



CRISTIANE CONTE PAIM DE ANDRADE

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XILANASE
TERMOESTÁVEL PRODUZIDA POR *Cryptococcus flavescens*
E EXPRESSÃO EM *Pichia pastoris***

CAMPINAS
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CRISTIANE CONTE PAIM DE ANDRADE

**Produção, purificação e caracterização de xilanase termoestável produzida por
Cryptococcus flavescens e expressão em *Pichia pastoris***

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Cristiane Conte Paim de Andrade e orientada pelo Prof.Dr.Francisco Maugeri Filho

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

An24p Andrade, Cristiane Conte Paim de, 1983-
Produção, purificação e caracterização de xilanase termoestável produzida por *Cryptococcus flavescens* e expressão em *Pichia pastoris* / Cristiane Conte Paim de Andrade. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Francisco Maugeri Filho.
Coorientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Xilanase. 2. *Cryptococcus flavescens*. 3. Purificação. 4. Caracterização. 5. Expressão heteróloga. 6. *Pichia pastoris*. I. Maugeri Filho, Francisco. II. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Production, purification and characterization of thermostable xylanase produced by *Cryptococcus flavescens* and expression in *Pichia pastoris*

Palavras-chave em inglês:

Xylanase

Cryptococcus flavescens

Purification

Characterization

Heterologous expression

Pichia pastoris

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Doutora em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Francisco Maugeri Filho [Orientador]

Aldo José Pinheiro Dillon

Andreas Karoly Gombert

Osmar Vaz de Carvalho Netto

Roberto da Silva

Data de defesa: 23-05-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho – Orientador

Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon – Membro Titular

Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert – Membro Titular

Dr. Osmar Vaz de Carvalho Netto – Membro Titular

Prof. Dr. Roberto da Silva – Membro Titular

Profa. Dra. Ana Paula Manera – Membro Suplente

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo – Membro Suplente

Profa. Dra. Telma Teixeira Franco – Membro Suplente

RESUMO GERAL

Xilanases são enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas entre as unidades de xilose que compõem a xilana, o principal constituinte hemicelulósico. Devido à grande disponibilidade desse tipo de material na natureza, as xilanases podem ser empregadas em diversos ramos, como nas indústrias têxtil, de alimentos e de rações, na bioconversão de resíduos lignocelulósicos, no clareamento de papel e polpa, e no tratamento de resíduos. Visando descrever novas enzimas para futuras aplicações, este trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar a xilanase produzida pelo basidiomiceto *Cryptococcus* sp. LEB-AY₁₀, uma levedura previamente isolada da Mata Atlântica e selecionada pela produção de enzima termoestável. Para tanto, o micro-organismo foi inicialmente identificado em nível de espécie e depositado como *C. flavescens* LEB-AY₁₀ (CCT 7725); em sequência, foi estudada a produção da enzima utilizando, como substrato, bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado por explosão a vapor em três diferentes condições, bem como suas respectivas frações solúveis, e suplementados com melaço ou componentes sintéticos. Tendo sido definida a metodologia de tratamento do bagaço, técnicas de planejamento experimental foram utilizadas para estudar a influência das variáveis de cultivo e aumentar a atividade da xilanase produzida. Nas condições otimizadas, obteve-se aumento de 5,6 vezes na atividade em relação aos testes iniciais, atingindo 4,67 U/mL (a 50 °C) ou 8,33 U/mL (a 80 °C) em 96 h de incubação. Posteriormente, realizou-se a purificação da xilanase em duas etapas cromatográficas (troca iônica e permeação em gel), sendo possível recuperar 45% da atividade inicial. A massa molecular média foi estimada em 48 kDa. A enzima apresentou atividade ótima a 77,5 °C e maior estabilidade em pH próximo a 5,3. Neste pH, as meias-vidas desta enzima foram estimadas em 9,2 minutos a 77,5 °C e 33,74 h a 67 °C. Os parâmetros cinéticos K_m e v_{max} utilizando xilana de bétula (*birchwood*) como substrato foram 4,13 g/L e 2,32 U/mL, respectivamente. A xilanase purificada apresentou baixas atividades de β -xilosidase em 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (0,02 U/mg) e de celulase em carboximetilcelulose (0,99 U/mg). Os produtos de hidrólise da xilana de faia (*beechwood*) pela xilanase de *C. flavescens* LEB-AY₁₀ foram, principalmente, xilobiose e xilotriose. Para identificação do gene responsável pela produção da xilanase, foram utilizadas três estratégias: amplificação com *primers* degenerados, identificação de peptídeos por espectrometria de massas e sequenciamento do genoma da levedura. Um único gene (1265 pb) denominado *Xyn10Cf* foi identificado e o correspondente cDNA (1035 pb) foi clonado em *Escherichia coli* DH10B. O gene é interrompido por 6 íntrons, codifica um peptídeo sinal composto por 13 aminoácidos e a proteína madura é formada por 331 aminoácidos, tendo sua massa molecular estimada em 37,1 kDa (podendo conter cerca de 11 kDa de glicosilação). Com base na sequência de nucleotídeos e na caracterização da enzima purificada, a proteína foi classificada como membro da família GH10. Por fim, para comprovar a funcionalidade do gene identificado *Xyn10Cf* foi realizada a expressão na linhagem de *Pichia pastoris* GS115 sob o controle dos promotores álcool oxidase 1 (AOX1) ou gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), atingindo 5,66 U/mL e 7,67 U/mL, respectivamente, para 84 h de indução em frascos agitados.

Palavras-chave: xilanase, *Cryptococcus flavescens*, purificação, caracterização, expressão heteróloga, *Pichia pastoris*.

ABSTRACT

Xylanases are enzymes that hydrolyze the glycosidic bonds between the xylose units of xylan, the main hemicellulosic compound. Due to the high availability in nature of this kind of material, the xylanases may be used in a wide range of industrial plants, including: textile, food and feed industries, bioconversion of lignocellulosic wastes, biobleaching of paper and pulp, and waste treatment. In order to describe novel enzymes for future applications, the goal of this work was to purify and characterize the xylanase produced by the basidiomycete *Cryptococcus* sp. LEB-AY₁₀, a yeast previously isolated in the Atlantic Forest and selected by the production of a thermostable enzyme. First, the microorganism was identified at the species level and deposited as *C. flavescens* LEB-AY₁₀ (CCT 7725); then, enzyme production was studied using the substrate sugarcane bagasse, pretreated by steam explosion in three different conditions, as well their corresponding soluble fractions, and supplemented with molasses or synthetic compounds. After selection of the treatment, experimental design techniques were used to assess the influence of cultivation variables and to increase the activity of produced xylanase. At optimized conditions, it was possible to increase activity by 5.6 times from initial assays, reaching 4.67 U/mL (at 50 °C) or 8.33 U/mL (at 80 °C) after 96 h of incubation. Later, the purification of the xylanase was performed in two chromatographic steps (ion exchange and gel permeation), in which it was possible to recover 45% of initial activity. The average molecular weight was estimated at 48 kDa. The enzyme showed optimal activity at 77.5 °C and it was most stable at pH values near 5.3. At this pH, the half-lives of this enzyme were 9.2 min at 77.5 °C and 33.74 h at 67 °C. The kinetic parameters K_m and v_{max} for Birchwood xylan were 4.13 g/L and 2.32 U/mL, respectively. The purified xylanase showed low activity of β -xylosidase on 4-nitrophenyl- β -D-xilopiranosídeo (0.02 U/mg) and also showed some cellulase activity on carboxymethylcellulose (0.99 U/mg). The hydrolysis products of Beechwood xylan by the xylanase from *C. flavescens* LEB-AY₁₀ were mainly xylobiose and xylotriose. For identification of the gene responsible for xylanase production, three strategies were used: amplification of degenerated primers, identification of peptides by mass spectrometry and yeast genome sequencing. A single gene (1265 pb) named *Xyn10Cf* was identified and the corresponding cDNA (1035 pb) was cloned into *Escherichia coli* DH10B. The gene is interrupted by 6 introns, it codifies a signal peptide of 13 amino acids and the mature protein is composed by 331 amino acids, with an estimated molecular mass of 37.1 kDa (it may contain around 11 kDa of glycosylation). Based on nucleotide sequencing and on characterization of the purified enzyme, the protein was classified as a member of GH10 family. Finally, to prove the functionality of the identified gene *Xyn10Cf*, the expression in *Pichia pastoris* GS115 strain was performed under the control of alcohol oxidase 1 (AOX1) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) promoters, reaching 5.66 U/mL and 7.67 U/mL, respectively, after 84 h of incubation in shaker flasks.

Keywords: xylanase, *Cryptococcus flavescens*, purification, characterization, heterologous expression, *Pichia pastoris*.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xxi
ÍNDICE DE TABELAS	xxv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxvii
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E APRESENTAÇÃO DO TRABALHO.....	1
1.1 INTRODUÇÃO GERAL	3
1.2 OBJETIVOS.....	5
1.2.1 Objetivo Geral	5
1.2.2 Objetivos Específicos.....	5
1.3 ORGANIZAÇÃO DOS CAPÍTULOS	6
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 HEMICELULOSES.....	11
2.1.1 Xilana.....	13
2.1.2 Extração e despolimerização da xilana	14
2.2 ENZIMAS XILANOLÍTICAS.....	16
2.2.1 Endoxilanases.....	18
2.2.1.1 <i>Classificação e modo de ação</i>	18
2.2.1.2 <i>Aplicações</i>	21
Indústria de papel e polpa.....	21
Bioconversão de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis	22
Indústrias farmacêuticas, de alimentos e de rações	23
2.2.1.3 <i>Micro-organismos produtores</i>	24
Multiplicidade de xilanases	25
2.2.1.4 <i>Clonagem e expressão</i>	26
Expressão em bactérias.....	27
Expressão em fungos filamentosos.....	27
Expressão em leveduras.....	28
2.3 <i>Cryptococcus flavescens</i>	29
2.4 OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS	30
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
CAPÍTULO 3: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASE UTILIZANDO BAGAÇO EXPLODIDO.....	41
3.1 INTRODUCTION	45
3.2 MATERIALS AND METHODS.....	46
3.2.1 Yeast Identification	46
3.2.2 Substrates	47
3.2.2.1 <i>Soluble fraction preparation</i>	47
3.2.3 Induction of enzyme	47
3.2.3.1 <i>Assay 1: Preliminary test using bagasse and molasses</i>	48
3.2.3.2 <i>Assay 2: Removal of possible inhibitors</i>	48
3.2.3.3 <i>Assay 3: Enzyme production using bagasse and synthetic medium</i>	48
3.2.4 Optimization strategy	49
3.2.5 Analysis.....	50
3.2.5.1 <i>Enzymatic Activity</i>	50
3.2.5.2 <i>Moisture content</i>	50
3.2.5.3 <i>HPAEC-PAD analysis</i>	50
3.3 RESULTS AND DISCUSSION	51

3.3.1 Yeast identification	51
3.3.2 Enzyme production.....	51
3.3.2.1 Preliminary tests using bagasse and molasses.....	51
3.3.2.2 Removal of possible inhibitors.....	52
3.3.2.3 Enzyme production using bagasse and synthetic medium	53
3.3.3 Optimization of culture media	55
3.4 CONCLUSION	62
3.5 REFERENCES	63
CAPÍTULO 4: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO	67
4.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	69
4.1.1 Micro-organismo.....	69
4.1.2 Produção da enzima	69
4.1.3 Concentração e purificação da xilanase.....	69
4.1.3.1 Precipitação da enzima	69
4.1.3.2 Concentração por ultrafiltração.....	70
4.1.3.3 Purificação da enzima	70
4.1.3.4 Eletroforese	71
4.1.4 Caracterização da enzima purificada.....	71
4.1.4.1 Perfil de Temperatura e pH.....	71
4.1.4.2 Estabilidade da enzima a 72 °C em função do pH.....	73
4.1.4.3 Estabilidade térmica.....	73
Constante de inativação e meia vida da enzima.....	73
Cálculo da energia de inativação enzimática.....	74
Parâmetros termodinâmicos	74
4.1.4.4 Especificidade pelo substrato.....	75
4.1.4.5 Parâmetros cinéticos.....	75
4.1.4.6 Hidrólise da xilana.....	76
4.1.5 Métodos analíticos.....	76
4.1.5.1 Determinação da atividade de xilanase	76
4.1.5.2 Determinação de atividade de β -xilosidase.....	77
4.1.5.3 Determinação de proteínas	77
4.1.5.4 Quantificação de xilose e xilo-oligossacarídeos.....	77
4.2 RESULTADOS.....	78
4.2.1 Produção da enzima	78
4.2.2 Concentração e purificação da xilanase.....	79
4.2.2.1 Concentração da enzima.....	79
4.2.2.2 Purificação das enzimas	81
4.2.3 Caracterização da enzima purificada.....	85
4.2.3.1 Perfil de temperatura e pH	85
4.2.3.2 Estabilidade a 72 °C em função do pH.....	90
4.2.3.3 Estabilidade térmica.....	90
4.2.3.4 Parâmetros cinéticos.....	93
4.2.3.5 Especificidade substrato	95
4.2.3.6 Produtos da hidrólise.....	97
4.3 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO	100
4.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
CAPÍTULO 5: CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO GENE XYN10CF.....	105
5.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	107
5.1.1 Construção de <i>primers</i> degenerados baseado em banco de dados.....	107
5.1.1.1 Extração de DNA	107
5.1.1.2 <i>Primers</i> degenerados.....	108
5.1.1.3 Amplificação	108
5.1.1.4 Purificação das bandas.....	109

5.1.1.5 Sequenciamento	109
5.1.1.6 Análise das sequências.....	110
5.1.2 Espectrometria de massas	110
5.1.2.1 Preparo da amostra	110
5.1.2.2 LC-MS/MS.....	110
5.1.2.3 Análise dos dados.....	111
5.1.3 Genoma	111
5.1.3.1 Sequenciamento HiSeq Illumina.....	111
5.1.3.2 Bioinformática.....	112
5.1.3.3 Procedimentos da clonagem	113
Extração de RNA total	113
Purificação do mRNA.....	113
Síntese do cDNA.....	114
Desenho dos primers.....	114
Clonagem.....	115
5.1.3.4 Extração dos plasmídeos (pequena escala)	116
5.1.3.5 Sequenciamento	116
5.1.3.6 Predição da proteína e análise de bioinformática.....	116
5.1.3.7 Depósito	117
5.2 RESULTADOS.....	117
5.2.1 Amplificação utilizando primers degenerados.....	117
5.2.2 Espectrometria de massas	119
5.2.3 Genoma	119
5.2.3.1 Clonagem	120
5.2.3.2 Análise da sequência	121
5.3 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO	125
5.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
<u>CAPÍTULO 6: EXPRESSÃO EM PICHIA PASTORIS</u>	<u>127</u>
6.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	129
6.1.1 Vetores de expressão	129
6.1.2 Clonagem em vetor pGEM-T Easy	130
6.1.3 Clonagem nos vetores de expressão.....	131
6.1.4 Confirmação da clonagem.....	132
6.1.5 Transformação em GS115.....	132
6.1.6 Seleção dos transformantes	132
6.1.6.1 Pesquisa por fenótipo Mut ⁺ e Mut ^S	133
6.1.6.2 Pesquisa pela produção da enzima funcional extracelular	133
6.1.7 Produção da enzima recombinante	133
6.1.8 Purificação parcial das enzimas	134
6.1.9 Métodos Analíticos	134
6.1.9.1 Determinação de proteínas.....	134
6.1.9.2 Atividade de endo-xilanase (qualitativo).....	134
6.1.9.3 Atividade de endo-xilanase (quantitativo)	134
6.1.9.4 Gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	135
6.2 RESULTADOS.....	135
6.3 CONCLUSÕES	141
6.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
<u>CAPÍTULO 7: CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</u>	<u>143</u>
7.1 CONCLUSÃO GERAL	145
7.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	147
<u>ANEXOS: PUBLICAÇÕES RELACIONADAS</u>	<u>149</u>

"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito (...)
não somos quem deveríamos ser,
não somos quem iremos ser,
mas, graças a Deus, não somos o que éramos."
Martin Luther King

Dedico esta tese:
aos meus pais, Silvana e José Vilmar,
ao meu irmão, Eduardo,
e ao meu amor, Samuel

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao professor Francisco, por me receber em seu grupo de pesquisa, pela oportunidade, confiança e ensinamentos.

Ao professor Gonçalo por abrir as portas do seu laboratório, pela co-orientação, pelos conselhos e pela motivação, para sempre seguir em frente.

Aos professores: Aldo, Ana Paula, Andreas, Gabriela, Osmar, Roberto e Telma, por terem aceitado o convite para fazer parte da banca. Certamente as colocações, os questionamentos e as dicas enriqueceram muito este trabalho.

Aos meus pais e ao Duda, por serem fundamentais em minha vida, pelos ensinamentos, pelo amor, suporte, conselhos, apoio e por estarem sempre torcendo por mim.

Ao Sa, por todo amor, companheirismo, compreensão e incentivo, atitudes e gestos que me fortaleceram durante essa caminhada.

Ao Delano, Ana, Rafa, Me e Naô por me receberem em sua família.

À família Lussari pelos bons momentos e por terem feito parte da minha história.

À professora Maria Isabel (Bel), pela dedicação e pelos auxílios diversos, tanto a nível profissional quanto pessoal.

À Fifa pelo carinho, conselhos, paciência, disponibilidade incondicional em ajudar e, principalmente, por esse jeitinho que nos dá conforto nos momentos de desespero.

Aos professores e funcionários da FEA, em especial àqueles que estão sempre dispostos a ajudar: Cosme, Marcos, Fred, Reinaldo e Mauro, obrigada pela paciência e auxílio com as burocracias. E ao Dani (CI), pelas conversas e inúmeras vezes que tentou "reanimar" nossos equipamentos.

Aos amigos do "mestrado", Fran e Gustavo, Tali e Nelson, Su e Mariano, Telmicha e Fabiano, Suzi e Felipe, Lo e Ronald, Paula e Lucas, Van e André, pela amizade e pelos inúmeros bons momentos de descontração, que tornaram essa jornada um pouco mais leve e divertida.

À Ana, Zama, Marquinhos, Phelipe e Remi, pela amizade e inúmeros conselhos nos momentos mais difíceis. Aos amigos e companheiros do LEB, os quais me aguentaram durante esses anos: Dani, Gi, Rafa, Ricardo, Karla, Laís, Marina, Bárbara, Natália, Raquel, Andrea (e César), Mónica, Rosana, Luige, Bernardo, Abraão. E agora, aos "novos" integrantes do LEMeB: Felipe, Wesley, Bruno e Rosa. À Pri pela amizade e disposição. À Tatiana pelo auxílio como iniciação científica nos testes com bagaço. E à Fer Lopes, pelas dicas, colaborações e amizade.

Aos amigos que fiz no LGE, em especial ao Bruno pela quase "co-orientação", à Sula pelas ajudas iniciais, à Oda pelo auxílio com os *primers* degenerados, ao Javier pelo sequenciamento do Genoma, ao Tchelo pelas análises em bioinformática, ao Joan por ajudar na elaboração do protocolo de extração de RNA, à Tchela e ao Leandro pelos conselhos diversos. Ao Bruce pela bancada, preocupação e amizade. À Eli e ao Welbe pelas inúmeras ajudas. Ao João Paulo (CTBE) e ao Alexandre (IQ) pela paciência e auxílio com as análises de espectrometria de massas.

Aos amigos do Ital, que me acolheram logo que cheguei em Campinas.

Ao pessoal da UCS, em especial Ana, Sérgio, Juci. e César, pelos ensinamentos e amizade.

Às minhas irmãs de coração, Bru, Mily (e Di), Kety, Ticha e Léca, por todos esses anos de amizade, que mesmo à distância se mantêm cada vez mais forte.

Aos meus familiares e amigos que, mesmo não tendo seus nomes citados, são muito importantes em minha vida.

A todos aqueles que de alguma forma me apoiaram ou fizeram parte desta caminhada.

E ao CNPq pelo apoio financeiro.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Ilustração da estrutura da parede celular de plantas, demonstrando as diferentes camadas e seus principais compontes (adaptado de Achyuthan <i>et al.</i> , 2010).....	11
Figura 2.2. Representação esquemática de estruturas de hemicelulose (adaptado de BURTON <i>et al.</i> , 2010; CARPITA, 1996; SOUZA, 2013).....	12
Figura 2.3. Modelos estruturais de xilanas extraídas de trigo, sorgo e gimnospermas (adaptado de KABEL, 2002).	13
Figura 2.4. Estrutura hipotética da xilana apresentando diferentes grupos substituintes com sítios de ataque por xilanases (BEG <i>et al.</i> , 2001; MARTINS <i>et al.</i> , 2011; SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).....	17
Figure 3.1 Xylanase activity (a) and pH (b) for <i>Cryptococcus flavescens</i> LEB-AY ₁₀ cultivated in the soluble fraction (C5) treated with activated charcoal, submitted to biphasic fermentation (biodiesel) or without treatment. Synthetic compounds (SYNT) or molasses (MOL) were added.....	52
Figure 3.2 Xylanase activity (a) and pH (b) for <i>C. flavescens</i> LEB-AY ₁₀ using pretreated bagasse (PTB), soluble fraction (C5) or raw bagasse, in synthetic medium.	53
Figure 3.3 Bars chart showing the estimate of effects in the PB design at 90% confidence determined by the Student's t-test. Vertical dashed lines represent $t_{critic}=1.94$ (two-tailed test, $p<0.1$; 6 degrees of freedom). MAX/t: maximum activity for each fermentation divided by its time of occurrence.....	56
Figure 3.4 Xylanase activity (a) and biomass (b) for different concentrations of the C5 fraction.....	57
Figure 3.5 Xylanase activity (a) and biomass concentration (b) for the CCRD.....	59
Figure 3.6 Response surface (a) and contour plot (b) for xylanase activity as a function of yeast extract and ammonium sulfate concentrations.	61
Figure 3.7 Xylanase activity (a) and biomass (b) for validation of results from trial 13 and study of all factors at condition $-\alpha$. Error bars represent the standard error among fermentation replicates and different letters ^{a,b} indicate that enzymatic activity differed significantly between means according to Tukey's test ($\alpha = 0.10$) for different media compositions.....	61
Figura 4.1. Produção da enzima: pH (a) e atividade enzimática (b) em função do tempo de fermentação.....	79
Figura 4.2. SDS-PAGE revelado com nitrato de prata, onde LMW: padrão de baixa massa molecular (GE Healthcare), A) extrato enzimático, B) precipitado com acetona, C) precipitado	

com etanol, D) ultrafiltração em dispositivo Amicon®, E) concentrado com sulfato de amônio.	81
Figura 4.3. Cromatografia de troca iônica DEAE-Streamline.....	82
Figura 4.4. SDS-PAGE revelado com nitrato de prata, onde LMW: padrão de baixa massa molecular (GE Healthcare); A-F: frações ativas GPC; G: injeção GPC 1:10.....	83
Figura 4.5. Cromatografia por permeação em gel (GPC) Superdex75.	83
Figura 4.6. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a atividade xilanólítica em função do pH e temperatura.....	88
Figura 4.7. Valores previstos de atividade em função dos valores experimentais (a) e atividade xilanólítica em função da temperatura em pH 4,8 (b).	89
Figura 4.8. Estabilidade em relação ao pH a 72°C após 30 minutos de incubação em tampão citrato e tampão fosfato.....	90
Figura 4.9. Estabilidade térmica (a), em termos de meia-vida, a pH 4,8 e 5,3, ajustadas à equação de Arrhenius. Linearização da equação de Arrhenius (b) para calcular a energia de inativação enzimática.....	91
Figura 4.10. Efeito da concentração de substrato na atividade de xilanase: pontos experimentais e ajuste não-linear (a), e gráficos de Lineweaver-Burk (b), Hanes-Woolf (c) e Eadie-Hofstee (d).....	93
Figura 4.11. Pontos experimentais e ajustes da equação de Michaelis-Menten gerados através das constantes preditas por cada modelo.....	95
Figura 4.12. Soluções de 1% de xilanas: (a) xilana de bétula, (b) xilana de faia (lote A) e (c) xilana de faia (lote B).	97
Figura 4.13. Análise dos produtos após 1 h de hidrólise (diluídos 10 vezes) e, em destaque, exemplo de cromatograma mostrando a separação dos padrões de xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4) e xilopentose (X5), cada um a 50 mg/L.	98
Figura 4.14. Produtos da hidrólise da enzima purificada em até 2 h de incubação a 70°C....	99
Figura 5.1. Representação esquemática do preparo das bibliotecas e da formação dos <i>clusters</i> (baseado em http://res.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf).....	112
Figura 5.2. Mapa do vetor pGEM-T Easy (Promega)	115
Figura 5.3. Fragmento de DNA amplificado utilizando os <i>primers</i> X ₁₀ -F e X ₁₀ -R (a) e banda purificada (b). Padrão de massa molecular Invitrogen DNA Ladder 100 pb.....	118
Figura 5.4. Extração de RNA total em três tempos de indução (a), controle e sequências de DNA e cDNA (18 h) correspondente ao gene <i>Xyn10Cf</i> (b). Padrão de massa molecular (MW) 1 kb DNA Ladder (Invitrogen).....	120

Figura 5.5. Exemplo de extração plasmidial (1), controle negativo (C) e amplificação do gene clonado com os <i>primers</i> XynACf-R e XynACf-R (2), e digestão parcial do plasmídeo com as enzimas Apa I e Sal I. Padrão de massa molecular (MW) 1 kb DNA Ladder (Invitrogen)....	121
Figura 5.6. Sequência de nucleotídeos e predição de aminoácidos para o gene <i>Xyn10Cf</i> . Em negrito, códons de iniciação e término da transcrição. Íntrons representados por letras minúsculas. Sublinhado, peptídeo sinal predito. Regiões demarcadas por retângulos representam potenciais sítios de N- e O-glicosilação. Resíduos conservados de ácido glutâmico encontram-se circulosados. Setas acima dos nucleotídeos indicam regiões nas quais foram desenhados <i>primers</i>	122
Figura 5.7. Alinhamento ClustalW da sequência de aminoácidos deduzida para xilanase de <i>C. flavescens</i> LEB-AY ₁₀ e outras xilanases GH10 produzidas por: <i>Cryptococcus adeliensis</i> (gi 2624008), <i>Streptomyces ipomoeae</i> 91-03 (gi 496654957), <i>Thermobispora bispora</i> DSM 43833 (gi 296270111) e <i>Schizophyllum commune</i> H4-8 (gi 302675262). Asteriscos (*) acima dos resíduos indicam os ácidos glutâmicos conservados.....	124
Figura 6.1. Mapa do Vetor pPICZαA (Invitrogen).	129
Figura 6.2. Mapa do Vetor pGAPZαA (Invitrogen).....	130
Figura 6.3. Digestão do pGEM-T Easy para remoção do inserto (indicado pela seta), utilizando as enzimas EcoRI e NotI, sendo que A, B, C e D representam diferentes extrações.	135
Figura 6.4. Vetores de expressão pPICZαA (a) e pGAPZαA (b) extraídos por lise alcalina. Padrão de massa molecular (MW) 1 kb DNA Ladder (Invitrogen)	136
Figura 6.5. Exemplo de amplificação do pPICZαA (a) e pGAPZαA (b) com os <i>primers</i> dos vetores para a confirmação do inserto (indicado pela seta).....	136
Figura 6.6. Crescimento celular de clones recombinantes de <i>P. pastoris</i> GS115 para xilanases, para expressão induzida em BMMY e constitutiva em YPD, utilizando linhagem não transformada como controle.....	137
Figura 6.7. Atividade de xilanases em clones recombinantes de <i>P. pastoris</i> GS115 em condições induzidas (BMMY) ou constitutivas (YPD), utilizando linhagem não transformada como controle.	138
Figura 6.8. Perfil de proteínas de soluções enzimáticas em SDS-PAGE corado com nitrato de prata, enzima nativa purificada (A) e enzimas recombinantes sem (B) e com (C) cauda de poli-histidina.. Padrão de baixa massa molecular (LMW, GE Healthcare).....	140

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Estrutura, mecanismo catalítico, resíduo ácido/base e nucleófilo para as famílias de hidrolases glicosídicas relacionadas com atividade de xilanase, de acordo com o banco CAZy.....	19
Table 3.1 PB matrix showing coded levels and real values (in brackets).....	49
Table 3.2 HMF, sucrose and monomeric sugars analyzed by HPAEC-PAD (averages of duplicate analysis).....	54
Table 3.3 Coded and real values (in brackets) followed by responses of xylanase activity at 48 and 60 h of incubation.	58
Table 3.4 Regression coefficients results for the CCRD of the strain <i>C. flavescens</i> LEB-AY ₁₀ using different nitrogen sources. Confidence level of 90%.	60
Tabela 4.1. Faixa de valores utilizados para o primeiro DCCR.....	72
Tabela 4.2. Faixa de valores utilizados para o segundo DCCR, sendo os fatores pH e temperatura.....	72
Tabela 4.3. Concentração da enzima utilizando sal, solventes orgânicos e ultrafiltração.	80
Tabela 4.4. Concentração, atividade, volume, atividade total e recuperação para o processo de purificação da enzima xilanase	84
Tabela 4.5. Matriz do DCCR e atividade enzimática.	85
Tabela 4.6. Coeficientes de regressão do DCCR para a atividade de endoxilanase ($R^2=0,86$).	86
Tabela 4.7. Matriz do DCCR e atividade enzimática.	87
Tabela 4.8. Coeficientes de regressão estatisticamente significativos a $p < 0,10$	87
Tabela 4.9. Análise de Variância para a xilanase.....	88
Tabela 4.10. Constante de inativação, meia-vida, energia livre de Gibb's, entalpia e entropia de inativação da enzima para cada temperatura em pH 4,8 e pH 5,3.	91
Tabela 4.11. Parâmetros cinéticos estimados por quatro metodologias baseados no modelo de Michaelis-Menten.....	94
Tabela 4.12. Atividade da enzima purificada em diferentes substratos.	96
Tabela 5.1. Lista de <i>primers</i> desenhados para amplificação do <i>Xyn10Cf</i>	114
Tabela 5.2. Homologia por Blastx do cDNA <i>Xyn10Cf</i> com outras linhagens	123

Tabela 6.1. Lista de *primers* utilizados neste capítulo para amplificação do *Xyn10Cf* e sequenciamento do vetor de expressão.....131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A ₀	constante de Arrhenius
ANOVA	análise de variância
AOX	álcool oxidase
Blast	Basic Local Alignment Search Tool
C ₁	constante
CAZy	Carbohydrate Active Enzymes
CBD	<i>cellulose-binding domain</i>
CCRD	<i>Central Composite Rotational Design</i>
cDNA	DNA complementar
cds	<i>coding sequence</i> , sequência codificadora
CMC	carboximetilcelulose
Da	Dalton
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico
DNS	ácido dinitro-salicílico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfato
DTT	ditiotreitól
E _a	energia de ativação enzimática (kJ/mol)
E _d	energia de inativação/desativação enzimática (E _d)
ExPASy	Expert Protein Analysis System
FC5	<i>fraction containing pentoses</i> , fração contendo pentoses
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GH	<i>glucosyl hydrolases</i> , hidrolases glicosídicas
GPC	<i>gel permeation chromatography</i> , cromatografia de permeação em gel
GRAS	<i>generally recognized as safe</i> , geralmente reconhecido como seguro
h	constante de Planck (11,04.10 ⁻³⁶ J.min)
HPAE-PAD	<i>high-ph anion-exchange chromatography - pulsed amperometric detection</i>
HTSF	High Throughput Sequencing Facility
IAA	iodoactemanida

k	constante de velocidade (min^{-1})
k_B	constante de Boltzman ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$)
k_d	constante de inativação/desativação (min^{-1})
K_m	constante de Michaelis-Menten
LGE	Laboratório de Genômica e Expressão
LMW	<i>low molecular weight</i> , baixo massa (peso) molecular
mRNA	RNA mensageiro
Mut ⁻	<i>Methanol utilization minus</i>
Mut ⁺	<i>Methanol utilization plus</i>
Mut ^S	<i>Methanol utilization slow</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
pb	pares de bases
PB	Plackett-Burman
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , reação de polimerase em cadeia
PDN6	<i>primers</i> randômicos
pNPX	4-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo
PTB	<i>pre-treated bagasse</i> , bagaço pré-tratado
R	constante dos gases ideais ($8,314 \cdot 10^{-3} \text{ kJ/mol.K}$)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , ácido ribonucléico
S	concentração de substrato.
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis</i>
T	temperatura
t	tempo (min)
$t_{1/2}$	meia-vida da enzima (min)
v	velocidade, atividade
v_0	atividade inicial
v_{max}	atividade máxima
XOS	xilo-oligossacarídeos
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>yeast extract, peptone, dextrose broth</i>
ΔG	variação da energia livre de Gibbs (kJ/mol)
ΔH	variação da entalpia (kJ/mol)
ΔS	variação da entropia (kJ/mol.K)

CAPÍTULO 1

1 Introdução e apresentação do trabalho

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A xilana, um polímero de xilose, é o principal componente da fração hemicelulósica da parede celular vegetal e, por isso, é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. Xilana pode representar até 35% da massa seca da madeira e de resíduos agrícolas (CUI *et al.*, 2008), o que a torna um dos mais importantes alvos na exploração de fontes de carbono renováveis (DEN HAAN; VAN ZYL, 2003).

Devido à heterogeneidade da xilana encontrada em plantas, a sua completa despolimerização depende da ação de um complexo enzimático variado. Dentre as enzimas hidrolíticas envolvidas nesse processo, as mais importantes são as endo- β -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8), também denominadas endoxilanases ou xilanases. Elas atuam na hidrólise da cadeia principal, catalisando a clivagem das ligações β -D-1,4- entre os resíduos de xilose o que resulta na formação de xilobiose e xilo-oligosacarídeos (XOS) de tamanhos variados.

Diversas são as aplicações das xilanases, podendo ser empregadas como aditivos nas indústrias de rações, alimentos e bebidas, na fabricação de têxteis, no clareamento de papel e polpa, na bioconversão de lignocelulósicos em produtos de maior valor agregado como etanol, ou auxiliarem no tratamento de resíduos (biorremediação e bioconversão). Entretanto, a maioria das xilanases estudadas não possui todas as características requeridas para serem utilizadas em processos industriais. Considera-se que uma xilanase ideal deva ter, dentre outros atributos, estabilidade dentro de uma ampla faixa de valores de pH e temperatura ou, pelo menos, dentro das condições operacionais, além de ter alta atividade específica e grande resistência a cátions metálicos e outras substâncias químicas. Em vista de preencher tais requisitos, estudos de bioprospecção por novas enzimas aliados à otimização de processos têm sido algumas das ferramentas utilizadas.

Xilanases são produzidas por uma grande variedade de micro-organismos, sendo os fungos filamentosos e as bactérias os mais estudados visto que eles secretam grandes quantidades destas enzimas. Entretanto, o interesse na produção de xilanases por leveduras também tem atraído a atenção de pesquisadores que apostam nas bioprospecções para buscar enzimas com características particulares e de interesse industrial. Dentre os principais gêneros de leveduras já estudados, pode-se citar: *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Scheffersomyces* e *Aureobasidium*, sendo este último um fungo dimórfico.

Com o intuito de buscar novas enzimas potenciais, Motta (2008) analisou a produção de xilanase por 349 leveduras, as quais foram isoladas de diversas fontes (como solo, flores

e frutos) em diferentes regiões do Brasil por Hernalsteens (2006). No estudo de Motta (2008), foram selecionadas (em placa de petri) 84 leveduras produtoras de xilanase. Dentre elas, a cultura AY₁₀ despertou grande interesse por exibir atividade enzimática ótima à temperatura de 80 °C. Em pH 5,3, a enzima apresentou meia-vida de 11,21 horas a 70 °C e 4,38 minutos a 80 °C; sendo que à temperatura constante (72 °C), a enzima manteve-se estável ao variar o pH.

Considerando que a produção de enzimas por micro-organismos é influenciada por diversos fatores, como fontes nutricionais e condições de cultivo, Lopes (2010) ao empregar técnicas de planejamento experimental conseguiu aumentar a atividade da xilanase do micro-organismo LEB-AY₁₀ em 600% em meio sintético contendo xilana de bétula. Essa linhagem foi, posteriormente, identificada como *Cryptococcus* sp. (LOPES *et al.*, 2011).

Além da bioprospecção e otimização de processos, o melhoramento genético de micro-organismos tem sido uma ferramenta bastante difundida nas últimas décadas com o objetivo de expressar, superexpressar ou reprimir determinados genes e, conseqüentemente, manipular características metabólicas. Com isso, é possível reduzir etapas e tempo de fermentação ou aumentar o rendimento fermentativo. De acordo com Ahmed *et al.* (2009), a produção natural de enzimas pode não atender à demanda devido aos baixos rendimentos e à incompatibilidade com o padrão dos processos fermentativos industriais (condições nutricionais e operacionais necessárias para o crescimento de muitos micro-organismos). Diante disso, a expressão heteróloga tem sido a principal ferramenta para a produção de xilanases a nível industrial. Engenharia de proteínas (alteração ou modificação de proteínas existentes) utilizando a tecnologia de DNA recombinante também pode ser uma alternativa interessante para melhorar as características específicas das xilanases existentes.

Desta forma, este trabalho surgiu da necessidade de dar continuidade aos estudos com a levedura *Cryptococcus* sp. LEB-AY₁₀, uma vez que a xilanase termoestável produzida por ela não foi completamente caracterizada. Inicialmente houve a necessidade de identificar a espécie do *Cryptococcus* e de avaliar a produção da enzima utilizando bagaço de cana-de-açúcar como alternativa mais econômica ao meio sintético até então estudado. Visando determinar potenciais aplicações da xilanase, caracterizou-se a enzima purificada e o gene responsável pela sua produção, sendo que a funcionalidade do gene predito foi verificada através da expressão heteróloga em *Pichia pastoris*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Produzir, purificar e caracterizar a xilanase de uma levedura silvestre e identificar o gene responsável pela sua produção visando futuras aplicações.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar e identificar o isolado produtor de xilanase em nível de espécie
- Estudar a indução da enzima em diferentes substratos
- Purificar e caracterizar a(s) enzima (s) xilanolítica(s) produzida(s) pelo micro-organismo
- Avaliar os produtos de hidrólise da enzima visando possíveis aplicações
- Clonar e sequenciar o(s) gene(s) responsáveis pela produção da xilanase
- Expressar o(s) gene(s) xilanolítico(s) em *Pichia pastoris*
- Selecionar os clones de *Pichia pastoris* transformadas para xilanase com maior atividade desta enzima.

1.3 ORGANIZAÇÃO DOS CAPÍTULOS

A presente tese foi organizada na forma de capítulos, conforme descrito a seguir.

Capítulo 1: Introdução e apresentação do trabalho

Nesta seção, estão apresentados: uma breve introdução e motivação para realização desta tese, os objetivos delineados e a descrição de como foram organizados os capítulos.

Capítulo 2: Revisão bibliográfica

O segundo capítulo contém uma revisão da literatura sobre os principais tópicos abordados.

Capítulo 3: Otimização da produção de xilanase utilizando bagaço explodido

Este capítulo está escrito na forma de artigo (“Optimization of xylanase production by *Cryptococcus flavescens* LEB-AY₁₀ from steam exploded sugarcane bagasse”) e submetido à revista *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (Elsevier). Nele consta a identificação da espécie do micro-organismo em estudo, *C. flavescens* LEB-AY₁₀ (CCT 7725), e a utilização do mesmo para produção de xilanase termoestável utilizando como substrato bagaço de cana-de-açúcar. Três diferentes condições de explosão a vapor e suas respectivas frações solúveis foram testados, enquanto xilana de faia e bagaço bruto foram utilizados como controle. Melaço ou componentes sintéticos foram utilizados para suplementar o meio. Após escolha do melhor tipo de substrato e nutrientes, o meio e as condições de cultivo foram otimizadas através de técnicas de planejamento experimental.

Capítulo 4: Purificação e caracterização

O quarto capítulo tem o objetivo de descrever a purificação e caracterização da xilanase produzida por *C. flavescens* LEB-AY₁₀. Após definir o melhor processo para purificação, caracterizou-se a enzima purificada quanto à massa molecular, atividade em função do pH e temperatura, às estabilidades térmica e de pH, à especificidade, ao efeito da concentração de substrato e aos perfis de hidrólise.

Capítulo 5: Clonagem e sequenciamento do gene *Xyn10Cf*

No capítulo 5, são apresentados os resultados obtidos pelas três estratégias utilizadas para identificação do gene: amplificação com *primers* degenerados, identificação de peptídeos por espectrometria de massas e, por último, sequenciamento do genoma da levedura. Após identificação, o gene foi clonado em *Escherichia coli* DH10B, utilizando vetor pGEM-T Easy. Os dados da sequência de nucleotídeos foram utilizados para complementar os estudos descritos no Capítulo 4 e, deste modo, caracterizar e classificar a proteína.

Capítulo 6: Expressão induzida e constitutiva em *Pichia pastoris*

O sexto capítulo demonstra a expressão do gene *Xyn10Cf* em *Pichia pastoris* GS115, de forma induzida ou constitutiva, com o objetivo de confirmar a funcionalidade da sequência predita.

Capítulo 7: Considerações finais

No último capítulo estão apresentadas as principais conclusões obtidas no decorrer desta tese e algumas sugestões para trabalhos futuros.

Anexos

Nesta seção encontram-se as publicações oriundas desta pesquisa.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.; RIAZ, S.; JAMIL, A. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 19–35, 2009.

CUI, F.; LI, Y.; LIU, Z.; Zhao, H.; PING, L.; PING, L.; YANG, Y.; XUE, Y.; YAN, L. Optimization of fermentation conditions for production of xylanase by a newly isolated strain, *Penicillium thiersii* ZH-19. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 721–725, 2008.

DEN HAAN, R. ; VAN ZYL, W. H. Enhanced xylan degradation and utilisation by *Pichia stipitis* overproducing fungal xylanolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 5, p. 620–628, 2003.

HERNALSTEENS, S. **Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

LOPES, F.; MOTTA, F.; ANDRADE, C. C. P.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI-FILHO, F. Thermo-stable xylanases from non conventional yeasts. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 03, n. 03, p. 36–42, 2011.

LOPES, F. P. **Otimização da produção de xilanase por levedura silvestre**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

MOTTA, F. B. **Triagem, seleção produção e caracterização da enzima xilanase a partir de leveduras silvestres**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

CAPÍTULO 2

2 Revisão Bibliográfica

2.1 HEMICELULOSES

O termo hemicelulose, inicialmente referia-se aos polissacarídeos da parede celular de plantas que eram insolúveis em água e solução de oxalato de amônia, mas eram solúveis em solução alcali. Entretanto, por essa definição não ser completamente satisfatória do ponto de vista químico, foi necessário descrever a fração cuja solubilidade pode ser relacionada com suas funções biológicas. Quimicamente, o termo hemicelulose compreende uma grande classe de compostos, sendo polímeros heterogêneos de pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e açúcares ácidos (ácido D-glucurônico, ácido 4-*O*-metil-glucurônico). As hemiceluloses possuem baixa massa molecular com um grau de polimerização entre 50 e 300. Elas ocorrem em parede celular de plantas junto com celulose, substâncias pécicas, lignina, lipídeos, proteínas, pigmentos e minerais (HALLIWELL, 1965; SAHA, 2003). Localizada entre a lignina e as fibras de celulose das plantas, como ilustra a Figura 2.1, a hemicelulose parece estar entremeada, entrelaçada e covalentemente ligada em vários pontos com o revestimento de lignina, enquanto fornece uma capa em torno das fibras de celulose, através de pontes de hidrogênio (BEG *et al.*, 2001).

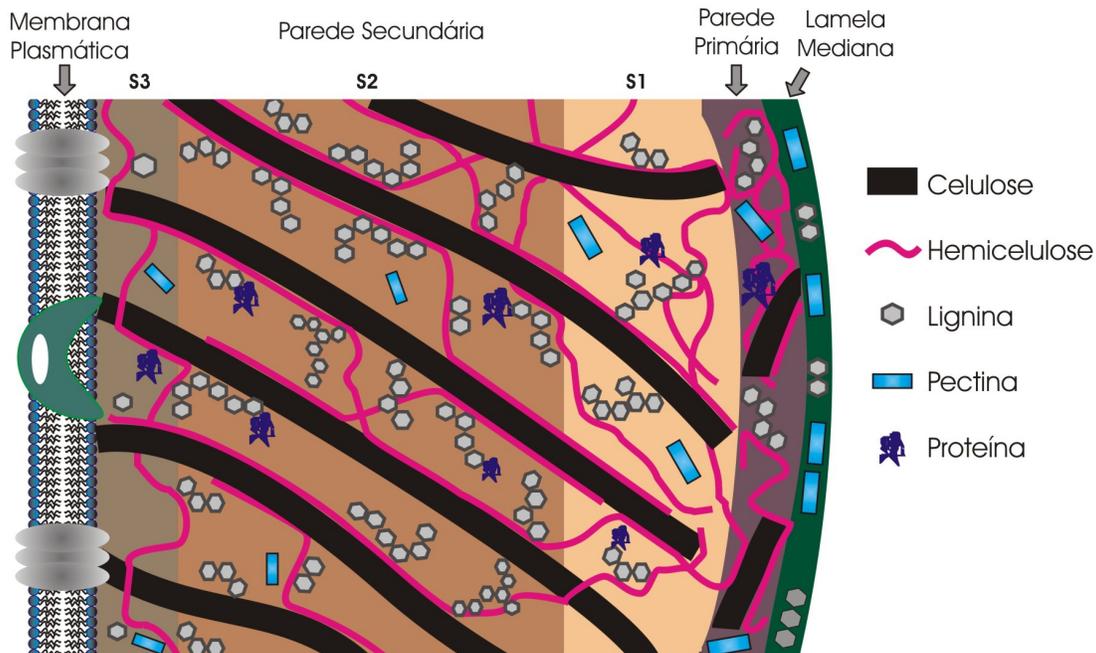


Figura 2.1. Ilustração da estrutura da parede celular de plantas, demonstrando as diferentes camadas e seus principais componentes (adaptado de Achyuthan *et al.*, 2010).

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais comum na natureza e representa em torno de 20-35% da biomassa lignocelulósica (SAHA, 2003), enquanto que a celulose representa de 35 a 50% e a lignina de 10 a 15% (WYMAN, 1994). Juntos, esses componentes correspondem a aproximadamente 90% da massa seca das plantas (INGRAM, 1999).

Classes de hemicelulose são nomeadas de acordo com a unidade de açúcar principal. Assim, quando um polímero é hidrolisado e libera xilose, é uma xilana, da mesma forma, hemicelulose inclui mananas, glucanas, arabinanas e galactanas. Porém, na natureza, a hemicelulose dificilmente é composta por apenas um tipo de açúcar. Geralmente são estruturas complexas feitas de mais de um polímero (Figura 2.2), sendo os mais comuns glucuranoxilanas, glucronoarabinoxilanas, glucomananas e galactoglucomananas. Assim, a hemicelulose não é um componente químico bem definido, mas uma classe de componentes poliméricos das fibras das plantas, com propriedades particulares de cada composto (POLIZELI *et al.*, 2005).

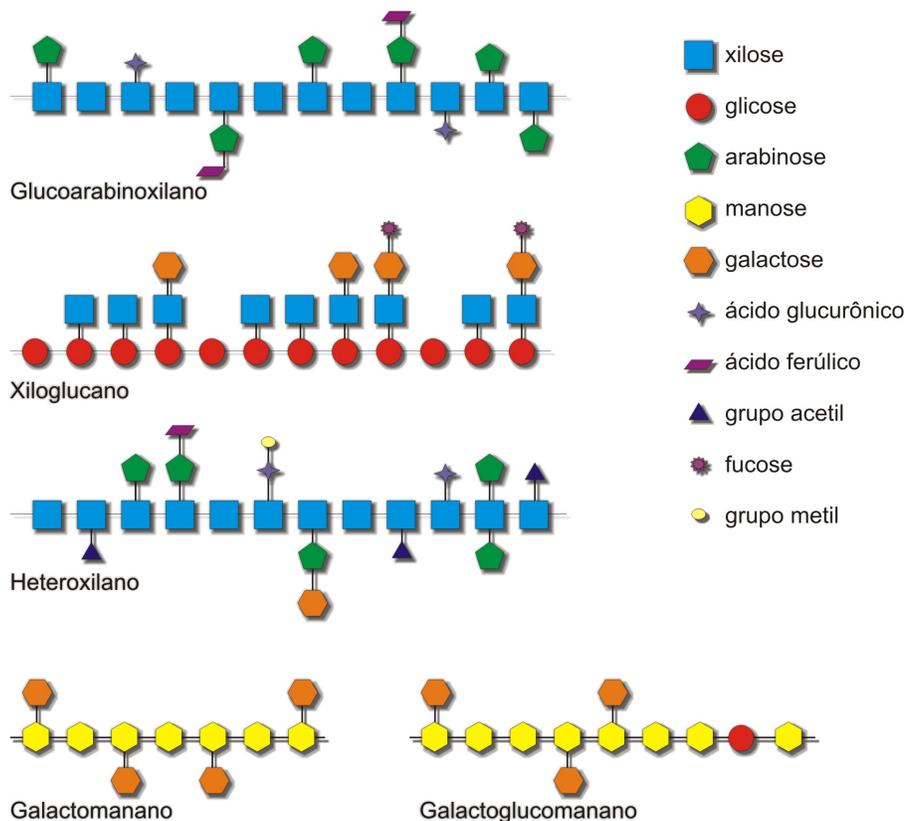


Figura 2.2. Representação esquemática de estruturas de hemicelulose (adaptado de BURTON *et al.*, 2010; CARPITA, 1996; SOUZA, 2013).

2.1.1 Xilana

Dentre os compostos hemicelulósicos, a xilana é o principal e mais abundante. As xilanas extraídas de materiais vegetais são heteropolissacarídeos cuja estrutura principal é formada por cadeias de β -D-xilopirranose unidas por ligações β -1,4. Além de xilose, xilanas podem conter arabinose, ácido glucurônico ou seu 4-O-metil éter, e ácidos acético, ferúlico e *p*-coumárico (ASPINALL, 1980). A composição e as ligações das cadeias laterais determinam a variedade específica da xilana (WYMAN *et al.*, 2005), sendo que a quantidade de cada componente varia de espécie para espécie e ainda de planta para planta (Figura 2.3) (POLIZELI *et al.*, 2005).

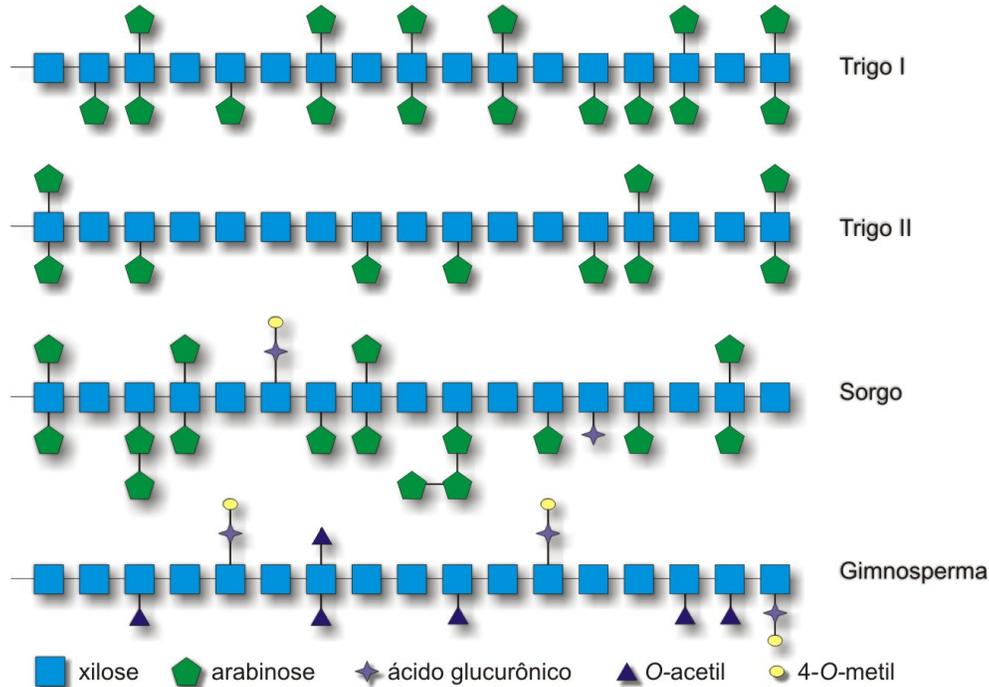


Figura 2.3. Modelos estruturais de xilanas extraídas de trigo, sorgo e gimnospermas (adaptado de KABEL, 2002).

Em geral, xilanas presentes no principal grupo de plantas, as angiospermas (plantas floridas), podem ser divididas em dois grupos: glucronoarabinoxilanas e glucuronoxilanas. Xilanas que estão presentes nas paredes celulares de monocotiledôneas (gramíneas e cereais) consistem em cadeias lineares de resíduos de xilopiranosil unidos por ligações do tipo β -D-1,4, que geralmente podem ser substituídos por L-arabinofuranosil na posição 2'

e/ou 3' e ácido urônico D-glucopiranosil ou o seu derivado 4-*O*-metil na posição 2'. Poucas publicações descrevem a presença de substituintes *O*-acetil. Além dessas unidades substituintes, a variedade de cadeias laterais diméricas e triméricas tem sido identificada como constituintes menores de glucuronoarabionoxilanas. Essas cadeias laterais podem ser compostas de arabinose apenas, ou também podem incluir xilose e galactose. Ademais, pequenas quantidades de ligações éster de resíduos de ácido hidroxicinâmico, assim como ácidos coumárico e ferúlico, são encontrados ligados a alguns dos resíduos de arabinose. Apesar das características gerais, as fontes das quais a xilana é extraída determinam os recursos específicos que diz respeito ao tipo, a quantidade, a posição e a distribuição dos substituintes ao longo da cadeia principal de xilana (KABEL, 2002).

Em contraste com a xilana de monocotiledôneas, a xilana de dicotiledôneas (gimnospermas, ervas e plantas lenhosas) é uma *O*-acetilado 4-*O*-metil- α -D-glucuronoxilana quase sem nenhuma substituição de arabinose. Em média cada dez resíduos de xilosil carregam um resíduo substituinte de ácido 4-*O*-metilglucurônico na posição 2'. Substituintes *O*-acetil podem estar localizados na posição 2' e/ou 3' dos resíduos de xilosil presentes. Em geral, o conteúdo de *O*-acetyl é 3-5% (p/p) da madeira total (KABEL, 2002).

2.1.2 Extração e despolimerização da xilana

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é crucial para a separação dos seus componentes: celulose, hemicelulose e lignina. Diversos métodos vêm sendo pesquisados para isolar a hemicelulose, evitando a degradação e buscando alta pureza e rendimento (PENG *et al.*, 2012). Os métodos de pré-tratamento geralmente são classificados em: físicos, químicos, biológicos ou combinados. Os métodos físicos (moagem, trituração, congelamento, irradiação) geralmente estão associados à redução do tamanho das partículas e da cristalinidade da matéria-prima, e são posteriormente combinados com outro(s) tratamento(s) (BRODEUR *et al.*, 2011; MOOD *et al.*, 2013).

Hemicelulose é geralmente extraída de materiais lignocelulósicos com solução alcali, como KOH, NaOH (AKPINAR *et al.*, 2007), CaOH₂ ou amônia (MOOD *et al.*, 2013), por extração alcalina com peróxido, extração com água quente, e extrações baseadas em explosão a vapor (PENG *et al.*, 2012). Métodos combinados, como extrações com NaOH

seguida da utilização de ultrassonicação, enzimas e ultrafiltração, mostraram-se interessantes para extrair e hidrolisar a xilana em xilose (WANG; ZHANG, 2006).

Conforme revisado por Mood *et al.* (2013), o pré-tratamento alcalino é interessante por remover a lignina, os grupos acetil e as diferentes substituições de ácidos urônicos, facilitando o acesso de enzimas. Entretanto, neste método, a solubilização da hemicelulose e celulose é menor que no tratamento ácido e no processo hidrotérmico. O método também é conhecido por causar inchaço das fibras de celulose, uma vez que ocorrem reações de saponificação e solvatação que levam ao rompimento das ligações entre a hemicelulose e outros componentes, aumentando a porosidade da biomassa. Extrações alcalinas são feitas a baixas temperaturas e não necessitam de reatores complexos, entretanto, necessitam de um tempo de residência longo (de horas a dias) e de neutralização após o pré-tratamento.

Na hidrólise ácida a fração de hemicelulose é despolimerizada a temperaturas mais baixas do que a fração de celulose. Se temperaturas mais elevadas (ou maior tempo de residência) são aplicadas, os monossacarídeos formados a partir da hemicelulose irão se degradar, o que dará origem aos compostos de furano e ácidos carboxílicos. Por esta razão, é normalmente sugerido que o processo de hidrólise seja realizado em pelo menos duas etapas, a primeira fase em condições relativamente suaves durante a qual a fração hemicelulose é hidrolisada e uma segunda fase em temperaturas mais elevadas, durante a qual a celulose é hidrolisada. A fase líquida, contendo os monossacarídeos, é retirada entre os tratamentos, evitando a degradação dos monossacarídeos formados. Evitar a degradação dos monossacarídeos é importante não só para melhorar o rendimento, mas também para evitar problemas de inibição, uma vez que os produtos de degradação são tóxicos para os micro-organismos da fermentação. Estes subprodutos podem estar presentes em quantidades baixas e ainda assim causar uma inibição substancial (SANCHEZ *et al.*, 2004).

Desta forma, uma questão crítica na utilização de hidrolisados pela acidificação em processos fermentativos é a capacidade do micro-organismo em resistir aos inibidores formados durante o tratamento. Esses compostos inibidores são classificados em quatro grandes grupos: subprodutos derivados de açúcar (furfural e hidroximetilfurfural), ácidos alifáticos (ácido acético, ácido levulínico), produtos da degradação da lignina (os quais incluem grande variedade de compostos aromáticos e poliaromáticos com uma variedade de substituintes) e inibidores derivados de metais e minerais da madeira, solo e equipamentos de hidrólise. Esses problemas de inibição da fermentação podem ser superados pela detoxificação prévia à fermentação. Diversos métodos podem ser empregados, incluindo a

adaptação da levedura, neutralização e *overliming*, evaporação, extração com solvente, adsorção com carvão ativado, tratamento biológico e uso de resinas de troca iônica. No entanto, a introdução de uma etapa, além de aumentar o custo e a complexidade do processo, pode gerar problemas de precipitação (MILLATI *et al.*, 2002; NIGAM, 2001; NILVEBRANT *et al.*, 2003; SANCHEZ *et al.*, 2004; VILLARREAL *et al.*, 2006)

Extração de xilana com vapor, assim como na extração com ácido, produz grandes quantidades de monossacarídeos e produtos da desidratação. Vapor ou degradação hidrolítica da xilana, conhecido como auto-hidrólise, envolve desacetilação da xilana para produzir ácido acético, o qual hidrolisa a hemicelulose. Esse método elimina o uso de produtos químicos corrosivos para extração da xilana. Contudo, ele requer equipamentos especiais que podem ser operados a altas temperaturas (AKPINAR *et al.*, 2007). Além dos hidrolisados desse processo também conter uma variedade de componentes indesejáveis como a lignina solúvel e produtos da desidratação (AKPINAR *et al.*, 2010).

Em contraste aos tratamentos químicos, a hidrólise enzimática é mais conveniente porque ela não produz subprodutos indesejáveis e não requer equipamentos especiais (AKPINAR *et al.*, 2009) e nem condições operacionais corrosivas (MARTINS *et al.*, 2011). Entretanto, devido à heterogeneidade e natureza química complexa da xilana presente em plantas, sua hidrólise enzimática requer a ação de um repertório enzimático com diversas especificidades e modos de ação (BEG *et al.*, 2001). Como já foi descrito no Tópico 2.1.1, o grau de ramificação das xilanas e o tipo de grupos substituintes ligados à cadeia principal variam de planta para planta. Por isso, ao optar pelo processo de hidrólise enzimática, torna-se importante o conhecimento da composição e da estrutura do material. Além disso, a hidrólise enzimática pode ser combinada com outro método de pré-tratamento, desde que em condições mais brandas, visando apenas tornar as fibras mais acessíveis à ação enzimática.

2.2 ENZIMAS XILANOLÍTICAS

O sistema xilanolítico é usualmente composto por um complexo de enzimas hidrolíticas (*O*-glicosidases hidrolases, EC 3.2.1.x): β -1,4-endoxilanase (E.C.3.2.1.8), β -xilosidase (E.C. 3.2.1.37), acetil xilana esterase (EC 3.2.1.72), α -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α -glucuronidase (EC 3.2.1.139), ácido *p*-coumárico esterase (EC 3.1.1.-) e ácido

ferúlico esterase (EC 3.2.1.73). Todas essas enzimas agem cooperativamente para converter a xilana em seus açúcares constituintes (BEG *et al.*, 2001; WONG *et al.*, 1988), conforme exemplificado na Figura 2.4.

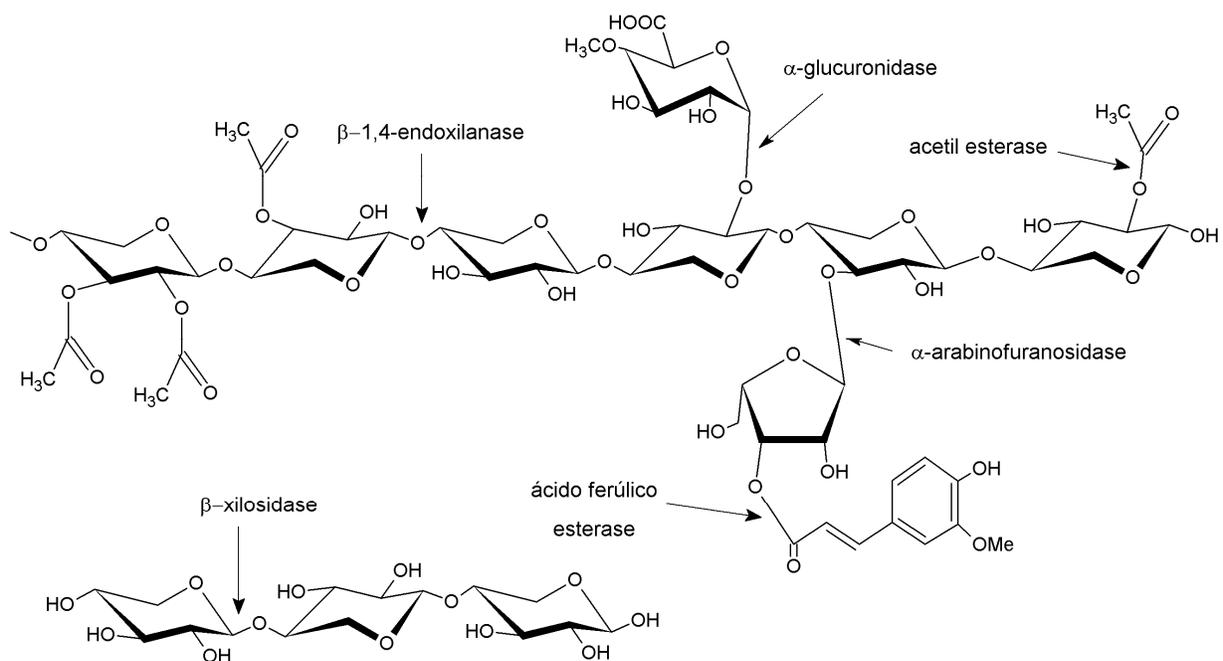


Figura 2.4. Estrutura hipotética da xilana apresentando diferentes grupos substituintes com sítios de ataque por xilanasas (BEG *et al.*, 2001; MARTINS *et al.*, 2011; SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

A endoxilanasase ataca a cadeia principal da xilana, hidrolisando as ligações β-1,4 entre os resíduos de xilose e resultando em xilo-oligossacarídeos de tamanhos variados. Enquanto a β-xilosidase hidrolisa os xilo-oligossacarídeos a xilose. Endoxilanasase e xilosidase são claramente duas enzimas distintas, as quais diferem consideravelmente na regulação de suas sínteses e na localização intracelular. Enquanto que endoxilanasas são quase que totalmente secretadas no meio de cultura, apresentando atividade extracelular, representativas quantidades da atividade total de xilosidasas são encontradas no extrato bruto ou ligadas à parede celular (ÖZCAN *et al.*, 1991).

Muitas endoxilanasas não clivam ligações glicosídicas entre unidades de xilose que possuem grupos substituintes. As cadeias laterais precisam ser clivadas antes que a cadeia principal da xilana possa ser completamente hidrolisada. Assim, as demais enzimas possuem funções cooperativas específicas para a completa degradação da xilana, conforme ilustrado na Figura 2.4. As enzimas α-arabinofuranosidase e a α-glucuronidase removem os

substituintes arabinose e ácido 4-*O*-metil glucurônico, respectivamente, da cadeia de xilana. As esterases hidrolisam as ligações éster entre as unidades de xilose da xilana e ácido acético (acetil xilana esterase) ou entre a cadeia lateral de resíduos de arabinose e ácidos fenólicos, como ácido ferúlico (ácido ferúlico esterase) e ácido *p*-coumárico (ácido *p*-coumárico esterase) (SAHA, 2003).

Enzimas degradadoras de xilana desempenham um grande papel em elucidação de estruturas de xilanas complexas (SAHA, 2003). Apesar da estrutura da xilana ser mais complexa que a da celulose e requerer uma diversidade maior de enzimas para sua completa hidrólise, os polissacarídeos não formam uma estrutura cristalina arranjada firmemente como a celulose e, portanto, são mais acessíveis à hidrólise enzimática (GILBERT; HAZLEWOOD, 1993).

Embora todo complexo enzimático exerça um importante papel na hidrólise da xilana e, por isso, todos seus componentes mereçam devida atenção, os próximos tópicos têm como foco principal as endoxilanases. Essa escolha é devida à necessidade de introduzir as características desse grupo de enzimas visando dar continuidade aos estudos realizados com a xilanase produzida por *Cryptococcus* sp. LEB-AY₁₀ (LOPES, 2010; LOPES *et al.*, 2011; MOTTA, 2008), a qual despertou a atenção de seus autores por apresentar atividade ótima a 80 °C e ser considerada termoestável.

2.2.1 Endoxilanases

2.2.1.1 Classificação e modo de ação

As endoxilanases hidrolisam as ligações glicosídicas (β -1,4) entre xiloses, levando a formação de um açúcar hemiacetal e a sua correspondente aglicona (composto não açúcar que permanece após a troca do glicosídeo por um átomo de hidrogênio). Xilanases têm sido classificadas de pelo menos três maneiras, baseado-se: na massa molecular e no ponto isoelétrico (pI) (WONG *et al.*, 1988), na estrutura cristalográfica (JEFFRIES, 1996) e nas propriedades cinéticas, ou na especificidade do substrato e no perfil de produtos. Como a primeira classificação não é suficiente para descrever todas as xilanases, diversas exceções têm sido identificadas (COLLINS *et al.*, 2005) porque nem todas xilanases têm alta massa molecular (acima de 30 kDa) e baixo pI ou baixa massa molecular (menor que 30 kDa) e elevado pI (COLLINS *et al.*, 2002). Portanto, um sistema mais completo baseado na

estrutura primária e na comparação dos domínios catalíticos foi introduzido (COLLINS *et al.*, 2005; HENRISSAT; COUTINHO, 2001), analisando ambas as características estruturais e mecânicas (COLLINS *et al.*, 2005).

De acordo com o banco de dados do CAZy (*Carbohydrate Active Enzymes*, <http://www.cazy.org>), as xilanases (EC3.2.1.8) estão relacionadas com as famílias 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 e 62 das hidrolases glicolíticas (GH). Porém, as sequências classificadas nas famílias 16, 51 e 62 parecem ser enzimas bifuncionais contendo dois domínios catalíticos, diferentemente das famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43, as quais possuem um domínio catalítico com verdadeira atividade de endo-1,4- β -xilanase (COLLINS *et al.*, 2005). Utilizando o mesmo raciocínio, as famílias 9, 12, 26, 30 e 44 também podem possuir uma atividade residual ou secundária.

Xilanases foram primeiramente classificadas como GH 10 e 11 baseado na análise dos agrupamentos hidrofóbicos dos domínios catalíticos e em semelhanças das sequências de aminoácidos (VERMA; SATYANARAYANA, 2012). Embora os membros dessas duas famílias tenham sido muito estudados, as propriedades catalíticas dos membros das demais famílias (5, 7, 8 e 43) são recentes e ainda muito limitadas (TAIBI *et al.*, 2012). A Tabela 2.1 resume as características dessas famílias de xilanases “verdadeiras”, juntamente com as famílias que estão relacionadas com a atividade de xilanase (EC3.2.1.8), conforme a classificação do CAZy.

Tabela 2.1. Estrutura, mecanismo catalítico, resíduo ácido/base e nucleófilo para as famílias de hidrolases glicosídicas relacionadas com atividade de xilanase, de acordo com o banco CAZY.

Família GH	Estrutura 3D	Mecanismo	Ácido/base	Nucleófilo
5, 10, 26*, 30*, 44*, 51*	(β/α) ₈	retenção	glutamato	glutamato
7, 11, 12*, 16*, 8, 9*	β -jelly roll	retenção	glutamato	glutamato
43	(α/α) ₆	inversão	glutamato	aspartato
62*	5-dobras β -hélice	inversão	glutamato	aspartato
	desconhecida	desconhecido	desconhecido	desconhecido

*enzimas que apesar de não conterem domínios catalíticos verdadeiramente distintos, com atividade comprovada de endo-1,4- β -xilanase, estão relacionadas com as EC3.2.1.8.

Membros das famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43 diferem em suas propriedades físico-químicas, estruturas, modo de ação e especificidade pelo substrato (COLLINS *et al.*, 2005). Diversos modelos têm sido propostos para explicar o mecanismo de ação das xilanases, a qual hidrolisa xilana. Geralmente, esta hidrólise pode resultar tanto na retenção (famílias GH 5, 7, 10 e 11) quanto na inversão (famílias GH 8 e 43) do centro anomérico do monômero do açúcar redutor do carboidrato (COUTINHO; HENRISSAT, 1999; SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

As famílias 5, 7, 10 e 11 contêm enzimas que catalisam a hidrólise com retenção da configuração anomérica, com dois resíduos de ácido glutâmico responsáveis pelo mecanismo catalítico. Isso indica um mecanismo de duplo deslocamento, em que um intermediário covalente glicosil-enzima é formado e, em seguida, hidrolisado, e dois resíduos de ácido carboxílico localizados no sítio ativo, são envolvidos na formação do intermediário; um atua como um catalisador ácido pela protonação do substrato, enquanto o segundo realiza um ataque nucleofílico o que resulta na liberação do grupo de saída e na formação do intermediário α -glicosil-enzima (inversão β para α). Na segunda etapa, o primeiro grupo carboxilato funciona como uma base geral, abstraindo um próton da molécula de água do nucleófilo o qual ataca o carbono anomérico. Isso leva a uma segunda substituição, na qual o carbono anomérico novamente passa pelo estado de transição para dar origem a um produto de configuração β (inversão α para β) (COLLINS *et al.*, 2005; COUTINHO; HENRISSAT, 1999).

Em contraste aos mecanismos mencionados acima, as enzimas das famílias 8 e 43 geralmente atuam via uma inversão do centro anomérico, sendo que glutamato e aspartato podem ser os resíduos catalíticos. O trabalho de inversão de enzimas é feito via reação de simples deslocamento, no qual um carboxilato proporciona a liberação de um grupo de saída catalisado por ácido. A segunda função dessas enzimas, atuando como uma base em geral, ativa uma molécula de água nucleofílica para atacar o carbono anomérico, clivando assim a ligação glicosídica e levando a uma inversão da configuração do carbono anomérico. Em geral, a distância entre os dois resíduos permite a acomodação da molécula de água entre o carbono anomérico e a base generalizada (COLLINS *et al.*, 2005; COUTINHO; HENRISSAT, 1999).

2.2.1.2 Aplicações

Uma das mais importantes aplicações biotecnológicas da xilanase é no clareamento de polpas (VIKARI *et al.*, 1994). Outras aplicações de xilanases também incluem bioconversão de materiais lignocelulósicos e resíduos agroindustriais em produtos fermentativos, a clarificação de sucos, o melhoramento da consistência de cervejas e da digestibilidade de rações animais (WONG *et al.*, 1988).

Indústria de papel e polpa

O uso de enzimas no branqueamento de papel e polpa tem atraído a atenção de pesquisadores e indústrias do mundo inteiro, uma vez que esse ramo industrial é conhecido por ser um grande contribuidor para a poluição ambiental devido ao grande consumo de energia e de produtos químicos (BAJPAI, 2012). Xilanases e outras enzimas acessórias têm sido utilizadas no branqueamento de polpa para ajudar a reduzir, principalmente, o conteúdo de lignina e aumentar a brancura da polpa (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997; VIKARI *et al.*, 1994). A importância da xilanase em indústrias de papel e celulose está relacionada com a hidrólise da xilana que facilita a liberação de lignina da polpa de papel e, conseqüentemente, reduz o nível de uso de cloro como agente de branqueamento (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

O branqueamento de polpas que utilizam enzimas ligninolíticas ou micro-organismo é chamado biobranqueamento (PÉREZ *et al.*, 2002). O branqueamento da pasta de papel envolve a destruição, alteração, ou solubilização da lignina, matérias orgânicas coloridas e outros resíduos indesejáveis sobre as fibras (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002). Branqueamento de polpa Kraft geralmente requer grandes quantidades de produtos químicos à base de cloro e hidrossulfito de sódio, que causam vários problemas em relação aos efluentes dessas indústrias. A utilização desses produtos químicos geram substâncias orgânicas cloradas, algumas das quais são tóxicas, mutagênicas, persistentes, e muito resistentes à biodegradação, além de causar numerosas perturbações prejudiciais aos sistemas biológicos e formar uma das principais fontes de poluição do meio ambiente (BEG *et al.*, 2001; ONYSKO, 1993; SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

O uso de xilanase em polpas de branqueamento visa à busca de algumas características especiais. Um requisito importante é o de ser livre de celulase, evitando efeitos adversos que possam danificar as fibras de celulose (HALTRICH *et al.*, 1996), uma

vez que a celulose deve ser o principal produto recuperado na indústria de papel (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002). Outras características desejáveis são: ser estável à altas temperaturas (CHIDI *et al.*, 2008) e ter pH alcalino ótimo (PÉREZ *et al.*, 2002).

Madlala *et al.* (2001) utilizaram diferentes preparações de xilanase P comercial e xilanase bruta a partir de *Thermomyces lanuginosus* para avaliá-las no processo de branqueamento de polpa de papel. Foi demonstrado que o uso de enzimas poderia aumentar o brilho da pasta de papel (com mais de 5 pontos de brilho em relação ao controle) ou, alternativamente, reduzir as quantidades de produtos químicos de branqueamento usados (até 30% de dióxido de cloro). Chipeta *et al.* (2005) avaliaram preparações de xilanase não purificadas de *Aspergillus oryzae* NRRL 3485 e *Aspergillus phoenicis* ATCC 13157 e, a uma carga de 10 U/g de polpa, foi possível reduzir a utilização de dióxido de cloro em até 30%, sem comprometer o brilho da polpa.

Bioconversão de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis

Atualmente, os biocombustíveis de “segunda geração” (2G, utilizando biomassa lignocelulósica) têm sido os principais produtos da bioconversão de materiais lignocelulósicos. De acordo com Taherzadeh e Karimi (2008), o etanol tem sido o combustível renovável mais importante em termos de volume e valor de mercado, desde que se tornou uma alternativa de combustível após a crise de combustíveis fósseis (PÉREZ *et al.*, 2002). Apesar do etanol ser produzido principalmente pelo processo denominado de “primeira geração” (1G, a partir do açúcar ou do amido), nos últimos anos a produção de etanol 2G passou a ser intensamente pesquisada (TAHERZADEH; KARIMI, 2007). E, ao contrário da 1G, os biocombustíveis da 2G não competem com a produção de alimentos, e podem proporcionar benefícios ambientais, econômicos e estratégicos para a produção de combustíveis (VIKARI *et al.*, 2012).

Para a produção do bioetanol, o primeiro passo é a deslignificação da lignocelulose para libertar celulose e hemicelulose de seu complexo com lignina. O segundo passo é a despolimerização dos carboidratos para a produção de açúcares livres e, por fim, a fermentação de hexoses e pentoses para produzir etanol (BEG *et al.*, 2001; LEE, 1997). Xilanases, em conjunto com outras enzimas hidrolíticas, podem ser usadas para a geração de combustíveis a partir de biomassa lignocelulósica, tal como o etanol (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002). No entanto, a hidrólise enzimática ainda constitui o fator principal no custo

da conversão de matérias-primas lignocelulósicas para etanol (VIKARI *et al.*, 2012). Sacarificação simultânea à fermentação é um processo alternativo, em que tanto as enzimas hidrolíticas quanto o micro-organismo fermentativo estão presentes no reator (CHANDRAKANT; BISARIA, 2008; PÉREZ *et al.*, 2002).

Indústrias farmacêuticas, de alimentos e de rações

Xilanase, em conjunto com a pectinase, carboximetilcelulase e amilase, pode ser usada para a clarificação de sucos, uma vez que a turbidez é causada devido aos materiais pécticos e a outros materiais em suspensão, formando um sistema coloidal estável (SREENATH; SANTHANAM, 1992). A xilanase pode também ser empregada para melhorar a extração de café, óleos vegetais, e amido (WONG; SADDLER, 1993). A xilose resultante da despolimerização da xilana também pode ser convertida para o xilitol, um adoçante que tem aplicações nas indústrias farmacêutica e de alimentos (PARAJÓ *et al.*, 1998; SIRISANSANEEYAKUL, 1995; SOLEIMANI *et al.*, 2006).

Na indústria de panificação, xilanase pode melhorar a qualidade do pão aumentando seu volume específico. E, em combinação com a amilase, esta característica pode ser reforçada, tal como estudado pela introdução de xilanase de *Aspergillus niger var. awamori* (MAAT *et al.*, 1992). De acordo com o estudo de Collins *et al.* (2006), o uso da xilanase de *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAH3a da família GH8 aumentou em 25% o volume do pão, enquanto que a xilanase de *Bacillus subtilis* da família GH11 aumentou o volume em 19%.

Xilanases podem melhorar as propriedades nutricionais da silagem agrícola e de cereais forrageiros. Estudos revelaram que a redução no ganho de peso e na eficiência da conversão alimentar em frangos alimentados com centeio têm sido associadas com a viscosidade intestinal das aves (VAN PARIDON *et al.*, 1992). A incorporação de xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* neste tipo de dieta reduziu a viscosidade intestinal dos frangos de corte e, desta forma, melhorou tanto o ganho de peso dos filhotes quanto a sua eficiência de conversão alimentar (BEDFORD; CLASSEN, 1992).

As xilanases podem ser utilizadas em cereais como um pré-tratamento de substratos contendo arabinoxilanas, uma vez que as arabinoxilanas são parcialmente solúveis em água e resultam em uma solução aquosa altamente viscosa. A alta viscosidade em extrato aquoso de grãos de cereais pode causar problemas na fabricação de cerveja, por diminuir a taxa de filtração ou devido à turvação da cerveja. Também pode ser um aspecto negativo para os

grãos de cereais utilizados na alimentação de animais (DERVILLY *et al.*, 2002; DERVILLY-PINEL; SAULNIER, 2001).

A hidrólise enzimática da xilana também pode resultar em oligômeros conhecidos como xilo-oligossacarídeos (XOS) que podem ser usados em produtos farmacêuticos, agrícolas e produtos para alimentação animal. XOS têm efeitos prebióticos, uma vez que eles não são nem hidrolisados nem absorvidos na parte superior do trato gastrointestinal e estimulam seletivamente o crescimento ou a atividade de um número limitado de bactérias no cólon e, assim, são benéficos à saúde (COLLINS; GIBSON, 1999; ROBERFROID, 1997; VÁZQUEZ *et al.*, 2000). Dentre as suas principais importâncias fisiológicas, pode-se citar: redução do colesterol, manutenção da saúde gastrointestinal, melhoria da disponibilidade biológica de cálcio. Eles também inibem a retrogradação do amido e melhoraram as propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos (VORAGEN, 1998). Para a produção dos XOS, o complexo enzimático deve conter baixa atividade de exo-xilanase ou de β -xilosidase, para não produzir uma quantidade elevada de xilose, a qual inibe a produção dos XOS (AKPINAR *et al.*, 2009; VÁZQUEZ *et al.*, 2002).

2.2.1.3 Micro-organismos produtores

Bactérias e fungos produtores de xilanases secretam grandes quantidades destas enzimas sob uma variedade de condições (BASARAN *et al.*, 2000). Fungos filamentosos têm sido utilizados por mais de 60 anos na produção de enzimas industriais (DALBOGE, 1997). Eles são amplamente utilizados como produtores de xilanase e são geralmente considerados como produtores mais potentes do que bactérias e leveduras, secretando quantidades muito mais elevadas no meio de cultivo (BERGQUIST *et al.*, 2002; FANG *et al.*, 2008; PEDERON *et al.*, 2007; POLIZELI *et al.*, 2005). Em escala industrial, as xilanases são produzidas principalmente pelos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* (FENGXIA *et al.*, 2008).

Entretanto o alto nível de expressão da enzima pelo micro-organismo não é o único fator que deve ser levado em consideração, uma vez que as ferramentas de expressão heteróloga podem auxiliar a elevar esses índices. Muitas vezes, busca-se por alguma enzima com uma característica particular para se adequar a um determinado processo, como tolerância a inibidores (químicos e íons metálicos), termoestabilidade ou determinados perfis de hidrólise. Em vista disso, outros tipos de micro-organismos, como leveduras, têm sido pesquisados. Dentre os gêneros estudados, pode-se citar: *Cryptococcus* (GOMES *et al.*,

2000; LOPES *et al.*, 2011; PETER *et al.*, 1980; SCORZETTI *et al.*, 2000), *Trichosporon* (LIU *et al.*, 1999; STEVENS; PAYNE, 1977), *Pichia* (BASARAN *et al.*, 2000) e o dimórfico *Aureobasidium* (LEATHERS, 1986; TANAKA *et al.*, 2004).

Leveduras são consideradas decompositores primários e estão entre os primeiros colonizadores de substratos ricos em nutrientes, como tecidos de plantas terrestres (fontes de lignocelulose), onde elas são seguidas por uma sucessão de organismos que degradam matéria orgânica morta (MORAIS *et al.*, 2013; STARMER; LACHANCE, 2011). Considerando a abundância de material lignocelulósico na natureza, bioprospecções por novas leveduras xilanolíticas, em fontes relacionadas a esse tipo de material, têm sido relatadas (MORAIS *et al.*, 2013; MOTTA, 2008). Com vistas disso, Motta (2008) avaliou a atividade de xilanase em 349 leveduras isoladas de diferentes regiões brasileiras (amostras de solo, flores e frutos), selecionando uma levedura (*Cryptococcus* sp. LEB-AY₁₀) termoestável com atividade ótima a 80°C. E, mais recentemente, Morais *et al.* (2013), isolaram 321 leveduras de amostras de madeiras em decomposição da Mata Atlântica e, dentre aquelas que apresentaram atividade xilanolítica, encontraram 20 espécies distintas. Tal pesquisa demonstrou a grande diversidade de leveduras produtoras de xilanase, entretanto, o estudo detalhado dessas leveduras e da produção da enzima ainda não foi relatado.

Multiplicidade de xilanases

Como as ligações xilosídicas não são nem equivalentes e nem igualmente acessíveis, a produção de um sistema enzimático com especializadas funções é uma estratégia para alcançar a melhor hidrólise da xilana (WONG *et al.*, 1988). A multiplicidade do sistema xilanolítico em diversos micro-organismos foi descrita na literatura nas décadas de setenta e oitenta. Wong *et al.* (1988) revisaram a produção de um sistema de enzimas, sendo cada enzima com funções especializadas, considerando que essa possa ser uma estratégia microbiana para alcançar a hidrólise efetiva da xilana. Foram purificadas cinco diferentes tipos de xilanase de *Aspergillus niger* e, em outros estudos, foram purificadas pelo menos três xilanases de *Clostridium stercorarium*, *Streptomyces* sp. 3137, *Streptomyces exfoliatus* MC1, *Trichoderma harzianum* E58, *Trichoderma reesei* QM9414, *Aeromonas* sp. 212, *Penicillium janthinellum*, e *Talaromyces byssochlamydoides* (OHKOSHI *et al.*, 1985; TAKENISHI; TSUJISAKA, 1975; YOSHIOKA *et al.*, 1982). Multiplicidade do sistema xilanolítico também tem sido reportada em *Penicillium purpurogenum* (BELANCIC *et al.*,

1995), *Melanocarpus albomyces* IIS 68 (SARASWAT; BISARIA, 1997), *Cellulomonas* sp. N.C.I.M 2353 (CHAUDHARY; DEOBAGKAR, 1997), e *Aeromonas caviae* W-61 (OKAI *et al.*, 1998).

Apesar de alguns micro-organismos possuírem genes distintos para xilanases, como no caso do *Trichoderma reesei* que apresentou pelo menos 4 genes (HEROLD *et al.*, 2013), muitas vezes, um único gene de xilanase codifica mais de uma xilanase (JUTURU; WU, 2011). Essa multiplicidade de xilanases em micro-organismos pode ser causada por uma redundância na expressão gênica, pelo processamento diferencial do RNA mensageiro (*splicing* alternativo), ou ainda por modificações pós-traducionais da proteína, como glicosilação diferencial, proteólise e/ou autoagregação (BADHAN *et al.*, 2007; JUTURU; WU, 2011).

2.2.1.4 Clonagem e expressão

Considerando que o custo das enzimas é um dos fatores que determinam a economia de um processo biocatalítico, esse pode ser reduzido ao se encontrar condições ideais para sua produção, pelo isolamento de cepas hiperprodutoras através de triagem e seleção de mutantes induzidos e pela construção de produtores eficientes utilizando técnicas de engenharia genética (BASARAN; OZCAN, 2008).

Avanços na biologia molecular e engenharia genética têm aberto áreas de aplicações das tecnologias de clonagem gênica e DNA recombinante. Essas últimas técnicas oferecem novas oportunidades de construção de micro-organismos geneticamente modificados com um maquinário de enzimas selecionadas (BEG *et al.*, 2001). Os dados disponíveis de sequência de aminoácidos, dados de cristalografias de raio-X, dinâmica molecular e *design* computacional de xilanases fornecem informações que validam a relação entre a estrutura e função de xilanases. Todos estes métodos auxiliam no *design* de xilanases que são exigidas em processos industriais, tais como a melhoria da estabilidade destas enzimas à temperaturas mais elevadas e a pHs alcalinos (VERMA; SATYANARAYANA, 2012).

Para atender os fins comerciais, genes que codificam diversas xilanases foram clonados em hospedeiros homólogos e heterólogos (KULKARNI *et al.*, 1999; PÉREZ *et al.*, 2002). Xilanases recombinantes demonstraram propriedades equivalentes ou melhores do que as enzimas nativas (AHMED *et al.*, 2009). Genes de xilanase de micro-organismos anaeróbios também foram expressos com sucesso em hospedeiros que podem ser

empregados em fermentações industriais; o que viabilizou o processo considerando o aumento dos níveis de secreção e o fato de não precisar mais manter as condições de crescimento anaeróbio (AHMED *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 1997).

Expressão em bactérias

Escherichia coli é conhecida pela sua facilidade de manipulação, pelas condições de crescimento de baixo custo, pelas simples técnicas requeridas para a sua transformação e pelo acúmulo de elevados níveis do produto no citoplasma celular e, por isso, este organismo tornou-se o hospedeiro de expressão mais amplamente utilizado (JHAMB; SAHOO, 2012). Apesar do uso de *E. coli* como um hospedeiro de clonagem ser bom para a produção de proteínas recombinantes, ela não proporciona a expressão eficiente e funcional de muitas xilanases (AHMED *et al.*, 2009; JUTURU; WU, 2011), e nem todos os genes são facilmente expressos em *E. coli* (JHAMB; SAHOO, 2012). Este problema pode ser devido ao aparecimento repetitivo de códons raros ou pela necessidade de modificações pós-traducionais específicas, tais como formação de pontes dissulfureto e glicosilação (JUTURU; WU, 2011). Apesar disso, este micro-organismo é útil para o estudo detalhado da estrutura dos genes de xilanase e para a melhoria das enzimas através de engenharia de proteínas (AHMED *et al.*, 2009).

Espécies de *Lactobacillus* e *Bacillus subtilis* foram hospedeiros atrativos para a produção de proteínas heterólogas, obtendo-se níveis de expressão mais elevados do que a *E. coli* (BRON *et al.*, 1998; JUTURU; WU, 2011). O interesse principal da indústria e da pesquisa nestas bactérias, é devido ao fato de que elas não são tóxicas e são geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) (BRON *et al.*, 1998; JUTURU; WU, 2011). Os membros do gênero *Bacillus*, ao contrário de *E. coli*, não contêm endotoxinas (lipopolissacarídeos), as quais são difíceis de separar das proteínas durante o processo de purificação. (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

Expressão em fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são capazes de produzir xilanases e também expressá-las, tanto por via heteróloga quanto homóloga, alcançando rendimentos elevados utilizando os seus próprios promotores (AHMED *et al.*, 2009). Fungos filamentosos já passaram por melhoramento para a secreção de complexos de proteínas em alto nível e são viáveis

quando se utiliza a expressão do “maquinário nativo” de xilanase ou para expressão funcional de xilanasas de outros micro-organismos provenientes de fontes remotas. O gene *XynNB* que codifica xilanase B de *Aspergillus niger* foi expresso com sucesso em *A. kawachii* (KINOSHITA *et al.*, 1995). O gene *xyn2* de *Trichoderma reesei* QM6a foi constitutivamente expresso em *Aspergillus niger* D15, sendo que a máxima atividade obtida pelo clone recombinante foi 1,5 vezes maior que a do *Trichoderma reesei* e seis vezes maior que a obtida pela expressão em *Saccharomyces cerevisiae* (ROSE; VAN ZYL, 2002).

Expressão em leveduras

A expressão heteróloga de proteínas em levedura é altamente atraente porque elas proporcionam vantagens adicionais em relação aos sistemas de expressão bacterianos. Dentre estas vantagens, estão a possibilidade de realizar as modificações pós-traducionais eucarióticas, a capacidade de crescer até densidades celulares elevadas e a capacidade para secretar proteínas para o meio de fermentação. Além disso, a levedura está livre de toxinas e a maioria tem o status de GRAS (AHMED *et al.*, 2009).

Diversos genes de xilanase fúngicas já foram clonados e expressos em *Saccharomyces cerevisiae*. Por já ter sido estabelecido como um micro-organismo industrial, pode ser utilizado convenientemente para a produção industrial de xilanasas de baixo custo (AHMED *et al.*, 2009). Ela fornece um eficiente processamento pós-traducional como glicosilação, boa conformação de proteínas, proteólise, além de secretar um pequeno número de proteínas nativas o que facilita a purificação das proteínas expressas (DAS; SHULTZ, 1987; INNIS *et al.*, 1985; SA-PEREIRA *et al.*, 2003).

Scheffersomyces (Pichia) stipitis também tem sido reportada como um hospedeiro de clonagem e expressão para genes de xilanase de vários fungos. *S. stipitis* silvestres produzem baixos níveis de atividade de xilanase. Entretanto, os genes de xilanase de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus kawachii* mostraram altos níveis de expressão quando expressos em *S. stipitis* sob controle transcripcional do promotor do gene induzível xilose redutase (XYL1) de *S. stipitis* (HAAN, DEN; ZYL, VAN, 2003). Coexpressão dos genes de xilanase com genes de β -xilosidase de *Aspergillus niger* também aumentaram significativamente a atividade xilanolítica (AHMED *et al.*, 2009).

Pichia pastoris, recentemente reclassificada como *Komagataella pastoris*, é considerada um excelente sistema de hospedeiro para expressão de proteínas heterólogas

(CHENG *et al.*, 2005), devido à sua alta eficiência em secreção, alta densidade celular alcançada em meio de cultura de baixo custo, e do aumento de escala industrial relativamente fácil (CREGG, 1999). Uma vantagem da expressão de proteínas recombinantes utilizando *P. pastoris* pode estar relacionada ao tipo de glicosilação resultante, uma vez que os oligossacarídeos que são ligados às proteínas pela *P. pastoris* possuem cadeias bem menores do que aqueles são ligados às proteínas expressas por *Saccharomyces cerevisiae* (BRETTHAUER; CASTELLINO, 1999).

2.3 *Cryptococcus flavescens*

O basidiomiceto *Cryptococcus flavescens* é uma levedura encapsulada saprófita ubíqua (KANO *et al.*, 2012). De acordo com Fonseca *et al.* (2011), ele já foi considerado sinônimo de *C. laurentii* devido às suas características fisiológicas, mas diferencia-se pela incapacidade de assimilar D-glucosamina e creatinina, e pela habilidade de crescer em meios sem a adição de vitaminas. Conforme revisado pelos autores, a linhagem descrita para esta espécie, a CBS 942 (ATCC 10668), foi isolada do ar por Saito em 1922, no Japão. Posteriormente, além do ar, *C. flavescens* foi obtido de diversas fontes, como solo, grãos de trigo e milho após a colheita, molho de soja fermentado, de isolados clínicos, e até do intestino de lagartas.

C. flavescens não é considerado tão patogênico quanto *C. neoformans*, uma vez que só há relatos de infecção em um paciente imunossuprimido, portador de HIV, de quem o *C. flavescens* foi isolado do fluido cerebrospinal (KORDOSSIS *et al.*, 1998). O polissacarídeo capsular solúvel desse isolado demonstrou ser um glucuronoxilomanano similar ao do *C. neoformans*, apesar de ter um conteúdo reduzido de grupos O-acetil e de apresentar diferentes substituições de xilose e manose. Essas diferenças podem afetar na adesão das células da levedura às outras células, podendo ser a causa da diferença na patogenicidade entre as espécies (IKEDA; MAEDA, 2004). Um dos fatores de virulência associados aos *Cryptococcus*, como os patógenos *C. neoformans* e *C. gatti*, é a capacidade de crescer a 37°C (LESTER *et al.*, 2011). *C. flavescens* não cresce a essa temperatura, podendo ser esse outro motivo dele não ser associado como um potencial patógeno. Entretanto, recentemente *C. flavescens* foi relatado como causador de uma infecção subcutânea em um cachorro (KANO *et al.*, 2012).

Um dos potenciais biotecnológicos do *C. flavecens* está associado com o controle de fitopatógenos. Antes citado como *C. nodaensis*, ele apresentou capacidade antagônica ao suprimir o crescimento de *Fusarium* em cereais como trigo e cevada (SCHISLER *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2007). A produção de glutaminase termo e halotolerante pela linhagem CBS 101036 também foi relatada (SATO *et al.*, 1999). *C. flavecens* (NRRL Y-1401) foi descrito como produtor de um polissacarídeo extracelular, composto por manose, xilose, ácido glucurônico e grupos *O*-acetil, quando cultivado em meio contendo glicose como fonte de carbono (JEANES *et al.*, 1964). Sendo posteriormente pesquisada a produção de polissacarídeo polianiónico extracelular a partir de hemicelulose (TANENBAUM *et al.*, 1992).

Apesar da produção de xilanases por algumas espécies do gênero *Cryptococcus* já ter sido descrita (MOROSOLI *et al.*, 1993; PARACHIN *et al.*, 2009; PETRESCU *et al.*, 2000; SCORZETTI *et al.*, 2000), a produção dessa enzima por *C. flavecens* foi primeiramente publicada por Lopes *et al.* (2011), sendo que naquela época a linhagem havia sido identificada apenas como *Cryptococcus* sp. LEB-AY₁₀. A xilanase produzida por ela apresentou atividade ótima a 80 °C. A termoestabilidade dessa enzima foi o principal fator que motivou o presente trabalho a dar continuidade aos estudos de Lopes *et al.* (2011) visando determinar suas potenciais aplicações.

2.4 OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS

A redução de custos na produção de enzimas é essencial para desenvolver processos competitivos de tratamentos enzimáticos visando diferentes aplicações industriais e ambientais (LEVIN *et al.*, 2008). Nesses processos, deseja-se maximizar o rendimento, a produtividade e a qualidade de produtos. Desta forma, com o objetivo de minimizar custo e tempo, técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos têm sido crescentemente empregadas na otimização de produtos e processos. Além de reduzir o número de experimentos, o planejamento experimental analisa os fatores simultaneamente e ainda permite otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo (RODRIGUES; IEMMA, 2012).

Nesses processos, geralmente há um número grande de variáveis possíveis a serem estudadas. E, portanto, uma eficiente seleção das variáveis mais importantes é desejável (STOWE; MAYER, 1966). Exemplos de planejamentos para selecionar as variáveis significativas são o delineamento Plackett-Burman e o fatorial fracionado.

Já os experimentos fatoriais (estilo 2^K) são aqueles que envolvem combinações entre os níveis de duas ou mais variáveis independentes (fatores, K), como é o caso do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). O DCCR é dito completo por testar todas as combinações possíveis entre os fatores em cada nível e é utilizado em laboratórios ou locais onde as fontes de variação são bem controladas (RODRIGUES; IEMMA, 2012).

A adição de ensaios no ponto central do espaço experimental viabiliza o cálculo do erro padrão, permitindo verificar a reprodutibilidade do processo. Já a adição de pontos axiais permite o ajuste dos dados a um modelo de segunda ordem e, conseqüentemente, verificar a existência de curvatura (RODRIGUES; IEMMA, 2012).

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHYUTHAN, K. E.; ACHYUTHAN, A. M.; ADAMS, P. D.; DIRK, S. M.; HARPER, J. C.; SIMMONS, B. A.; SINGH, A. K. Supramolecular self-assembled chaos: polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8641–88, 2010.
- AHMED, S.; RIAZ, S.; JAMIL, A. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 19–35, 2009.
- AKPINAR, O.; AK, O.; KAVAS, A.; BAKIR, U.; YILMAZ, L. Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5544–51, 2007.
- AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BAKIR, U.; YILMAZ, L. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 119–125, 2010.
- AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Enzymatic production of xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, n. 2, p. 145–151, 2009.
- ASPINALL, G. O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: PREISS, J. (Ed.). **The biochemistry of plants (a comprehensive treatise)**. New York: Academic Press, 1980. p. 473–500.
- BADHAN, A.K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 504–510, 2007.
- BAJPAI, P. **Biotechnology for pulp and paper processing**. Boston, MA: Springer US, 2012. p. 83–137
- BASARAN, P.; BASARAN, N.; HANG, Y. D. Isolation and characterization of *Pichia stipitis* mutants with enhanced xylanase activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 545–550, 2000.

- BASARAN, P.; OZCAN, M. Characterization of beta-xylosidase enzyme from a *Pichia stipitis* mutant. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 38–43, 2008.
- BEDFORD, M.; CLASSEN, H. The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye-fed broiler chick. In: VISSER, J.; BELDMAN, G.; VANSOMEREN, M.; VORAGEN, A. (Eds.). **Xylans and xylanases**. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 361–370.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326–338, 2001.
- BELANCIC, A.; SCARPA, J.; PEIRANO, A.; DIAZ, R.; STEINER, J.; EYZAYUIRRE, J. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. **Journal of Biotechnology**, v. 41, p. 71–79, 1995.
- BERGQUIST, P.; TE'O, O. V.; GIBBS, M.; CZIFERSZKY, A.; FARIA, F. P.; AZEVEDO, M.; NEVALAINEN, H. Expression of xylanase enzymes from thermophilic microorganisms in fungal host. **Extremophiles**, v. 6, p. 177–184, 2002.
- BRETTTHAUER, R. K.; CASTELLINO, F. J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 30 (Pt 3), p. 193–200, 1999.
- BRODEUR, G.; YAU, E.; BADAL, K.; COLLIER, J. RAMACHANDRAN, K. B.; RAMAKRISHNAN, S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-17, 2011.
- BRON, S.; BOLHUIS, A.; TJALSMA, H.; HOLSAPPEL, S.; VENEMA, G.; VAN DIJL, J.M. Protein secretion and possible roles for multiple signal peptidases for precursor processing in bacilli. **Journal of Biotechnology**, v. 64, n. 1, p. 3–13, 1998.
- BURTON, R. A.; GIDLEY, M. J.; FINCHER, G. B. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. **Nature Chemical Biology**, v. 6, n. 10, p. 724–732, 2010.
- CARPITA, N. C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 47, p. 445–476, 1996.
- CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 295–331, 2008.
- CHAUDHARY, P.; DEOBAGKAR, D. Purification and characterization of xylanase from *Cellulomonas* sp. N.C.I.M. 2353. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 25, p. 127–133, 1997.
- CHEN, H.; LI, X. L.; LJUNGDAHL, L. G.; CHEN, H.; LI, X. Sequencing of a 1,3-1,4-beta-D-glucanase (lichenase) from the anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2: properties of the enzyme expressed in *Escherichia coli* and evidence that the gene has a bacterial origin. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 19, p. 6028-6034, 1997.
- CHENG, Y. F.; YANG, C. H.; LIU, W. H. Cloning and expression of *Thermoibifida* xylanase gene in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 541–546, 2005.

- CHIDI, S. B.; GODANA, B.; NCUBE, I.; VAN RENSBURG, E. J.; ABOTSI, E. K. Production, purification and characterization of cellulase-free xylanase from *Aspergillus terreus* UL 4209. **Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 21, p. 3939–3948, 2008.
- CHIPETA, Z. A.; PREEZ, J. C. DU; SZAKACS, G.; CHRISTOPHER, L. Xylanase production by fungal strains on spent sulphite liquor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 1, p. 71–78, 2005.
- COLLINS, M. D.; GIBSON, G. R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 5, p. 1052S–1057S, 1999.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3–23, 2005.
- COLLINS, T.; HOYOUX, A.; DUTRON, A.; GEORIS, J.; GENOT, B.; DAUVRIN, T.; ARNAUT, F.; GERDAY, C.; FELLER, G. Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking. **Journal of Cereal Science**, v. 43, n. 1, p. 79–84, 2006.
- COLLINS, T.; MEUWIS, M.-A.; STALS, I.; CLAEYSSENS, M.; FELLER, G.; GERDAY, C. A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 35133–35139, 2002.
- COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. **Carbohydrate Active Server**. Disponível em: <<http://www.cazy.org/>>. Acesso em: 25 jul. 2012.
- CREGG, J. M. Expression in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In: FERNANDEZ, J. M.; HOEFFLER, J. P. (Eds.). **Gene expression systems**. New York: Academic, 1999. p. 157–191.
- DALBOGE, H. Expression cloning of fungal enzyme genes: a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, p. 29–42, 1997.
- DAS, R. C.; SHULTZ, J. L. Secretion of heterologous proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Progress**, v. 3, p. 43–48, 1987.
- DERVILLY, G.; LECLERCQ, C.; ZIMMERMANN, D.; ROUE, C.; THIBAUT, J.; SAULNIER, L. Isolation and characterization of high molar mass water-soluble arabinoxylans from barley and barley malt. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 143–149, 2002.
- DERVILLY-PINEL, G.; SAULNIER, L. Experimental evidence for a semi-flexible conformation for arabinoxylans. **Carbohydrate Research**, v. 330, p. 365–372, 2001.
- FANG, H. Y.; CHANG, S. M.; LAN, C. H.; FANG, T. J. Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 49–55, 2008.
- FENGXIA, L.; MEI, L.; ZHAOXIN, L.; XIAOMEI, B.; HAIZHEN, Z.; YI, W. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5938–5941, 2008.

- GILBERT, H. J.; HAZLEWOOD, G. P. Bacterial cellulases and xylanases. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 187–194, 1993.
- GOMES, J.; GOMES, I.; STEINER, W. Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast *Cryptococcus adeliae*: production and properties. **Extremophiles**, v. 4, p. 227–235, 2000.
- DEN HAAN, R.; VAN ZYL, W. H. Enhanced xylan degradation and utilisation by *Pichia stipitis* overproducing fungal xylanolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 5, p. 620–628, 2003.
- FONSECA, Á.; BOEKHOUT, T.; FELL, J. W. *Cryptococcus* Vuillemin (1901). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Eds.). **The Yeasts, a Taxonomic Study**. 5 ed. Elsevier, 2011. p. 1661–1737.
- HALLIWELL, G. Hemicelluloses. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**. Weinheim: Chemie, 1965. p. 1064.
- HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ŽUPANČIČ, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 2, p. 137–161, 1996.
- HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M. Classification of glycoside hydrolases and glycosyltransferases from hyperthermophiles. **Methods in Enzymology**, v. 330, p. 183–201, 2001.
- HEROLD, S.; BISCHOF, R.; METZ, B.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C. P. Xylanase gene transcription in *Trichoderma reesei* is triggered by different inducers representing different hemicellulosic pentose polymers. **Eukaryotic cell**, v. 12, n. 3, p. 390–398, 2013.
- IKEDA, R.; MAEDA, T. Structural studies of the capsular polysaccharide of a non-neoformans *Cryptococcus* species identified as *C. laurentii*, which was reclassified as *Cryptococcus flavescens*, from a patient with AIDS. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 3, p. 503–509, 2004.
- INGRAM, L. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 855–866, 1999.
- INNIS, M. A.; HOLLAND, M. J.; MCCABE, P. C.; COLE, G. E.; WITTMAN, V. P.; TAL, R.; WATT, K. W. K.; GELFAND, D. H.; HOLLAND, J. P.; MEADE, J. H. Expression, glycosylation, and secretion of an *Aspergillus glucoamylase* by *Saccharomyces cerevisiae*. **Science**, v. 228, p. 21–26, 1985.
- JEANES, A.; PITTSLEY, J. E.; WATSON, P. R. Extracellular polysaccharide produced from glucose by *Cryptococcus laurentii* var. *flavescens* NRRL Y -1401: chemical and physical characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 8, p. 2775–2787, 1964.
- JEFFRIES, T. W. Biochemistry and genetics of microbial xylanases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 337–342, 1996.
- JHAMB, K.; SAHOO, D. K. Production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*: effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 135–143, 2012.

- JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1219–1227, 2011.
- KABEL, M. **Characterisation of complex xylo-oligosaccharides from xylan rich by-products**. Tese (Doutorado) Universidade de Wageningen, Holanda, 2002. 129 p.
- KANO, R.; ISHIDA, R.; NAKANE, S.; SEKIGUCHI, M.; HASEGAWA, A.; KAMATA, H. The first reported case of canine subcutaneous *Cryptococcus flavescens* infection. **Mycopathologia**, v. 173, n. 2-3, p. 179–82, 2012.
- KINOSHITA, K.; TAKANO, M.; KOSEKI, T.; ITO, K.; IWANO, K. Cloning of the xynNB gene encoding xylanase B from *Aspergillus niger* and its expression in *Aspergillus kawachii*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 5, p. 422–428, 1995.
- KORDOSSIS, T.; AVLAMI, A.; VELEGRAKI, A.; STEFANO, I.; GEORGAKOPOULOS, G.; PAPALAMBROU, C.; LEGAKIS, N.J. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. **Medical Mycology**, v. 36, n. 5, p. 335–339, jan 1998.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411–456, 1999.
- LEATHERS, T. D. Color variants of *Aureobasidium pullulans* overproduce xylanase with extremely high specific activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1026–1030, 1986.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 1–24, 1997.
- LESTER, S. J.; MALIK, R.; BARTLETT, K. H.; DUNCAN, C. G. *Cryptococcosis*: update and emergence of *Cryptococcus gattii*. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 1, p. 4–17, 2011.
- LEVIN, L.; HERRMANN, C.; PAPINUTTI, V. L. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 1, p. 207–214, 2008.
- LIU, W.; LU, Y.; MA, G. Induction and glucose repression of endo- β -xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL409. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 67–72, 1999.
- LOPES, F.; MOTTA, F.; ANDRADE, C. C. P.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI-FILHO, F. Thermo-stable xylanases from non conventional yeasts. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 03, n. 03, p. 36–42, 2011.
- LOPES, F. P. **Otimização da produção de xilanase por levedura silvestre**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- MAAT, J.; ROZA, M.; VERBAKEL, J.; STAM, H.; DASILVA, M. J. S.; EGMOND, M. R.; HAGEMANS, M. L. D.; VANGARCOM, R. F. M.; HESSING, J. G. M.; VANDERHONDEL, C. A. M. J. J.; ANROTTERDAM, C. Xylanases and their application in bakery. In: VISSER, J.; BELDMAN, G.; VANSOMEREN, M.; VORAGEN, A. (Eds.). **Xylans and xylanases**. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 349–360.

- MADLALA, A.; BISSOON, S.; SINGH, S.; CHRISTOV, L. Xylanase-induced reduction of chlorine dioxide consumption during elemental chlorine-free bleaching of different pulp types. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 345–351, 2001.
- MARTINS, D. A. B.; PRADO, H. F. A.; LEITE, R. S. R.; FERREIRA, H.; MORETTI, M. M. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production. In: MR. SUNIL KUMAR (Ed.). **Integrated Waste Management**, v. 2. 1. ed. Rijeka, Croatia: InTech, 2011. p. 319–360.
- MILLATI, R.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J. Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 515–522, 2002.
- MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.
- MORAIS, C. G.; CADETE, R. M.; UETANABARO, A. P. T.; UETANABARO, A. P. T.; ROSA, L. H.; LACHANCE, M.-A.; ROSA, C. A. D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 19–28, 2013.
- MOROSOLI, R.; ZALCE, E.; DURAND, S. Secretion of a *Cryptococcus albidus* xylanase in *Pichia stipitis* resulting in a xylan fermenting transformant. **Current Genetics**, v. 24, n. 1-2, p. 94–9, 1993.
- MOTTA, F. B. **Triagem, seleção produção e caracterização da enzima xilanase a partir de leveduras silvestres**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 17–27, 2001.
- NILVEBRANT, N. O.; PERSSON, P.; REIMANN, A.; SOUSA, F.; GORTON, L.; JÖNSSON, L. Limits for alkaline detoxification of dilute acid lignocellulose hydrolysates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, p. 615–628, 2003.
- OHKOSHI, A.; KUDO, T.; MASE, T.; HORIKOSHI, K. Purification of three types of xylanases from an alkalophilic *Aeromonas* sp. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, p. 3037–3038, 1985.
- OKAI, N.; FUKASAKU, M.; KANEKO, J.; TOMITA, T.; MURAMOTU, K.; KAMIO, Y. Molecular properties and activity of a carboxyl-terminal truncated form of xylanase 3 from *Aeromonas caviae* W-61. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, p. 1560–1567, 1998.
- ONYSKO, K. A. Biological bleaching of chemical pulps: a review. **Biotechnology Advances**, v. 11, p. 179–198, 1993.
- ÖZCAN, S.; KIITTER, P.; CIRIACY, M.; KÖTTER, P. Xylan-hydrolysing enzymes of the yeast *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 190–195, 1991.

- PARACHIN, N. S.; SIQUEIRA, S.; FARIA, F. P.; TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. Xylanases from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of CfXYN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1-3, p. 52–57, 2009.
- PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v. 65, n. 3, p. 191–201, 1998.
- VAN PARIDON, P. A.; BOONMAN, J. C. P.; SELTEN, G. C. M.; GEERSE, C.; BARUG, D.; DE BOT, P. H. M.; HEMKE, G. The application of fungal endoxylanase in poultry diets. In: VISSER, J.; BELDMAN, G.; KUSTERS-VAN SOMEREN, M. A.; VORAGEN, A. G. J. (Eds.). **Xylans and xylanases**. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 371–378.
- PEDERON, M.; LAURITZEN, H. K.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S. Identification of thermostable beta-xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 743–748, 2007.
- PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R.-C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 879–903, 2012.
- PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; LA RUBIA, T. DE; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53–63, 2002.
- PETER, B.; KRATKY, Z.; VRSANSKA, M.; URMANICOVA, D. Xylan-degrading enzymes of the yeast *Cryptococcus albidus*. Identification and cellular localization. **European Journal of Biochemistry**, v. 108, n. 1, p. 323–329, 1980.
- PETRESCU, I.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; CHESSA, J.-P.; NTAARIMA, P., CLAEYSSSENS, M.; DEVREESE, B.; MARINO, G.; GERDAY, C. Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae*. **Extremophiles**, v. 4, n. 3, p. 137–144, 2000.
- POLIZELI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.
- ROBERFROID, M. B. Health benefits of non-digestible oligosaccharides. **Advances In Experimental Medicine and Biology**, v. 427, p. 211–219, 1997.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental Design and Process Optimization**. Campinas, SP, Brazil: Cárita Editora, 2012. 352 p.
- ROSE, S. H.; ZYL, W. H. VAN. Constitutive expression of the *Trichoderma reesei* β -1,4-xylanase gene (*xyn2*) and the β -1,4-endoglucanase gene (*egl*) in *Aspergillus niger* in molasses and defined glucose media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 461–468, 2002.
- SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.

- SANCHEZ, G.; PILCHER, L.; ROSLANDER, C.; MODIG, T.; GALBE, M.; LIDEN, G. Dilute-acid hydrolysis for fermentation of the Bolivian straw material Paja Brava. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 3, p. 249–256, 2004.
- SA-PEREIRA, P.; PAVEIA, H.; COSTA-FERREIRA, M.; AIRES-BARROS, M. R. A new look at xylanases: an overview of purification strategies. **Molecular Biotechnology**, v. 24, p. 257–281, 2003.
- SARASWAT, V.; BISARIA, V. S. Biosynthesis of xylanolytic and xylan-debranching enzymes in *Melanocarpus albomyces* IIS 68. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, p. 352–357, 1997.
- SATO, I.; KOBAYASHI, H.; HANYA, Y.; ABE, K.; MURAKAMI, S.; SCORZETTI, G.; FELL, J. W. *Cryptococcus nodaensis* sp nov, a yeast isolated from soil in Japan that produces a salt-tolerant and thermostable glutaminase. v. 10, p. 127–132, 1999.
- SCHISLER, D. A.; KHAN, N. I.; BOEHM, M. J.; SLININGER, P. J. Greenhouse and field evaluation of biological control of *Fusarium* head blight on durum wheat. **Plant Disease**, v. 86, n. 12, p. 1350–1356, 2002.
- SCORZETTI, G.; PETRESCU, I.; YARROW, D.; FELL, J. W. *Cryptococcus adeliensis* sp. nov., a xylanase producing basidiomycetous yeast from Antarctica. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, n. 2, p. 153–157, 2000.
- SIRISANSANEEYAKUL, S. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 6, p. 565–570, 1995.
- SOLEIMANI, M.; TABIL, L.; PANIGRAHI, S.; ALBERTA, E. Bio-production of a polyalcohol (xylitol) from lignocellulosic resources: a review. Written for presentation at the CSBE / SCGAB 2006. **Annual Conference Society**, 2006.
- SOUZA, W. R. DE. Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. In: CHANDEL, A.; SILVA, S.S. (Eds.) **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass - techniques, applications and commercialization**. InTech, 2013. p. 207–247.
- SREENATH, H. K.; SANTHANAM, K. The use of commercial enzymes in white grape juice clarification. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 73, n. 3, p. 241–243, 1992.
- STARMER, W. T.; LACHANCE, M.-A. Yeast ecology. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Eds.). **The yeasts: a taxonomic study**. 5 ed. Elsevier, 2011. p. 65–83.
- STEVENS, B. J. H.; PAYNE, J. Cellulase and xylanase production by yeasts of the genus *Trichosporon*. **Journal of General Microbiology**, v. 100, n. 2, p. 381–393, 1977.
- STOWE, R. A.; MAYER, R. P. Efficient screening of process variables. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 36–40, 1966.
- SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33–64, 2002.
- SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 39–67, 1997.

- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, v. 2, n. 4, p. 707–738, 2007.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: a Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621–1651, 2008.
- TAIBI, Z.; SAOUDI, B.; BOUDELAA, M.; TRIGUI, H.; BELGHITH, H.; GARGOURI, A.; LADJAMA, A. Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. strain Cpt20 isolated from poultry compost. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 3, p. 663–679, 2012.
- TAKENISHI, S.; TSUJISAKA, Y. On the modes of action of three xylanases produced by a strain of *Aspergillus niger* van tieghem. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 39, p. 2315–2323, 1975.
- TANAKA, H.; OKUNO, T.; MORIYAMA, S.; MUGURUMA, M.; OHTA, K. Acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans*: efficient expression and secretion in *Pichia pastoris* and mutational analysis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, n. 5, p. 338–343, 2004.
- TANENBAUM, S. W.; FISHER, P. J.; HENWOOD, A.; NOVAK, J.; SCOTT, B.; NAKAS, J. P. Hemicellulose bioconversion to polyanionic heteropolysaccharides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34-35, p. 135–148, 1992.
- VÁZQUEZ, M.; ALONSO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 11, p. 387–393, 2000.
- VÁZQUEZ, M.; ALONSO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. Enzymatic processing of crude xylooligomer solutions obtained by autohydrolysis of eucalyptus wood. **Food Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 91–105, 2002.
- VERMA, D.; SATYANARAYANA, T. Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 360–367, 2012.
- VIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2-3, p. 335–350, 1994.
- VIKARI, L.; VEHEMAANPERÄ, J.; KOIVULA, A. Lignocellulosic ethanol: From science to industry. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 1–12, 2012.
- VILLARREAL, M. L.; PRATA, A. M. R.; FELIPE, M. G.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 1, p. 17–24, 2006.
- VORAGEN, A. G. J. Technological aspects of functional carbohydrates. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 328–335, 1998.
- WANG, Y.; ZHANG, J. A novel hybrid process, enhanced by ultrasonication, for xylan extraction from corncobs and hydrolysis of xylan to xylose by xylanase. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 1, p. 140–145, 2006.

WONG, K. K.; TAN, L. U.; SADDLER, J. N. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 305–317, 1988.

WONG, K. K. Y.; SADDLER, J. N. Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries. In: COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. (Eds.). **Hemicelluloses and Hemicellulases**. London: Portland Press, 1993. p. 127–143.

WYMAN, C. Alternative fuels from biomass and their impact on carbon dioxide accumulation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 45-46, p. 897–915, 1994.

WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E. Hydrolysis of cellulose and hemicellulose. **Renewable Energy**, 2005.

YOSHIOKA, H.; NAGATO, N.; CHAVANICH, S.; NILUBOL, N.; HAYASHIDA, S. Purification and properties of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoidea* YH-50. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, p. 2425–2432, 1982.

ZHANG, S.; SCHISLER, D. A.; BOEHM, M. J.; SLININGER, P. J. Utilization of chemical inducers of resistance and *Cryptococcus flavescens* OH 182.9 to reduce *Fusarium* head blight under greenhouse conditions. **Biological Control**, v. 42, n. 3, p. 308–315, 2007.

CAPÍTULO 3

3 Otimização da produção de xilanase utilizando bagaço explodido

Este capítulo está apresentado na forma de artigo (“Optimization of xylanase production by *Cryptococcus flavescens* LEB-AY₁₀ from steam exploded sugarcane bagasse”) o qual foi submetido à revista *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (Elsevier). Ele corresponde ao estudo da identificação da levedura *Cryptococcus flavescens* LEB-AY₁₀ (CCT 7725) e da produção de xilanase termoestável utilizando como substrato bagaço de cana-de-açúcar. Três diferentes condições de explosão a vapor e suas respectivas frações solúveis foram testadas, enquanto xilana de faia e bagaço bruto foram utilizados como controle. Melaço ou componentes sintéticos foram utilizados para suplementar o meio. Técnicas de planejamento experimental foram utilizadas para estudar a influência das variáveis e aumentar a atividade da xilanase. A fração solúvel correspondente a 75 g/L de bagaço pré-tratado em condições brandas foi selecionada como substrato. Nas condições otimizadas, a enzima apresentou atividade de $4,67 \pm 0,23$ U/mL (a 50 °C) ou $8,33 \pm 0,36$ U/mL (a 80 °C) em 96 h de incubação induzida. A atividade de xilanase aumentou em 5,6 vezes em relação à atividade dos testes preliminares e 2,4 vezes à atividade utilizando fração C5 como indutor.

Optimization of xylanase production by *Cryptococcus flavescens* LEB-AY₁₀ on steam exploded sugarcane bagasse

Cristiane C. P. Andrade^{1,2*} • Tatiana P. Santos¹ • Sulamita F. Franco² • Maria I. Rodrigues¹ •
Gonçalo A. G. Pereira² • Francisco Mauger Filho¹

¹Faculty of Food Engineering, University of Campinas, Campinas-SP, Brazil

²Institute of Biology, University of Campinas, Campinas-SP, Brazil

*ccpandra@gmail.com

ABSTRACT

Agricultural wastes are constantly studied for industrial applications due to their high availability and low costs. Once these wastes may be employed as substrate for enzyme induction, the production of a thermo-stable xylanase was evaluated using sugarcane bagasse as substrate. First, the yeast *Cryptococcus flavescens* LEB-AY₁₀ (CCT 7725) was identified by sequencing of ITS1-5.8S-ITS2 region and of D1/D2 domains of the large subunit 26S ribosomal DNA. Then, three different conditions of steam exploded bagasse and their corresponding soluble fractions were assayed as inductors, while xylan from beechwood and raw bagasse were used as controls. Molasses or synthetic compounds were used to supplement the media. Experimental design was employed to study the influence of variables and enhance activity of xylanase. The soluble fraction from 75 g/L of mild pretreated bagasse was selected as substrate. At optimized conditions, the enzyme showed an activity of 4.67±0.23 U/mL (at 50 °C) or 8.33±0.36 U/mL (at 80 °C) at 96 h of induced incubation. Activity of the xylanase increased 5.6 times compared to the activity of preliminary tests and 2.4 times from activity on the C5 fraction.

Keywords: xylanase, steam exploded bagasse, *Cryptococcus flavescens*

3.1 INTRODUCTION

Bio-bleaching of paper pulp, bioconversion of lignocellulose materials for biofuels, waste treatment, digestibility of animal feed and the food industry (Beg et al., 2001; Juturu and Wu, 2011; Subramaniyan and Prema, 2002) are some of the potential applications of xylanases. These enzymes, also known as endo-1,4- β -xylanases (E.C. 3.2.1.8), are the main xylan degrading enzymes which randomly cleave the β -1,4 glycosidic bonds between xylose residues, releasing xylooligosaccharides and xylobiose.

Although xylan is, after cellulose, the most abundant polysaccharide in nature (Biely, 1985), xylanase production utilizing purified xylan as substrate is uneconomical. A viable method to substantially reduce the enzyme production cost is to utilize agricultural by-products as substrate (Murthy and Naidu, 2010). These lignocellulosic materials, in addition to being low cost, do not compete with food chains (Jurado et al., 2009). Therefore, wastes such as corn cob, corn husk, oat husk, sugarcane bagasse (Oliveira et al., 2013), rice straw (Dhillon et al., 2000) wheat straw and bran (Azin et al., 2007) have been used by researchers to replace pure xylan in xylanase induction.

Sugarcane bagasse is an efficient alternative to reduce the costs of xylanase production since it is inexpensive and is often available in tropical countries like Brazil (Bocchini et al., 2005). It is a fibrous residue of cane stalks left over after extraction of the juice (Pandey et al., 2000), and it is composed mainly by 32-44% of cellulose, 19-24% of lignin, 27-32% of hemicellulose and 4.5-9.0% of ash (Rowell, 1992).

Due to the recalcitrant nature of lignocellulosic biomass, pretreatment of the raw material is important prior to enzymatic hydrolysis (Galbe and Zacchi, 2012), whose purpose is to separate lignin from cellulose and hemicellulose, reduce cellulose crystallinity and increase porosity of the material (Cheng and Timilsina, 2011). From the same point of view, pretreatment is required for enzyme production because the fibers must be accessible for induction. A widely employed physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass is steam explosion (Liu et al., 2013). In this treatment method, biomass is heated using high-pressure steam for a few minutes, then the steam condenses under the high pressure ("wetting" the material) and it is "exploded" by rapid depressurization of the reactor. Steam explosion causes both hemicellulose solubilization (by partial hydrolysis) and disaggregation of the lignocellulosic matrix, breaking down inter- and intra-molecular linkages (Carrasco, 1989; Girio et al., 2010; Romaní et al., 2013).

Experimental design tools are common practices in biotechnology and have been applied by various researchers, especially for optimization of culture conditions (Kalil et al., 2000). The main advantages to the use of these tools include: the reduction of number of trials, analysis of the interaction among factors and the exploration of the entire experimental space (Rodrigues and lemma, 2012).

Lopes et al. (2011) studied the xylanolytic activity of 349 wild yeasts isolated from different Brazilian biomes, and selected *Cryptococcus* sp. LEB-AY₁₀ by optimal activity at 80 °C. The authors increased the activity of this enzyme by up to 600% in experimental designs, using birchwood xylan as substrate. Considering the high cost of this optimized medium, the objective of the present study was to identify the species of *Cryptococcus* sp. strain LEB-AY₁₀, select a steam explosion condition and optimize xylanase production using sugarcane bagasse as substrate.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Yeast Identification

Species identification of *C. flavescens* LEB-AY₁₀ isolated from Atlantic Forest was carried out by sequencing the gene that encodes the 5.8S region of ribosomal RNA, the spacer regions ITS-1 and ITS-2, and D1/D2 domains of the large subunit 26S. DNA extraction of the culture grown overnight was performed according to Ausubel et al. (1998). The universal primers ITS1F (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') and ITS4R (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') were used for ITS1-5.8S-ITS2 amplification, and primers NL1F (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3') and NL4R (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3') were used for D1/D2 amplification, according to the methodology described previously (Esteve-Zarzoso et al., 1999; Kurtzman; Robnett, 1998; Leaw et al., 2006). PCR products were purified using Exo 1 (Exonuclease 1) and SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase), and quantified in a ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Both strands were sequenced using the BigDye[®] Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems) and the DNA ABI PRISM 377 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), at the Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio, Brazil). Identification of the yeast species was based on comparison of

nucleotide sequences with those deposited in GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the Basic Local Alignment Search Tool (Blastn).

3.2.2 Substrates

Xylanase production was performed by induction with steam exploded sugar cane bagasse (Centro de Tecnologia Canaveieira - CTC, Piracicaba, Brazil) at three different pretreatment conditions: mild (12 kgf/cm²; 188.5°C), moderate (15 kgf/cm²; 198°C) and high (19 kgf/cm²; 210°C). For each pretreated sample, the soluble fraction (C5-fraction, containing the hemicellulosic compounds of bagasse) was extracted as described below. *Beechwood* xylan (Sigma) and raw bagasse (Usina Ester, Cosmópolis, Brazil) were utilized as standards.

3.2.2.1 Soluble fraction preparation

C5 fractions of pretreated bagasse (PTB) were extracted by consecutive washings. For each pretreatment, 10% (dry weight/volume) solutions were prepared in distilled water. Solutions were homogenized in a rotatory shaker at 150 rpm for 1 h at room temperature. Subsequently, the solutions were vacuum filtered and the filtrates were reserved, while the retentates were washed twice at the same conditions, but the homogenization time was reduced to 15 min. The filtrates from all washes were pooled and concentrated in a rotary evaporator Marconi AM-120 (São Paulo, Brazil) at 70°C until reaching the desired concentration. Therefore, unless otherwise noted, concentration of the C5 fraction described hereafter means the amount of PTB (dry weight) used to obtain the final volume after vacuum evaporation.

3.2.3 Induction of enzyme

The microorganism was activated in 50 mL GYMP broth and pre-inoculum was performed in 200 mL of the C5 fraction extracted from 5% (wet weight/volume) of moderately pretreated bagasse and containing 0.2% (of total reducing sugars) of molasses. The fermentation broth was incubated at 30°C for 48 h.

Cells of the pre-inoculum were centrifuged and inoculated in a 500 mL baffled Erlenmeyer containing 150 mL of broth with different compositions (as described below). The flasks were incubated under rotational shaking at 150 rpm and 28°C. Samples were collected

every 12 h for pH measurement and determination of enzymatic activity. The samples were centrifuged at 10,000 x g in a centrifuge model RC26Plus Sorvall (DuPont) for 10 min at 4 °C.

3.2.3.1 Assay 1: Preliminary test using bagasse and molasses

First, the fermentation broth consisted of 2.5% (dry weight/volume) of PTB (high, moderate or mild) supplemented with 0.2% (in total reducing sugars) molasses. Synthetic medium containing xylan (1% Beechwood xylan; 0.5% peptone; 0.3% yeast extract; 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), was also used as a standard.

3.2.3.2 Assay 2: Removal of possible inhibitors

The second test aimed to compare PTB supplemented with molasses or with synthetic compounds. Two treatment methods for the removal of potential inhibitors present in the soluble fraction of PTB were also assayed. The first medium was treated with activated charcoal before preparation of the medium (Aguiar-Oliveira; Maugeri, 2010; Mendes, 2006). The second treatment was performed during fermentation, using biodiesel, in which a two-phase fermentation system was formed according to Maugeri Filho et al. (2012). The C5 fraction with no treatment was used as the control.

Thus, the two treatments described above and the control were applied to two types of fermentation media, totaling six trials:

- C5-MOL Broth: C5 fraction corresponding to 3% (dry weight/volume) of pretreated bagasse (moderate) and 0.2% molasses (corresponding to the amount of total reducing sugars present);

- C5-SYNT Broth: C5 fraction corresponding to 3% (dry weight/volume) of pretreated bagasse (moderate), 0.5% peptone, 0.3% yeast extract, 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

3.2.3.3 Assay 3: Enzyme production using bagasse and synthetic medium

The third test was carried out to verify the induction of enzyme production, for all pretreatments, as determined by previous tests. For this purpose, the three types of pretreated bagasse (PTB, 2.5% dry weight/volume) and their respective soluble fractions (C5,

corresponding to 5% dry weight/volume) were used instead of xylan in synthetic medium (0.5% peptone, 0.3% yeast extract, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% $(NH_4)_2SO_4$). Untreated bagasse and xylan (1% dry weight) were used for comparison.

3.2.4 Optimization strategy

As a preliminary study, a Plackett-Burman (PB) design (Rodrigues; lemma, 2012) was performed to evaluate the effects of eight variables (related to media composition and incubation conditions) in xylanase production (response), using a matrix of 12 trials and 4 replicates of the central point. Coded and real values of the variables are presented in Table 3.1.

Table 3.1 PB matrix showing coded levels and real values (in brackets).

Trial	Temperature. (°C)	Agitation (rpm)	Substrate (g/L)	pH	Yeast extract (g/L)	Peptone (g/L)	$MgSO_4 \cdot$ $7H_2O$ (g/L)	$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)
1	1 (35)	-1 (100)	1 (150)	-1 (5)	-1 (1)	-1 (0)	1 (0.5)	1 (2)
2	1 (35)	1 (200)	-1 (50)	1 (7)	-1 (1)	-1 (0)	-1 (0.1)	1 (2)
3	-1 (25)	1 (200)	1 (150)	-1 (5)	1 (3)	-1 (0)	-1 (0.1)	-1 (0)
4	1 (35)	-1 (100)	1 (150)	1 (7)	-1 (1)	1 (4)	-1 (0.1)	-1 (0)
5	1 (35)	1 (200)	-1 (50)	1 (7)	1 (3)	-1 (0)	1 (0.5)	-1 (0)
6	1 (35)	1 (200)	1 (150)	-1 (5)	1 (3)	1 (4)	-1 (0.1)	1 (2)
7	-1 (25)	1 (200)	1 (150)	1 (7)	-1 (1)	1 (4)	1 (0.5)	-1 (0)
8	-1 (25)	-1 (100)	1 (150)	1 (7)	1 (3)	-1 (0)	1 (0.5)	1 (2)
9	-1 (25)	-1 (100)	-1 (50)	1 (7)	1 (3)	1 (4)	-1 (0.1)	1 (2)
10	1 (35)	-1 (100)	-1 (50)	-1 (5)	1 (3)	1 (4)	1 (0.5)	-1 (0)
11	-1 (25)	1 (200)	-1 (50)	-1 (5)	-1 (1)	1 (4)	1 (0.5)	1 (2)
12	-1 (25)	-1 (100)	-1 (50)	-1 (5)	-1 (1)	-1 (0)	-1 (0.1)	-1 (0)
13	0 (30)	0 (150)	0 (100)	0 (6)	0 (2)	0 (2)	0 (0.3)	0 (1)
14	0 (30)	0 (150)	0 (100)	0 (6)	0 (2)	0 (2)	0 (0.3)	0 (1)
15	0 (30)	0 (150)	0 (100)	0 (6)	0 (2)	0 (2)	0 (0.3)	0 (1)
16	0 (30)	0 (150)	0 (100)	0 (6)	0 (2)	0 (2)	0 (0.3)	0 (1)

The analysis of effects was performed by the Student's t-test, using the Statistica 8.0 software (Statsoft, Brazil). After selection of the variables, a Central Composite Rotational Design (CCRD) was used to explore the experimental space and verify the interactions among variables (Rodrigues; lemma, 2012).

3.2.5 Analysis

3.2.5.1 Enzymatic Activity

The enzymatic solution (0.3 mL) was incubated with 2.7 mL of 1% birchwood xylan (Sigma) in 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.3) at 50 °C (Bailey et al., 1992) or at 80 °C, in a shaker bath. Samples were collected at constant time intervals and xylanase activity was determined by the amount of reducing sugar (xylose) released, measured by the DNS method (Miller, 1959). In this work, one unit of xylanase activity was defined as the amount of enzyme necessary to produce 1 μ mol of xylose from xylan per minute at 50 °C, unless informed the temperature of 80 °C.

3.2.5.2 Moisture content

The moisture content was measured by the gravimetric technique at 105 °C, in an oven with air circulation, until the samples reached constant weight.

3.2.5.3 HPAEC-PAD analysis

HMF, sucrose and monomeric sugars (arabinose, mannose, glucose, xylose, galactose and fructose) were analyzed using a HPAEC-PAD DX-500 system (Dionex, USA) equipped with a CarboPac PA-1 column (0.4×25 cm; Dionex, USA) and pre-column (0.4×5 cm; Dionex, USA). Elution was performed at 1 mL/min and involved an isocratic step of 1 mM NaOH for 8 min followed by a linear gradient of 1-5 mM NaOH for 8 min and an isocratic step of 5 mM NaOH for 14 min. The column was cleaned between runs for 5 min with 150 mM NaOH and equilibrated for 5 min with 1 mM NaOH.

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1 Yeast identification

The yeast LEB-AY₁₀, previously classified as *Cryptococcus* sp. by Lopes et al. (2011), did not grow in temperatures exceeding 30 °C. On GYMP agar at 28 °C, 48-hours-old colonies were creamy, smooth and glossy, with soft texture, circular shape and slightly raised. According to the microscopic analysis at the same conditions, cells were single, ovoid, encapsulated and showed some buddings.

The fragment of 610 bp amplified for the D1/D2 domains of large subunit (26S) ribosomal DNA was compared with others deposited in the GenBank databases using the NCBI's BLAST tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). For this gene, the sequence similarity value with some *C. flavescens* strains was 99%, including *C. flavescens* IMUFRJ 52043 (accession number FN428920.1, e-value 0.0), *C. flavescens* TJY36-3 (accession number EU301625.1, e-value 0.0) and *C. flavescens* ATT120 (accession number FJ743610.1, e-value 0.0).

The 553 bp fragment in the ITS1-5.8S-ITS2 region also showed high similarity (96%, e-value 0.0) with *C. flavescens* IMUFRJ 52043 and other *C. flavescens* isolates. Thus, according to morphological and molecular characteristics, the strain LEB-AY₁₀ was classified as *Cryptococcus flavescens* and deposited in the “Coleção de Culturas Tropical” (Fundação André Tosello, Campinas, Brazil) bank as CCT 7725.

3.3.2 Enzyme production

Moisture of PTB samples varied from to 50.3 and 70.5% and was used to adjust the dry weight of each PTB before the assays.

3.3.2.1 Preliminary tests using bagasse and molasses

Preliminary tests were performed to evaluate the production of xylanase on PTB supplied with 0.2% molasses as a nutrient source. The maximum activity achieved was 0.84

U/mL at 72 h for the mild PTB. This amount was approximately three times lower than those obtained with the standard medium (1% xylan in synthetic medium).

3.3.2.2 Removal of possible inhibitors

The C5 fraction was extracted and tested with molasses or synthetic compounds (mainly nitrogen sources). Fermentation of the microorganism LEB-AY₁₀ was performed with the C5 fraction extracted from 3% (dry weight/volume) of moderate PTB, using 6 different combinations. Each test was carried out with different treatments intended to removal potential inhibitors. Nutrients, instead of molasses, were added in order to induce and enhance the production of enzymes. Results are shown in Figure 3.1.

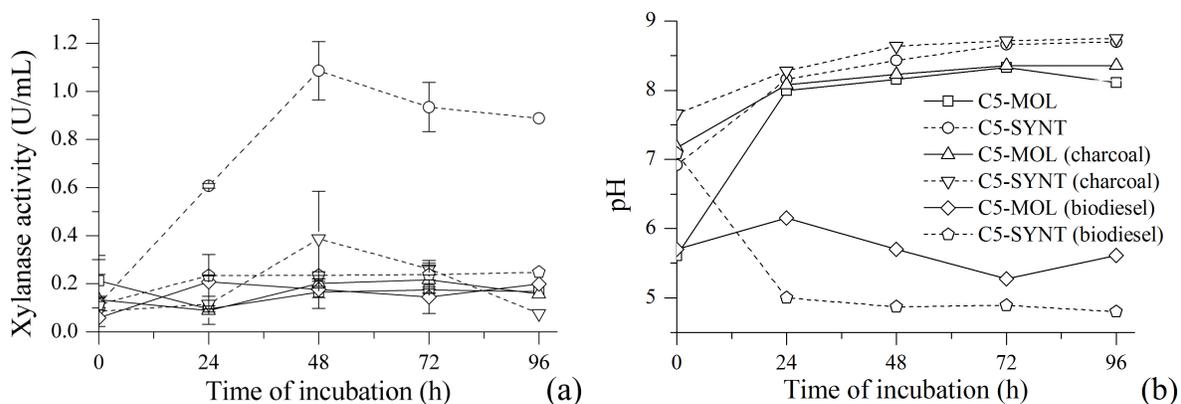


Figure 3.1 Xylanase activity (a) and pH (b) for *Cryptococcus flavescens* LEB-AY₁₀ cultivated in the soluble fraction (C5) treated with activated charcoal, submitted to biphasic fermentation (biodiesel) or without treatment. Synthetic compounds (SYNT) or molasses (MOL) were added.

According to this figure, fermentation of the C5 fraction in synthetic medium showed the highest production of enzymes, reaching 1.1 U/mL at 48 hours of fermentation. These results demonstrate that the presence of molasses in the fermentation broth was a negative factor for enzyme production, which may be suppressed by the reducing sugars or due to an incidental lack of nitrogen and other nutrients.

Since the treatments for inhibitor removal reduced the enzyme production, composition of the synthetic medium (without pure xylan) was selected to carry out the fermentation of PTB and its C5 fractions.

3.3.2.3 Enzyme production using bagasse and synthetic medium

The fermentative broths were formulated like the synthetic media composition (carbon source, 0.5% peptone, 0.3% yeast extract, 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) in which the carbon sources were: raw bagasse, PTB (2.5% dry weight/volume) or C5 fraction (extracted from 5% of dry weight of PTB).

The Figure 3.2 shows the results of xylanase production by LEB-AY₁₀ at these conditions for each pretreatment (mild, moderated or high).

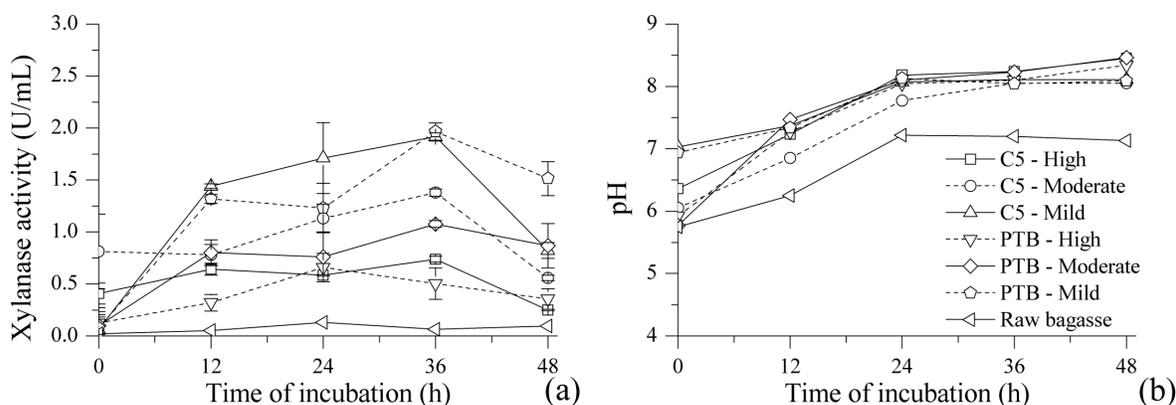


Figure 3.2 Xylanase activity (a) and pH (b) for *C. flavecens* LEB-AY₁₀ using pretreated bagasse (PTB), soluble fraction (C5) or raw bagasse, in synthetic medium.

Based on Figure 3.2, it can be observed that the microorganism showed the best activity when induced with bagasse pretreated under mild conditions. Using this substrate source, the xylanase activity was 1.97 U/mL for the PTB and 1.92 U/mL for the C5 fraction, both at 36 h of fermentation.

In an attempt to understand the different activities, different substrate sources were considered. The composition of HMF and sugars released in the pretreatments are showed in Table 3.2. However, as can be seen in this table, sugars released and HMF produced are meaningless, especially in the fermentation medium composition, and potentially may not significantly affect microorganism behavior.

According to Table 3.2, xylose is the main sugar in pretreated bagasses while sucrose is predominant in raw bagasse. For galactose and xylose, the more intense the treatment, the higher is the quantity of sugars released. However, high pretreatment showed lower levels of

sugars than moderate treatment in cases of arabinose, glucose, mannose and fructose. These trends of sugar degradation at higher temperatures was previously reported by Ruiz et al. (2008). These authors also reported that the increase in temperature led to a higher amount of sugars up to a certain temperature, above which higher sugar degradation took place. The authors studied the composition of sunflower stalks hydrolyzates after steam explosion, between 180 °C and 230 °C, and verified that the higher sugar yields corresponded to central temperature values (around 210 °C). Solubilization and stability were also dependent on the sugar type.

Table 3.2 HMF, sucrose and monomeric sugars analyzed by HPAEC-PAD (averages of duplicate analysis).

Media	HMF	Arabinose	Galactose	Glucose	Sucrose	Xylose	Mannose	Fructose
Composition after extraction of C5 fraction (mg/L)								
C5-High	86.6	167.2	116.1	446.5	nd	2515.5	68.8	118.2
C5-Moderate	198.8	281.6	114.1	803.5	nd	2322.8	90.0	306.2
C5-Mild	< 20	412.0	< 20	nd	nd	401.7	nd	nd
Composition of media at beginning of fermentation (mg/L)								
C5-High	< 20	78.8	41.4	205.1	< 20	953.4	21.7	40.6
C5-Moderate	< 20	87.9	36.3	250.4	nd	720.7	28.3	90.9
C5-Mild	< 20	158.2	< 20	40.3	nd	143.8	60.1	nd
PTB-High	< 20	79.4	69.9	177.6	nd	1097.9	119.8	66.2
PTB-Moderate	< 20	137.9	63.8	373.8	nd	1016.4	44.2	152.8
PTB-Mild	< 20	275.8	38.0	nd	nd	311.4	nd	nd
Raw bagasse	nd	nd	45.2	574.6	1203.8	24.5	< 20	620.7

* nd: not detected.

Comparing the composition of C5 fraction after its extraction, with the composition of media after sterilization at 121 °C for 20 min in Table 3.3, it can be observed that the amount of free sugar and HMF were reduced substantially. Hemicellulosic sugars may degrade to weak acids, furan and phenolic derivatives as a function of the process and pretreatment conditions (Larsson et al., 1999). Sterilization with heat may have also contributed to the formation of these compounds, and they may be responsible for pH decrease after autoclaving (Figures 3.1b and 3.2b). They may inhibit subsequent fermentative processes, leading to low yields and productivities (Carvalho et al., 2008). In the case of xylanase

production, greater amounts of free sugars may repress enzyme induction. Based on the studies of Mandal et al. (2012), despite the presence of xylan and low amounts of xylose and arabinose in the media supplemented with xylan, the production of xylanase increased; higher concentrations (>0.1%) of these sugars repressed xylanase biosynthesis by *Bacillus cereus* BSA1, and addition of 0.1% glucose repressed xylanase production.

According to the results for the activities of xylanase, the microorganism LEB-AY₁₀ can grow well in a broth containing the C5 fraction of bagasse subjected to mild pretreatment, supplemented with other components of the synthetic medium. Although the amount of substrate needed to generate the C5 fraction is twice as high as in the PTB, the C5 fraction was selected to allow for monitoring of biomass and enzyme activities during fermentation. Furthermore, because the C5 fraction is obtained by water washing of the PTB, the solid retentate may be reused in cellulase induction or hydrolyzed and used as a glucose-rich substrate for biotechnological applications.

3.3.3 Optimization of culture media

A PB experimental design was utilized, considering the previous fermentation results, in order to improve the fermentation process, and consequently to increase the induction of enzyme production. The effects of the variables were analyzed at 24, 36 and 48 h according to the PB design, and are shown in Figure 3.3. The effects for maximum activity of each assay divided by its respective time of fermentation (MAX/t) were also estimated, as a parameter of productivity, so as to aid in the interpretation of the results.

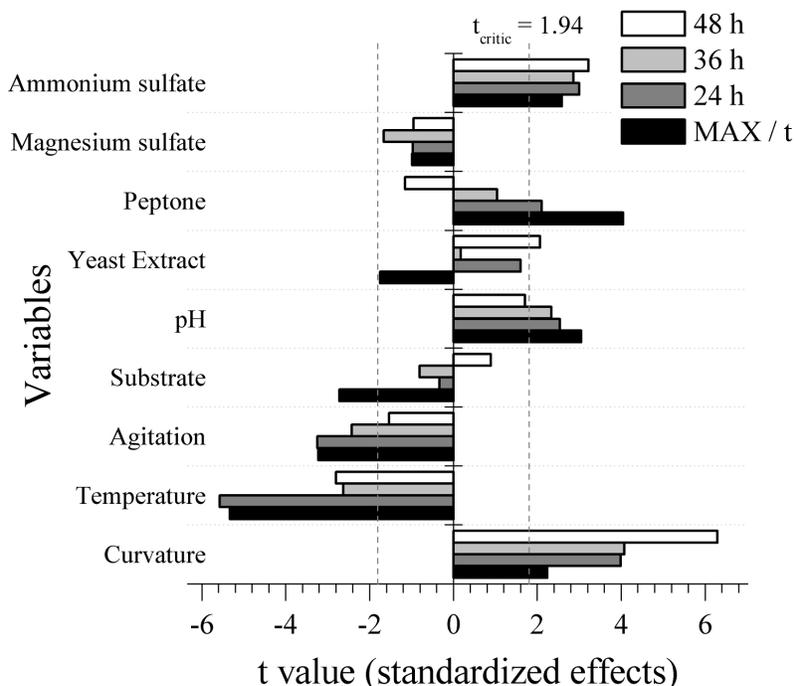


Figure 3.3 Bars chart showing the estimate of effects in the PB design at 90% confidence determined by the Student's t-test. Vertical dashed lines represent $t_{critic}=1.94$ (two-tailed test, $p<0.1$; 6 degrees of freedom). MAX/t: maximum activity for each fermentation divided by its time of occurrence.

Considering the effect of the estimates in Figure 3.3, the curvature showed positive effects and according to Cockshott and Sullivan (2001) this parameter indicates the degree to which the center points differ from the non-center points, and a positive effect indicates that responses occur at or beyond the extremes.

Only the variable magnesium sulfate had no significant effect, at 90% confidence, for xylanase production for up to 48 h of incubation in the studied concentration ranges. It was therefore fixed at the low level (0.01 g/L). The increase in pH apparently had a positive effect in enzyme induction, however because the culture media is not buffered, the initial value decreased after sterilization and all trials presented an initial pH in the range from 4.9 to 5.7 (except the trial 9 that showed a pH of 6.4). Because the use of phosphate buffered media was prejudicial for xylanase production by this microorganism (Lopes et al., 2011), this variable is fixed at 8.0 (before sterilization).

Both agitation and temperature showed increasingly negative effects (p -value < 0.1). High agitation in baffled flasks may have been detrimental to the microorganism, but aeration is important for enzyme production. Thus, this parameter was fixed at 150 rpm and the volume of media was reduced to 10% of the total volume of the flask. Incubation of *C.*

flavescens LEB-AY₁₀ at 35°C hindered enzyme induction, differently from the results of Castro et al. (1997), who obtained 2.5 times greater xylanase production by *Aspergillus* FP-470 at 45°C than at 37°C, although growth was seriously affected. Because the highest activities were found in trial 9 (2.16 ± 0.04 U/mL at 36h) and trial 13 (1.83 ± 0.08 U/mL at 48h), and considering curvature positive effects, the temperature was fixed at 28°C.

Ammonium sulfate was statistically significant at all times and the increase in concentration proved to be beneficial for enzyme production. Yeast extract and peptone were seemed to be favorable for enzyme activity, but the data were not statistically significant.

With respect to the substrate concentration, it was statistically significant in the concentration range studied and showed a negative effect only when considering MAX/t. However, substrate is usually an important parameter and, in this case, it might be masked by the effects of other variables. So, in order to define the best substrate concentration, other variables were fixed and the substrate was assayed at 32.5, 75 and 150 g/L, as shown in Figure 3.4.

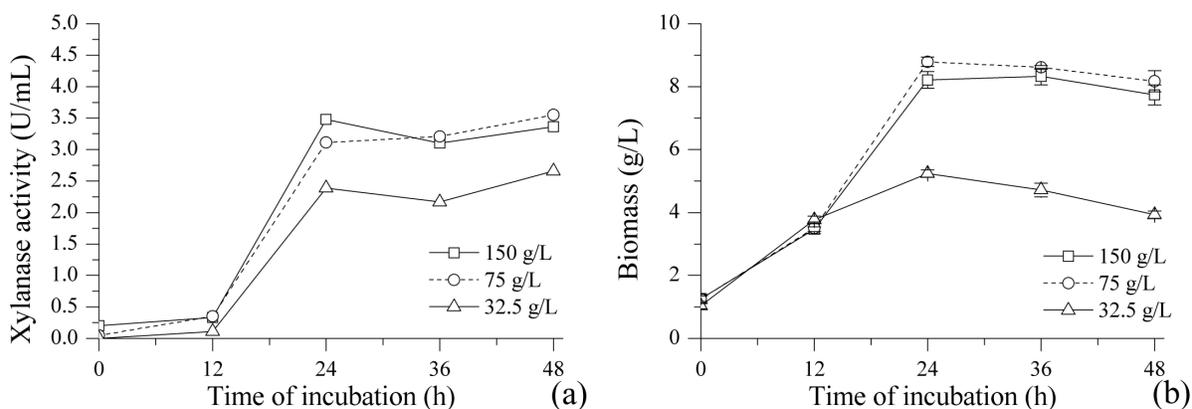


Figure 3.4 Xylanase activity (a) and biomass (b) for different concentrations of the C5 fraction.

The use of 32.5 g/L of substrate showed the lowest enzyme expression and biomass production (2.27 U/mL and 3.93 g/L at 48 h, respectively), while the other two FC5 concentrations showed the same tendency for both responses, as can be seen in Figure 3.4. Based on these trials, the C5 fraction concentration was fixed at 75 g/L (w/v) of PTB in mild conditions. Inoculum size and its time of incubation were also assayed (data not shown) to improve cell efficiency.

After global analysis of the PB design effects, a CCRD experimental design was performed to evaluate the influence and interactions among higher levels of nitrogen sources in xylanase production (Table 3.2). Other variables were fixed as described in previous paragraphs: 75 g/L of substrate; 0.01 g/L magnesium sulfate, pH 8.0, 28°C and 150 rpm. Results for xylanase activity and biomass concentration are shown in Figure 3.5.

Table 3.3 Coded and real values (in brackets) followed by responses of xylanase activity at 48 and 60 h of incubation.

Trial	Coded Levels (Real values, g/L)			Xylanase activity (U/mL)	
	Yeast extract	Peptone	Ammonium sulfate	48 h	60 h
1	-1 (2)	-1 (4)	-1 (2)	2.58±0.21	3.34±0.14
2	1 (4)	-1 (4)	-1 (2)	2.76±0.06	3.34±0.06
3	-1 (2)	1 (6)	-1 (2)	2.16±0.09	2.95±0.38
4	1 (4)	1 (6)	-1 (2)	3.42±0.06	3.69±0.40
5	-1 (2)	-1 (4)	1 (4)	1.13±0.14	0.75±0.04
6	1 (4)	-1 (4)	1 (4)	1.17±1.33	0.73±0.13
7	-1 (2)	1 (6)	1 (4)	0.96±0.04	1.32±0.17
8	1 (4)	1 (6)	1 (4)	0.93±0.14	1.16±0.34
9	-1.68 (1.32)	0 (5)	0 (3)	1.17±0.03	1.01±0.28
10	1.68 (4.68)	0 (5)	0 (3)	1.67±0.23	2.13±0.12
11	0 (3)	-1.68 (3.32)	0 (3)	2.51±0.12	3.13±0.07
12	0 (3)	1.68 (3.32)	0 (3)	1.42±0.10	1.62±0.11
13	0 (3)	0 (5)	-1.68 (1.32)	5.06±0.17	5.06±0.54
14	0 (3)	0 (5)	1.68 (4.68)	1.14±0.08	1.33±0.05
15	0 (3)	0 (5)	0 (3)	2.35±0.11	2.56±0.13
16	0 (3)	0 (5)	0 (3)	2.82±0.14	2.95±0.11
17	0 (3)	0 (5)	0 (3)	2.10±0.72	2.34±0.20

Means of analyses followed by \pm standard error.

The pH values at the start of the process were 5.6-6.1 and at the end ranged from 8.2-8.6. According to Table 3.2 and Figure 3.5, at the end of the fermentation (60h) the activities were between 0.73 and 5.06 U/mL, while biomass oscillated between 3.68 and 5.69 g/L. The highest activities were obtained in trial 13, which corresponds to an axial point ($-\alpha$) of

ammonium sulfate, reaching 5.06 ± 0.17 U/mL, pH 8.53 and 5.69 ± 0.10 g/L of biomass at 48h of induction.

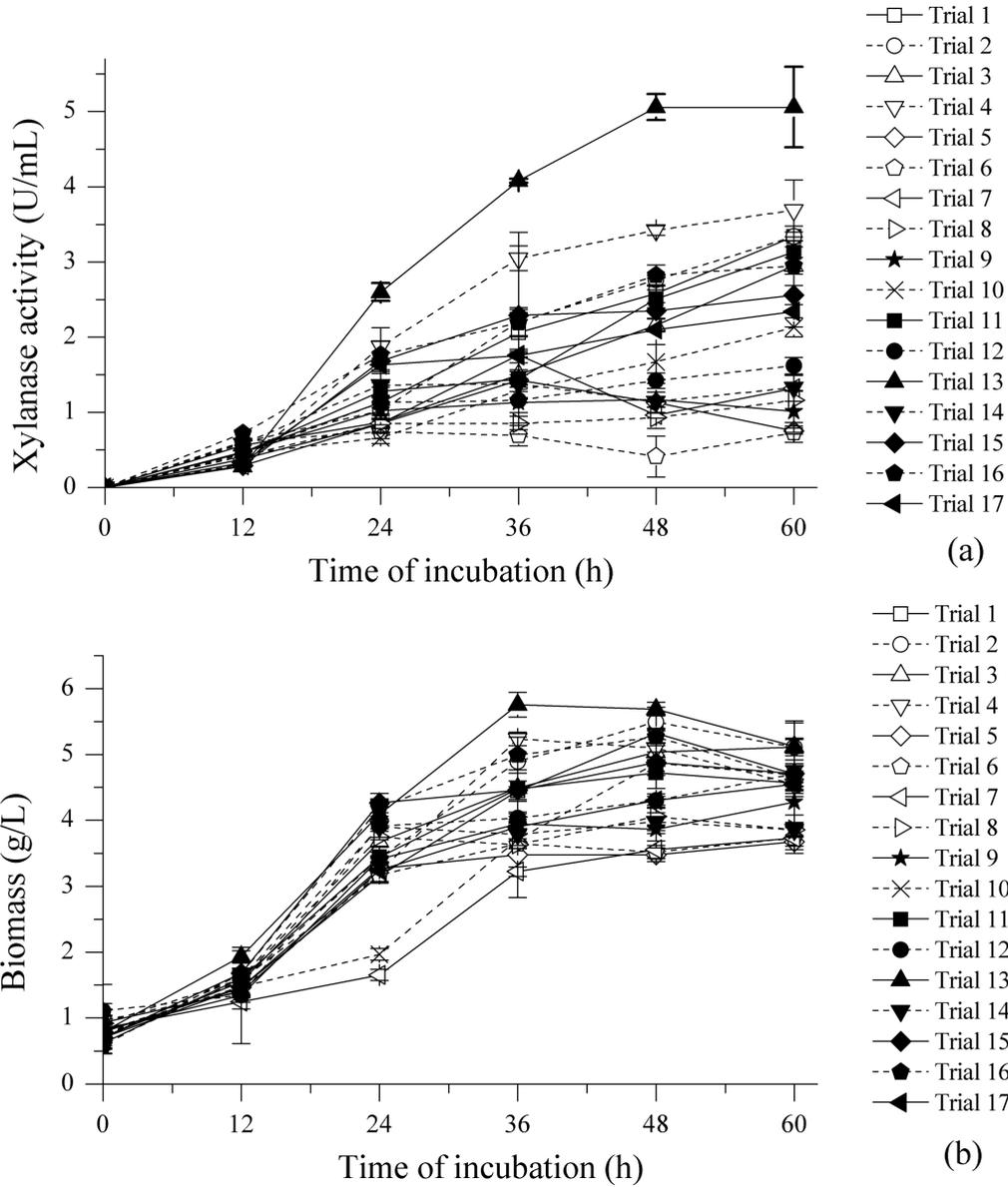


Figure 3.5 Xylanase activity (a) and biomass concentration (b) for the CCRD.

Reproducibility of the assays at the central point condition (2.62 ± 0.22) allowed for analysis of the regression coefficients of the variables at 90% of confidence.

Table 3.4 Regression coefficients results for the CCRD of the strain *C. flavecens* LEB-AY₁₀ using different nitrogen sources. Confidence level of 90%.

Factors*	24 h		36 h		48 h		60 h	
	Coeff	p-value	Coeff	p-value	Coeff	p-value	Coeff	p-value
Mean	1.71	0.0001	2.08	0.0001	2.44	<0.0001	2.63	<0.0001
x ₁ (L)	0.03	0.7707	0.27	0.0493	0.17	0.1937	0.20	0.1608
x ₁ (Q)	-0.37	0.0084	-0.31	0.0379	-0.41	0.0141	-0.42	0.0225
x ₂ (L)	0.03	0.7235	0.02	0.8499	-0.15	0.2435	-0.11	0.4064
x ₂ (Q)	-0.24	0.0508	-0.28	0.0552	-0.22	0.1267	-0.13	0.3861
x ₃ (L)	-0.27	0.0216	-0.63	0.0008	-0.97	<0.0001	-1.14	<0.0001
x ₃ (Q)	0.04	0.7329	0.22	0.1120	0.18	0.1944	0.16	0.3011
x ₁ .x ₂	0.13	0.3291	0.20	0.2160	0.14	0.3743	0.11	0.5422
x ₁ .x ₃	-0.10	0.4446	-0.01	0.9643	-0.18	0.2656	-0.07	0.6902
x ₂ .x ₃	-0.06	0.6322	0.03	0.8668	-0.08	0.5997	0.13	0.4706
	R ² =	0.807	R ² =	0.893	R ² =	0.933	R ² =	0.931

* x₁ is the coded representation for yeast extract, x₂ for peptone and x₃ for ammonium sulfate.

As can be seen in Table 3.4, no significant interactions ($p < 0.1$) were observed among factors. At 48 and 60 h of incubation, times on which the highest activities were detected, only the quadratic term of yeast extract (x_1^2) and the linear term of ammonium sulfate (x_3) were statistically significant ($p < 0.10$). Then, the other terms were ignored and a new model (for 60 h) was generated, as represented by equation 3.1:

$$\text{Activity} = 2.66 - 0.42 \cdot x_1^2 - 1.14 \cdot x_3 \quad (3.1)$$

The analysis of variance (ANOVA) was used to verify the validity of the results. As the variance explained by the model was 85.9% and $F_{\text{calculated}}$ was 15.7 times higher than F_{listeds} ($F_{14;2;0.1} = 2.73$), the model was considered acceptable and the response surface was constructed as shown in Figure 3.6.

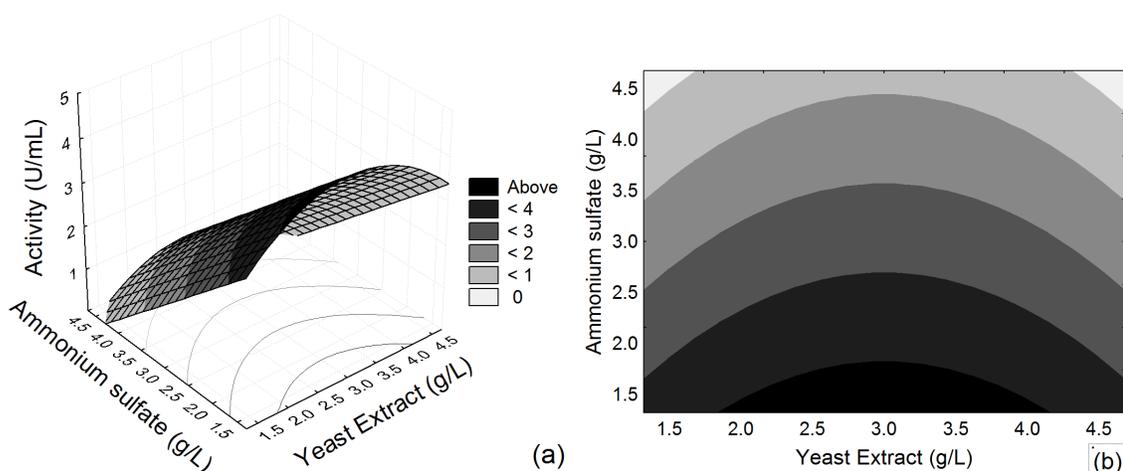


Figure 3.6 Response surface (a) and contour plot (b) for xylanase activity as a function of yeast extract and ammonium sulfate concentrations.

By analysis of Figure 3.6, the best condition for enzymatic is from 2 to 4 g/L of yeast extract (from level -1 to 1) and 1.68 g/L of ammonium sulfate (level $-\alpha$), which are the same conditions as Trial 13 for these factors. Thus, Trial 13 was chosen as the model validation condition. It was also decided to study all factors at condition $-\alpha$ (1.32 g/L yeast extract, 3.32 g/L peptone, 1.32 g/L ammonium sulfate) as it would decrease the costs of operation. Results can be observed in Figure 3.7.

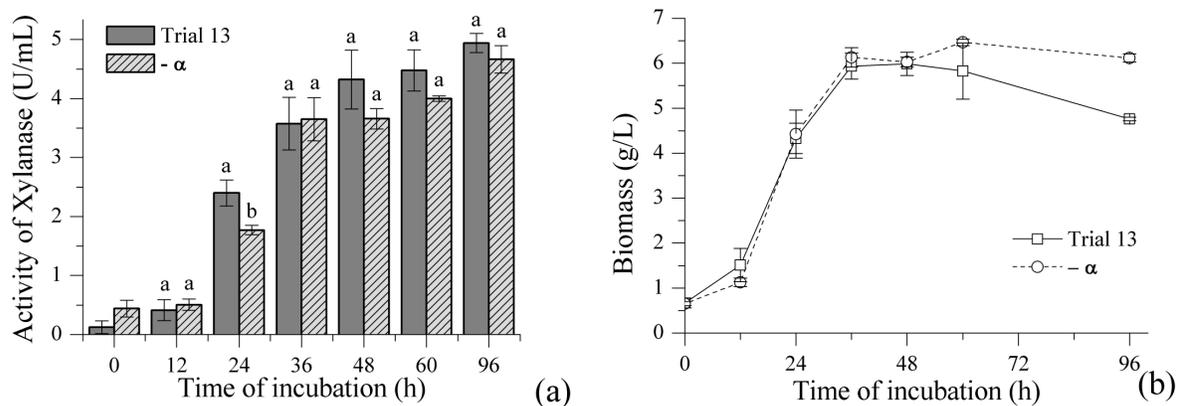


Figure 3.7 Xylanase activity (a) and biomass (b) for validation of results from trial 13 and study of all factors at condition $-\alpha$. Error bars represent the standard error among fermentation replicates and different letters ^{a,b} indicate that enzymatic activity differed significantly between means according to Tukey's test ($\alpha = 0.10$) for different media compositions.

According to the analysis of variance and Tukey's test of three replicates at significance level of 10% ($p < 0.1$), there is no statistical difference between xylanase activity for trial 13 and condition $-\alpha$. Therefore, as level $-\alpha$ was less expensive than trial 13, it was selected as the optimized media. Under these conditions, the maximum xylanase activity was 4.67 ± 0.23 U/mL, reaching 6.12 ± 0.09 g/L of biomass at 96 h. Similar values of activity on sugarcane bagasse were reported for the thermolabile xylanase produced by *C. adeliae*, which showed 65 nkat/mL (equivalent to 3.9 U/mL) on optimized medium containing 24.2 g/L of alkali treated bagasse supplemented with 10 g/L of yeast extract (Gomes et al., 2000).

Considering that the optimal temperature for xylan hydrolysis by *C. flavescens* LEB-AY₁₀ is 80 °C, according to Lopes et al. (2011), activity may be up to 1.78 times higher at that temperature. Therefore, if measured at 80 °C, the enzyme activity may in fact be 8.33 ± 0.36 U/mL at 96 h of fermentation under conditions of level $-\alpha$.

In this study, activity in optimized conditions was 5.6 times higher than media containing molasses and 2.4 times higher than the firsts tests in FC5 supplemented with synthetic media. Although no interactions among factors were significant, in the range of the studied factors, the effects of the factors were evaluated and the strategies utilized during this work corroborate the optimization of the process.

3.4 CONCLUSION

The strain LEB-AY₁₀, identified as *Cryptococcus flavescens* and known as a stable xylanase producer, was assayed for enzyme production under different fermentation conditions. Pre-treated sugar cane bagasses were used, as well as the C5 fraction. Production of xylanase on sugarcane bagasse was higher under mild conditions of the steam explosion pre-treatment (12 kgf/cm²). Experimental design tools helped to delineate strategies and, consequently, increase xylanolytic activity by up to 5.6 times, reaching 4.67 U/mL (at 50 °C) or 8.33 U/mL (at 80 °C), and 6.12 g/L of biomass at 96 h of induced incubation. Thus, utilization of the steam explosion treatment showed to be a suitable option when using sugarcane bagasse as a xylanase inductor.

Abbreviations

PTB: pre-treated bagasse; FC5: fraction containing pentoses; PB: Plackett-Burman experimental design; MAX/t: maximum activity/time.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Foundation for Research Support of the State of São Paulo (FAPESP) for the scholarships, the “Centro de Tecnologia Canavieira” (CTC, Piracicaba-SP, Brazil) for kindly providing the steam exploded bagasse and “Usina Ester Ltda” (Cosmópolis - SP, Brazil) for supplying the raw bagasse.

3.5 REFERENCES

- Aguiar-Oliveira, E., Maugeri, F., 2010. Characterization of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. *Int. J. Food Eng.* 6, online.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, A.J., Struhl, K., 1998. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons Inc, New York, NY.
- Azin, M., Moravej, R., Zareh, D., 2007. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method 40, 801–805.
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* 23, 257–270.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 326–338.
- Biely, P., 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3, 286–290.
- Bocchini, D. a., Oliveira, O.M.M., Gomes, E., Silva, R. Da, 2005. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. *Process Biochem.* 40, 3653–3659.
- Carrasco, F., 1989. Fundamentos del fraccionamiento de la biomasa. *Afinidad* 46, 425–429.
- Carvalho, F., Duarte, L.C., Gírio, F.M., 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *J. Sci. Ind. Res.* 67, 849–864.

- Castro, L.P.M., Trejo-aguilar, B.A., Osorio, G.A., 1997. Thermostable xylanases produced at 37 °C and 45 °C by a thermotolerant *Aspergillus* strain 146, 97–102.
- Cheng, J.J., Timilsina, G.R., 2011. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. *Renew. Energy* 36, 3541–3549.
- Cockshott, a. R., Sullivan, G.R., 2001. Improving the fermentation medium for *Echinocandin B* production. Part I: sequential statistical experimental design. *Process Biochem.* 36, 647–660.
- Dhillon, A., Gupta, J.K., Jauhari, B.M., Khanna, S., 2000. A cellulase-poor , thermostable , alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp 73, 273–277.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, a, 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 Pt 1, 329–37.
- Galbe, M., Zacchi, G., 2012. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy* 1–9.
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R., 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4775–4800.
- Gomes, J., Gomes, I., Steiner, W., 2000. Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast *Cryptococcus adeliae*: production and properties. *Extremophiles* 4, 227–235.
- Jurado, M., Prieto, A., Martínez-Alcalá, A., Martínez, A.T., Martínez, M.J., 2009. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresour. Technol.* 100, 6378–84.
- Juturu, V., Wu, J.C., 2011. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnol. Adv.* 30, 1219–1227.
- Kalil, S.J., Maugeri, F., Rodrigues, M.I., 2000. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Process Biochem.* 35, 539–550.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 331–371.
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., Nilvebrant, N.-O., 1999. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb. Technol.* 24, 151–159.
- Leaw, S.S.N., Chang, H.H.C., Sun, H.H.F., Barton, R., Bouchara, J., Chang, T.C., 2006. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. *J. Clin. Microbiol.* 44, 693–699.
- Liu, Z.-H., Qin, L., Pang, F., Jin, M.-J., Li, B.-Z., Kang, Y., Dale, B.E., Yuan, Y.-J., 2013. Effects of biomass particle size on steam explosion pretreatment performance for improving the enzyme digestibility of corn stover. *Ind. Crops Prod.* 44, 176–184.

- Lopes, F., Motta, F., Andrade, C.C.P., Rodrigues, M.I., Maugeri-Filho, F., 2011. Thermo-stable xylanases from non conventional Yeasts. *J. Microb. Biochem. Technol.* 03, 36–42.
- Mandal, A., Kar, S., Das Mohapatra, P.K., Maity, C., Pati, B.R., Mondal, K.C., 2012. Regulation of xylanase biosynthesis in *Bacillus cereus* BSA1. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 1052–60.
- Maugeri Filho, F., Rossell, C.E. V., Zautsen, R.R.M., 2012. Processo de fermentação extrativa e uso do mesmo. Brazilian Patent (INPI), University of Campinas. No PCT/BR2012/000470
- Mendes, G.L., 2006. Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em processo batelada alimentada a partir de meios industriais pré-tratado. 1. PhD Thesis, Faculty of Food Engineering, University of Campinas, Campinas – SP, Brazil.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428.
- Murthy, P.S., Naidu, M.M., 2010. Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. *Food Bioprocess Technol.* 5, 657–664.
- Oliveira, L.R.M., Nascimento, V.M., George, J., Rocha, M., 2013. Effects of alkaline organosolv delignification on enzymatic conversion of cellulose from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion. *Rev. Investig. Apl.* 7, 1–10.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 74, 69–80.
- Rodrigues, M.I., Iemma, A.F., 2012. Experimental Design and Process Optimization. Cárita Editora, Campinas, SP, Brazil.
- Romaní, A., Garrote, G., Ballesteros, I., Ballesteros, M., 2013. Second generation bioethanol from steam exploded *Eucalyptus globulus* wood. *Fuel* 111, 66–74.
- Rowell, R.M., 1992. Opportunities for Lignocellulosic Materials and Composites, in: Rowell, R.M., Schultz, T.P., Narayan, R. (Eds.), *Emerging Technologies for Materials and Chemicals from Biomass*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 12–27.
- Ruiz, E., Cara, C., Manzanares, P., Ballesteros, M., Castro, E., 2008. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme Microbial Technology* 42, 160–166.
- Subramaniyan, S., Prema, P., 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22, 33–64.

CAPÍTULO 4

4 Purificação e caracterização

O presente capítulo tem o objetivo de descrever a purificação e caracterização da xilanase produzida pelo micro-organismo *Cryptococcus flavescens* LEB-AY₁₀. A purificação foi realizada em duas etapas cromatográficas pelo fato do micro-organismo produzir heteropolissacarídeo polianiônico extracelular na presença de xilana. Na primeira etapa, utilizou-se resina de troca iônica DEAE Streamline (25 mL), da qual as frações com atividade foram unidas e concentradas em sistema de ultrafiltração (10 kDa). A segunda etapa foi realizada por permeação em gel, em coluna Superdex75 (16/60), sendo possível recuperar 45% da atividade inicial. Acompanhou-se a qualidade da purificação por eletroforese desnaturante, em gel de poliacrilamida 12%, sendo que a massa molecular da xilanase foi estimada em 48 kDa. Caracterizou-se a enzima purificada quanto aos perfis de pH e temperatura, estabilidades térmica e de pH, especificidade e efeito da concentração de substrato. A enzima apresentou atividade ótima a 77,5°C (pH 4,8) e maior estabilidade em valores de pH próximo a 5,3. As meias-vidas desta enzima em pH 4,8 foram de 1,11 min a 77,5°C, 47,5 min a 70°C e 4,84 h a 67°C. A pH 5,3, as meias-vidas foram 9,2 minutos a 77,5°C, 50,25 min a 72°C, 1,93 h a 70°C e 33,74 h a 67°C. Avaliou-se o efeito da concentração do substrato xilana de bétula sobre a atividade enzimática. Os parâmetros cinéticos K_m e v_{max} para esse substrato foram 4,13 g/L e 2,32 U/mL, respectivamente. A xilanase purificada apresentou atividade em pNPX (0,02 U/mg) e também mostrou um pouco de atividade de celulase em CMC (0,99 U/mg), sugerindo que ela pertença a família GH10.

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Micro-organismo

Para a produção da xilanase, utilizou-se a linhagem de *Cryptococcus flavescens* LEB-AY₁₀ (CCT 7725), selecionada por Motta (2008) e identificada no capítulo anterior. O micro-organismo encontra-se armazenado no banco de culturas do Laboratório de Engenharia Metabólica e Bioprocessos (LEMeB) – FEA/UNICAMP, a 4°C em ágar inclinado GYMP (2,0% glicose, 0,5% extrato de levedura, 1,0% de extrato de malte, 0,2% fosfato de sódio monobásico, 2,0% ágar e pH 5,5) ou a -80°C em caldo GYMP contendo 20% de glicerol.

4.1.2 Produção da enzima

A xilanase foi produzida por fermentação submersa, em frascos agitados. Para tanto, transferiu-se uma alçada da cultura LEB-AY₁₀ para 50 mL de caldo GYMP e incubou-se a 30°C e 150 rpm por 24 horas. Centrifugaram-se as células e realizou-se o pré-inóculo da linhagem em 50 mL de meio contendo 1% (m/v) xilana de bétula (Sigma); 0,5% peptona; 0,3% extrato de levedura; 0,01% MgSO₄.7H₂O; 0,1% (NH₄)₂SO₄; e com pH inicial de 6,0 por mais 24 h. As células foram novamente centrifugadas e inoculadas em um Erlenmeyer aletado contendo 300 mL de meio de mesma composição e incubadas sob as mesmas condições (adaptado de LOPES *et al.*, 2011). O caldo fermentativo foi centrifugado a 10000 x g a 4°C por 10 minutos em centrífuga Sorvall RC26 Plus (DuPont Company, Newton, EUA) para remoção das células e demais impurezas. O sobrenadante, contendo as enzimas extracelulares foi congelado a -20°C até o momento do uso.

4.1.3 Concentração e purificação da xilanase

4.1.3.1 Precipitação da enzima

Foram avaliadas três metodologias de precipitação: por sulfato de amônio, por etanol e por acetona. Na primeira, o sulfato de amônio foi adicionado lentamente sob agitação

branda até obter-se 70% (m/v) de saturação e a solução foi armazenada por 12 h a 4 °C. Em seguida, foi centrifugada a 15000 x g por 10 min a 4 °C e o precipitado foi ressuspendido em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0). Em sequência, foi dialisado com mesmo tampão por 24 h a 4 °C (AGUIAR-OLIVEIRA, 2007).

Para a precipitação com solvente (etanol ou acetona), o mesmo foi adicionado ao caldo sob gotejamento lento até atingir a concentração de 70% (v/v), sob agitação branda a 4 °C, com o auxílio de reatores encamisados e agitadores magnéticos (SANTOS, 2002). Após, centrifugou-se a 4 °C e 15000 x g por 10 min e ressuspendeu-se o precipitado em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0).

4.1.3.2 Concentração por ultrafiltração

Como alternativa aos métodos de precipitação descritos anteriormente, a concentração das proteínas contidas no sobrenadante também foi testada por ultrafiltração, utilizando o dispositivo Amicon Ultra-15 (Millipore) para centrífugas. A membrana utilizada possuía massa molecular de corte de 10 kDa e o protocolo foi realizado segundo recomendações do fornecedor.

4.1.3.3 Purificação da enzima

A enzima foi purificada em duas etapas cromatográficas, utilizando sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*, Pharmacia). Inicialmente, utilizou-se cromatografia de troca iônica na qual o tipo de resina e as condições do ensaio (tampão, pH, gradiente, fluxo) foram determinadas utilizando o *HiTrap IEX Selection Kit* (GE Healthcare), contendo colunas de 1 mL. Após escolha da resina Q-Sepharose, foram montadas colunas com volume de leito de 10 mL e a purificação foi realizada coletando-se amostras a cada 3 mL.

Testes posteriores foram feitos utilizando a resina DEAE Streamline (GE Healthcare), em volume de leito de 25 mL (16 x 125 mm), injetando 50 mL de amostra por corrida. Utilizou-se 50 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,0) a um fluxo de 1,6 mL/min, exceto durante a injeção da amostra em que o valor do fluxo foi reduzido para 1,0 mL/min. Para eluição, utilizou-se gradiente de NaCl (no mesmo tampão) alternando com condições isocráticas, conforme descrito a seguir: 0-100 mM de NaCl em 50 mL, 100 mM de NaCl em 100 mL, 100-200 de mM de NaCl em 50 mL, 200 mM de NaCl em 100 mL, 200-300 mM de NaCl em 50 mL, 300 mM de NaCl em 100 mL, 300 mM-1 M de NaCl em 50 mL e, finalmente,

1 M de NaCl em 100 mL do mesmo tampão. A purificação foi realizada a temperatura ambiente e as frações foram coletadas a cada 5 mL.

As frações com atividade de xilanase foram unidas e concentradas por ultrafiltração, em célula de aço inox com agitação (CARVALHO *et al.*, 2011), utilizando membrana com massa molecular de corte de 10 kDa. O fluido de pressurização utilizado foi nitrogênio em duas pressões: 1 MPa para membrana UC010 (Microdyn Nadir) e 2 MPa para membrana YM-10 (Millipore). O processo foi realizado a 4 °C e as membranas foram condicionadas com água MilliQ[®] até fluxo constante.

A segunda etapa da purificação foi realizada por cromatografia de permeação em gel (GPC, gel permeation chromatography), a 15 °C, utilizando coluna Superdex75 16/60 (Amersham Bioscience Co.). Equilibrou-se a coluna com 50 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,0) contendo 150 mM de NaCl. Para isso, injetou-se 2 mL de amostra por corrida, a um fluxo de 1 mL/min, e as frações coletadas a cada 3 mL.

4.1.3.4 Eletroforese

O grau de purificação e a massa molecular da enzima foram estimados por eletroforese desnaturante em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*) na concentração de 12% para o gel de separação e 4% para o gel de empilhamento, de acordo com método descrito por Laemmli (1970). Mistura de proteínas de baixa massa molecular (*LMW electrophoresis standard*, GE Healthcare) foram utilizadas como padrão de massa molecular. A revelação das bandas foi feita por coloração com nitrato de prata ou com azul de coomassie.

4.1.4 Caracterização da enzima purificada

A enzima purificada foi caracterizada quanto aos perfis de pH e temperatura, estabilidade em relação ao pH, estabilidade térmica, especificidade pelo substrato e efeito da concentração de substrato.

4.1.4.1 Perfil de Temperatura e pH

A determinação da temperatura e do pH ótimos foram realizadas por um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com dois fatores (2²), 3 repetições na

condição de ponto central e 4 pontos axiais. A metodologia de análise das superfícies de respostas foi aplicada aos resultados obtidos, tendo em vista sua confiabilidade e praticidade nos estudos de caracterização enzimática, além de explorar todo o espaço experimental e testar a interação entre as variáveis envolvidas (RODRIGUES; IEMMA, 2012). A análise dos efeitos das variáveis e a construção da superfície de resposta foram realizadas pelo software Statistica® 10.0 (STATSOFT, 2010).

Para este DCCR, a resposta avaliada foi a atividade de xilanase e a faixa de valores estudados foi estabelecida de acordo com Lopes *et al.* (2011), para a enzima não purificada, conforme Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Faixa de valores utilizados para o primeiro DCCR.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Temperatura (°C)	50	55	65	75	80
pH	3,4	3,8	4,8	5,8	6,2

Como as condições ótimas encontradas foram obtidas nas condições dos pontos axiais para temperatura, um segundo DCCR foi elaborado de acordo com os novos valores apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Faixa de valores utilizados para o segundo DCCR, sendo os fatores pH e temperatura.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Temperatura (°C)	55,9	60	70	80	83,9
pH	3,4	3,8	4,8	5,8	6,2

A validação dos resultados do segundo DCCR ocorreu fixando o pH em 4,8, conforme utilizado para a enzima não-purificada (LOPES *et al.*, 2011), e variando a temperatura (60; 70; 72,5; 75; 77,5; 80; 85 e 88,2°C).

4.1.4.2 Estabilidade da enzima a 72 °C em função do pH

A estabilidade da enzima em relação ao pH foi determinada pela atividade residual da enzima após 30 minutos de incubação a 72°C. Tampão citrato de sódio (50 mM) foi utilizado para faixa de pH entre 3,5 e 6,0 e tampão fosfato de sódio (50 mM) foi usado para pH de 6,0 a 8,0. Atividade de xilanase foi determinada como descrito a seguir, no tópico 4.1.5.1.

4.1.4.3 Estabilidade térmica

As constantes de inativação térmica (k_d) foram determinadas para cada temperatura em pH 4,8 (60, 64, 67, 70 e 77,5°C) e em pH 5,3 (67, 70, 72 e 77,5°C), e a meia-vida ($t_{1/2}$) em função da temperatura.

Constante de inativação e meia vida da enzima

O k_d em cada temperatura foi determinado por meio da inclinação da reta do logaritmo natural da atividade relativa v/v_0 em função do tempo (minutos). A regressão linear obtida dos dados experimentais obedece a Equação 4.1.

$$\ln\left(\frac{v}{v_0}\right) = -k_d \cdot t + C_1 \quad (4.1)$$

Sendo: v é a atividade, v_0 é atividade inicial; k_d é a constante de inativação (min^{-1}); t é o tempo (min); e C_1 é constante.

A meia vida ($t_{1/2}$), a qual é definida como sendo o tempo necessário para a enzima perder 50% da atividade inicial, pode ser calculada pela Equação 4.2. Neste caso, substitui-se v por $v_0/2$ na Equação 4.1.

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{k_d} \quad (4.2)$$

Sendo: $t_{1/2}$ é a meia-vida da enzima (min); e k_d é a constante de desnaturação (min^{-1}).

Cálculo da energia de inativação enzimática

Assim como em outras reações químicas, nas reações catalisadas por enzimas a velocidade aumenta com o aumento da temperatura. Esse efeito foi descrito por Arrhenius e está representado na Equação 4.3 (WISEMAN, 1991).

$$k = A_0 \cdot e^{-E_a / RT} \quad (4.3)$$

Sendo: k é a constante de velocidade (min^{-1}); A_0 é a constante de Arrhenius; E_a é a energia de ativação enzimática (kJ/mol); R é a constante dos gases ideais ($8,314 \cdot 10^{-3}$ kJ/mol.K); e T é a temperatura absoluta (K).

O valor da estabilidade da enzima também é influenciado pela temperatura, em uma forma similar à inativação (WISEMAN, 1991). Desta forma, considerando que a constante de velocidade é igual a constante de inativação (k_d), pode-se obter o valor da energia de inativação enzimática (E_d) pela linearização da equação de Arrhenius (Equação 4.4) através do gráfico $\ln(k_d)$ versus $1/T$. Com este valor de E_d e substituindo a Equação 4.2 na Equação 4.3, é possível estimar a meia vida da enzima em função da temperatura, conforme Equação 4.5

$$\ln k_d = \ln A_0 - \frac{E_d}{R} \frac{1}{T} \quad (4.4)$$

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0.5)}{A_0} \cdot e^{E_d / RT} \quad (4.5)$$

Parâmetros termodinâmicos

Os valores para energia livre de Gibbs, a entalpia e a entropia, foram calculados pelas equações 4.6, 4.7 e 4.8, respectivamente (AGUIAR-OLIVEIRA; MAUGERI, 2011).

$$\Delta G = -RT \ln \left(\frac{k_d \cdot h}{k_B \cdot T} \right) \quad (4.6)$$

$$\Delta H = E_d - RT \quad (4.7)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (4.8)$$

Sendo: ΔG é a energia livre de Gibbs (kJ/mol); ΔH é a entalpia (kJ/mol); ΔS é a entropia (kJ/mol.K); R é a constante dos gases ideais ($8,314 \cdot 10^{-3}$ kJ/mol.K); T é a temperatura absoluta (K); k_d é a constante de inativação (min^{-1}) obtida pela Equação 4.3; k_B é a constante de Boltzman ($1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K); h é a constante de Planck ($11,04 \cdot 10^{-36}$ J.min); E_d é a energia de inativação enzimática (kJ/mol) obtido pela Equação 4.4.

4.1.4.4 Especificidade pelo substrato

A especificidade pelo substrato foi estudada utilizando xilana de bétula (*Birchwood*, Sigma), xilana de faia (*Beechwood*, dois lotes diferentes, Sigma), papel filtro (Whatman nº 1), carboximetilcelulose (CMC, Sigma) e 4-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo (pNPX, Sigma). A atividade em pNPX foi determinada conforme descrito em 4.1.5.2. As demais atividades foram determinadas pelo método de DNS, como descrito no item 4.1.5.1, utilizando curva padrão de glicose para as atividades em CMC e papel filtro, e curva padrão de xilose para as atividades em xilana.

4.1.4.5 Parâmetros cinéticos

Avaliou-se o efeito da concentração do substrato na atividade da enzima utilizando diferentes concentrações de xilana de bétula (0,3 a 27 g/L). As atividades enzimáticas foram realizadas conforme o item 4.1.5.1, alterando apenas a concentração de substrato. A determinação das constantes cinéticas (K_m e v_{max}) foi feita por três métodos de regressão linear (RITCHIE; PRVAN, 1996): Lineweaver-Burk (LINEWEAVER; BURK, 1934), Hanes-Woolf (HANES, 1932) e Eadie-Hofstee (HOFSTEE, 1959) conforme as Equações 4.9, 4.10 e 4.11, respectivamente. As constantes também foram estimadas por regressão não-linear dos pontos experimentais, utilizando o software Statistica® 10.0 (STATSOFT, 2010), ajustados ao modelo de Michaelis-Menten, de acordo com a Equação 4.12.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (4.9)$$

$$\frac{S}{v} = \frac{1}{v_{\max}} S + \frac{K_m}{v_{\max}} \quad (4.10)$$

$$v = -K_m \frac{v}{S} + v_{\max} \quad (4.11)$$

$$v = v_{\max} \frac{S}{K_m + S} \quad (4.12)$$

Sendo: v é a atividade enzimática, v_{\max} é atividade máxima; K_m é a constante de Michaelis-Menten; e S é a concentração de substrato.

4.1.4.6 Hidrólise da xilana

A enzima purificada foi incubada a 70 °C por 2 h em tampão citrato 50 mM contendo 1% de xilana, na proporção de 1:2. Os xilo-oligossacarídeos (XOS) de cadeia curta resultante da hidrólise da xilana foram quantificados por cromatografia de íons (conforme tópico 4.1.5.4).

4.1.5 Métodos analíticos

4.1.5.1 Determinação da atividade de xilanase

A atividade de xilanase foi estimada através da determinação de açúcares redutores. Para isso, 0,3 mL do extrato enzimático (sobrenadante) foram adicionados a 2,7 mL da solução 1% (m/v) de xilana de bétula (Sigma) dissolvida em 50 mM tampão citrato de sódio (pH 5,3) e incubados a 50 °C (BAILEY *et al.*, 1992), em banho agitado recíproco modelo MA093 (Marconi). Amostras foram coletadas em intervalos constantes (2, 6, 10 e 14 minutos) do tempo de reação e usadas para quantificar a quantidade de xilose liberada através da determinação de açúcares redutores.

Para determinação de açúcares redutores foram adicionados 0,1 mL de amostra em 0,1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em tubos de ensaio. Estes foram colocados em banho fervente por 5 minutos, resfriados em banho de gelo e adicionados de 1,6 mL de solução 0,05 M de tartarato de sódio e potássio. Absorbância foi determinada em espectrofotômetro modelo DU 640 (Beckman Coulter) a 540 nm (QINNGHE *et al.*, 2004; MILLER, 1959)

Para a construção da curva padrão, o mesmo procedimento foi realizado utilizando soluções de 1% (m/v) xilana de bétula com diferentes concentrações de D-xilose. A atividade enzimática foi determinada a partir de comparação com a curva padrão. Uma unidade de atividade (U) da xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de D-xilose por minuto de reação a 50 °C.

4.1.5.2 Determinação de atividade de β -xilosidase

A atividade de β -xilosidase foi medida utilizando *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX, Sigma) como substrato, baseado em Basaran e Ozcan (2008). Uma alíquota de 200 μL de pNPX 2 mM dissolvido em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 5,3), foi misturada com 200 μL do extrato enzimático. Incubou-se a 50 °C, por 60 min, e a reação foi finalizada com adição de 800 μL de carbonato de sódio 1 M. A liberação do *p*-nitrofenil foi medida espectrofotometricamente a 405 nm.

O coeficiente de extinção (ϵ), calculado através de curva padrão de para-nitrofenil (pNP), foi de 17.31 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de *p*-nitrofenil por hora a 50 °C em tampão citrato de sódio (pH 5,3).

4.1.5.3 Determinação de proteínas

O conteúdo de proteína foi determinado de acordo com o método posposto por Lowry *et al.* (1951), utilizando albumina bovina (Sigma) como padrão.

4.1.5.4 Quantificação de xilose e xilo-oligossacarídeos

Xilose, xilobiase e os oligossacarídeos com grau de polimerização de 3 a 5 foram identificados e quantificados por cromatografia de íons, utilizando detector de pulso

amperométrico (HPAE-PAD), com bomba GP50 gradient e detector eletroquímico ED40 (DIONEX). Foi utilizada coluna e pré-coluna Carbobac-PA100 (Dionex). Os açúcares foram eluídos em 50 mM de hidróxido de sódio com um gradiente linear de acetato de sódio (15 a 200 mM), em um fluxo de 1 mL/min.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Produção da enzima

Devido aos valores de atividade enzimática serem inferiores aos encontrados por Lopes *et al.* (2011), decidiu-se testar a influência da variação do lote do substrato na produção da enzima. Para isso, foi utilizado o meio complexo sem tampão fosfato (não otimizado) contendo 1% de xilana de bétula (*Birchwood xylan*, Sigma) conforme descrito em Lopes (2010). O lote utilizado pelo autor foi denominado “Lote A”, enquanto que aquele utilizado nos estudos deste capítulo foi denominado de “Lote B”. Além disso, optou-se por testar a indução da enzima em meio mínimo (Yeast Nitrogen Base, YNB) suplementado com 1% de xilana Lote B (não foi possível realizar essa mesma comparação para xilana Lote A devido à sua indisponibilidade comercial). A Figura 4.1 apresenta os resultados de atividade e pH obtidos para as três combinações:

- Meio 1: meio complexo + xilana Lote A (Lopes *et al.*, 2011)
- Meio 2: meio complexo + xilana Lote B
- Meio 3: YNB + xilana Lote B

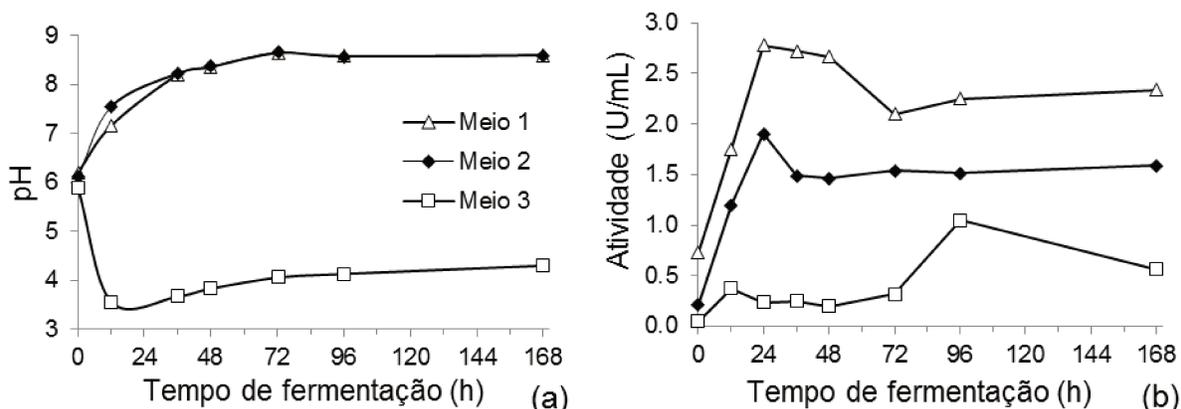


Figura 4.1. Produção da enzima: pH (a) e atividade enzimática (b) em função do tempo de fermentação.

Os meios fermentativos complexos (Meios 1 e 2) foram mais favoráveis à produção de xilanase, sendo que o pH final foi 8,6, enquanto que para o meio YNB foi 4,3 (Meio 3, Figura 4.1a). A atividade máxima foi de 2,69 U/mL a 24 h de fermentação para o Meio 1 (Figura 4.1b), resultado semelhante ao encontrado por Lopes (2010) para estas condições de fermentação. A Figura 4.1b mostra que a variação do lote do substrato afeta a atividade de xilanase, como descrito previamente (KÖNIG *et al.*, 2002). Essa diferença entre xilanas de diferentes lotes será também demonstrada mais adiante, no tópico 4.2.3.5 (o qual aborda a especificidade da enzima pelo substrato).

Para os estudos de purificação, optou-se por não utilizar o meio otimizado por Lopes *et al.* (2011), pois o mesmo contém 2% de xilana e o aumento desse carboidrato no meio foi prejudicial para as etapas de purificação, conforme será justificado a seguir.

4.2.2 Concentração e purificação da xilanase

Protocolos de purificação de xilanas geralmente envolvem uma etapa de precipitação seguida de cromatografia de troca iônica e/ou filtração em gel (TECHAPUN *et al.*, 2003).

4.2.2.1 Concentração da enzima

Visando concentrar e purificar parcialmente a enzima extracelular, foram testados diferentes métodos para precipitação, conforme apresentado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Concentração da enzima utilizando sal, solventes orgânicos e ultrafiltração.

Método de concentração	FC	V (mL)	A (U/mL)	AT (U)	P (mg)	AE (U/mg)	FP	R (%)
Extrato enzimático	1,0	50,0	1,07	53,62	110,83	0,48	1,00	100,0
Solventes orgânicos								
Etanol (70%)	10,0	5,0	3,79	18,93	2,52	7,52	15,54	35,3
Acetona (70%)	10,0	5,0	1,60	7,99	9,11	0,88	1,81	14,9
Sal								
(NH ₄) ₂ SO ₄ (70%)	8,3	6,0	3,78	22,65	6,24	3,63	7,50	42,2
Ultrafiltração (Amicon)								
Extrato enzimático	1,7	30,0	1,82	54,74	60,52	0,90	1,46	100,0
Permeado (<10 kDa)	2,0	25,0	0,07	1,72	46,19	0,04	0,06	3,1
Retido (>10 kDa)	10,0	5,0	5,27	26,36	13,13	2,01	2,23	48,2

Abreviações: FC: fator de concentração, V: volume, A: atividade de xilanase, AT: atividade total de xilanase, P: proteínas, AE: atividade específica, FP: fator de purificação, R: recuperação.

De acordo com a Tabela 4.3, a precipitação com etanol foi o método mais eficiente, pois apresentou o maior fator de purificação (15,54 vezes), aumentando a atividade específica da enzima de 0,48 U/mg para 7,52 U/mg. Entretanto, a recuperação da atividade total da enzima através deste método (35,3%) foi maior apenas que a precipitação com acetona (14,9%). Dentre os tratamentos utilizados, a ultrafiltração (Amicon) mostrou-se como melhor opção considerando a recuperação da enzima (48,2%), seguida pela precipitação com sulfato de amônio (42,2%) que, por sua vez, apresentou um fator de purificação 2,3 vezes maior que o da ultrafiltração.

Entretanto, devido à xilana ser solúvel e ao micro-organismo utilizado (*C. flavecens*) ser produtor de um heteropolissacarídeo polianiónico extracelular por xilosiltransferases (JEANES *et al.*, 1964; PAVLOVA *et al.*, 2011), os testes realizados para a concentração da enzima não foram eficazes, pois não foi possível separar as proteínas dos polissacarídeos através da precipitação. Além dos métodos propostos, foram testadas precipitações parciais com solventes (dados não apresentados), entretanto, estas também não foram satisfatórias.

Na Figura 4.2, estão apresentados os precipitados em gel desnaturante de poliácridamida 12%. Como pode ser visualizada pela eletroforese, os métodos de precipitação com solventes foram os mais seletivos já que desfavoreceram a precipitação

das proteínas de menor massa molecular (Figura 4.2B e C). A baixa resolução do gel e o efeito de “arraste” podem ser atribuídos à presença dos polissacarídeos.

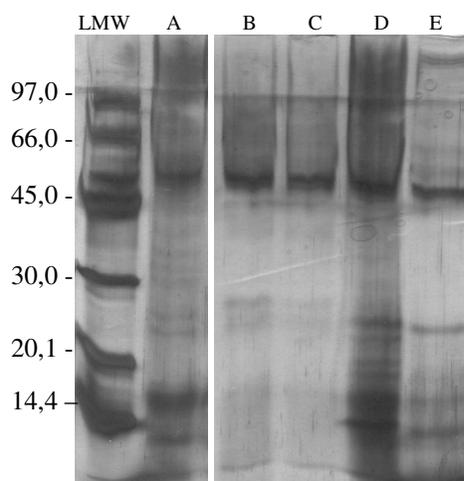


Figura 4.2. SDS-PAGE revelado com nitrato de prata, onde LMW: padrão de baixa massa molecular (GE Healthcare), A) extrato enzimático, B) precipitado com acetona, C) precipitado com etanol, D) ultrafiltração em dispositivo Amicon®, E) concentrado com sulfato de amônio.

Considerando a praticidade e o tempo de execução da etapa de concentração da enzima, o método escolhido para dar continuidade aos estudos de purificação foi o de ultrafiltração.

4.2.2.2 Purificação das enzimas

A partir dos testes realizados com o *HiTrap IEX Selection Kit* (GE Healthcare), determinou-se que a resina ideal para a purificação da xilanase seria uma trocadora de ânions (Q-Sepharose). Ao aumentar a escala, a elevada presença de polissacarídeos no precipitado elevou a viscosidade da amostra, pressurizando o sistema, por isso, optou-se por utilizar a resina DEAE-Streamline. E, como a recuperação da enzima foi inferior a 50% para os métodos de concentração testados (Tabela 4.3), eliminou-se esta etapa e o sobrenadante do caldo fermentativo passou a ser injetado diretamente no sistema de FPLC.

Após testes de adsorção, definiu-se tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) como fase móvel e gradiente de NaCl de 0 a 1 M (Figura 4.3). Nas diferentes condições de gradiente testadas, a resina DEAE-Streamline não demonstrou ser suficiente para purificar a enzima.

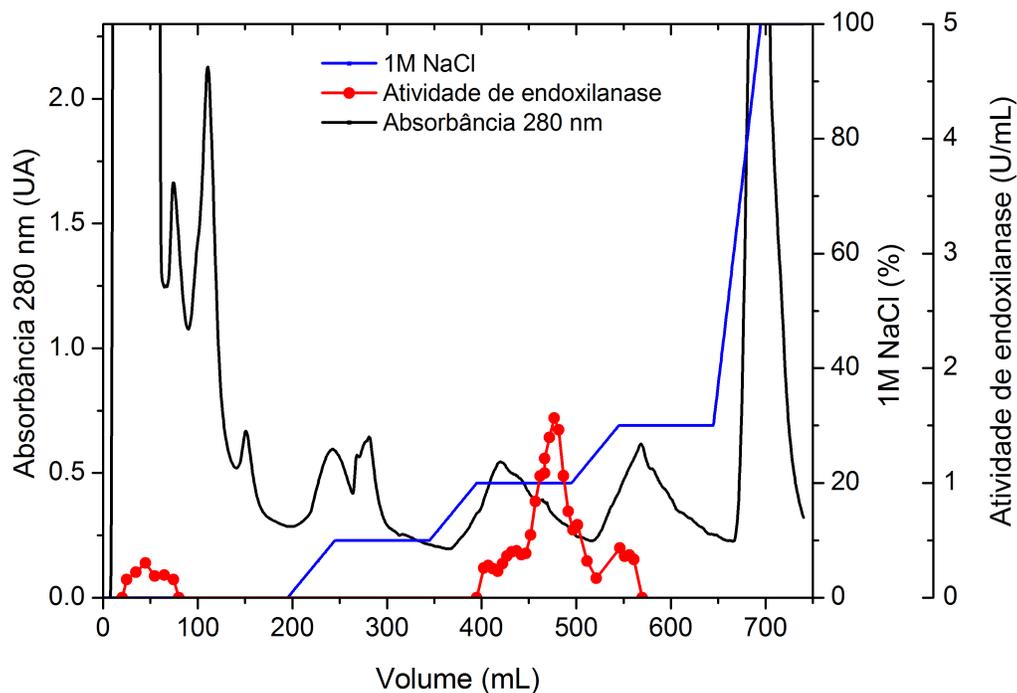


Figura 4.3. Cromatografia de troca iônica DEAE-Streamline.

Pela análise da Figura 4.3, percebe-se dois picos de atividade enzimática, um em 0,2 M NaCl e outro em 0,3 M NaCl. Após análise das frações em SDS-PAGE (dados não apresentados), aparentemente trata-se da mesma enzima que pode ter se desprendido em diferentes forças iônicas devido à interferência do polissacarídeo. Por isso, a etapa de purificação a 0,2 M tornou-se desnecessária e não foi realizada nas purificações seguintes. Diferentemente do que foi descrito para o *Cryptococcus flavus*, que possui pelo menos três xilanases (PARACHIN *et al.*, 2009), o *C. flavescens* apresentou apenas uma banda correspondente a xilanase em zimograma (não apresentado).

Como as bandas de proteínas apresentadas na eletroforese (SDS-PAGE, Figura 4.4-G) demonstraram boa separação, optou-se por incluir uma etapa de permeação em gel (Figura 4.5) em tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), acrescido de 0,15 M NaCl para aumentar a força iônica, evitando a interação com o leito.

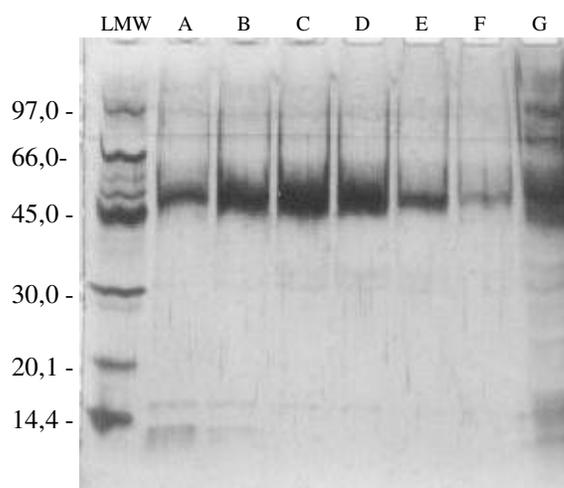


Figura 4.4. SDS-PAGE revelado com nitrato de prata, onde LMW: padrão de baixa massa molecular (GE Healthcare); A-F: frações ativas GPC; G: injeção GPC 1:10.

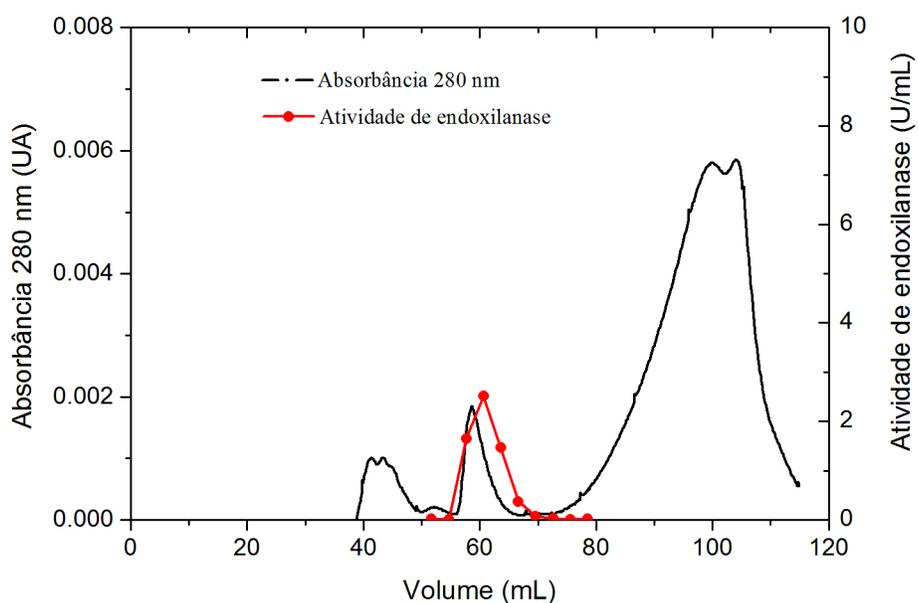


Figura 4.5. Cromatografia por permeação em gel (GPC) Superdex75.

De acordo com a Figura 4.5, o cromatograma apresentou um único pico de atividade enzimática, em torno de 60 mL de corrida. Antes das frações serem unidas e dialisadas, a pureza de cada uma delas foi verificada em SDS-PAGE (Figura 4.4, colunas A-F). Como apresentado, a coloração com nitrato de prata revelou uma única banda para cada fração ativa. Portanto, a utilização das cromatografias de troca iônica e permeação em gel

mostraram-se suficientes para purificar a enzima. E, como pode ser estimado pela eletroforese, a xilanase purificada possui em torno de 48 kDa, semelhante a glicosil hidrolase da família 10 (GH10) produzida por *Cryptococcus albidus* (MOROSOLI *et al.*, 1986) e outras xilanases de *Cryptococcus* (PETRESCU *et al.*, 2000) que possuem 43-45 kDa.

O cálculo da recuperação da enzima, em cada etapa de purificação, pode ser visualizado na Tabela 4.4. Devido à limitação de cada coluna e a fim de aumentar o volume final de enzima purificada, as etapas cromatográficas foram realizadas três vezes distintas e depois unidas para etapas seguintes. Além disso, o processo de ultrafiltração da enzima semipurificada foi testado utilizando pressões de 1 ou 2 MPa, visando aumentar o fluxo e diminuir o tempo de residência da enzima na célula de filtração. Verificou-se que tanto a enzima quanto a membrana, apresentaram um comportamento favorável ao aumento da pressão no sistema. Desta forma, a pressão de 2 MPa foi escolhida para esta etapa de concentração da enzima.

Tabela 4.4. Concentração, atividade, volume, atividade total e recuperação para o processo de purificação da enzima xilanase .

Etapa de purificação	Volume (mL)	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	AE (U/mg)	FP	R (%)
Extrato enzimático	150,00	171,25±2,64	336,91±12,55	0,51	1,0	100,0
DEAE Streamline (3x50 mL)	197,17	161,23±4,06	30,83±1,25	5,23	10,3	94,2
Ultrafiltração (2 MPa)	7,94	134,05±6,02	4,86±0,10	27,58	54,3	78,3
Injeção GPC (3x2 mL)	6,00	101,29±4,55	3,67±0,07	27,58	54,3	59,2
Frações ativas GPC (3x)	45,00	76,99±3,07	1,10±0,03	70,07	137,9	45,0

Abreviações: AE: atividade específica, FP: fator de purificação, R: recuperação

Conforme apresentado na Tabela 4.4, após o processo de purificação, foi possível recuperar 45,0% da atividade enzimática total inicial. E, como se pode perceber, 19,1% da atividade inicial é perdida devido aos quase 2 mL de enzima concentrada que foram utilizados para análise ou ficaram no volume morto do “loop” do GPC. Otimizando esta etapa, pode-se aumentar a recuperação da enzima, considerando que no GPC ela perdeu 24,4% de atividade, em relação à atividade total injetada.

4.2.3 Caracterização da enzima purificada

Caracterizou-se a enzima purificada quanto aos perfis de pH e temperatura, estabilidade em relação ao pH, estabilidade térmica, especificidade pelo substrato e efeito da concentração de substrato.

4.2.3.1 Perfil de temperatura e pH

A matriz dos ensaios e as respostas obtidas para cada condição estão representadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Matriz do DCCR e atividade enzimática.

Ensaio	Valores reais		Valores codificados		Atividade (U/mL)
	T (°C)	pH	T	pH	
1	55	3,8	-1	-1	2,07±0,23
2	75	3,8	1	-1	0,14±0,06
3	55	5,8	-1	1	2,17±0,30
4	75	5,8	1	1	4,32±nd
5	50	4,8	-1,41	0	2,37±0,29
6	80	4,8	1,41	0	4,38±0,09
7	65	3,4	0	-1,41	1,42±0,04
8	65	6,2	0	1,41	3,53±0,12
9	65	4,8	0	0	3,10±0,28
10	65	4,8	0	0	3,41±0,15
11	65	4,8	0	0	3,40±0,19

Apesar de o planejamento mostrar reprodutibilidade dos ensaios na condição do ponto central (3,30±0,24 U/mL), a análise dos coeficientes de regressão mostrou que os termos linear e quadrático para temperatura não são significativos a 90% de confiança ($p < 0,10$), como pode ser visto na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Coeficientes de regressão do DCCR para a atividade de endoxilanase ($R^2=0,86$).

	Efeitos	Erro padrão	t (5)	p-valor
Média	3,303	0,389	8,498	0,000
T (L)	0,382	0,238	1,605	0,169
T (Q)	-0,154	0,283	-0,536	0,615
pH (L)	0,909	0,238	3,820	0,012
pH (Q)	-0,601	0,283	-2,120	0,088
T x pH	1,021	0,337	3,032	0,029

Ignorando os parâmetros não significativos, a variação explicada pelo modelo cai para $R^2 = 0,78$, diminuindo significativamente a qualidade do ajuste. Uma vez que o ajuste foi baixo e que a temperatura não foi estatisticamente significativa, apesar de ser considerada como um fator importante na atividade enzimática, optou-se por não realizar a análise de variância para este planejamento.

Em vista disso, foi realizado um novo planejamento alterando as faixas de temperatura, já que as maiores respostas (atividades) no planejamento anterior foram obtidas na região do ponto axial de maior temperatura. A matriz dos ensaios e as respostas obtidas para cada condição estão representadas na Tabela 4.7. Verificou-se através dos dados dessa tabela que os valores de atividade enzimática variaram de 0,26 a 4,71 U/mL, mostrando a sensibilidade da enzima à variação de temperatura e pH. Assim como outras proteínas, as enzimas possuem muitos grupos ionizáveis de forma que a mudança de pH pode alterar sua conformação, sua capacidade de união com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o centro ativo (WISEMAN, 1991). No caso da xilanase produzida pelo LEB-AY₁₀, esta se mostrou pouco ativa para os menores valores de pH testados, quando a temperatura foi igual ou superior a 70 °C.

Tabela 4.7. Matriz do DCCR e atividade enzimática.

Ensaio	Valores reais		Valores codificados		Atividade (U/mL)
	T (°C)	pH	T	pH	
1	60	3,8	-1	-1	2,31
2	80	3,8	1	-1	0,26
3	60	5,8	-1	1	3,27
4	80	5,8	1	1	3,37
5	55,9	4,8	-1,41	0	2,06
6	84,1	4,8	1,41	0	3,15
7	70	3,4	0	-1,41	0,09
8	70	6,2	0	1,41	3,85
9	70	4,8	0	0	4,71
10	70	4,8	0	0	4,49
11	70	4,8	0	0	4,47

A reprodutibilidade dos ensaios na condição do ponto central ($4,56 \pm 0,14$ U/mL) permitiu que fossem analisados os efeitos das variáveis. Por ser um processo envolvendo enzimas, a análise foi feita em nível de 90% de confiança. O termo linear da temperatura (T) e o termo de interação (pH x temperatura) não foram estatisticamente significativos. Porém, optou-se por manter o termo de interação e retirar do modelo apenas o termo linear de temperatura. Os coeficientes de regressão podem ser visualizados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Coeficientes de regressão estatisticamente significativos a $p < 0,10$.

	Coef. Regressão	Erro padrão	t (6)	p-valor
Média	4,558	0,314	14,490	< 0,001
T (Q)	-0,973	0,229	-4,245	0,005
pH (L)	1,172	0,193	6,082	0,001
pH (Q)	-1,291	0,229	-5,629	0,001
T x pH	0,537	0,272	1,970	0,096

Considerando os parâmetros estatisticamente significativos a $p < 0,10$, para o modelo com as variáveis codificadas, obtemos a Equação 4.13, sendo T o valor codificado da temperatura e pH o valor codificado do pH:

$$\text{Atividade} = 4,558 - 0,973 T^2 + 1,172 \text{ pH} - 1,291 \text{ pH}^2 + 0,537 T.\text{pH} \quad (4.13)$$

Verificou-se a validade dos resultados através da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Análise de Variância para a xilanase.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}
Regressão	23,72	4	5,93	19,97
Resíduos	1,78	6	0,30	-
Total	25,50	10	-	-

$F_{4;6;0,10} = 3,18$; variação explicada (R^2) = 93,02%

Como a variação explicada pelo modelo é de 93,02% e o $F_{\text{calculado}}$ é 6,28 vezes maior que o F_{tabelado} , considera-se que o modelo é aceitável tornando possível a construção da superfície de resposta (Figura 4.6a).

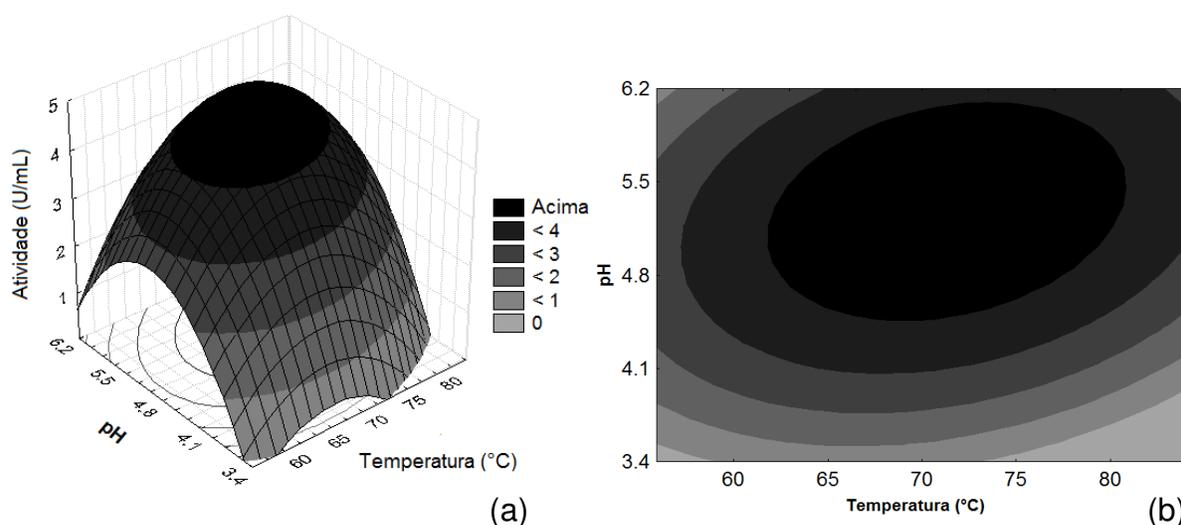


Figura 4.6. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a atividade xilanólítica em função do pH e temperatura.

De acordo com a superfície de resposta (Figura 4.6a) e com a curva de contorno (Figura 4.6b), o pH ótimo para a atividade de xilanase está na faixa de valores de 4,5 a 6,0. Em pH 4,8, a temperatura ótima variou de 62,5°C a 77,5°C. E, em pH 5,3, a temperatura ótima foi entre 62,5°C e 81°C.

A relação entre os valores previstos a partir do modelo e os valores observados experimentalmente está apresentada Figura 4.7a. A qualidade do modelo pode ser vista pelo ajuste dos pontos à reta.

Considerando que as condições ótimas de atividade para enzima não-purificada foram 80°C e pH 4,8 (LOPES *et al.*, 2011), a validação dos resultados foi realizada fixando o pH em 4,8 (Figura 4.7b).

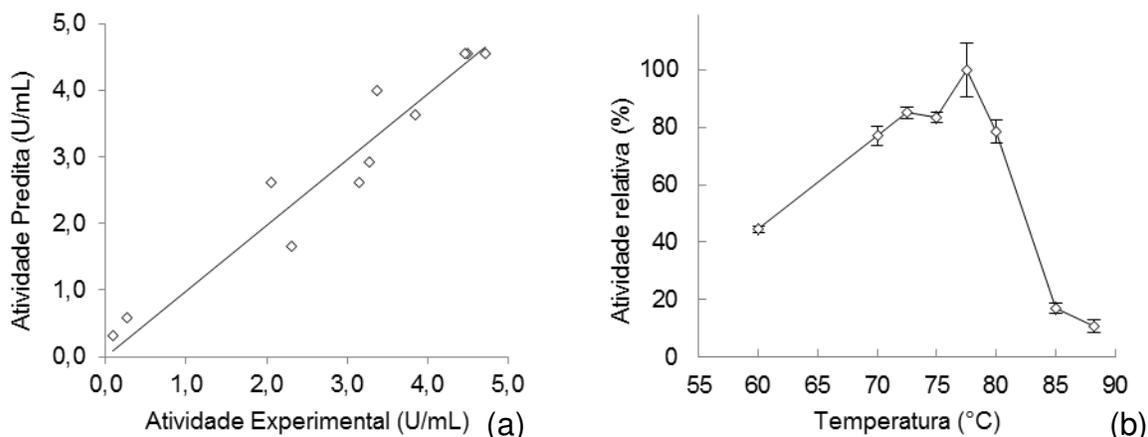


Figura 4.7. Valores previstos de atividade em função dos valores experimentais (a) e atividade xilanolítica em função da temperatura em pH 4,8 (b).

O modelo previsto, neste caso, não ajusta exatamente a interação entre pH e temperatura para esta xilanase, mas fornece uma aproximação sobre a região de condições ideais e, portanto, reduziu o número de ensaios que seriam necessárias para esse objetivo. Pela validação do modelo (Figura 4.7b), não há diferença significativa (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$) entre as atividades de 70, 72,5, 75 e 80°C, mas há uma diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em 77,5°C. Este pico de atividade não foi previsto pelo modelo, provavelmente devido à elevada sensibilidade desta enzima para esta pequena variação de temperatura. Possivelmente, uma pequena mudança nos valores dos níveis escolhidos poderia melhorar a precisão do modelo.

4.2.3.2 Estabilidade a 72°C em função do pH

Para a estabilidade em relação ao pH, variou-se este parâmetro de 3,5 a 6,0 em de tampão de citrato de sódio 50 mM ou de 6,0 a 8,0 em tampão fosfato de sódio 50 mM, e a atividade residual foi medida após 30 min de incubação a 72°C (Figura 4.8).

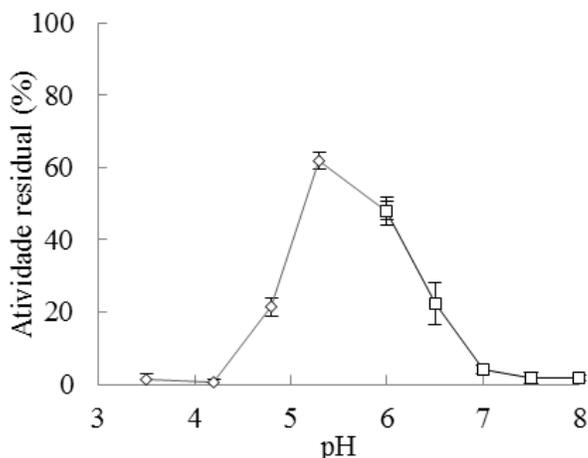


Figura 4.8. Estabilidade em relação ao pH a 72°C após 30 minutos de incubação em tampão citrato e tampão fosfato.

De acordo com a Figura 4.8, a enzima purificada possui maior estabilidade em pH próximo a 5,3, uma vez que esta reteve um pouco mais de 60% da atividade inicial nessa condição. Entretanto, o extrato bruto enzimático do micro-organismo LEB-AY₁₀ apresentou-se estável no intervalo de valores de pH entre 3,5 e 6,0 considerando a mesma temperatura de 72°C (LOPES *et al.*, 2011).

4.2.3.3 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da xilanase purificada foi estudada através da determinação da meia-vida da enzima. Para isso, a enzima foi incubada em tampão citrato de sódio pH 4,8 ou pH 5,3, e variando a temperatura de 60 a 77,5°C. Os pontos experimentais foram ajustados à equação de Arrhenius (Equação 4.3) e sua linearização (Equação 4.4) foi utilizada para calcular a energia de inativação, de acordo com a Figura 4.9.

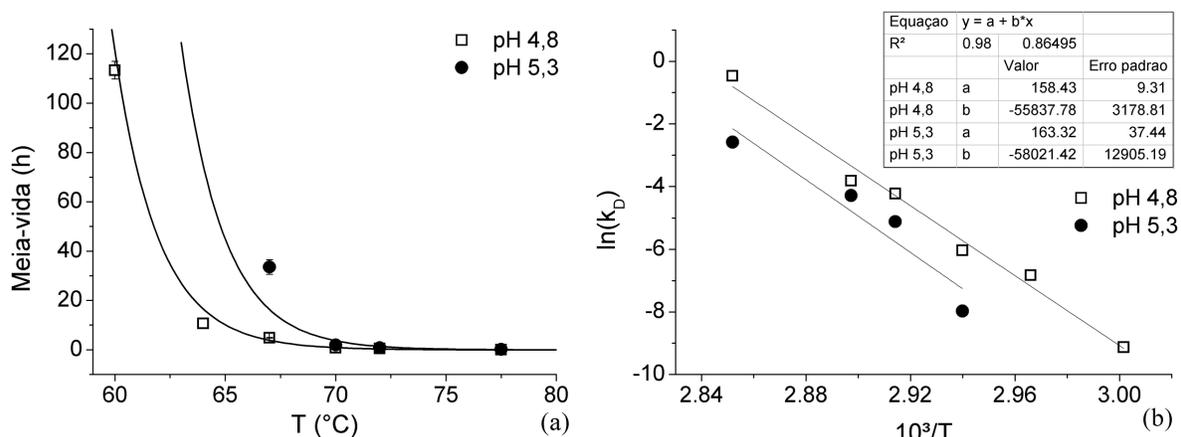


Figura 4.9. Estabilidade térmica (a), em termos de meia-vida, a pH 4,8 e 5,3, ajustadas à equação de Arrhenius. Linearização da equação de Arrhenius (b) para calcular a energia de inativação enzimática.

Após determinação da energia de inativação, foram calculados os parâmetros termodinâmicos para a enzima purificada, conforme apresetados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Constante de inativação, meia-vida, energia livre de Gibb's, entalpia e entropia de inativação da enzima para cada temperatura em pH 4,8 e pH 5,3.

Temperatura (K / °C)	k_d (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	ΔG ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔH ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔS ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)
pH 4,8 ($E_d = 463,99 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)					
333,15 / 60	0,00011	6375,63	118,52	461,22	1028,66
337,15 / 64	0,00108	643,66	113,55	461,18	1031,10
340,15 / 67	0,00239	290,36	112,33	461,16	1025,51
343,15 / 70	0,01460	47,47	108,18	461,13	1028,57
345,15 / 72	0,02206	31,42	107,64	461,12	1024,12
350,65 / 77,5	0,62790	1,10	99,64	461,07	1030,74
pH 5,3 ($E_d = 482,39 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)					
340,15 / 67	0,00034	2014,28	117,81	461,16	1009,41
343,15 / 70	0,00597	116,06	110,73	461,13	1021,14
345,15 / 72	0,01379	50,25	108,99	461,12	1020,21
350,65 / 77,5	0,07564	9,16	105,81	461,07	1013,14

A energia de inativação da enzima é um parâmetro que expressa o quanto de energia é necessário para promover a desnaturação da enzima nas condições avaliadas (AGUIAR-OLIVEIRA; MAUGERI, 2011). Para a enzima purificada, a E_d em pH 4,8 ($463,99 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) é inferior que em pH 5,3 ($482,39 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), sendo portanto, mais estável em pH 5,3 como pode ser verificado pela comparação entre as meia-vidas. Geralmente, a energia de inativação varia entre 40 a 130 kcal/mol (WISEMAN, 1991) (correspondente a 167,43 a 544.15 kJ/mol), mostrando que a xilanase LEB-AY₁₀ está entre as enzimas mais estáveis.

Como demonstrado, em pH 5,3, as meias-vidas foram 9,16 minutos a 77,5°C (temperatura ótima), 50,25 min a 72°C e 1,93 h a 70°C, enquanto que as meias-vidas da enzima não-purificada (LOPES *et al.*, 2011) foram de 9 minutos a 80°C (temperatura ótima), 7,8 h a 72°C e 11,21 h a 70°C, em pH 5,3. A perda da termo-estabilidade após a purificação foi também relatada em estudos de purificação de xilanase de *Thermotoga* sp. FjSS3-B (SIMPSON *et al.*, 1991). A xilanase de extrato bruto concentrado (sobrenadante) de *Thermotoga* apresentou meia-vida superior a 20 min a 100°C, enquanto que a enzima purificada obteve meia-vidas de 90 min a 95°C e 8 minutos a 100°C. De acordo com o autor, a redução da termo-estabilidade da enzima purificada sugeriu que a xilanase poderia ser estabilizada por fatores presentes no extrato bruto ou por elevadas concentrações de proteína.

Ajustando os pontos experimentais à Equação 4.5 (Figura 4.9a), é possível extrapolar o gráfico de Arrhenius e estimar a meia-vida da enzima em diferentes temperaturas. Considerando que a enzima mantenha esse mesmo comportamento a 50°C, calcula-se que ela apresente meia-vida de 27 meses em pH 4,8 e 179 meses em pH 5,3, na ausência de proteases. Entretanto, essa estimativa de Arrhenius pode conduzir a um erro grande considerando que muitas enzimas têm mais de um comportamento para o ajuste de Arrhenius, dependendo da faixa de temperatura. Além do mais, o ajuste obtido para o pH 5,3 foi baixo ($R^2 = 0,86$), necessitando de mais pontos para melhorar a estimativa.

Analisando a tabela 4.10, verifica-se que a energia livre de Gibb's diminui com o aumento da temperatura, sendo esse decréscimo ainda mais sutil para a entalpia. Em pH 5,3 a entropia de inativação da enzima purificada passa a decrescer com o aumento da temperatura a partir de 70°C. Já a enzima não purificada, apresentou esse mesmo comportamento a partir dos 75°C, de acordo com Motta (2008). Segundo este autor, essa temperatura foi considerada crítica para a destruição da enzima, já que o aumento da

entropia está associado à exposição das cadeias hidrofóbicas durante o desdobramento das proteínas.

4.2.3.4 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram estimados através do efeito da concentração do substrato. Os resultados de atividade obtidos para as diferentes concentrações de substrato estão apresentados na Figura 4.10. Como não houve inibição pelo substrato, dentro da faixa de valores estudados, concluiu-se que a cinética enzimática segue o modelo proposto por Michaelis-Menten. Portanto, três métodos de regressão linear e um método de ajuste não-linear foram utilizados para determinar as constantes cinéticas, como apresentado na Tabela 4.11.

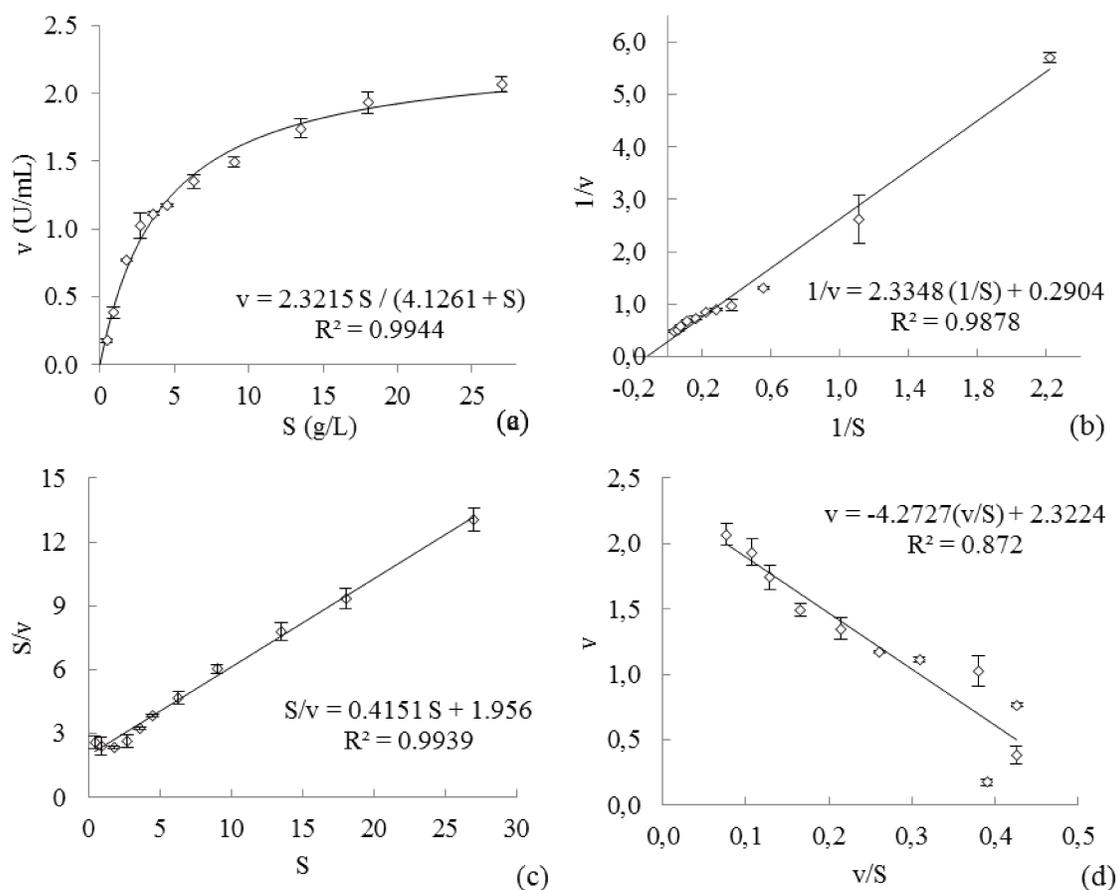


Figura 4.10. Efeito da concentração de substrato na atividade de xilanase: pontos experimentais e ajuste não-linear (a), e gráficos de Lineweaver-Burk (b), Hanes-Woolf (c) e Eadie-Hofstee (d).

Tabela 4.11. Parâmetros cinéticos estimados por quatro metodologias baseados no modelo de Michaelis-Menten.

	K_m (g/L)	$v_{m\acute{a}x}$ (U/mL)	R^2
Não-linear	4,13	2,32	99,44
Lineweaver-Burk	8,04	3,44	98,78
Hanes-Woolf	4,71	2,41	99,39
Eadie-Hofstee	4,27	2,32	87,20

O melhor ajuste ($R^2 = 99,44\%$) foi realizado por meio de regressão não-linear da equação de Michaelis-Menten (Figura 4.10a) ajustada aos pontos experimentais, utilizando o software Statistica[®] 10.0 (StatSoft, EUA), os parâmetros K_m e $v_{m\acute{a}x}$ calculados foram 4,13 g/L e 2,32 L/mL, respectivamente.

A maior diferença nos parâmetros estimados pelo método de duplo recíproco de Lineweaver-Burk (Tabela 4.11 e Figura 4.10b) sugere que este modelo pode induzir a erros, pois destaca os pontos de baixas concentrações de substrato, os quais são menos precisos. A determinação de K_m e $v_{m\acute{a}x}$ usando gráfico de Hanes-Woolf (Figura 4.10c) é mais precisa do que aquela obtida utilizando o ajuste de duplo recíproco. Enquanto que o método proposto por Eadie-Hofstee (Figura 4.10d) é mais confiável que os dois métodos anteriores de regressão linear. Apesar de observar que o modelo de Eadie-Hofstee não tem um real ajuste linear, as constantes determinadas por este método são mais próximas àquelas obtidas pela predição do método de Michaelis-Menten (RITCHIE; PRVAN, 1996). As diferenças de predição podem ser melhor visualizadas através da Figura 4.11.

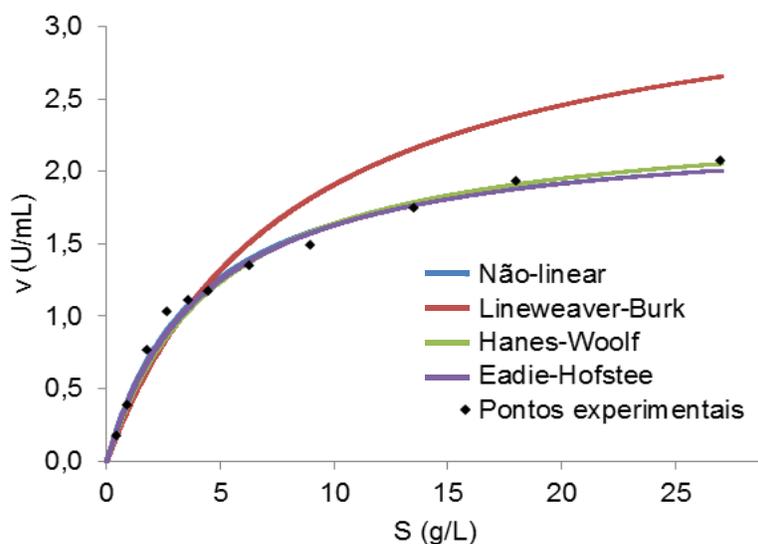


Figura 4.11. Pontos experimentais e ajustes da equação de Michaelis-Menten gerados através das constantes preditas por cada modelo.

A purificação da enzima reduziu em quatro vezes a afinidade pelo substrato (xilana de bétula) da xilanase produzida por LEB-AY₁₀, aumentando K_m de 0,97 g/L (enzima não-purificada (LOPES *et al.*, 2011)) a 4,12 g/L (enzima purificada, presente trabalho). Como descrito anteriormente, isto pode ser devido ao lote da xilana utilizada como substrato neste trabalho ter sido diferente ao utilizado por Lopes *et al.* (2011). Além disso, o aumento do K_m pode também ser devido à perda de algum cofator que estava presente na solução de enzima não-purificada ou a presença de inibidores provenientes da fonte de xilana, considerando que elas pertenciam a diferentes lotes e que pode haver diferenças nas extrações das mesmas.

4.2.3.5 Especificidade substrato

A afinidade por alguns substratos pela enzima purificada de *C. flavescens* LEB-AY₁₀ estão apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12. Atividade da enzima purificada em diferentes substratos.

Substrato	Atividade (U/mg)	Atividade relativa (%)
xilana de bétula	102,67±1,83 ^a	100,00
xilana de faia (lote A)	128,23±0,64 ^b	124,88
xilana de faia (lote B)	119,45±2,42 ^c	116,34
4-nitrofenil β-D-xilopiranosídeo (pNPX)	0,02±0,00	0,02
Carboximetilcelulose (CMC)	0,83±0,50	0,81
Papel filtro (Whatman nº 1)	ND	ND

Triplicata das médias seguidas por \pm desvio padrão e diferentes letras sobrescritas ^{a,b,c} indicam que a atividade enzimática difere significativamente entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) para diferentes xilanas. ND: não detectada

Pela análise de variância e teste de Tukey, a partir de três repetições, ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$), há diferença significativa entre a atividade da xilanase em xilana de bétula para xilana de faia, sugerindo que esta xilanase pode ser mais específica contra o substrato xilana de faia. A xilanase termo-estável purificada de *Laetiporus sulphureus* também apresentou maior atividade em xilana de faia do que em bétula (LEE *et al.*, 2009), talvez porque xilana de faia possua principalmente ligações 1,4- entre xiloses enquanto xilanas de bétula apresentem também algumas ligações 2,4- (LEE *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2000).

Há também diferença entre os mesmos tipos de substrato a partir de lotes distintos, sendo que esta variação é visual, tanto no substrato em pó quanto na solução preparada a 1%, mudando a viscosidade, cor e turbidez (Figura 4.12). A variação de lote para lote de materiais lignocelulósicos foi previamente descrita por König *et al.* (2002), que estudou a atividade enzimática em vários lotes de arabinoxilana e β-glucana, obtendo-se variação de até 15%.

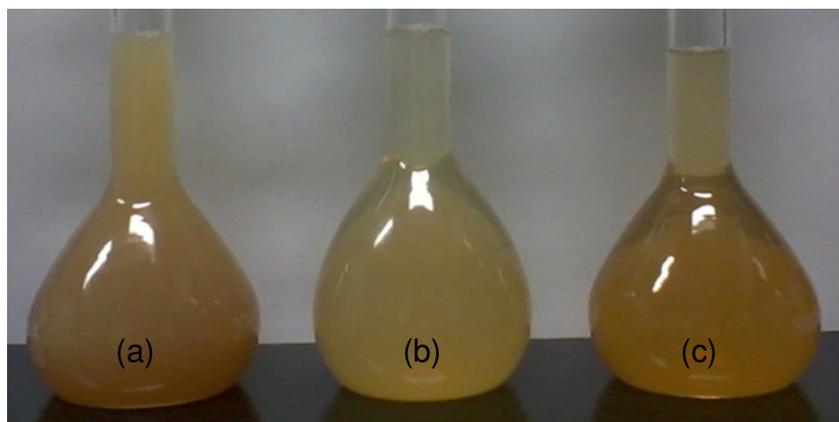


Figura 4.12. Soluções de 1% de xilanas: (a) xilana de bétula, (b) xilana de faia (lote A) e (c) xilana de faia (lote B).

A xilanase purificada produzida pelo micro-organismo LEB-AY₁₀ é levemente ativa contra pNPX (0,02 U/mg). Embora nenhuma atividade tenha sido detectada utilizando papel de filtro em 1 hora de incubação, a xilanase mostrou baixa atividade de celulase em CMC (0,83 U/mg). Considerando-se que as xilanases pertencentes à família GH10 têm maior massa molecular e apresentam uma maior versatilidade catalítica e especificidade de substrato mais baixa do que as pertencentes a GH11 (BIELY *et al.*, 1997; FAULDS *et al.*, 2006), a enzima utilizada neste estudo pode pertencer à família GH10. Entretanto, a análise adicional da estrutura primária e dos domínios catalíticos é necessária para confirmar esta classificação (COLLINS *et al.*, 2005).

Devido a estabilidade em baixas faixas de pH e a baixa especificidade por xilanas, essa enzima pode não ser aplicável em processos de clareamento de papel e polpa, os quais requerem xilanases estáveis em pH alcalinos e que não possuam atividade de celulases (NAGAR *et al.*, 2010). Por outro lado, essa enzima pode ser utilizada para o tratamento de resíduos ou para conversão de biomassa lignocelulósica, mas outros estudos ainda são necessários para definir as aplicações da xilanase de *C. flavescens* LEB-AY₁₀.

4.2.3.6 Produtos da hidrólise

Os xilo-oligossacarídeos (XOS) são denominados de acordo com o número de resíduos de xilose envolvidos na sua formação. Geralmente, os XOS possuem entre 2 e 10 resíduos de xilose e, portanto, são denominados xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentose (X5) e assim por diante (AACHARY; PRAPULLA, 2011). Apesar da

xilobiose não ser considerada oligossacarídeo o qual geralmente possui um grau de polimerização maior que 2, para fins alimentícios, xilobiose é considerada XOS (VÁZQUEZ *et al.*, 2000) e, portanto, será considerada também neste estudo.

Os XOS resultantes de 2 h de hidrólise da xilana de faia foram quantificados e caracterizados por cromatografia de íons, conforme Figura 4.13.

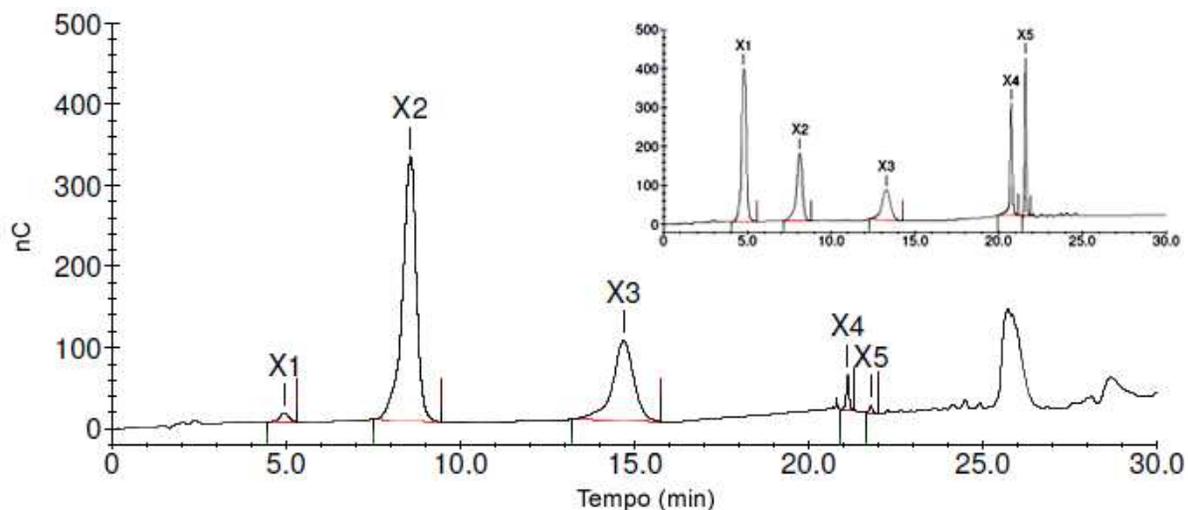


Figura 4.13. Análise dos produtos após 1 h de hidrólise (diluídos 10 vezes) e, em destaque, exemplo de cromatograma mostrando a separação dos padrões de xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4) e xilopentose (X5), cada um a 50 mg/L.

Pela Figura 4.13, assim como nos demais cromatogramas (não apresentados), é possível verificar que ainda há uma considerável quantidade de xilana e oligossacarídeos de cadeia mais longa, que podem ser despolimerizados ao aumentar o tempo de hidrólise. Para Bragatto *et al.* (2013), de 5 a 8 horas de incubação foram necessárias para atingir a produção de XOS mais elevada (utilizando bagaço de cana-de-açúcar), enquanto outros autores determinaram que esse período poderia ser de 8 até 24 h.

O rendimento da produção de XOS, foi calculado para cada 30 min de hidrólise, durante 2 h, conforme demonstrado na Figura 4.14.

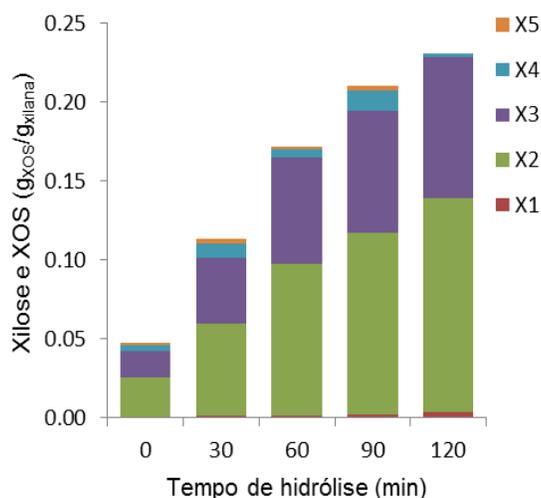


Figura 4.14. Produtos da hidrólise da enzima purificada em até 2 h de incubação a 70°C.

De acordo com a Figura 4.14, em duas horas de hidrólise, não foi detectada a presença de X5 (< 20 mg/L) e a conversão de xilana em xilose foi de apenas 0,27%. Nesse mesmo tempo, a conversão de xilana em XOS (X2 a X4) foi de 17,99%, em comparação com a quantidade inicial. Os principais produtos foram xilobiose e xilotriose, respectivamente, sendo estes os tipos mais frequentes de XOS produzidos a partir de materiais lignocelulósicos (CARVALHO *et al.*, 2013). E esta característica também está de acordo com a dos demais membros da família GH10, uma vez que os XOS produzidos por eles são menores do que aqueles produzidos por xilanases da família GH11 (BIELY *et al.*, 1997; MASLEN *et al.*, 2007).

Geralmente, os XOS comerciais são compostos por oligossacarídeos menores, principalmente por X2 a X4. Além disso, estudos demonstram que micro-organismos probióticos tem preferência por XOS de cadeia curta. Nos estudos de Moura *et al.* (2007), *Lactobacillus brevis* apresentou crescimento preferencial em xilobiose e o aumento no grau de polimerização (para 5 e 6) dos XOS utilizados reduziu nitidamente a sua utilização pelo *Bifidobacterium adolescentis*.

Portanto, em vista dos resultados obtidos, é possível afirmar que a enzima apresentou grande potencial na produção de XOS, uma vez que X2 e X3 são de grande interesse industrial. Além disso, de acordo com Teng *et al.* (2010), xilanases termoestáveis são mais interessantes para produção de XOS do que xilanases mesófilicas, uma vez que o seu uso pode reduzir o tempo de hidrólise devido ao aumento da temperatura.

Adicionalmente, a possibilidade de operar a altas temperaturas é um recurso tecnológico interessante, pois diminui a probabilidade de ocorrerem contaminações por micro-organismos indesejáveis.

Contudo, esse estudo serviu apenas para verificar o padrão de hidrólise dessa enzima e, portanto, o estudo das condições e do tempo de hidrólise, incluindo o uso de resíduos agrícolas, torna-se necessário para otimizar o processos de produção desses prebióticos.

4.3 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO

A xilanase produzida pelo micro-organismo *Cryptococcus flavescens* LEB-AY₁₀ foi purificada em duas etapas cromatográficas, troca iônica seguida de permeação em gel, com fator de purificação de 137,9 vezes e com recuperação de 45% da atividade inicial. Apresentou massa molecular aparente de 48 kDa, atividade ótima a 77,5°C, na faixa de pH entre 4,5 e 6,0, e maior estabilidade em valores de pH próximo a 5,3. Na temperatura ótima e pH 5,3, a meia-vida foi de 9,2 minutos, podendo ser aumentada para 1,9 h se a temperatura for reduzida para 70°C. Os parâmetros cinéticos K_m e v_{max} para esse substrato foram 4,13 g/L e 2,32 U/mL, respectivamente. A xilanase purificada apresentou baixa especificidade por xilana, apresentando atividade em pNPX (0,02 U/mg) e também mostrou um pouco de atividade de celulase em CMC (0,99 U/mg). Os produtos de hidrólise correspondem principalmente a xilobiose e xilotriose, demonstrando o seu potencial para produção de XOS. De acordo com as características analisadas, a xilanase possivelmente pertença à família GH10. Estudos adicionais, como estrutura da proteína, são necessários para confirmar essa classificação e foram realizados nos próximos capítulos.

4.4 REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS

AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 1, p. 2–16, 2011.

- AGUIAR-OLIVEIRA, E. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* sp. e aplicação na produção de frutooligossacarídeos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2007.
- AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 03, p. 363–372, 2011.
- BASARAN, P.; OZCAN, M. Characterization of beta-xylosidase enzyme from a *Pichia stipitis* mutant. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 38–43, 2008.
- BIELY, P.; VRSANSKÁ, M.; TENKANEN, M.; KLUEPFEL, D. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n. 1-3, p. 151–166, 1997.
- BRAGATTO, J.; SEGATO, F.; SQUINA, F. M. Production of xylooligosaccharides (XOS) from delignified sugarcane bagasse by peroxide-HAc process using recombinant xylanase from *Bacillus subtilis*. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 123–129, 2013.
- CARVALHO, A. F. A.; NETO, P. D. O.; SILVA, D. F. DA; PASTORE, G. M. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 75–85, 2013.
- CARVALHO, A. L.; MAUGERI, F.; SILVA, V.; HERNÁNDEZ, A.; PALACIO, L.; PRADANOS, P. AFM analysis of the surface of nanoporous membranes: application to the nanofiltration of potassium clavulanate. **Journal of Materials Science**, v. 46, n. 10, p. 3356–3369, 2011.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3–23, 2005.
- FAULDS, C. B.; MANDALARI, G.; LO CURTO, R. B.; BISIGNANO, G.; CHRISTAKOPOULOS, P.; WALDRON, K.W. Synergy between xylanases from glycoside hydrolase family 10 and family 11 and a feruloyl esterase in the release of phenolic acids from cereal arabinoxylan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 5, p. 622–629, 2006.
- HANES, C. S. Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. **The Biochemical Journal**, v. 26, n. 5, p. 1406–1421, 1932.
- HOFSTEE, B. H. J. Non-inverted versus inverted plots in enzyme kinetics. **Nature**, v. 184, n. 4695, p. 1296–1298, 1959.
- JEANES, A.; PITTSLEY, J. E.; WATSON, P. R. Extracellular polysaccharide produced from glucose by *Cryptococcus laurentii* var. *flavescens* NRRL Y-1401: chemical and physical characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 8, p. 2775–2787, 1964.
- KÖNIG, J.; GRASSER, R.; PIKOR, H.; VOGEL, K. Determination of xylanase, beta-glucanase, and cellulase activity. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 374, n. 1, p. 80–87, 2002.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LEE, J.-W.; PARK, J.-Y.; KWON, M.; CHOI, I.-G. Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 1, p. 33–37, 2009.
- LI, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J. S.; ERIKSSON, K. E. L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 89–94, 2000.
- LINWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, n. 3, p. 658–666, 1934.
- LOPES, F.; MOTTA, F.; ANDRADE, C.C.P.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI-FILHO, F. Thermo-stable xylanases from non conventional yeasts. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 03, n. 03, p. 36–42, 2011.
- LOPES, F. P. **Otimização da produção de xilanase por levedura silvestre**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, p. 265–275, 1951.
- MASLEN, S. L.; GOUBET, F.; ADAM, A.; DUPREE, P.; STEPHENS, E. Structure elucidation of arabinoxylan isomers by normal phase HPLC-MALDI-TOF/TOF-MS/MS. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 5, p. 724–35, 2007.
- MOROSOLI, R.; ROY, C.; YAGUCHI, M. Isolation and partial primary sequence of a xylanase from the yeast *Cryptococcus albidus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 870, n. 3, p. 473–478, 1986.
- MOTTA, F. B. **Triagem, seleção produção e caracterização da enzima xilanase a partir de leveduras silvestres**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- MOURA, P.; BARATA, R.; CARVALHEIRO, F.; GÍRIO, F.; LOUREIRO-DIAS, M.C.; ESTEVES, M.P. In vitro fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 6, p. 963–972, 2007.
- NAGAR, S.; GUPTA, V. K.; KUMAR, D.; KUMAR, L.; KUHAD, R. C. Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 71–83, 2010.
- PARACHIN, N. S.; SIQUEIRA, S.; FARIA, F. P. DE; TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. DE. Xylanases from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of CfXYN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1-3, p. 52–57, 2009.

PAVLOVA, K.; RUSINOVA-VIDEVA, S.; KUNCHEVA, M.; GOCHEVA, M.; DIMITROVA, S. Synthesis and characterization of an exopolysaccharide by antarctic yeast strain *Cryptococcus laurentii* AL100. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 1038–1052, 2011.

PETRESCU, I.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; CHESSA, J.-P.; NTAIRIMA, P.; CLAEYSSSENS, M.; DEVREESE, B.; MARINO, G.; GERDAY, C. Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae*. **Extremophiles**, v. 4, n. 3, p. 137–144, 2000.

RITCHIE, R. J.; PRVAN, T. Current statistical methods for estimating the Km and Vmax of Michaelis-Menten kinetics. **Biochemical Education**, v. 24, n. 4, p. 196–206, 1996.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental design and process optimization**. Campinas-SP: Cárita Editora, 2012. 352 p.

SANTOS, A. M. P. **Síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose por inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

SIMPSON, H. D.; HAUFLER, U. R.; DANIEL, R. M. An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga*. **Biochemical Journal**, v. 277, p. 413–417, 1991.

TECHAPUN, C.; POOSARAN, N.; WATANABE, M.; SASAKI, K. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 1327–1340, 2003.

TENG, C.; YAN, Q.; JIANG, Z.; FAN, G.; SHI, B. Production of xylooligosaccharides from the steam explosion liquor of corncobs coupled with enzymatic hydrolysis using a thermostable xylanase. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7679–7682, 2010.

VÁZQUEZ, M.; ALONSO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 387–393, 2000.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnología de los enzimas**. Zaragoza: Acribia, 1991. 444 p.

CAPÍTULO 5

5 Clonagem e sequenciamento do gene *Xyn10Cf*

O objetivo desse capítulo foi identificar o(s) gene(s) responsável (is) pela produção de xilanase pela levedura *Cryptococcus flavescens* LEB-AY₁₀. Para isso, foram apresentadas três estratégias: utilização de *primers* degenerados, identificação de peptídeos por espectrometria de massas e, por último, sequenciamento do genoma da levedura. Um único gene foi identificado e clonado em *Escherichia coli* DH10B. O gene denominado *Xyn10Cf* que codifica essa enzima é formado por 1265 pb e o cDNA por 1035 pb, devido a remoção dos 6 íntrons. O peptídeo sinal predito é composto por 13 aminoácidos e a proteína madura por 331 aminoácidos, tendo sua massa molecular estimada em 37,1 kDa. Considera-se que a xilanase apresente cerca de 11 kDa de glicosilação, uma vez que a proteína purificada possui massa molecular média de 48 kDa, conforme demonstrado no capítulo anterior. Calculou-se o ponto isoelétrico em torno de 4,6. Com base na sequência de nucleotídeos e em estudos anteriores, descritos no Capítulo IV, a proteína foi classificada como membro da família GH10.

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

A determinação do gene responsável pela produção da xilanase produzida pelo *Cryptococcus flavescens* LEB-AY₁₀ foi realizada através de três diferentes estratégias: amplificação com *primers* degenerados baseados em bancos de dados, construção de *primers* degenerados baseados em peptídeos determinados por espectrometria de massas e sequenciamento do genoma da levedura, conforme as metodologias descritas a seguir.

5.1.1 Construção de *primers* degenerados baseado em banco de dados

Primers degenerados são misturas de oligonucleotídeos similares que são utilizados em PCR para amplificar uma sequência de DNA desconhecida a qual é, tipicamente, correspondente a uma região codificadora (cds, “coding sequence”) de gene. Eles são desenhados com base em dados de sequências de genes homólogos já relacionados e já sequenciados (LANG; ORGOGOZO, 2011). Variam na sequência das bases, mas possuem o mesmo número de bases (“degeneradas”). Há muitas ocasiões nas quais o uso de *primers* degenerados pode ser necessário ou desejado, como a procura por um determinado gene utilizando *primers* construídos a partir de uma sequência de aminoácidos quando uma porção limitada da sequência de proteína é conhecida. Também pode ser aplicado quando se busca por uma sequência nova ou não caracterizada e relacionada a uma família conhecida de genes (COMPTON, 1990).

5.1.1.1 Extração de DNA

A levedura foi cultivada em 4 mL de caldo YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose) a 30°C por 18 h sob agitação de 150 rpm. Para a extração do DNA total, as células foram transferidas para tubos de 1,5 mL e centrifugadas a temperatura ambiente durante 4 minutos a 6.000 x g. Foi feita ressuspensão em 200 µL de tampão de lise (2% Triton X-100; 1% SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0), seguido da adição de esferas de vidro e 200 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Após a agitação em vórtex por 2 min e centrifugação por 15 min a 16.000 x g, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado com acetato de sódio 3 M (pH 5,3) e

etanol absoluto gelado, nos volumes correspondentes a, respectivamente, 1/10 e 2 vezes o volume de sobrenadante. O tubo foi mantido a -18°C por uma hora e depois centrifugado por 15 minutos a 4°C e $16000 \times g$. O *pellet* foi lavado com etanol 70% e o tubo foi deixado na bancada por 1 h para evaporação do etanol. O DNA foi ressuscitado com $40 \mu\text{L}$ de água MilliQ, quantificado em NanoDrop e armazenado a -18°C até momento do uso.

5.1.1.2 Primers degenerados

Para amplificar o gene de xilanase do *C. flavescens*, primeiramente, testaram-se os *primers* degenerados propostos por Wang *et al.* (2010) para família GH10: X10-F (5'-CTACGACTGGGAYGTNIBSAAYGA-3') e X10-R (5'-GTGACTCTGGAWRCCIA BNCCRT-3'), ou para família GH11: X11-F (5'-AACTGCTACCTGKCNITNTAYGGNTGG-3') e X11-R (5'-CCGCACGGACCAGTAYTGNKIRAANGT-3'), sendo que as regiões degeneradas estão sublinhadas (Y: C ou T; R: A ou G; W: A ou T; S: C ou G; B: C, G, ou T; N: A, C, G, ou T; e I: inosina).

Posteriormente, foram construídos *primers* degenerados baseado apenas nas sequências de aminoácidos e genes de xilanase de *Cryptococcus* depositadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Essas sequências foram salvas em formato FASTA e alinhadas com o auxílio do programa Bioedit (HALL, 1999) para auxiliar na identificação das regiões conservadas.

5.1.1.3 Amplificação

Testaram-se os pares de *primers* degenerados (descritos em 5.1.1.2) em um gradiente com quatro temperaturas de anelamento (52 , 55 , 58 e 60°C), adicionando $1 \mu\text{L}$ DNA para a reação de polimerase em cadeia (PCR) em um volume total de $15 \mu\text{L}$, em diversas combinações (tampão 1x; $0,12$ - $0,33 \text{ mM}$ dNTP MIX; $1,67 \text{ mM}$ MgCl_2 ; $0,6$ - $16 \mu\text{M}$ de *primer* F; $0,6$ - $16 \mu\text{M}$ de *primer* R; $0,067$ - $0,167 \text{ U}/\mu\text{L}$ de Taq DNA Polimerase; q.s.p. água MilliQ).

Realizou-se a reação em termociclador *Veriti 96-well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, EUA), nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 3 min; 15 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 60°C por 30 s (decrecendo $0,5^{\circ}\text{C}$ a cada ciclo) e extensão a 72°C por 30 s; seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a temperatura de acordo com o *primer* por 30 s e extensão a 72°C por 30 s;

extensão final de 72°C por 6 min e resfriados a 4°C. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e as bandas foram visualizadas sob iluminação ultravioleta em Fotodocumentador L-PIX (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil).

5.1.1.4 Purificação das bandas

As bandas de interesse foram recortadas do gel e purificadas com a utilização do Kit Purelink® Quick Gel Extraction (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, foram concentradas em centrífuga a vácuo Vacufuge (Eppendorf) e armazenadas a -20°C.

5.1.1.5 Sequenciamento

Após purificação das bandas, montaram-se as reações de sequenciamento para volume final de 10 µL (30 ng de DNA purificado; 2 µL de BigDye + tampão 1:1; 2,5 pmol de *primer* F ou R; q.s.p. água MilliQ). As reações foram levadas ao termociclador e os PCRs foram realizados nas seguintes condições: 94°C por 2 min, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 20 s, à temperatura de anelamento do *primer* por 15 s, e 60°C por 1 min. Os produtos das reações foram mantidos a 4°C até o passo seguinte.

Os 10 µL dos produtos das reações de PCRs foram transferidos para uma placa específica de 96 poços (Applied Biosystems) e acrescidos de 40 µL de isopropanol 75%, homogeneizados e centrifugados (centrífuga 5810R, Eppendorf) por 30 s. O material foi então, mantido em temperatura ambiente por 20 min, centrifugado a 10.000 x g por 45 min e o isopropanol foi removido pela inversão da placa.

Adicionou-se 200 µL de etanol 70% a cada poço e a placa foi centrifugada por 45 min a 10.000 x g. Removeu-se o etanol por inversão seguido de centrifugação rápida (aproximadamente 5 s) com a placa invertida para retirada do excesso de etanol. Removeu-se o etanol residual com o auxílio do concentrador a vácuo Vacufuge (Eppendorf), na condição estática, por 5 min. A placa foi envolvida com papel alumínio e armazenada a 4°C até o momento da corrida.

Antes do sequenciamento, adicionou-se 10 µL de Hi-Di™ formamida (Invitrogen), e levou-se ao termociclador por 5 minutos a 95°C. A placa foi colocada em banho de gelo por 3 min e as amostras precipitadas foram sequenciadas em sequenciador Genetic Analyzers 3500 (Applied Biosystems).

5.1.1.6 Análise das sequências

Os cromatogramas foram analisados com o auxílio dos softwares ChromasPro (Technelysium Pty Ltda, Austrália) e BioEdit (HALL, 1999). Através do algoritmo Blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), as sequências de nucleotídeos foram traduzidas e comparadas com as sequências de proteínas depositadas no NCBI.

5.1.2 Espectrometria de massas

A técnica de espectrometria de massas foi utilizada com o objetivo de identificar alguns peptídeos da enzima.

5.1.2.1 Preparo da amostra

A enzima purificada foi dialisada com água MilliQ em sistema de ultrafiltração de 2 mL AMICON 10 kDa (Millipore) e quantificada pelo método de Lowry (1951). Posteriormente, 100 µg de enzima foram ressuspensos em tampão bicarbonato de amônio 50 mM. Reduziu-se com 5 µL de Ditioneitol (DTT) 10 mM, incubando a 60°C por 30 min. Alquilou-se a proteína adicionando 5 µL de iodoacetamida (IAA) 50 mM, incubando à temperatura ambiente por 30 min, protegendo-a da luz. Digeriu-se a proteína com solução de tripsina (na proporção 1:50, enzima:substrato), incubando a 37°C por 16 h. Parou-se a reação de digestão pela adição de ácido fórmico (concentração final de 1%) e congelaram-se as amostras até o momento da análise em LC-MS/MS.

5.1.2.2 LC-MS/MS

Realizaram-se as análises no laboratório Dalton Espectrometria de Massas, do Instituto de Química, UNICAMP. Injetou-se 5 µL de amostra previamente digeridas em sistema de cromatografia líquida acoplado a espectrômetro de massas (LC-MS/MS), utilizando o sistema Waters Xevo Q-TOF (ESI-QTOF). Utilizou-se pré-coluna e coluna C18 (fase reversa), com fluxo de 0,6 µL/min e gradiente de acetonitrila (2-90%) em 0,1% de ácido fórmico em até 60 min.

5.1.2.3 Análise dos dados

Analisaram-se os dados gerados (.pkl) utilizando a busca por íons (MS/MS Ion Search) do MASCOT (Matrix Science Inc., Boston, MA, EUA) para identificação dos peptídeos. Foram utilizados os banco de dados CAZy, Trembl, NCBI ou SwissPort. Os seguintes parâmetros foram considerados: modificações fixas como “Carbamidomethyl (C)”, devido à redução com DTT e alquilação com iodoacetamina; modificações variáveis como “Oxidation (M)”, considerando as oxidações nas metioninas; e 0,1 Da para íons precursores e fragmentos.

5.1.3 Genoma

Para análise do genoma da levedura LEB-AY₁₀, 200 µg de DNA foram enviadas em gelo seco ao laboratório *High Throughput Sequencing Facility* (HTSF), Departamento de Genética da Escola de Medicina da Universidade da Carolina do Norte (UNC, Chapel Hill, NC, EUA).

5.1.3.1 Sequenciamento HiSeq Illumina

O genoma do *C. flavecens* LEB-AY₁₀ foi sequenciado em HiSeq 2000 (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA), uma plataforma de “Segunda Geração” (*Next-Generation Sequencing*) de alta performance que visa o baixo custo e o menor tempo quando comparada com os sequenciadores de “Primeira geração”. Para a análise, foi utilizado um inserto de 400 pb para gerar fragmentos de sequencia (*reads*) de 100 pb (PE_{x100}, *paired end*).

Em síntese, neste tipo de sequenciamento, o preparo das bibliotecas é feito pela fragmentação aleatória do DNA. As pontas dos fragmentos são reparadas e adeniladas para que seja feita a ligação dos adaptadores nas duas extremidades (*paired-end*). Esses fragmentos são selecionados de acordo com o tamanho desejado (aproximadamente 400 pb) e purificados. Para a formação dos *clusters*, os fragmentos de fita simples são aleatoriamente imobilizados pela hibridização dos adaptadores que foram ligados aos fragmentos com os adaptadores que estão fixados na superfície dos canais da célula de fluxo. As fitas são então replicadas através da formação de “pontes”, acorando-se à célula. As duplas fitas são posteriormente desnaturadas em fitas simples para a formação de novas

“pontes” e assim sucessivamente. Desta forma, são criadas até mil cópias idênticas de cada molécula molde (fita simples), formando assim diversos milhões de *clusters* em cada canal da célula de fluxo. Um resumo desse processo está ilustrado na Figura 5.1.

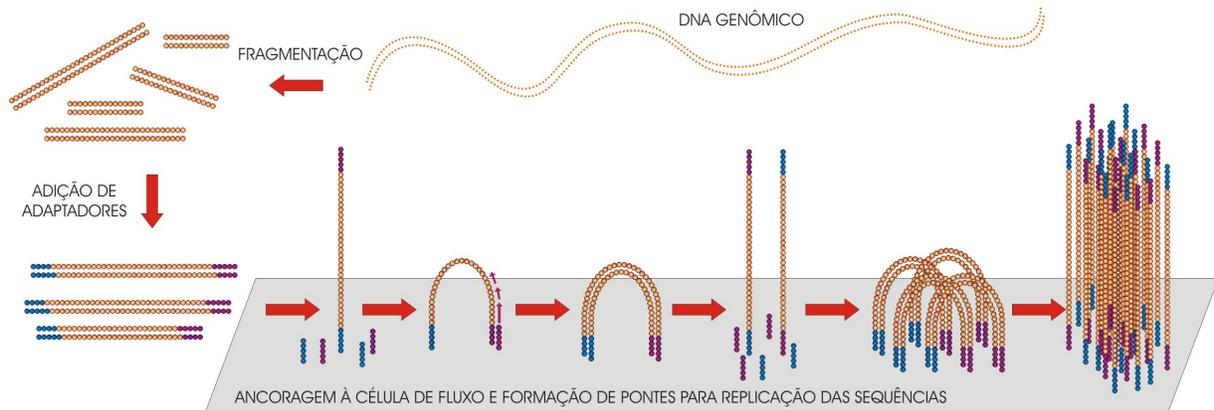


Figura 5.1. Representação esquemática do preparo das bibliotecas e da formação dos *clusters* (baseado em http://res.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf)

O sequenciamento é feito pela tecnologia de síntese na qual são incorporados nucleotídeos com marcação de fluorescência. Durante cada ciclo de sequenciamento, uma única base nitrogenada (A, T, C ou G) é adicionada à cada cadeia de ácidos nucleicos. Após a excitação com laser, a fluorescência emitida por cada cluster é capturada e a base é então identificada. O ciclo de sequenciamento é então repetido para determinar a próxima base, e assim por diante até obter a sequência de bases de um fragmento (*reads* de até 100 pb).

5.1.3.2 Bioinformática

A análise dos dados gerados pelo sequenciamento foi feita pela equipe de bioinformática do Laboratório de Genômica e Expressão (LGE). A montagem dos fragmentos contíguos (*contigs*) foi realizada a partir da sobreposição dos *reads* gerados e a identificação do gene foi realizada através de uma combinação de estratégias. Primeiramente, foi feita a predição de genes utilizando o software Augustus (STANKE *et al.*, 2004) “treinado” com o modelo do *Cryptococcus neoformans*, por ser o micro-organismo sequenciado filogeneticamente mais próximo. Em seguida, foi feita comparação via Blastx com genes de xilanases de outros *Cryptococcus* para identificar os prováveis genes de interesse. E por último, foi feita a identificação manual via Blastx contra o banco de dados do NCBI para

confirmação e possíveis ajustes da predição por comparação. A ferramenta “Expert Protein Analysis System” - ExPASy (GASTEIGER, 2003) também foi utilizada para auxiliar tradução dos nucleotídeos em aminoácidos.

5.1.3.3 Procedimentos da clonagem

Extração de RNA total

A indução da produção de xilanase foi realizada em meio contendo 1% (m/v) de xilana de bétula conforme descrito no Capítulo 4 (tópico 4.1.2). Células foram coletadas após 14, 18 e 22 h de fermentação, centrifugadas e o *pellet* foi imediatamente congelado com nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até o momento do uso. A cada *pellet* congelado foram adicionados esferas de vidro (0,5 mm), 300 µL de tampão desnaturante (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM acetato de sódio, pH 5,3 em água tratada com dietilpirocarbonato, DEPC) gelado e 300 µL de fenol ácido, e levado imediatamente ao 96-Mini Beadbeater (BioSpec Products, Bartlesville, OK, EUA) por 40 s. Após a lise celular, centrifugaram-se os microtubos, recuperou-se a fase aquosa e adicionou-se 300 µL de mistura de fenol ácido e clorofórmio (1:1). Após nova centrifugação, recuperaram-se as fases aquosas contendo o RNA, as quais foram lavadas com 300 µL de clorofórmio e centrifugadas a 16.000 x g. Precipitaram-se os materiais de RNA com 1/10 volumes (em relação ao conteúdo dos tubos) de acetato de sódio 3 M (pH 5,3) e três volumes de etanol absoluto gelado. Misturaram-se cuidadosamente por inversão e deixaram-se a -20°C por 30 min. Centrifugaram-se a 4°C e 16.000 x g por 30 min e descartaram-se os sobrenadantes. Após lavagem com etanol 70%, deixaram-se secar os *pellets* e reconstituíram-se com água DEPC. O RNA foi quantificado em NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) e a qualidade do RNA extraído nos diferentes tempos foi verificada em gel desnaturante 1%, contendo formamida e formaldeído (AUSUBEL *et al.*, 1998). O RNA foi armazenado a -80°C até o momento do uso.

Purificação do mRNA

Para evitar interferências e melhorar a qualidade da amplificação, o RNA mensageiro (mRNA) foi purificado a partir de 75 µg do RNA total utilizando o kit *Dynabeads mRNA Purification* (Invitrogen). Esse sistema de purificação é baseado no emparelhamento da

cauda poliA do mRNA (extremidade 3') com os resíduos do oligo (dT)₂₅ que estão covalentemente ligados à superfície das esferas magnéticas (Dynabeads®). A utilização foi feita conforme recomendações do fabricante.

Síntese do cDNA

Sistema de transcrição reversa SuperScript II First-Strand Synthesis System (Invitrogen, EUA) foi utilizado para a construção do DNA complementar (cDNA). Para isso, 1 µL de mRNA foi adicionado a 50 ng *primers* randômicos (PDN6) (LifeTechnologies) em um volume total de 13 µL e mantido a 70 °C por 10 min. Após esse tempo, levou-se ao banho de gelo por 10 min e adicionaram-se: 5 µL de 5X First Strand Buffer, 2,5 µL de ditiotreitol (dTT, 100 mM), 0,5 µL RNaseOUT (40 U/µL) e 1,25 µL de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTP, 10 mM). Incubou-se a 25 °C por 2 min e adicionou-se 1 µL de SuperScript II® (200 U/µL). A reação foi incubada a 25 °C por 10 min, 42 °C por 70 min, 70 °C por 15 min. Alíquotas do material foram armazenadas a -80 °C.

Desenho dos *primers*

Os *primers* XynACf-F e XynACf-R foram desenhados para amplificar do início (*start* códon) ao final do gene (*stop* códon), respectivamente. Os *primers* internos GH10CF-F4 e GH10CF-R2 foram construídos posteriormente para auxiliar no sequenciamento. Estes *primers* estão relacionados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Lista de *primers* desenhados para amplificação do *Xyn10Cf*.

<i>Primer</i>	Sequência	Tamanho	T _m (°C)*
XynACf-F	5' ATGCTTCACCTCCTCGCC 3'	18	61,0
XynACf-R	5' CTA CTTGCGAAGCGCATCTTTG 3'	22	64,0
GH10CF-F4	5' AGTCACTTTATCGGCGGTGAG 3'	21	57,6
GH10CF-R2	5' GATATGCTCCTTCAGAACTTGC 3'	22	55,8

* Temperatura de fusão (*melting*)

Clonagem

Para clonagem do gene *Xyn10Cf*, 1 µl da fita simples de cDNA foi utilizado para amplificar a ORF (*open reading frame*). A amplificação foi conduzida utilizando-se a enzima *pfu* DNA polymerase (Promega) e o mesmo par de *primers* utilizado para amplificação do DNA genômico: XynACf-F e XynACf-R (Tabela 5.1). A amplificação do gene foi realizada nas seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 2 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 20 s, anelamento a 58 °C por 20 s e extensão a 72 °C por 60 s; extensão final de 72 °C por 2 min e resfriados a 4 °C.

A banda correspondente ao tamanho de fragmento predito foi purificada do gel de agarose utilizando o kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Após adenilação, o produto de PCR foi dialisado e a clonagem foi feita em vetor pGEM T-Easy (Promega), Figura 5.2, utilizando T4 DNA ligase e introduzindo em células competentes de *Escherichia coli* DH10B por eletroporação, de acordo com metodologia fornecida pelo fabricante.

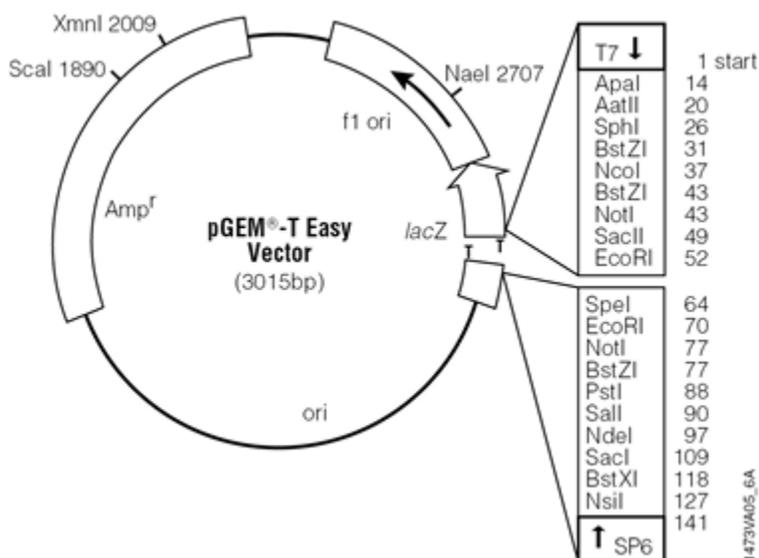


Figura 5.2. Mapa do vetor pGEM-T Easy (Promega)

5.1.3.4 Extração dos plasmídeos (pequena escala)

A extração de plasmídeos foi realizada de acordo com o princípio de lise alcalina proposto por Birboim e Doly (1979). Para isso, cada colônia transformante (branca) foi inoculada em 3 mL de caldo Luria Bertani (LB, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl) contendo 100 mg/L ampicilina. As culturas foram incubadas a 37°C e 250 rpm por 14 horas. Logo após esse período, 1,5 mL foram transferidos para microtubos e centrifugados a 3.000 x g por 5 minutos. Descartaram-se os sobrenadantes e ressuspenderam-se as células em 100 µL da Solução I (10 mM EDTA pH 8, 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 µg/mL de RNase A) gelada. Incubaram-se os tubos a 37°C por 15 min e adicionou-se 200 µL da Solução II (NaOH 0,2 M e SDS 1%) e homogeneizaram-se delicadamente por inversão. Em seguida, adicionaram-se 150 µL da Solução III (3 M acetato de potássio pH 5,5 ajustado com acético glacial) gelada e os tubos foram mantidos em banho de gelo por 20 min. Centrifugaram-se a 15.000 x g por 20 min a 4°C e transferiu-se o sobrenadante para outro tubo ao qual adicionou-se 1 mL de etanol absoluto gelado. Após mistura por inversão, centrifugaram-se novamente nas mesmas condições, descartando os sobrenadantes e lavando os *pellets* com 200 µL de etanol 70% (gelado). Após a evaporação completa do etanol, os *pellets* foram ressuspensos em 50 µL de água Milli-Q. O conteúdo de DNA plasmidial foi quantificado em NanoDrop e a qualidade da extração foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%.

5.1.3.5 Sequenciamento

O produto de PCR purificado foi quantificado em NanoDrop e ambas as fitas foram sequenciadas em DNA ABI PRISM 377 Genetic Analyzer, conforme descrito em 5.1.1.5. Os *primers* internos GH10CF-F4 e GH10CF-R2 (Tabela 5.1) foram utilizados para auxiliar na construção da sequência.

5.1.3.6 Predição da proteína e análise de bioinformática

A análise das sequências foi realizada através do algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Os programas ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/ClustalW>) e Bioedit (HALL, 1999) foram utilizados para alinhar a sequência de proteína predita para o *Xyn10Cf* com sequências homólogas de xilanases depositadas no banco do NCBI. Os domínios conservados foram analisados pelo InterProScan Sequence Search

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan>) e Conserved Domain Architecture Retrieval Tool (CDART do NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi?cmd=rpsand>). Propriedades físico-químicas foram estimadas pela ferramenta ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) (GASTEIGER *et al.*, 2005). O peptídeo sinal foi identificado pelo software SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Os sítios putativos de N- e O-glicosilação do *Xyn10Cf* foram localizados utilizando os programas NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) e NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>), respectivamente.

5.1.3.7 Depósito

A sequência do gene *Xyn10Cf* pertencente à linhagem LEB-AY₁₀ (CCT 7725) foi depositado no NCBI e está disponível no GenBank sob o número de acesso KF318187.

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Amplificação utilizando *primers* degenerados

Baseado na sequência de aminoácidos de 652 xilanases fúngicas e bacterianas da família GH10 e 377 da família GH 11 coletadas do banco de dados do Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), Wang *et al.* (2010) estudou as regiões conservadas para cada família de proteínas, duas delas previamente descritas. Essas regiões compreendem: [W/Y]-D-W-D-V-[V/C/N]-N-E, descrita por Sunna e Bergquist (2003), e [D/H]-[G/A/C]-[I/V/L]-G-[M/F/L/I]-Q-[S/G/M/C]-H para xilanases da família GH10 (englobando cerca de 85 aminoácidos entre as sequências), e S-Y-L[C/S/A]-[V/L]-Y-G-W e T-F-[V/L]-Q-[Y/F]-[W/F]-S-V descrita por Morris *et al.* (1998) para xilanases da família GH11 (separados por 70 aminoácidos).

Os *primers* degenerados propostos por Wang *et al.* (2010) para cada família de proteína (GH10 e 11) foram construídos (Invitrogen) e testados em diferentes combinações de condições de amplificação. Nenhuma banda em torno de 210 pb foi amplificada utilizando os *primers* X₁₁-F e X₁₁-R. Porém, uma banda com tamanho aproximado de 260 pb foi

amplificada utilizando os *primers* X₁₀-F e X₁₀-R (Figura 5.3a). Esta banda foi então purificada do gel (Figura 5.3b) e sequenciada.

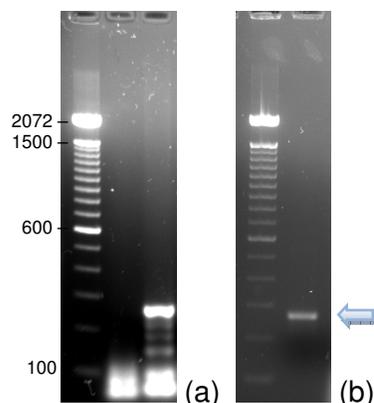


Figura 5.3. Fragmento de DNA amplificado utilizando os *primers* X₁₀-F e X₁₀-R (a) e banda purificada (b). Padrão de massa molecular Invitrogen DNA Ladder 100 pb.

Entretanto, ao analisar a sequência amplificada por comparação com as sequências de proteínas do banco de dados do NCBI, utilizando a ferramenta Blastx (compara sequência de dados de nucleotídeos com banco de dados de proteínas), foi constatado que a sequência amplificada não apresentou similaridade com outras sequências de xilanase, demonstrando a baixa especificidade dos *primers* utilizados.

Em vista disso, novos pares de *primers* foram desenhados com base no alinhamento apenas de sequências de xilanasas *Cryptococcus*, para ambas as famílias de hidrolases glicosídicas. Esses *primers* foram combinados entre eles e também com os *primers* anteriores, porém não foi possível amplificar nenhuma banda com o tamanho próximo ao predito.

Uma desvantagem do uso de *primers* degenerados é que ao aumentar a degeneração (com o intuito de detectar diferentes genes) há o descréscimo da quantidade de cada *primer* presente na mistura, levando à baixa proporção do *primer* apropriado. Além disso, amplificação de produtos indesejados é resultado da reduzida especificidade dos *primers* e do baixo rigor das condições de anelamento (PROVENCHER *et al.*, 2003).

Desta forma, optou-se por utilizar outra estratégia para desenho dos *primers* degenerados e detecção do gene que codifica a xilanase do micro-organismo LEB-AY₁₀.

5.2.2 Espectrometria de massas

A técnica de espectrometria de massas foi empregada visando identificar alguns peptídeos que compõem a xilanase em estudo e, com base neles, desenhar *primers* degenerados para amplificar parte do gene. Para isso, utilizou-se o protocolo de “digestão em solução”, descrito em 5.1.2.1, para o preparo das amostras e estas foram enviadas ao ESI-QUAD-TOF. Entretanto, nenhum peptídeo similar a xilanase foi identificado utilizando o software Mascot e os bancos de dados CAZy, Trembl, NCBI ou SwissPort.

Por isso, diferentes protocolos foram utilizados, incluindo a utilização de outras proteases como quimotripsina e glu-c, a utilização de surfactantes para a desnaturação da enzima (ProteaseMAX, Promega) e utilização de ureia, todos em diferentes combinações. Porém, em nenhum dos casos obteve-se a identificação de peptídeos. Posteriormente, optou-se por um processo de “digestão em gel”, conforme Shevchenko *et al.* (1996), para eliminar possíveis interferentes, mas os resultados também não foram satisfatórios.

Levando em consideração o tempo de análises e os custos com reagentes, optou-se por sequenciar o genoma da levedura.

5.2.3 Genoma

Com os dados de sequenciamento gerados através do Illumina e com o auxílio da equipe de bioinformática do LGE, montou-se o genoma do micro-organismo *Cryptococcus flavescens* LEB-AY₁₀. Para isso, os 34.202.008 *reads paired-end* (com tamanho de 100 pb) gerados foram organizados em 235 *contigs* (sequências maiores que 1000 pb), resultando um genoma de 20 Mbases com uma cobertura de 170 vezes o seu tamanho.

Após montados os *contigs*, foi realizada a predição de genes utilizando o software Augustus treinado com o modelo do genoma do *Cryptococcus neoformans*. Sequências de xilanases de outros *Cryptococcus* (disponíveis no NCBI) foram utilizadas para comparação por Blastx a fim de identificar os genes codificadores de xilanase. Um gene foi identificado e comparado manualmente utilizando o Blastx contra o banco de dados do NCBI. A ferramenta ExPASy foi utilizada para traduzir os nucleotídeos a fim de analisar a sequência de aminoácidos.

O gene predito apresentou tamanho de 1265 pb e uma única cópia no genoma. Não foram encontrados outros genes hipotéticos que codificassem possíveis xilanases.

5.2.3.1 Clonagem

A boa qualidade do RNA extraído pode ser visualizada pela ausência de DNA genômico e pela integridade das bandas que representam os componentes ribossomais (26S, 18S, 5.8S e 5S) e RNA transportadores (tRNAs), conforme indicado na Figura 5.4a. O fragmento de DNA genômico e o cDNA correspondente, ambos amplificados com os *primers* XynACf-F e XynACf-R (listados na Tabela 5.1), estão representados na Figura 5.4b.

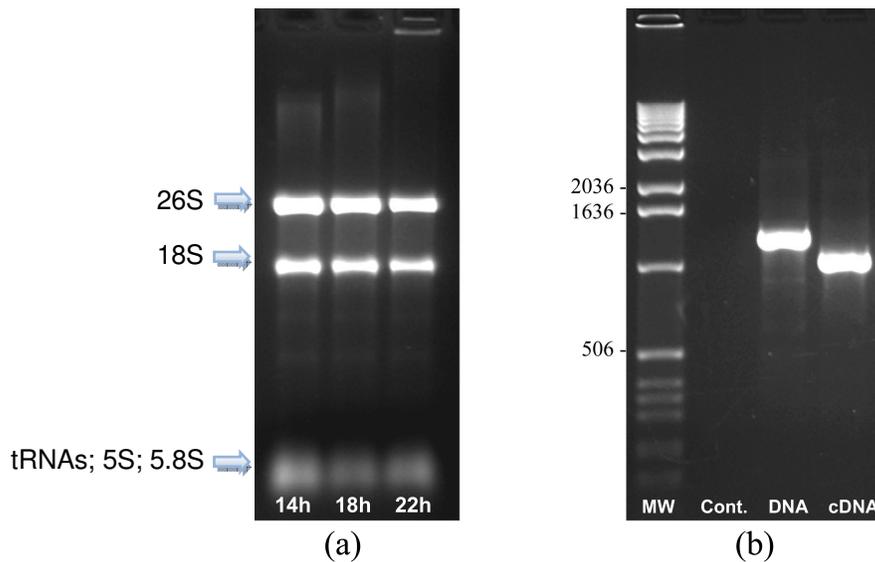


Figura 5.4. Extração de RNA total em três tempos de indução (a), controle e sequências de DNA e cDNA (18 h) correspondente ao gene *Xyn10Cf* (b). Padrão de massa molecular (MW) 1 kb DNA Ladder (Invitrogen)

Para auxiliar na identificação da CDS, o cDNA foi clonado em vetor pGEM T-Easy. Para isso, o produto de PCR foi purificado, adenilado e ligado ao vetor. A transformação foi feita por eletroporação em células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B. Os clones recombinantes foram selecionados pela resistência à ampicilina adquirida. Já a presença do inserto foi detectada pela coloração das colônias na presença de X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo), uma substância de estrutura análoga à lactose. Aquelas células que não continham o inserto apresentaram coloração azul, uma vez que o gene *lacZ* estava intacto e, portanto, a enzima β -galactosidase foi expressa resultando na hidrólise do X-gal (produzindo uma pigmentação azul). Já os clones recombinantes que apresentavam o

inserto apresentaram coloração branca, uma vez que o gene *lacZ* foi interrompido pela inserção do *Xyn10Cf*, inativando a β -galactosidase.

Os plasmídeos dos clones recombinantes foram extraídos pelo método de lise alcalina e a confirmação da clonagem foi feita por PCR e digestão parcial, conforme Figura 5.5.

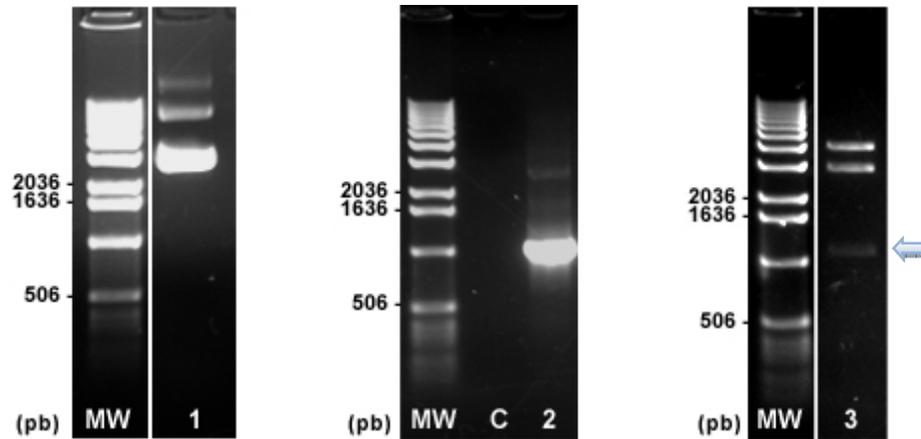


Figura 5.5. Exemplo de extração plasmidial (1), controle negativo (C) e amplificação do gene clonado com os *primers* XynACf-R e XynACf-R (2), e digestão parcial do plasmídeo com as enzimas Apa I e Sal I. Padrão de massa molecular (MW) 1 kb DNA Ladder (Invitrogen).

Após sequenciamento do gene clonado, o cDNA foi alinhado e comparado com o DNA genômico. Seis íntrons foram observados e a CDS apresentou 1035 pb, sendo traduzida em uma proteína de 334 aminoácidos.

5.2.3.2 Análise da sequência

A estrutura do gene, a sequência de aminoácidos deduzida e as predições podem ser visualizadas na Figura 5.6.

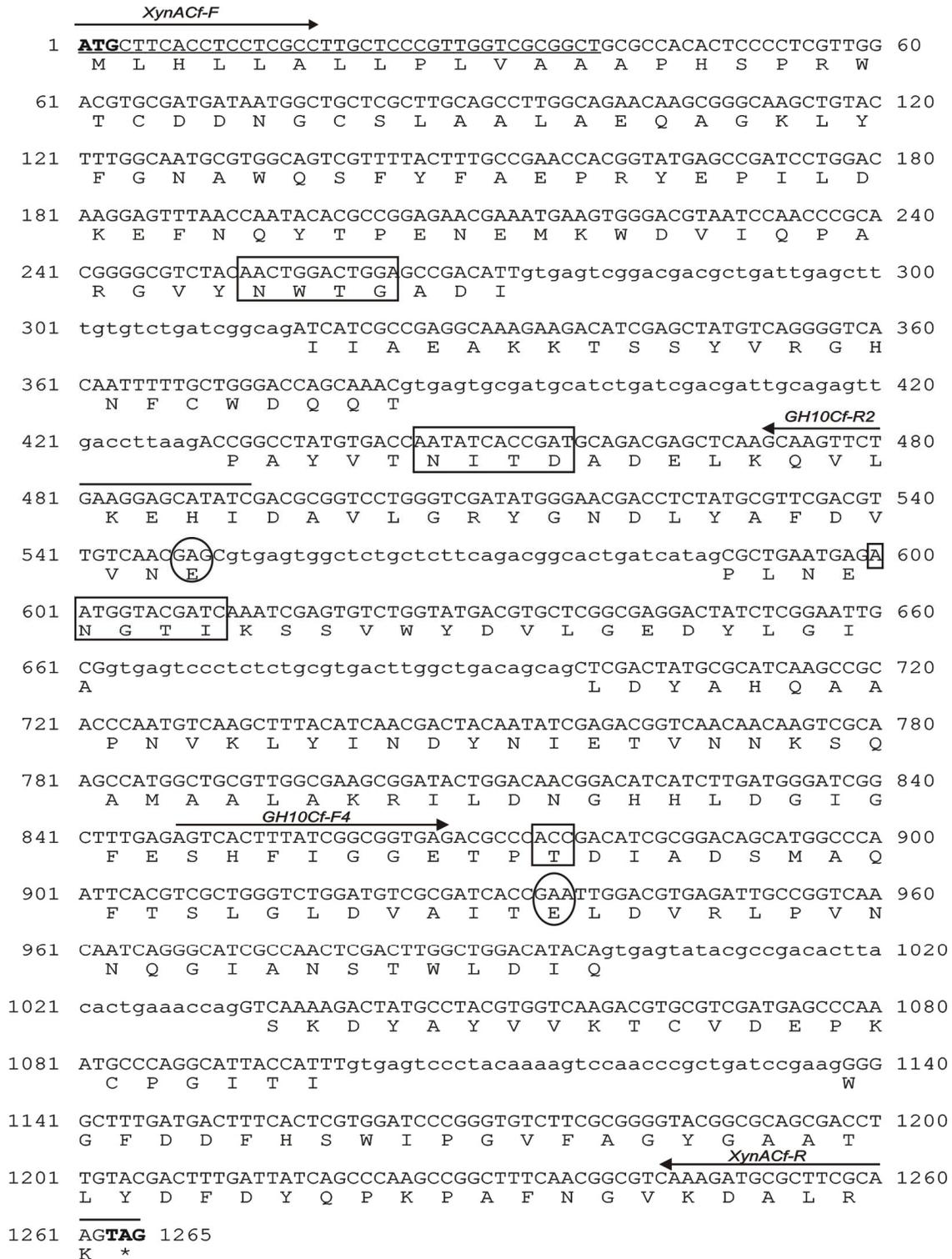


Figura 5.6. Sequência de nucleotídeos e predição de aminoácidos para o gene *Xyn10Cf*. Em negrito, códons de iniciação e término da transcrição. Íntrons representados por letras minúsculas. Sublinhado, peptídeo sinal predito. Regiões demarcadas por retângulos representam potenciais sítios de N- e O-glicosilação. Resíduos conservados de ácido glutâmico encontram-se circulosados. Setas acima dos nucleotídeos indicam regiões nas quais foram desenhados *primers*.

Utilizando o programa SignalP 4.1, verificou-se que a porção N-terminal da proteína apresentou um peptídeo sinal composto por 13 aminoácidos. A massa molecular da proteína madura (331 aminoácidos) foi estimada em 37,1 kDa, e o ponto isoelétrico em torno de 4,6. Enquanto que a proteína purificada apresentou uma massa molecular média de 48 kDa em SDS-PAGE (conforma Capítulo 4). Estima-se que os 11 kDa de diferença entre o valor predito e o valor encontrado corresponda a glicosilação da proteína. Três sítios de N-glicosilação foram preditos pelo software NetNGlyc 1.0: na posição dos resíduos 85 (NWTG, score 0.7007), 120 (NITD, score 0.6284) e 159 (NGTI, score 0.6838) da proteína não madura. E um sítio de treonina para O-glicosilação na posição 239 (G-score 0.312, I-score 0.505) foi predito por NetOGlyc 3.1.

A massa molecular predita 37.1 kDa para a proteína madura de *C. flavescens* LEB-AY₁₀ está de acordo com a massa molecular predita para a xilanase mesofílica produzida por *C. albidus* (37.1 kDa) e sua xilanase termolábil homóloga da levedura *C. adeliensis* (antigo *C. adeliae*, 37.4 kDa) isolada da Antártica (PETRESCU *et al.*, 2000). Apesar dessa similaridade, a maior identidade entre as sequências pelo alinhamento Blastx foi de 54% com a xilanase de *C. adeliensis*, conforme Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Homologia por Blastx do cDNA *Xyn10Cf* com outras linhagens

Linhagem	Número de acesso	e-value	Identidade
<i>Cryptococcus adeliensis</i>	CAA75630.1	1e-117	172/318 (54%)
<i>Streptomyces ipomoeae</i> 91-03	WP_009297450.1	5e-90	134/293 (46%)
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	NP_823272.1	5e-89	136/289 (47%)
<i>Thermobispora bispora</i> DSM 43833	YP_003652743.1	4e-85	141/315 (45%)
<i>Cryptococcus albidus</i>	P07529.2	1e-54	129/337 (38%)

A análise da sequência utilizando a ferramenta InterProScan Sequence Search mostrou um domínio conservado para hidrolases glicosídicas da família 10 (PF00331, superfamília cl01495) do aminoácido 31 ao 341 (2.0E-87). Baseado na sequência de aminoácidos deduzida e nos domínios conservados, essa enzima foi classificada como pertencente à família GH10, de acordo com a classificação do CAZY (COUTINHO; HENRISSAT, 1999). Similarmente à xilanase GH10 de *Cohnella laeviribosi* HY-21 (KIM *et al.*, 2010) nenhum domínio acessório adicional, como domínio de ligação à celulose (CBD,

cellulose-binding domain), módulo de ligação a carboidratos, domínio de ligação à xilana e domínio de fibronectina tipo 3, foi encontrado pelas ferramentas *CDART* e *InterProScan Sequence Search*.

O aminoácido Glu-236 do XlnA de *Streptomyces lividans* (MOREAU *et al.*, 1994) provavelmente desempenha o papel do nucleófilo em comparação com o Glu-274 da exoglucanase GH10 produzida por *Cellulomonas fimi* (TULL *et al.*, 1991). Baseado no alinhamento dos aminoácidos com outras xilanases GH10 (Figura 5.7), o *Xyn10Cf* apresentou dois resíduos conservados de ácido glutâmico: Glu-154 (catalisador ácido/base) e Glu-259 (nucleófilo catalítico), os quais provavelmente desempenham papéis essenciais nas reações biocatalíticas de retenção das enzimas pertencentes às hidrolases glicosídicas (KIM *et al.*, 2010; MACLEOD *et al.*, 1994).

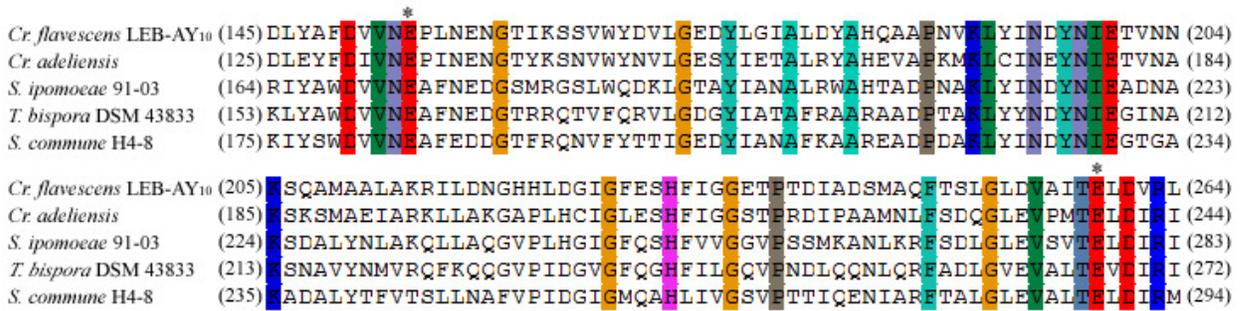


Figura 5.7. Alinhamento ClustalW da sequência de aminoácidos deduzida para xilanase de *C. flavecens* LEB-AY₁₀ e outras xilanases GH10 produzidas por: *Cryptococcus adeliensis* (gi|2624008|), *Streptomyces ipomoeae* 91-03 (gi|496654957|), *Thermobispora bispora* DSM 43833 (gi|296270111|) e *Schizophyllum commune* H4-8 (gi|302675262|). Asteriscos (*) acima dos resíduos indicam os ácidos glutâmicos conservados.

As xilanases da família GH11 (ou família G) têm menor massa molecular com um ponto isoelétrico entre 8-9,5, enquanto aquelas pertencentes a família GH10 (ou família F) apresentam maior massa molecular e ponto isoelétrico mais baixo (AHMED *et al.*, 2009; BUCHERT *et al.*, 1995). Além disso, as xilanases GH10 exibem grande versatilidade catalítica e menor especificidade pelo substrato do que aquelas pertencentes a família GH11 (BIELY *et al.*, 1997; FAULDS *et al.*, 2006). Essa classificação está de acordo com a caracterização da enzima, conforme demonstrado no Capítulo 4.

5.3 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO

O sequenciamento genômico do *Cryptococcus flavescens* LEB-AY₁₀ mostrou apenas uma sequência para xilanase. Essa xilanase é composta por 343 aminoácidos, dos quais 13 correspondem ao peptídeo sinal. Dos 48 kDa descritos para essa enzima, estima-se que 37,1 kDa referem-se à cadeia polipeptídica e o restante à glicosilação. Com base na sequência de nucleotídeos e em estudos anteriores, a proteína pertence à família GH10 das hidrolases glicosídicas. A clonagem do cDNA do *Xyn10Cf* foi uma etapa importante para posterior expressão heteróloga da enzima e para estudos aplicados à bioconversão de materiais lignocelulósicos.

5.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIELY, P.; VRSANSKÁ, M.; TENKANEN, M.; KLUEPFEL, D. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n. 1-3, p. 151–166, 1997.

BIMBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, p. 1513–1523, 1979.

COMPTON, T. Degenerate primers for DNA amplification. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego, California: Academic Press, 1990. 482 p.

COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. **Carbohydrate Active Server**. Disponível em: <<http://www.cazy.org/>>. Acesso em: 25 jul. 2012.

FAULDS, C. B.; MANDALARI, G.; LO CURTO, R. B.; BISIGNANO, G.; CHRISTAKOPOULOS, P.; WALDRON, K. W. Synergy between xylanases from glycoside hydrolase family 10 and family 11 and a feruloyl esterase in the release of phenolic acids from cereal arabinoxylan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 5, p. 622–629, 2006.

GASTEIGER, E. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3784–3788, 2003.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 571–607.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

- KIM, D. Y.; HAN, M. K.; OH, H.-W.; BAE, K. S.; JEONG, T.-S.; KIM, S. U.; SHIN, D.-H.; KIM, I.-H.; RHEE, Y. H.; SON, K.-H.; PARK, H.-Y. Novel intracellular GH10 xylanase from *Cohnella laeviribosi* HY-21: biocatalytic properties and alterations of substrate specificities by site-directed mutagenesis of Trp residues. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8814–8821, 2010.
- LANG, M.; ORGOGOZO, V. Identification of homologous gene sequences by PCR with degenerate primers. **Methods in Molecular Biology**, v. 772, p. 245–56, 2011.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, p. 265–275, 1951.
- MACLEOD, A. M.; LINDHORST, T.; WITHERS, S. G.; WARREN, R. A. J. The acid/base catalyst in the exoglucanase/xylanase from *Cellulomonas fimi* is glutamic acid 127: evidence from detailed kinetic studies of mutants. **Biochemistry**, v. 33, n. 20, p. 6371–6376, 1994.
- MOREAU, A.; ROBERGE, M.; MANIN, C.; SHARECK, F.; KLUEPFEL, D.; MOROSOLI, R. Identification of two acidic residues involved in the catalysis of xylanase A from *Streptomyces lividans*. **Biochemical Journal**, v. 302, p. 291–295, 1994.
- MORRIS, D. D.; GIBBS, M. D.; CHIN, C. W. J.; KOH, M.-H.; WONG, K.K.Y.; ALLISON, R.W.; NELSON, P.J.; BERGQUIST, P.L. Cloning of the xynB gene from *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1 and action of the gene product on kraft pulp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1759–1765, 1998.
- PETRESCU, I.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; CHESSA, J.-P.; NTARIMA, P.; CLAEYSSENS, M.; DEVREESE, B.; MARINO, G.; GERDAY, C. Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae*. **Extremophiles**, v. 4, n. 3, p. 137–144, 2000.
- PROVENCHER, C.; LAPOINTE, G.; SIROIS, S.; VAN CALSTEREN, M.; ROY, D. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of priming glycosyltransferase genes of the exopolysaccharide locus in strains of the *Lactobacillus casei* group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3299–3307, 2003.
- SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850–858, 1996.
- STANKE, M.; STEINKAMP, R.; WAACK, S.; MORGENSTERN, B. AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server issue, p. W309–W312, 2004.
- SUNNA, A.; BERGQUIST, P. L. A gene encoding a novel extremely thermostable 1,4-beta-xylanase isolated directly from an environmental DNA sample. **Extremophiles: life under extreme conditions**, v. 7, n. 1, p. 63–70, 2003.
- TULL, D.; WITHERS, S. G.; GILKES, N. R.; KILBURN, D. G.; WARREN, R. A. J.; AEBERSOLD, R. Glutamic acid 274 is the nucleophile in the active site of a “retaining” exoglucanase from *Cellulomonas fimi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 24, p. 15621–15625, 1991.
- WANG, G.; WANG, Y.; YANG, P.; LUO, H.; HUANG, H.; SHI, P.; MENG, K.; YAO, B. Molecular detection and diversity of xylanase genes in alpine tundra soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1383–1393, 2010.

CAPÍTULO 6

6 Expressão em *Pichia pastoris*

Com o objetivo de confirmar a funcionalidade do gene identificado *Xyn10Cf*, foi realizada a expressão na linhagem de *Pichia pastoris* GS115 utilizando os promotores da álcool oxidase 1 (AOX1) ou da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Sob o controle da AOX1 (GS115ΔX10_3.4) obteve-se 5,66 U/mL em 84 h de indução, e sob o controle da GAPDH (GS115ΔX10_8.7) obteve-se 7,67 U/mL para o mesmo tempo de incubação. A massa molecular da enzima recombinante corresponde à da enzima nativa, sugerindo que o processamento pós-traducional tenha sido semelhante em ambos micro-organismos. Apesar da otimização do processo e caracterização das enzimas recombinantes serem necessárias, esse estudo serviu para confirmar as predições realizadas anteriormente.

6.1 MATERIAL E MÉTODOS

A expressão do gene *Xyn10Cf* foi realizada na linhagem de *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen), de forma induzida ou constitutiva, conforme descrito a seguir.

6.1.1 Vetores de expressão

A expressão induzida foi feita utilizando o vetor pPICZ α A (Invitrogen) sob o controle do promotor da enzima álcool oxidase 1 (AOX1), conforme Figura 6.1, a qual é induzida por metanol. Em leveduras metilotróficas, a AOX (EC 1.1.3.13) é uma enzima envolvida no metabolismo do metanol, responsável pela sua oxidação a formaldeído. E por ter baixa afinidade pelo oxigênio, as células compensam essa limitada habilidade catalítica sintetizando grandes quantidades dessa enzima (CREGG *et al.*, 1989).

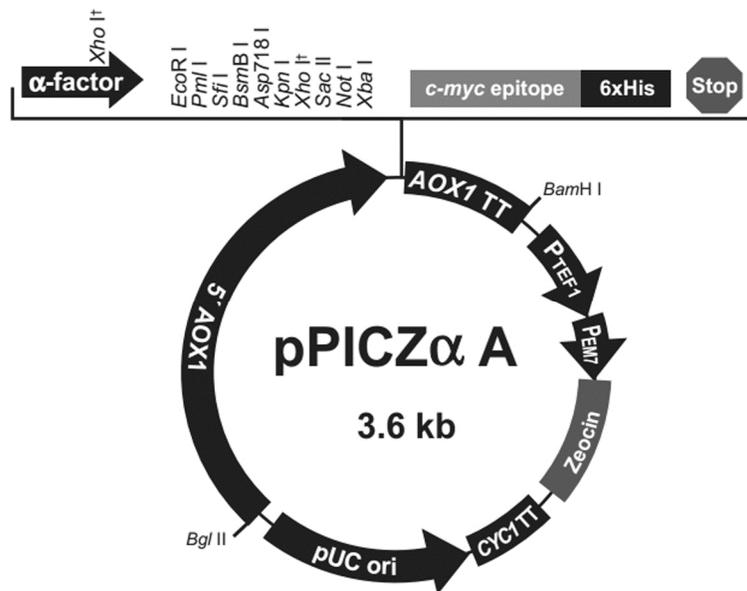


Figura 6.1. Mapa do Vetor pPICZ α A (Invitrogen).

Para expressão constitutiva, utilizou-se o vetor pGAPZ α A (Invitrogen) cujo promotor regula a expressão da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), representado na Figura 6.2. A GAPDH (EC 1.2.1.12) está constantemente expressa e em altos níveis, uma

vez que ela está envolvida tanto na glicólise quanto na gliconeogênese (WATERHAM *et al.*, 1997).

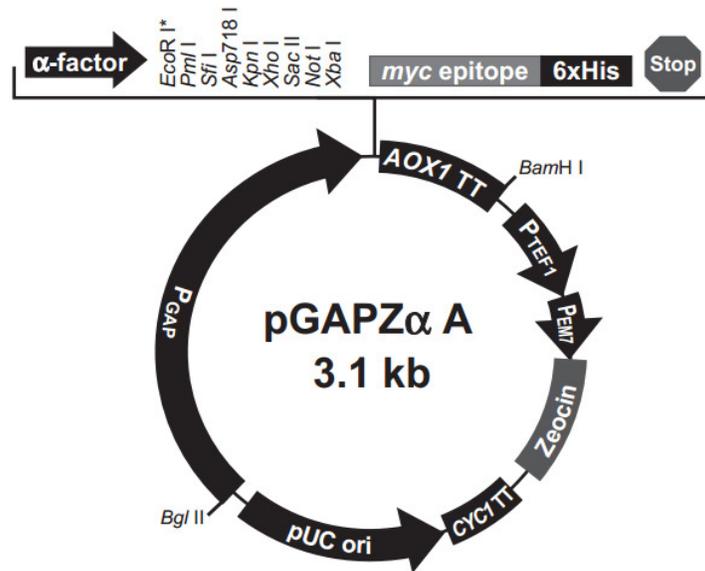


Figura 6.2. Mapa do Vetor pGAPZαA (Invitrogen)

Ambos os vetores possuem marcador de resistência à zeocina para a seleção dos clones recombinantes, que pode ser utilizado tanto em *Escherichia coli* quanto em *P. pastoris*. Os vetores contêm o fator- α (peptídeo N-terminal de *Saccharomyces cerevisiae*), como sinal de secreção, e uma cauda de poli-histidina (6xHis) no peptídeo C-terminal, para auxiliar na purificação das proteínas de fusão recombinantes.

6.1.2 Clonagem em vetor pGEM-T Easy

Para adicionar os sítios de restrição (EcoRI e NotI) às extremidades da sequência do gene *Xyn10Cf*, foram construídos os *primers* listados na Tabela 6.1. A ferramenta NEBCutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) foi utilizada para auxiliar na escolha das enzimas de restrição.

O *primer Xyn10Cf-F-sp+eco* foi desenhado a partir da base seguinte ao peptídeo sinal (nucleotídeo 40, Figura 5.6). O *primer Xyn10Cf-R+not* corresponde ao *primer XynACf-R*

adicionado do sítio de restrição da NotI e o *primer Xyn10Cf-R+not-stop* corresponde a este mesmo *primer* do qual foi excluído o códon de terminação (“TAG”) com o objetivo de adicionar a cauda de poli-histidina à enzima.

Tabela 6.1. Lista de *primers* utilizados neste capítulo para amplificação do *Xyn10Cf* e sequenciamento do vetor de expressão.

<i>Primer</i>	Sequência	Sítio de Restrição ⁽¹⁾
<i>Xyn10Cf-F-sp+eco</i>	5'- <u>GAATTC</u> GC GCCACACTCCCCTCGTTG-3'	EcoRI
<i>Xyn10Cf-R+not</i>	5'- <u>GCGGCCG</u> CCTACTTGCGAAGCGCATCTTTG-3'	NotI
<i>Xyn10Cf-R-stop+not</i>	5'- <u>GCGGCCG</u> CCTTGCGAAGCGCATCTTTG-3'	NotI
<i>5' pGAP Forward</i> ⁽²⁾	5'-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3'	-
<i>5' AOX1</i> ⁽²⁾	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'	-
<i>3' AOX1</i> ⁽²⁾	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'	-

⁽¹⁾ A sequência correspondente aos sítios de restrição adicionados estão sublinhadas

⁽²⁾ *Primers* sugeridos pelo fabricante (Invitrogen)

As duas sequências (com e sem o códon de terminação) foram amplificadas com a enzima *pfu* DNA Polimerase a partir do gene já clonado em pGEM-T Easy (Capítulo 5). Os novos produtos de PCR foram purificados, adenilados, clonados novamente em vetor pGEM-T Easy e transformados em *E. coli* DH10B. A transformação foi feita por eletroporação em Gene Pulser (BioRad), nas condições: 2,5 kV, 200 Ω , 25 μ F, em cubeta de 0,2 cm. A seleção dos transformantes foi feita em meio LB (1% tripton; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl; pH 7,5) contendo ampicilina (100 μ g/mL).

6.1.3 Clonagem nos vetores de expressão

A extração do DNA plasmidial foi feita por lise alcalina (descrita em 5.1.3.4). Tanto os plasmídeos construídos quanto os vetores de expressão (pPICZ α A e pGAPZ α A) foram digeridos com as enzimas com 1 U/ μ g de EcoRI e de NotI (Promega). As bandas de interesse foram purificadas do gel de agarose utilizando o kit Wizard SV (Promega). Com o auxílio da enzima T4 DNA ligase (Promega), o inserto contendo o códon de terminação foi

ligado ao vetor pPICZαA (pPICZαA+Xyn10) e o inserto sem o códon de terminação foi ligado ao pGAPZαA (pGAPZαA+Xyn10-stop).

Para efeitos de propagação do vetor, as ligações foram dialisadas e transformadas em *E. coli* DH10B por eletroporação, nas mesmas condições utilizadas para transformar o pGEM-T Easy. A seleção dos transformantes foi feita em meio LB com baixo teor de sal (1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 0,5% NaCl; pH 7,5) contendo zeocina (25 µg/mL).

6.1.4 Confirmação da clonagem

Para a confirmação da presença do inserto nos clones selecionados, realizou-se a extração do DNA plasmidial seguida da digestão com as enzimas EcoRI e NotI (Promega). Também foi realizado o PCR com os *primers* (Tabela 6.1) 5' *AOX1* e 3' *AOX1* para pPICZαA+Xyn10, e os *primers* *pGAP Forward* e 3' *AOX1* para amplificar o pGAPZαA+Xyn10-stop. Os produtos de PCR foram purificados, quantificado em NanoDrop e ambas as fitas foram sequenciadas utilizando sequenciador DNA ABI PRISM 377 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), conforme descrito em 5.1.1.5.

6.1.5 Transformação em GS115

O DNA plasmidial foi novamente extraído por lise alcalina, purificado e linearizado com a enzima PmeI (MssI, 5'...GTTT[^]AAAC...3', Thermo Scientific) ou com BspHI (5'...T[^]CATGA...3', New England Biolabs). O preparo das células competentes de *P. pastoris* GS115 e a transformação foram realizados de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante (Invitrogen).

6.1.6 Seleção dos transformantes

Os transformantes resistentes à zeocina (100 µg/mL) foram repassados para outra placa contendo YPD (1% extrato de levedura; 2% peptona; 1% glicose) contendo a mesma concentração de zeocina e utilizados nos testes a seguir.

6.1.6.1 Pesquisa por fenótipo Mut^+ e Mut^S

Existem dois *loci* da AOX no cromossomo da *P. pastoris*, sendo AOX1 responsável por aproximadamente 90% da atividade da AOX e o AOX2 responsável pelo restante. As técnicas de recombinação gênica utilizadas para transformar a *P. pastoris* podem resultar em manter ambos os genes funcionais (Mut^+ , *Methanol utilization plus*), apenas o AOX2 funcional (Mut^S , *Methanol utilization slow*) ou nenhum gene funcional (Mut^- , *Methanol utilization minus*) (PLA *et al.*, 2006).

Para selecionar os transformantes com o fenótipo Mut^+ , os clones resultantes da integração do pPICZ α A-Xyn10 foram crescidos em placas contendo o meio MDH (1,34% Yeast Nitrogen Base / YNB; 4×10^{-5} % biotina; 2% dextrose; 0,004% histidina) por 48 h a 30 °C. Após esse período, os clones foram repicados em uma placa contendo MDH e outra contendo MMH (1,34% YNB; 4×10^{-5} % biotina; 0,5% metanol; 0,004% histidina), nas mesmas condições de incubação. Após 48 h, passou-se a verificar quais os transformantes não obtiveram crescimento (Mut^-) ou cresceram lentamente (Mut^S), sendo que os que tiveram crescimento mais rápido (Mut^+) foram selecionados.

6.1.6.2 Pesquisa pela produção da enzima funcional extracelular

A produção de enzima em pequena escala foi realizada em tubos contendo MMH (pPICZ α A+Xyn10) ou YDP (pGAPZ α A+Xyn10-stop), incubados a 28 °C e 200 rpm. A produção e secreção da enzima foi feita pela análise qualitativa (tópico 6.1.9.2) do sobrenadante em 24 e 60 h de incubação. Células rompidas também foram utilizadas para verificar a produção da enzima intracelular.

6.1.7 Produção da enzima recombinante

A produção da enzima recombinante pelos clones selecionados foi realizada em frascos agitados, em YPD ou MMH, conforme sugerido pelo fabricante dos plasmídeos (Invitrogen). Após selecionar os transformantes com maior atividade, foram realizadas novas curvas em YPD ou BMMY (1% extrato de levedura; 2% peptona; 100 mM fosfato de potássio pH 6,0; 1,34% YNB; 4×10^{-5} % biotina; 3% metanol), sendo o meio BMMY suplementado com metanol a cada 24 h para compensar perdas por evaporação.

6.1.8 Purificação parcial das enzimas

A enzima contendo a cauda de poli-histidina foi purificada utilizando o *kit His SpinTrap Talon* (GE Healthcare), conforme recomendações. Já a enzima sem a cauda foi primeiramente precipitada com etanol 70% (v/v) e ressuspendida em tampão citrato (50 mM, pH 5,3). Posteriormente, foi purificada em sistema FPLC utilizando a resina de troca iônica Q Sepharose (GE Healthcare) em um volume de leito de 10 mL. Após equilibrar a coluna com tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0), foram injetados 2 mL de amostra e foi feita lavagem seguida da aplicação de um gradiente salino de 0 a 1 M de NaCl, sempre em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0).

6.1.9 Métodos Analíticos

6.1.9.1 Determinação de proteínas.

As proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando albumina bovina (Sigma) como padrão.

6.1.9.2 Atividade de endo-xilanase (qualitativa)

Para determinação da presença ou ausência de atividade, 20 µL da amostra foram adicionados a 180 µL de tampão citrato 50 mM (pH 5,3) contendo 1% (m/v) de xilana de faia em microplaca de 96 poços de 2,2 mL (tipo “deep well”). A microplaca foi incubada em banho-maria a 50°C por 12 h ou 70°C por 2 h. Após, foram adicionados 200 µL do reagente de DNS, a mistura foi fervida por 5 min e levada ao banho de gelo. As amostras contendo enzima ativa foram identificadas por diferença de coloração e submetidas a ensaios de quantificação (item 6.1.9.3).

6.1.9.3 Atividade de endo-xilanase (quantitativa)

A atividade de xilanase foi determinada pela quantificação de açúcares redutores (xilose) liberados na reação de hidrólise da xilana, de acordo com metodologia descrita em 4.1.5.1, exceto pelos tempos de coleta de amostras (2, 4, 6 e 8 min).

6.1.9.4 Gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

As proteínas foram visualizadas em SDS-PAGE na concentração de 12% para o gel de separação e 4% para o gel de empilhamento de acordo com Laemmli (1970), conforme descrito no tópico 4.1.3.4 do Capítulo 4.

6.2 RESULTADOS

Às extremidades do *Xyn10Cf* foram adicionados os sítios de restrição, por PCR, e o novo inserto foi clonado em vetor pGEM-T Easy visando a sua propagação. Os plasmídeos foram extraídos por lise alcalina e digeridos com *EcoRI* e *NotI* para gerar o sítio de ligação ao novo vetor.

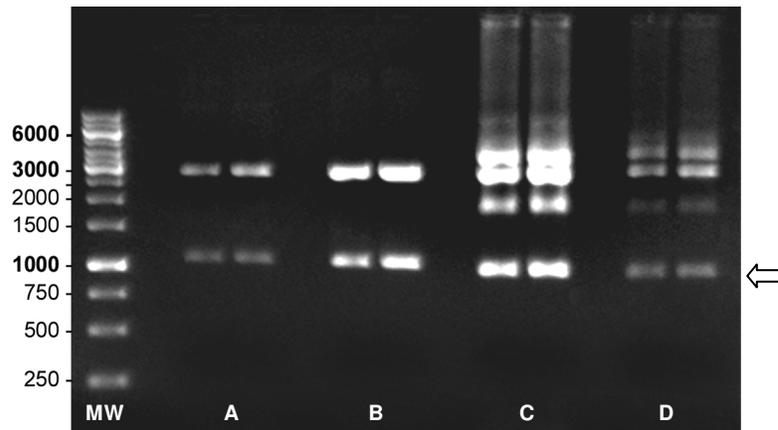


Figura 6.3. Digestão do pGEM-T Easy para remoção do inserto (indicado pela seta), utilizando as enzimas *EcoRI* e *NotI*, sendo que A, B, C e D representam diferentes extrações.

As bandas correspondentes aos insertos (aproximadamente 1 kb) foram purificadas e ligadas aos respectivos vetores de expressão, os quais foram transformados novamente em células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B. Os clones recombinantes foram selecionados pela resistência à zeocina, sendo que de 10 a 20 colônias foram escolhidas aleatoriamente para verificar a presença do inserto. Exemplos de plasmídeos extraídos por lise alcalina estão apresentados na Figura 6.4.

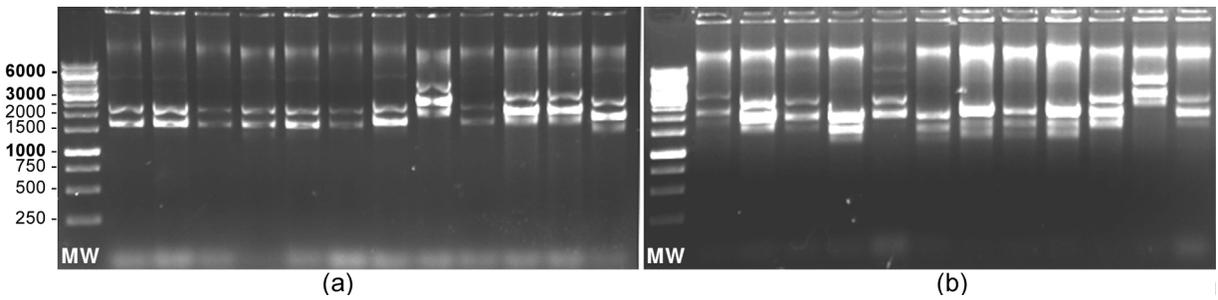


Figura 6.4. Vetores de expressão pPICZαA (a) e pGAPZαA (b) extraídos por lise alcalina. Padrão de massa molecular (MW) 1 kb DNA Ladder (Invitrogen)

Os plasmídeos de maior tamanho aparente, foram selecionados para a confirmação da presença do inserto, através da digestão (utilizando as enzimas EcoRI e NotI) e também do PCR (Figura 6.4) com os *primers* indicados para cada vetor (ver Tabela 6.1).

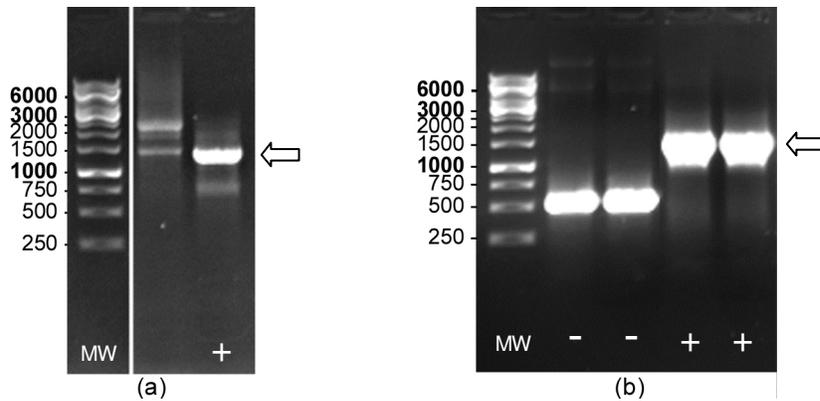


Figura 6.5. Exemplo de amplificação do pPICZαA (a) e pGAPZαA (b) com os *primers* dos vetores para a confirmação do inserto (indicado pela seta)

Cada plasmídeo com o inserto contém 588 pb (pPICZαA) ou 540 pb (pGAPZαA) mais 1035 pb (ou 1032 pb sem o códon de terminação) correspondentes ao *Xyn10Cf*. Sendo, portanto, o plasmídeo desejado aquele que contém em torno de 1,6 kb. Para cada construção foi selecionado um transformante o qual foi estocado e utilizado para propagar os vetores.

Posteriormente, os vetores foram linearizados e o gene *Xyn10Cf* foi integrado no *locus* da *AOX1* ou no *locus* da GAPDH da *P. pastoris* GS115. A seleção dos clones recombinantes foi feita pela resistência à zeocina, pelo fenótipo Mut⁺ (no caso da integração em *AOX1*) e pela atividade enzimática extracelular em tubos de 15 mL. Os clones que apresentaram

atividade de xilanase (qualitativa) foram selecionados para o acompanhamento da produção de enzima em até 96 h.

Dentre os selecionados, o clone GS115 Δ X10_3.4 (AOX1) e o GS115 Δ X10_8.7 (GAPDH) foram os que apresentaram maiores atividades no *screening* e, por isso, foram utilizados para produção da enzima em frascos agitados. O acompanhamento do crescimento celular e as curvas de atividades estão representados nas Figuras 6.6 e 6.7, respectivamente.

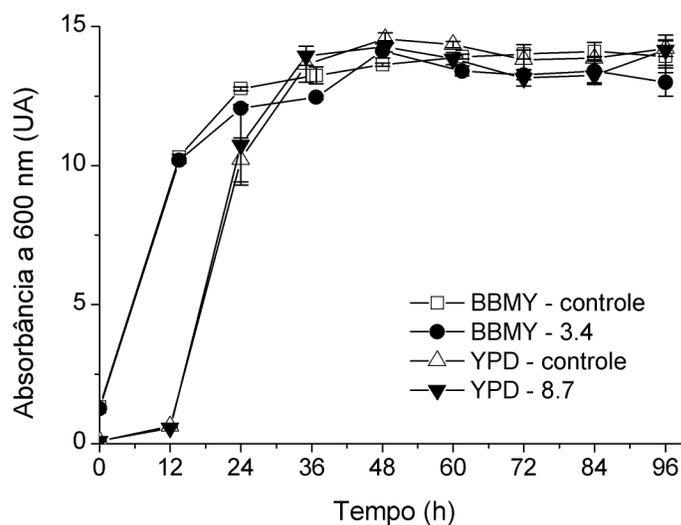


Figura 6.6. Crescimento celular de clones recombinantes de *P. pastoris* GS115 para xilanases, para expressão induzida em BMMY e constitutiva em YPD, utilizando linhagem não transformada como controle.

Analisando a Figura 6.6, percebe-se que a partir de 48 h de incubação o crescimento microbiano foi estabilizado, atingindo aproximadamente 14 UA (unidades de absorbância). No início da incubação, a densidade celular dos clones em YPD foi menor que em BMMY devido à quantidade de células inoculadas ser inferior. Isso porque, para indução em BMMY, as células são previamente crescidas em meio no qual há a substituição do metanol por glicerol (BMMY) com o intuito de obter mais biomassa no início do processo.

Nas condições ensaiadas, *P. pastoris* atingiu níveis de densidade celular superiores aos obtidos anteriormente pelo *Cryptococcus flavescens* em meio contendo xilana. Além disso, o sobrenadante dos clones recombinantes foram mais límpidos e menos viscosos, devido à ausência da xilana e de outros polissacarídeos (como aquele produzido pelo

Cryptococcus flavescens, conforme discutido no Capítulo 4), facilitando a manipulação e futuros estudos de recuperação e purificação da enzima.

A Figura 6.7 apresenta os dados obtidos para a atividade extracelular. Como foi possível expressar as enzimas de formas funcionais, considera-se que o gene *Xyn10Cf* predito realmente corresponda a uma xilanase.

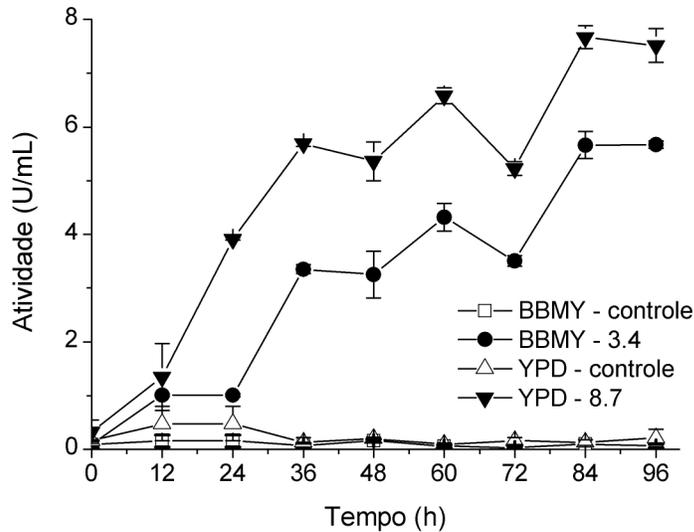


Figura 6.7. Atividade de xilanases em clones recombinantes de *P. pastoris* GS115 em condições induzidas (BMMY) ou constitutivas (YPD), utilizando linhagem não transformada como controle.

A Figura 6.7 demonstra que as maiores atividades foram obtidas pelo clone GS115ΔX10_8.7, atingindo 7,67 U/mL em 84 h de indução. Já o GS115ΔX10_3.4 alcançou 5,66 U/mL nesse mesmo período de tempo. Tanto em BMMY quanto em YPD, a linhagem GS115, utilizada como controle negativo, não apresentou atividade de xilanase.

Apesar dos níveis de expressão das enzimas recombinantes serem aparentemente superiores àqueles que tinham sido encontrados para a produção do *C. flavescens*, esses níveis podem ser aumentados através das construções de plasmídeos contendo múltiplas cópias do gene, visando a superexpressão. Além disso, a otimização do meio e das condições de cultivo pode aumentar consideravelmente a produção da enzima. A utilização de fermentadores de bancada ao invés de frascos agitados pode melhorar o rendimento, principalmente pelo controle da aeração nos cultivos utilizando metanol, uma vez que a taxa de transferência de oxigênio é uma etapa limitante. No metabolismo do metanol, a oxidação do metanol com a utilização de oxigênio molecular é o primeiro passo tanto para produção

de energia quanto para assimilação de carbono. Entretanto, alto suprimento de oxigênio pode levar ao acúmulo de formaldeído, principalmente na fase de indução (BAUMANN *et al.*, 2008).

A expressão de genes sob o controle do promotor da AOX1 é fortemente regulada pela presença ou ausência de metanol, permitindo que haja um rigoroso controle de indução ou repressão. Por isso, a utilização desse promotor é feita em processos contendo pelo menos duas etapas independentes, uma de obtenção de biomassa e outra de indução para a produção da proteína recombinante. Esse tipo de estratégia é conveniente nos casos em que o produto é tóxico à célula da levedura. Entretanto, quando não há problema de inibição pelo produto formado, a utilização do promotor da GAPDH é mais vantajosa uma vez que ele não exige que seja feita a troca da fonte de carbono durante a fermentação (CEREGHINO *et al.*, 2001).

A utilização do promotor da GAPDH, pode ser uma forte alternativa para utilização em grandes escalas uma vez que o metanol é altamente inflamável e seu uso em escalas maiores apresenta grandes riscos. Outro fator que deve ser levado em consideração é que o metanol é derivado de petroquímicas e, portanto, seu uso é restrito em muitos processos envolvendo alimentos e aditivos (WATERHAM *et al.*, 1997).

Nesse estudo, embora as condições não tenham sido otimizadas, a produção da enzima foi mais eficiente utilizando o promotor da GAPDH. A presença de metanol, mesmo que diluído, pode ter interferido na quantificação da atividade enzimática. Além do mais, diferentemente do que acontece para o metanol, o monitoramento dos níveis de açúcares no meio pode ser feito por métodos simples e rápidos, como pela quantificação de açúcares redutores. Apesar de não ser tão precisa quanto os métodos cromatográficos, essa metodologia é útil para estimar a quantidade de substrato presente no meio quando não é possível contar com a disponibilidade de cromatógrafos, com *kits* enzimáticos ou com sensores específicos para este fim.

Com intuito de comparar a massa molecular das enzimas recombinantes com a da enzima nativa purificada (conforme Capítulo 4), a enzima produzida pelo clone recombinante GS115ΔX10_3.4 foi purificada por cromatografia de troca iônica, em sistema FPLC utilizando coluna Q Sepharose. Já a enzima produzida pelo clone GS115ΔX10_8.7, por conter a cauda de poli-histidina, foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando as colunas *His SpinTrap TALON* para microcentrífugas. As bandas correspondentes a essas enzimas estão apresentadas na Figura 6.8.

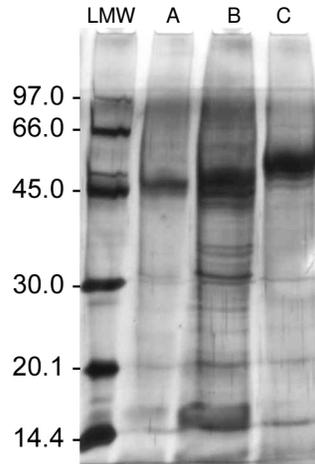


Figura 6.8. Perfil de proteínas de soluções enzimáticas em SDS-PAGE corado com nitrato de prata, enzima nativa purificada (A) e enzimas recombinantes sem (B) e com (C) cauda de poli-histidina.. Padrão de baixa massa molecular (LMW, GE Healfcare).

Conforme visualizado na Figura 6.8, a semelhança entre as massas moleculares (aproximadamente 48 kDa) da enzima nativa (A) e da enzima recombinante (B) sugere que ambos micro-organismos (*Cryptococcus* e *Pichia*) apresentaram capacidade semelhante de glicosilação. Sendo que essa afirmação poderá ser verificada futuramente pelo tratamento com endoglucanases e por análise em espectrometria de massas (PAN *et al.*, 2011).

O sinalizador fator- α foi processado corretamente, uma vez que a enzima foi secretada e que o seu não-processamento seria responsável pelo acréscimo de 9,3 kDa no tamanho da enzima. Já a adição da cauda de poli-histidina aumentou em 2,5 kDa a massa molecular da enzima (Figura 6.8C), como pode ser verificado pela pequena diferença da posição das bandas.

De acordo com a Figura 6.8, as proteínas recombinantes (B e C) foram parcialmente purificadas, uma vez que há a presença de outras proteínas mesmo que em menores quantidades. Neste estudo, a purificação parcial foi suficiente para concentrar e visualizar a enzima. Entretanto, para estudos de caracterização, maior pureza pode ser obtida pela inclusão de uma etapa cromatográfica de permeação em gel (GPC), como realizada no Capítulo 4. A utilização do GPC também foi utilizada por Gonçalves *et al.* (2012) após purificação por cromatografia de afinidade, melhorando a qualidade da purificação.

6.3 CONCLUSÕES

Foi possível expressar o gene *Xyn10Cf* em *Pichia pastoris* GS115, tanto de forma induzida quanto constitutiva. Em meio não otimizado, as maiores atividades de xilanase foram para a expressão sob o controle da GAPDH (GS115ΔX10_8.7), atingindo 7,67 U/mL em 84 h de incubação, sendo que sob o controle da AOX1 (GS115ΔX10_3.4) obteve-se 5,66 U/mL. Apesar da enzima recombinante apresentar maior atividade que a enzima nativa, esse aumento foi muito sutil e, por isso, para viabilização da produção da enzima pelo *Xyn10Cf*, esses níveis de secreção precisam ser otimizados. A utilização do promotor da GAPDH mostrou-se uma boa alternativa para dar continuidade aos estudos, uma vez que o uso de metanol requer maiores cuidados de manipulação por parte do operador e carece de métodos simples para quantificação dos níveis de substrato no meio, dependendo da disponibilidade do uso de métodos cromatográficos. Além disso, a presença do metanol pareceu interferir negativamente na quantificação da atividade da enzima.

Desta forma, os resultados deste capítulo confirmam a funcionalidade da predição do *Xyn10Cf* e servem como base para estudos posteriores de produção, caracterização e aplicação da enzima recombinante na produção de xilo-oligossacarídeos, uma vez que os XOS de cadeia curta produzidos por ela são de grande interesse industrial.

6.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUMANN, K.; MAURER, M.; DRAGOSITS, M.; COS, O.; FERRER, P.; MATTANOVICH, D. Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 177–183, 2008.

CEREGHINO, G. P. L.; SUNGA, A. J.; CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Expression of foreign genes in the yeast. In: SETLOW, J.K. (Ed). **Genetic engineering: principles and methods: principles and methods**. v. 23, p. 157–169, Springer, 2001.

CREGG, J. M.; MADDEN, K. R.; BARRINGER, K. J.; THILL, G. P.; STILLMAN, C. A. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Molecular and Cellular Biology**. v. 9, n. 3, 2001.

GONÇALVES, T. A.; DAMÁSIO, A. R. L.; SEGATO, F.; ALVAREZ, T. M.; BRAGATTO, J.; BRENELLI, L. B.; CITADINI, A. P. S.; MURAKAMI, M. T.; RULLER, R.; PAES LEME, A. F.; PRADE, R. A.; SQUINA, F. M. Functional characterization and synergic action of fungal

xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 293–299, 2012.

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

PAN, S.; CHEN, R.; AEBERSOLD, R.; BRENTNALL, T. A. Mass spectrometry based glycoproteomics from a proteomics perspective. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2011.

PLA, I. A.; DAMASCENO, L. M.; VANNELLI, T.; RITTER, G.; BATT, C. A.; SHULER, M. L. Evaluation of Mut⁺ and Mut^S *Pichia pastoris* phenotypes for high level extracellular scFv expression under feedback control of the methanol concentration. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 3, p. 881–888, 2006.

WATERHAM, H. R.; DIGAN, M. E.; KOUTZ, P. J.; LAIR, S. V; CREGG, J. M. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. **Gene**, v. 186, n. 1, p. 37–44, 1997.

CAPÍTULO 7

7 Considerações finais

7.1 CONCLUSÃO GERAL

Com base nos estudos realizados no decorrer deste projeto, foi possível concluir que:

- Ao utilizar bagaço pré-tratado por explosão a vapor, o micro-organismo *Cryptococcus flavescens* LEB-AY₁₀ produziu maiores quantidades de xilanase para as condições brandas de pré-tratamento (12 kgf/cm²), apresentando atividade de 1,97 U/mL nesse substrato ou de 1,92 U/mL na sua fração C5 correspondente;
- Através de técnicas de planejamento experimental foi possível aumentar a atividade enzimática em 5,6 vezes em relação aos testes iniciais, para o cultivo com a fração C5 do bagaço pré-tratado em condições brandas, obtendo-se 4,67 U/mL (a 50 °C) ou 8,33 U/mL (a 80 °C) e 6,12 g/L de biomassa em 96 h de incubação induzida a 30 °C;
- O micro-organismo *C. flavescens* LEB-AY₁₀ foi capaz de produzir uma xilanase de massa molecular estimada em 48 kDa cuja purificação foi realizada através de duas etapas cromatográficas (troca iônica e exclusão molecular), com uma recuperação de 45% da atividade inicial;
- A xilanase purificada apresentou atividade ótima na faixa de pH de 4,5 a 6,0, e na temperatura de 77,5 °C. Nessa temperatura e pH 5,3, a meia-vida da enzima foi de 9,2 min ou 33,74 h a 67 °C;
- As constantes cinéticas em xilana de bétula, K_m e v_{max} , foram 4,13 mg/L e 2,32 U/mL, respectivamente. Essa xilanase também apresentou atividade de xilosidase em pNPX e de celulase em CMC;
- Os principais produtos da hidrólise da xilana foram xilobiose e xilotriose, os quais são considerados xilo-oligossacarídeos de grande interesse industrial;
- O genoma do *C. flavescens* LEB-AY₁₀ apresentou 20 Mbases, determinado por sequenciamento em plataforma Illumina HiSeq2000, com cobertura de até 170x;

- De acordo com a predição, o gene de xilanase possui 1285 pb, sendo interrompido por 6 íntrons. A região codificante possui 1035 pb e resulta em uma proteína de 344 aminoácidos;
- O peptídeo sinal predito foi composto por 13 aminoácidos e a massa molecular da proteína madura foi estimada em 37,1 kDa. Esta diferença entre a predição e os 48 kDa estimados para a proteína purificada pode ser devido à glicosilação;
- O ponto isoelétrico calculado com base na estrutura primária da proteína foi próximo a 4,6.
- A xilanase apresentou baixa identidade com os genes descritos até o momento (máximo de 54% com xilanase de *C. adeliensis*);
- Baseado nos ensaios de caracterização, nos domínios conservados e na sequência predita de aminoácidos, esta xilanase foi classificada como membro da família GH10;
- *Pichia pastoris* GS115 transformada para xilanase apresentou atividades de 5,66 ou 7,67 U/mL em 84 h de incubação utilizando promotor induzido (AOX1) ou constitutivo (GAPDH), respectivamente;
- Embora a produção da enzima recombinante seja apenas um pouco superior à da enzima nativa, necessitando de otimização, este estudo confirmou a funcionalidade do gene predito para xilanase possibilitando direcionar os próximos estudos;
- E, considerando a termoestabilidade e o perfil de hidrólise da enzima, os estudos com a enzima recombinante utilizando promotor da GAPDH poderão ser direcionados para produção de pre-bióticos (xilo-oligossacarídeos) de interesse industrial.

7.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em continuidade ao estudo realizado nessa tese, sugere-se:

- A montagem e anotação do genoma do *Cryptococcus flavescens* LEB-AY₁₀;
- A busca por genes de enzimas degradadoras de parede celular vegetal para entender o mecanismo de hidrólise utilizado pelo *Cryptococcus flavescens*;
- A caracterização da enzima expressa, como: condições ótimas de operação, estabilidade, parâmetros cinéticos, e co-fatores;
- A construção do plasmídeo contendo múltiplas cópias do gene e a realização de ensaios de produção enzimática em fermentadores de bancada;
- A co-expressão com o gene de β -xilosidase visando a produção de xilose a partir de compostos lignocelulósicos;
- A avaliação da utilização desta enzima em coquetéis enzimáticos para auxiliar na hidrólise de diferentes matérias-primas lignocelulósicas;
- A análise da estrutura conformacional e a engenharia da enzima para melhorar sua atividade e estabilidade;
- O estudo das melhores condições da enzima recombinante para produção de xilo-oligossacarídeos, utilizando a enzima livre ou imobilizada.

ANEXOS

8 Publicações relacionadas

A seguir estão apresentadas as publicações relacionadas com o trabalho de tese desenvolvido. O primeiro artigo, *Thermo-stable xylanases from non conventional yeasts*, foi publicado na revista *Journal of Microbial & Biochemical Technology* (OMICS, 2011) e faz parte dos estudos de mestrado de Lopes e de Motta, sendo que a colaboração foi na parte de identificação das linhagens isoladas. O artigo mostra a seleção e a caracterização do micro-organismo LEB-AY₁₀ e serviu como motivação e base para a presente tese. A segunda publicação, intitulada *A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications*, consiste em um capítulo do livro *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization* (InTech, editado por Dr. Anuj Chandel, 2013) e nele contém parte do conteúdo escrito no Capítulo 2 desta tese. E o último artigo, *Purification, Characterization and Cloning of a Thermo-stable GH10 Xylanase from Cryptococcus flavescens LEB-AY₁₀*, está em fase de preparação e corresponde ao conteúdo dos Capítulos 4 e 5 desta tese.

ARTIGO I



Thermo-Stable Xylanases from Non Conventional Yeasts

Lopes F^{1*}, Motta F², Andrade C C P³, Rodrigues M P and Mauger-Filho F³¹Development of Biotechnological Processes Laboratory, Biotechnological Processes Department, University of Campinas, P.O. Box 6066, 13081-970, Campinas, SP, Brazil²Amyris Brasil S.A., 315, James Clerk Maxwell Street, 13069-380, Campinas, SP, Brazil³Bioprocess Engineering Laboratory, Food Engineering Department, University of Campinas, P.O. Box 6121, 13081-970, Campinas, SP, Brazil

Abstract

Xylanase is a commercial enzyme that has considerable applications in different types of industries, such as the feed, food, textile and paper industries, amongst others. The main goal of the present work was to select and evaluate the enzyme production from isolated wild yeasts strains obtained from several different Brazilian regions. From a total of 349 strains, two were selected, namely LEB-AAD₆ and LEB-AY₁₀, which produced fairly stable enzymes. The characterization studies showed that the strain LEB-AAD₆ produced an enzyme with the following optimal range: temperature from 57.5 to 67.5 °C and pH from 4.7 to 5.5, with a half-life of 21.33 hours at 52°C and pH 5.3, V_{max} of 1.77 μmol/mL.min and Km of 0.44 g/L. The enzyme from strain LEB-AY₁₀ showed the following optimal range: pH from 4.1 to 4.8 and temperature around 80°C, with a half-life of 11.21 hours at 72°C and pH 5.3, V_{max} of 5.47 μmol/mL.min and Km of 1.37 g/L. Xylanase from LEB-AY₁₀ strain is more Thermo-stable than that of LEB-AAD₆, both of which belongs to *Cryptococcus* sp. After optimized using two experimental designs, xylanase production increased by 600%, reaching 11.25 IU/mL under the optimal fermentation conditions (30°C, initial pH of 6.0 and 20 g/L of xylan as substrate).

Keywords: Xylanase; Enzyme characterization; Wild yeast selection; Xylan

Introduction

The enzymatic hydrolysis of xylan is one of the most important industrial bioprocesses, xylan being the second most abundant natural polysaccharide [1,2]. It is a heteropolysaccharide consisting of a chain of β-1,4-linked D-xylanopyranose units with substitution by acetyl, arabinosyl and glucopyranosyl residues. The complete hydrolysis of xylan requires the action of several enzymes, including endo-1,4-β-D-xylanase (EC3.2.1.8), which is crucial for xylan depolymerization. Xylanases have applications in animal feed digestion, food industries and as bleaching agents in the pulp and paper industries [3]. However, the main application of xylanases is in the pulp and paper industry, where they are used in pre-treatment prior to bleaching [4].

The main chain of xylan is composed of β-xylopyranose residues [2]. Xylan is the most common hemicellulosic polysaccharide in the cell walls of land plants, representing up to 30%–35% of the total dry weight [5]. Xylan is the major hemicellulose in the hardwood from angiosperms, but is less abundant in the softwood from gymnosperms, accounting for approximately 15%–30% and 7%–12% of their total dry weights, respectively [2]. The xylan from hardwood is an O-acetyl-4-O-methylglucuronoxylan, consisting of at least 70 β-xylopyranose residues [average degree of polymerization (DP) between 150 and 200], linked by β-1,4-glycosidic bonds. Every tenth xylose residue carries a 4-O-methylglucuronic acid attached to the 2 position of xylose. Hardwood xylans are highly acetylated (e.g. the birchwood xylan contains more than 1 mol of acetic acid per 2 mol of xylose), and acetylation is more frequent at the C-3 than at the C-2 position. The presence of these acetyl groups is responsible for the partial solubility of xylan in water and they are readily removed when the xylan is subjected to alkali extraction [6]. Xylans from softwood are composed of arabino-4-O-methylglucuronoxylans and they have a higher 4-O-methylglucuronic acid content than hardwood xylans, the 4-O-methylglucuronic acid residues being attached to the C-2 position. Softwood xylans are not acetylated, and instead of an acetyl group they

have α-L- arabinofuranose units linked by α-1,3-glycosidic bonds at the C-3 position of the xylose [2].

Due to the structural heterogeneity of the xylans, xylan-degrading enzyme systems include several hydrolytic enzymes, and xylan derivatives are frequently used to induce the production of xylanase by yeasts and fungi on a laboratory scale [7].

The main goal of this study was to screen wild yeast strain producers of xylanase in a liquid-state culture, using xylan as the main substrate, examine the effects of pH, temperature and substrate concentration on the crude xylanase stabilities, and optimize the production of xylanase from the selected microorganism.

Material and Methods

Screening and growth conditions

The total of 349 yeasts used in the screening process [8] was isolated from the soil and from the stems, fruits and especially from flowers of plants harvested in several Brazilian regions.

Xylanase producer cultures were selected according to their capability of degrading soluble xylan in Petri plates and a liquid cultures. The selective medium contained the following: 10.0 g/L birchwood xylan (Sigma); 0.6 g/L yeast extract; 7 g/L KH₂PO₄; 2.0 g/L K₂HPO₄; 0.1 g/L MgSO₄·7H₂O; 1.0 g/L (NH₄)₂SO₄ and 15 g/L agar. The pH was adjusted to 5.0 and plates were incubated at 30°C / 48 hours.

*Corresponding author: Lopes, F, Development of Biotechnological Processes Laboratory, Biotechnological Processes Department, University of Campinas, P.O. Box 6066, 13081-970, Campinas, SP, Brazil, Tel. +55 19 8204 0224; E-mail: fernandaplopes@yahoo.com.br

Received February 06, 2011; Accepted April 25, 2011; Published April 28, 2011

Citation: Lopes F, Motta F, Andrade CCR, Rodrigues MI, Mauger-Filho F (2011) Thermo-Stable Xylanases from Non Conventional Yeasts. J Microbiol Biotechnol 3: 036-042. doi:10.4172/1948-5948.1000049

Copyright: © 2011 Lopes F, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ARTIGO II: CAPÍTULO DE LIVRO

Chapter 10

A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications

F. L. Motta, C. C. P. Andrade and M. H. A. Santana

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/53544>

1. Introduction

The enzymatic hydrolysis of xylan, which is the second most abundant natural polysaccharide, is one of the most important industrial applications of this polysaccharide [1, 2]. The primary chain of xylan is composed of β -xylopyranose residues, and its complete hydrolysis requires the action of several enzymes, including endo-1,4- β -D-xylanase (EC3.2.1.8), which is crucial for xylan depolymerization [2]. Due to the diversity in the chemical structures of xylans derived from the cell walls of wood, cereal or other plant materials, a large variety of xylanases with various hydrolytic activities, physicochemical properties and structures are known. Moreover, xylan derivatives are frequently used to induce the production of xylanases [3] by microorganisms [4], using either solid-state or submerged fermentation [5].

Xylanases and the microorganisms that produce them are currently used in the management of waste, to degrade xylan to renewable fuels and chemicals, in addition to their use in food, agro-fiber, and the paper and pulp industries, where the enzymes help to reduce their environmental impact [6]. Oligosaccharides produced by the action of xylanases are further used as functional food additives or alternative sweeteners with beneficial properties [7].

To meet the needs of industry, more attention has been focused on the enzyme stability under different processing conditions, such as pH, temperature and inhibitory ions, in addition to its ability to hydrolyze soluble or insoluble xylans. Although many wild-type xylanases contain certain desired characteristics, such as thermostability, pH stability or high activity, no individual xylanase is capable of meeting all of the requirements of the feed and food industries. Moreover, as industrial applications require cheaper enzymes, the elevation of expression levels and the efficient secretion of xylanases are crucial to ensure the viability of

ARTIGO III: MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO

Purification, Characterization and Cloning of a Thermo-stable GH10 Xylanase from

Cryptococcus flavescens LEB-AY₁₀

Cristiane C. P. Andrade^{1,2,*} • Bruno V. Oliveira² • Odalys G. Cabrera² • Javier C. Alvarez² •
Marcelo F. Carazzolle² • Gonçalo A. G. Pereira² • Francisco Maugeri-Filho¹

¹Laboratory of Bioprocess Engineering, Faculty of Food Engineering, University of Campinas – UNICAMP, Campinas-SP, Brazil

²Laboratory of Genomic and Expression, Institute of Biology, University of Campinas – UNICAMP, Campinas-SP, Brazil

* cris.cpandrade@gmail.com

Abstract

Bioconversion of lignocellulosic residues, bio-bleaching of paper and pulp, waste treatment, food and feed industries are some potential applications of xylan degrading enzymes. With the aim of studying the potential features of novel enzymes for future applications, a thermo stable xylanase from *Cryptococcus flavescens* strain LEB-AY₁₀ (CCT 7725) was purified and characterized. Since the microorganism also produces extracellular polyanionic heteropolysaccharides, which hinders the purification of the enzyme, the enzyme purification in this work was performed in two chromatographic steps with a purification factor of 138-times and 45% recovery. The 48 kDa xylanase showed optimal activity at pH range between 4.5 and 6.0, and optimal temperature of 77.5°C (pH 4.8). Kinetic constants on birchwood xylan, k_m and v_{max} , were 4.13 mg/L and 2.32 U/mL, respectively. The xylanase from *C. flavescens* also showed minor activities against pNPX and carboxymethylcellulose. The *Xyn10Cf* gene of 1265 bp is interrupted by 6 introns resulting in a coding sequence of 1035 bp. The first 13 N-terminal amino acids are predicted as signal peptide and there are three potential sites for N-glycosylation and a threonine site of O-glycosylation. Based on mechanistic features and conserved domains, this xylanase was classified as a member of GH10 family.

Keywords: *Cryptococcus*, xylanase, purification, characterization, cloning, GH10 family

