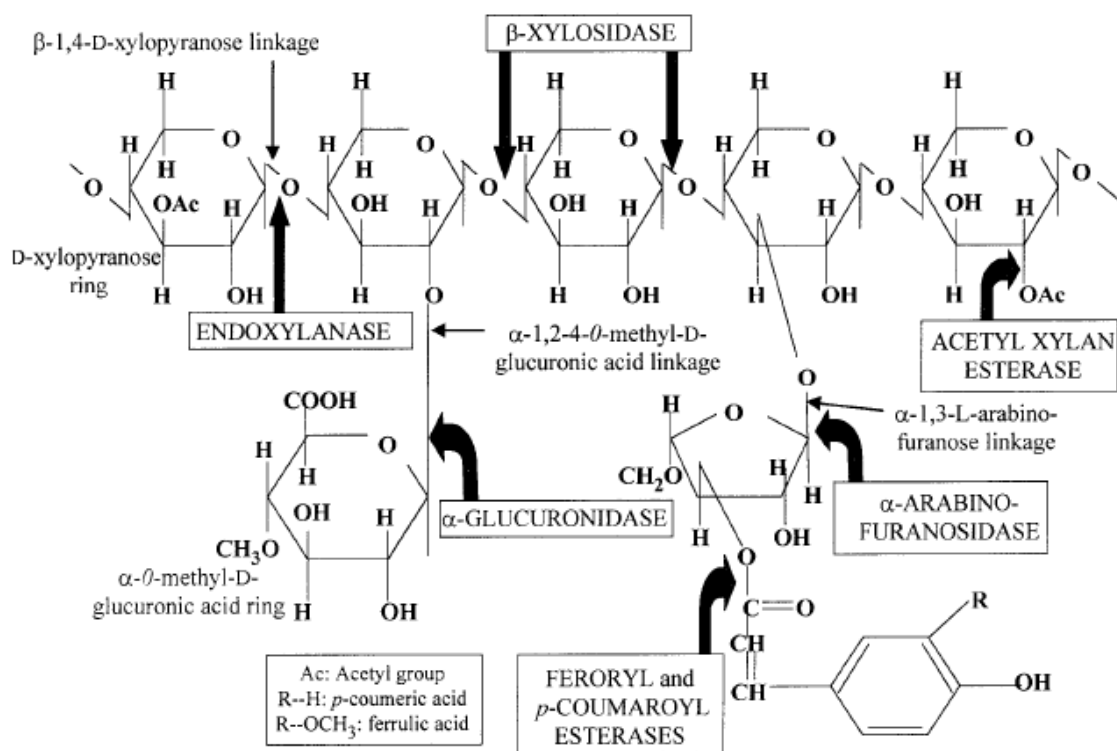


Fig.3. Xilana hipotética mostrando os diferentes sítios de ataque para as xilanases microbianas (Beg *et al.*, 2001)

As enzimas hemicelulolíticas hidrolisam os polissacarídeos a monômeros de xilose, manose, glicose, galactose, arabinose e pequenas quantidades de ramnose, ácido glicurônico, ácido metil glicurônico e ácido galacturônico (Khandeparker & Numan, 2008). Dentro do grupo das hemicelulases, as xilanases microbianas (1,4- β -D-xilana xilanohidrolases) são os catalisadores preferidos pela indústria para a hidrólise da xilana devido à sua alta especificidade, baixa perda de substrato e baixa geração de resíduos (Michelin *et al.*, 2008).

1.1.2 O Bagaço de Cana

Os resíduos agroindustriais representam uma fonte rica em carbono para o crescimento de fungos filamentosos e para a produção de enzimas que degradam a estrutura holocelulolítica, denominadas holocelulases (figura 4) (Zhang *et al.*, 2006). A xilana constitui um terço de todas as fontes

de carbono renováveis do planeta, e quantidades consideráveis deste biopolímero são encontradas em resíduos sólidos agroindustriais (Chidi *et al.*, 2008).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma importante *commodity* para vários países em desenvolvimento, como o Brasil e a Índia, os dois maiores produtores de cana-de-açúcar do mundo (Kadam, 2002).

O bagaço de cana-de-açúcar é considerado o maior resíduo da agroindústria brasileira (Portal Agrario, 2005), e constitui-se de material fibroso resultante da extração do sumo do açúcar da cana. Ele apresenta composição em peso seco de aproximadamente 42% de celulose, 28% de hemicelulose, 22% de lignina e 8% de ceras vegetais e ácidos orgânicos (Quensanga & Picard, 1988). Estima-se que a quantidade deste resíduo agrícola gerado por ano esteja em torno de $317-380 \times 10^6$ toneladas (Portal Agrario, 2005). Apesar de ser usado para a geração da energia interna dos engenhos por combustão, cerca de 15 a 25% do bagaço não são aproveitados (Kadam, 2002; Khan *et al.*, 2004). O bagaço empilhado tem baixo valor econômico e constitui um problema ambiental para os engenhos de açúcar e regiões ao redor, especialmente se permanecerem por muito tempo, devido ao risco de combustão espontânea da pilha (Dawson *et al.*, 1990).

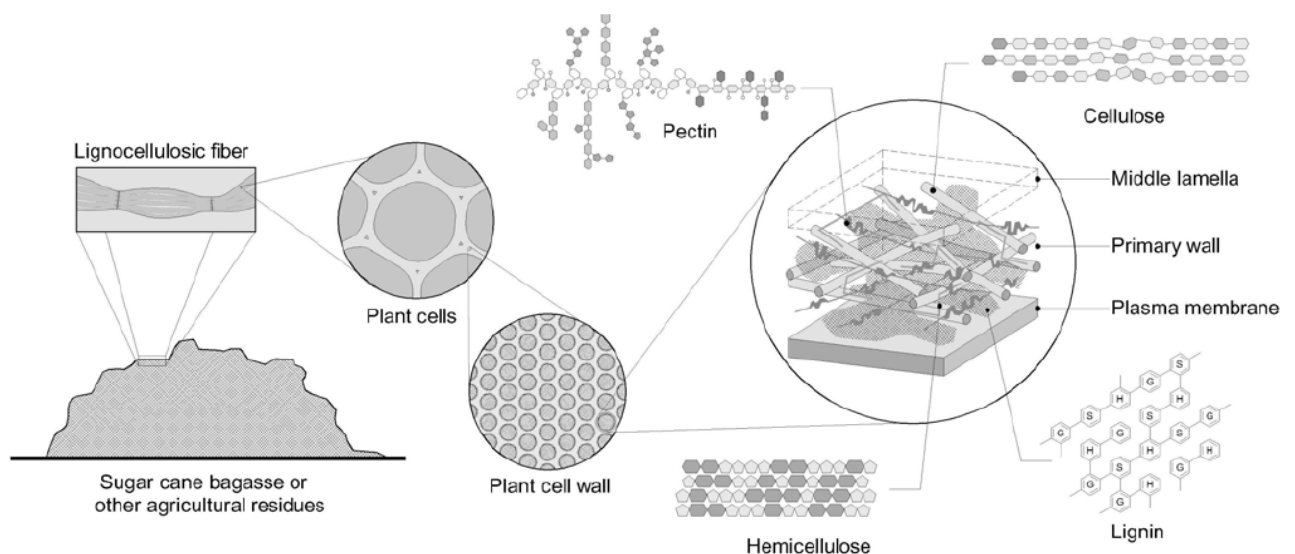


Fig.4. Estrutura da parede celular de resíduos agrícolas (Siqueira & Filho, 2010).

A fonte de carbono é um dos componentes essenciais para o meio de fermentação de microrganismos, pois exerce grande influência sobre seu metabolismo e crescimento celular (Laxmi *et al.*, 2008). Neste contexto, o bagaço de cana surgiu como uma alternativa economicamente viável de fonte de carbono para fungos filamentosos, bactérias e leveduras produzirem enzimas lignocelulolíticas de aplicação industrial. Este esforço visa à redução dos estoques de resíduos mundiais concomitante com o desenvolvimento de tecnologias mais limpas para o meio ambiente.

1.2 Classificação e Aplicação de Xilanases

As Glicosil hidrolases (GHs) são conhecidas por sua habilidade de hidrolisar os polissacarídeos da biomassa lignocelulósica. As xilanases são glicosil hidrolases que catalisam a hidrólise de ligações 1,4- β -D-xilosídicas da cadeia principal da xilana (Collins *et al.*, 2005).

O sistema de classificação CAZy (Carbohydrate-Active enZymes - www.cazy.org) é baseado no princípio da similaridade de seqüências e já apresenta mais de 100 famílias de GHs reconhecidas pelo Enzyme Commission (EC). Os fungos produzem enzimas que estão presentes em 20 dessas famílias, apresentando todas as atividades críticas necessárias para o processo de hidrólise da biomassa (Jovanovic *et al.*, 2009). Enzimas da mesma família apresentam estrutura tridimensional e mecanismos moleculares similares (Collins *et al.*, 2005).

Atualmente, sabe-se que a eficiência catalítica de GHs é aumentada na presença de módulos de ligação ao carboidrato (CBMs), pois esses podem apresentar mais de um sítio ligante (Henshaw *et al.*, 2004) e exibir uma gama de especificidades à substratos. A ligação do CBM ao polissacarídeo específico aumenta a concentração da hidrolase na superfície do substrato polimérico e mantém a enzima próxima ao substrato, levando a

uma degradação mais rápida do polissacarídeo (Andreaus *et al.*, 2008). A remoção proteolítica ou do elemento genético que codifica o CBM do domínio catalítico reduz a atividade enzimática sobre substratos insolúveis, como é o caso da xilana (Boraston *et al.*, 2004).

Outro tipo de classificação é feito com base na homologia da seqüência de aminoácidos e análise dos *clusters* hidrofóbicos (HCA). De acordo com a HCA, as xilanases estão subdivididas em duas famílias, F e G, análogas às famílias 10 e 11 das GHs, compreendendo xilanases de alta (35 kDa) e baixa (20 kDa) massa molecular, respectivamente (Henrissat & Bairoch, 1993; Kulkarni *et al.*, 1999).

Wong *et al.* (1988) classificaram as xilanases com base em suas propriedades físico-químicas, e propuseram a existência de dois grupos: as xilanases de baixa massa molecular (menores que 30 kDa) e pI básico, e as de alta massa molecular (maiores que 30 kDa) e pI ácido. Esta classificação mantém relação com as classificações anteriores (11/G e 10/F). As xilanases da família 10, com maior massa molecular e pI baixo exibem maior versatilidade catalítica do que as xilanases da família 11, com baixo peso molecular e pI alto, sendo capazes de hidrolisar xilanas altamente ramificadas mais eficientemente (Kapoor *et al.*, 2007).

Na natureza, diversos organismos desenvolveram estratégias para a degradação mais completa de polissacarídeos, como a formação de xilanossomas, descritos como complexos xilanolíticos de alta massa molecular, e a produção de enzimas com centros catalíticos “relaxados” ou de polipeptídios contendo domínios multifuncionais. As hidrolases multifuncionais já foram relatadas e apresentam grande potencial sinérgico na degradação de substratos complexos. (Fan *et al.*, 2009). As enzimas D-xilosidase e L-arabinofuranosidase são um exemplo de enzimas bifuncionais. Elas são espacialmente similares, de forma que suas ligações glicosídicas e seus grupamentos hidroxil podem ser sobrepostos. (Jordan & Li, 2007; Lee *et al.*, 2003).

As vantagens do uso de enzimas ao invés de produtos químicos são a alta eficiência de conversão, a ausência de perda de substrato devido às modificações químicas, e o uso de condições de operação físico-químicas mais moderadas e não-corrosivas (temperatura de reação mais baixa, pH quase neutro e uso de reagentes biodegradáveis e não-tóxicos), o que torna o processo mais amigável ao meio ambiente (Andreaus *et al.*, 2008).

As xilanases começaram a ter aplicação tecnológica na década de 80 e hoje, juntamente com celulasas e pectinases, são responsáveis por 20% do mercado mundial de enzimas (Polizeli *et al.*, 2005). As xilanases comerciais já são produzidas industrialmente no Japão, Finlândia, Alemanha, Irlanda, Dinamarca, Canadá e Estados Unidos. Sua comercialização tem finalidade biotecnológica na indústria alimentícia, na extração, clarificação e estabilização de sucos de frutas e vegetais, na redução da viscosidade e incremento da recuperação de aromas, óleos essenciais, sais minerais, e vitaminas (Polizeli *et al.*, 2005).

A demanda mundial por enzimas vem crescendo ao longo dos anos. Em 1995, as enzimas de aplicação industrial movimentaram mais de 1 bilhão de dólares (Bhat, 2000). Este valor subiu para 1,6 bilhões no ano 2000, 2 bilhões em 2005, atingindo valores acima dos 5 bilhões de dólares em 2009, de acordo com pesquisas do Freedonia Group (www.fredoniagroup.com). As hidrolases representam 75% destas enzimas industriais.

Na indústria farmacêutica, o complexo xilanolítico é utilizado na formulação de produtos dietários ou medicamentos para tratar problemas digestivos; na indústria química, os produtos hidrolíticos da xilana podem ser convertidos em combustíveis líquidos, solventes e adoçantes. Entretanto, seu principal uso encontra-se na indústria do papel, onde são utilizadas no branqueamento da polpa de celulose (Medeiros *et al.*, 2007; Polizeli *et al.*, 2005). Para esta finalidade, é necessário que as xilanases sejam livres de celulasas, a fim de se evitar a danificação das fibras da polpa (Haltrich *et al.*, 1996). As xilanases com alta especificidade ou contendo níveis insignificantes de atividade celulolítica podem ser obtidas usando métodos

de separação adequados, organismos geneticamente modificados para a produção exclusiva dessa enzima ou selecionando condições de cultivo apropriadas para a obtenção das enzimas desejadas (Balakrishnan *et al.*, 1992).

As xilanases também encontram aplicação nas biorefinarias, participando da bioconversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis. Apesar de a celulose ser o polímero mais abundante da biomassa, a remoção da hemicelulose altera substancialmente a estrutura e a acessibilidade da lignocelulose às outras enzimas participantes do processo (Merino & Cherry, 2007).

As enzimas industriais podem ser produzidas em meios de cultura líquidos ou sólidos. Gawande e Kamat (1999), comparando as duas formas de cultivo de *A. niger* em bagaço de cana, constataram que o meio líquido, apesar de ter atividade xilanolítica 30% menor em relação ao meio sólido, apresenta uma razão xilanase/CMCase maior e uma quantidade menor de proteínas extracelulares. Resultados como esse explicam o motivo de 80-90% das xilanases comerciais serem produzidas em meios de culturas líquidos submersos (Polizeli *et al.*, 2005).

Outro motivo de o meio líquido ser o mais amplamente utilizado é o fato de permitir uma maior intensificação dos processos e um melhor nível de automação. No mais, o tratamento de materiais lignocelulósicos em meio aquoso (autohidrólise ou tratamento hidrotermal) em condições otimizadas leva à solubilização de hemiceluloses, resultando em uma fase sólida rica em celulose e lignina (Garrote *et al.*, 1999). Essa fase sólida pode ser submetida a processamentos posteriores para a obtenção de diversos produtos comerciais (Michelin *et al.*, 2008).

As xilanases são extracelulares e induzidas por seu substrato, o que determina a importância da escolha do meio nutricional (Kulkarni *et al.*, 1999; Subramaniyan & Prema, 2002). Quando a fermentação da xilana ocorre em substratos complexos e heterogêneos, vários fatores exercem um efeito

conjunto no nível de expressão dessas enzimas. Entre eles estão a acessibilidade ao substrato, a taxa e a quantidade de xilooligossacarídeos liberados, a natureza química e a quantidade de xilose liberada que, na maioria dos casos, atua como um inibidor da síntese de xilanase. Em geral, a indução da xilanase é um fenômeno complexo e o nível da resposta de um indutor varia de acordo com o organismo (Kulkarni *et al.*, 1999).

A caracterização das enzimas xilanolíticas é importante para sua aplicação biotecnológica. Um dos fatores determinantes do uso em larga escala de xilanases é, certamente, o custo. Muitos processos industriais podem ser desenvolvidos utilizando os fungos ou outros microrganismos como fontes de enzimas e a eficiência pode, muitas vezes, ser melhorada com o uso de enzimas puras. (Chidi *et al.*, 2008). Nos últimos anos tem havido um progresso considerável na identificação de parâmetros importantes para a obtenção de altas concentrações e produtividade de xilanases, o que influencia economicamente seu processo de produção. O custo da fonte de carbono, bem como dos outros componentes do meio, tem um papel importante na economia da produção de xilanases (Haltrich *et al.*, 1996).

1.3 *Aspergillus niger*

Uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, é capaz de produzir xilanases (Wong *et al.*, 1988). Destes organismos, os fungos filamentosos são produtores particularmente interessantes dessas enzimas de um ponto de vista industrial devido ao fato de secretarem xilanases no meio, eliminando a necessidade de lise celular. Além disso, os níveis de xilanases de culturas de fungos são, geralmente, muito mais altos do que os apresentados em cultivos de leveduras e bactérias (Haltrich *et al.*, 1996). Acredita-se que a

habilidade de degradar a lignocelulose eficientemente esteja associada à capacidade de crescimento micelial, que permite que o fungo acesse regiões internas do substrato (Hammel, 1997).

Diversos fungos já foram isolados de resíduos agroindustriais e testados quanto à produção de holocelulases. Duas espécies do gênero *Aspergillus*, *A. oryzae* e *A. terreus*, em estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa, apresentaram atividade xilanolítica mais expressiva quando comparados com espécies de outros gêneros, como *Penicillium citrinum*, *Fusarium verticillioides* e *Paecilomyces lilacinum* (Siqueira *et al.*, 2010).

Na indústria, os gêneros mesofílicos *Trichoderma* e *Aspergillus* são os mais utilizados para a produção de xilanases (Haltrich *et al.*, 1996). Para a indústria de polpa e papel, especificamente, xilanases de diversas espécies de *Aspergillus* têm sido investigadas por apresentarem potencial de aplicação (Angayarkanni, *et al.*, 2006; Rizzatti, *et al.*, 2001; Sandrim *et al.*, 2005), principalmente por apresentarem apenas atividade residual de celulases (Gawande & Kamat, 1999).

A espécie *Aspergillus niger*, em especial, é amplamente utilizada em processos biotecnológicos para a produção de ingredientes alimentícios, farmacêuticos e para a produção de outras enzimas de aplicação industrial. Em seu *habitat* natural, linhagens de *A. niger* secretam grandes quantidades de uma variedade de enzimas necessárias para a liberação de nutrientes a partir de biopolímeros. (Pandey *et al.*, 1999). Uma importante vantagem associada ao uso deste fungo é o manuseio seguro pelo homem durante a produção de enzimas e ácidos orgânicos (Schuster *et al.*, 2002). Outra característica com grande potencial exploratório é o metabolismo marcadamente versátil desta espécie, o que possibilita seu crescimento sobre uma ampla gama de substratos e sob diversas condições ambientais (Raj *et al.*, 1992).

1.4 Ferramentas do Estudo de Enzimas

O desenvolvimento da pesquisa biológica pode trazer grande impacto no desenvolvimento de rotas economicamente viáveis para a produção de combustíveis e outros produtos derivados da biomassa lignocelulósica. Dentre os novos avanços estão o desenvolvimento de plantas mais suscetíveis ao processamento, enzimas mais eficientes na hidrólise de plantas e microrganismos capazes de converter hexoses e pentoses em combustíveis e químicos (Jovanovic *et al.*, 2009).

Mais de 25 genomas de fungos já foram completamente seqüenciados e diversos projetos estão em andamento. A posse desses dados facilita o entendimento da expressão protéica, das funções associadas e da forma de regulação metabólica desses organismos. Com isso, informações importantes sobre mecanismos de colonização, interações planta-fungo, patogênese e adaptação ecológica (Bhadoria *et al.*, 2007) seriam desvendados, propiciando diversas aplicações destes organismos em benefício do meio ambiente e do bem-estar humano.

A análise proteômica de um organismo é uma ferramenta que propicia a identificação e quantificação das proteínas que influenciam os processos metabólicos de determinados organismos. Com ela é possível analisar as mudanças que ocorrem durante o ciclo celular em resposta aos fatores ambientais, sendo útil no estudo de sistemas biológicos dinâmicos e complexos.

O secretoma é uma sub-fração do proteoma total de um organismo (Tjalsma *et al.*, 2000), sendo definido como o conjunto de enzimas e demais proteínas secretadas por um determinado tipo ou conjunto de células, bem como o aparato responsável pela secreção dessas proteínas. A análise do secretoma de fungos filamentosos é importante para a identificação das enzimas hidrolíticas extracelulares que participam da degradação de

compostos lignocelulósicos em resposta a diferentes fontes de carbono e nitrogênio, visando a sua aplicação tecnológica (Bouws *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICATIVAS

O *Aspergillus niger* é um fungo filamentosamente encontrado em material orgânico em decomposição. Trata-se de um microrganismo de fácil manuseio, pois se adapta facilmente às condições ambientais amenas e ligeiramente quentes, o que propicia sua aplicação na indústria (Raj *et al.*, 1992). Quando crescido em bagaço de cana, é capaz de produzir enzimas extracelulares que degradam hemicelulose, principalmente xilanase.

O bagaço de cana, por sua vez, é um resíduo abundante da agricultura brasileira, visto que o Brasil é um dos maiores produtores de cana-de-açúcar do mundo (Kadam, 2002). O desenvolvimento de tecnologias que têm o bagaço e outros resíduos agrícolas como fonte de energia tem sido muito comum nas últimas décadas e é uma tendência cada vez mais abrangente no mundo. As enzimas também têm sido alvo de pesquisa em diversas áreas do conhecimento e sua aplicação comercial já pode ser vista em diversos países, principalmente da Europa e América do Norte. Entre seus usos estão a panificação, a produção de vinhos e sucos, as indústrias farmacêutica e têxtil e, muito comum para as xilanases, a indústria de polpa e papel.

O propósito central da presente pesquisa é purificar e caracterizar uma xilanase produzida por *A. niger* em resposta ao crescimento em bagaço de cana, visando ao seu aproveitamento em diversos processos industriais. A investigação aprofundada de enzimas traz informações acerca da ecologia do fungo, sua interação com o meio e com o substrato usado como fonte de energia. Este empenho visa a substituir químicos tradicionalmente utilizados em processos industriais diversos e contribuir para as pesquisas realizadas no país. Os resultados deste projeto poderão auxiliar na aplicação em maior escala de tecnologias baseadas em recursos nacionais e o desenvolvimento de práticas industriais mais limpas e menos lesivas ao meio ambiente.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estimular a produção, purificar e caracterizar uma xilanase de *Aspergillus niger* crescido em bagaço de cana visando ao aproveitamento deste resíduo agrícola e a aplicação tecnológica da enzima.

3.2 Objetivos Específicos

- Promover o crescimento de *A. niger* em meio de cultura líquido, tendo o bagaço de cana como fonte de carbono;
- Obter a curva de indução enzimática de *A. niger*;
- Caracterizar a atividade xilanolítica de *A. niger*;
- Realizar a caracterização cinética, bioquímica e físico-química da xilanase purificada;
- Identificar o perfil bidimensional do fungo sob as condições de cultivo;
- Utilizar a microscopia eletrônica de varredura (MEV) na observação dos efeitos de *A. niger* sobre o bagaço de cana;
- Utilizar a microscopia de força atômica (MFA) na observação da estrutura da xilanase purificada

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os substratos xilana de aveia, CMC, manana, pectina, pNPG e pNPX foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co., e a resina Sephadex G-50, da GE Healthcare.

4.2 Microrganismos e Condições de Cultivo

Para esta pesquisa foi utilizado o isolado *A. niger* van Thiegen LPM93 (*et al.*, 2003). Este fungo foi isolado de troncos de madeira em decomposição da Reserva Natural do INPA (Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia) e apresentou relevante atividade xilanolítica em comparação com outras espécies isoladas. O microrganismo foi plaqueado em meio de cultura BDA (10% batata, 1% dextrose e 2% ágar) e mantido à temperatura ambiente até sua esporulação.

4.3 Preparo do Bagaço de Cana

O bagaço de cana provém da espécie *Saccharum officinarum* e foi obtido na Fazenda Monjolo, em Cabeceiras-GO, no ano de 2008. O material foi lavado, autoclavado e novamente lavado em água corrente abundante. O

bagaço de cana limpo foi então secado em estufa a 60°C e moído a um pó fino.

4.4 Produção de Enzimas Xilanolíticas

A produção de xilanases foi realizada em frascos de 1 litro contendo, em cada: 3,5 g de KH_2PO_4 ; 1,0 g de K_2HPO_4 ; 0,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g de extrato de levedura e 5 g de bagaço de cana em volume final de 500 mL (1% m/v). Este meio de cultura foi autoclavado por 20 minutos. Os esporos de *A. niger* no meio BDA foram recolhidos utilizando solução de NaCl 0,9% até a obtenção de uma suspensão conidial de 10^8 células/mL. O volume de esporos inoculado por frasco foi de 5 mL. Este meio foi mantido sob agitação constante de 120 rpm e à 28°C. Após o período de incubação de seis dias, que foi determinado pela curva de indução enzimática como sendo o suficiente para a produção de xilanases, os meios foram filtrados a vácuo com papel filtro comum a fim de reter a massa micelial do fungo. O sobrenadante obtido, aqui chamado de extrato bruto (EB), foi preservado a 5°C na presença de azida sódica.

4.5 Purificação da Xilanase

4.5.1 Ultrafiltração

O EB foi concentrado por ultrafiltração em membrana de retenção de 10 kDa (PM10 Millipore Co., MA, EUA), pressão de 2,5 kgf/cm² e temperatura de 10°C. Foram obtidas duas frações: o concentrado e o ultrafiltrado (figura 5).

4.5.2. Precipitação com Sulfato de Amônio

O volume do ultrafiltrado foi saturado com 60% (m/v) de sulfato de amônio macerado, que foi adicionado aos poucos, com leve agitação e a 5°C. Após aproximadamente 15 horas de incubação com sulfato de amônio, o líquido foi submetido à centrifugação por 20 minutos e 4.500 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscendido em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7 em volume 10 vezes menor ao volume inicial do ultrafiltrado. Esta solução foi chamada de UFPM10.

4.5.3 Cromatografia

A amostra de UFPM10 foi aplicada em coluna cromatográfica de exclusão molecular do tipo Sephadex G-50 (60,0 X 2,7 cm), a 28°C, previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 com NaCl 0,15 M e azida sódica. Frações de 5,0 mL foram coletadas com fluxo de 20 mL/h. Foram feitos ensaios enzimáticos para a detecção da atividade xilanolítica de cada fração e leitura da absorbância a 280 nm para a determinação da quantidade total de proteínas presentes. O pico que apresentou a mais alta atividade xilanolítica foi denominado Xyl.

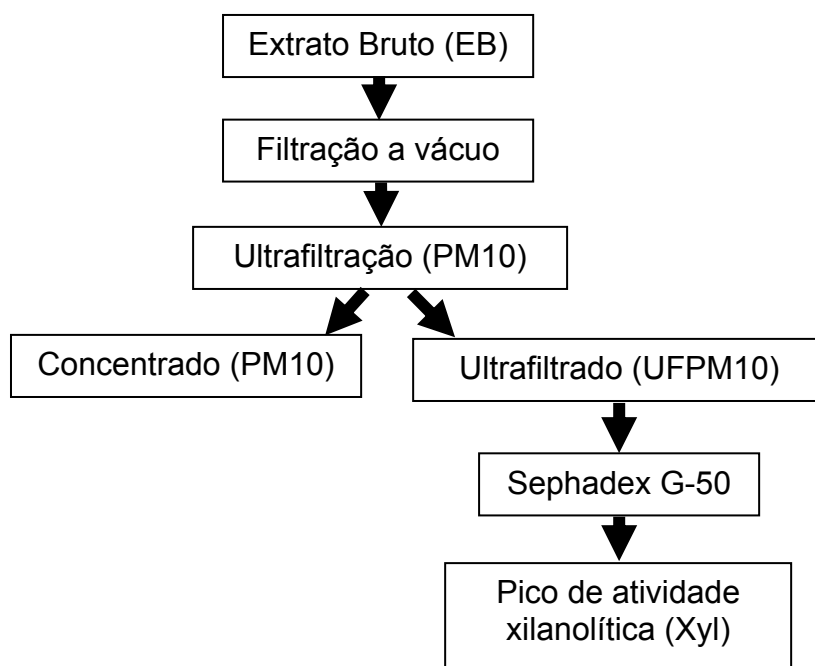


Fig. 5. Esquema das etapas de purificação de amostra contendo atividade xilanolítica produzida por *A. niger* crescido em meio líquido com bagaço de cana a 1%

4.6 Caracterização Enzimática

4.6.1 Quantificação de Proteínas

A quantidade de proteínas presentes no EB, no UFPM10 e em Xyl foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando a albumina bovina sérica como padrão. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.2 Determinação da Atividade Xilanolítica

As atividades xilanolíticas do EB, do UFPM10 e de Xyl foram determinadas utilizando xilana solúvel de aveia como substrato. Seu preparo utilizou 1 g de xilana, 20 mL de NaOH 1 M, 20 mL de HCl 1 M e 60 mL de tampão acetato de sódio 100 mM. Esta preparação foi centrifugado a 12.350

g por 15 minutos, a fim de se remover a fração insolúvel da xilana. O pH foi ajustado para 5,0.

Em cada ensaio, foram incubados 100 μL de substrato e 50 μL da amostra enzimática a 50°C durante 30 minutos. Transcorrido o tempo de reação, 300 μL de ácido dinitrosalicílico (DNS) foram adicionados. O DNS (Miller, 1959) detecta a quantidade de açúcar redutor, no caso, a xilose, liberada durante o ensaio. As soluções com o reagente foram incubadas a 100°C durante 10 minutos. Ao final, 1500 μL de água destilada foram adicionados e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. As atividades enzimáticas foram expressas como 1 μMol de açúcar redutor formado por minuto (Unidade Internacional - UI) por 1 mL de enzima ($\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.2.1 Curva de Indução Enzimática

A curva de indução enzimática foi determinada por meio de alíquotas dos meios de cultura retiradas ao longo de 50 dias durante o crescimento do fungo, dos quais os primeiros 16 dias foram consecutivos, e os outros, intercalados por períodos variados. A fase líquida foi separada da sólida por centrifugação. As alíquotas foram testadas quanto à atividade xilanolítica e quanto à quantidade de proteínas presentes no sobrenadante. O crescimento do fungo no meio de cultura e a retirada das alíquotas foram feitos em triplicata.

4.6.2.2 Efeito da Temperatura na Atividade Xilanolítica

Foram realizados ensaios enzimáticos de xilanase com o EB, o UFPM10 e Xyl a 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70°C, nas condições previamente descritas.

4.6.2.3 Efeito do pH na Atividade Xilanolítica

As amostras enzimáticas de EB, UFPM10 e Xyl foram testadas quanto à sua atividade xilanolítica na presença de diferentes tampões, em diferentes faixas de pH: tampão acetato de sódio (pH 3,0 – 6,0), tampão fosfato de sódio (pH 6,0 – 7,5) e tampão Tris HCl (pH 7,0 – 9,0). Foram adicionados 25 µL de enzima, 50 µL de xilana 1% e 75 µL de tampão 50 mM em cada ensaio. A força iônica dos tampões foi previamente ajustada com NaCl.

4.6.2.4 Influência de Íons Metálicos na Atividade Xilanolítica

A amostra Xyl foi incubada por 30 minutos com soluções contendo íons metálicos, SDS e EDTA separadamente, e depois testada quanto à sua atividade xilanolítica nas concentrações de 2 e 10 mM. As soluções utilizadas foram: MgCl₂, MgSO₄.7H₂O, AlCl₃, HgCl₂, NaCl, ZnSO₄, CaCl₂, KCl, FeCl₃, FeSO₄, CuSO₄, MnCl₂, DTT, CuCl₂, AgNO₃, CoCl₂. Em cada ensaio foram adicionados 25 µL de enzima, 50 µL de xilana 1% e 75 µL de solução.

4.6.2.5 Influência de Modificadores Químicos de Aminoácidos

A amostra Xyl foi incubada por 30 minutos com soluções contendo modificadores químicos de aminoácidos e testada quanto à atividade xilanolítica a fim de se verificar a atuação destes como inibidores ou ativadores. Foram testadas soluções de: DTP, DTNB, EDC, DEPC, triptofano, cisteína, iodoacetamida, DTT, β-mercaptoetanol e NBS. Em cada ensaio foram adicionados 25 µL de Xyl, 50 µL de xilana 1% e 75 µL de solução. As concentrações dos ensaios variaram de 0,5 a 10 mM.

4.6.2.6 Avaliação da Termoestabilidade da Atividade Xilanolítica

O EB, o UFPM10 e Xyl foram incubados nas temperaturas em que demonstraram maior atividade xilanolítica: 45, 50 e 55°C. Alíquotas foram retiradas e testadas em relação à atividade xilanolítica em intervalos de tempo até que sua meia-vida fosse determinada.

4.6.2.7 Avaliação da Termoestabilidade da Atividade Xilanolítica em Tampão Acetato de Sódio 50 mM pH 4,5

As amostras de EB, UFPM10 e Xyl foram incubadas na presença de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 e temperaturas de 45 e 50°C. Alíquotas foram retiradas e testadas quanto à atividade xilanolítica em intervalos de tempo para a determinação de sua meia-vida.

4.6.2.8 Determinação da Termoestabilidade na Presença de Triptofano e β -Mercaptoetanol

As amostras enzimáticas foram incubadas com triptofano e β -mercaptoetanol 10 mM, a 45°C, e testadas quanto à sua atividade xilanolítica em intervalos de tempo para determinação de sua meia-vida.

4.6.2.9 Determinação da Especificidade Enzimática

A amostra Xyl foi incubada com diferentes substratos, incluindo CMC (carboxi metil celulose) 1%, FP (papel de filtro), Avicel (celulose microcristalina) 1%, Manana 0,5%, Pectina 1%, pNPG (para-nitro-fenil- β -glicopiranosídeo) 0,01 M e pNPX (para-nitro-fenil- β -xilopiranosídeo) 0,01 M para a determinação de especificidade enzimática.

Os ensaios de CMCase, Mananase e Pectinase foram realizados nas mesmas condições descritas para o ensaio de xilanase, bem como o ensaio de Avicelase, este, no entanto, com tempo de incubação de duas horas e agitação de 80 rpm . No ensaio de detecção de atividade de FPase, um pedaço de papel de filtro de 1 X 6 cm foi incubado por 1 hora a 50°C com 150 µL de Xyl. Todos esses ensaios tiveram suas atividades determinadas pelo método do DNS. Os ensaios de pNPG e pNPX utilizaram 50 µL do substrato, 100 µL de Xyl e 850 µL de água destilada. Após 10 minutos de incubação a 50°C, adicionou-se 1 mL de Na₂CO₃. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 410 nm.

4.6.2.10 Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Para a determinação do Km e de Vmax de Xyl, foram feitos dois ensaios com concentrações crescentes de substrato: um com xilana solúvel variando de 5 a 45 mg/mL, e outro com xilana insolúvel entre 0,5 e 6 mg/mL. A xilana solúvel foi previamente dialisada contra água destilada e liofilizada, enquanto que a xilana insolúvel foi lavada várias vezes com água destilada e, posteriormente, submetida à liofilização.

Em cada ensaio foram adicionados 50 µL de Xyl e 100 µL da respectiva xilana. Os parâmetros cinéticos foram então obtidos por meio de regressão não-linear, utilizando-se o *software* Enzifitter (Leatherbarrow, 1999).

4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com o objetivo de se comparar o grau de degradação enzimática de *A. niger* sobre o bagaço de cana ao longo dos dias e analisar as regiões de ataque preferenciais, utilizou-se a Microscopia Eletrônica de Varredura

(MEV). O bagaço de cana do meio de cultura líquido retido pela filtração à vácuo previamente descrita, após os seis dias de incubação, foi secado em estufa a 60°C e analisado por MEV. Para se fazer a comparação, utilizou-se bagaço de cana puro (sem ter sido incubado com o microrganismo) e o bagaço de cana contido no meio de cultura ao final dos 50 dias da curva de crescimento (previamente descrita), que também foi filtrado à vácuo. O material foi metalizado com ouro no equipamento Sputter Coater 050-Balzers, para posterior visualização no microscópio de varredura JSM 840.

4.8 Eletroforese

4.8.1 SDS-PAGE

O EB, o UFPM10 e Xyl foram submetidos a SDS-PAGE para a comparação das etapas de purificação, confirmação da pureza e determinação da massa molecular de Xyl. As frações da curva de indução também foram analisadas por SDS-PAGE para a visualização do padrão protéico secretado ao longo dos dias de crescimento do fungo *A. niger* no meio de cultura utilizado.

As amostras de EB, UFPM10 e Xyl foram liofilizadas em diferentes volumes (200, 600 e 800 µL, respectivamente), ressuspensas em 20 µL de tampão de amostra 1X (SDS 25% (p/v), glicerol 10% (v/v), EDTA 0,1 M, Tris HCl pH 6,8, 17,5% (m/v), azul de bromofenol) e fervidas por cinco minutos. Uma alíquota de 15 µL das amostras concentradas foi utilizada para a aplicação nos poços. A eletroforese foi conduzida em gel de poliacrilamida de 12% e 0,75 mm de espessura à temperatura ambiente e voltagem constante de 20 mA.

As amostras da curva de indução foram liofilizadas em volume de 200 µL e ressuspensas em 30 µL de tampão de amostra 1X, dos quais 20 µL

foram utilizados para a aplicação no gel. A eletroforese foi conduzida em gel de gradiente (8-15%) de 0,75 mm de espessura à temperatura ambiente e voltagem constante de 20 mA no sistema Hoefer[®]. Os géis foram corados com nitrato de prata como descrito por Blum *et al.* (1987).

4.8.2 2-DE

O EB foi submetido a 2-DE com o objetivo de se estudar o secretoma do fungo *A. niger* em presença de bagaço de cana como fonte de carbono. A fração purificada Xyl também foi analisada por 2-DE para a visualização de possíveis isoformas e para a conseqüente determinação de seus pontos isoelétricos (pIs).

Na etapa de focalização isoelétrica, foram utilizados Immobiline[™] Dry Strips 18 cm, na faixa de pH 3-10 linear. As amostras EB e Xyl (1500 µL) foram previamente liofilizadas e precipitadas com 2D-Clean-Up Kit (Amersham Biosciences) e, posteriormente, ressuspendidas em 350 µL de tampão 2-DE contendo: DTT 85 mmol/L, Triton X-100 2,5% (m/v), IPG buffer pH 3-10 GE[®] 0,5% (m/v), uréia 7 mol/L, tiouréia 2 mol/L e isopropanol 10%.

Devido às diferenças de concentração protéica e salinidade entre EB e Xyl, as duas amostras foram trabalhadas utilizando protocolos que melhor se adequaram para cada caso. O *strip* de EB foi reidratado durante a noite a temperatura ambiente. Sua focalização isoelétrica ocorreu a 20°C no suporte Manifold[®] adaptado ao aparelho Ettan IPGphor III GE[®] e corrente constante de 75 µA/*strip* em um total de 36000 Vh. Para Xyl, o *strip* contendo a amostra foi reidratado durante 6 horas a 20°C e a IEF foi feita no equipamento Ettan IPGphor III GE[®], a 20°C e corrente constante de 50 µA/*strip* em um total de 33680 Vh. Após a focalização, os *strips* foram reduzidos em solução de equilíbrio (Tris 1 mol/L pH 8,0 50 mmol/L, uréia 6 mol/L, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v)) adicionada de DTT 125 mM por 30 minutos e, posteriormente, alquilados na mesma

solução de equilíbrio, agora adicionada de acrilamida 300 mM por mais 30 minutos (Sanchez *et al*, 1997; Yan *et al*, 1999; Mineki *et al*, 2002). O *strip* equilibrado contendo proteínas de EB foi transferido para gel de SDS-PAGE de gradiente de 8 a 15% (20 x 20 cm) e a separação foi feita no Bio-Rad Protean® II xi Cell, a corrente constante de 25 mA/gel. Já o *strip* com as proteínas da amostra Xyl foi transferido para gel de SDS-PAGE 12%. Os géis foram fixados e corados com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987).

4.8.3 Zimograma

Para a detecção de atividades xilanolíticas presentes no EB e no UFPM10, comparativamente com Xyl, utilizou-se o protocolo de zimograma descrito por Wang *et al.* (1993). Após a eletroforese em condições desnaturantes, o gel foi submerso em solução de Tris/HCl 20 mM e pH 7,5 contendo 0,7% de Triton X-100 em agitação por uma hora. Este procedimento foi repetido duas vezes. O gel foi então incubado em solução de Tris/HCl 20 mM e pH 7,5 por 20 minutos, lavado com água destilada e incubado com solução de xilana 0,1% a 37°C por duas horas. O gel foi novamente lavado com água destilada e corado com Congo Red (0,5 mg/mL) por 15 minutos, e então descorado com solução de NaCl 1 M por 15 minutos. Após o aparecimento das bandas de xilanase em amarelo sobre o fundo vermelho, foi adicionada solução de HCl 1 M, que tornou o fundo azul escuro.

4.9 Identificação de Proteínas por Espectrometria de Massa

Os *spots* selecionados a partir do gel bidimensional de Xyl foram excisados manualmente e descorados com solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,5%

(m/v) e tiosulfato de sódio 0,8% (m/v). Para a digestão de proteínas, cada *spot* foi submetido a lavagens sucessivas de acetonitrila e NH_4HCO_3 50 mM. Após as lavagens, de 2 a 10 μL de solução gelada de tripsina modificada (PromegaTM) (12,5 ng/ μL) em tampão (NH_4HCO_3 50 mM, CaCl_2 5 mM) foram utilizados para a digestão de proteínas. Foram aplicados 2 μL de cada amostra sobre a placa AnchorChipTM (Bruker), que foram misturados com 1 μL da matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em acetonitrila 70% (v/v) e TFA 0,1% (m/v).

Os espectros de massa foram gerados no equipamento Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics) e analisados no *software* Flex Analysis 2.4 (Bruker Daltonics). As massas dos peptídeos foram calibradas externamente com o kit Pep Mix (PromegaTM) e internamente com picos conhecidos de queratina e outros provenientes da autólise da tripsina. As listas de massas geradas pelo programa foram usadas para a busca das proteínas candidatas pelo método PMF e PFF na base de dados não redundante NCBI (National Center for Biotechnology Information), por meio do *software* MASCOT (Matrix Science). Os parâmetros de busca usados foram: categoria de taxonomia Fungi; erro máximo permitido na massa do peptídeo igual a 100 ppm; oxidação da metionina como modificação variável; propionamida como modificação fixa; e consideração de, no máximo, uma perda na clivagem da tripsina.

4.10 Microscopia de Força Atômica

Xyl foi analisada por Microscopia de Força Atômica (MFA) a fim de se obter informações sobre sua estrutura tridimensional. A amostra (2 μL) foi aplicada sobre uma superfície de mica recém clivada e deixada secar por 30 minutos ao ar livre. A fim de se remover o excesso de sal, foram feitas duas lavagens sucessivas da amostra seca utilizando 5 μL de água destilada, que

foram depositados e removidos 20 segundos depois com pipeta automática. Após a segunda lavagem, a amostra foi deixada secar ao ar livre.

As imagens de MFA foram obtidas no equipamento SPM-9600 (Shimadzu, Japão). O modo de operação utilizado foi o dinâmico, com aquisição de imagens de fase (visco-elasticidade) e altura (topografia). Foram utilizados *cantilevers* retangulares de 125 μm de comprimento (constante de mola de 60 N/m e frequência de ressonância de 276 kHz), com ponteiros cônicos de silício (raio de curvatura <10 nm). A área máxima do *scanner* utilizado é de 125 X 125 X 7 μm nas direções x, y e z, respectivamente. As imagens foram obtidas em 512 X 512 pixels, com frequência de varredura de 1 Hz. As áreas escaneadas foram quadrados perfeitos que variaram em tamanho (de 1,25 μm X 1,25 μm a 625 nm X 625 nm). As imagens foram processadas e analisadas pelo *software* SPM-9600 *off-line*, por meio de um nivelamento no plano horizontal e do nivelamento automático da superfície no plano bidimensional, seguidos por um ajuste de plano de fundo no eixo x. As nanoestruturas tiveram suas alturas médias mensuradas por meio da função *labeling* do analisador de partículas do *software*. As análises estatísticas e matemáticas dos dados foram feitas pelo *software* ORIGIN 8.0 (Microcal, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curva de Indução Enzimática

O crescimento de fungos e sua produção de xilanasas são determinados por uma grande variedade de parâmetros, como a composição do meio, a temperatura e o pH (Haltrich *et al.*, 1996). Para a otimização da utilização dessas enzimas na indústria, faz-se necessária uma prévia caracterização enzimática, que seja capaz de determinar os principais parâmetros influenciadores da atividade e estabilidade.

Após da escolha do meio de cultura a ser utilizado, a etapa posterior baseia-se no estabelecimento do padrão de crescimento do microrganismo em contato com este meio. A curva de indução de *A. niger* crescido em bagaço de cana (figura 6) revela o dia em que ocorre o pico de produção de xilanasas pelo fungo. Já no segundo dia de crescimento, observa-se um platô de atividade xilanolítica que se mantém relativamente constante até o final do período investigado.

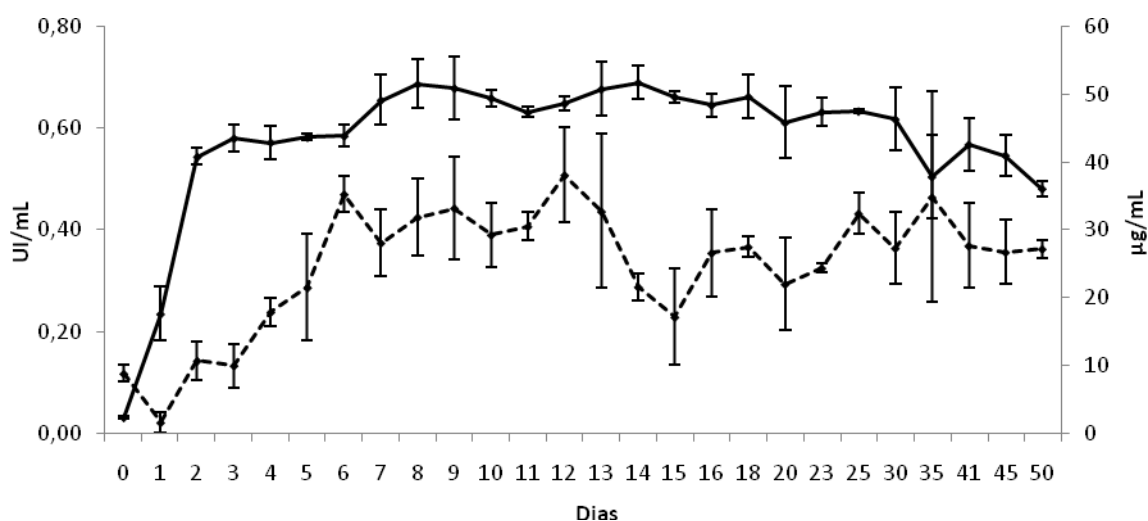


Fig. 6. Curva de indução da atividade xilanolítica de *A. niger* em meio líquido contendo bagaço de cana a 1% ao longo do tempo. Atividade xilanolítica (—) e quantidade de proteína (----).

Este perfil de indução pode ser devido a um acesso gradual às fibras de hemicelulose que permeiam as fibras de celulose, e que estimula a produção e liberação gradual de enzimas hidrolíticas para o consumo do substrato. A presença de açúcares no meio, ao menos aparentemente, não inibiu a produção de xilanases até o 50º dia, mas pode ter sido a causa da estagnação da produção das mesmas a partir do segundo dia. É possível, ainda, que o açúcar liberado no meio tenha sido utilizado pelo fungo como fonte de energia, visto que não houve acréscimo de nutrientes ao meio ao longo do período estudado. Portanto, com base na curva de crescimento do fungo e visando a obtenção de grande quantidade de enzimas xilanolíticas, foi estabelecido o período de seis dias para o crescimento do fungo no meio líquido contendo bagaço de cana.

A quantidade de proteínas oscilou durante o período de crescimento estudado (figura 6). Este resultado abrange outras proteínas, além das xilanases, que são produzidas concomitantemente e que também participam do processo de degradação desse substrato. Para os fins deste trabalho, apenas a atividade xilanolítica foi alvo de investigação; no entanto, a figura 7 revela a multiplicidade de proteínas liberadas pelo fungo ao longo de seu crescimento e que, certamente, atuam de forma harmônica com as xilanases aqui estudadas. Pela figura, também é possível notar o aumento da concentração de determinadas proteínas ao longo dos dias, bem como a interrupção de produção de proteínas após os primeiros dias. Estas podem ser proteínas do meio que são consumidas ao longo do processo ou mesmo proteínas produzidas pelo fungo e que são necessárias para sua germinação e desenvolvimento primário sobre o substrato.

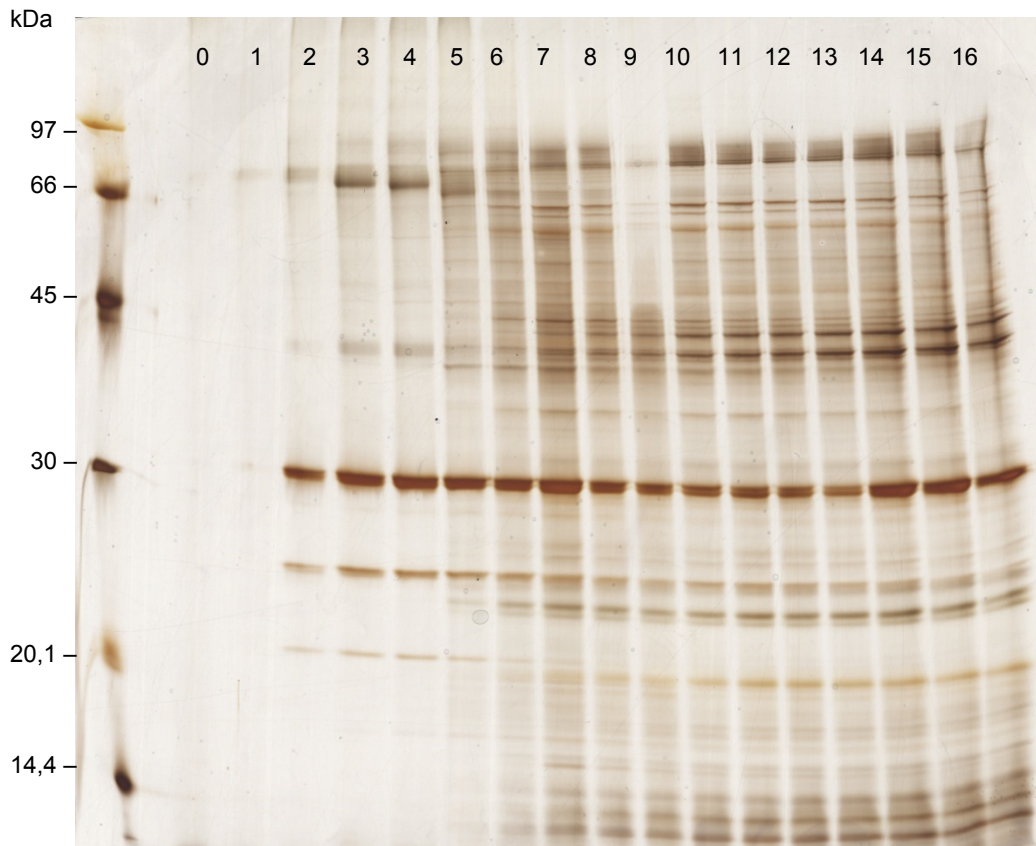


Fig. 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (8-15%), sob condições desnaturantes, das alíquotas da curva de indução enzimática de *A. niger* em meio líquido contendo bagaço de cana a 1%, do início da incubação até o 16º dia (números 0 a 16). Padrões de massa molecular: fosforilase B (97 kDa), albumina bovina sérica (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lacto-albumina (14,4 kDa).

5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As eletromicrografias de varredura podem ser visualizadas na figura 8. O bagaço controle, ou seja, que não foi incubado com o fungo, pode ser visto nas figuras 8-A e B com suas fibras intactas. Nas figuras 8-C a F é possível observar a alteração da estrutura do material, com o aparecimento de estruturas soltas e rompidas, e que podem ser atribuídas à hidrólise enzimática promovida pelo fungo, além do desgaste mecânico causado pela agitação do meio de cultura.

As figuras 8-C e D, resultantes da incubação por um período de seis dias, mostram um grau intermediário de degradação entre o bagaço controle e aquele das figuras 8-E e F, resultantes da exposição ao fungo por 50 dias, apresentando-se bem alterado e sem uma organização definida. A seqüência de imagens comprova a susceptibilidade do bagaço de cana ao fungo *A. niger*.

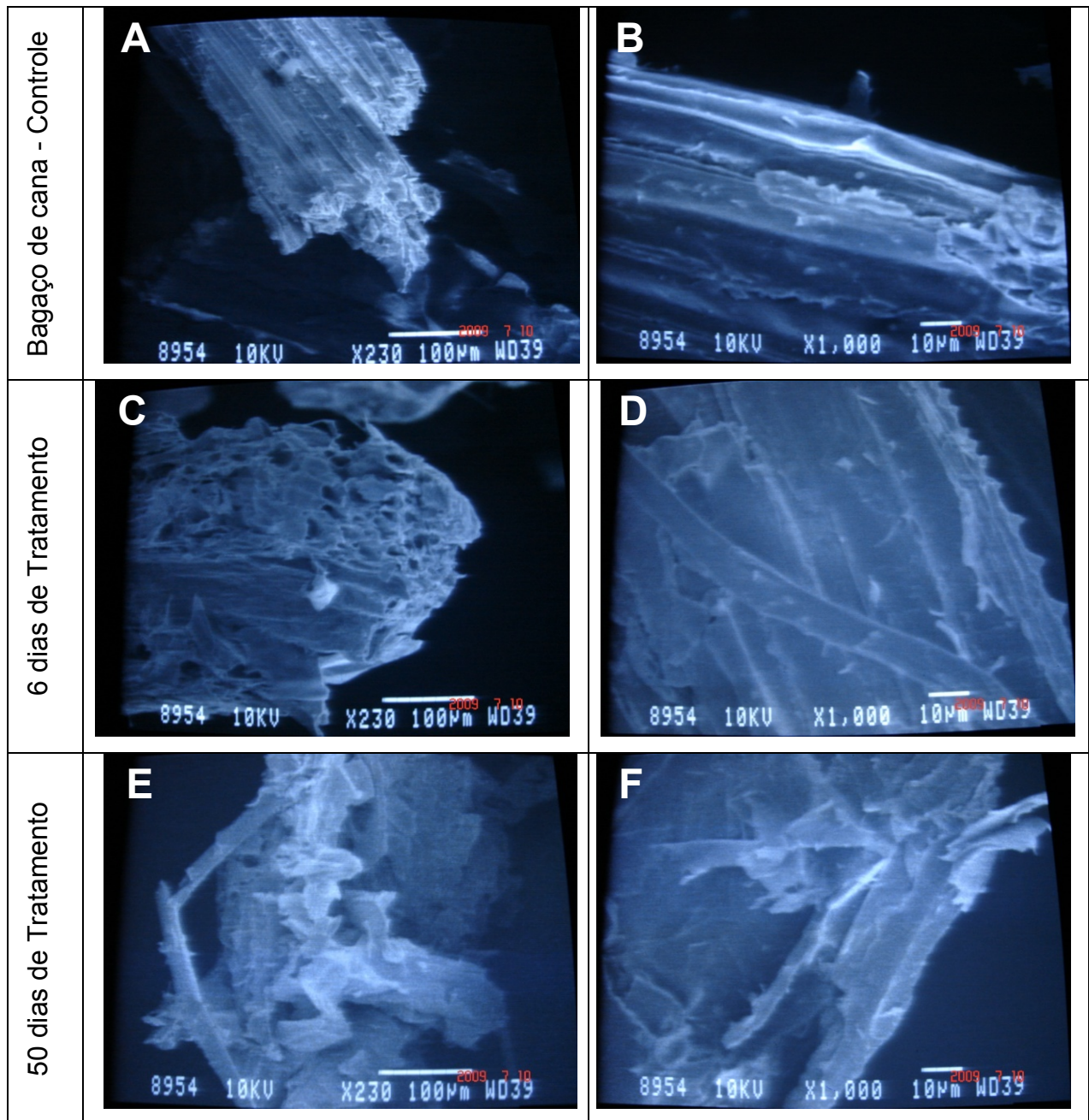


Fig. 8. Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de bagaço de cana. Amostra controle (sem tratamento) (A e B), bagaço de cana após seis (C e D) e 50 dias (E e F) de incubação com o fungo *A. niger*.

5.3 Cromatografia e Rendimento da Purificação

Após o período de incubação com o bagaço de cana em meio líquido por seis dias, o fungo foi retirado do meio de cultura, juntamente com o restante do bagaço hidrolisado, por meio de filtração a vácuo. O EB obtido foi submetido à ultrafiltração com membrana de 10 kDa, visando à separação por massa molecular das proteínas presentes no meio de cultura líquido. A presença de uma significativa atividade xilanolítica no ultrafiltrado (UFPM10) motivou a investigação desta amostra enzimática.

O perfil cromatográfico do UFPM10 em resina de exclusão molecular do tipo Sephadex G-50 pode ser visualizado na figura 9.

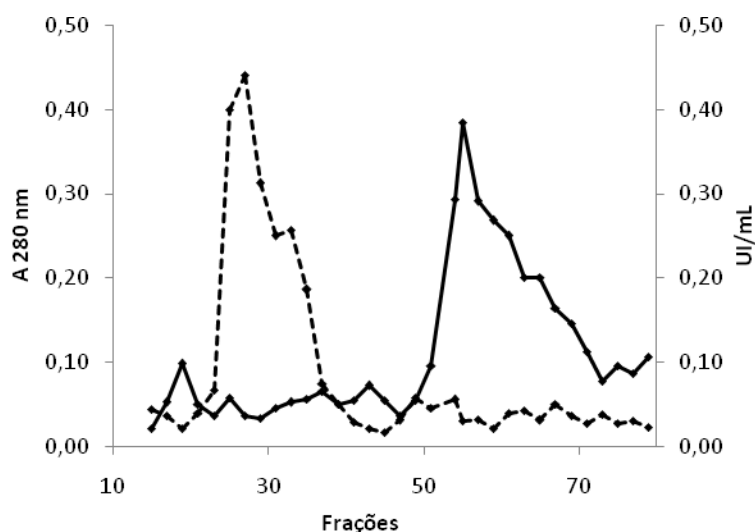


Fig. 9. Perfil cromatográfico do UFPM10 em coluna de exclusão molecular do tipo Sephadex G-50. Proteína total (—) e atividade xilanolítica (-----).

A purificação por cromatografia de exclusão molecular revelou a presença de apenas um pico de atividade xilanolítica (Xyl). A indefinição deste, no entanto, pode indicar a presença de mais de uma xilanase no UFPM10. A tabela 1 revela um aumento de quase 15 vezes da atividade específica de Xyl em relação ao EB, e um aumento de mais de 14 vezes em seu fator de purificação, o que pode indicar a presença de uma grande quantidade de xilanases no EB em relação a outras proteínas. De certa

forma, este resultado era esperado, pois a espécie de fungo selecionada para este estudo é conhecida por produzir grandes quantidades de enzimas xilanolíticas (Haltrich *et al.*, 1996; Siqueira *et al.*, 2010). O baixo rendimento do UFPM10, bem como de Xyl, podem ser indícios da ação sinérgica das enzimas presentes no EB. A remoção destas proteínas, sejam elas celulasas ou hemicelulasas, durante o processo de purificação, diminui a capacidade das enzimas remanescentes de atuarem plenamente sobre o substrato de origem lignocelulósica, influenciando, dessa forma, no rendimento da purificação.

Tabela 1. Etapas de purificação de uma amostra contendo atividade xilanolítica do fungo *A. niger* crescido em meio líquido contendo bagaço de cana a 1%.

Frações	Proteína Total (mg)	Atividade Total (UI)	Atividade Específica (UI/ mg)	Rendimento (%)	Fator de Purificação
Extrato bruto	25,581	139,320	5,446	100,000	1,000
Ultrafiltração e precipitação com sulfato de amônio	0,476	13,043	27,418	9,362	5,034
Sephadex G-50	0,163	13,224	80,958	9,492	14,865

A figura 10 mostra a análise eletroforética sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) das três etapas da purificação (EB, UFPM10 e Xyl) e confirma, ao menos visualmente, a pureza de Xyl (figura 10-A). Sua massa estimada foi de, aproximadamente, 33 kDa. Este resultado revela a capacidade já relatada (Shei *et al.*, 1985; Tan *et al.*, 1987; Filho *et al.*, 1993) de xilanasas maiores que 10 kDa alterarem sua conformação e passarem por membranas de ultrafiltração com retenção igual ou superior a 10 kDa. A habilidade de se difundir por poros pequenos da madeira, e assim penetrar na matriz de hemicelulose-lignina-celulose pode ser vantajosa,

especialmente para os fungos filamentosos (Grabski & Jeffries, 1991). Esta característica é passível de ser explorada nos processos biotecnológicos.

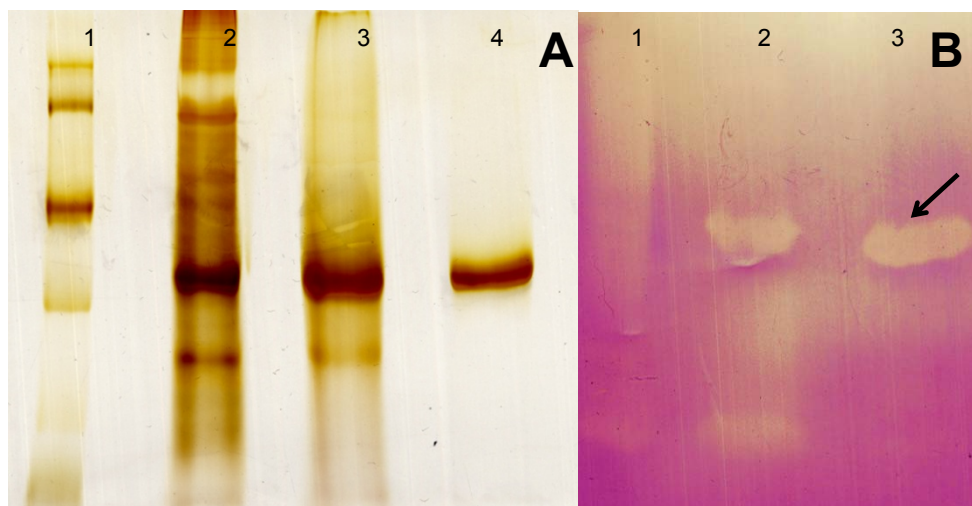


Fig.10. Análise eletroforética por SDS-PAGE 12% (A) e zimograma (B) das etapas de purificação do Extrato Bruto de *A. niger* crescido em meio líquido contendo bagaço de cana a 1%. **A)** Linha 1: marcador; Linha 2: EB; Linha 3: UFPM10; Linha 4: Xyl. **B)** Linha 1: EB; Linha 2: UFPM10; Linha 3: Xyl (seta). Padrões de massa molecular: fosforilase B (97 kDa), albumina bovina sérica (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lacto-albumina (14,4 kDa).

O UFPM10 apresenta outra banda além da banda correspondente à Xyl (figura 10-A) que, de acordo com o zimograma (figura 10-B), também apresenta atividade xilanolítica. Como a cromatografia revelou apenas um pico, infere-se que a coluna não foi capaz de separar as duas enzimas e, na figura 9, a segunda enzima estaria representada pela parte indefinida que aparece à direita do pico de Xyl. Outra possibilidade é que esta enzima, além de ser pequena (menor que 30 kDa), provavelmente apresenta baixa atividade específica, não tendo sido possível, desta maneira, sua detecção por meio da cromatografia com a coluna Sephadex G-50.

A natureza e relevância de xilanases de baixa massa molecular nem sempre são claras, pois os procedimentos de purificação favorecem o isolamento das xilanases maiores. As xilanases menores podem ter funções que não são requeridas em grandes quantidades (como a hidrólise de

ligações que não ocorrem com frequência). Elas podem não ser produzidas em grandes quantidades sob as condições de cultivo utilizadas, ou elas podem ser perdidas devido à degradação ou adsorção em substratos insolúveis. Alternativamente, as xilanases maiores podem ser relativamente superproduzidas sob as condições de cultivo. É possível que o conhecimento acerca da produção enzimática *in situ* possa esclarecer a importância dessas xilanases de baixa massa molecular (Wong *et al.*, 1988).

A linha do zimograma que representa o EB apresenta um rastro de atividade xilanólítica, indicando a presença de outras xilanases. Estas enzimas, ausentes no UFPM10, foram removidas pelo processo de ultrafiltração, sendo proteínas de maior massa molecular.

5.4 Caracterização Enzimática

A caracterização enzimática é a etapa posterior à padronização do cultivo e da purificação das enzimas. Diversos ensaios e técnicas podem ser utilizados na caracterização que revela, dentre as características das enzimas, aquelas que são promissoras do ponto de vista de aplicação industrial.

Como parte da caracterização enzimática, Xyl foi testada com diversos substratos de origem holocelulósica, como CMC, Avicel, Manana, FP, Pectina, pNPG e pNPX, a fim de se comprovar a ausência de atividade holocelulolítica. Esta fração enzimática apresentou apenas atividade residual sobre os substratos citados, inferiores a 0,04 UI/mL. Este resultado, juntamente com as propriedades físico-químicas de Xyl, pode determinar a escolha desta enzima para processos industriais em que seja necessária a ausência de atividade celulolítica, por exemplo, como é o caso da indústria de branqueamento de polpa de celulose.

Os parâmetros cinéticos de Xyl a 50°C com xilana solúvel e insolúvel foram analisados de acordo com o modelo de Michaelis-Menten. Houve uma grande diferença entre os resultados, pois Xyl não apresentou atividade sobre a xilana insolúvel. Isto sugere o papel e a importância das ramificações presentes na xilana solúvel para a ancoragem de Xyl na estrutura do substrato e posterior hidrólise enzimática. É possível que a enzima interaja quimicamente com essas ramificações, em outros locais além do seu sítio catalítico, a fim de se manter firme sobre o substrato. A ausência de tais ramificações na xilana insolúvel impediria a adsorção de Xyl ao substrato, não havendo, assim, atividade enzimática. O alto valor de KM encontrado (tabela 2) para a xilana solúvel, e que indica uma baixa afinidade pelo substrato, reforça a hipótese da dependência das ramificações da xilana para que a enzima possa atuar sobre o mesmo.

Diversas xilanases de baixa massa molecular de fungos já estudadas, inclusive do gênero *Aspergillus*, apresentam características semelhantes às de Xyl, como a temperatura e o pH ótimo (tabela 2).

Tabela 2. Xilanases caracterizadas de fungos de diversas espécies.

Fungo	KM ^a (mg/mL)	Vmax ^a (UI/mL)	Temp. ótima (°C)	pH ótimo	Massa molecular ^b (kDa)	Fonte
<i>A. niger</i>	47,08	3,02	50	4,5	33	Presente trabalho
<i>A. fumigatus</i>	5,72	2,34	55	5,5	19	Silva <i>et al.</i> , 1999
<i>A. versicolor</i>	0,66	-	50	10	40,5	Salama <i>et al.</i> , 2008
<i>M. verrucaria</i>	4,4	9,6	45	5,5	15,9	Filho <i>et al.</i> , 1993
<i>A. nainiana</i>	1,87	-	55	5,5	-	Moreira <i>et al.</i> , 2008

^a Xilana solúvel de aveia.

^b Estimada por SDS-PAGE.

A determinação do efeito da temperatura sobre uma amostra enzimática estabelece o tipo de processo industrial em que ela pode ser

aplicada. A temperatura propícia para a ação de endo-xilanases de bactérias e fungos varia entre 40 e 60°C (Kulkarni *et al.*, 1999). Estudos do efeito da temperatura em xilanases de *Aspergillus* spp. compilados por Subramaniyan e Prema (2002) revelam uma maior atividade na faixa entre 45 a 60°C. Outros estudos mostram que pode haver variação nesta faixa de temperatura de acordo com o tipo de substrato. Medeiros *et al.* (2003) relataram como sendo de 40°C a temperatura em que xilanases do extrato bruto de *A. niger* cultivado em meio líquido contendo xilana apresentam maior atividade. O extrato bruto do mesmo fungo, mas crescido em farelo de trigo, apresentou maior atividade a 48°C, apesar de ser estável entre 45 e 55°C (Zhao *et al.*, 2002). Em meio sólido, a maior atividade xilanolítica de *A. niger* crescido em bagaço de cana se deu a 35°C (Gawande & Kamat, 1999).

No presente estudo, foram avaliadas amostras de EB, UFPM10 e Xyl, que apresentaram maior atividade entre 45 e 50°C, e esta faixa de temperatura foi utilizada em ensaios posteriores. Pela figura 11 é possível perceber que as três amostras seguem a mesma curva de resposta à temperatura, havendo apenas uma redução na escala de atividade xilanolítica. Esta diminuição pode estar relacionada à remoção, durante o processo de purificação, de cofatores ou enzimas que atuam em sinergismo com Xyl, e cuja retirada resulta em uma diminuição do desempenho da amostra. Além disso, no EB estão presentes outras xilanases que podem apresentar características diferentes das enzimas presentes em Xyl, como maior atividade em temperaturas mais elevadas. Desta forma, é possível que, para diversos processos industriais, a utilização de uma combinação de enzimas seja mais eficaz do que apenas uma determinada enzima pura.

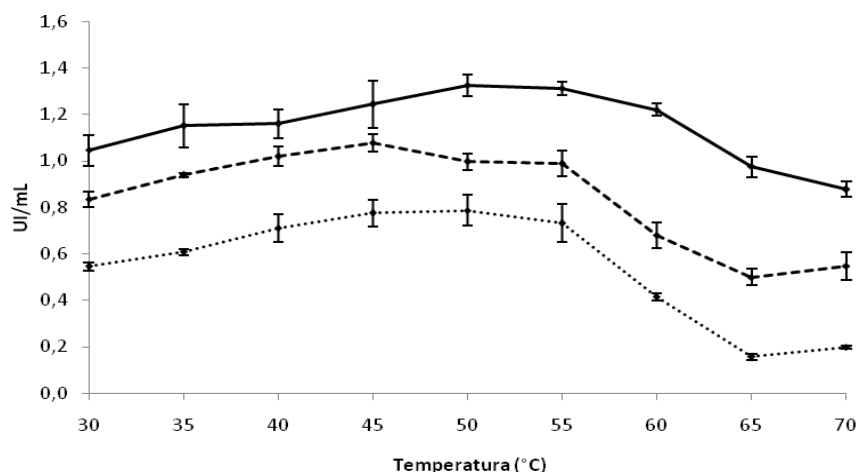


Fig.11. Efeito da temperatura na atividade xilanólica de EB (—), UFPM10 (---) e Xyl (.....).

Outro fator que afeta significativamente a atuação de xilanases é o pH do meio. As xilanases da maioria dos organismos estudados são estáveis na faixa de pH de 3 a 10, apresentando maior atividade no intervalo de pH de 4 a 7 (Kulkarni *et al.*, 1999). Xilanases de diversos fungos do gênero *Aspergillus* apresentam maior atividade na faixa de pH de 4 a 6 (Subramaniam & Prema, 2002), sendo possível encontrar espécies, como o *A. kawachii* (Ito *et al.*, 1992), cujas xilanases exibem maior atividade em pH ácido, entre 2 e 6. Krengel e Dijkstra (1996), também isolaram uma xilanase produzida por *A. niger* com maior atividade em pH 3. Por causa desta característica, enzimas como estas podem ser utilizadas em alimentação animal, sendo cruciais para a liberação de nutrientes no estômago ácido.

As figura 12 e 13 revelam os perfis de resposta ao pH de amostras de EB, UFPM10 e Xyl, a 45 e 50°C, respectivamente.

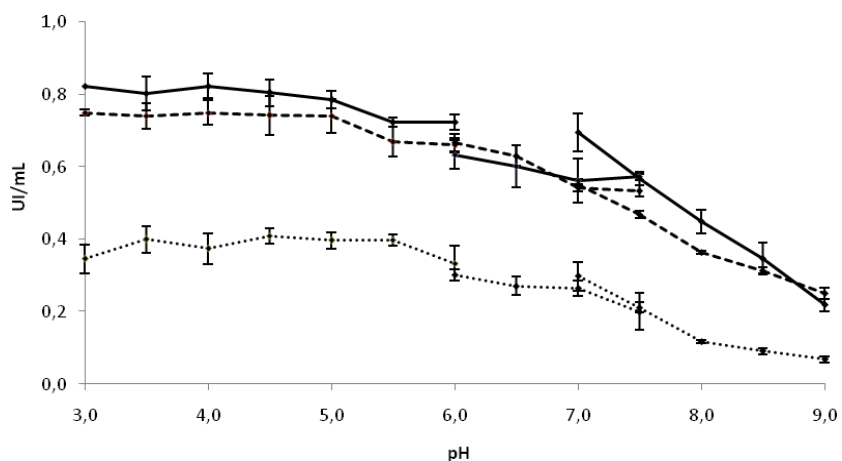


Fig.12. Efeito do pH na atividade xilanolítica de EB (—), UFPM10 (---) e Xyl (.....) a 45°C.

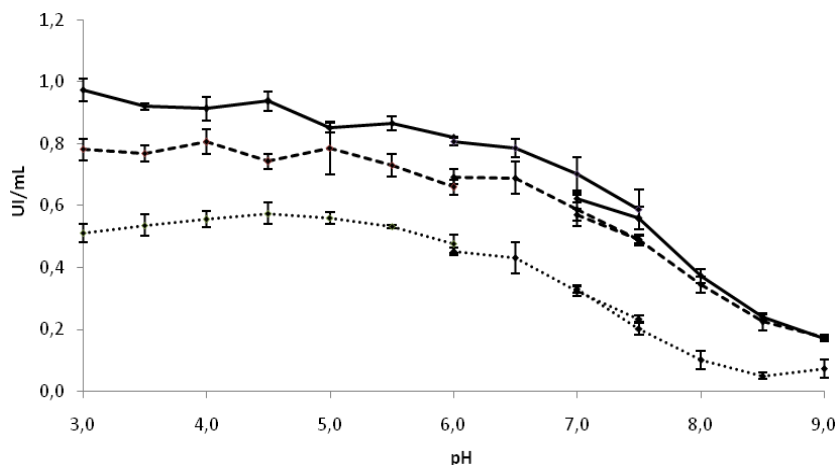


Fig.13. Efeito do pH na atividade xilanolítica de EB (—), UFPM10 (---) e Xyl (.....) a 50°C.

As duas figuras apresentam o mesmo perfil gráfico, diferindo apenas na escala. Nas duas temperaturas, o EB apresentou a maior atividade, seguido pelo UFPM10 e Xyl. O pH de maior atividade de EB e UFPM10 variou entre 3 e 4 nas duas temperaturas. Para Xyl, tanto a 45 quanto a 50°C, o pH de maior atividade enzimática foi 4,5.

Um ponto a ser observado nos gráficos de pH ótimo, no entanto, é que a diferença de 5°C entre os ensaios, pouco marcante no ensaio de temperatura ótima, aumentou a atividade xilanolítica de EB e Xyl em quase 0,15 UI/mL a 50°C. Por outro lado, a atividade de UFPM10 não foi alterada

significativamente pela temperatura. Este fato pode ser devido à presença de alguma molécula estabilizadora que é removida na etapa da cromatografia, e por isso está ausente em Xyl. No EB, por outro lado, a presença desta molécula não deve ser muito significativa devido à presença de outras xilanases, diferentes das enzimas presentes na amostra Xyl, e que são independentes destas moléculas.

Em seguida, foi testada a termoestabilidade das amostras a 45 e 50°C e em tampão acetato de sódio pH 4,5. Este pH foi escolhido por ter proporcionado a maior atividade para Xyl e por não ter causado diminuição drástica na atividade das outras amostras enzimáticas. Apesar da temperatura de 50°C, comparada à de 45°C, ter proporcionado maior atividade xilanólítica para o EB e Xyl nos ensaios com os diferentes tampões (figuras 12 e 13), a termoestabilidade destas frações incubadas com o tampão acetato de sódio pH 4,5 foi maior a 45°C, e não a 50°C. Os resultados encontram-se resumidos na tabela 3:

Tabela 3. Determinação da termoestabilidade das amostras de EB, UFPM10 e Xyl, a 45 e 50°C, e na presença de tampão acetato de sódio pH 4,5.

	Meia-vida		Meia-vida em pH 4,5	
	45°C	50°C	45°C	50°C
EB	12 h	1 h	144 h	15 h
UFPM10	40 h	2,5 h	36 h	5 h
Xyl	48 h	10 min	110 h	6 h

A meia-vida do EB aumentou 12 vezes na presença do tampão, a 45°C, e 15 vezes a 50°C. A termoestabilidade de Xyl também foi muito afetada pela presença do tampão, que aumentou sua meia-vida em 36 vezes a 50°C, e 2,3 vezes a 45°C. Mantiveram-se relativamente constantes os resultados do UFPM10, mais uma vez sugerindo a presença de alguma molécula estabilizadora de atividade nesta etapa de purificação. Estes

resultados se mostram importantes do ponto de vista da aplicação industrial que, em geral, opera em temperaturas acima de 40°C. A incubação com tampão acetato de sódio pH 4,5, portanto, tornou as frações enzimáticas mais resistentes a 45 e 50°C.

Um estudo realizado por Medeiros *et al.* (2003) com xilanases de *A. niger* mostrou que, após seis horas de incubação a 45°C e pH 5,5, as enzimas perderam 50% de sua atividade inicial. Com a temperatura de 50°C e o mesmo pH, 60 minutos foram o suficiente para que as xilanases perdessem 53% de sua atividade. As xilanases deste fungo apresentaram maior meia-vida do que as dos fungos *P. corylophilum* e *T. longibrachiatum*, também investigados neste estudo comparativo.

Estes resultados corroboram a importância do pH do meio e do estabelecimento dos parâmetros enzimáticos ótimos para um melhor aproveitamento do processo.

Como Xyl não apresentou nenhuma outra atividade holocelulolítica além da xilanolítica, foi considerada uma preparação pura, tendo sido incubada com íons metálicos, EDTA e SDS, nas concentrações de 2 e 10 mM, a fim de se detectar alterações em sua atividade xilanolítica (tabela 4). A amostra pura foi preferida em detrimento das outras, pois, desta forma, fica mais fácil discriminar os efeitos causados pelas soluções, em comparação a um *pool* enzimático formado por enzimas de diferentes naturezas.

Nenhum dos íons testados estimulou a atividade de Xyl. Alguns deles mantiveram a atividade com apenas uma pequena redução em relação ao controle (MgCl₂, CaCl₂, FeSO₄, DTT e CoCl₂), enquanto outros promoveram uma diminuição significativa da atividade xilanolítica (HgCl₂ e SDS), resultado este também já encontrado por outros autores (Ishihara *et al.*, 1997). Estes podem ser casos de inibição não-competitiva do íon metálico com um grupo funcional da enzima, como uma hidroxila, ou com um íon metálico em um grupo prostético no sítio ativo da xilanase (Salama *et al.*,

2008). A forte inibição por Hg^{2+} pode indicar o envolvimento de grupos sulfidrila no domínio catalítico (John *et al.*, 1979).

Tabela 4. Efeito dos íons metálicos e SDS na atividade de Xyl.

Íon	Atividade a 2 mM		Atividade a 10 mM	
	(UI/mL)	%	(UI/mL)	%
Controle	0,546	100	0,546	100
MgCl ₂	0,440	80,61	0,493	90,21
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,426	77,91	0,412	75,46
AlCl ₃	0,373	68,25	0,348	63,62
HgCl ₂	0,388	71,08	0,060	10,97
NaCl	0,428	78,38	0,413	75,56
ZnSO ₄	0,396	72,56	0,347	63,47
CaCl ₂	0,515	94,27	0,500	91,45
KCl	0,472	86,42	0,429	78,44
SDS	0,048	8,70	0,047	8,69
FeCl ₃	0,360	65,93	0,434	79,41
FeSO ₄	0,444	81,31	0,488	89,36
CuSO ₄	0,417	76,23	0,305	55,88
EDTA	0,459	84,07	0,429	78,46
DTT	0,487	89,11	0,524	95,87
CuCl ₂	0,413	75,52	0,333	60,89
AgNO ₃	0,400	73,17	0,398	72,80
CoCl ₂	0,522	95,52	0,442	80,92

A concentração do íon na solução causou grande diferença na atividade (acima de 10% de diferença) para HgCl₂, ZnSO₄, KCl, FeCl₃, CuSO₄, EDTA, CuCl₂ e CoCl₂, mas só para o FeCl₃ a menor concentração (2 mM) do íon resultou em uma redução da atividade enzimática.

A modificação química é um dos métodos mais úteis na identificação dos grupos funcionais de uma proteína. Na pesquisa básica, suas maiores

aplicações estão na análise da seqüência de aminoácidos e na identificação dos resíduos dos sítios catalíticos e de ligação das proteínas (Glazer *et al.*, 1987). Este tipo de procedimento causa mudanças na constante de Michaelis-Menten, e às vezes também uma queda na constante catalítica, Kcat. Desta forma, a identificação de um grupo catalítico pode ser obtida pelo bloqueio deste com um reagente que cause pequena ou nenhuma alteração no tamanho, resultando em uma mudança na habilidade de ligação ao substrato (Imoto & Yamada, 1990). Sendo assim, os reagentes e as condições de reação devem ser escolhidos de acordo com as propriedades das proteínas e o propósito da investigação.

Diversos modificadores químicos de aminoácidos foram incubados com Xyl a fim de se obter informações sobre seus grupos funcionais. Os resultados são descritos na tabela 5.

Tabela 5. Efeito dos modificadores químicos de aminoácidos na atividade de Xyl.

	Atividade (UI/mL)	%	Concentração do Ensaio (mM)
Controle - H ₂ O	0,317	100	-
Controle - Álcool 20%	0,091	28,75	-
DTP*	0,241	76,15	2
DTNB*	0,464	146,49	2
EDC	0,347	109,62	2
L-Triptofano	0,598	188,82	10
DEPC	0,369	116,65	10
L-Cisteína	0,053	16,86	10
Iodoacetamida	0,402	126,85	10
DTT	0,466	147,19	10
B-mercaptoetanol	0,578	182,70	10
NBS	0,048	15,19	0,5

* Solução em álcool 20%.

Os dados da incubação de Xyl com DTP e DTNB revelam que as atividades aumentaram em relação ao controle com álcool, levando à conclusão de que estas soluções, mesmo em meio desfavorável, ativaram a atividade de Xyl. Estes resultados sugerem a possível influência da L-cisteína no processo de catálise da xilana, participando das pontes de hidrogênio formadas com o substrato e do dobramento enzimático (Ferreira & Filho, 2004). Os resultados obtidos para o DTT e o β -mercaptoetanol seguem a mesma explicação.

Contraditoriamente ao acima exposto, a solução de L-cisteína promoveu uma redução drástica na atividade de Xyl. O que deve ficar claro, no entanto, é que estes agentes modificadores podem não ser específicos, ou seja, grupos essenciais, mas inacessíveis, podem não ser modificados pelo agente utilizado. Além disso, a modificação de grupos a certa distância do sítio ativo pode causar mudanças conformacionais e conseqüente perda da atividade enzimática (Ferreira & Filho, 2004).

A inativação quase total da atividade xilanolítica pelo NBS sugere o envolvimento de L-triptofano na ligação ao substrato ou na catálise (Filho *et al.*, 1993-b). O anel indólico do triptofano é um grupo funcional reativo em proteínas e é modificado por vários reagentes eletrofílicos e oxidantes (Imoto & Yamada, 1990), como é o caso do NBS. Outra evidência deste fato foi a estimulação da atividade enzimática pela solução de L-triptofano, tendo sido a maior ativação de todas as soluções testadas.

A ativação de Xyl por DEPC corrobora evidências do envolvimento de histidinas na ligação do substrato e/ou catálise (Celestino *et al.*, 2006). A manutenção da atividade original da enzima também sugere que os resíduos de histidina presentes não são mecanicamente essenciais, nem estão envolvidos na manutenção da conformação necessária para a atividade (Clarke & Yaguchi, 1985).

Tendo sido os maiores ativadores da atividade de Xyl, L-triptofano e β -mercaptoetanol foram testados nas outras amostras enzimáticas, EB e

UFPM10 (tabela 6). Todos os resultados foram positivos, e o L-triptofano também teve um desempenho melhor que o β -mercaptoetanol em EB e UFPM10, assim como previamente observado em Xyl.

Tabela 6. Efeito da incubação de EB, UFPM10 e Xyl com L-Triptofano e β -Mercaptoetanol.

Fração	Atividade do controle (UI/mL)	Ativação com L- Triptofano (%)	Ativação com β - Mercaptoetanol (%)
Extrato Bruto	0,807	141,01	126,1
UFPM10	0,694	135,22	129,71
Xyl	0,313	184,43	158,89

Na tentativa de se verificar a duração deste efeito, as três amostras enzimáticas foram incubadas a 45°C com os dois ativadores, separadamente. As figuras 14, 15 e 16 comparam estes resultados com os dados de termoestabilidade previamente demonstrados.

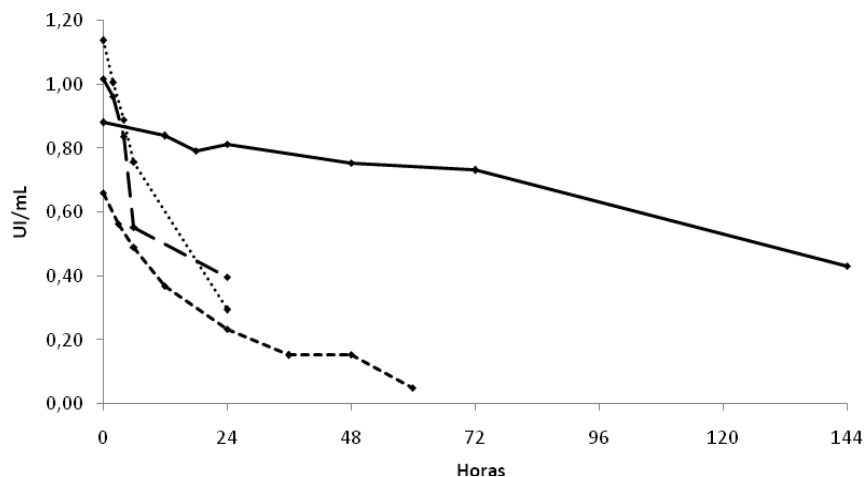


Fig.14. Termoestabilidade a 45°C de EB (----) e EB incubado com tampão acetato de sódio pH 4,5 (—), L-triptofano (.....), β -mercaptoetanol (- -).

A figura 14 mostra que os dois ativadores não foram capazes de manter a alta atividade de EB por muito tempo quando incubados a 45°C. É possível que as soluções tenham perdido suas propriedades ativadoras em contato com a temperatura de 45°C. Para esta fração enzimática, a

incubação com tampão acetato de sódio pH 4,5 foi a melhor forma de aumentar a meia-vida, tendo sido 14,4 vezes maior do que a da amostra incubada com L-triptofano, e 24 vezes maior do que a com β -mercaptoetanol.

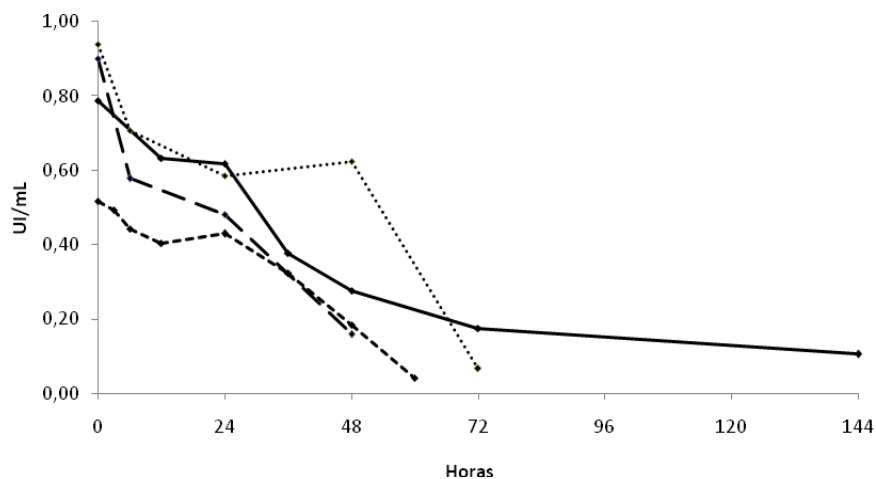


Fig.15. Termostabilidade a 45°C de UFPM10 (----) e UFPM10 incubado com tampão acetato de sódio pH 4,5 (—), L-triptofano (.....), β -mercaptoetanol (- - -).

A reação do UFPM10 aos ativadores (figura 15) foi diferente da reação de EB (figura 14). O L-triptofano aumentou a meia-vida do UFPM10 em mais de 1,5 vez quando comparado à incubação com tampão e em relação ao UFPM10 incubado sozinho. Mais uma vez, a incubação com β -mercaptoetanol não foi capaz de manter a alta atividade por muito tempo ao longo da incubação a 45°C.

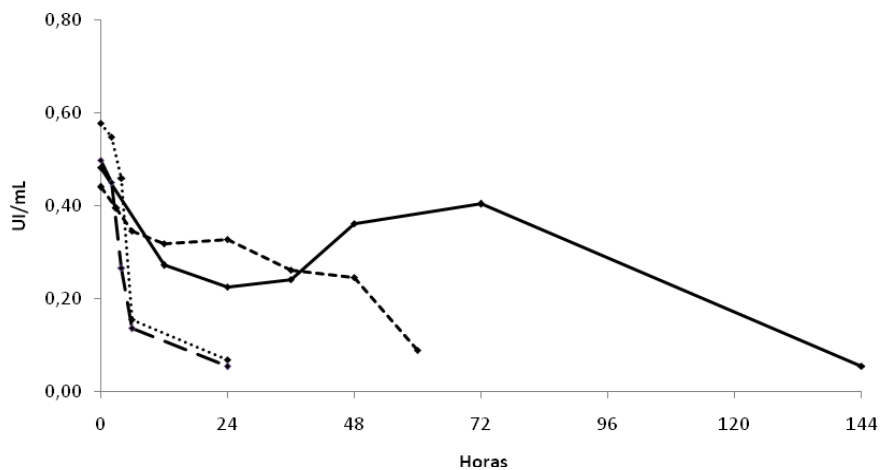


Fig.16. Termostabilidade a 45°C de Xyl (----) e Xyl incubado com tampão acetato de sódio pH 4,5 (—), L-triptofano (.....), β -mercaptoetanol (- - -).

A figura 16 mostra que Xyl apresenta um comportamento diferente das outras frações quando incubado com tampão. Após perder metade de sua atividade, esta torna a aumentar, atingindo valor próximo ao inicial. A incubação com o tampão aumentou a meia-vida (110 horas) em 22 e 27,5 vezes em comparação à incubação com L-triptofano e β -mercaptoetanol, respectivamente.

Portanto, a incubação com os ativadores não promoveu aumentos na meia-vida de EB e Xyl, sendo o tampão acetato de sódio pH 4,5 o melhor meio para o aumento da durabilidade da atividade xilanolítica dessas amostras enzimáticas a 45°C. O UFPM10, como nos experimentos anteriores, comportou-se de forma diversa, tendo reagido positivamente à incubação com o L-triptofato. Este fato, mais uma vez, sugere que a purificação pode ter removido cofatores presentes no UFPM10 e que, portanto, estão ausentes em Xyl. No EB, que contém outras enzimas além das xilanases de Xyl, a influência desses cofatores seria diluída.

Estes resultados indicam que, apesar de não apresentar atividade celulolítica, Xyl não apresenta as características comumente necessárias para sua utilização na indústria de clareamento de polpa de celulose, como atividade em pH alcalino e em temperaturas acima de 50°C (Medeiros *et al.*, 2007). No entanto, Xyl e as outras frações podem ter aplicação em processos cuja temperatura é moderada e o pH, ácido. Tem-se observado, nos últimos anos, o aumento do uso de xilanases que possuem pH ótimo abaixo de 5,5 (Subramaniyan & Prema, 2000), como é o caso de *A. fumigatus* (Bailey & Viikari, 1993), que requer pH abaixo de 3,0 na fase final do cultivo. Algumas enzimas comerciais que apresentam atividade xilanolítica e que já são utilizadas na indústria têxtil no tratamento das fibras de algodão, exibem atividade ótima na faixa de pH de 4,5-5,0 a 50°C (Csiszár *et al.*, 2001). Além desta possibilidade de aplicação para Xyl, também vale ressaltar sua aplicabilidade na panificação, devido à capacidade deste tipo de enzima de substituir os aditivos tradicionalmente

utilizados, como emulsificantes e oxidantes. Romanowska *et al.* (2006) isolaram uma xilanase de baixa massa molecular e pH ótimo 5,5, isolada de *A. niger*, que se mostrou muito eficiente no aumento do volume da massa do pão, característica desejável nesta indústria alimentícia. Outra aplicabilidade plausível para Xyl, UFPM10 e EB seria nas biorefinarias, cujas enzimas mais utilizadas atualmente são de *T. reesei*, na temperatura de 50°C e pH 5,0 (Merino & Cherry, 2007).

5.5 Perfis Bidimensionais

O recente desenvolvimento da genômica e proteômica de fungos filamentosos, juntamente com metodologias clássicas de cinética enzimática e bioensaios, tem melhorado a precisão e sensibilidade da análise das proteínas secretadas, sua interação com o meio e seus mecanismos de regulação e secreção. Com a ajuda de ferramentas da bioinformática, mediante estudos *in silico*, pode-se criar uma rede de informação sobre proteínas, a fim de se aumentar o entendimento sobre mecanismos de ação, estabilidade e resposta dos secretomas fúngicos, bem como seu potencial biotecnológico (Pereira *et al.*, 2007-b).

A figura 17-A revela o perfil bidimensional das proteínas secretadas pelo fungo *A. niger* em presença de bagaço de cana. Os p/s de endoxilanasas de microrganismos geralmente variam entre 3 e 10. (Kulkarni *et al.*, 1999). É possível notar que a maior parte das proteínas encontra-se na faixa ácida do gel, e ainda que há uma predominância de proteínas de alta massa molecular, proteínas estas removidas do EB ao longo do processo de purificação, e que estão ausentes em Xyl (figura 17-B).

O perfil bidimensional da amostra Xyl (figura 17-B) sugere a existência de isoformas que diferem entre si por uma pequena variação na massa molecular e no pI. Muitos microrganismos, além da produção de diversos

tipos de enzimas xilanolíticas, produzem também xilanases múltiplas. Elas podem ter diferentes propriedades físico-químicas, estrutura, atividade específica e rendimento (Biely *et al.*, 1985). Estudos anteriores com o fungo *A. niger* já revelaram a produção de isoenzimas, tendo sido encontradas 15 xilanases extracelulares por Biely *et al.* (1985).

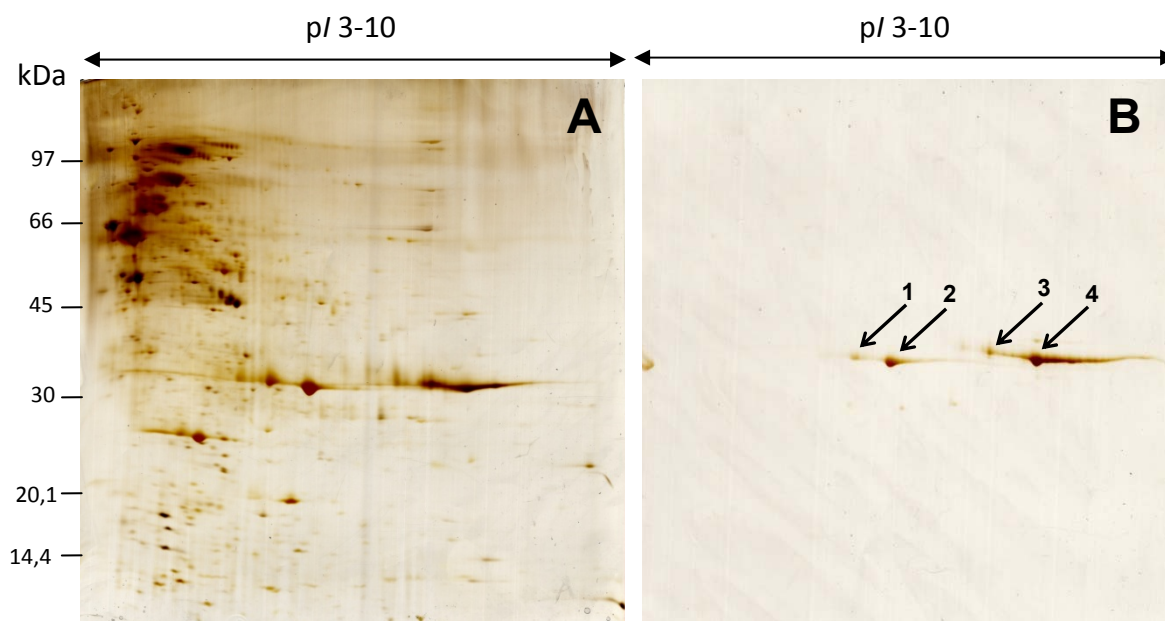


Fig.17. Perfis bidimensionais do EB (A) e de Xyl (B). Setas(1-4): spots selecionados para digestão de proteínas.

Em fungos, algumas xilanases múltiplas podem ser aloenzimas, produtos de diferentes alelos de um mesmo gene, ou podem ser artefatos resultantes da degeneração do meio de cultura microbiano. Por outro lado, cada uma das xilanases múltiplas pode ser um produto gênico distinto produzido pelo microrganismo para aumentar a utilização da xilana (Wong *et al.*, 1988), ou mesmo ter sido adquiridas por transferência horizontal de genes (Gilbert & Hazlewood, 1993). A multiplicidade, enfim, pode ser resultado de redundância genética (Wong *et al.*, 1988), mas casos de processamento pós-traducional diferencial há muito têm sido reportados (Biely, 1985).

As modificações pós-traducionais (MPT) são essenciais no processamento de proteínas secretadas e ativas biologicamente. A

glicosilação é a mais abundante e diversificada forma de MPT, sendo o resultado da união de um glicano a um resíduo de asparagina, recebendo o nome de N-glicosilação, ou O-glicosilação se o glicano se une a um resíduo de serina ou de treonina (revisto por Deshpande *et al.*, 2008). A glicosilação pode contribuir para a secreção, estabilidade e imunogenicidade de proteínas (Lee *et al.*, 2003-b).

Para que a base da multiplicidade xilanolítica seja mais bem conhecida, são necessários estudos mais aprofundados. A regulação, a especificidade ao substrato e as MPTs destas enzimas devem ser consideradas, pois cada fator pode resultar na ocorrência de múltiplas enzimas com atividade xilanolítica (Wong *et al.*, 1988).

5.6 Espectrometria de Massa

As xilanases microbianas são proteínas de uma única subunidade com massa molecular que varia entre 8 e 145 kDa (Sunna & Antranikian, 1997). A massa da amostra Xyl foi estimada em 32,686 kDa (figura 18) por espectrometria de massa, em concordância com o resultado obtido pela eletroforese sob condições desnaturantes da mesma amostra (figura 10-A).

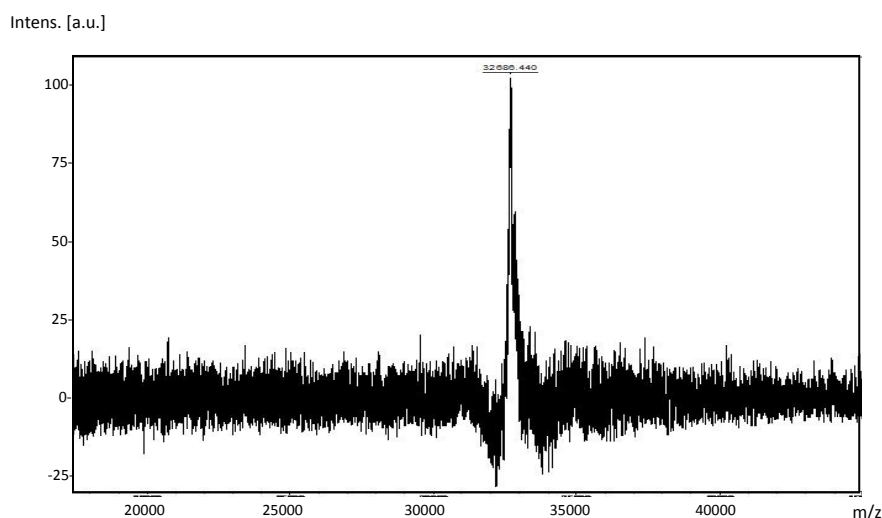


Fig.18. Espectro de massa de Xyl por MALDI-TOF.

Os *spots* 1-4 da figura 17-B foram digeridos com tripsina, e os peptídeos resultantes foram submetidos à análises do tipo PMF e PFF, usando espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF. Apenas os *spots* 1, 3 e 4 apresentaram resultado de identificação significativos, como mostrado na tabela 7. Apesar do genoma de *A. niger* já ter sido seqüenciado (Pel *et al.*, 2007), as três proteínas foram identificadas como possuindo peptídeos em comum com enzimas de outros fungos do gênero *Aspergillus*. O *spot* 2 não apresentou resultado significativo, e os outros *spots* que aparecem na figura 17-B não foram analisados.

Tabela 7. Proteínas identificadas por PMF (*spot* 4) e PFF (*spots* 1 e 3) a partir do perfil bidimensional da amostra Xyl, proveniente do fungo *A. niger* crescido em bagaço de cana a 1%.

<i>Spot</i>	Proteína	Massa teórica	pI calculado	Pontuação	Nº de acesso NCBI	Organismo
1	α -L-arabinofuranosidase	36169	4,74	32	gi 3913152	<i>A. tubingensis</i>
3	Endo-1,4- β -xylanase	35451	8,33	47	gi 3915310	<i>A. aculeatus</i>
4	Endo-1,4- β -xylanase	35451	8,33	208	gi 3915310	<i>A. aculeatus</i>

Existe um alto grau de conservação entre o genoma de *A. niger* e o de outras espécies de *Aspergillus*, como *A. nidulans*, *A. fumigatus* e *A. oryzae* (Pel *et al.* 2007). Desta forma, é possível que haja genes conservados que codificam enzimas lignocelulolíticas, em especial, xilanases. De fato, Kotaro *et al.* (1995) encontraram um gene de *A. niger* que codifica uma xilanase que apresenta alta homologia com uma xilanase acidófila de *A. kawachii*. Tanaka *et al.* (2005) também purificaram uma endo-1,4- β -xilanase de *Penicillium citrinum* intimamente relacionada com xilanases de outras espécies pertencentes à família GH11, como *T. reesei*, *A. niger*, *P. funiculosum* e *A. nidulans*.

A proteína identificada como α -L-arabinofuranosidase de *A. tubingensis* (tabela 7) apresenta massa molecular e pI em acordo com a proteína apontada pela seta 1 (figura 17-B). A figura 19 mostra os espectros

obtidos a partir do processamento do *spot* 1, e a tabela 8, o resultado da busca no programa MASCOT.

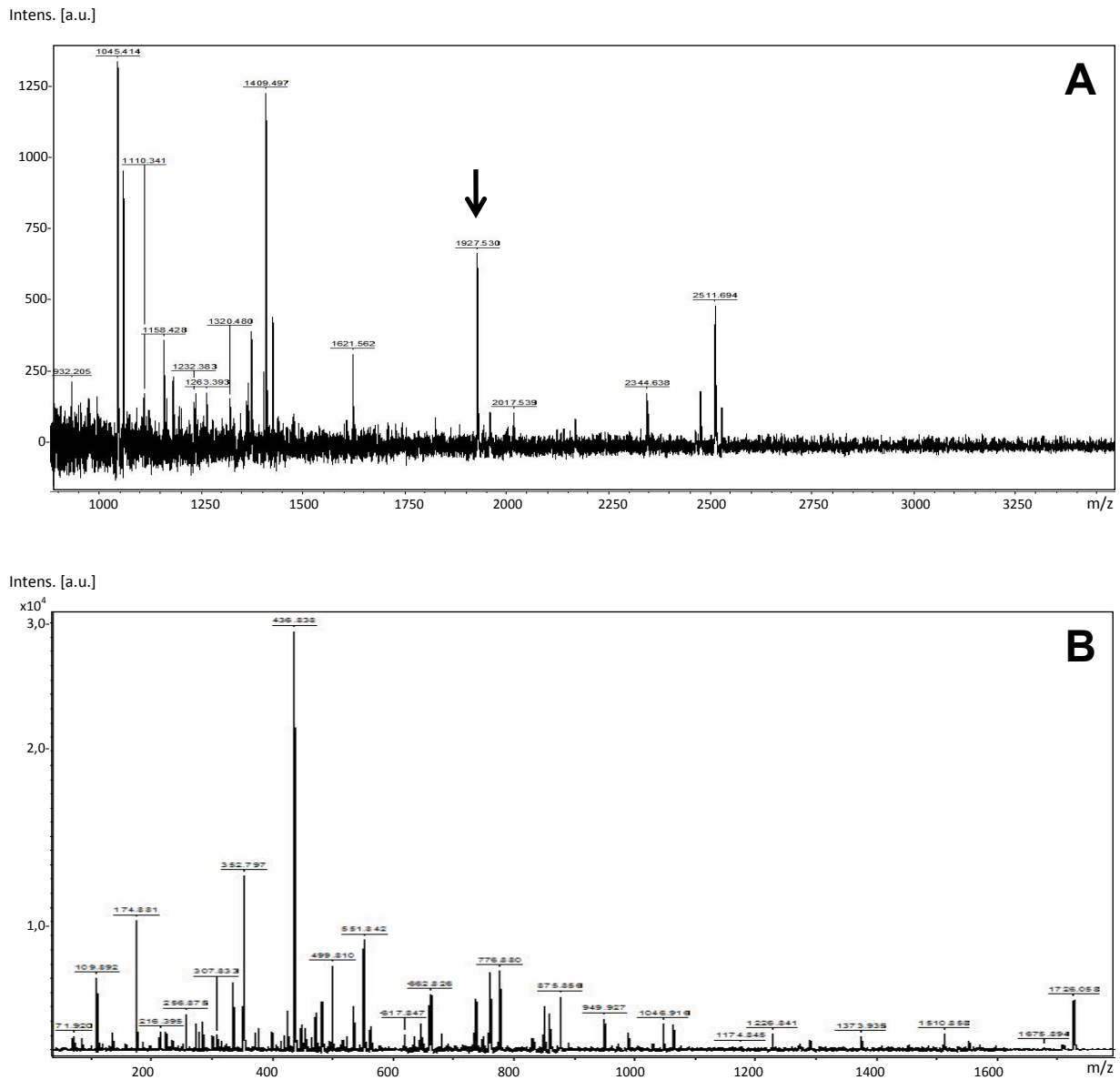


Fig.19. Espectros de massas obtidos a partir do processamento do *spot* 1 do gel 2-DE da amostra Xyl. Espectro do PMF (**A**) e espectro da fragmentação do peptídeo de m/z 1927,925 (**B**), indicado pela seta.

Tabela 8. Resultado parcial da busca no programa MASCOT para os spots 1, 3 e 4.

Spot 1	<p>1. gi 3913152 Mass: 36169 Score: 32 Queries matched: 1 RecName: Full=Alpha-L-arabinofuranosidase; AltName: Full=Arabinoxylan arabinofuranohydrolase; Flags: Precursor</p> <p>2. gi 46117298 Score: 15 Queries matched: 1 hypothetical protein FG04491.1 [Gibberella zeae PH-1]</p> <p>3. gi 71016460 Mass: 110135 Score: 15 Queries matched: 1 hypothetical protein UM02752.1 [Ustilago maydis 521]</p>
Spot 3	<p>1. gi 3915310 Mass: 35451 Score: 47 Queries matched: 1 RecName: Full=Endo-1,4-beta-xylanase; Short=Xylanase; AltName: Full=1,4-beta-D-xylan xylanohydrolase; AltName: Full=FIA-xylanase; Flags: Precursor</p> <p>2. gi 170094166 Mass: 74151 Score: 15 Queries matched: 1 predicted protein [Laccaria bicolor S238N-H82]</p> <p>3. gi 256731029 Mass: 140953 Score: 13 Queries matched: 1 hypothetical protein NECHADRAFT_48925 [Nectria haematococca mpVI 77-13-4]</p>
Spot 4	<p>1. gi 3915310 Mass: 35451 Score: 208 Expect: 1e-15 Queries matched: 11 RecName: Full=Endo-1,4-beta-xylanase; Short=Xylanase; AltName: Full=1,4-beta-D-xylan xylanohydrolase; AltName: Full=FIA-xylanase; Flags: Precursor</p> <p>gi 7960269 Mass: 35471 Score: 70 Expect: 0.064 Queries matched: 5 endo-1,4-beta-D-xylanase A [Penicillium purpurogenum]</p> <p>gi 240279702 Mass: 16271 Score: 46 Expect: 18 Queries matched: 3 conserved hypothetical protein [Ajellomyces capsulatus H143]</p> <p>gi 115433801 Mass: 66388 Score: 44 Expect: 25 Queries matched: 4 predicted protein [Aspergillus terreus NIH2624]</p> <p>gi 212541364 Mass: 11140 Score: 39 Expect: 74 Queries matched: 2 60S acidic ribosomal protein P2/allergen Asp F 8 [Penicillium marneffeii ATCC 18224]</p> <p>2. gi 189193981 Mass: 52769 Score: 55 Expect: 1.9 Queries matched: 6 ornithine aminotransferase [Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP]</p> <p>3. gi 242772468 Mass: 70943 Score: 48 Expect: 11 Queries matched: 4 conserved hypothetical protein [Talaromyces stipitatus ATCC 10500]</p>

A enzima α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) também pertence à família das hidrolases e participa do metabolismo de açúcares, agindo sobre a extremidade não-redutora dos α -L-arabinofuranosídeos, α -L-arabinanas contendo ligações (1,3) e/ou (1,5), arabinoxilanas e arabinogalactanas, liberando α -L-arabinanos e L-arabinose (Kanehisa *et al.*, 2006). O seqüenciamento do genoma de *A. niger* (Pel *et al.*, 2007) revelou a presença de dois genes que codificam α -arabinofuranosidases da família GH43, três

da GH51 e um da GH54. Como Xyl não apresenta atividade de α -L-arabinofuranosidase, é possível que haja alta homologia de seqüência entre esta enzima e endo-xilanases.

As duas proteínas indicadas pelas setas 3 e 4 (figura 17-B) foram identificadas como endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8) (tabelas 7 e 8), mesmo que, de acordo com o perfil bidimensional, possuam p/s diferentes. Este resultado corrobora a hipótese de se tratarem de xilanases múltiplas que, possivelmente, sofreram modificações pós-traducionais. As conseqüências de MPTs, na prática, incluem a alteração do pI e, de uma forma nem sempre tão perceptiva, da massa molecular. As endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8) também participam do metabolismo de carboidratos, quebrando ligações β - 1,4-D-xilosídicas de xilanas (Kanehisa *et al.*, 2006).

O genoma de *A. niger* revela que este fungo produz uma endo-1,4- β -xilanase da família GH 10 e quatro da GH11 (Pel *et al.*, 2007). Tendo como base o seu tamanho (cerca de 33 kDa), é possível dizer que Xyl seja composto por endo-1,4- β -xilanases da família GH10 (ou família F), que compreende as glicosil hidrolases de massa molecular acima de 30 kDa. Esta família é composta por endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8), que são as maiores enzimas desta família, e também por endo-1,3- β -xilanases (EC 3.2.1.32) e celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) (Coutinho & Henrissat, 1999). Os membros dessa família são altamente ativos sobre pequenos xilo-oligossacarídeos, o que indica pequenos sítios de ligação ao substrato (Biely *et al.*, 1997). Segundo Collins *et al.* (2005), os membros típicos dessa família apresentam alta massa molecular, baixo pI e formam uma estrutura de barril (α/β)₈ (figura 20-A). As isoformas ácidas de Xyl (figura 17-B) parecem se enquadrar nesse padrão.

Por outro lado, as enzimas presentes na amostra Xyl também podem ser classificadas como sendo da família GH11 (ou família G), visto que só apresentam atividade celulolítica residual. De fato, a família 11 é monoespecífica, consistindo unicamente de xilanases que atuam especificamente sobre substratos contendo D-xilose. Essas enzimas

apresentam menor versatilidade catalítica do que as enzimas da família 10, podendo ter seus produtos de hidrólise posteriormente hidrolisados pelas enzimas da família 10 (Biely *et al.*, 1997; Biely *et al.*, 1993). As GH11 são mais ativas do que as GH10 em cadeias longas de xilo-oligossacarídeos, possuindo, no caso do fungo *A. niger*, no mínimo, sete sítios de ligação ao substrato (Vrsanska *et al.*, 1982), enquanto as da família 10 têm quatro ou cinco (Biely *et al.*, 1997). As enzimas da família 11 são geralmente caracterizadas por um alto *pI*, baixa massa molecular e estrutura cilíndrica dobrada de folhas- β (figura 20-B) (Collins *et al.*, 2005).

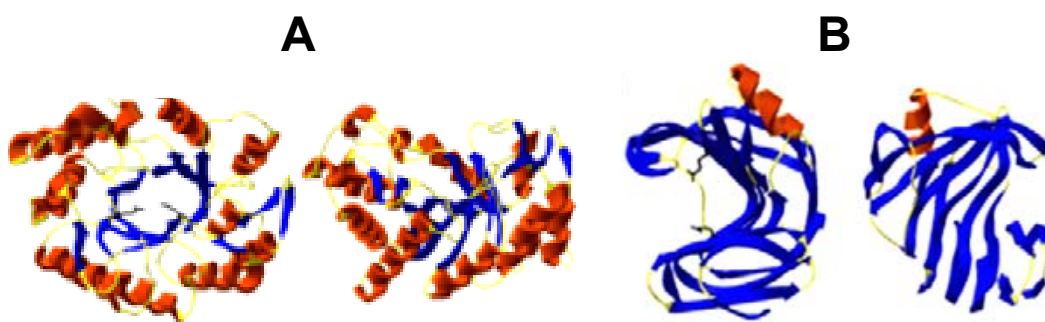


Fig.20. Estrutura de xilanase de *Streptomyces lividans*, característica da família GH10 (A), e de *Trichoderma reesei*, com a típica estrutura da família GH11 (B) (Collins *et al.*, 2005).

Esta duplicidade pode indicar a presença de mais de um tipo de xilanase em *Xyl*. Estudos anteriores mostraram resultados semelhantes para *T. reesei*, em que se purificaram duas xilanases de 20 kDa e *pI*s 5,5 e 9,0 pertencendo à família 11 (Tenkanen *et al.*, 1992), e uma terceira xilanase de 32 kDa e *pI* 9,1, pertencendo à família 10 (Xu *et al.*, 1998).

A heterogeneidade e complexidade da xilana resultou na abundância e diversidade de xilanases, com suas várias especificidades, seqüências primárias e terciárias, levando à limitações quanto à classificação dessas enzimas apenas com base na especificidade ao substrato (Collins *et al.*, 2005).

5.7 Microscopia de Força Atômica (MFA)

A MFA tem sido utilizada no estudo das interações entre enzimas e seus substratos. Ristolainen *et al.* (2002) investigaram as mudanças físicas e químicas ocorridas na superfície de fibras após o tratamento com xilanase, enquanto Adams *et al.* (2003) caracterizaram o tamanho e a forma da arabinoxilana. Mais recentemente, Medeiros *et al.* (2007-b) avaliaram os efeitos de uma xilanase purificada de *Hemicola grisea* sobre polpa de celulose.

A análise da amostra enzimática Xyl por meio de MFA teve como objetivo obter informações acerca de sua estrutura tridimensional e sobre possíveis diferenças na topografia de suas moléculas, visto que a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massa revelaram a presença de mais de uma enzima, ou mesmo de isoformas na amostra denominada Xyl. A figura 21 mostra as imagens com dados de topografia (A e C) e viscoelasticidade (B).

Os pontos escuros que aparecem na figura 21-B indicam a existência de regiões mais viscosas no centro das partículas, o que pode ser confirmado pelos orifícios vistos nas figuras 21-A e C. A maior viscosidade do centro das enzimas pode ser devido à cristalização do sal presente na amostra, ou mesmo das interações entre os resíduos de aminoácidos presentes nas proximidades. Ela pode ainda constituir característica topográfica, podendo não representar qualquer propriedade mecânica. É possível observar, ainda na figura 21, que as enzimas depositaram-se sobre a mica em orientações semelhantes, ou seja, com os orifícios perpendiculares à superfície. Isto pode ser devido à alta afinidade da mica, que é muito hidrofílica, pelos resíduos presentes nas bordas dos orifícios, sugerindo que esta região esteja repleta de resíduos polares, como serina, treonina, cisteína, asparagina e glutamina. A composição de aminoácidos das xilanases reportada por diversos autores indicam a predominância dos

ácidos aspártico e glutâmico, glicina, serina e treonina (Kulkarni *et al.*, 1999). As estruturas das partículas da figura 21, portanto, sugerem que Xyl apresenta formato tridimensional semelhante ao das glicosil hidrolases da família 10 (figura 20) (Collins *et al.*, 2005).

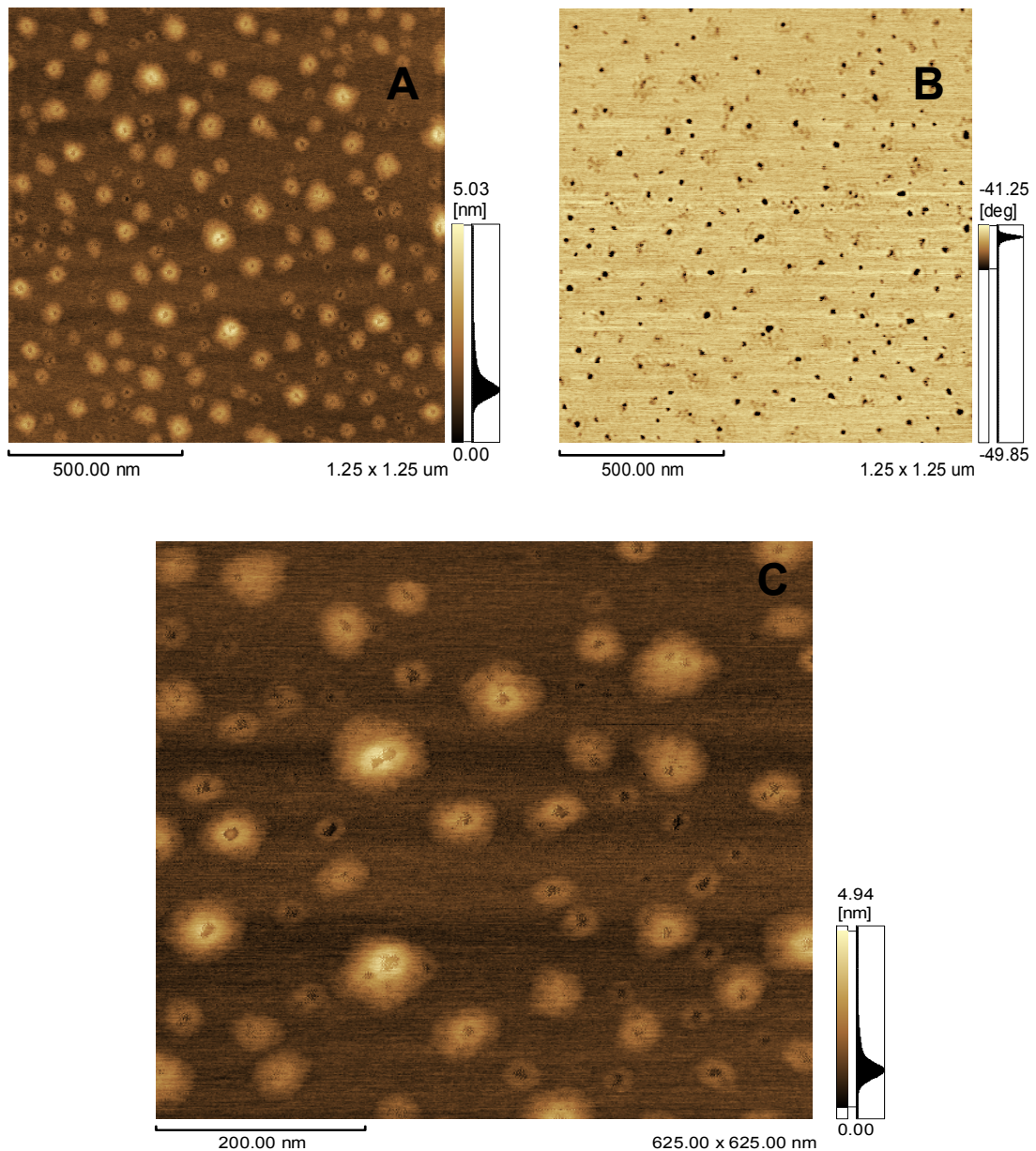


Fig.21. Imagens de Microscopia de Força Atômica de Xyl. Topografia (A e C) e viscoelasticidade (B).

A figura 21-C mostra orifícios muito próximos, quase sobrepostos, podendo ser artefatos ou indícios de que Xyl forma dímeros, ou até trímeros. Este fato já foi observado em xilanase de *T. reesei* (Parkkinen *et al.*, 2004).

A avaliação da medida dos diâmetros das partículas (obtidos por meio de medidas de altura) visualizadas por MFA foi realizada com o *software* ORIGIN 8.0 (Microcal, EUA), e resultou na distribuição destas em três classes de diâmetros, variando de 0,5 nm a 4 nm (figura 22). Consistente com este resultado está a inspeção visual da figura 21, que deixa claro a existência de três populações de tamanhos de partículas. A diferença nos tamanhos pode ser devido à MPTs, que aumentariam o volume das enzimas, pode ser devido à presença de diferentes enzimas de tamanho aproximado na amostra, ou pode ser consequência da formação de dímeros e trímeros.

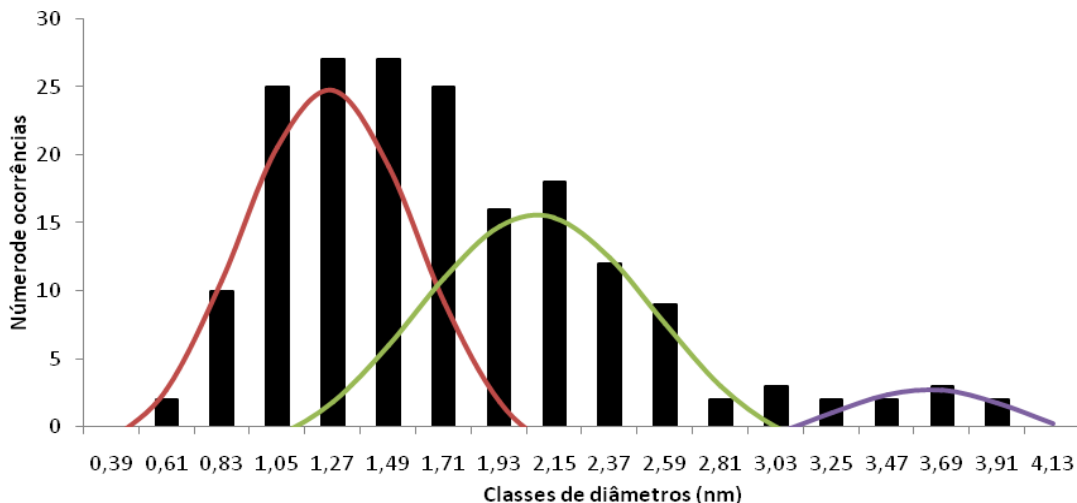


Fig.22. Distribuição normal dos raios das partículas da figura 21, mensurados como a altura das estruturas obtidas por meio de microscopia de força atômica.

6. CONCLUSÕES

O trabalho desenvolvido até o momento nos permitiu verificar que:

- O fungo *A. niger* produz enzimas xilanolíticas, bem como outras enzimas, em presença de bagaço de cana;
- As imagens obtidas por MEV confirmam a degradação enzimática do bagaço de cana pelo fungo *A. niger*;
- A cromatografia revelou apenas um pico de atividade xilanolítica no UFPM10, denominado Xyl, que não apresenta outras atividades holocelulolíticas;
- O tamanho estimado de Xyl foi de cerca de 33 kDa, comprovando sua capacidade de passar por poros de tamanho menor que o seu;
- A atividade específica de Xyl é quase 15 vezes maior do que a do EB, mas seu baixo rendimento indica a presença de cofatores, cuja remoção pela purificação prejudica seu desempenho enzimático;
- A melhor atividade para as amostras EB, UFPM10 e Xyl foi entre 45-50°C. O melhor pH de EB e UFPM10 variou entre 3 e 4, a 45 e 50°C. O melhor pH de Xyl foi 4,5 nas duas temperaturas;
- O HgCl₂ e o SDS promoveram uma diminuição significativa na atividade de Xyl;
- O L-triptofano e o β-mercaptoetanol foram os modificadores químicos de aminoácidos que melhor ativaram a atividade de Xyl, com um incremento de mais de 80%. O NBS e a L-cisteína foram os que mais inibiram sua atividade xilanolítica;
- O tampão acetato de sódio pH 4,5 foi capaz de aumentar a meia-vida do EB e de Xyl melhor do que o L-triptofano e o β-mercaptoetanol. Para o UFPM10, no entanto, o L-triptofano foi o melhor;

- Em princípio, dadas as suas características, as maiores aplicabilidades para Xyl encontram-se na indústria têxtil, na panificação e nas biorefinarias;
- O EB de *A. niger* crescido em bagaço de cana apresenta maior quantidade de enzimas na faixa ácida;
- O perfil bidimensional de Xyl revela a presença de isoformas, ou enzimas múltiplas, que variam em *pI* e em massa molecular. A espectrometria identificou essas proteínas como correspondentes a outras espécies do gênero *Aspergillus*, sugerindo que essas proteínas são conservadas entre as espécies deste gênero;
- Duas proteínas de Xyl foram identificadas como endo-1,4- β -xilanases, e uma como α -L-arabinofuranosidase. Como Xyl não apresenta atividade arabinofuranosídica, é possível que haja uma alta homologia entre endo-xilanases e arabinofuranosidases;
- As imagens de MFA reforçam as características de Xyl que a classificam como GH10, mas a atividade celulolítica residual de Xyl leva sua classificação para a família GH11.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados da caracterização de Xyl demonstraram a possibilidade da aplicação desta enzima em processos industriais. O conhecimento das habilidades de Xyl deve agora ser utilizado de forma a potencializar seu desempenho enzimático em cada processo industrial testado. Devem-se testar, também, as vantagens econômicas da aplicação da enzima pura em relação às outras frações enzimática, EB e UFPM10.

Além disso, as imagens de Xyl de microscopia de força atômica levantaram a suspeita da formação de dímeros, ou até trímeros. Esta amostra vai ser analisada no equipamento Dinamic Light Scattering (DLS), visando a esclarecer se a enzima de fato forma aglomerados e, caso o faça, se estes mantêm a atividade xilanolítica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, E.L.; Kroon, P.A.; Williamson, G. & Morris, V.J. 2003. Characterisation of heterogeneous arabinoxylans by direct imaging of individual molecules by atomic force microscopy. **Carbohydrate Research**. 338: 771–80

Andreas, J.; Filho, E.X.F. & Bon, E.P.S. 2008. Biotechnology of holocellulose-degrading enzymes. In: Hou, C.T. & Shaw, J.-F (eds) **Biocatalysis and Bioenergy**. John Wiley & Sons, United States of America, p. 197-229

Angayarkanni, J.; Palaniswamy, M.; Pradeep, B.V. & Swaminathan, K. 2006. Biochemical substitution of fungal xylanases for prebleaching of hardwood kraft pulp. **African Journal of Biotechnology**. 5(10): 921-929

Bailey, M.J. & Viikari, L. 1993. Production of xylanases by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylanbased media. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 9: 80-84

Balakrishnan H.; Dutta-Choudhry M.; Srinivasan M.C. & Rele M.V. 1992. Cellulase-free xylanase production from an alkalophilic *Bacillus sp.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 8: 627

Beg, Q.K.; Kapoor, M.; Mahajan, L. & Hoondal, G.S. 2001. Microbial xilanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 56: 326-338

Bhadoria, V.; Popescu, L.; Zhao, W. & Peng, Y. 2007. Fungal Transcriptomics. **Microbiological Research**. 162: 285-298

Bhat, M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology . **Biotechnology Advances**. 18: 355-383

Bhat, M.K. & Hazlewood, G.P. 2001. Enzymology and other characteristics of cellulases and xilanases. In: Bedford, M.R. & Partridge, G.G. (eds) **Enzymes in farm animal nutrition**. CABI Publishing, p. 11-23

Biely, P. 1985. Microbial Xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**. 3: 286-290

Biely, P.; Markovic, O. & Mislovicova, D. 1985. Sensitive detection of endo-1,4-beta-glucanases and endo-1,4-beta-xylanases in gels. **Analytical Biochemistry**. 144: 147–151

Biely, P.; Kluepfel, D.; Morosoli, R. & Shareck, F. 1993. Mode of action of three endo-beta-1,4-xylanases of *Streptomyces lividans*. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1162: 246-254

Biely, P.; Vrsanska, M.; Tenkanen, M. & Kluepfel, D. 1997. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**. 57: 151–166

Blum, H.; Beier, H. & Gross, B. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**. 8:93-99

Boraston, A. B.; Bolam, D. N.; Gilbert, H. J. & Davies, G. J. 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **Biochemical Journal**. 38: 769-781

Bouws, H.; Wattenberg, A. & Zorn, H. 2008. Fungal secretomes – Nature’s toolbox for white biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 80: 381-388

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72: 248-254

Celestino, S.M.C.; Freitas, S.M.; Medrano, F.J.; Sousa, M.V. & Filho, E.X.F. 2006. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. **Journal of Biotechnology**. 123: 33-42

Chidi, S.B.; Godana, B.; Ncube, I.; van Rensburg, E.J.; Cronshaw, A. & Abotsi, E.K. 2008. Production, purification and characterization of cellulase-

free xylanase from *Aspegillus terreus* UL 4209. **African Journal of Biotechnology**. 7(21): 3939-3948

Clarke, A.J. & Yaguchi, M. 1985. The role of carboxyl groups in the function of endo- β -1,4-glucanase from *Schizophyllum commune*. **European Journal of Biochemistry**. 149(2): 233-238

Collins, T.; Gerday, C. & Feller, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xilanases. **FEMS Microbiology Reviews**. 29: 3-23

Coutinho, P.M. & Henrissat, B. 1999. Carbohydrate-active enzyme server (CAZY) at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/> CAZY/.

Csiszár, E.; Urbánszki, K. & Szakács, G. 2001. Biotreatment of desized cotton fabric by commercial cellulase and xylanase enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 11: 1065-1072

Dawson, M.; Dixon, T. & Inkerman, P. 1990. Moisture loss from baled bagasse during storage. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**. P. 199-206

Deshpande, N.; Wilkins, M.R.; Packer, N. & Nevalainen, H. 2008. Protein glycosylation pathways in filamentous fungi. **Glycobiology**. 18(8): 626-63

De Vries, R.P.; Kester, H.C.; Poulsen, C.H.; Benen, J.A. & Visser, J. 2000. Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the

degradation of plant cell wall polysaccharides. **Carbohydrate Research**. 327(4): 401-410

Fan, Z.; Werkman, J.R. & Yuan, L. 2009. Engineering of a multifunctional hemicellulase. **Biotechnology Letters**. 31: 751-757

Ferreira, H.M. & Filho, E.X.F. 2004. Purification and characterization of a β -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. **Carbohydrate Polymers**. 57: 23-29

Filho, E. X. F. 1998. Hemicellulases and biotechnology. In: Pandalai, S.G. (Ed.) **Recent Research Developments in Microbiology**. Trivandrum: Research Signpost, p. 165–176

Filho, E.X.F.; Puls, J. & Coughlan, M.P. 1993. Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 11: 171-180

Filho, E.X.F.; Puls, J. & Coughlan, M.P. 1993. Physicochemical and catalytic properties of a low-molecular-weight endo-1,4- β -D-xylanase from *Myrothecium verrucaria*. **Enzyme and Microbial Technology**. 15: 535-540

Garrote, G.; Domínguez, H. & Parajó, J.C. 1999. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **Holz Roh Werk**. 57:191-202

Gawande, P.V. & Kamat, M.Y. 1999. Production of *Aspergillus* xylanases by lignocellulosic waste fermentation and its application. **Journal of Applied Microbiology**. 87:511-519

Glazer, A.N.; Delange, R.J. & Sigman, D.S. 1987. **Chemical Modification of Proteins: Selected Methods and Analytical Procedures**. Elsevier Medical Press, Amsterdam.

Grabski, A.C. & Jeffries, T.W. 1991. Production, purification, and characterization of β -(1,4)-endoxylanase of *Streptomyces roseiscleroticus*. **Applied and Environmental Microbiology**. 57(4): 987-992

Haltrich, D.; Nidetzky, B.; Kulbe, K.D.; Steiner, W. & Zupancic, S. 1996. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**. 58: 137-161

Hammel, K.E. 1997. Fungal degradation of lignin. In: Cadisch, G. & Giller, K.E. (eds) **Plant litter quality and decomposition**. CAB-International, p. 33-46

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

Henshaw, J.L.; Bolam, D.N.; Pires, V.M.R.; Czjzek, M.; Henrissat, B.; Ferreira, L.M.A.; Fontes, C.M.G.A. & Gilbert, H.J. 2004. The family 6 carbohydrate binding module *CmCBM6-2* contains two ligand-binding sites

with distinct specificities. **Journal of Biological Chemistry**. 279 (20): 21552-21559

Gilbert, H.J. & Hazlewood, G.P. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. **Journal of Genetical Microbiology**. 139:187-194

Himmel, M.E.; Ding, S.-Y; Johnson, D.K.; Adney, W.S.; Nimtos, M.R.; Brady, J.W. & Foust, T.D. 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes from biofuels production. **Science**. 314: 804-807

Imoto T. & Yamada, H. 1990. Chemical Modification. In: Creighton, T.E. (ed) **Protein Function – A Practical Approach**. IRL Press, Oxford, p. 247-278

Ishihara, M.; Tawata, S. & Toyama, S. 1997. Purification and some properties of a thermostable xylanase from thermophilic fungus strain HG-1. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 83: 478-480

Ito, K.; Ogassawara, J.; Sugimoto, T. & Ishikawa, T. 1992. Purification and properties of acid stable xylanases form *Aspergillus kawachii*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 56, 547-550

John, M.; Schmidt, B. & Schmidt, J. 1979. Purification and some properties of five endo-1,4- β -D-xylanases and β -D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger*. **Biochemistry and Cell Biology**. 57(2): 125-13

Jordan, D.B. & Li, X.L. 2007. Variation in relative substrate specificity of bifunctional β -D-xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase by single-site mutations: roles of substrate distortion and recognition. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein & Proteomics**. 1774(9): 1192-1198

Jovanovic, I.; Magnuson, J.K.; Collart, F.; Robbertse, B.; Adney, W.S.; Himmel, M.E. & Baker, S.E. 2009. Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies. **Cellulose**. 16: 687-697

Kadam, K.L. 2002. Environmental benefits on a life cycle basis of using bagasse-derived ethanol as a gasoline oxygenate in India. **Energy Policy**. 30: 371-384

Kanehisa, M.; Goto, S.; Hattori, M.; Aoki-Kinoshita, K.F.; Itoh, M.; Kawashima, S.; Katayama, T.; Araki, M. & Hirakawa. 2006. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. **Nucleic Acids Research**. 34, database issue

Kapoor, M.; Singh, A.; Kuhad, R.C. 2007. Application of xylanases in the pulp and paper industry: an appraisal. In: Kuhad, R.C. & Singh, A. (eds), **Lignocellulose biotechnology: future prospects**. IK International, p. 307-310

Khan, M.A.; Ashraf, S.M. & Malhotra, V.P. 2004. Development and characterization of a wood adhesive using bagasse lignin. **International Journal of Adhesion and Adhesives**. 24: 485-493

Khandeparker, R. & Numan, M.T. 2008. Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 35:635-644

Kotaro, K.; Makoto, T.; Takuya, K.; Kiyoshi, I. & Kimio, I. 1995. Cloning of the xynNB gene encoding xylanase B from *Asperillus niger* and its expression in *Aspergillus kawachii*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 79(5): 422-428

Krengel, U& Dijkstra, B.W. 1996. Three-dimensional structure of endo-1,4- β -xylanase I from *Aspergillus niger*: molecular basis for its low pH optimum. **Journal of Molecular Biology**. 263: 70-78

Kulkarni, N.; Shendye, A. & Rao, M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xilanases. **FEMS Microbiology Reviews**. 23: 411:456

Laxmi, G.S.; Sathish, T.; Rao, C.S.; Brahmaiah, P.; Hymavathi, M. & Prakasham, R.S. 2008. Palm fiber as novel substrate for enhanced xylanase production by isolated *Aspergillus* sp. RSP-6. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**. 2(3): 447-455

Leatherbarrow, R.J. 1999. Enzfitter Manual, a non-linear curve fitting program for Windows. **Biosoft**. p. 1-104

Lee, R.C.; Hrmova, M.; Burton, R.A.; Lahnstein, J. & Fincher, G.B. 2003. Bifunctional family 3 glycoside hydrolase from barley with α -L-arabinofuranosidase and β -D-xylosidase activity. **The Journal of Biological Chemistry**. 278: 5377-5387

Lee, J.; Park, J.S.; Moon, J.Y.; Kim, K.Y. & Moon, H.M. 2003. The influence of glycosylation on secretion, stability, and immunogenicity of recombinant HBV pre-S antigen synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 303:427-432

Medeiros, R.G.; Hanada, R. & Filho, E.X.F. 2003. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon Forest fungal species. **International Biodeterioration and Biodegradation**. 52: 97-100

Medeiros, R.G.; da Silva Jr, F.G.; Bão, S.N.; Hanada, R. & Filho, E.X.F. 2007. Application of xylanases from Amazon forest fungal species in bleaching of eucalyptus kraft pulps. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 50(2): 231-238

Medeiros, R.G.; Silva, L.P.; Azevedo, R.B.; Silva Jr., F.G. & Filho, E.X.F. 2007. The use of atomic force microscopy as a tool to study the effect of a xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in kraft pulp bleaching. **Enzyme and Microbial Tehnology**. 40: 723-731

Merino, S.T. & Cherry, J. 2007. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**. 108: 95-120

Michelin, M.; Polizeli, M.L.T.M.; Ruzene, D.S.; Silva, D.P.; Vicente, A.A.; Jorge, J.A.; Terenzi, H.F. & Teixeira, J.A. 2008. A new strategy for xylanase production using wheat straw autohydrolysis liquor as substrate. In: Ferreira, E.C. & Mota, M. (eds.) **Proceedings of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference - CHEMPOR 2008**. Braga, Portugal, p. 9

Miller, G. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**. 31: 426-428

Mineki, R., Taka, H., Fujimura, T., Kikkawa, M., Shindo, N., & Murayama, K. 2002. *In situ* alkylation with acrylamide for identification of cysteinyl residues in proteins during one- and two-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Proteomics**. 2(12): 1672-1681

Moreira, L.R.S.; Mattos, I.; Monclaro, A.V.; Santos, S.S.T.; Jensen, A.T.; Siqueira, F.G. & Filho, E.X.F. 2008. The use of lignocellulosic substrates as carbon sources for production of xylan-degrading enzymes from *Acrophialophora nainiana*. **Current Topics in Biochemical Research**. 10(2): 35-45

Murashima, K.; Kosugi, A. & Doi, R.H. 2003. Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation. **Journal of Bacteriology**. 185(5): 1518-1524

Nakamura, S. 2003. Structure and function of a multidomain alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. **Catalysis Surveys from Asia**. 7: 157-164

Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C.R. & Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**. 77, 149–162

Parkkinen, T.; Hakulinen, N.; Tenkanen, M.; Siika-aho, M. & Rouvinen, J. 2004. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a novel *Trichoderma reesei* xylanase IV belonging to glycoside hydrolase family 5. **Acta Crystallographica Section D**. 60: 542-544

Pel, H.J.; de Winde, J.H.; Archer, D.B.; Dyer, P.S.; Hofmann, G.; Schaap, P.L.; Turner, G.; de Vries, R.P.; Albang, R.; Albermann, K.; Andersen, M.R.; Bendtsen, J.D.; Benen, J.A.E.; van den Berg, M.; Breestraat, S.; Caddick, M.X.; Contreras, R.; Cornell, M.; Coutinho, P.M.; Danchin, E.G.J.; Debets, A.J.M.; Dekker, P.; van Dijck, P.W.M.; Dijkhuizen, L.; Driessen, A.J.M.; d'Enfert, C.; Geysens, S.; Goosen, C.; Groot, G.S.P.; de Groot, P.W.J.; Guillemette, T.; Henrissat, B.; Herweijer, M.; van den Hombergh, J.P.T.W.; van den Hondel, C.A.M.J.J.; van den Heijden, R.T.J.M.; van der Kaaij, R.M.; Klis, F.M.; Kools, H.J.; Kubicek, C.P.; van Kuyk, P.A.; Lauber, J.; Lu, X.; van der Maarel, M.J.E.C.; Meulenber, R.; Menke, H.; Mortimer, M.A.; Nielsen, J.; Oliver, S.G.; Olsthoorn, M.; Pal, K.; van Peij, N.N.M.E.; Ram, A.F.J.; Rinas, U.; Roubos, J.A.; Sagt, C.M.J.; Schmoll, M.; Sun, J.; Ussery, D.; Varga, J.; Vervecken, W.; van der Vondervoort, P.J.J.; Wedler, H.; Wösten, H.A.B.; Zeng, A.-P.; van Ooyen, A.J.J.; Visser, J. & Stam, H. 2007. Genome sequencing and analysis of versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**. 25(2): 221-231

Pereira, A.A.; Martins, G.F.; Antunes, P.A.; Conrado, R.; Pasquini, D.; Job, A.E.; Curvelo, A.A.S.; Ferreira, M.; Riul Jr., A. & Constantino, C.J.L. 2007. Lignin from sugar cane bagasse: extraction, fabrication of nanostructured films, and application. **Langmuir**. 23(12): 6652-6659

Pereira, J.L.; Noronha, E.F.; Miller, R.N.G. & Franco, O.L. 2007. Novel insights in the use of hydrolytic enzymes secreted by fungi with biotechnological potential. **Letters in Applied Microbiology**. 44: 573-581

Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; De La Rubia, T. & Martínez, J. 2002. Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin: an Overview. **International Microbiology**. 5: 53-63

Polizeli, M.; Rizzatti, A.; Monti, R.; Terenzi, H.; Jorge, J.; Amorim, D. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 67: 577-591

Portal Agrario - Cultivos de Importância Nacional. 2005. (www.minag.gob.pe/agricola/azucar_produccion.shtml);(www.minag.gob.pe/agricola/maiz_produccion.shtml);(www.portalagrario.gob.pe/agricola/arroz_produccion.shtml).

Quensanga, A. & Picard, C. 1988. Thermal degradation of sugarcane bagasse. **Thermochimica Acta**.125: 89-97

Raj, H.G.; Saxena, M. & Allameh, A. 1992. Metabolism of foreign compounds by fungi. In: Arora, D.K., Elander, R.P. & Mukerji, K.G. (eds.) **Handbook of Applied Mycology**. Marcel Dekker Inc., New York, vol. 4, p. 881–904

Ristolainen, M.; Alén, R.; Malkavaara, P. & Pere, J. 2002. Reflectance FTIR microspectroscopy for studying effect of xylan removal on unbleached and bleached birch kraft pulps. **Holzforschung**. 56: 513–521

Rizzatti, A.C.S.; Jorge, J.A.; Terenzi, H.F.; Rechis, C.G.V. & Polizeli, M.L.T.M. 2001. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 4: 265-275

Romanowska, I.; Polak, J. & Bielecki, S. 2006. Isolation and properties of *Aspergillus niger* IBT-90 xylanase for bakery. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 69: 665-671

Salama, M.A.; Ismail, K.M.I.; Amany, H.A.; El-Lill, A. & Geweely, N.S.I. 2008. Biochemical studies of purified extracellular xilanases from *Aspergillus versicolor*. **International Journal of Botany**. 4(1): 41-48

Sanchez, J.C.; Rouge, V.; Pisteur, M.; Ravier, F.; Tonella, L.; Moosmayer, M.; Wilkins, M.R., & Hochstrasser, D.F. 1997. Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients. **Electrophoresis**. 18(3): 324-327

Sandrim, V.C.; Rizzatti, A.C.S.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A.; Milagres, A.M.F. & Polizeli, M.L.T.M. 2005. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochemistry**. 40: 1823-1828

Schuster, E.; Dunn-Coleman, N.; Frisvad, J.C. & van Dijck, P.W. 2002. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 59, 426–435

Shei, J.C.; Fratzke, A.R.; Frederick, M.M.; Frederick, J.R. & Reilly, P.J. 1985. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. II. An enzyme of pI 4.5. **Biotechnology and Bioengineering**. 27: 533-538

Silva, C.H.C.; Puls, J.; Sousa, M.V. & Filho, E.X.F. 1999. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Brazilian Journal of Microbiology**. 30: 114- 119

Siqueira, F.G. & Filho, E.X.F. 2010. Plant cell wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**. 7:54-60

Siqueira, F.G.; Siqueira, E.G.; Jaramillo, P.M.D.; Silveira, M.H.L.; Andreus, J.; Couto, F.A.; Batista, L.R.; Siqueira, E.G. & Filho, E.X.F. 2010. The potential of agro-industrial residues for production of holocelulases

from filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 64, 20-26

Subramaniyan, S. & Prema, P. 2000. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**. 183: 1-7

Subramaniyan, S. & Prema, P. 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. **Critical Reviews in Biotechnology**. 22(1): 33-46

Sunna, A. & Antranikian, G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**. 17: 39–67

Tan, L.U.L.; Mayers, P. & Saddler, J.N. 1987. Purification and characterization of a thermostable xylanase from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**. 33(8): 689-692

Tanaka, H.; Nakamura, T.; Hayashi, S. & Ohta, K. 2005. Purification and properties of an extracellular endo-1,4- β -xylanase from *Penicillium citrinum* and characterization of the encoding gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 100(6): 623-630

Tenkanen, M.; Puls, J. & Poutanen, K. 1992. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. **Enzyme and Microbial Technology**. 14: 566-574

Tjalsma, H.; Bolhuis, A.; Jongbloed, J.D.H.; Bron, S. & van Dijk, J.M. 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** 64(3): 515-547

Uffen, R.L. 1997. Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.** 19: 1-6

Vrsanska, M.; Gorbacheva, I.V.; Kratky, Z. & Biely, P. 1982. Reaction pathways of substrate degradation by an acidic endo-1,4-beta-xylanase of *Aspergillus niger*. **Biochimica et Biophysica Acta.** 704: 114-122

Wang, P.; Mason, C. & Broda, P. 1993. Xylanases from *Streptomyces cyaneus*: their production, purification and characterization. **Journal of General Microbiology.** 139: 1987-1993

Wong, K.K.Y.; Tan, L.U.L. & Saddler, J.N. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiology Reviews.** 52: 305-317

Xu, J.; Takakuwa, N.; Nogawa, M.; Ogawa, H. & Morikawa, Y. 1998. A third xylanase from *Trichoderma reesei* PC-3-7. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 49: 718-724

Yan, J.; Sanchez, J.; Rouge, V.; Williams, K. & Hochstrasser, D. 1999. Modified immobilized pH gradient gel strip equilibration procedure in SWISS-2D-PAGE protocols. **Electrophoresis**. 20(4-5): 723-726

Zhang , Y.-H.P.; Himmel, M.E. & Mielenz, J.R. 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**. 24: 452-481

Zhao, J.; Li, X.; Qu, Y; Gao, P. 2002. Xylanase pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat straw. . **Enzyme and Microbial Tehnology**. 30: 734-740

Zhao, H.; Kwak, J.H.; Zhang, Z.C.; Brown, H.M.; Arey, B.W. & Holladay, J.E. 2007. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**. 68 (2): 235-241