



**Universidade de Brasília**

*Campus Universitário Darcy Ribeiro*

*Departamento de Biologia Celular*

**Caracterização de múltiplas formas de xilanases  
produzidas por *Aspergillus oryzae* quando crescido em  
resíduos têxteis.**

***ANTONIELLE VIEIRA MONCLARO***

***Brasília/DF***

***Fevereiro/2014***



**Universidade de Brasília**

***Campus Universitário Darcy Ribeiro***

***Departamento de Biologia Celular***

**Caracterização de múltiplas formas de xilanases produzidas  
por *Aspergillus oryzae* quando crescido em resíduos têxteis.**

***ANTONIELLE VIEIRA MONCLARO***

**Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho**

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

***Brasília/DF***

***Fevereiro/2014***

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, por ter me recebido (duas vezes) e me incentivado desde o início de minha vida acadêmica. Por toda dedicação, confiança, apoio, e principalmente pela paciência durante todos os anos de convivência.

À professora Dra. Eliane Noronha, pelas conversas e diversas resoluções de dúvidas surgidas durante esses anos de convívio.

Aos professores Dr. Carlos Roberto Félix, Dr. Ricardo Krüger, Dr. Félix Gonçalves de Siqueira e Dr. Carlos André, e demais professores que me deram aula, do IB e da Farmácia, muito obrigada pelo conhecimento compartilhado.

Às queridas técnicas Marísia e Margarete, companheiras de café, amigas verdadeiras e que me ajudaram em inúmeros momentos críticos.

Aos meus “irmãos” Juliana, Caio, Helder, Paula, Leonora, Gilvan, Babi, Guilherme, Marcela e Débora, e aos meus “primos” Brenda, Karen, Fran, Priscila, Day, Aline, Pedro Hamann, Elaine, Raquel e Rachel, Amanda, Jéssica, Caroll, Pedro Martins, Gláucia e Camila, Samuel, Julianna, Elisa, Renata, Andrei, Fabyano e Camila, companheiros de bancada, me aguentaram em momentos de puro estresse a momentos de felicidade extrema, com muito café, cerveja e pizza!

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia e do corredor, pelos inúmeros almoços e cafés, conversas, momentos de descontração e colaboração!

Ao estagiário Juan, por ter coletado os dados do cultivo alternativo, e ao Raysson, que me ajudou em boa parte das mil cromatografias realizadas!

Aos meus amigos e amigas de todos os cantos, companheiros de caminhada e de vida, obrigada pelas palavras de incentivo, conforto nos momentos difíceis e carinho a todo instante. Levo cada um de vocês em meu coração.

Ao meu companheiro André Gomes Pontes, que não me deixou desistir e me fez crer que sou capaz. Obrigada por todo amor, carinho, compreensão, companheirismo, apoio e cumplicidade. Sem você isso aqui definitivamente não teria dado certo.

Por fim, a minha amada família. Meus pais e meu irmão, que formam o alicerce de minha vida e são responsáveis diretos pelas minhas conquistas. Vocês são o que tenho de mais especial nessa vida! E obrigada por terem me aturado repetidas vezes de mau humor...

## **APOIO FINANCEIRO**

Esta pesquisa foi desenvolvida com o apoio financeiro da CAPES por meio de concessão de bolsa de estudos. E pelos projetos de pesquisa: Redes Sisbiota (CNPq/563260/2010-6), Rede Centro Oeste (CNPq/563823/2010-0 e FAPDF/193.000.470/2011) Universal (CNPq/470265/2011-6), Pronex (FAPDF/193000584/2009) e INCT do Bioetanol/CNPq.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xii</b>
<b>1. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
1.1 Introdução geral.....	13
1.2 Holocelulases e degradação da biomassa lignocelulósica.....	15
1.3 Resíduos da indústria têxtil.....	22
1.4 Fungo filamentosso <i>Aspergillus oryzae</i> .....	23
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2 Objetivo específico.....</b>	<b>26</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1 Reagentes.....	27
3.2 Resíduos da indústria têxtil.....	27
3.3 Pré-tratamento.....	27
3.4 Composição dos resíduos da industrial têxtil.....	28
3.5 Isolamento, identificação e manutenção do fungo <i>A. oryzae</i> .....	28
3.6 Cultivo de <i>A. oryzae</i> para produção de enzimas.....	28
3.7 Atividade enzimática padrão.....	29
3.8 Dosagem de proteínas totais.....	30
3.9 Purificação de holocelulases produzidas por <i>A. oryzae</i> .....	30
3.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) .....	32
3.11 Zimograma.....	33
3.12 Análise das amostras por espalhamento de luz dinâmico (ELD) e efeito do Tween-80.....	33
3.13 Efeito de temperatura.....	34
3.14 Efeito do pH.....	34
3.15 Termoestabilidade.....	34

3.16 Efeito de íons metálicos e modificadores de aminoácidos.....	34
3.17 Parâmetros cinéticos.....	35
3.18 Efeito de licor de auto-hidrólise.....	35
3.19 Efeito de compostos fenólicos.....	36
3.20 Espectrometria de massa.....	36
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
4.1 Produção de holocelulases por <i>A. oryzae</i> cultivado nos resíduos têxteis..	38
4.2 Condições de cultivo de <i>A. oryzae</i> nos resíduos têxteis.....	45
4.3 Estratégia de purificação das xilanases de <i>A. oryzae</i> crescido em resíduos têxteis.....	46
4.4 Purificação de xyl-1 e xyl-7.....	49
4.5 Purificação parcial de multi-formas de xilanase.....	54
4.6 Caracterização das xilanases de <i>A. oryzae</i> crescido em resíduos têxteis...	67
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>6. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>79</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>80</b>
<b>Apêndice 1:</b> Capítulo publicado no livro: Fungal enzymes – Chapter 11: The Role of $\alpha$ -Glucuronidase in the Deconstruction of Plant Cell Wall Structure.....	<b>91</b>
<b>Anexo A:</b> Protocolo para determinação de celulose, hemicelulose, lignina e extraíveis.....	<b>107</b>
<b>Anexo B:</b> Protocolo para identificação molecular de <i>A. oryzae</i> .....	<b>109</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estrutura da parede celular dos resíduos agroindustriais.....	<b>15</b>
<b>Figura 2</b>	Estrutura e composição da parede primária e secundária.....	<b>16</b>
<b>Figura 3</b>	Esquema das etapas de purificação das amostras provenientes do cultivo padrão.....	<b>32</b>
<b>Figura 4</b>	Curvas de indução de holocelulases de <i>A. oryzae</i> cultivado em PL-nt e gel SDS-PAGE referente a alíquotas retiradas nos dias ímpares da curva de indução.....	<b>39</b>
<b>Figura 5</b>	Curvas de indução de holocelulases de <i>A. oryzae</i> cultivado em PL-t e gel SDS-PAGE referente a alíquotas retiradas nos dias ímpares da curva de indução.....	<b>40</b>
<b>Figura 6</b>	Curvas de indução de holocelulases de <i>A. oryzae</i> cultivado em PF-nt e gel SDS-PAGE referente a alíquotas retiradas nos dias ímpares da curva de indução.....	<b>41</b>
<b>Figura 7</b>	Curvas de indução de holocelulases de <i>A. oryzae</i> cultivado em PF-t e gel SDS-PAGE referente a alíquotas retiradas nos dias ímpares da curva de indução.....	<b>42</b>
<b>Figura 8</b>	Perfil proteico do ultrafiltrado das amostras em SDS-PAGE.....	<b>48</b>
<b>Figura 9</b>	Estratégia de purificação de xilanases.....	<b>49</b>
<b>Figura 10</b>	Perfil cromatográfico do ultrafiltrado de PF-t, gel SDS-PAGE das frações não coletadas e gel SDS-PAGE das frações reunidas.....	<b>50</b>
<b>Figura 11</b>	Análise por espectrometria de massa de xyl-1 purificada.....	<b>52</b>
<b>Figura 12</b>	Espalhamento de luz dinâmico de xyl-1.....	<b>53</b>
<b>Figura 13</b>	Perfil cromatográfico do ultrafiltrado de PF-t e gel SDS-PAGE das frações reunidas.....	<b>55</b>
<b>Figura 14</b>	Perfil cromatográfico do ultrafiltrado de PL-t e gel SDS-PAGE das frações reunidas.....	<b>57</b>
<b>Figura 15</b>	Espalhamento de luz dinâmico de xyl-5.....	<b>58</b>
<b>Figura 16</b>	Espalhamento de luz dinâmico de xyl-6.....	<b>60</b>
<b>Figura 17</b>	Espalhamento de luz dinâmico de xyl-8.....	<b>61</b>
<b>Figura 18</b>	Espalhamento de luz dinâmico de xyl-9.....	<b>62</b>
<b>Figura 19</b>	Efeito do pH na atividade xilanólica de xyl-1 e EB de PF-t.....	<b>67</b>

<b>Figura 20</b>	Efeito da temperatura na atividade xilanolítica de xyl-1, xyl-2, xyl-7 e EB de PF-t.....	<b>68</b>
<b>Figura 21</b>	Efeito da temperatura na atividade xilanolítica de xyl-6, xyl-5 e EB de PF-nt.....	<b>69</b>
<b>Figura 22</b>	Efeito da temperatura na atividade xilanolítica de xyl-8, xyl-3, xyl-9 e EB de PL-t.....	<b>69</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Análise bromatológica dos resíduos têxteis pré-tratados.....	<b>43</b>
<b>Tabela 2</b>	Comparação dos resíduos têxteis com cultivo padrão e cultivo alternativo quanto à produção de xilanase.....	<b>45</b>
<b>Tabela 3</b>	Comparação entre atividade enzimática (UI/mL) e atividade específica (UI/mg) dos extratos brutos de PL-nt, PL-t, PF-nt e PF-t.....	<b>46</b>
<b>Tabela 4</b>	Comparação entre atividade enzimática (UI/mL) e atividade específica (UI/mg) dos extratos brutos, concentrados e ultrafiltrados de PL-nt, PL-t, PF-nt e PF-t.....	<b>47</b>
<b>Tabela 5</b>	Efeito do Tween-80 0,1% (v/v) sobre a atividade xilanolítica das amostras.....	<b>63</b>
<b>Tabela 6</b>	Resumo das etapas de purificação para xyl-1, xyl-2, xyl-3, xyl-5, xyl-6, xyl-7, xyl-8, xyl-9, xyl-11 e xyl-12 produzidas por <i>A. oryzae</i> .....	<b>65</b>
<b>Tabela 7</b>	Efeito de reagentes específicos e aminoácidos na atividade de xyl-1 de <i>A. oryzae</i> .....	<b>70</b>
<b>Tabela 8</b>	Parâmetros cinéticos determinados para as xilanases produzidas por <i>A. oryzae</i> .....	<b>71</b>
<b>Tabela 9</b>	Termoestabilidade determinada para cada xilanase a 50°C.....	<b>72</b>
<b>Tabela 10</b>	Efeito do licor de auto-hidrólise na atividade xilanolítica.....	<b>75</b>
<b>Tabela 11</b>	Efeito dos inibidores fenólicos na atividade xilanolítica.....	<b>76</b>

## ABREVIATURAS

<b>C:</b> concentrado	<b>UF:</b> ultrafiltrado
<b>CMC:</b> carboximetilcelulose	<b>Xyl-1:</b> xilanase purificada da fração UF de PF-t
<b>DNS:</b> ácido dinitrosalicílico	<b>Xyl-2:</b> xilanase parcialmente purificada da fração C de PF-t
<b>EB:</b> extrato bruto	<b>Xyl-3:</b> xilanase parcialmente purificada da fração C de PL-t
<b>ELD:</b> espalhamento de luz dinâmico	<b>Xyl-5:</b> xilanase parcialmente purificada da fração UF de PF-nt
<b>IPD:</b> índice de polidispersividade	<b>Xyl-6:</b> xilanase parcialmente purificada da fração UF de PF-nt
<b>MALDI-TOF:</b> <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight</i>	<b>Xyl-7:</b> xilanase parcialmente purificada da fração UF de PF-t
<b>PF-nt:</b> pó de filtro não tratado	<b>Xyl-8:</b> xilanase parcialmente purificada da fração UF de PL-t
<b>PF-t:</b> pó de filtro tratado	<b>Xyl-9:</b> xilanase parcialmente purificada da fração UF de PL-t
<b>PL-nt:</b> piolho de algodão limpo não tratado	<b>Xyl-11:</b> xilanase parcialmente purificada da fração UF de PL-nt
<b>PL-t:</b> piolho de algodão limpo tratado	<b>Xyl-12:</b> xilanase parcialmente purificada da fração UF de PL-nt

## RESUMO

No presente estudo, multi-formas de xilanases, produzidas pelo fungo *A. oryzae* crescido em quatro resíduos têxteis – piolho de algodão limpo tratado e não tratado, e pó de filtro tratado e não tratado - foram purificadas e caracterizadas. A curva de indução enzimática do fungo nos resíduos indicou alta atividade xilanolítica a partir do segundo dia, mantendo-se constante ao longo de 14 dias. A suplementação com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, e utilização dos resíduos pré-tratados, aumentou a atividade das xilanases. Como os ultrafiltrados apresentaram maior atividade específica xilanolítica, deu-se continuidade com a purificação a partir destas frações. A xilanase xyl-1 foi purificada em apenas uma etapa cromatográfica, identificada por espectrometria de massa como endo- $\beta$ -1,4-xilanase de tamanho 35,55 kDa. As outras xilanases foram parcialmente purificadas em uma etapa cromatográfica e por SDS-PAGE apresentaram massa molecular estimada entre 35 kDa e 22 kDa. O espalhamento de luz dinâmico (ELD) se apresentou como uma ferramenta eficaz em avaliar o grau de pureza das amostras, a presença de agregações e tamanho das enzimas. Como as leituras de ELD mostraram agregações enzimáticas, foi adicionado Tween-80 0,1%, que foi eficaz em desagregar as xilanases, além de não influenciar na atividade enzimática. Xyl-1 apresentou atividade catalítica máxima em pH 6,0, 50°C, retendo 50% de sua atividade enzimática na faixa de pH 3,5-9,0. Xyl-1 também obteve maior afinidade ao substrato (fração solúvel de xilana de aveia) em comparação às outras estudadas ( $K_M$  4,45 mg/mL;  $V_{Máx}$  0,240 UI/mL). Além disso, as xilanases foram incubadas na presença de inibidores fenólicos provenientes da lignina e apresentaram ativação no lugar da inibição. E na presença do licor de auto-hidrólise de sabugo de milho também apresentaram ativação. Os resultados indicam que essas multi-formas de xilanase de *A. oryzae* possuem potencial para várias aplicações biotecnológicas.

## ABSTRACT

In this study, multiple-forms of xylanases produced by *A. oryzae* when grown in four textile wastes were purified and characterized. Wastes comprised–pre treated and untreated clean cotton and filter dust. The fungus displayed high amounts of xylanolytic activity from the second day onward, remaining constant up to 14 days. Growth media supplemented with ammonium sulfate as nitrogen source and with pre-treated residues increased the xylanase activity. Xylanase xyl-1 was purified in a single chromatographic step and identified as endo- $\beta$ -1,4-xylanase by mass spectrometry with a molecular mass of 35.55 kDa. Other xylanases were partially purified in one chromatographic step. Based on zymogram, xyl-8 and xyl-9 presented a molecular mass of 35 kDa whilst xyl-6, xyl-7, xyl-9 and xyl-11 presented a mass of 22 kDa. Dynamic light scattering (DLS) was effective in evaluating the degree of purity of the samples, the presence of aggregations and size of the enzymes. As DLS showed enzyme aggregates, Tween-80 0.1% was added, which proved to be an efficient disintegrator agent and did not influence enzyme activity. Xyl-1 presented the highest catalytic activity at pH 6.0, 50°C, and retaining 50% of its enzymatic activity at pH 3,5-9,0. Xyl-1 also showed higher affinity to the substrate (soluble fraction of xylan oatpelt) compared to the others ( $K_M$  4,45 mg/mL;  $V_{M\acute{a}x}$  0,240 UI/mL). Furthermore, the xylanases were incubated with phenolic inhibitors from lignin and displayed activation. The presence of an auto-hydrolysis liquor of corncob also showed activation. These findings indicate that multiple-forms of xylanases from *A. oryzae* offer potential in different biotechnological applications.

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 Introdução geral

Produtos e facilidades utilizados no nosso dia a dia, como papel, roupas, comida, medicamentos e transporte demandam altas quantidades de matéria-prima, energia, e produzem resíduos que possuem forte impacto ao meio-ambiente e na qualidade de vida. Um dos maiores desafios para a sociedade do século XXI é suprir a demanda dessas necessidades humanas sem comprometer a fonte de recursos naturais, buscando tecnologias alternativas (Jegannathan and Nielsen, 2013).

O desenvolvimento sustentável é entendido como uma mudança no processo onde a exploração de recursos, a orientação dos investimentos e dos desenvolvimentos tecnológicos e as mudanças institucionais estão em harmonia e conseguem atender as necessidades humanas sem comprometer as futuras gerações. Isto requer uma ação integrada de políticas e estratégias de desenvolvimento em contextos globais. A aplicação desses conceitos na indústria visa alcançar produções e processamentos sustentáveis através da sustentabilidade social, ecológica e ambiental. Neste contexto, a biotecnologia fornece novas oportunidades para elaboração de produtos e processos novos (Gavrilescu and Christi, 2005; Jegannathan and Nielsen, 2013).

Uma vertente importante da biotecnologia é a biocatálise, que se utiliza de materiais renováveis e gera produtos novos e funcionais menos poluentes, visando produções mais limpas. Esse processo se configura como uma ferramenta importante para sínteses industriais e uma alternativa viável para as tecnologias convencionais (Gavrilescu and Christi, 2005; Jegannathan and Nielsen, 2013; Schoemaker *et al*, 2003). A biocatálise é vista como uma área muito promissora na pesquisa e atrativa para fins industriais, não apenas por sua alta seletividade e eficiência na bioconversão do substrato em produto, mas também por que ela tende a atuar na produção de produtos relativamente puros, minimizando a geração de resíduos, e a sua utilização dispensa o uso de altas temperaturas e de solventes tóxicos. Além disso, a enzima consegue catalisar reações complexas onde os métodos químicos não são tão eficientes (Gavrilescu and Christi, 2005; Sarrouh *et al*, 2012; Shoemaker *et al*, 2003).

Para que uma enzima tenha aplicação industrial, é necessário que ela consiga realizar produção em escala e em grande quantidade, seja específica e estável, dentre outros fatores. Por isso nem toda enzima é boa candidata para utilização industrial. Atualmente, há um grande investimento em pesquisas que busquem otimizações que aumentem atividade, estabilidade e especificidade das enzimas em comparação aos coquetéis comerciais, melhorando o custo-benefício de sua produção e tornando-as mais competitivas comercialmente em relação às catálises químicas. O crescimento do mercado de enzimas industriais também é dependente de alguns fatores como inovação tecnológica e identificação e caracterização de novas enzimas candidatas (Sarrouh *et al*, 2012; Cherry and Fidantsef, 2003).

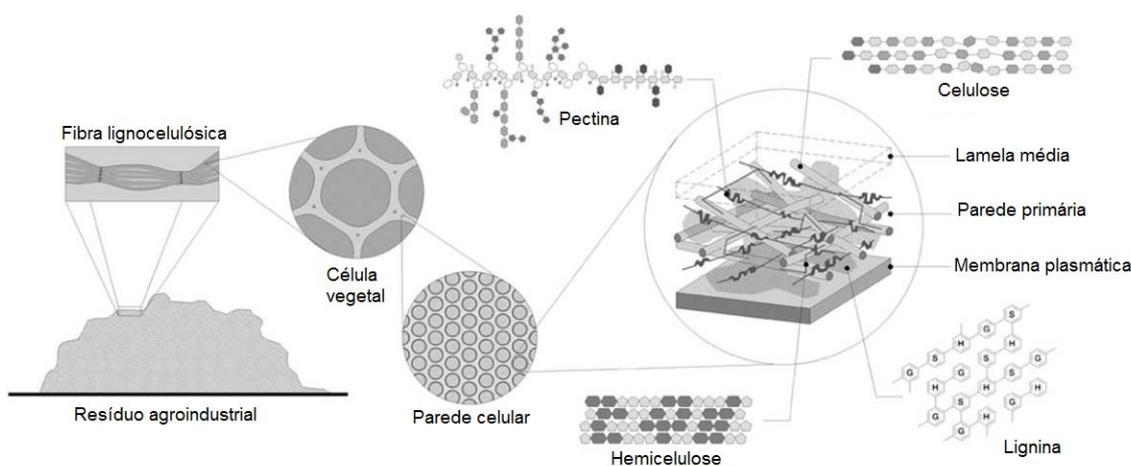
Enzimas industriais são geralmente produzidas por fermentação, em condições controladas, utilizando microrganismos como bactérias ou fungos. O critério empregado na seleção das enzimas industriais inclui especificidade, tempo de reação, pH, temperatura, estabilidade, resistência aos inibidores e afinidade ao substrato. As técnicas de produção enzimática podem ser utilizadas para adequar as reações químicas das enzimas para tipos específicos de atividades industriais e de operações (Sarrouh *et al*, 2012).

A maior parte das enzimas microbianas empregadas industrialmente é produzida por um número limitado de microrganismos, e são utilizadas principalmente nas indústrias alimentícias: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Bacillus* e *Kluyveromyces*. Dentre esses microrganismos, os fungos filamentosos se apresentam atrativos pela sua habilidade natural de secretar grandes quantidades de proteínas, metabólitos e ácidos orgânicos no meio de crescimento. Devido a essas características e outras, os fungos são utilizados amplamente pela indústria há décadas. Esta tradição levou a concessão do conceito *GRAS* – reconhecidamente seguro para utilização humana – para alguns fungos que sintetizam produtos para uso humano. Os fungos filamentosos que dominam o mercado na produção de enzimas são os anamorfos *Aspergillus niger*, *A. oryzae* e *Trichoderma reesei*. Além desses, outros fungos utilizados são *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium graminearum*, *A. sojae* e *A. japonicus* (Conesa *et al*, 2001; Nevalainen *et al*, 2005).

## 1.2 Holocelulases e degradação de biomassa lignocelulósica

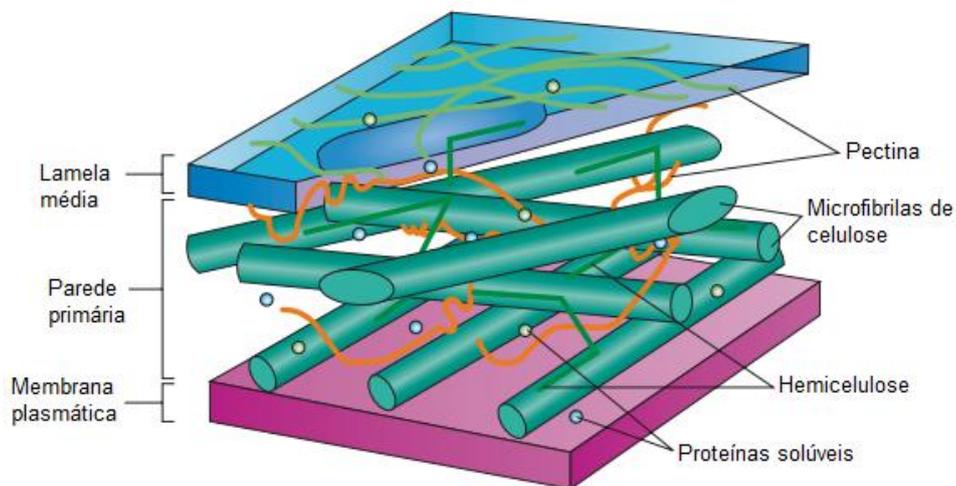
A biomassa é um termo usado para todo material orgânico de origem vegetal derivado da reação entre CO<sub>2</sub> no ar com água e luz solar, através da fotossíntese. As fontes de biomassa podem ser consideradas materiais orgânicos que armazenam energia na forma de ligação química. Dependendo do tipo de biomassa, existe um processo típico de conversão de energia associado. Por exemplo, plantas herbáceas como a cana-de-açúcar são melhores em processos de conversão de energia em meio aquoso (fermentação), enquanto pedaços de madeira e serragem, ou seja, biomassas com baixo teor de água são melhores para conversões térmicas (gasificação, combustão ou pirólise). Outros fatores considerados para se selecionar o processo de conversão de energia são as cinzas, substâncias alcalinas e componentes traços; estes podem impactar na conversão térmica e no conteúdo de celulose (Claassen *et al*, 1999; Mckendry, 2002).

Os polissacarídeos da parede celular de planta são os compostos orgânicos mais abundantes encontrados na natureza, constituindo cerca de 90% do conteúdo da parede, além de representar cerca de 70% da biomassa do planeta (figura 1). O termo holocelulose é usado para descrever os grupos de polissacarídeos presentes na parede celular e que ocorrem em estreita associação com lignina e formam uma estrutura insolúvel (Zhang *et al*, 2012; Brink and Vries, 2011; Siqueira *et al*, 2010). A parede celular é uma rede de fibrilas fortes, composta de celulose, hemicelulose, pectina, proteínas estruturais e lignina, e sua composição varia entre as espécies de plantas e entre os tecidos da própria planta (Vries and Visser, 2001; Jouanin and Minic, 2006).



**Figura 1.** Estrutura da parede celular dos resíduos agroindustriais (Adaptado de Siqueira *et al*, 2010).

Vários organismos podem degradar eficientemente a parede celular e usar os próprios produtos de degradação para nutrição, além de manter o fluxo de carbono no seu ciclo e na transformação da biomassa na natureza. Durante a vida da planta, a parede celular possui vários papéis importantes em funções fisiológicas, como comunicação intercelular, defesa contra patógenos, resistência mecânica e interação com o meio ambiente, além de ser a maior reserva fixa de carbono na natureza. As células das plantas possuem dois tipos de deposição celular em suas paredes, a primária e a secundária (figura 2). A primária é sintetizada durante a expansão celular nos primeiros estágios de desenvolvimento, é uma estrutura altamente hidratada e possui redes de microfibrilas de celulose incorporadas em compostos pécnicos, hemicelulose e glicoproteínas; a parede secundária é formada dentro da parede primária sendo muito mais densa e menos hidratada que a primária. Além disso, há uma camada exterior, a lamela média, formada basicamente de compostos pécnicos e proteínas. A composição da parede varia para cada tipo celular e seu uso como substrato para ação enzimática deve ser levada em consideração em diferentes contextos como sua complexidade e natureza (Jouanin and Minic, 2006; Siqueira *et al*, 2010; Wong *et al*, 1988).



**Figura 2.** Estrutura e composição da parede primária e secundária. (Adaptado de Sticklen, 2008).

A recalcitrância à decomposição biológica é um grande limitante para a conversão de biomassa lignocelulósica em produtos finais valiosos. A holocelulose, proteínas e ligninas, fazem a estrutura da parede celular um desafio para sistemas enzimáticos de diferentes fontes de carbono. As celulasas, hemicelulasas e pectinases pertencem ao grupo de enzimas chamadas holocelulasas. Elas são glicosil hidrolases

que mostram dois mecanismos conservados de hidrólise ácido/base das ligações glicosídicas: retenção dupla ou inversão da configuração anomérica no ponto de clivagem. Elas realizam a quebra da holocelulose por hidrólise das ligações glicosídicas, formando oligo e monossacarídeos. As exo-holocelulases agem nas ligações glicosídicas terminais e liberam unidades de monossacarídeos, enquanto endo-holocelulases hidrolisam ligações glicosídicas internas em posições específicas ou variadas. Em adição, enzimas que clivam regiões ramificadas variadas são essenciais para a completa hidrólise. As holocelulases são agrupadas em famílias de glicosil hidrolases e várias contem domínios não catalíticos de ligação ao substrato em sua estrutura, assim como sequências de ligação. A especificidade cruzada de substratos é uma das características das holocelulases. Neste caso, algumas holocelulases possuem especificidade ampla e outras restrita. A hidrólise da holocelulose por glicosil hidrolases esta relacionada com características estruturais da planta, como a natureza e extensão das ligações cruzadas entre diferentes polissacarídeos, a interação entre lignina e carboidratos, cristalização da celulose e tamanho das microfibrilas (Siqueira *et al*, 2010; Zhang *et al*, 2012).

A celulose representa o principal polissacarídeo presente na biomassa e consiste de um polímero linear não ramificado de resíduos de D-glicose. Os polímeros de celulose estão estruturados ordenadamente em fibrilas, e a função principal é de garantir a rigidez da parede celular. Estruturalmente, a celulose consiste de uma cadeia de D-glicopiranosose com ligações do tipo  $\beta$ -1,4 e condensada por ligações de hidrogênio em estruturas cristalinas, chamadas de microfibrilas. Estas microfibrilas consistem de mais de 250 cadeias de glicose e estão inseridas dentro da estrutura da hemicelulose. Além da sua estrutura cristalina, a celulose contem uma região amorfa não cristalina. A quantidade relativa de celulose cristalina e não cristalina depende de sua origem. O arranjo cristalino fornece as microfibrilas uma impermeabilidade relativa, não apenas para moléculas grandes como enzimas, mas também para moléculas pequenas como água. Além das regiões amorfas e cristalinas, existem vários tipos de irregularidades em sua superfície. Existem três classes de enzimas envolvidas na degradação da celulose: endoglicanases (EC 3.2.1.4), que hidrolisam regiões internas amorfas da cadeia principal, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos; exoglicanases, incluindo celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e glicanohidrolases (EC 3.2.1.74), que atuam nas

extremidades não redutoras da cadeia de celulose, liberando glicose (glicanohidrolases) ou celobiose (celbiohidrolases); e  $\beta$ -glicosidades (EC 3.2.1.21), que hidrolisam celobiose em glicose (Vries and Visser, 2001; Sukumaran *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2006; Lynd *et al*, 2002).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo variável e possui os açúcares D-xilose, D-manose, D-glicose, D-galactose e L-arabinose como principais monômeros presentes. A xilana é o segundo principal componente da holocelulose e mais abundante das hemiceluloses. Ela é um heteropolissacarídeo que possui uma estrutura muito variada, mas basicamente consiste de uma cadeia principal de  $\beta$ -1,4-xilose, e grupos laterais como resíduos de L-arabinofuranosil com ligações do tipo  $\alpha$ -1,2 ou  $\alpha$ -1,3 e resíduos de ácido 4-O-metil-glicurônico. As cadeias laterais podem ser estendidas, onde os resíduos de arabinofuranosil podem possuir substituintes adicionais, como o ácido-p-coumárico e o ácido ferúlico. Além disso, os resíduos de xilose na cadeia principal podem ser acetilados. As xilanas podem ser classificadas em arabinoxilana, glicuronoxilana e glicuronoarabinoxilana. Todas possuem uma cadeia principal de  $\beta$ -D-xilose unidas por ligações do tipo  $\beta$ -1,4. As arabinoxilanas possuem grandes quantidades de resíduos de L-arabinofuranosil. As glicuronoxilanas possuem o ácido-4-O-metil-glicurônico como cadeia lateral e podem ser acetiladas. As glicuronoarabinoxilanas possuem na sua cadeia lateral o ácido-4-O-metil-glicurônico e de L-arabinofuranosil, e não são acetiladas. As glicuronoxilanas e glicuronoarabinoxilanas estão localizadas principalmente na parede secundária e formam ligações cruzadas com a lignina, principalmente entre os resíduos fenólicos da lignina e os resíduos arabinosil e glicuronosil da xilana, funcionando como adesivos e mantendo a integridade da parede celular (Dodd and Cann, 2009; Jouanin and Minic, 2006; Vries and Visser, 2001; Polizeli *et al*, 2005; Wong *et al*, 1988).

As enzimas que hidrolisam a xilana podem ser divididas em duas categorias: as que degradam a cadeia polissacarídea principal, endo- $\beta$ -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8) e  $\beta$ -xilosidases (EC 3.2.1.37); e enzimas que liberam grupos laterais, as enzimas acessórias, que incluem  $\alpha$ -glucuronidase (EC 3.2.1.139), L-arabinases, acetilxilana esterase (EC 3.1.1.6), feruloil esterase (EC 3.1.1.73) e ácido p-cumárico esterase (EC 3.1.1.-). As endo- $\beta$ -1,4-xilanase clivam as ligações glicosídicas da estrutura principal da xilana. Esta clivagem não é aleatória, depende da natureza do substrato, do tamanho da cadeia, do

grau de ramificação e presença de substituintes. As  $\beta$ -xilosidases podem ser classificadas de acordo com suas afinidades relativas para xilobiose e xilooligosacarídeos. Essas enzimas também são capazes de clivar substratos sintéticos. A importância delas está relacionada com a diminuição do acúmulo de pequenos oligômeros de xilose, após a ação da xilanase, pois estes oligômeros podem inibir a ação da endo- $\beta$ -1,4-xilanase. As acetilxilana esterases removem os grupos O-acetil das posições 2 e 3 do resíduo de  $\beta$ -D-xilopiranosil. Sua ação é importante pois os grupo acetil causam impedimento estérico às enzimas que tentam alcançar a cadeia principal. As L-arabinases atuam retirando os resíduos de L-arabinose. Elas podem atuar de duas maneiras, clivando arabinanas ramificadas (exo- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase – EC 3.2.1.55) ou arabinanas lineares (endo-1,5-  $\alpha$ -L-arabinase EC 3.2.1.99). As  $\alpha$ -glucuronidases clivam a ligação  $\alpha$ -1,2 entre o resíduo do ácido glicurônico e de  $\beta$ -D-xilopiranosil. As duas esterases, feruloil e ácido  $p$ -cumárico, clivam as ligações éster; a primeira cliva entre a arabinose e o ácido ferúlico, a segunda entre a arabinose e o ácido  $p$ -cumárico (Polizeli *et al*, 2005; Dodd and Cann, 2009). As xilanases podem ser agrupadas em duas famílias, F e G, baseado nos clusters hidrofóbicos e sequências homólogas. As da família F possuem massa acima de 35 kDa e são análogas as GH 10, e as da família G em torno de 20 kDa e análogas as GH 11 (Krengel *et al*, 1996). Além disso, elas podem ser agrupadas em dois grupos, de acordo com sua massa e seu ponto isoelétrico (pI), onde as xilanases menores que 30 kDa possuem pontos isoelétricos alcalinos, e xilanases maiores que 45 kDa geralmente possuem pontos isoelétricos ácidos (Uffen, 1997). Uma classificação mais atual das xilanases se baseia na similaridade das sequências dos domínios catalíticos, pode ser acessado no banco de dados CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes - [www.CAZy.org](http://www.CAZy.org)) e abrange todas as exceções que não se encaixavam nas classificações antigas. As xilanases foram separadas então em nove famílias: 5, 8, 10, 11, 16, 26, 30, 43 e 62 (Paes *et al*, 2012). A presença de enzimas que clivam as regiões ramificadas variadas é essencial, pois elas criam mais sítios para a hidrólise total da holocelulose, além de também desempenharem papel na introdução de modificações específicas nas estruturas dos polissacarídeos, como mudança de solubilidade, configuração do polímero e ligações a compostos fenólicos e lignina (Vries and Visser, 2001; Siqueira *et al*, 2010; Ryabova *et al*, 2009).

O segundo polímero mais encontrado na hemicelulose é a manana. Ela pode ser dividida em quatro grupos: manana linear, glicomanana, galactomanana e galactoglucomana. Todas elas possuem uma cadeia principal de resíduos de D-manose, podendo se intercalar com resíduos de D-glicose e D-galactose. As mananas lineares são homopolissacarídeos, compostas de cadeias lineares de  $\beta$ -D-manopiranosil e contêm menos de 5% de galactose. As galactomananas são constituídas de uma cadeia de resíduos de  $\beta$ -D-manopiranosil com ligações do tipo  $\beta$ -1,4, e possuem cadeias laterais de resíduos de  $\alpha$ -D-galactopiranosil com ligações do tipo  $\alpha$ -1,6. As glicomananas possuem uma cadeia principal de  $\beta$ -D-manopiranosil e  $\beta$ -D-glicose, intercaladas numa taxa de 3 de manose para 1 de glicose, e um grau de polimerização maior que 200. As galactoglucomanas possuem a cadeia composta de  $\beta$ -D-manopiranosil,  $\beta$ -D-glicose e  $\alpha$ -D-galactopiranosil intercaladas numa proporção de 3:1:1, respectivamente (Moreira and Filho, 2008). A degradação da cadeia principal de galacto(gluco)manana depende da ação da  $\beta$ -endomananases (EC 3.2.178) e  $\beta$ -manosidades (EC 3.2.1.25). As  $\beta$ -endomananases hidrolisam a cadeia principal, liberando manooligosacarídeos. Sua habilidade em hidrolisar galactomananas e galactoglucomanas depende de vários fatores, como número e distribuição dos substituintes da cadeia e a conteúdo de glicose. Elas são mais ativas em galactomananas com poucos substituintes em sua cadeia principal e liberam basicamente manobiose e manotriose. As  $\beta$ -manosidades são enzimas exo-ativas, liberando manose da região terminal não redutora dos manooligosacarídeos. A degradação completa da cadeia de galacto(gluco)manana depende também da ação de  $\beta$ -glicosidades, acetilmanana esterase (EC 3.1.1.6) e a  $\alpha$ -galactosidase (EC 3.2.1.22) (Moreira and Filho, 2008; Vries and Visser, 2001).

As pectinas formam outro grupo de heteropolissacarídeos e consistem de uma cadeia principal de resíduos de ácido galacturônico com ligações do tipo  $\alpha$ -1,4. Elas possuem duas regiões distintas, as regiões “não densas” onde a cadeia pode ser acetilada em O-2 e O-3 e metilada em O-6; e regiões específicas “densas”, que possuem duas estruturas diferentes, uma onde o ácido galacturônico da cadeia principal é interrompido por resíduos de L-ramnose com ligações do tipo  $\alpha$ -1,2 formando a ramnogalacturônica e outra onde há resíduos de D-xilose, formando a xilogalacturônica. As longas cadeias laterais consistem principalmente de resíduos de L-arabinose e alguns resíduos de D-galactose podem estar ligados aos resíduos de ramnose. Em algumas determinadas

pectinas, o ácido ferúlico pode estar presente como um resíduo terminal ligado ao O-5 do resíduo de arabinose ou ao O-2 do resíduo de galactose (Vries and Visser, 2001; Jayani *et al*, 2005). As enzimas que degradam a pectina podem ser divididas em três grupos, as protopectinases, esterases e depolimerases. As depolimerases degradam a substância péctica através de dois mecanismos, pela hidrólise ou por lise trans-eliminatória, e podem ser divididas em quatro grupos: poligalacturonase e polimetilgalacturonase que atuam através da hidrólise, podendo ser exo- (EC 3.2.1.67) ou endo- (EC 3.2.1.15); e poligalacturonato liase e polimetilgalacturonato liase, podendo ser exo- (EC 4.2.2.9) ou endo- (EC 4.2.2.2). As pectinaesterases (EC 3.1.1.11) desesterificam as ligações metil-éster da cadeia de galacturonana, liberando pectinas ácidas e metanol. As protopectinases clivam a pectina insolúvel, tornando-a solúvel (Jayani *et al*, 2005).

A lignina é um mistura polifenólica que confere rigidez a planta, além de ser essencial para a integridade da parede celular, impermeabilizando-a, e protegendo contra ação de patógenos e enzimas hidrolíticas. É formada por três monômeros de álcool hidroxicinamil, que diferem apenas no nível de metoxilação, os ácidos p-cumaril, coniferil e sinapil. Estes monômeros formam respectivamente os p-hidroxifenil, guaiacil e siringil fenilpropanóides, quando incorporados à lignina (Boerjan *et al*, 2003; Siqueira *et al*, 2010). A xilose pode formar ligação cruzada com a xilana através dos resíduos de L-arabinofuranosil, que podem também ser esterificados com ácidos ferúlicos ou p-cumáricos (Minic and Jouanin, 2006).

Há uma demanda mundial para utilização industrial das enzimas. O mercado global de enzimas em 2002 movimentou U\$ 1,3 bilhão e a estimativa para 2015 é que alcance U\$ 4,4 bilhões (Binod *et al*, 2013; Li *et al*, 2012). Inseridas nesse mercado, as holocelulases são extensivamente utilizadas para diversos fins. Suas principais aplicações são na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais; na extração do azeite de oliva; na indústria de panificação e biscoitos, onde conferem qualidade e aumentam a exposição de fibras; na produção de bebidas alcoólicas, café e chá; na indústria de rações animais e de grãos com intuito de melhoramento nas propriedades nutricionais; na indústria de produção de couro; no biopolimento e lavagem do jeans e outros tecidos; na indústria de papel e polpa de celulose; como coadjuvantes em detergentes e alvejantes, dentre outras utilizações (Bhat, 2000; Cherry and Fidantsef,

2003; Ghorai *et al*, 2009). Outra importante aplicação biotecnológica é na produção de biocombustíveis de 2ª geração. A biomassa lignocelulósica se configura como uma fonte considerável de açúcares fermentáveis, é uma matéria prima abundante e de baixo custo. As enzimas hidrolíticas atuam na parede celular dessa biomassa e conseguem liberar os açúcares fermentáveis dos polissacarídeos presentes na parede celular (Jordan *et al*, 2012).

### 1.3 Resíduos da indústria têxtil

A fibra de algodão é uma única célula alongada e grossa, proveniente da epiderme da semente. As camadas na estrutura celular, de fora para dentro da fibra, são: cutícula, parede primária, parede secundária e lúmen. Estas camadas são estruturalmente e quimicamente diferentes e contem aproximadamente 10% do peso de substâncias não celulósicas como lipídios, ceras, substâncias pécnicas, ácidos orgânicos, proteínas, substâncias nitrogenadas, polissacarídeos não celulósicos e outros componentes. As paredes primária e secundária possuem diferentes graus de cristalinização, assim como diferentes orientações em suas cadeias moleculares. A cutícula é composta de cera, proteínas e pectinas, compõe 2,5% do peso da fibra e é amorfa. A parede primária corresponde a 2,5% do peso da fibra, possui um grau de cristalinidade de 22%, e é composto de celulose, circundada por xiloglicana e pectina. Já a parede secundária, composta somente de celulose, corresponde a 91,5% do peso da fibra e possui um grau de cristalinidade de 70%. O lúmen é composto de resíduos protoplasmáticos. A cutícula forma uma camada protetora a ataques ambientais e da penetração da água. Os materiais serosos são responsáveis pelas características não absorptivas do algodão, e as pectinas podem influenciar nisso também, já que 85% dos grupos carboxilas nas pectinas são metiladas (Li *et al*, 1997; Haigler *et al*, 2012).

O Brasil é o quinto maior produtor de algodão no mundo. De acordo com a ABRAPA, Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, a safra de algodão do Brasil de 2013/2014, em milhões de toneladas (mt), foi de 1,434, ficando atrás do Paquistão (2,151 mt), Estados Unidos (2,842 mt), Índia (6,227 mt) e China (7,284 mt). De acordo com o 12º Levantamento de Avaliação da Safra 2012-13 da Conab

(Companhia Nacional de Abastecimento), a superfície cultivada foi de 893,5 mil hectares plantados, com predomínio de plantação nas regiões Centro-Sul.

Na indústria têxtil, o fardo de algodão é limpo e uniformizado, e então ocorre a separação e estiramento das fibras de algodão. Todas as impurezas obtidas nestas quatro etapas de processamento são recolhidas por tubulações e acumuladas em filtros, gerando o resíduo chamado pó de filtro. Já o piolho de algodão é obtido pela etapa de descaroçamento do algodão (Paganni *et al*, 2011; Siqueira *et al*, 2009; Duarte *et al*, 2012). Esses resíduos são reaproveitados como alimento para animais de corte, produção de briquetes, preenchimentos de colchões e travesseiros, produção de bioetanol, para compostagem, produção de papel, produção de biogás e tecidos como rayon (Isci and Demirer, 2007; Agblevor *et al*, 2006). Em 2002, cerca de 17,1 milhões de fardos de algodão foram descaroçados nos Estados Unidos e o resíduo do descaroçamento estimado foi de  $2,25 \times 10^9$  kg. Como os resíduos gerados pelo cultivo de algodão podem chegar a ser cinco vezes mais pesados que a quantidade de fibra produzida (Agblevor *et al*, 2006), a conversão desses resíduos para produtos com valor agregado foi e ainda é extensivamente estudada, pois além de encaminhar um fim para o seu acúmulo no meio ambiente, apresenta um grande potencial para várias aplicações.

#### **1.4 Fungo filamentoso *Aspergillus oryzae***

Os fungos são um grupo eucarioto morfologicamente complexo e amplamente distribuído no mundo, e possuem um papel importante na natureza como decompositores biológicos. Dentre os fungos, os Ascomicetas e Basidiomicetas saprófitos são os mais eficientes na decomposição da biomassa lignocelulósica e conseguem se adaptar a diferentes fontes de carbono e nitrogênio. (Bouws *et al*, 2008). O filo Ascomiceta se diferencia dos outros por sua reprodução, onde há produção de esporos em ascos (esporângios). A maior parte dos Ascomicetas são filamentosos, ou seja, exibem formas estruturais distintas durante seu ciclo de vida. A estrutura vegetativa básica é a hifa, um filamento tubular originado da germinação do esporo reprodutivo. O crescimento da hifa produz micélios. Quando o micélio se encontra em culturas líquidas, ele apresenta diferentes formas, entre filamentos de micélios dispersos a massas miceliais densas (Papagianni, 2004; Madigan *et al*, 2009).

A habilidade dos fungos filamentosos em decompor o substrato é explorada em várias áreas das indústrias biotecnológicas, como produção de enzimas, biodegradação de resíduos ou fermentação de produtos de baixo valor agregado. A escolha da linhagem é baseada nas taxas de produções e em questões regulatórias (conceito *GRAS*). As vantagens das utilizações dos fungos filamentosos são o seu potente sistema de secreção, que é superior a bactérias e leveduras, não formação de corpúsculos de inclusão, realização de modificações pós-traducionais, facilidade de cultivo, boa capacidade de fermentação e um nível alto de expressão proteica (Grimm *et al*, 2005; Vries and Visser, 2001; Guimarães *et al*, 2006; Kulkarni *et al*, 1999). Industrialmente, os fungos filamentosos são utilizados para produzir peptídeos recombinantes e metabólitos secundários usados na terapêutica (Adrio and Demain, 2003), produtos fermentados e produção de enzimas hidrolíticas (Bows *et al*, 2008), na indústria alimentícia (Ghorai *et al*, 2009) e sacarificação de resíduos agroindustriais (Siqueira *et al*, 2009).

Dentre os Ascomycetas, o gênero *Aspergillus* é um anamórfico e possui mais de 180 espécies oficialmente reconhecidas e existe há mais de 200 milhões de anos. Alguns são patogênicos para humanos, como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*, produtores de aflatoxinas; e outros com características industriais, como o *Aspergillus nidulans* (um organismo modelo dentro desse gênero), *A. oryzae* e o *A. niger*, que possuem o status *GRAS* (*Generally Regarded as Safe*), e são amplamente utilizados pela indústria (Ward, 2012; Gouka *et al*, 1997; Galagan *et al*, 2005).

O *A. oryzae* é um fungo Ascomyceta e pertence ao gênero *Aspergillus* seção *Flavi*. Morfologicamente, essa seção inclui espécies com conídios em tons de amarelo escuro a marrom, esterigmatas uni e bisseriados, e esclerócios escuros (Rigó *et al*, 2002). É utilizado há mais de 4000 anos na Ásia, principalmente na produção do molho shoyo, sake, miso e outros produtos. Seu uso comercial se dá por sua imensa capacidade de secretar enzimas extracelulares (Barbesgaard *et al*, 1992; Oda *et al*, 2006). De fato, desde o século XVIII, segundo Takamine (1914), o *Aspergillus oryzae* é importante para a economia do Japão, principalmente pela sua produção enzimática e aplicação industrial. O genoma de *A. oryzae* já foi sequenciado (linhagem RIB40). O genoma de 36,9 Mb contém cerca de 12074 genes e possui muita semelhança com o genoma de *A. niger* e *A. flavus*, e é cerca de 20 a 30% maior que o genoma de *A. fumigatus* e *A.*

*nidulans* (Machida *et al*, 2005; Kobayashi *et al*, 2007). Foram relatados genes que estão envolvidos na síntese de aflatoxinas, porém não foi observado até hoje sua expressão, nem a expressão de metabólitos carcinogênicos (Machida *et al*, 2005; Galagan *et al*, 2005; Barbesgaard *et al*, 1992). Há também relatos de pelo menos 32 genes preditos para produção de glicosil hidrolases, demonstrando a importância desse fungo em hidrolisar a biomassa lignocelulósica (Kobayashi *et al*, 2007; Noguchi *et al*, 2009). Em comparação com *A. fumigatus* e *A. nidulans*, o *A. oryzae* possui cerca de 2000 a 3000 genes a mais, mantendo a mesma densidade gênica – quantidade de genes para o tamanho total do genoma. Essa expansão gênica pode explicar o aumento de hidrolases secretadas, além de transportadores, metabólitos primários e secundários, pois ao longo do tempo o *A. oryzae* foi submetido a ambientes em que se era necessário degradar para obtenção dos nutrientes (Machida *et al*, 2008).

A produção de xilanases por *A. oryzae* é relatada desde a década de 80 (Bailey and Poutanen, 1989), na ração animal (Krengel *et al*, 1996), no branqueamento de polpa de celulose (Szendefy *et al*, 2006) e na sacarificação de resíduos agroindustriais em resíduos de indústria têxtil (Duarte *et al*, 2012). Já foram relatadas também produção de seis xilanases e três  $\beta$ -xilosidases envolvidas na produção de molho shoyo (Kitamoto *et al*, 1998), com características termotolerantes e halotolerantes (Hashimoto *et al*, 1993). Inclusive, a cor escura do molho shoyo pode ser evitada inibindo as ações das xilanases, pois ele é um indicador de qualidade do molho (Kitamoto *et al*, 1998).

## 2. OBJETIVOS

Estudos prévios feitos pelo nosso grupo já demonstraram que o *A. oryzae* possui potencial em produzir holocelulases com características industriais quando crescido em resíduos agroindustriais (Siqueira *et al*, 2009; Duarte *et al*, 2012; Jaramillo *et al*, 2013). Dessa forma, uma melhor caracterização do mecanismo de ação das enzimas produzidas por esse fungo em resíduos da indústria têxtil faz-se necessário visando o aproveitamento das mesmas em processos biotecnológicos.

### 2.1 Objetivo geral

Produzir, purificar e caracterizar as multi-formas de xilanases de *A. oryzae* crescido em resíduos têxteis - pó de filtro e piolho de algodão limpo - visando tanto o aproveitamento dos resíduos como possíveis aplicações tecnológicas das enzimas.

### 2.2 Objetivo específico

1. Promover o crescimento de *A. oryzae* em meio de cultura líquido, tendo quatro resíduos têxteis como fonte de carbono: pó de filtro tratado e não tratado, piolho de algodão limpo tratado e não tratado;
2. Obter a curva de indução enzimática de cada resíduo;
3. Caracterizar a atividade xilanólítica de *A. oryzae* em um cultivo padrão e um cultivo alternativo;
4. Purificar as xilanases produzidas nos quatro meio de culturas;
5. Avaliar o grau de pureza das xilanases obtidas;
6. Caracterizar a cinética e as propriedades bioquímicas e físico-química das xilanases obtidas;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes

Os substratos xilana de aveia, pectina de frutas cítricas, carboximetilcelulose (CMC) e manana foram adquiridos da Sigma Chemical Aldrich Company (EUA). Foi utilizada um sistema de ultrafiltração Amicon e uma membrana com limite de exclusão molecular de 10 kDa da EMD-Millipore, e as resinas de cromatografia Sephacryl S-100, Sephadex G-50, HiTrap Q XL da GE HealthCare (EUA).

#### 3.2 Resíduos da indústria têxtil

Os resíduos utilizados foram o piolho de algodão limpo (PL) e pó de filtro (PF), que foram gentilmente fornecidos pela Hantex – Resíduos Têxteis Ltda., localizada no município de Gaspar, em Santa Catarina.

#### 3.3 Pré-tratamento

Os resíduos PL e PF, denominados piolho de algodão limpo não tratado (PL-nt) e pó de filtro não tratado (PF-nt), foram submetidos ao pré-tratamento para aumentar a exposição dos polissacarídeos presentes na parede celular. O protocolo de pré-tratamento foi estabelecido pelo Laboratório de Enzimologia da UnB, sob orientação do Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho. Inicialmente os resíduos foram autoclavados a 121°C por duas horas, seguido por lavagem exaustiva em água corrente, após secagem a 65°C por 72 h e por fim os resíduos foram moídos por um moinho de bancada. Após o procedimento do pré-tratamento, os resíduos piolho de algodão limpo pré-tratado (PL-t) e pó de filtro pré-tratado (PF-T) foram armazenados em sacos plásticos a temperatura ambiente. Nos cultivos submersos de *A. oryzae*, PL-nt, PL-t, PF-nt e PF-t foram utilizados como fontes de carbono.

### **3.4 Composição dos resíduos de indústria têxtil**

Os resíduos não tratados foram analisados quanto à composição química pelo Laboratório de Produtos Vegetais do Departamento de Ciência dos Alimentos e no Laboratório de Análise Foliar do Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, Brasil. Já os resíduos tratados foram analisados pelo Laboratório de Química Tecnológica do Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde/GO, sob supervisão do Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro. Protocolo indexado no Anexo A.

### **3.5 Isolamento, identificação e manutenção do fungo *A. oryzae***

*A. oryzae* foi isolado da compostagem natural de resíduos da indústria têxtil e, posteriormente identificado morfológicamente pelo Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, Brasil sob supervisão do Prof. Dr. Luís Roberto Batista. A identificação da espécie foi confirmada por análise molecular (Anexo B) realizada pela estudante de doutorado Gláucia Emy Okida Midorikawa do Laboratório de Microbiologia: Interação Planta Praga do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília/DF, Brasil sob supervisão do Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller. A manutenção do fungo foi feita através de congelamento em  $-80^{\circ}\text{C}$ , para evitar o risco de mutação e modificação das enzimas.

Dentro do âmbito da rede sisbiota de fungos filamentosos: AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010770/2013-5.

### **3.6 Cultivo de *A. oryzae* para produção de enzimas**

O fungo *A. oryzae* foi cultivado em meio líquido suplementado (0,7%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,01%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e 0,06% extrato de levedura – m/v), com PL-nt, PL-t, PF-nt e PF-t como fontes de carbono. Os cultivos submersos foram realizados em frascos do tipo *Erlenmeyer* de 2000 mL contendo 500 mL de cada meio líquido suplementado (ajustado para pH 7,0), e adicionado 5 g (1% m/v) de cada

fonte de carbono. O inoculo foi obtido através da raspagem da placa de petri e disperso em uma solução salina. A contagem de esporos da solução salina foi de aproximadamente  $3,4 \times 10^7$  esporos do fungo por mL, feita por câmara de *Newbauer*, e dessa solução foram adicionados 5 mL em cada cultivo, representando 1% do volume total (v/v). Os frascos foram incubados em um shaker, a 28°C e agitação de 120 rpm, por 14 dias. Em intervalos de 24 horas foram retiradas alíquotas de 1,0 mL de cada frasco, a partir do tempo de inoculação do fungo ao meio. As alíquotas foram centrifugadas a 10.500 g por 10 minutos a 20°C, armazenadas a -20°C e utilizadas como fonte de enzimas para a determinação da curva de indução enzimática. Após o estabelecimento dos melhores dias de cultivos para cada fonte de carbono, um novo crescimento foi realizado, nos mesmos parâmetros estabelecidos no crescimento anterior. Alternativamente, o fungo também foi cultivado em um meio líquido suplementado contendo apenas o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio (0,16% m/v) em substituição ao extrato de levedura. Para PF-t e PL-t, os frascos foram incubados em um shaker, a 28°C, agitação de 120 rpm, por 3 dias. Para PL-nt e PF-nt, os frascos foram incubados nas mesmas condições por 4 dias. Após o período de incubação, cada meio foi filtrado a vácuo com papel de filtro comum para reter a massa micelial do fungo. O sobrenadante obtido foi chamado de extrato bruto (EB). No total foram obtidos quatro extratos brutos para o meio de cultivo padrão e quatro extratos bruto para o meio de cultivo alternativo. Estes foram armazenados a 4,0° C com 0,02% (m/v) de azida sódica.

### **3.7 Atividade enzimática padrão**

As atividades enzimáticas obtidas ao longo do processo de purificação das enzimas foram medidas por meio de microensaios enzimáticos colorimétricos com ácido dinitrosalicílico – DNS (Miller, 1959) - realizados em placas de ELISA de 96 poços e em termocicladores (Mycycler Thermal Cycler, Bio Rad Laboratories, EUA). Foram adicionados 5 µL da amostra em 10 µL de solução de substrato (pectina 1%, xilana 1%, CMC 4% e manana 1% - m/v), incubadas a 50°C por 30 min. Após o período de incubação a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de DNS e fervida por 10 minutos. A atividade enzimática foi medida a partir da quantidade de açúcar

reductor produzido pela quebra do polissacarídeo pela enzima e a absorbância a 540 nm obtida em cada ensaio foi medida por meio de um espectrofotômetro (Spectramax plus 384, Molecular Devices) e foi convertida em unidade internacional por volume, UI/mL ( $\mu\text{mol}$  de açúcar reductor formado por minuto por mL de solução enzimática) a partir de uma curva de calibração utilizando os monômeros de açúcar em concentrações variadas. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

### **3.8 Dosagem de proteínas totais**

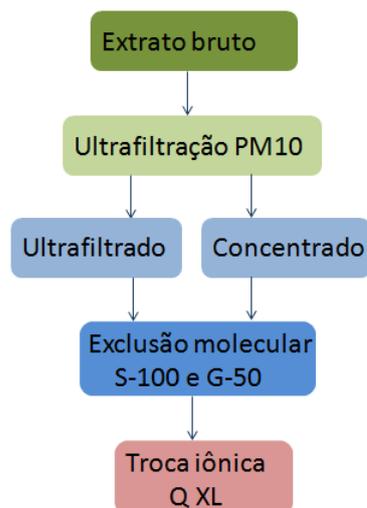
A concentração de proteínas das soluções foi obtida através do método de Bradford (1976). A concentração foi avaliada pela quantidade de reagente na forma azul iônica, mensurada pela absorbância em 595 nm. Foi utilizado o Kit Protein Assay (Bio Rad Laboratories, EUA).

### **3.9 Purificação de holocelulases produzidas por *A. oryzae***

Um volume de 350 mL de cada EB foi submetido à ultrafiltração em membrana com limite de exclusão molecular de 10 kDa (PM10 EMD-Millipore, EUA), pressão de  $2,5 \text{ kgf/cm}^2$  e temperatura de  $4,0^\circ \text{C}$ , resultando em duas frações para cada EB: cerca de 3 mL de concentrado, e 280 mL de ultrafiltrado. Para as etapas posteriores de purificação, as amostras utilizadas foram provenientes apenas do meio de cultivo padrão (figura 3). O próximo passo foi através do fracionamento por cromatografia de exclusão molecular. Utilizou-se uma resina do tipo Sephacryl S-100 com (45 cm x 3 cm) equilibrada em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, e uma resina do tipo Sephadex G-50 fine de (50 cm x 3 cm) também equilibrada em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0. Um volume de 40 mL de cada amostra de ultrafiltrado foi liofilizado e ressuspendido em 4 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0. As alíquotas dos ultrafiltrados foram então aplicadas em cada coluna de exclusão molecular, representado 1,2% do volume de coluna (VC) da Sephacryl S-100 e 1,08% VC da Sephadex G-50. Também foram aplicados 5 mL dos concentrados na Sephadex G-50, representando 1,35% VC da Sephadex G-50. Para cada cromatografia, foram coletadas 95 frações, com 3,2 mL em cada, e o tempo de coleta foi de 20 mL por hora. A

atividade enzimática de cada fração foi determinada, assim como a absorbância a 280 nm, e o perfil cromatográfico foi estabelecido. As frações correspondentes aos picos de atividade xilanolítica de cada cromatograma foram coletadas e armazenadas em câmara fria a 4,0° C com 0,02% (m/v) de azida sódica.

Uma das amostras provenientes da exclusão molecular foi submetida à cromatografia de troca iônica, em uma resina do tipo HiTrap Q XL 1 mL, em um sistema cromatográfico automatizado ÄKTA Purifier (GE Healthcare, EUA). A resina foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0. O volume aplicado de amostra foi de 10 mL. Foram coletadas 38 frações com 1 mL em cada, e o tempo de coleta para cada fração foi de 1 min/fração. Um gradiente crescente de NaCl (de 0 a 1 M) foi aplicado à coluna a partir do 10° tubo. A atividade enzimática de cada fração foi determinada, assim como a absorbância a 280 nm. As frações correspondentes aos picos de atividade enzimática de cada cromatograma foram coletadas e armazenadas em câmara fria a 4,0° C com 0,02% (m/v) de azida sódica. Outra amostra proveniente da cromatografia em Sephacryl S-100 foi submetida a uma nova cromatografia de exclusão molecular, em uma coluna HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 (60 x 1,5 cm), no ÄKTA. A coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0. O volume aplicado foi de 4,5 mL, representando 3,75% do VC. No total foram coletadas 40 frações com 3 mL em cada, e o tempo de coleta para cada fração foi de 6 min/fração. A atividade enzimática de cada fração foi determinada, assim como a absorbância a 280 nm. As frações correspondentes aos picos de atividade enzimática de cada cromatograma foram coletadas e armazenadas em câmara fria a 4,0° C com 0,02% (m/v) de azida sódica.



**Figura 3.** Esquema das etapas de purificação das amostras provenientes do cultivo padrão.

### 3.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os extrato brutos, ultrafiltrados, concentrados, e as amostras purificadas e parcialmente purificadas foram analisadas por SDS-PAGE, conforme descrito por Laemmli (1970). As amostras foram previamente precipitadas utilizando ácido tricloroacético (TCA) 10% (v/v), incubadas por 1h a 4,0° C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 18600 g por 15 minutos a 4,0° C, e então lavadas com acetona PA refrigerada e centrifugadas novamente. Este processo foi feito duas vezes. Após a última etapa de centrifugação, as amostras foram ressuspensas com 10 µL de água destilada e 5 µL de tampão de amostra [tris-HCl 125 mmol/l, pH 6,8; SDS 2,0% (v/v); azul de bromofenol 0,05% (m/v); glicerol 20% (v/v) e β-mercaptoetanol 5,0% (v/v)], e fervidas por 5 minutos. Aliquotas de 15 µL foram aplicadas em cada poço. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida de 12% e 0,75 mm de espessura, à temperatura ambiente e 25 mA. O azul de bromofenol foi utilizado como referência de migração e para determinação das massas moleculares aparentes foram utilizando os marcadores de massas moleculares contendo as proteínas fosforilase B (97 kDa), soroalbumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa) (GE Healthcare).

### 3.11 Zimograma

Para a detecção de atividades xilanolíticas presentes no ultrafiltrado e em algumas amostras, utilizou-se o protocolo de zimograma adaptado de Bischoff *et al* (2006). O procedimento de eletroforese em condições desnaturantes ocorreu conforme o item 3.10, porém o gel foi copolimerizado com xilana de aveia 0,1%. Após a eletroforese em condições desnaturantes, o gel foi submerso em uma solução de Triton X-100 2,5% (v/v) por meia hora em agitação e a temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido duas vezes, e então o gel foi submerso em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 por meia hora em agitação. Este procedimento também foi feito duas vezes. Por fim, incubou-se o gel no mesmo tampão, em 50° C, por duas horas. Após o período de incubação, o gel foi corado com Congo Red 0,1% (m/v) por mais 1 hora em agitação, e descorado com solução de NaCl 1M, até o aparecimento das bandas translúcidas. Para melhor visualização das bandas, foi adicionado cerca de 20 µL de ácido acético 1% (v/v).

### 3.12 Análise das amostras por espalhamento de luz dinâmico (ELD) e efeito do Tween-80

As análises das amostras por ELD foram realizadas com o auxílio da técnica Mary-Ann Elvina Xavier no Laboratório de Biofísica (UnB/Brasília), sob supervisão da Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Sonia Maria de Freitas. O grau de pureza das frações cromatográficas foi avaliada por espalhamento dinâmico de luz, utilizando o equipamento Zetasizer Nanoseries (Malvern, London, UK). As medidas foram realizadas a 28°C com tempo de aquisição de 60 segundos e 15 aquisições por medida. Foram utilizadas as amostras purificadas e parcialmente purificadas, em tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,0. O cálculo da massa molecular é feito com base no raio hidrodinâmico da proteína e leva em consideração proteínas perfeitamente globulares (Janis *et al*, 2001). Além disso, novas medidas foram realizadas, nos mesmos parâmetros, mas adicionando 0,1% (v/v) de Tween-80. Logo após a leitura, foi feito um ensaio enzimático para analisar o efeito do Tween-80 nas amostras.

### **3.13 Efeito de temperatura**

As amostras foram submetidas a diferentes variações de temperatura em seu tempo de incubação. O protocolo foi adaptado do item 3.7 e o intervalo de temperatura foi de 30° C a 80° C. A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% correspondeu a melhor atividade dentro desse intervalo de temperatura.

### **3.14 Efeito do pH**

As amostras foram submetidas a diferentes variações de pH em seu ensaio enzimático. Os microensaios foram realizados em três faixas tamponantes distintas: acetato de sódio 50 mM (pH 3,0 a pH 6,0), fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0 a pH 7,0) e tris-HCl 50 mM (pH 7,0 a pH 9,0). O protocolo utilizado foi adaptado do item 3.7, da seguinte maneira: foram aplicadas nos poços das placas 5 µL de amostra, 5 µL de substrato concentrado (xilana 2%, manana 2%, pectina 2% e CMC 8%) e 5 µL de tampão concentrado (100 mM). A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% correspondeu a maior atividade dentro desse intervalo de pH.

### **3.15 Termoestabilidade**

As amostras foram incubadas a 28° C e 50° C e alíquotas foram retiradas e testadas em relação a sua atividade em intervalos de tempos até que sua meia-vida fosse alcançada. A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% correspondeu à atividade enzimática sem incubação prévia.

### **3.16 Efeito de íons metálicos e modificadores de aminoácidos**

Foram analisados os efeitos de íons metálicos e modificadores de aminoácidos na amostra purificada. Os íons metálicos utilizados foram AgNO<sub>3</sub>, NaCl, CoCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, HgCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> e MnCl<sub>2</sub> e os modificadores de aminoácidos foram

EDTA, DTNB,  $\beta$ -mercaptoetanol, NBS, L-triptofano, L-cisteína e SDS. O protocolo utilizado foi adaptado do item 3.7, da seguinte maneira: foram aplicadas nos poços das placas 5  $\mu$ L de amostra, 5  $\mu$ L de substrato concentrado (xilana 2%, manana 2%, pectina 2% e CMC 8%) e 5  $\mu$ L de solução de íon (20 mM) ou modificador de aminoácido (100mM). A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% correspondeu à atividade enzimática controle, sem a presença do íon ou modificador.

### 3.17 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos ( $K_M$  e  $V_{M\acute{a}x}$ ) das amostras foram determinados na fração solúvel de xilana de aveia. O preparo das frações foi iniciado pela pesagem de 1 g de xilana de aveia. À massa foram adicionados 20 mL de solução de NaOH 1,0 mol/L, seguida de agitação por 30 min a temperatura ambiente; na sequência adicionou-se 20 mL de solução de HCl 1,0 mol/L, seguida de agitação por 30 min; a este volume fez-se a adição de tampão acetato de sódio 100 mmol/L, pH 5,0 para completar o volume final de 100 mL. A suspensão foi agitada por mais 30 min a temperatura ambiente, e posteriormente, centrifugada a 8.500 g por 15 min a 4,0° C, resultando em duas frações, uma solúvel e outra insolúvel. Estas frações foram dialisadas contra água destilada a 4,0° C, e por fim, foram liofilizadas e armazenadas a -20° C. O protocolo utilizado para estabelecer os parâmetros cinéticos foi adaptado do item 3.7, variando a concentração de substrato solúvel. A constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e a velocidade máxima de reação ( $V_{M\acute{a}x}$ ) foram determinadas pelo método de regressão não linear *Enzfitter* (Leatherbarrow, 1999).

### 3.18 Efeito de licor de auto-hidrólise

Os licores de auto-hidrólise foram gentilmente cedidos pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli do Laboratório de Microbiologia/Biologia Celular, da Universidade de São Paulo (USP). Os licores foram obtidos a partir do sabugo de milho, que sofreu auto-hidrólise em um reator à 200° C, por 30 minutos (Licor-30'), conforme descrito por Michelin *et al* (2012). O protocolo para analisar o efeito do licor

de auto-hidrólise na ação enzimática de todas as amostras foi adaptado do item 3.7, da seguinte maneira: foram aplicadas nos poços das placas 5  $\mu$ L de amostra, 5  $\mu$ L de substrato concentrado (xilana 2%, manana 2%, pectina 2% e CMC 8%) e 5  $\mu$ L do licor previamente diluído 10 vezes. A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% correspondeu à atividade enzimática controle sem a presença do licor.

### **3.19 Efeito de compostos fenólicos**

Foi analisado o efeito de desativação causado pelos compostos fenólicos (ácido ferúlico, ácido cinâmico, ácido p-cumárico, ácido 4-hidróxibenzóico e ácido tanínico - 1 mg/mL) nas atividades xilanolíticas. O protocolo para analisar o efeito dos compostos fenólicos foi adaptado do item 3.7, da seguinte maneira: foram incubados previamente 54  $\mu$ L da amostra com 6  $\mu$ L do composto fenólico, e então foi aplicado no poço da placa 5  $\mu$ L dessa solução e 10  $\mu$ L de substrato. A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% correspondeu à atividade enzimática controle, que foi a incubação de 54  $\mu$ L da amostra com 6  $\mu$ L de água.

### **3.20 Espectrometria de massa**

A análise por espectrometria de massa foi realizada com o auxílio da pesquisadora Dr<sup>a</sup> Elaine Nascimento Aquino do Laboratório de Enzimologia do Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília/DF, e o protocolo utilizado para digestão com tripsina foi adaptado de Zhang *et al* (2007). A análise por espectrometria de massa foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas do Departamento de Biologia celular (UnB/Brasília), sob supervisão do Prof. Dr. Carlos André O. Ricart.

As amostras foram inicialmente separadas em bandas por SDS-PAGE e coradas com nitrato de prata. As bandas selecionadas foram excisadas do gel manualmente e descoradas utilizando ferrocianeto de potássio 15 mM e tiosulfato de sódio 50 mM. Após esta etapa foram lavadas com água mili-Q até que o gel ficasse transparente. Em seguida, as bandas foram reduzidas com 10 mM de DTT por 1 hora a 56° C, alquiladas

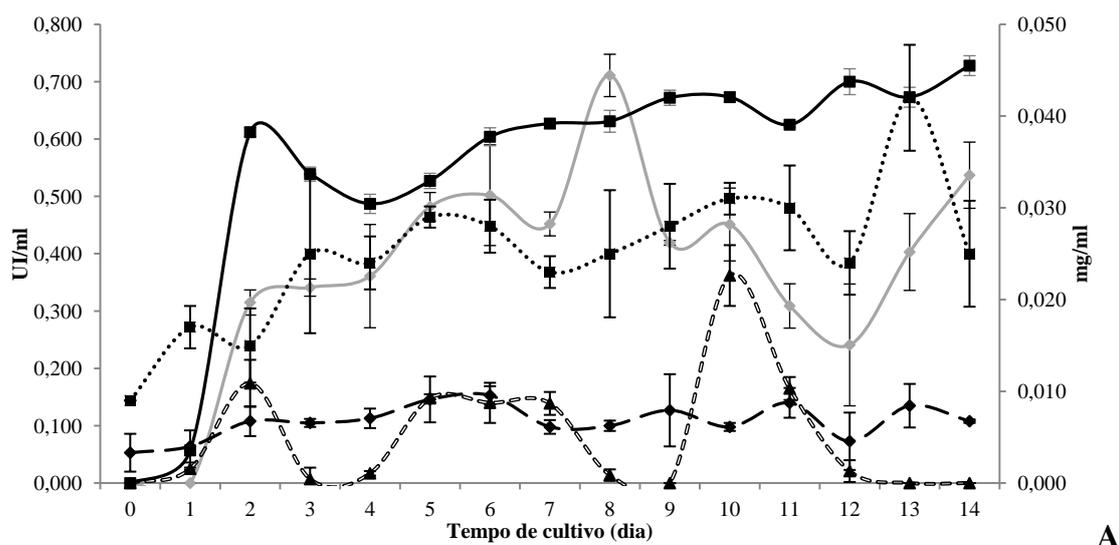
com 55 mM de iodoacetamida por 45 minutos a temperatura ambiente no escuro, e por fim lavadas com 100 mM bicarbonato de amônio, seguida de 100% de acetonitrila, por três vezes. As bandas do gel foram hidratadas em uma solução gelada de tripsina (12,5 ng/ $\mu$ L) por 45 minutos no gelo. Após o período de hidratação foi adicionado mais tampão de digestão (bicarbonato de amônio 50 mM e cloreto de cálcio 5 mM) e as bandas foram incubadas a 37° C durante 16 horas. Os peptídeos provenientes da digestão foram acidificados com TFA 1%, aplicados na placa AnchorChip™ (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), e após secarem sobre o halo do poço foi aplicada a solução matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA - 5 $\mu$ g/ $\mu$ L). A amostra foi analisada no espectrômetro de massa Autoflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics). Os picos de massa monoisotópicas gerados foram comparados com os bancos de dado de sequência de proteínas de fungo, taxonomia *other fungus*, do Swiss-Prot. Os parâmetros de busca utilizados foram o erro  $\geq$  50 ppm, carbamidometilação como modificação fixa, oxidação da metionina e acetilação do N terminal como modificações variáveis, e 0 ou 1 perda de clivagem da tripsina.

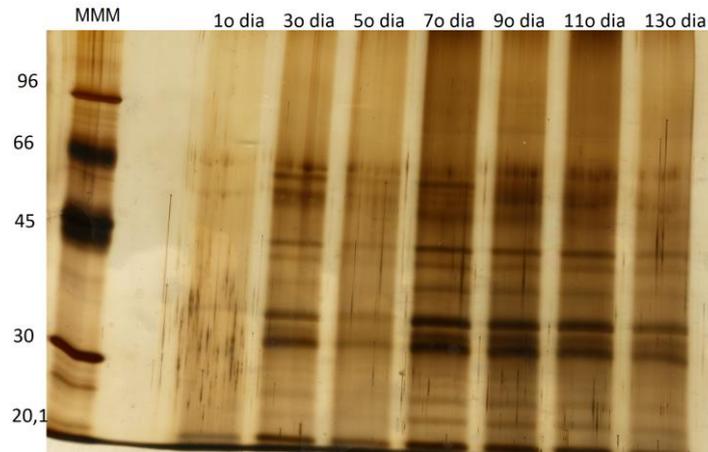
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

##### 4.1. Produção de holocelulases por *A. oryzae* cultivado nos resíduos têxteis

Os resíduos agroindústrias são atrativos para o crescimento de fungos filamentosos e outros microrganismos pois possuem alto teor de polissacarídeos em sua composição além de serem encontrados abundantemente e serem provenientes de fontes renováveis (Wong *et al*, 1988; Siqueira *et al*, 2009). Sabe-se que parâmetros como a composição do meio, pH e agitação influenciam a produção extracelular de enzimas por fungos filamentosos crescidos em meios complexos (Ruohang and Webb, 1995; Amanullah *et al*, 1998). A capacidade de *A. oryzae* de produzir holocelulases quando crescido em resíduos da indústria têxtil como fonte de carbono foi avaliada por meio de curvas de indução enzimática.

Para o piolho de algodão limpo não tratado, a partir do segundo dia houve um aumento significativo na produção de xilanases e pectinases, que se manteve estável ao longo dos dias (figura 4-A). A maior atividade específica de xilanase ocorreu no 2º dia de cultivo, com valor de 40,8 UI/mg; para pectinase foi no 8º dia com valor de 28,44 UI/mg; para CM-celulase foi no 2º dia com valor de 7,2 UI/mg e para mananase foi no 10º com valor de 11,677 UI/mg (resultados não apresentados). A expressão de proteínas foi crescente a partir do 3º dia, e se manteve ao longo dos quatorze dias, conforme observado no gel SDS-PAGE (figura 4-B).

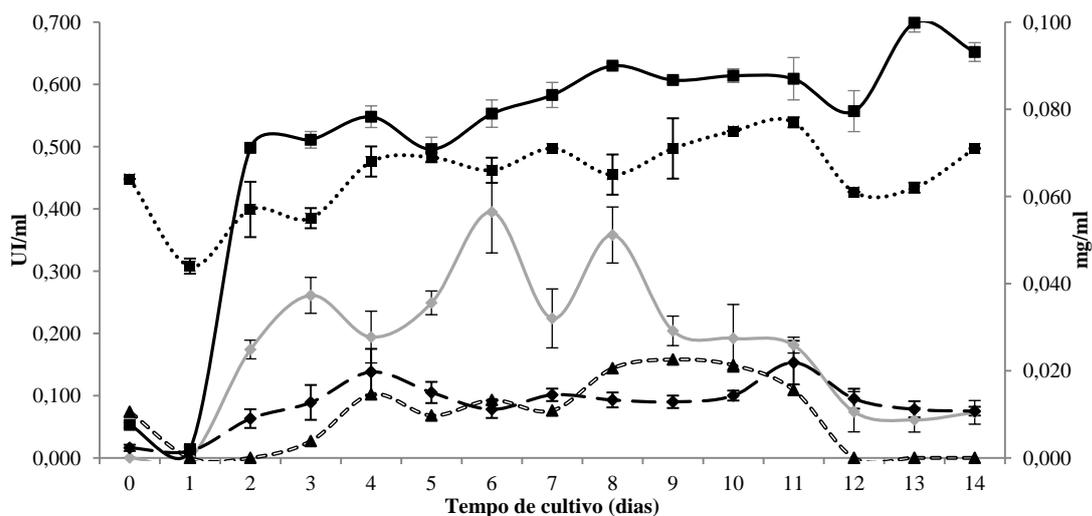




**B**

**Figura 4.** (A) Curvas de indução de holocelulases de *A. oryzae* cultivado em PL-nt, onde (····■····) proteínas totais (mg/mL), (—■—) xilanase, (—◆—) pectinase, (—▲—) mananase, (—♦—) CM-celulase. Todos os ensaios expressos em UI/mL. (B) gel SDS-PAGE referente a alíquotas retiradas nos dias ímpares da curva de indução. Na primeira coluna foram utilizados os marcadores de massa molecular (MMM) contendo as proteínas fosforilase B (97 kDa), soroalbumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,4 kDa).

Para o piolho de algodão limpo tratado, a partir do segundo dia houve um pico de produção de xilanases, que se manteve constante ao longo do tempo (figura 5-A). A atividade específica da xilanase também se manteve estável ao longo do tempo, e obteve maior atividade no 13º dia com valor de 9,131 UI/mg. A atividade de pectinase foi maior no 6º dia com valor de 5,985 UI/mg; para CM-celulase, a atividade foi maior no 4º dia com valor de 2,029 UI/mg e para mananase no 8º dia com valor de 2,215 UI/mg (resultados não apresentados). A expressão de proteínas foi estável ao longo dos quatorze dias, porém percebe-se a quantidade crescente de bandas no gel SDS-PAGE (figura 5-B).



A

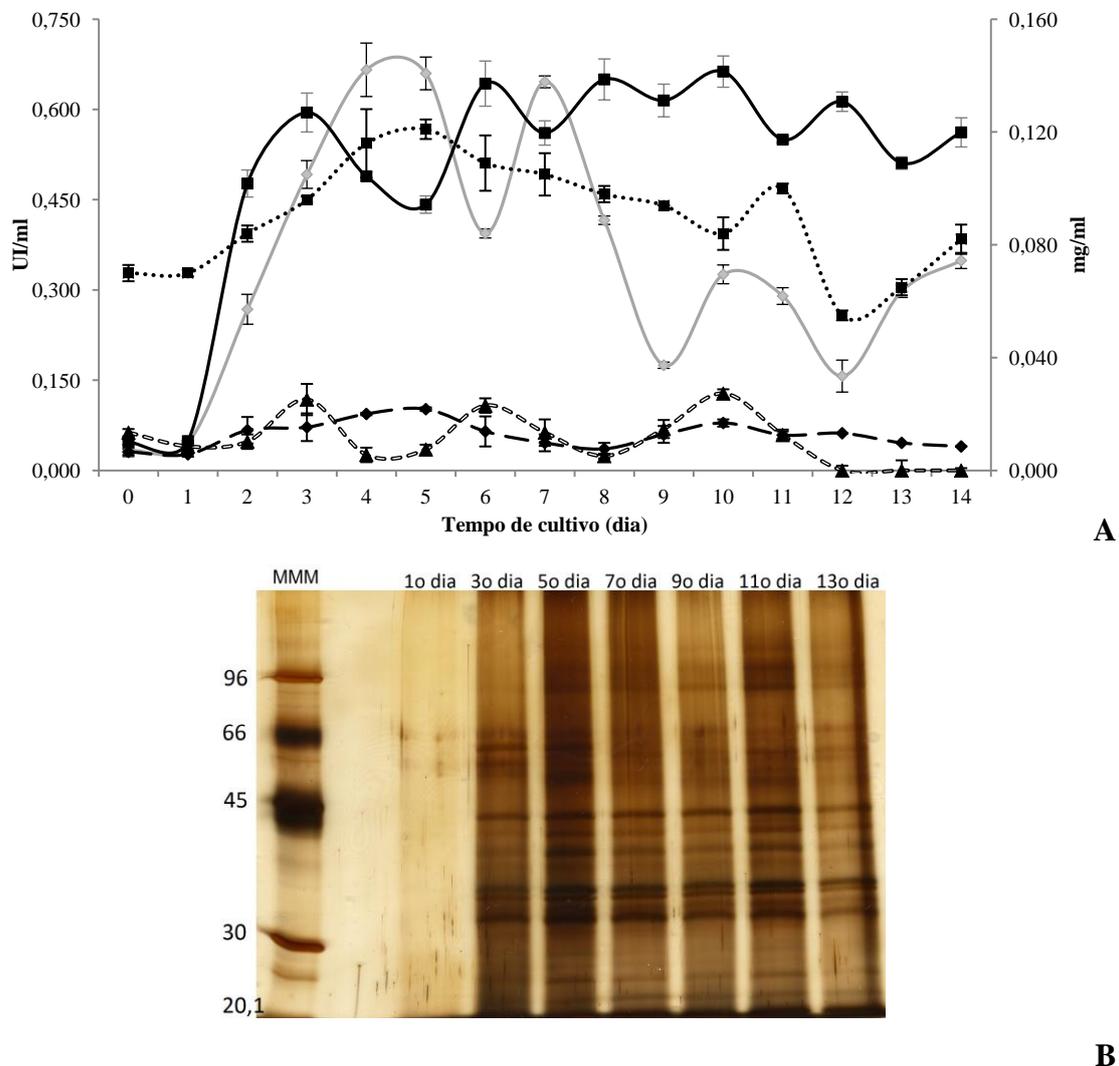


B

**Figura 5.** (A) Curvas de indução de holocelulases de *A. oryzae* cultivado em PL-t, onde (····■····) proteínas totais (mg/mL), (—■—) xilanase, (—▲—) pectinase, (---▲---) mananase, (—▲—) CM-celulase. Todos os ensaios expressos em UI/mL. (B) gel SDS-PAGE referente a alíquotas retiradas nos dias ímpares da curva de indução. Na primeira coluna foram utilizados os marcadores de massa molecular (MMM) contendo as proteínas fosforilase B (97 kDa), soroalbumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (30 kDa).

Para o pó de filtro não tratado, a partir do 2º dia houve um pico de produção de xilanases que se manteve constante (figura 6-A). Sua atividade específica também permaneceu estável a partir do 2o dia, tendo o 12º dia com o maior valor, 11,14 UI/mg. Para pectinase, o dia de maior atividade foi o 7º, com valor de atividade de 6,152 UI/mg; para CM-celulase foi no 12º dia com valor de atividade de 1,127 UI/mg e para mananase no 10º dia, com valor de atividade de 1,524 UI/mg (resultados não

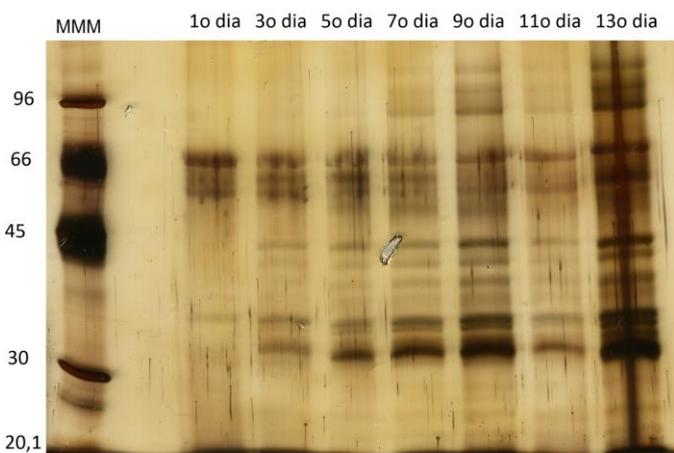
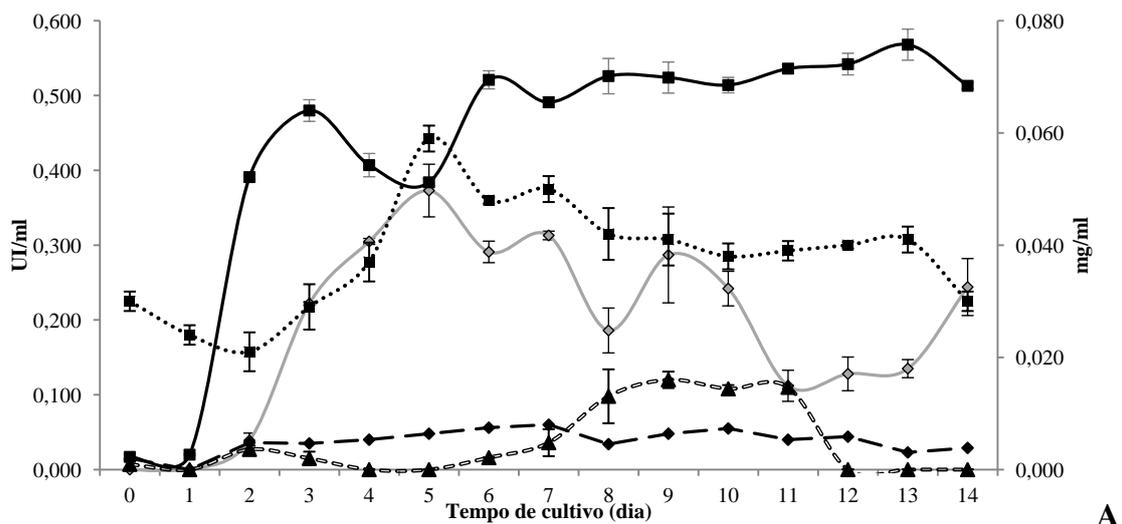
apresentados). A expressão de proteínas foi estável ao longo dos quatorze dias, observado também no gel SDS-PAGE (figura 6-B).



**Figura 6.** (A) Curvas de indução de holocelulases de *A. oryzae* cultivado em PF-nt, onde (····■····) proteínas totais (mg/mL), (—■—) xilanase, (—◆—) pectinase, (---▲---) mananase, (—●—) CM-celulase. Todos os ensaios expressos em UI/mL. (B) gel SDS-PAGE referente a alíquotas retiradas nos dias ímpares da curva de indução. Na primeira coluna foram utilizados os marcadores de massa molecular (MMM) contendo as proteínas fosforilase B (97 kDa), soroalbumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e inibidor de tripsina (20,1 kDa).

Para o pó de filtro tratado, a partir do 2o dia houve um pico de produção de xilanases que se manteve constante (Figura 7-A). Sua atividade específica também permaneceu estável, tendo o 2º dia com o maior valor de atividade, 18,619 UI/mg. Para

pectinase o dia de maior atividade foi o 4º, com valor de atividade de 8,243 UI/mg; para CM-celulase foi no 2º dia, com valor de atividade de 1,714 UI/mg e para mananase no 9º dia, com valor de atividade de 2,927 UI/mg (resultados não apresentados). A expressão de proteínas foi estável ao longo dos quatorze dias, observado também no gel SDS-PAGE (figura 7-B).



**B**

**Figura 7.** **A)** Curvas de indução de holocelulase de *A. oryzae* cultivado em PF-nt, onde (····■····) proteínas totais (mg/mL), (■—■) xilanase, (—○—) pectinase, (---▲---) mananase, (—●—) CM-celulase. Todos os ensaios expressos em UI/mL. **(B)** gel SDS-PAGE referente a alíquotas retiradas nos dias ímpares da curva de indução. Na primeira coluna foram utilizados os marcadores de massa molecular (MMM) contendo as proteínas fosforilase B (97 kDa), soroalbumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e inibidor de tripsina (20,1 kDa).

O perfil das curvas de indução para xilanase indicam que durante os 14 dias de crescimento houve um acesso gradual às fibras de hemicelulose, dessa forma a liberação de enzimas xilanolíticas se manteve constante. Além disso, houve oscilação na produção de proteínas. Estes dados vão de acordo com o trabalho de von Gal Milanezi *et al* (2012), que cresceu o fungo *A. niger* em bagaço de cana, e obteve um platô de atividade xilanolítica a partir do 2º dia de crescimento do fungo, e Midorikawa *et al* (2012), que cresceu o mesmo fungo, *A. oryzae*, em bagaço de cana de açúcar. A presença dos açúcares solúveis no cultivo não inibiu a atividade da enzima, e é possível que o fungo tenha utilizado estes açúcares como fonte de energia, pois não houve adição de nutrientes ao longo do período. Além disso, a produção de xilanases foi semelhante entre os cultivos, mas a produção de pectinases foi inferior nos cultivos com resíduos tratados em comparação aos cultivos com resíduos não tratados. O pré-tratamento diminuiu a produção das pectinases, provavelmente por retirar a pectina presente nos resíduos. De acordo com Kulkarni *et al* (1999), uma estratégia para obter uma produção seletiva de xilanase livre de celulase seria crescer o fungo filamentosos em meio líquido contendo apenas xilose como fonte de carbono. Os resíduos têxteis demonstraram ser potenciais fontes de carbono para uma produção mais seletiva de xilanases, pois além de manter a eficiência de produção das mesmas ao longo dos dias, obteve uma baixa produção de CM-celulase.

Segundo Duarte *et al* (2012), a diversidade de holocelulases produzidas por *A. oryzae* crescido em resíduos agroindustriais pode estar relacionada com a composição da biomassa. Foi realizada uma análise bromatológica dos resíduos têxteis para avaliar quais foram as variações apresentadas após o pré-tratamento. A tabela 1 apresenta os principais resultados obtidos.

**Tabela 1.** Análise bromatológica dos resíduos têxteis pré-tratados. **PL-t** – piolho de algodão limpo tratado; **PF-t** – pó de filtro tratado.

Parâmetros analisados (%)	Resíduos têxteis	
	PL-t	PF-t
Celulose	60,8 ± 0,1	68,1 ± 0,1
Hemicelulose	22,9 ± 0,3	15,9 ± 1,2
Lignina	11,6 ± 0,2	11,6 ± 0,8
Extrativos	4,72 ± 0,01	4,4 ± 0,3

Na análise bromatológica dos resíduos não tratados (resultados não apresentados), o piolho de algodão limpo apresentou um teor de celulose de 73% e hemicelulose de apenas 4,1%. O pó de filtro apresentou teores de celulose e hemicelulose de 40,8% e 47,7%, respectivamente. A quantidade de celulose do piolho de algodão foi bem superior ao de hemicelulose, ao contrário do pó de filtro, que possuiu um teor semelhante de hemicelulose e celulose. Isto se deve provavelmente ao modo de obtenção de cada resíduo, pois o pó de filtro é obtido em várias etapas de processamento de algodão, acumulando desde casca e talo do algodão (ricos em hemicelulose) à própria fibra; e o piolho de algodão é gerado a partir da fibra já limpa. O pré-tratamento do piolho de algodão demonstrou reduzir o teor de celulose e aumentar o teor de hemicelulose, mostrando que este processo aumentou a exposição polimérica da hemicelulose. Para o pó de filtro, o teor de celulose aumentou com o pré-tratamento e o de hemicelulose diminuiu.

O fungo *A. oryzae* demonstrou seu potencial na produção de hemicelulases, principalmente xilanase, quando crescido nos resíduos têxteis, mantendo sua eficiência de produção ao longo dos dias. Estes resultados vão de acordo com uma série de trabalhos já publicados e que utilizaram resíduos industriais como fontes de carbono (Christov *et al*, 1999; Teixeira *et al*, 2010; Siqueira *et al*, 2010b; Moreira *et al*, 2013; Von Gal Milanezi *et al*, 2012; Duarte *et al*, 2012). O piolho de algodão limpo tratado foi o que apresentou maior atividade específica para todas as enzimas (resultados não apresentados): a atividade de xilanase foi maior no 2º dia, com atividade de 40,8 UI/mg, para pectinase foi maior no 8º dia, com atividade de 28,44 UI/mg; para mananase foi no 10º dia, com atividade de 11,67 UI/mg, e para CM-celulases foi maior no 2º dia com atividade de 7,2 UI/mg. O valor de atividade específica de xilanase proveniente do crescimento do *A. oryzae* em PL-t foi duas vezes superior ao crescimento do *A. oryzae* PF-t e quatro vezes superior em comparação aos outros resíduos não tratados (PL-nt e PF-nt).

A barreira recalcitrante da lignina pode ser rompida com vários tipos de pré-tratamento, além de reduzir a cristalinidade da celulose, retirar certo teor de hemicelulose e aumentar a porosidade da biomassa (Wong *et al*, 1988). O maior valor da atividade específica de xilanase sugere a capacidade do pré-tratamento em aumentar

o acesso à hemicelulose, e também na remoção de produtos solúveis que poderiam estar atuando como repressores na produção de xilanases, para PL-t e PF-t.

Com base nas curvas de indução apresentadas e visando obter uma grande quantidade de xilanases, estabeleceu-se o período de cultivo de 3 dias para os resíduos tratados e 4 dias para os resíduos não tratados.

#### 4.2 Condições de cultivo de *A. oryzae* nos resíduos têxteis

Após estabelecer os parâmetros de tempo de cultivo mais adequado para *A. oryzae*, foi avaliado seu potencial de produção xilanolítica utilizando meios de cultivos suplementados com extrato de levedura (cultivo padrão - <sup>a</sup>) ou apenas com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio (cultivo alternativo - <sup>b</sup>). O fungo cresceu nos resíduos PF-t e PL-t por 3 dias sob mesma condição, e nos não tratados PF-nt e PL-nt por 4 dias. A tabela 2 apresenta os dados obtidos com os dois cultivos para xilanases.

**Tabela 2.** Comparação dos resíduos têxteis com cultivo padrão (<sup>a</sup>) e cultivo alternativo (<sup>b</sup>) quanto à produção de xilanase.

Condição de cultivo	Atividade enzimática (UI/mL)	Atividade específica (UI/mg)
PL-nt <sup>a</sup>	0,705 ± 0,036	3,296
PL-nt <sup>b</sup>	0,490 ± 0,026	6,901
PL-t <sup>a</sup>	0,585 ± 0,025	12,4
PL-t <sup>b</sup>	0,668 ± 0,076	22,267
PF-nt <sup>a</sup>	0,620 ± 0,045	7,821
PF-nt <sup>b</sup>	0,632 ± 0,031	8,000
PF-t <sup>a</sup>	0,527 ± 0,038	4,757
PF-t <sup>b</sup>	0,415 ± 0,004	14,821

A atividade enzimática de xilanase dos extratos brutos de PL-nt e PF-t diminuiu com o cultivo alternativo, diferentemente de PL-t, onde houve um aumento. E para PF-nt, não houve variação de atividade entre os cultivos. Porém a atividade específica de xilanase aumentou para todos os cultivos alternativos, indicando que a suplementação com sulfato de amônio diminuiu a produção de proteínas produzidas pelo fungo, pois em termos de atividade enzimática (UI/mL), as xilanases do cultivo alternativo tiveram valores menores que as do cultivo padrão, porém em termos de atividade específica

houve um aumento. Resultado semelhante foi encontrado por Shah and Madamwar (2005). A produção dos metabólitos primários (as enzimas hidrolíticas) pelos microrganismos é altamente influenciada pelo seu crescimento. E o crescimento do microrganismo é determinado pela disponibilidade de nutrientes no meio, principalmente nitrogênio e carbono. O extrato de levedura, além de fonte de nitrogênio, é fonte de vitaminas também, então sua ausência na suplementação influenciou o crescimento do fungo, mas não a produção das enzimas xilanolíticas. Dessa forma, a suplementação com sulfato de amônio (cultivo alternativo) demonstrou ser uma boa estratégia para o crescimento de *A. oryzae* e para produção de xilanases, por diminuir a quantidade de proteínas presentes e aumentar a atividade específica das enzimas.

### 4.3 Estratégia de purificação das xilanases de *A. oryzae* crescido em resíduos têxteis

Como o maior valor de atividade xilanolítica predominou no meio de cultivo padrão, deu-se continuidade neste cultivo para purificação das xilanases. A tabela 3 apresenta o perfil de atividade enzimática de cada extrato bruto. O *A. oryzae* foi cultivado por quatro dias em PL-nt e PF-nt, e por três dias em PL-t e PF-t. Todos os cultivos cresceram à temperatura ambiente (28°C) com agitação de 120 rpm.

**Tabela 3.** Comparação entre atividade enzimática (UI/mL) e atividade específica (UI/mg) dos extratos brutos do piolho de algodão limpo não tratado (PL-nt), piolho de algodão limpo tratado (PL-t), pó de filtro não tratado (PF-nt) e pó de filtro tratado (PF-t).

Atividade enzimática em UI/mL	Extratos brutos			
	PL-nt	PL-t	PF-nt	PF-t
Xilanase	0,705 ± 0,036	0,585 ± 0,025	0,620 ± 0,045	0,527 ± 0,038
Pectinase	0,515 ± 0,075	0,346 ± 0,066	0,439 ± 0,069	0,296 ± 0,032
CM-celulase	0,492 ± 0,018	0,377 ± 0,034	0,381 ± 0,036	0,344 ± 0,066
Mananase	0,135 ± 0,019	0,096 ± 0,016	0,075 ± 0,026	0,000 ± 0,000
Atividade específica em UI/mg	Extratos brutos			
	PL-nt	PL-t	PF-nt	PF-t
Xilanase	3,296	12,4	7,821	4,757
Pectinase	2,409	7,334	5,543	2,668
CM-celulase	2,303	7,991	4,807	3,108
Mananase	0,645	1,966	0,947	0,551

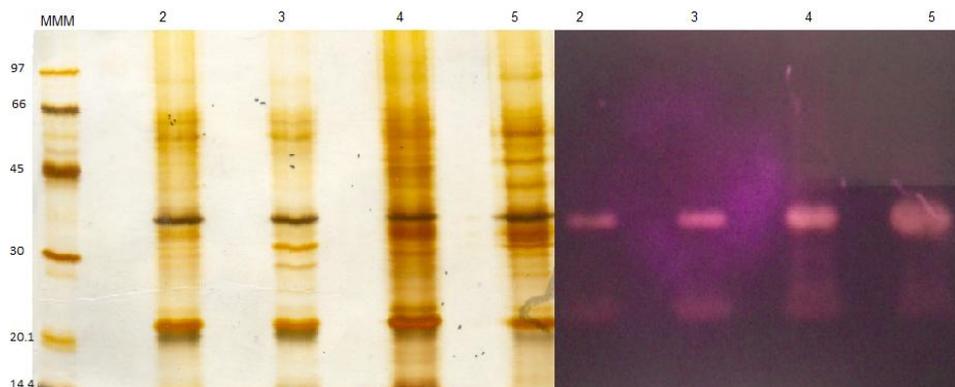
Nestas condições de cultivo, para todos os resíduos, o maior valor de atividade enzimática foi de xilanase, seguido de pectinase, CM-celulase e mananase. Dentre os resíduos, percebe-se maiores valores de atividade entre os não tratados em comparação com os tratados. Em termos de atividade específica de xilanase, o PL-t foi o que apresentou maior valor, seguido de PF-nt, PF-t e por fim PL-nt.

Os extratos foram então ultrafiltrados em uma membrana com retenção de 10 kDa, gerando um ultrafiltrado e um concentrado para cada amostra. A tabela 4 apresenta o perfil enzimático e a atividade específica das xilanas em cada dessas frações.

**Tabela 4.** Comparação entre atividade enzimática (UI/mL) e atividade específica (UI/mg) dos extratos brutos, concentrados e ultrafiltrados do piolho de algodão limpo não tratado (PL-nt), piolho de algodão limpo tratado (PL-t), pó de filtro não tratado (PF-nt) e pó de filtro tratado (PF-t).

Frações	Atividade enzimática (UI/mL)			
	PL-nt	PL-t	PF-nt	PF-t
Extrato bruto	0,705 ± 0,036	0,585 ± 0,025	0,620 ± 0,045	0,527 ± 0,038
Ultrafiltrado	0,407 ± 0,023	0,365 ± 0,005	0,295 ± 0,016	0,244 ± 0,024
Concentrado	0,602 ± 0,030	2,420 ± 0,382	0,827 ± 0,038	0,613 ± 0,019
Frações	Atividade específica (UI/mg)			
	PL-nt	PL-t	PF-nt	PF-t
Extrato bruto	3,296	12,400	7,821	4,757
Ultrafiltrado	42,481	52,381	74,532	217,134
Concentrado	0,521	9,294	2,355	4,683

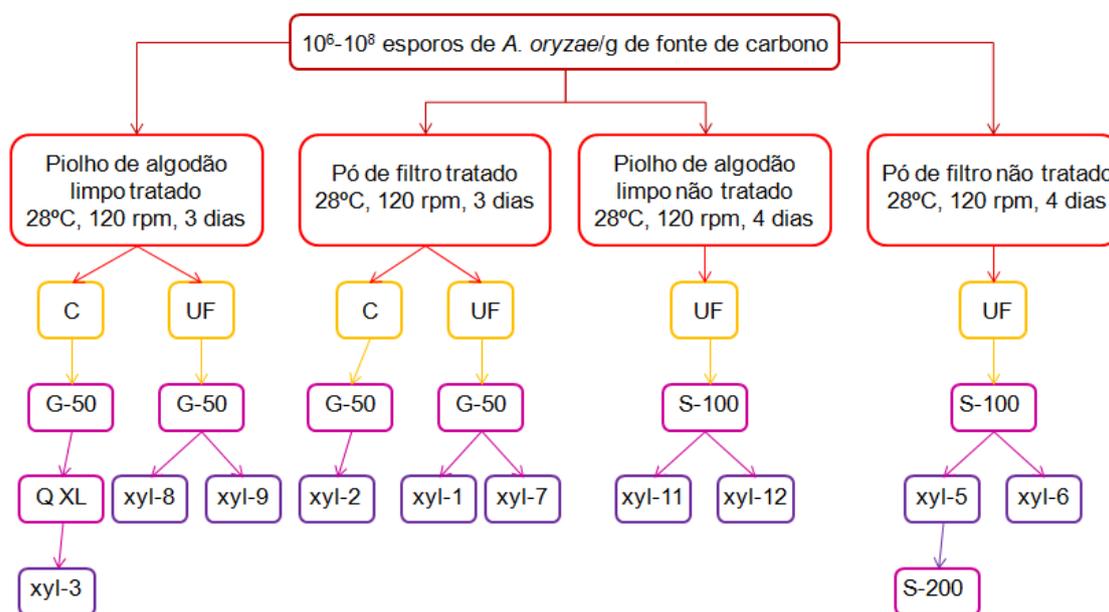
Nas frações provenientes da ultrafiltração, apesar das atividades enzimáticas serem maiores nos concentrados de cada resíduo, a atividade específica é muito superior no ultrafiltrado. A figura 8 mostra o perfil enzimático dos ultrafiltrados das quatro amostras em gel desnaturante SDS-PAGE e as mesmas amostras no zimograma copolimerizado com xilana de aveia 1%.



**Figura 8.** À esquerda, perfil proteico do ultrafiltrado das amostras em SDS-PAGE. À direita, perfil proteico do ultrafiltrado em zimograma copolimerizado com xilana de aveia 1%. Na primeira coluna foram utilizados os marcadores de massa molecular (MMM) contendo as proteínas fosforilase B (97 kDa), soroalbumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,4 kDa). Na 2ª coluna, o ultrafiltrado de PF-nt; na 3ª coluna, o ultrafiltrado de PF-t; na 4ª coluna, o ultrafiltrado de PL-nt; na 5ª coluna, o ultrafiltrado de PL-t.

No gel de zimograma dos ultrafiltrados percebe-se a presença de duas bandas de xilanases para cada ultrafiltrado, uma em torno de 35 kDa e uma em torno de 22 kDa. Curiosamente, essas bandas de xilanases apresentaram massas superiores a 10 kDa, que era o corte de retenção da membrana, o que reforça a hipótese das xilanases passarem por entre os poros da membrana, como uma estratégia do fungo para que as enzimas penetrem na estrutura lignocelulósica. De acordo com Wong *et al* (1988) e Kulkarni *et al* (1999), existe uma ocorrência de multiplicidade de formas de xilanases produzidas por microrganismos, com massas moleculares variando entre 8 a 150 kDa. Ao que tudo indica, elas devem possuir especificidades e características diferentes para que consigam hidrolisar eficientemente a xilana. Xilanases de baixa massa molecular, semelhantes às encontradas no zimograma e produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* já foram relatadas previamente (MacCabe *et al*, 1996; Von Gal Milanesi *et al*, 2012; Hashimoto *et al*, 1999; Fang *et al*, 2008; Sardar *et al*, 2000; Duarte *et al*, 2012; Moreira *et al*, 2013; Do *et al*, 2013). Segundo Wong *et al* (1988), as xilanases de baixa massa molecular podem ter funções em que não são requeridas em grandes quantidades, ou podem não ser produzidas em grandes quantidades de acordo com as condições de crescimento, ou podem ser degradadas ou adsorvidas em substratos insolúveis. Por isso, o estudo das xilanases de baixa massa molecular pode ajudar a entender a importância das mesmas.

A estratégia de purificação desenvolvida e as xilanases obtidas estão apresentadas na figura 9.



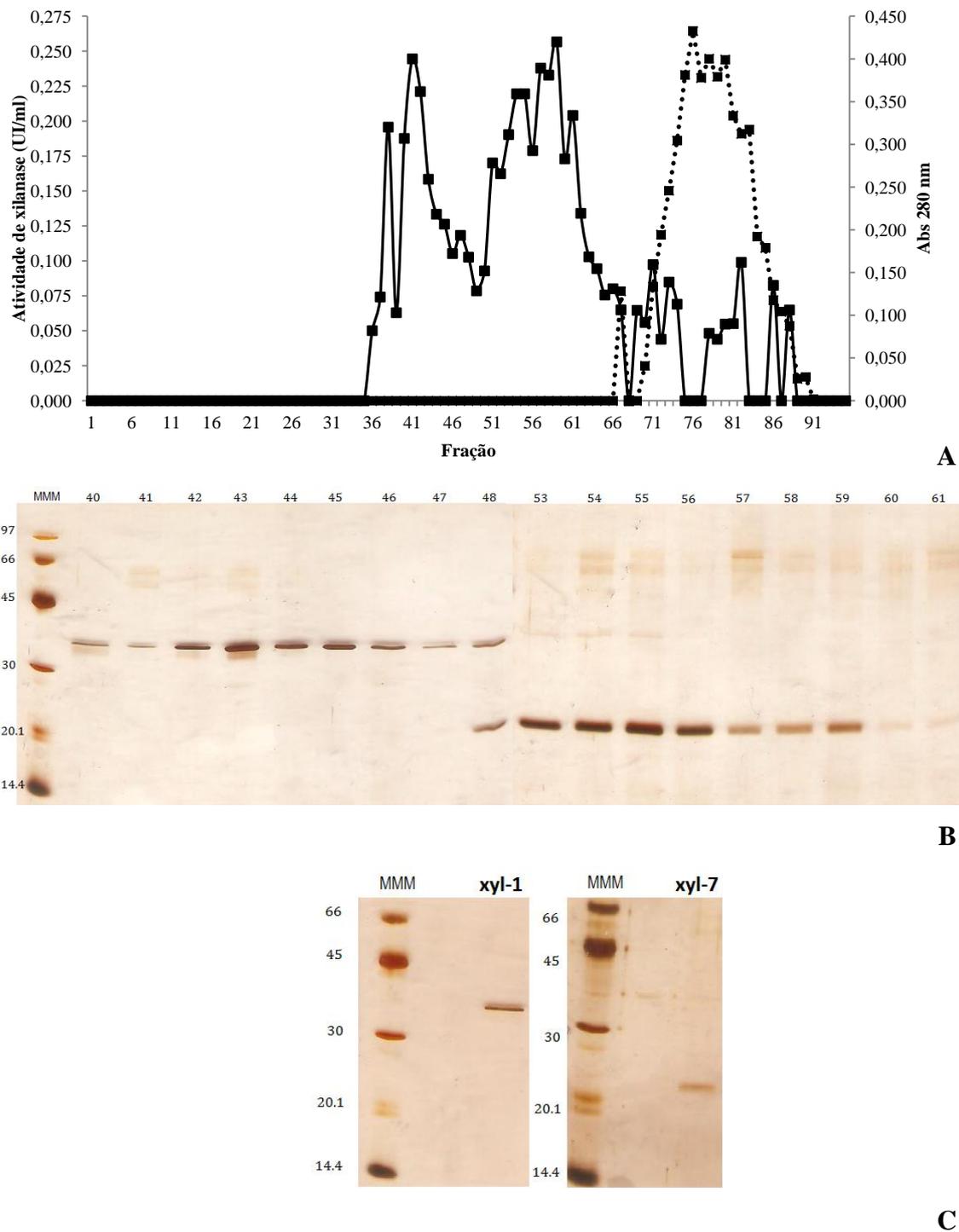
**Figura 9.** Estratégia de purificação de xilanases. C - concentrado; UF – ultrafiltrado; G-50 – resina Sephadex G-50; S-100 – resina Sephacryl S-100; Q XL – HiTrap Q XL; S-200 – resina Sephacryl S-200; xyl – representa as frações contendo atividade de xilanase coletadas em cada procedimento cromatográfico.

#### 4.3.1 Purificação de xyl-1 e xyl-7

O extrato bruto de PF-t foi submetido à ultrafiltração numa membrana de retenção de 10 kDa, gerando duas frações: concentrado e ultrafiltrado. O ultrafiltrado foi liofilizado, concentrados 10 vezes e submetido a uma cromatografia de exclusão molecular numa resina do tipo Sephadex G-50 (figura 10). As frações de cada pico foram reunidas e armazenadas a 4,0 °C com azida sódica 0,02% (m/v).

No perfil cromatográfico, percebe-se a presença de dois picos principais com atividade xilanólítica. A partir do perfil de bandas das frações de cada pico por gel SDS-PAGE, determinou-se quais frações seriam coletadas. Do primeiro pico, as frações 40 a 47 foram coletadas e identificadas como xyl-1; do segundo pico, as frações 53 a 59 foram coletadas e identificadas como xyl-7. Além disso, as frações xyl-1 e xyl-7 também foram caracterizadas por gel SDS-PAGE como uma única banda proteica para cada, com massa molecular estimada em 35 e 22 kDa para xyl-1 e xyl-7,

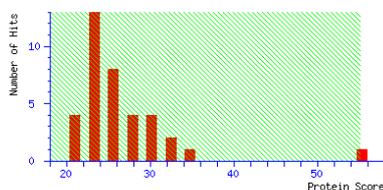
respectivamente. Estes resultados foram semelhantes à massa encontrada no zimograma do ultrafiltrado de PF-t. Com apenas uma etapa cromatográfica as duas xilanases foram separadas e purificadas.



**Figura 10.** Perfil cromatográfico do ultrafiltrado de PF-t. **A)** Cromatografia de exclusão molecular em resina do tipo Sephadex G-50 equilibrada em tampão fosfato de sódio 50 mM. (···■···) proteínas totais

(mg/mL), (—■—) xilanase (UI/mL). **B)** gel SDS-PAGE das frações 40 a 48 e 53 a 61. **C)** gel SDS-PAGE das frações reunidas. Foram utilizados os marcadores de massa molecular (MMM) contendo as proteínas fosforilase B (97 kDa), soroalbumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,4 kDa).

Para obter uma identificação mais precisa de xyl-1, a banda corada com nitrato de prata foi excisada manualmente e submetida à análise por espectrometria de massa pela técnica *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) em MALDI-TOF. Os peptídeos obtidos da banda foram analisados na base de dados NCBI (National Center Biotechnology Information – *Mascot Research*) e confirmou-se homologia com uma endo- $\beta$ -1,4-xilanase F1 de *A. oryzae* RIB40 (figura 11-A). A massa nominal da enzima homóloga foi calculada em 35,552 kDa, semelhante à massa molecular estimada por SDS-PAGE (figura 10-C). O gene responsável pela expressão desta endo- $\beta$ -1,4-xilanase de 35,5 kDa é o XynF1 e contém 327 aminoácidos (Kitamoto *et al*, 1999). A cobertura de sequência foi de 19%, com cinco peptídeos identificados (figura 11-B).



[XYNF3\\_ASPFN](#) Mass: 35446 Score: 55 Expect: 0.053 Matches: 5  
Probable endo-1,4-beta-xylanase F3 OS=Aspergillus flavus (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRR 167) GN=xynF3 PE=2 SV=1  
[XYNF1\\_ASEOR](#) Mass: 35552 Score: 55 Expect: 0.056 Matches: 5  
Endo-1,4-beta-xylanase F1 OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40) GN=xynF1 PE=1 SV=1

**A**

#### Sequência de peptídeos gerados

```

1 MVHLKALASG ILFASLASSA VISRQAAASI NDAFVAHGKK YFGTCSQAL
51 LQNSQNEAIV RADFGQLTPE NSMKWDALEP SQGSFSFAGA DFLADYAKTN
101 NKLVRGHTLV WHSQLPSWVQ GITDKDLTE VIKNHITTIM QRYKGQIYAW
151 DVVNEIFDED GILRDSVFSQ VLGEDFVRIA FETAREADFN AKLYINDYNL
201 DSADYARTKG MVSIVKKNLD AGVPIDGIGS QSHYSANGFP VSGAKGALTA
251 LASTGVSEVA VIELDIEGAS SESYLEVVNA CLDVSSCVGI TVWGVSDKDS
301 WRSSTSPLLF DSNYQAKDAY NAIIDAL

```

Sequência	Massa observada	Massa esperada	Massa calculada	Peptídeo
62 – 74	1437.6216	1436.6143	1436.6606	R.ADFGQLTPENSMK.W
165 – 178	1597.6455	1596.6382	1596.7784	R.DSVFSQVLGEDFVR.I
179 – 185	807.4190	806.4117	806.4286	R.IAFETAR.E
193 – 207	1777.7061	1776.6989	1776.8206	K.LYINDYNLDSADYAK.T
303 – 317	1657.6202	1656.6129	1656.7995	R.SSTSPLLFDSNYQAK.D

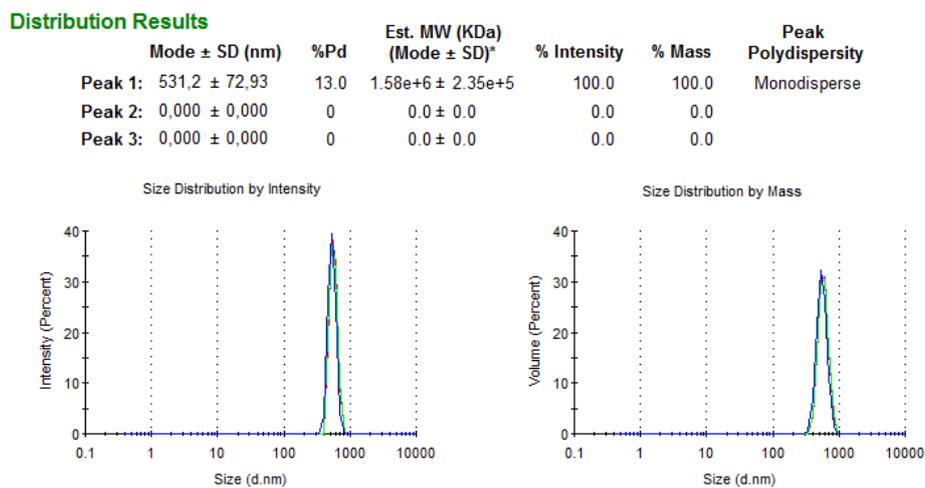
**B**

**Figura 11.** Análise por espectrometria de massa de xyl-1 purificada. **A)** Histograma do *score* (>55%,  $p < 0,05$ ) obtido na busca do Mascot de xyl-1. **B)** Sequência de peptídeos gerados pela tripsinização de xyl-1 e as massas observadas, esperadas e calculadas do digesto de xyl-1.

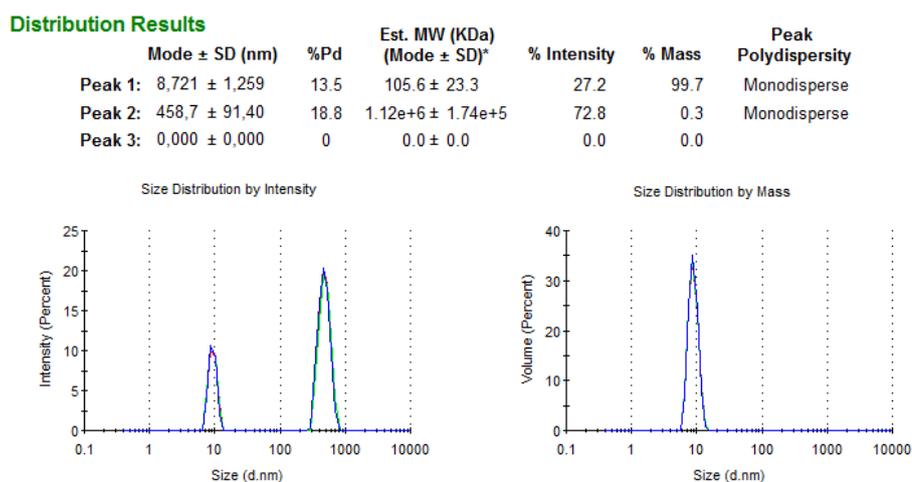
A eficiência de purificação de xyl-1 foi avaliada por espalhamento de luz dinâmico (ELD). Através do programa *Zetasizer*, pode-se obter o tamanho estimado da enzima em nm, a massa estimada em kDa, a porcentagem de intensidade de luz desviada pela enzima e porcentagem de sua massa em relação à amostra. O pico da enzima demonstrou ter um tamanho estimado muito superior ao esperado, indicando agregação das enzimas. Dessa forma, após a primeira leitura, foi adicionado 0,1% de Tween-80 (v/v), surfactante não iônico, para avaliar se ele atuaria como agente desagregador. As figuras a seguir mostram a comparação entre os picos de espalhamento de luz sem Tween-80 (A) e com Tween-80 (B) para xyl-1 (fig. 12-A e 12-B). Para xyl-7 o Tween-80 não foi eficaz em desagregar a enzima (resultado não apresentado). De acordo com o fabricante (Malvern, UK), o gráfico de intensidade por tamanho (à esquerda) indica a intensidade relativa da luz espalhada pelas partículas de diferentes tamanhos; o gráfico de volume por tamanho (à direita) correlaciona a intensidade relativa das partículas, medidas previamente, com seu volume (toma como base proteínas globulares e utiliza a teoria de Mie) e fornece um tamanho relativo da partícula e sua massa. Resumidamente, o gráfico de distribuição de intensidade indica principalmente populações de partículas de diferentes tamanhos, e o gráfico de distribuição por massa indica a prevalência dessas populações de partículas, qual é a mais representativa em termos de volume.

A análise por ELD de xyl-1 sem Tween-80 (A) mostrou um pico monodisperso com baixo índice de polidispersidade (IPD - 13%), significando apenas uma população de mesmo tamanho e com distribuição bem homogênea, indicando um alto grau de pureza da enzima. A massa molecular estimada foi de  $1,58 \cdot 10^6 \pm 2,35 \cdot 10^5$  kDa e o tamanho estimado foi de  $531,2 \pm 72,93$  nm, indicando o agregado de proteínas. Com a adição de Tween-80 (B), o pico continuou monodisperso, indicando que a homogeneidade se manteve, e a variação do IPD para 13,5% se deveu provavelmente pela adição de Tween-80. Interessante notar que o Tween-80 foi eficaz em desagregar as xilanases, pois o tamanho estimado caiu para  $8,721 \pm 1,258$  nm e a massa estimada para  $105,6 \pm 23,3$  kDa. Verificou-se a formação de dois picos no gráfico de distribuição

por intensidade, um com a mesma característica do agregado, e outro de menor intensidade porém maior massa, com características da desagregação.



**A**



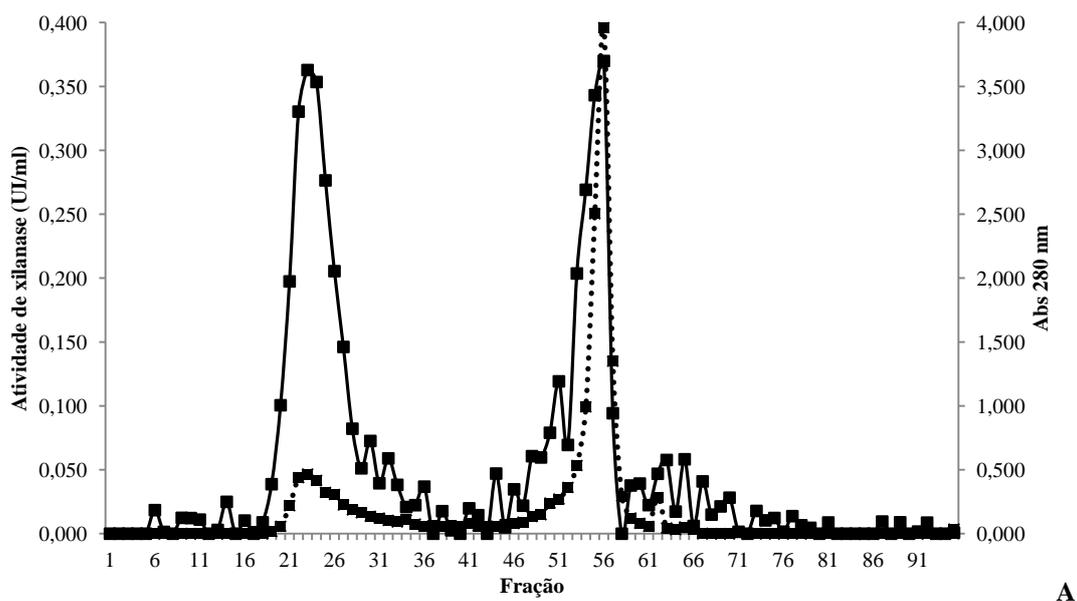
**B**

**Figura 12.** Espalhamento de luz dinâmico de xyl-1. **A)** Leitura sem Tween-80. **B)** Leitura com 0,1% Tween-80 (v/v). Amostra em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, analisada à 28°C e leituras em triplicata.

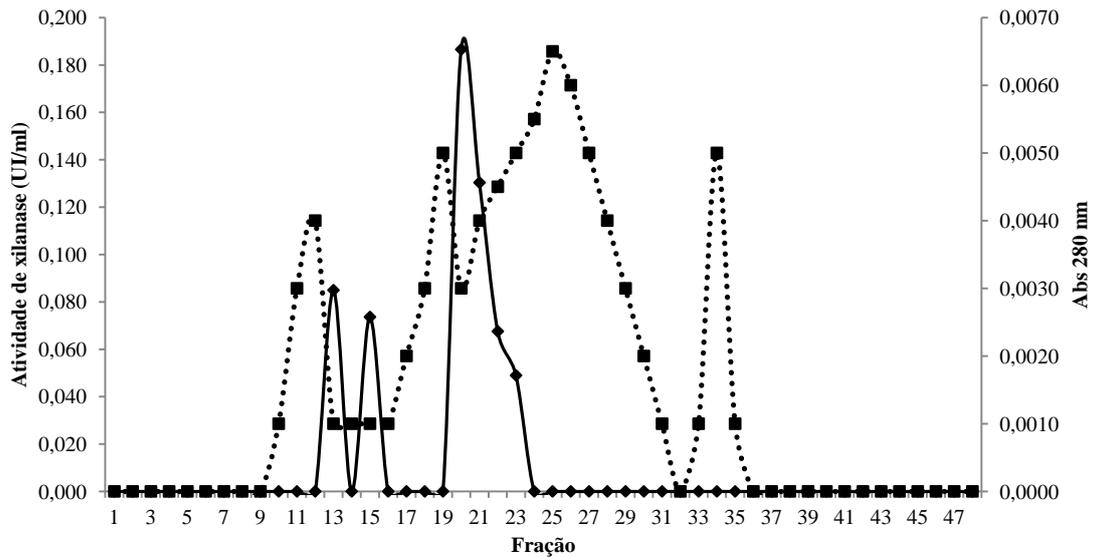
Estudos prévios indicaram a produção dessa xilanase por *A. oryzae* (Kitamoto *et al*, 1999; Ozeki *et al*, 2010). Porém é a primeira vez que se tem relato dessa enzima produzida por *A. oryzae* crescido em biomassa lignocelulósica, e de estudos da mesma por ELD.

#### 4.3.2 Purificação parcial de multi-formas de xilanase

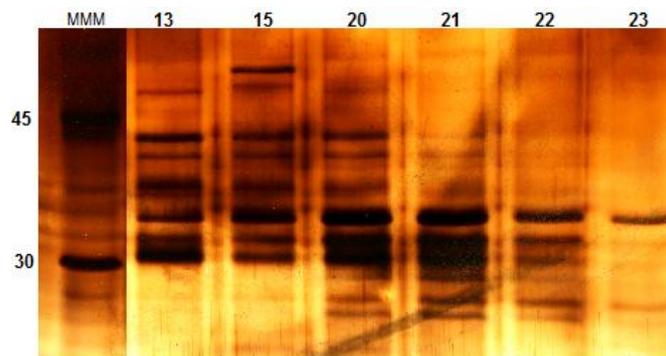
Os ultrafiltrados foram liofilizados e concentrados 10 vezes. Para obtenção de xyl-8 e xyl-9, o ultrafiltrado de PL-t foi submetido a uma cromatografia de exclusão molecular em uma resina do tipo Sephadex G-50 (resultado não apresentado). Para obtenção de xyl-11 e xyl-12, o ultrafiltrado de PL-nt foi submetido a uma cromatografia de exclusão molecular em uma resina do tipo Sephacryl S-100 (resultado não apresentado). O ultrafiltrado de PF-nt também foi submetido a uma resina do tipo Sephacryl S-100, e resultou em dois picos principais. Do primeiro pico foram reunidas as frações 20 a 27 e denominadas xyl-5, do segundo pico foram reunidas as frações 50 a 57 e denominadas xyl-6. A fração correspondente a xyl-5 foi eluída no volume vazio da Sephacryl S-100, sendo submetida a uma nova cromatografia de exclusão molecular numa resina do tipo Sephacryl S-200 (figura 13).



A



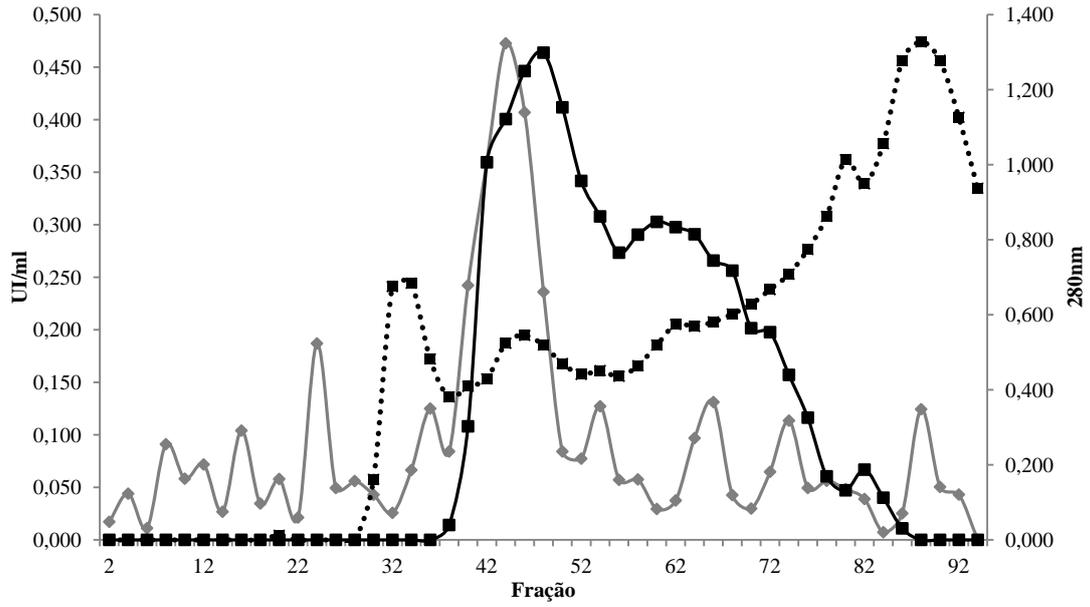
**B**



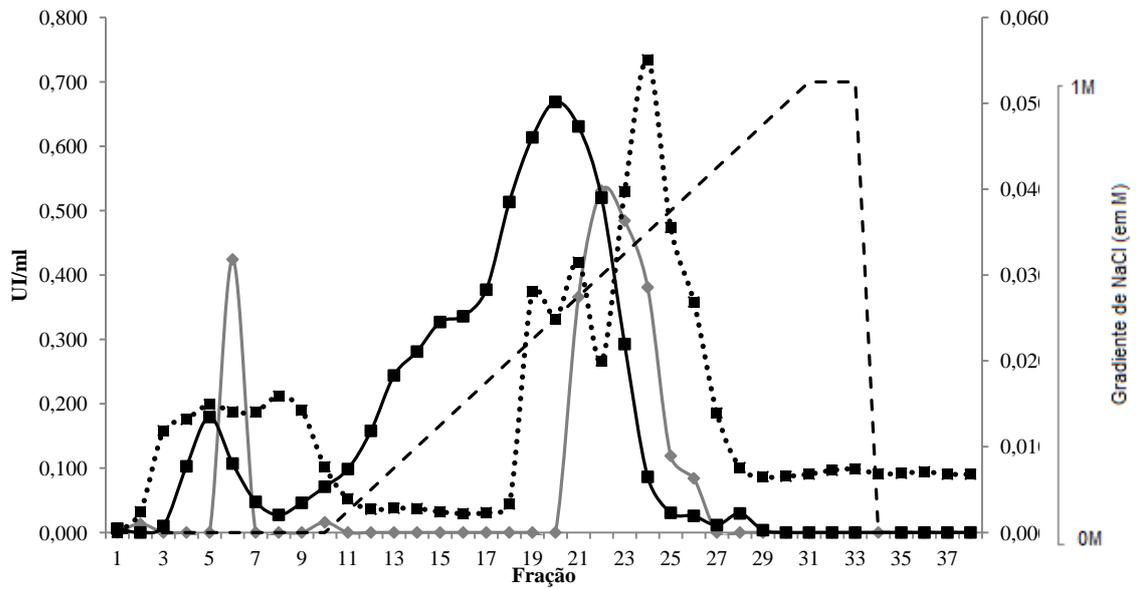
**C**

**Figura 13.** Perfil cromatográfico do ultrafiltrado de PF-nt. **A)** Cromatografia de exclusão molecular em resina do tipo Sephacryl S-100 equilibrada em tampão fosfato de sódio 50 mM. (····■····) proteínas totais (mg/mL), (—■—) xilanase (UI/mL). **B)** Cromatografia de exclusão molecular em resina do tipo Sephacryl S-200 equilibrada em tampão fosfato de sódio 50 mM. (····■····) proteínas totais (mg/mL), (—■—) xilanase (UI/mL). **C)** gel SDS-PAGE das frações 13;15; 20 a 23 de (B). Foram utilizados os marcadores de massa molecular (MMM) contendo as proteínas ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (30 kDa).

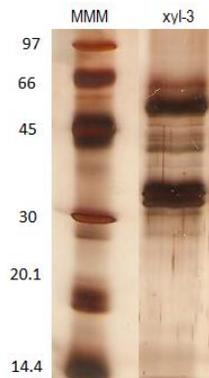
Para obtenção de xyl-3, o concentrado de PL-t foi aplicado numa resina do tipo Sephadex G-50 e a fração correspondente ao pico de xilanase foi submetida à cromatografia de troca iônica, numa resina de carga positiva Q XL (figura 14). Enquanto que para a obtenção de xyl-2, o concentrado de PF-t foi submetido a uma resina do tipo Sephadex G-50 (resultado não apresentado). Todas as frações coletadas foram armazenadas a 4,0° C em azida sódica 0,02% (m/v).



**A**



**B**



**C**

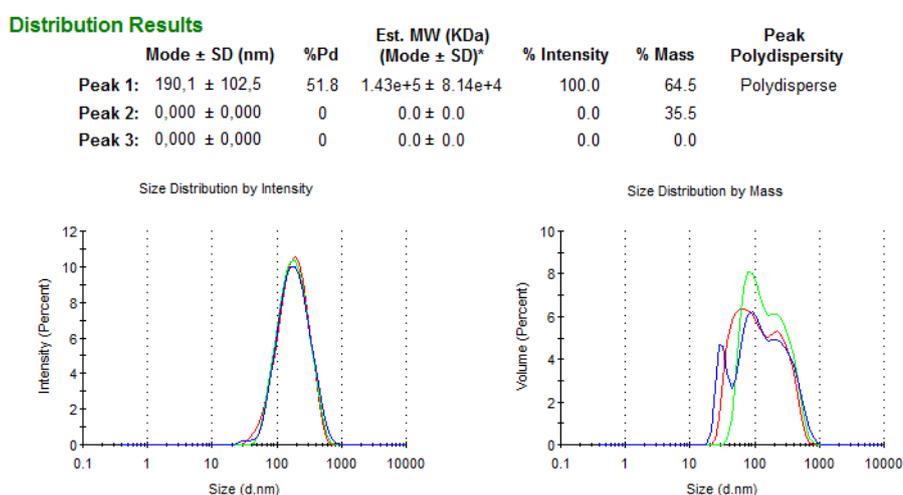
**Figura 14.** Perfil cromatográfico do concentrado de PL-t. **A)** Cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G-50 equilibrada em tampão fosfato de sódio 50 mM. (····■····) proteínas totais (mg/mL), (—■—) xilanase (UI/mL), (—◆—) pectinase. Foram reunidas as frações 42 a 49. **B)** Cromatografia de troca iônica em resina do tipo HiTrap Q XL 1mL equilibrada em tampão fosfato de sódio 50 mM. (····■····) proteínas totais (mg/mL), (—■—) xilanase (UI/mL), (—◆—) pectinase, (········) gradiente de NaCl. Foram reunidas as frações 18 a 24 (xyl-3). **C)** gel SDS-PAGE das frações reunidas. Foram utilizados os marcadores de massa molecular (MMM) contendo as proteínas fosforilase B (97 kDa), soroalbumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,4 kDa).

A eficiência de purificação das xilanases foi avaliada por espalhamento de luz dinâmico (ELD). Os picos das enzimas também demonstraram agregação pelo seu tamanho estimado. Dessa forma, após a primeira leitura, foi adicionado 0,1% de Tween-80 (v/v), para avaliar seu potencial como agente desagregador.

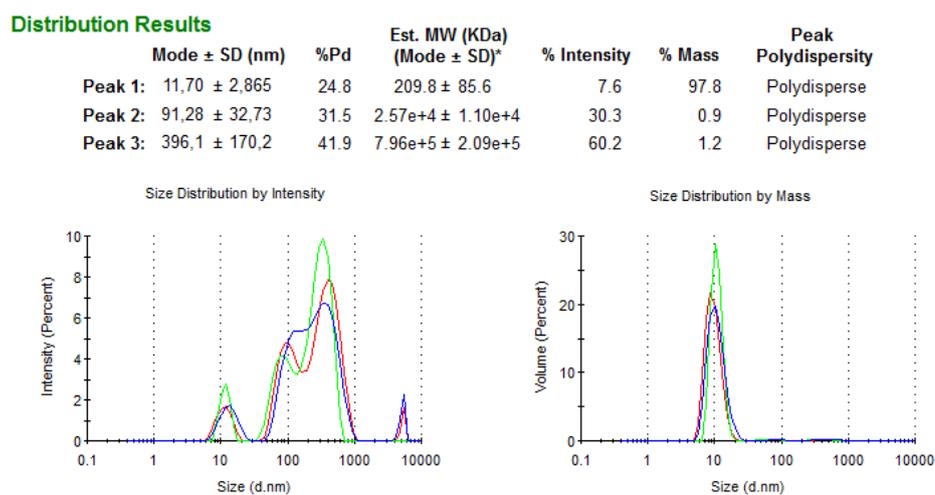
A análise por ELD de xyl-5 sem Tween-80 (A) revelou um pico polidisperso com alto IPD (51,8%), significando populações de partículas com diferentes tamanhos, e uma distribuição bem heterogênea. O formato do pico no gráfico de intensidade revela uma população heterogênea, com populações de 50 a 1000 nm. No gráfico de massa, aparentemente três picos principais despontaram em quantidade, entre 50 nm, 100 nm e 500 nm. A massa molecular estimada foi de  $1,45 \cdot 10^5 \pm 8,35 \cdot 10^4$  kDa e o tamanho estimado foi de  $190,1 \pm 102,5$  nm, indicando o agregado de proteínas. Com a adição de Tween-80 (B), verificou-se a formação três picos polidispersos, predominando apenas um com maior massa. O IPD diminuiu, ficando 24,8%, o tamanho estimado caiu para  $11,7 \pm 2,865$  nm e a massa estimada para  $209,8 \pm 85,6$  kDa, indicando a desagregação do pico principal.

Esta amostra foi proveniente do volume vazio da cromatografia de exclusão molecular do ultrafiltrado do pó de filtro não tratado em S-100. Sistemas agregados, principalmente celulolíticos, são encontrados em bactérias anaeróbicas, formando complexos multicelulares chamados de celulosomas (Goodenough, 1996). As características obtidas aqui pelo ELD sugerem um complexo secretado pelo fungo, dito xilanossoma. Estes agregados xilanolíticos são bem raros e foram encontrados apenas nos microrganismos *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium papyrosolvens* e *Streptomyces olivaceoviridis* (Goodenough, 1996; Uffen, 1997; Jiang *et al*, 2004). Em gel SDS-PAGE apresentam 11 bandas com atividade xilanolítica e 3 bandas com

atividade de endoglicanase (Beg *et al.*, 2001). De acordo com a figura 13-C, cada fração apresentada no gel é proveniente da amostra que saiu no volume vazio da cromatografia em Sephacryl S-100 e foi fracionado na S-200, e percebe-se a presença de 10 ou mais bandas nas frações. O perfil de várias bandas pode ser devido a algum tipo de degradação que as proteínas sofreram, ou instabilidade delas no meio, ou que são proteínas diferentes, ou podem ser várias xilanases provenientes de complexo xilanolítico. Uma perspectiva para melhor análise desta fração seria o zimograma, para identificar a enzima, e a espectrometria de massa de cada banda para identificação proteica.



**A**



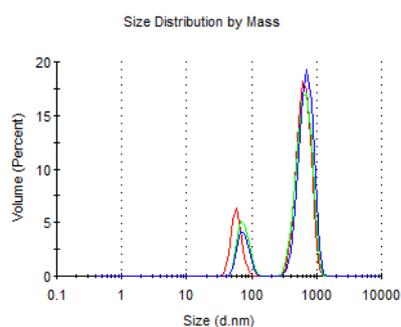
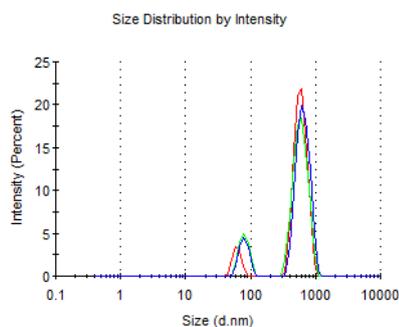
**B**

**Figura 15.** Espalhamento de luz dinâmico de xyl-5. **A)** Leitura sem Tween-80. **B)** Leitura com 0,1% Tween-80 (v/v). Amostra em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, analisada à 28°C e leituras em triplicata.

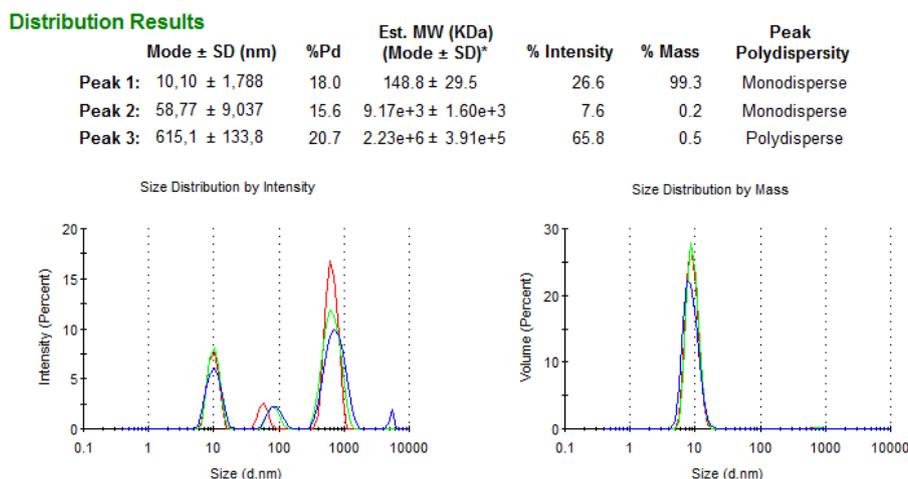
A análise por ELD de xyl-6 sem Tween-80 (A) revelou dois picos, o de menor massa monodisperso e com baixo IPD (14,6%) e o de maior massa polidisperso com IPD mediano (21,5%), significando populações de partículas de diferentes tamanhos. A massa molecular estimada do pico principal foi de  $2,23 \cdot 10^6 \pm 3,03 \cdot 10^5$  kDa e o tamanho estimado foi de  $615,1 \pm 128,2$  nm, indicando o agregado de proteínas. Com a adição de Tween-80 (B), houve a formação de três picos, predominando apenas um pico monodisperso e com maior massa. O IPD diminuiu para 18%, o tamanho estimado caiu para  $10,1 \pm 1,788$  nm e a massa estimada para  $148,8 \pm 29,5$  kDa, indicando a desagregação do pico principal de A. O pico secundário de A manteve as mesmas características de tamanho e massa molecular estimada com a adição de Tween-80, sendo provavelmente outra proteína presente que não é a enzima, e que não foi afetada pela adição do surfactante. Além disso, percebe-se dois picos no gráfico de distribuição por intensidade, um com a mesma característica do agregado, e outro de menor intensidade mas maior massa, com características da desagregação.

#### Distribution Results

	Mode $\pm$ SD (nm)	%Pd	Est. MW (KDa) (Mode $\pm$ SD)*	% Intensity	% Mass	Peak Polydispersity
Peak 1:	58,77 $\pm$ 9,063	14.6	9.17e+3 $\pm$ 2.25e+3	9.9	20.2	Monodisperse
Peak 2:	615,1 $\pm$ 128,2	21.5	2.23e+6 $\pm$ 3.03e+5	90.1	79.8	Polydisperse
Peak 3:	0,000 $\pm$ 0,000	0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0	0.0	



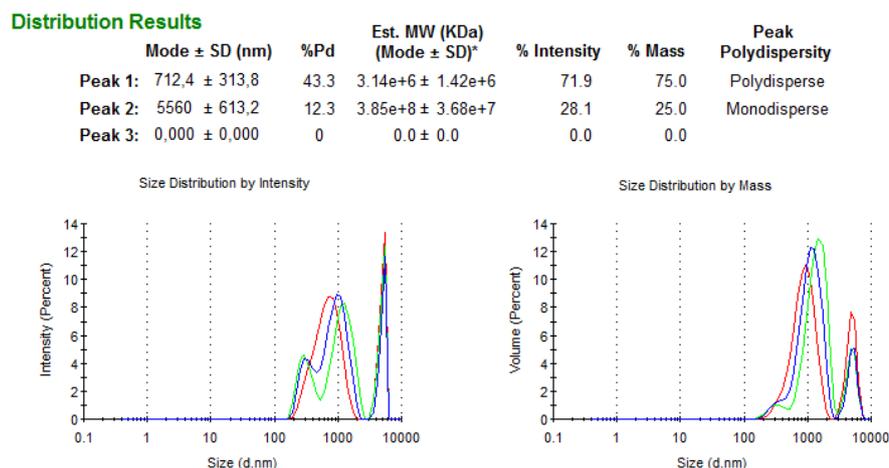
**A**



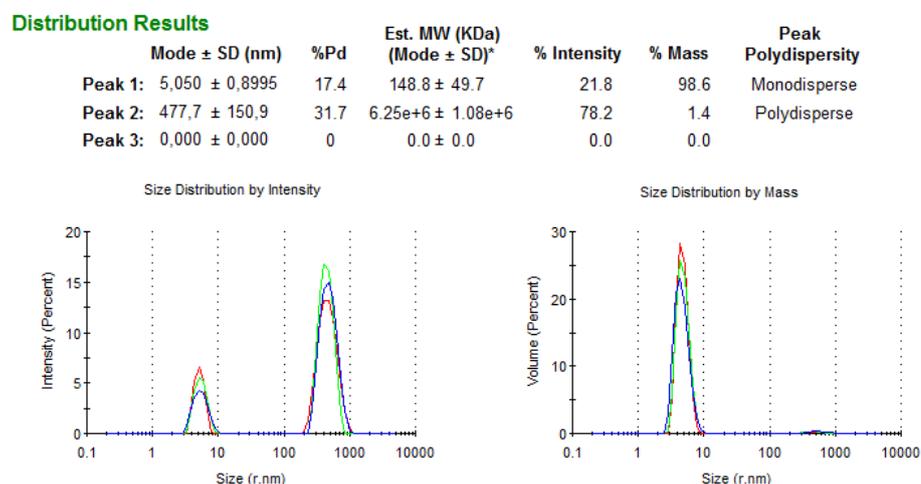
**B**

**Figura 16.** Espalhamento de luz dinâmico de xyl-6. **A)** Leitura sem Tween-80. **B)** Leitura com 0,1% Tween-80 (v/v). Amostra em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, analisada à 28°C e leituras em triplicata.

A análise por ELD de xyl-8 sem Tween-80 (A) revelou dois picos, o de menor massa monodisperso e com baixo IPD (12,3%) e o de maior massa polidisperso com IPD alto (43,3%), significando populações de partículas de diferentes tamanhos. A massa molecular estimada do pico principal foi de  $3,14 \cdot 10^6 \pm 1,42 \cdot 10^6$  kDa e o tamanho estimado foi de  $712,4 \pm 313,8$  nm, indicando o agregado de proteínas. Com a adição de Tween-80 (B), o pico principal virou monodisperso e o IPD caiu para 17,4%, indicando que houve maior homogeneidade das partículas presentes. Além disso, o Tween-80 foi eficaz em desagregar as xilanases, pois o tamanho estimado caiu para  $5,050 \pm 0,899$  nm e a massa estimada para  $148,8 \pm 49,7$  kDa. Dessa forma ocorreu a formação de dois picos no gráfico de distribuição por intensidade, um com a mesma característica do agregado, e outro de menor intensidade mas de maior massa, com características da desagregação.



**A**

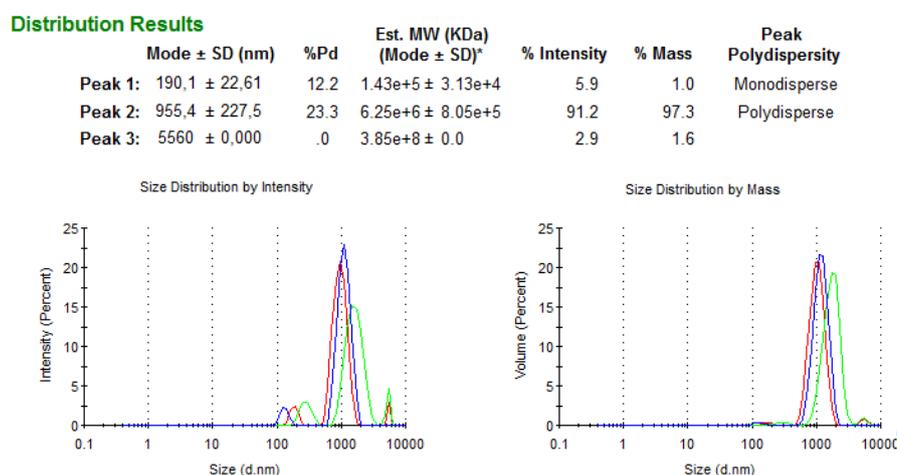


**B**

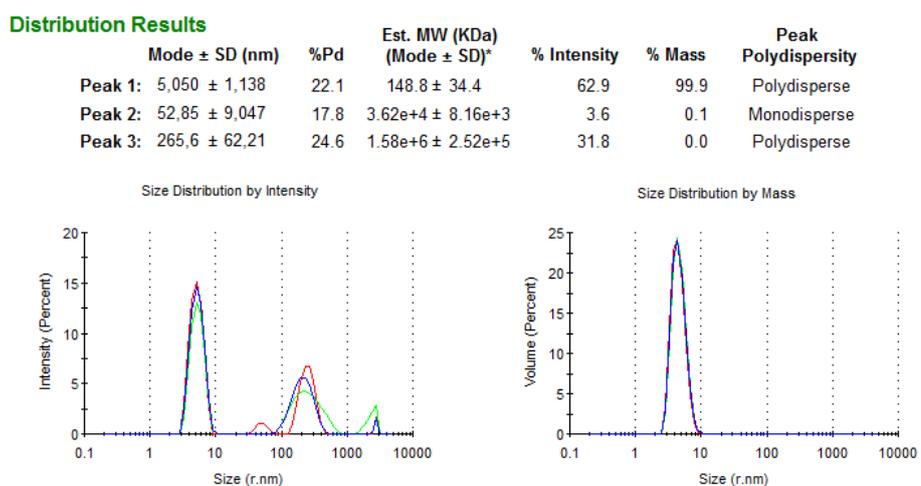
**Figura 17.** Espalhamento de luz dinâmico de xyl-8. **A)** Leitura sem Tween-80. **B)** Leitura com 0,1% Tween-80 (v/v). Amostra em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, analisada à 28°C e leituras em triplicata.

A análise por ELD de xyl-9 sem Tween-80 (A) revelou três picos, um de baixa massa monodisperso e com baixo IPD (12,2%), um insignificante e o de maior massa polidisperso com IPD mediano (23,3%), significando populações de partículas de diferentes tamanhos. A massa molecular estimada do pico principal foi de  $1,43 \cdot 10^5 \pm 3,13 \cdot 10^4$  kDa e o tamanho estimado foi de  $190,1 \pm 22,61$  nm, indicando o agregado de proteínas. Com a adição de Tween-80 (B), o pico principal continuou polidisperso e o IPD se manteve, em 22,1%, indicando que não houve diferença na homogeneidade da amostra. Porém o Tween-80 foi eficaz em desagregar as xilanases, pois o tamanho estimado caiu para  $5,050 \pm 1,138$  nm e a massa estimada para  $148,8 \pm 34,4$  kDa.

Formaram dois picos no gráfico de distribuição por intensidade, um com a mesma característica do agregado, e outro de menor intensidade mas de maior massa, com características da desagregação.



**A**



**B**

**Figura 18.** Espalhamento de luz dinâmico de xyl-9. **A)** Leitura sem Tween-80. **B)** Leitura com 0,1% Tween-80 (v/v). Amostra em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, analisada à 28°C e leituras em triplicata.

O Tween-80 se mostrou um eficiente agente desagregador das xilanases. Uma explicação para essa agregação seria a exposição das superfícies hidrofóbicas em meio aquoso devido a desnaturação da enzima (Dutta *et al*, 2010), porém as enzimas mantiveram atividade nestas condições. Outra explicação mais plausível para essa agregação enzimática poderia ser o pH em que elas se encontram (pH 7,0, tampão

fosfato de sódio 50 mM). Então, algumas amostras foram avaliadas quanto ao seu potencial zeta, que analisa o potencial que existe em torno da superfície de cada partícula (resultados não apresentados). Todas as enzimas tiveram carga líquida negativa, demonstrando que em pH 7,0 elas estão desprotonadas (e o pI está abaixo de 7,0), porém o valor da carga variou de -5 mV a -30 mV, valores tidos como próximos do neutro. Quando partículas possuem potenciais zeta próximos do neutro, elas tendem a agregar, e talvez isso explique essa agregação incomum das partículas.

Para saber se o Tween-80 afetou a atividade da xilanase foi feito um ensaio enzimático com algumas das amostras contendo 0,1% (v/v) do surfactante. A tabela 5 mostra a comparação entre as amostras sem e com Tween-80. A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% correspondeu à atividade enzimática controle, sem a presença Tween-80.

**Tabela 5.** Efeito do Tween-80 0,1% (v/v) sobre a atividade xilanolítica das amostras.

Amostras	Atividade controle (UI/mL)	Atividade relativa controle (%)	Atividade com 0,1% Tween-80 (UI/mL)	Atividade relativa (%)
Xyl-1	0,174 ± 0,008	100,00	0,206 ± 0,002	118,1
Xyl-3	0,279 ± 0,026	100,00	0,324 ± 0,026	116,0
Xyl-5	0,199 ± 0,008	100,00	0,219 ± 0,013	110,1
Xyl-6	0,213 ± 0,003	100,00	0,241 ± 0,029	113,2
Xyl-7	0,173 ± 0,010	100,00	0,198 ± 0,006	114,5
Xyl-8	0,095 ± 0,006	100,00	0,102 ± 0,012	107,4

Estes resultados indicam que o Tween-80, na concentração de 0,1% (v/v), além de ser um eficiente agente desagregador, aumenta a atividade enzimática. Resultado semelhante foi encontrado por Chen *et al* (2008), que com a adição de 5 g/L de Tween-80 conseguiu aumentar a hidrólise enzimática de celulase, e por Do *et al* (2013), que obteve aumento de atividade xilanolítica de *A. niger* com adição de 2% de Tween-80. Pode ser que esse pequeno aumento na atividade enzimática esteja relacionado com a desagregação das enzimas e exposição de alguns sítios catalíticos. O Tween-80 também é utilizado como surfactante na bioconversão da lignocelulose, durante o pré-tratamento, na hidrólise enzimática e para reciclar enzimas que poderiam ter se adsorvido não especificamente à lignina (Van Dyk and Pletschke, 2012). Como o Tween-80 é um agente tensoativo não iônico, ele poderia ter aplicação também em

procedimentos de extração líquido-líquido, como alternativa ao Triton X-114 no sistema micelar de duas fases (Jaramillo *et al*, 2013).

O resumo da estratégia e eficiência da purificação para cada xilanase está apresentado na tabela 6. A concentração das proteínas por liofilização fez com que os valores de atividade enzimática total (UI) caíssem para todas as xilanases. Possíveis explicações para isso são a desnaturação que a liofilização pode causar nas enzimas ou que este processo concentrou não só as enzimas, como seus inibidores derivados da lignina por exemplo. Uma perspectiva interessante seria aplicar um volume maior do ultrafiltrado não liofilizado na cromatografia de exclusão molecular ou concentrá-lo de outra forma, com precipitação por sulfato de amônio por exemplo. Para xyl-1 e xyl-7 a atividade aumentou quase 12 vezes, sendo que xyl-1 e xyl-7 são as duas xilanases de PF-t separadas apenas por uma etapa de cromatografia. O mesmo aconteceu para xyl-8 e xyl-9 de PL-t, e xyl-11 e xyl-12 de PL-nt, xilanases separadas apenas por uma etapa de cromatografia. Ou seja, esse processo de purificação para xilanases do ultrafiltrado se mostrou muito eficiente. Curiosamente, só não foi eficiente para as xilanases provenientes do ultrafiltrado de PF-nt (xyl-5 e xyl-6), onde a atividade específica diminuiu em comparação com o extrato bruto e com o ultrafiltrado. Uma possível explicação seria que a resina Sephacryl S-100 eluiu em cada pico, além das xilanases, outras proteínas (figura 13). Nesse caso uma perspectiva plausível seria avaliar outro tipo de resina para analisar a eficiência da separação dessas xilanases. Ademais, todas as xilanases provenientes do concentrado também tiveram suas atividades específicas diminuídas. Porém para xyl-3 é interessante notar que a etapa de troca iônica foi eficiente em aumentar a atividade específica da xilanase, mas não foi capaz de separar a xilanase da pectinase (figura 14-B). Para tentar separar essas duas enzimas seria interessante ampliar o gradiente de NaCl.

**Tabela 6.** Resumo das etapas de purificação para xyl-1, xyl-2, xyl-3, xyl-5, xyl-6, xyl-7, xyl-8, xyl-9, xyl-11 e xyl-12 produzidas por *A. oryzae*.

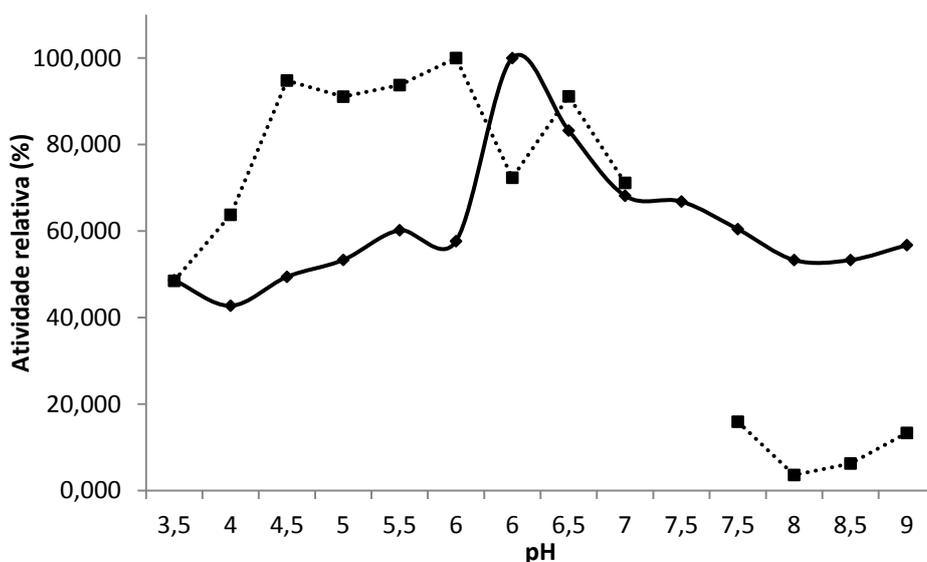
<b>Etapas de purificação</b>	<b>Volume total (mL)</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>Atividade total (UI)</b>	<b>Atividade específica (UI/mg)</b>	<b>Fator de purificação</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<i>xyl-1</i>						
Extrato bruto filtrado	320	35,520	168,640	4,748	1,000	100,00
Ultrafiltrado	230	0,230	56,120	244,000	51,393	33,28
Liofilizado	4	0,020	1,684	84,200	17,735	1,00
Sephadex G-50 - frações 40-48	18	0,054	3,060	56,667	11,935	1,81
<i>xyl-2</i>						
Extrato bruto filtrado	320	35,520	168,640	4,748	1,000	100,00
Concentrado	31	4,061	19,003	4,679	0,986	11,27
Sephadex G-50 - frações 68-72	20	1,260	1,260	1,000	0,211	0,75
<i>xyl-3</i>						
Extrato bruto filtrado	320	15,040	187,200	12,447	1,000	100,00
Concentrado	22,5	5,850	54,450	9,308	0,748	29,09
Sephadex G-50 - frações 42-49	45	18,990	21,150	1,114	0,089	11,30
HiTrap Q XL - frações 18-24	8	0,480	4,288	8,933	0,718	2,29
<i>xyl-5</i>						
Extrato bruto filtrado	320	25,280	198,400	7,848	1,000	100,00
Ultrafiltrado	275	1,100	67,850	61,682	7,859	34,20
Liofilizado	4	0,022	1,328	60,364	7,691	0,67
Sephacryl S-100 - frações 20-27	17,4	1,275	6,264	4,911	0,626	3,16
<i>xyl-6</i>						
Extrato bruto filtrado	320	25,280	198,400	7,848	1,000	100,00
Ultrafiltrado	275	1,100	67,850	61,682	7,859	34,20
Liofilizado	4	0,022	1,328	60,364	7,691	0,67

Sephacryl S-100 - frações 53-57 <i>xyl-7</i>	16	1,541	5,664	3,676	0,468	2,85
Extrato bruto filtrado	320	35,520	168,640	4,748	1,000	100,00
Ultrafiltrado	230	0,230	56,120	244,000	51,393	33,28
Liofilizado	4	0,020	1,684	84,200	17,735	1,00
Sephadex G-50 - frações 53-61 <i>xyl-8</i>	19	0,075	4,518	60,200	12,680	2,68
Extrato bruto filtrado	320	15,040	187,200	12,447	1,000	100,00
Ultrafiltrado	260	1,820	94,900	52,143	4,189	50,69
Liofilizado	4	0,060	1,724	28,733	2,308	0,92
Sephadex G-50 - frações 42-45 <i>xyl-9</i>	8	0,029	1,776	60,989	4,900	0,95
Extrato bruto filtrado	320	15,040	187,200	12,447	1,000	100,00
Ultrafiltrado	260	1,820	94,900	52,143	4,189	50,69
Liofilizado	4	0,060	1,724	28,733	2,308	0,92
Sephadex G-50 - frações 53-56 <i>xyl-11</i>	8	0,042	1,208	28,653	2,302	0,65
Extrato bruto filtrado	320	68,480	225,600	3,294	1,000	100,00
Ultrafiltrado	235	2,350	95,645	40,700	12,354	42,40
Liofilizado	4	0,088	2,716	30,864	9,369	1,20
Sephacryl S-100 - frações 63-75 <i>xyl-12</i>	28	0,193	11,368	58,841	17,861	5,04
Extrato bruto filtrado	320	68,480	225,600	3,294	1,000	100,00
Ultrafiltrado	235	2,350	95,645	40,700	12,354	42,40
Liofilizado	4	0,088	2,716	30,864	9,369	1,20
Sephacryl S-100 - frações 50-57	11	0,041	2,585	63,514	19,279	1,15

#### 4.4 Caracterização das xilanases de *A. oryzae* crescido em resíduos têxteis

Todas xilanases foram caracterizadas de acordo com a maior atividade em função da temperatura e comparadas com seus extratos brutos, parâmetros cinéticos ( $K_M$  e  $V_{Máx}$ ) para xilana de aveia solúvel, efeito de licores de auto-hidrólise e inibidores fenólicos. A enzima purificada (xyl-1) também foi caracterizada de acordo com suas características bioquímicas, como maior atividade em função do pH, termoestabilidade a 50° C e efeito de íons e modificadores de aminoácidos.

A estabilidade no pH para xyl-1 foi ampla e reteve cerca de 40% de sua atividade entre o pH 3,5 ao pH 9,0; o extrato bruto de PF-t se manteve estável numa faixa menor, entre o pH 3,5 ao pH 7,0. A maior atividade, tanto de xyl-1 quanto de seu extrato bruto foi no pH 6,0, xyl-1 em tampão fosfato de sódio 50 mM e o EB em tampão acetato de sódio 50 mM (figura 19).

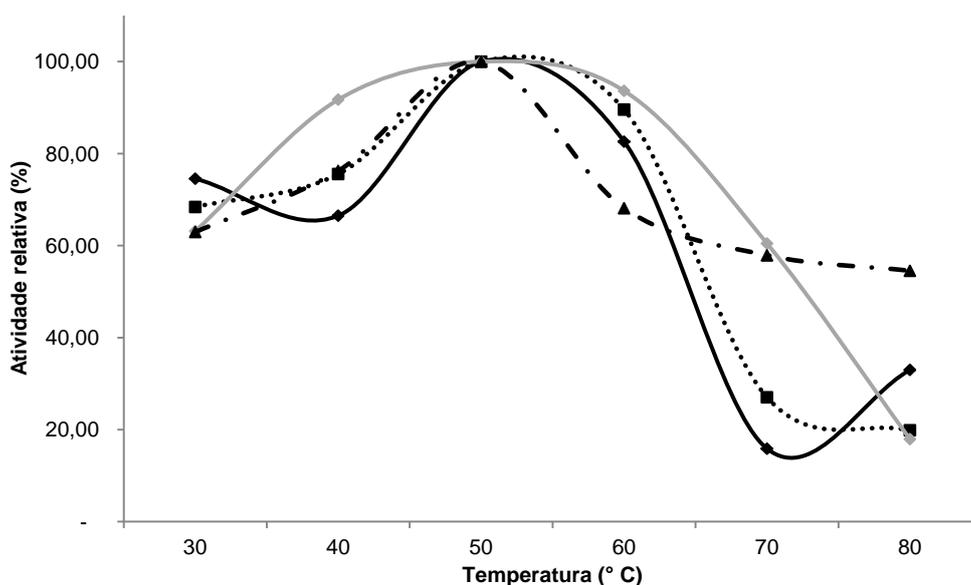


**Figura 19.** Efeito do pH na atividade xilanólítica de xyl-1 (—■—) e EB PF-t (····■····).

O fato de xyl-1 possuir atividade em pH baixo indica uma possível aplicação na indústria de ração de animal, onde a xilanase é utilizada como aditivo e precisa manter atividade quando entrar em contato com o ambiente estomacal ácido (Krengel *et al.*, 1996). Além disso, ela suportaria a mudança de ambiente estomacal para duodenal, onde o pH se torna básico. Em comparação a outras xilanases produzidas por fungos filamentosos, a faixa de pH em que as xilanases obtiveram maior atividade foi entre 5-7

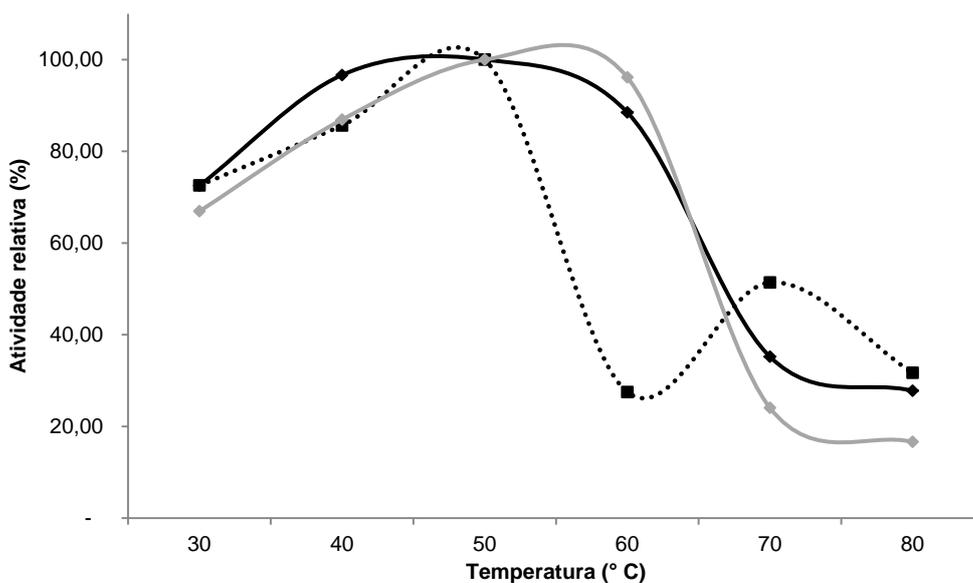
(Chen *et al*, 1997; Kitamoto *et al*, 1999; Lucena-neto and Filho, 2004; Duarte *et al*, 2012; Teixeira *et al*, 2010; Carmona *et al*, 2005; Raj and Chandra, 1996; von Gal Milanesi *et al*, 2012; Moreira *et al*, 2013). Aparentemente a influência do pH na catálise das endo- $\beta$ -1,4-xilanase está relacionada com um tipo de aminoácido presente que faz ligação de hidrogênio com o glu170, um dos glutamatos responsáveis pela catálise. Xilanases com resíduos de aspartato no lugar da asparagina, na posição 37, costumam ter melhores atividades em pH mais ácido (Krengel *et al*, 1996).

Em relação ao efeito da temperatura na atividade xilanolítica das xilanases provenientes de PF-t, tanto para xyl-1, xyl-2, xyl-7 e o EB de PF-t, a maior atividade foi na temperatura de 50° C. Porém enquanto xyl-1, xyl-7 e o EB se mantiveram estáveis entre 30° C a 60° C, xyl-2 reteve 60% de sua atividade entre 30° C a 80° C (figura 20).



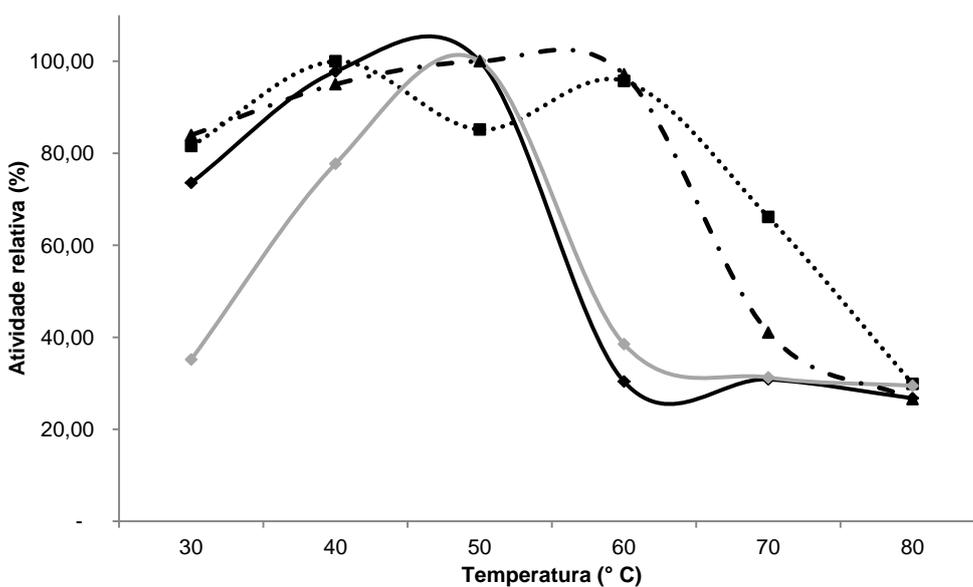
**Figura 20.** Efeito da temperatura na atividade xilanolítica de xyl-1 (—■—), xyl-2 (—▲—) xyl-7 (····■····), e EB de PF-t (—▲—).

Em relação ao efeito da temperatura na atividade xilanolítica das xilanases provenientes de PF-nt, tanto para xyl-5 e xyl-6, a maior atividade foi na temperatura de 50° C, porém para EB de PF-nt, foi a 60° C. Tanto xyl-6 e EB de PF-nt se mantiveram estáveis entre 30° C a 60° C, e a atividade de xyl-5 se manteve apenas entre 30 a 50° C (figura 21).



**Figura 21.** Efeito da temperatura na atividade xilanolítica de xyl-6 (—■—), xyl-5 (····■····), e EB de PF-nt (—◆—).

Em relação ao efeito da temperatura na atividade xilanolítica das xilanases provenientes de PL-t, para xyl-8 e xyl-9, a maior atividade foi na temperatura de 50° C, para xyl-3 foi a 60° C e para EB foi a 40° C. Tanto xyl-3 e xyl-9 se mantiveram estáveis entre 30° C a 60° C, xyl-8 se manteve estável entre 30° C a 50° C e EB de PL-t se manteve estável apenas entre 40 e 50° C (figura 22).



**Figura 22.** Efeito da temperatura na atividade xilanolítica de xyl-8 (—■—), xyl-3 (—▲—) xyl-9 (····■····), e EB de PL-t (—◆—).

Em comparação com outras xilanases produzidas por fungos filamentosos, a faixa de temperatura em que as xilanases obtiveram maior atividade foi entre 45° C a 60° C (Chen *et al*, 1997; Kitamoto *et al*, 1999; Lucena-neto and Filho, 2004; Teixeira *et al*, 2010; Duarte *et al*, 2012; Raj and Chandra, 1996; von Gal Milanesi *et al*, 2012; Moreira *et al*, 2013).

A xilanase purificada xyl-1 foi submetida a ensaios com reagentes e aminoácidos que poderiam modular sua atividade enzimática. A tabela 7 mostra o resultado desta caracterização.

**Tabela 7.** Efeito de reagentes específicos e aminoácidos na atividade de xyl-1 de *A. oryzae*.

Reagentes/aminoácidos	Atividade (UI/mL)	Atividade relativa (%)	Concentração (mmol/l)
<i>Controle</i>	0,170 ± 0,005	100,00	-
CaSO <sub>4</sub>	0,092 ± 0,010	54,32	10
CoSO <sub>4</sub>	0,122 ± 0,015	71,70	10
CuSO <sub>4</sub>	0,076 ± 0,003	44,92	10
FeSO <sub>4</sub>	0,051 ± 0,003	30,21	10
HgSO <sub>4</sub>	0,053 ± 0,003	31,22	10
MgSO <sub>4</sub>	0,061 ± 0,002	35,74	10
MnSO <sub>4</sub>	0,086 ± 0,013	50,56	10
NaSO <sub>4</sub>	0,068 ± 0,002	39,84	10
EDTA	0,052 ± 0,007	30,59	10
L-cisteína	0,311 ± 0,022	183,15	10
SDS	0,000 ± 0,003	0,00	10
AgNO <sub>3</sub>	0,000 ± 0,050	0,00	10
<i>Controle</i>	0,202 ± 0,008	100,00	-
DTNB	0,094 ± 0,037	46,38	2
β-mercaptoetanol	0,133 ± 0,007	65,94	2
NBS	0,139 ± 0,007	68,69	2
L-triptofano	0,154 ± 0,007	76,29	2

O estudo de efeito de reagentes e aminoácidos sobre a atividade enzimática é uma ferramenta útil para estudar o sítio catalítico da enzima e seu mecanismo de ação. Dentre todos reagentes e aminoácidos testados, apenas um aumentou a atividade de xyl-1, que foi a cisteína na concentração final de 10 mmol/l, aumentando a atividade xilanolítica 83,15%. Além disso, o íon Hg<sup>+</sup> diminuiu a atividade da enzima cerca de 70%, e este interage com grupos sulfidrilas, sugerindo a presença de grupos tióis (cisteína) no sítio catalítico. Resultado semelhante foi encontrado por Teixeira *et al*

(2010) e Moreira *et al* (2013). O NBS (N-bromosuccinimida), que está envolvido na oxidação de resíduos de triptofano, diminuiu a atividade cerca de 30%, conforme observado pela xilanase de *A. awamori* (Teixeira *et al*, 2010) e de *A. niger* (von Gal Milanesi, 2012). Todos os íons diminuíram significativamente a atividade xilanólica, assim como EDTA, SDS, DTNB e  $\beta$ -mercaptoetanol.

Os valores obtidos para os parâmetros cinéticos foram estabelecidos apenas para fração solúvel da xilana de aveia (tabela 8).

**Tabela 8.** Parâmetros cinéticos determinados para as xilanases produzidas por *A. oryzae*.

<b>Parâmetros cinéticos</b>		
Xilanases	$K_M$ (mg/mL)	$V_{Máx}$ (UI/mL)
<b>xyl-1</b>	4,45 $\pm$ 0,55	0,240 $\pm$ 0,006
<b>xyl-2</b>	10,15 $\pm$ 1,79	0,144 $\pm$ 0,008
<b>xyl-3</b>	19,65 $\pm$ 3,21	2,230 $\pm$ 0,016
<b>xyl-5</b>	8,93 $\pm$ 0,39	0,610 $\pm$ 0,081
<b>xyl-6</b>	18,46 $\pm$ 3,94	1,100 $\pm$ 0,104
<b>xyl-8</b>	23,07 $\pm$ 0,37	0,540 $\pm$ 0,004
<b>xyl-9</b>	29,13 $\pm$ 9,11	1,220 $\pm$ 0,019

A enzima purificada xyl-1 foi a que apresentou maior afinidade ao substrato. Além disso, todos os valores variaram significativamente, principalmente entre as xilanases de massa molecular semelhante, evidenciada pelo seu zimograma (resultados não apresentados): entre xyl-1 para PF-t, xyl-5 para PF-nt e xyl-8 para PL-t, todas com massa molecular em torno de 35 kDa; e entre xyl-6 para PF-nt e xyl-9 para PL-t, com massa molecular em torno de 22 kDa. Apesar dessas xilanases serem as mesmas, elas possuem características bioquímicas distintas, muito provavelmente induzidas pela fonte de carbono que o fungo cresceu. Resultado semelhante é encontrado em alguns trabalhos. Duarte *et al* (2012) descreveu uma xilanase purificada de *A. oryzae*, crescido em resíduo agroindustrial, com massa de 21, kDa e  $K_M$  de 10,05 mg/mL para fração solúvel de xilana de aveia. No trabalho de Gao *et al* (2012), foram expressas duas xilanases de *A. oryzae* em *Pichia pastoris*, de massa 24,6 e 26,2 kDa, com  $K_M$  de 1,58 mg/mL e 1,63 mg/mL, respectivamente, em xilana de bétula. Kimura *et al* (2002; 2000) purificou uma xilanase de *A. oryzae* crescido em farelo de trigo, com massa de 32,437

kDa e  $K_M$  de 6,5 mg/mL em xilana de bétula; e uma xilanase de 21 kDa e  $K_M$  de 5,1 mg/mL em xilana de bétula.

As enzimas foram submetidas a ensaios de termoestabilidade na temperatura de 50° C (tabela 9). Vários fatores podem alterar a termoestabilidade de uma enzima. O aumento de temperatura rompe com as ligações não covalentes (ligações de hidrogênio, van der Waals, etc), tornando-a inativa, ou parcialmente inativa (Paes *et al*, 2012).

**Tabela 9.** Termoestabilidade determinada para cada xilanase a 50° C.

<b>Xilanases</b>	<b>Termoestabilidade</b>
xyl-1	20 minutos
xyl-2	<24h
xyl-3	24 hrs
xyl-5	24hrs
xyl-6	<24h
xyl-7	15 minutos
xyl-8	5 minutos
xyl-9	20 minutos

É importante notar que xyl-5, enzima parcialmente purificada, se manteve estável a 50° C por 24 horas, diferentemente das outras que apresentaram menor estabilidade térmica. Xyl-3 também se manteve estável a 50° C, porém essa fração possui a presença de mais de uma enzima, e essa associação pode ter ajudado a manter sua termoestabilidade (figura 14-B). Percebe-se que dentre as enzimas os valores de termoestabilidade foram distintos. Conforme Paes *et al* (2012), a comparação de termoestabilidade entre enzimas de trabalhos diferentes não produz análises significativas pois dificilmente os trabalhos compartilham das mesmas condições, como tempo de incubação, temperatura, medida relativa de atividade, etc. Neste trabalho, a termoestabilidade foi conduzida de forma igual para todas as enzimas, dessa forma as diferenças entre elas são plausíveis e significativas. A termoestabilidade de cada enzima pode estar relacionada com seu N-terminal, maior quantidade de resíduos alifáticos (Kulkarni *et al*, 1999) e também com seu padrão de glicosilação (Fonsenca-Maldonado *et al*, 2013).

As enzimas foram incubadas com o licor de auto-hidrólise de sabugo de milho. O sabugo foi submetido a um pré-tratamento em um reator por 30 minutos à 200° C, para solubilizar principalmente a sua porção hemicelulolítica. A atividade

xilanolítica foi dosada para cada enzima com o licor diluído 10 vezes. A tabela 10 resume a atividade relativa de cada xilanase em diferentes condições. Foram comparadas duas atividades distintas em relação ao controle, uma onde a enzima foi incubada com o licor e o substrato, e outra onde a mesma foi incubada apenas com o licor. O efeito da mistura de licor, substrato e enzima aumentou a atividade de todas as xilanases, menos de xyl-8. Xyl-12 obteve um aumento de mais de 100% em sua atividade. É interessante notar o efeito da mistura de licor com a enzima somente, pois mesmo que a atividade não fosse comparável à atividade controle (menos para xyl-1), o licor conseguiu atuar como substrato para todas as xilanases. De acordo com Michelin *et al* (2012), a composição do licor de auto-hidrólise é principalmente de xilooligossacarídeos (25,39 g/L). Há também a presença de outros oligossacarídeos (glico-, arabino- e grupos acetil), monossacarídeos (xilose, glicose, arabinose), e também hidroximetilfurfural e furfural, inibidores de metabolismo microbiano, nas concentrações de 0,19 e 0,77 g/L, respectivamente. A presença de xilooligossacarídeos pode inibir a atividade xilanolítica (Polizeli *et al*, 2005), porém praticamente todas as enzimas tiveram aumento em suas atividades na mistura de licor com substrato. Provavelmente isto aconteceu pelo aumento de substrato disponível para hidrólise enzimática, evidenciado a afinidade das xilanases pelos xilooligossacarídeos. No caso de xyl-8, o efeito inibitório pode ser devido à ação dos furfurais presentes ou pelo acúmulo dos xilooligossacarídeos. Uma perspectiva interessante seria utilizar o licor como substrato enzimático, tanto para atividades como para parâmetros cinéticos, e também como indutor de produção de xilanase em meios de cultura submerso, conforme foi proposto por Michelin *et al*, 2012. Além disso, importante notar novamente os resultados distintos para todas as xilanases desse estudo.

As enzimas também foram submetidas ao efeito dos compostos fenólicos em suas atividades xilanolíticas. A tabela 11 mostra a atividade relativa de cada xilanase. Os inibidores utilizados foram ácido ferúlico, ácido cinâmico, ácido  $p$ -cumárico, ácido 4-hidróxibenzóico, vanilina e ácido tanínico. Conforme descrito por Duarte *et al* (2012b), estes compostos fenólicos são provenientes da lignina na quebra da biomassa lignocelulósica e inibem a atividade enzimática. Porém o notado foi que muitos aumentaram a atividade enzimática em vez de inibir. O ácido ferúlico aumentou a atividade de todas as xilanases testadas e para xyl-9 todos os inibidores aumentaram sua

atividade. No resultado encontrado por Moreira *et al* (2013), uma xilanase purificada proveniente de *A. terreus* não só teve atividade aumentada assim como se manteve estável por 7 dias nestes inibidores. Segundo Kaya *et al* (2000), a adição de compostos fenólicos em baixas concentrações (0,05%) aumentou a atividade xilanolítica, porém um aumento da concentração dos inibidores (0,2%) levou à inibição enzimática. Um estudo realizado por Paes *et al* (2011) demonstrou que a ação inibitória dos compostos fenólicos não ocorre diretamente no sítio catalítico e sim através de inibição alostérica, ou seja, o composto estaria se ligando a um sítio da enzima que não é o catalítico, resultando na sua perda de atividade. Ou seja, se as xilanases neste presente estudo foram ativadas pela adição do composto fenólico, provavelmente essa ativação ocorre por alguma mudança conformacional que favorece a ação catalítica da enzima.

**Tabela 10.** Efeito do licor de auto-hidrólise na atividade xilanolítica.

<b>Xilanases</b>	<b>Atividade controle (UI/mL)</b>	<b>Atividade controle (%)</b>	<b>Efeito do licor com substrato (UI/mL)</b>	<b>Efeito do licor com substrato (%)</b>	<b>Efeito do licor sem substrato (UI/mL)</b>	<b>Efeito do licor sem substrato (%)</b>
xyl-1	0,100 ± 0,005	100,00	0,139 ± 0,013	139,43	0,115 ± 0,014	115,04
xyl-2	0,077 ± 0,017	100,00	0,110 ± 0,023	156,38	0,075 ± 0,018	100,21
xyl-3	0,421 ± 0,027	100,00	0,618 ± 0,016	146,70	0,193 ± 0,028	45,78
xyl-5	0,350 ± 0,020	100,00	0,435 ± 0,008	124,08	0,151 ± 0,010	43,09
xyl-6	0,300 ± 0,028	100,00	0,402 ± 0,017	133,80	0,110 ± 0,010	36,76
xyl-7	0,232 ± 0,016	100,00	0,350 ± 0,014	150,70	0,078 ± 0,010	31,16
xyl-8	0,262 ± 0,021	100,00	0,215 ± 0,017	82,03	0,060 ± 0,015	20,46
xyl-9	0,087 ± 0,012	100,00	0,163 ± 0,016	187,47	0,057 ± 0,007	65,20
xyl-11	0,290 ± 0,033	100,00	0,374 ± 0,030	129,02	0,179 ± 0,046	61,57
xyl-12	0,127 ± 0,015	100,00	0,274 ± 0,045	216,13	0,096 ± 0,023	75,99

**Tabela 11.** Efeito dos inibidores fenólicos na atividade xilanolítica. **AF** – ácido ferúlico; **AC** – ácido cinâmico; **ApC** – ácido p-cumárico; **4HB** – ácido 4-hidróxibenzóico; **V** – vanilina; **AT** – ácido tanínico.

Xilanases	Controle	Inibidores fenólicos					
		AF - UI/mL	AF - %	AC - UI/mL	AC - %	ApC - UI/mL	ApC - %
xyl-1	0,144 ± 0,016	0,218 ± 0,011	151,49	0,122 ± 0,013	84,68	0,102 ± 0,015	70,90
xyl-3	0,451 ± 0,044	0,731 ± 0,022	162,16	0,461 ± 0,020	102,21	0,458 ± 0,018	101,47
xyl-5	0,259 ± 0,002	0,446 ± 0,069	171,86	0,261 ± 0,018	100,56	0,291 ± 0,040	112,19
xyl-6	0,296 ± 0,016	0,356 ± 0,040	120,52	0,291 ± 0,012	98,51	0,332 ± 0,005	112,30
xyl-7	0,233 ± 0,020	0,283 ± 0,015	121,74	0,238 ± 0,014	102,45	0,248 ± 0,019	106,70
xyl-8	0,206 ± 0,027	0,281 ± 0,021	135,91	0,198 ± 0,010	95,75	0,181 ± 0,019	87,70
xyl-9	0,090 ± 0,013	0,183 ± 0,011	204,56	0,115 ± 0,012	128,48	0,114 ± 0,006	127,40
xyl-11	0,377 ± 0,022	0,519 ± 0,014	137,66	0,344 ± 0,012	91,24	0,364 ± 0,018	96,55
xyl-12	0,168 ± 0,020	0,282 ± 0,024	167,85	0,173 ± 0,015	102,97	0,175 ± 0,025	104,16

Xilanases	Controle	Inibidores fenólicos					
		4HB - UI/mL	4HB - %	V - UI/mL	V - %	AT - UI/mL	AT - %
xyl-1	0,144 ± 0,016	0,134 ± 0,003	93,13	0,133 ± 0,012	92,33	0,143 ± 0,011	99,31
xyl-3	0,451 ± 0,044	0,470 ± 0,038	104,30	0,520 ± 0,024	115,20	0,465 ± 0,037	103,14
xyl-5	0,259 ± 0,002	0,306 ± 0,047	118,07	0,340 ± 0,010	131,23	0,309 ± 0,024	119,19
xyl-6	0,296 ± 0,016	0,357 ± 0,027	120,93	0,359 ± 0,009	120,33	0,334 ± 0,017	113,06
xyl-7	0,233 ± 0,020	0,286 ± 0,015	122,70	0,118 ± 0,022	50,65	0,216 ± 0,008	92,75
xyl-8	0,206 ± 0,027	0,183 ± 0,002	88,81	0,193 ± 0,008	93,41	0,207 ± 0,007	100,32
xyl-9	0,090 ± 0,013	0,113 ± 0,005	126,22	0,107 ± 0,012	119,59	0,144 ± 0,012	161,08
xyl-11	0,377 ± 0,022	0,373 ± 0,033	98,93	0,401 ± 0,034	106,36	0,364 ± 0,021	96,55
xyl-12	0,168 ± 0,020	0,165 ± 0,024	98,21	0,143 ± 0,035	85,11	0,144 ± 0,020	85,71

Os dados apresentados nesse trabalho sugerem que o fungo *A. oryzae* produz multiplicidade de formas de xilanases com características diferentes, de acordo com o resíduo em que o fungo cresceu. De acordo com Beg *et al* (2001), os microrganismos secretam um sistema multi-enzimático com funções especializadas para alcançar a hidrólise eficiente da xilana. Nesse trabalho foram relatadas a presença de xilanases semelhantes, comprovado por suas massas por zimograma, porém com características bioquímicas distintas. Ou seja, há alguma razão para essa expressão diferenciada das xilanases. Alguns fatores que influenciam a multiplicidade de formas de xilanase são as condições de cultivo (Oda *et al*, 2006), regulação genética, processamento diferencial do RNA mensageiro e as modificações pós-traducionais (Wong *et al*, 1988; Polizeli *et al*, 2005). Como foi descrito anteriormente, a composição de cada resíduo têxtil utilizado neste trabalho variou entre si. Aparentemente a multiplicidade de formas de xilanase existe para que o fungo saprófito se adapte a diferentes biomassas lignocelulósicas.

## 5. CONCLUSÕES

O trabalho desenvolvido até o momento nos permitiu verificar que:

1. O fungo *Aspergillus oryzae* produziu múltiplas formas de xilanase quando crescido em resíduos têxteis;
2. O pré-tratamento foi eficaz para aumentar a atividade específica das xilanases;
3. O cultivo com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio se mostrou mais eficaz na produção de xilanases;
4. Os ultrafiltrados apresentam atividade específica xilanolítica significativa, sendo alvos potenciais para purificação de xilanases;
5. A enzima xyl-1 foi purificada com apenas uma etapa cromatográfica, identificada como uma endo- $\beta$ -1,4-xilanase, com tamanho de 35,55 kDa,
6. O ELD se mostrou eficaz em avaliar o grau de pureza das amostras e se elas estão agregadas ou não; o Tween-80 se mostrou eficiente agente desagregador e não influenciou na atividade enzimática;
7. Xyl-1 obteve maior atividade em pH 6,0, 50°C, termoestabilidade de 20 minutos, foi ativada por cisteína e dentre as xilanases avaliadas neste estudo, foi a que obteve maior afinidade ao substrato;
8. O licor de auto-hidrólise aumentou a atividade de todas xilanases, menos xyl-8, além de ter atuado como substrato;
9. O ácido ferúlico ativou todas as enzimas; xyl-9 foi ativada por todos inibidores fenólicos;
10. Pelas características apresentadas pelas xilanases deste estudo, as melhores aplicabilidades seriam na indústria têxtil, de ração animal, branqueamento de papel e produção de etanol de 2ª geração;

## 6. PERSPECTIVAS

Uma perspectiva futura é realizar o estudo estrutural das multi-formas de xilanases produzidas por *A. oryzae* sob o efeito de inibidores fenólicos, licores de auto-hidrólise e aminoácido cisteína, e os produtos de hidrólise dessas xilanases em xilana de aveia e polpas de celulose submetidas ao processo industrial *Kraft*. A análise estrutural da xilanase sob o efeito de ativadores e inibidores de atividade enzimática permitirá a melhor compreensão da interação destas substâncias com o sítio catalítico da enzima. E o estudo dos produtos de hidrólise possibilitará um melhor entendimento sobre a ação enzimática e seu desempenho na hidrólise das diferentes polpas de celulose. Outra perspectiva é a elaboração de mapas bidimensionais para identificação das diferentes proteínas secretadas por *A. oryzae* crescido nos quatro resíduos têxteis, e se há a presença de xilanases glicosiladas. A análise do secretoma auxiliará a descrição da secreção de proteínas induzida por diferentes fontes de carbono. E a análise da presença ou não de glicosilações nas xilanases permitirá entender melhor qual a influência que cada fonte de carbono imprime no sistema de excreção enzimático do fungo.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Adrio JL, Demain AL. Fungal biotechnology. *International Microbiology*. 2003. 6:191-199.
- Agblevor FA, Cundiff JS, Mingle C, Li W. Storage and characterization of cotton gin waste for ethanol production. *Resources Conservation & Recycling*. 2006. Set;46:198–216.
- Amanullah A, Blair R, Nienow AW, Thomas CR. Effects of Agitation Intensity on Mycelial Morphology and Protein Production in Chemostat Cultures of Recombinant *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 1998. Fev; 62(4):434-46.
- Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Exportações e Importações Brasileiras de Algodão. Relatório Agosto 2013. Brasília: ABRAPA; 2013.
- Bailey MJ, Poutanen K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 1989. 30(5):5–10.
- Bailey MJ, Viikari L. Production of xylanases by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylan-based media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1993. 9:80–4.
- Barbesgaard P, Heldt-hansen HP, Diderichsen B. On the safety of *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology Biotechnology: a review*. 1992. 36:569–72.
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal, GS. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2001. Jun; 56:326–38.
- Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 2000. 18:355–83.
- Binod P, Palkhiwala P, Gaikawai R, et al. Industrial enzymes – Present status and future perspectives for India. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2013. 72:271-286.

Bischoff K, Rooney A, Li X-L, et al. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*.

*Biotechnology Letters*. 2006. 28:1761-5.

Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*. 2003. 54:519-46.

Bouws H, Wattenber A, Zorn H. Fungal secretomes – nature’s toolbox for white biotechnology. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2008. 80:381-388.

Bradford MM., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976. 72:248-54.

Brink JVD, Vries RPD. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2011. 91:1477–92.

Carmona EC, Fialho MB, Buchgnani ÉB, et al. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. *Process Biochemistry*. 2005. Jan;40:359–64.

Chen C, Chen JL, Lin TY. Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production. *Enzyme and Microbial Technology*. 1997. 21:91-6.

Chen M, Zhao J, Xia L. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars. *Carbohydrate Polymer*. 2008. Jun;71:411–5.

Cherry JR, Fidantsef AL. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*. 2003. 14:438–43.

Christov LP, Szakacs G, Balakrishnan H. Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching. *Process Biochemistry*. 1999. Ago;34:511–7.

Claassen PAM, van Lier JB, Lopez Contreras AM, et al. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology Biotechnology*. 1999. 52:741–55.

Conesa A, Punt PJ, Luijk NV, van den Hondel CAMJJ. The secretion pathway in filamentous fungi: A biotechnological view. *Fungal Genetics and Biology*. 2001. 33:155-171.

Do TT, Quyen DT, Nguyen TN, Nguyen VT. Molecular characterization of a glycosyl hydrolase family 10 xylanase from *Aspergillus niger*. *Protein Expression and Purification*. 2013. 92(2):196–202.

Dodd D, Cann IO. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy*. 2009. Jan;1:2-17.

Duarte GC, Moreira LRS, Jaramillo PMD, Filho EXF. Biomass-Derived Inhibitors of Holocellulases. *Bioenergy Research*. 2012. Fev;5:768–77.

Duarte GC, Moreira LRSM, Mendoza DPG, et al. Use of Residual Biomass from the Textile Industry as Carbon Source for Production of a Low-Molecular-Weight Xylanase from *Aspergillus oryzae*. *Applied Sciences*. 2012b. 2:754–72.

Dutta T, Bhattacharjee A, Majumdar U, et al. In Vitro Renaturation of Alkaline Family G/11 Xylanase via a Folding Intermediate:  $\alpha$ -Crystallin Facilitates Refolding in an ATP-Independent Manner. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 2010. 162:1238–48.

Fang H, Chang S, Lan C, Fang TJ. Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. *Process Biochemistry*. 2008. Out;43:49–55.

Fonseca-maldonado R, Vieira DS, Alponi JS, et al. Engineering the Pattern of Protein Glycosylation Modulates the Thermostability of a GH11 Xylanase. *Journal of Biological Chemistry*. 2013. Ago; 288(35); 25522-34.

Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, et al. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*. 2005. Dez;438:1105–15.

Gao SJ, Wang JQ, Wu MC, et al. Engineering Hyperthermostability Into a Mesophilic Family 11 Xylanase From *Aspergillus oryzae* by In Silico Design of N-Terminus Substitution. *Biotechnology and Bioengineering*. 2013. 110(4):1028–38.

Gavrilescu M, Chisti Y. *Biotechnology - a sustainable alternative for chemical industry*. *Biotechnology Advances*. 2005. Mai; 23:471–99.

Ghorai S, Banik SP, Verma D, et al. Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*. 2009. Fev; 42:577–87.

Goodenough PW. Structural studies on cellulases, pectinases and xylanases. *Enzymes for Carbohydrate Engineering*. 1996:83–107.

Gouka RJ, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Applied Microbiology Biotechnology*. 1997. Set;47:1–11.

Grimm LH, Kelly S, Krull R, Hempel DC. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2005. Nov; 69:375–84.

Guimarães LHS, Peixoto-nogueira SC, Michelin M, et al. Screening of Filamentous Fungi for Production of Enzymes of Biotechnological Interest. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006. Jul; 37:474–80.

Haigler CH, Betancur L, Stiff MR, Tuttle JR. Cotton fiber: a powerful single-cell model for cell wall and cellulose research. *Frontiers in Plant Science*. 2012. Mai;3:1–7.

Hashimoto T, Morishita M, Iwashita K et al. Production and Some Properties of Salt-Tolerant  $\beta$ -Xylosidases from a Shoyu Koji Mold , *Aspergillus oryzae* in Solid and Liquid Cultures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1999. 88(5):479–83.

Isci A, Demirer GN. Biogas production potential from cotton wastes. *Renewable Energy*. 2007. Jun;32:750–7.

Janis J, Rouvinen J, Leisola M, Turunen O, Vainiotalo P. Thermostability of endo-1,4- $\beta$ -xylanase II from *Trichoderma reesei* studied by electrospray ionization Fourier-

transform ion cyclotron resonance MS, hydrogen/deuterium-exchange reactions and dynamic light scattering. *Biochemical Journal*. 2001. 356:453–60.

Jaramillo PMD, Gomes HAR, Siqueira FG, et al. Liquid-liquid extraction of pectinase produced by *Aspergillus oryzae* using aqueous two-phase micellar system. *Separation and Purification Technology*. 2013. 120:452-457.

Jayani RS, Saxena S, Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*. 2005. 40:2931–44.

Jegannathan KR, Nielsen PH. Environmental assessment of enzyme use in industrial production e a literature review. *Journal of Cleaner Production*. 2013. 42:228–40.

Jiang ZQ, Deng W, Li L, et al. A novel, ultra-large xylanolytic complex (xylanosome) secreted by *Streptomyces olivaceoviridis*. *Biotechnology Letters*. 2004. 26:431-6.

Jordan DB, Bowman MJ, Braker JD, Dien BS, et al. Plant cell walls to ethanol. *Biochemistral Journal*. 2012. 442:241-252.

Juturu V, Wu JC. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*. 2012. Nov; 30(6):1219–27.

Kaya F, Heitmann JA, Joyce TW. Influence of lignin and its degradation products on enzymatic hydrolysis of xylan. *Journal of Biotechnology*. 2000. 80:241–7.

Kimura T, Suzuki H, Furuhashi H, et al. Molecular cloning, Characterization and Expression Analysis of the xynF3 gene from *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. 2002. 66:285-92.

Kimura T, Suzuki H, Furuhashi H, et al. Molecular cloning, overexpression and purification of a major xylanase from *A. oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. 2000. 64(12):2734-8.

Kitamoto N, Yoshino S, Ohmiya K, Tsukagoshi N. Purification and characterization of the overexpressed *Aspergillus oryzae* xylanase, XynF1. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. 1999. 63(10):1791-4.

Kobayashi T, Abe K, Asai K, et al. Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2007. Mar;71(3): 646–70.

Krengel U, Dijkstra BW. Three-dimensional Structure of Endo-1,4- $\beta$ -xylanase I from *Aspergillus niger*: Molecular Basis for its Low pH Optimum. *Journal of Molecular Biology*. 1996. 263:70–8.

Kulkarni N, Shendye A, Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 1999. Feb; 23: 411-56.

Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970. 227:680-5.

Leatherbarrow RJ. *Enzfitter Manual*, a non-linear curve fitting program for Windows. Biosoft: London, 1999.

Li Y, Hardin IR. Enzymatic Scouring of Cotton: Effects on Structure and Properties. *Textile Chemist and Colorist*. 1997. 29:71–6.

Li S, Yang X, Yang S, Zhu M, Wang X. Technology prospecting of enzymes: applications, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnological Journal*. 2012. 2(3):1-11.

Lucena-neto SA, Filho EXF. Purification and Characterization of a New Xylanase from *Humicola Grisea* Var. *Thermoidea*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004. 35;86–90.

Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002. Set;66(3):506-77.

MacCabe A, Fernández-Espinar MT, Graaff LH, et al. Identification, isolation and sequence of the *Aspergillus nidulans* xlnC gene encoding the 34-kDa xylanase. *Gene*. 1996. Jan; 175: 29-33.

Machida M, Asai K, Sano M, et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*. 2005. Dez;438:1157-61.

Machida M, Yamada O, Gomi K. Genomics of *Aspergillus oryzae* : Learning from the History of Koji Mold and Exploration of Its Future. *DNA Research*. 2008. Ago; 15:173–83

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock biology of microorganisms. 12<sup>th</sup> ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings; 2009.

Mckendry P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology*. 2002. Jul;83:37–46.

Michelin M, Polizeli MLTM, Ruzene DS, et al. Production of xylanase and  $\beta$ -xylosidase from autohydrolysis liquor of corncob using two fungal strains. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2012. 35;1185–92.

Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 1959. Mar; 31(3):426-28.

Minic Z, Jouanin L. Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2006. Set; 44:435–49.

Midorikawa GEO, Noronha EF, Filho EXF, Togawa RC, Silva JR, Miller RNG. Analysis of the *Aspergillus oryzae* transcriptome in relation to enzymatic degradation of sugarcane bagasse. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso). Congresso Brasileiro de Biotecnologia (2012)

Moreira LRS, Filho EXF. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2008. Abr;1:165–78.

Moreira LRSM, Campos MC, Siqueira PHVM, et al. Two  $\beta$ -xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. *Fungal Genetics and Biology*. 2013: 1-7.

Nevalainen KMH, Te'o VSJ, Bergquist PL. Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*. 2005. 23(9):468-474.

Noguchi Y, Sano M, Kanamaru K, et al. Genes regulated by AoXlnR, the xylanolytic and cellulolytic transcriptional regulator, in *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2009. 81:141-154.

Oda K, Kakizono D, Yamada O, et al. Proteomic Analysis of Extracellular Proteins from *Aspergillus oryzae* Grown Under Submerged and Solid-State Culture Conditions. *Applied And Environmental Microbiology*. 2006. Feb;72(5):3448–57.

Ozeki K, Takagi Y, Oda S, Ohashi S. Production of Xylanase with a transformant of *Aspergillus oryzae* RIB40 in a Liquid-Surface Immobilization (LSI) System. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2010. Set;109(3):224–6.

Paës G, Berrin J, Beaugrand J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnology Advances*. 2012. Out;30(3):564–92.

Paganni NC, Eurich VRP, Franco JM. Gerenciamento de resíduos sólidos de indústria de fios em cooperativa agroindustrial. II Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental; 2011 Nov 06-09; Londrina, Brasil. Bauru; IBEAS; 2011.

Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*. 2004. Set;22:189-259.

Pirota RDPB, Tonelotto M, Delabona PS, et al. Enhancing xylanases production by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions. *Industrial Crops and Products*. 2013. Jan; 45:465–71.

Polizeli MLTM, Rizzati ACS, Monti R, et al. Xylanases from fungi : properties and industrial applications. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2005. Jan; 67:577–91.

Raj KC, Chandra TS. Purification and characterization of xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn 1. *FEMS Microbiology Letters*. 1996. Out; 145:457-61.

Rigó K, Varga J, Tóth B, et al. Evolutionary relationships with *Aspergillus* section *Flavi* based on sequences of the intergenic transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2002. 48:9-16.

Ruohang W, Webb C. Effect of cell concentration on the rheology of glucoamylase fermentation broth. *Biotechnology Techniques*. 1995. Dez;9(1):55–8.

Ryabova O, Vršanská M, Kaneko S, van Zyl WH, Biely P. A novel family of hemicellulolytic  $\alpha$ -glucuronidase. *FEBS Letters*. 2009. Abr;583(9):1457–62.

Ryslava H, Doubnerová V, Kavan D, Vanek O. Effect of posttranslational modifications on enzyme function and assembly. *Journal of Proteomics*. 2013. Mar;1–30.

Sardar M, Roy I, Gupta MN. Simultaneous purification and immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on the reversibly soluble polymer Eudragit<sup>TM</sup> L-100. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000. 27:672-9.

Sarrouh B, Santos TM, Miyoshi A, Dias R, Azevedo V. Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. *Bioprocessing & Biotechniques*. 2012. 4:1-10.

Schoemaker HE, Mink D, Wubbolts MG. Dispelling the Myths — Biocatalysis in Industrial Synthesis. *Science*. 2013. Mar; 299: 1694-97.

Shah AR, Madamwar D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochemistry*. 2005. Jun;40:1763–71.

Siqueira FG de, Ximenes EFF. Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. 2010. 7:54–60.

Siqueira FG, Siqueira EG, Jaramillo PMD, et al. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2009. Nov;64:20-6.

Sticklen MB. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews*. 2008. Jun;9(6):433–43.

Sukumaran RK, Singhania RR, Pandey A. Microbial cellulases – Production, Applications and Challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2005. 64:832-44.

Szendefy J, Szakacs G, Christopher L. Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006. Jun; 39:1354–60.

Takamine J. Enzymes of *Aspergillus oryzae* and the application of its amyloclastic enzyme to the fermentation industry. *The Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 1914. Jun; 6(10): 824-28.

te Biesebeke R, Boussier A, van Biezen N, et al. Identification of secreted proteins of *Aspergillus oryzae* associated with growth on solid cereal substrates. *Journal of Biotechnology*. 2006. Ago; 121:482–5.

Teixeira RSS, Siqueira FG, de Souza MV, et al. Purification and characterization studies of a thermostable  $\beta$ -xylanase from *Aspergillus awamori*. *Journal of Industrial Microbiological and Biotechnology*. 2010. Jun;37:1041–51.

Uffen RL. Xylan degradation : a glimpse at microbial diversity. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 1997. 19:1–6.

Van Dyk JS, Pletschke BI. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes — Factors affecting enzymes , conversion and synergy. *Biotechnology Advances*. 2012. Mar;30(6):1458–80.

von Gal Milanezi N, Mendoza DPG, Siqueira FG, et al. Isolation and Characterization of a Xylan-Degrading Enzyme from *Aspergillus niger* van Tieghem LPM 93 with Potential for Industrial Applications. *Bioenergy Research*. 2012. Jul; 5:363–71.

Vries RP, Visser J. Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001. Dec; 65(4):497–522.

Ward OP. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*. 2012. Set;30:1119–39.

Wong KKY, Tan LUL, Saddler JN. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. *Microbiological Reviews*. 1988. Sep; 52(3):305–17.

Zhang X, Shi L, Shu S, et al. An improved method of sample preparation on AnchorChip™ targets for MALDI-MS and MS / MS and its application in the liver proteome project. *Proteomics*. 2007. Abr;7:2340–9.

Zhang YHP, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. 2006. Mar;24:452–81.

Zhang Z, Donaldson AA, Ma X. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. *Biotechnology Advances*. 2012. Jan; 30(4): 913–9.

## The Role of $\alpha$ -Glucuronidases in the Deconstruction of Plant Cell Wall Structure

**Antonielle Vieira Monclaro and Edivaldo Ximenes Ferreira Filho**

Enzymology Laboratory, Cellular Biology Department, University of Brasília, Brasília, 70910-900, Federal District, Brazil; Email: eximenes@unb.br; Tel: +55-61-31072976

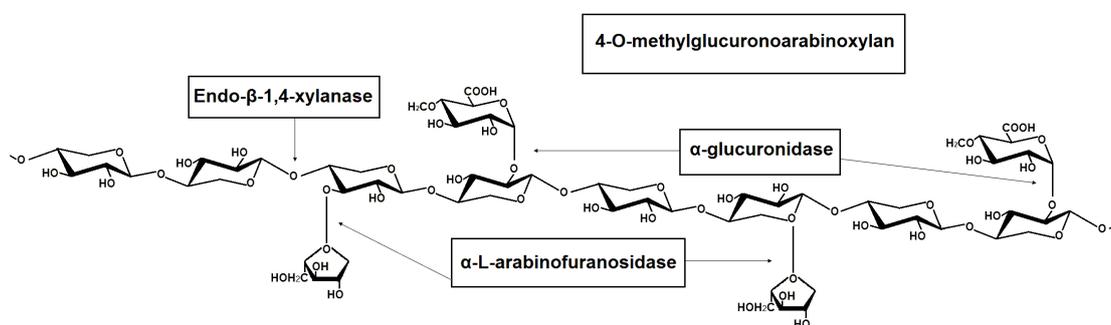
### Introduction

The matrix of polysaccharides presents a great structural diversity in the plant cell wall. Each molecule may contain different sugar residues with the same or different bonds, branched to varying degrees. The term holocellulose is used to describe a diverse group of polysaccharides, including cellulose and hemicelluloses that occur in close association with lignin (Andreas et al. 2008, Khandeparker and Numan 2008). The presence of enzymes that break the various branch points is essential for complete hydrolysis of the plant cell wall holocellulose structure, creating more sites for subsequent enzymatic hydrolysis. They may also have a role in the introduction of specific modifications in the polysaccharide structure, such as changing solubility, polymer configuration and linkages to phenolic compounds and lignin. Within this context,  $\alpha$ -glucuronidases are key enzymes in the cleavage of glucuronic acid side-groups that protect the neighboring  $\beta$ -1,4-linkages of the xylan backbone from being cleaved by xylan-degrading enzymes (Biely et al. 2000a, Nagy et al. 2002, de Wet et al. 2006).

Xylan is a polysaccharide that represents one of the major source of reduced carbon in the environment (Polizeli et al. 2005, Sánchez 2009, Jordan et al. 2012). It contains a backbone of xylose with  $\beta$ -1,4-linked glycosidic and side-chains, showing  $\alpha$ -1,2 linked 4-O-methyl-D-glucosyluronic groups, single  $\alpha$ -1,2 or  $\alpha$ -1,3 linked arabinofuranosyl residues, or more extended side-chains in which the arabinofuranosyl residues contain additional substituents (Aspinall 1959, McCleary and Matheson 1986). The linear framework of xylans from hardwood contains at least 70 1,4-linked  $\beta$ -D-xylopyranose units, every tenth of which has a terminal 4-O-methyl- $\alpha$ -D-glucuronic acid distributed acid residue attached (Timell 1964). The acidic and O-acetyl units are attached to C-2 and C-3 of the xylosyl residues, respectively. Approximately 70% of the xylosyl residues of hardwood xylans are acetylated (Wong et al. 1988). The acetylated xylan of hardwoods contains single 4-O-methyl- $\alpha$ -D-glucuronic acid distributed on

approximately 10 to 18% of its xylosyl residues (Timell 1967). The differences between the various structures of xylan polymer are mainly reflected in the proportions and types of side-chains present and their modes of attachment.

Two types of enzymes are involved in the breaking down of xylan: main-chain enzymes, including  $\beta$ -1,4-D-xylanase (EC 3.2.1.8) and  $\beta$ -1,4-D-xylosidase (EC 3.2.1.37), and side-chain enzymes (Nurizzo et al. 2002, Nagy et al. 2003, Shallom and Shoham 2003). The removal of branched substituent from xylan is effected by side-chain enzymes of different specificities such as  $\alpha$ -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), acetyl xylan esterases (EC 3.1.1.72) and  $\alpha$ -D-glucuronidases (EC 3.2.1.139) (Shallom and Shoham 2003, Siqueira and Filho 2010, Jordan et al. 2012). Figure 1 shows the attack of main-chain (xylanase) and some side-chain enzymes ( $\alpha$ -arabinofuranosidase and  $\alpha$ -glucuronidase) to 4-*O*-methylglucuronoarabinoxylan structure. Accessory enzymes are very important in the removal of side-chain substituents (Bachmann and McCarthy 1991, Filho 1994). They act by synergistic interaction with main chain-cleaving enzymes, being defined as heterosynergy (Coughlan et al. 1993). The synergism is observed when the action of the main chain enzyme facilitates the release of substituent by the side chain enzyme or *vice versa* (uniproduct heterosynergy), and when the extent of liberation of substituent and of hydrolysis of the main chain resulting from the action of the combined enzymes exceed the sum of those observed following the actions of the individual enzymes. This review provides particular attention to fungal  $\alpha$ -D-glucuronidases with emphasis in their mechanism of action on xylan structure of plant cell wall.



**Figure 1.** Hydrolysis of 4-*O*-methylglucuronoarabinoxylan by xylan-degrading enzymes. Modified from Polizeli et al. (2005).

### **The Mechanisms of $\alpha$ -glucuronidase action**

The hydrolysis mechanism proposed for  $\alpha$ -glucuronidases from fungi involves the cleavage of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-glycosidic linkage between 4-*O*-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyluronic acid (MeGlcA)/D-glucopyranosyluronic acid (GlcA) and xylopyranosyl residues in xylooligosaccharides or glucuronoxylan (Puls et al. 1987, Siika-aho et al. 1994, Ryabova et al. 2009, Chong et al. 2011). According to the CAzY database (<http://www.cazy.org/>),  $\alpha$ -glucuronidases belonging to glycoside hydrolase family GH67 (EC 3.2.1.139) are described to cleave 4-*O*-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyluronic acid  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-linked to the non-reducing xylopyranosyl residues in short xylooligosaccharides (Cantarel et al. 2009). These enzymes have been only reported in ascomycetes, and are not able to attack glucuronoxylan and aryl glycosides of GlcA or MeGlcA.

Several examples of heterosynergy have been reported between  $\alpha$ -glucuronidase from GH67 family and main chain-degrading enzymes (Puls et al. 1987, Coughlan et al. 1993, Varnai et al. 2011, Zhang et al. 2011). Thus, the heterosynergism between  $\alpha$ -glucuronidase and main chain-cleaving enzymes (xylanase and  $\beta$ -xylosidase) is required for the release of MeGlcA/GlcA linked to xylan backbone (Puls et al. 1987, Siika-aho et al. 1994, Shao et al. 1995, de Vries et al. 1998, Choi et al. 2000, Chong et al. 2011). Puls et al. (1987) reported the synergistic action between  $\alpha$ -glucuronidase and  $\beta$ -xylanase after incubation of the substrate (4-*O*-methylglucuronoxylan) with xylanase. The  $\alpha$ -glucuronidase released MeGlcA from the products of xylanase action and rendered the xylooligomers for  $\beta$ -xylosidase action. The  $\alpha$ -glucuronidase from *Schizophyllum commune* was reported to remove MeGlcA side chains from hardwood arabinoglucuronoxylan (Tenkanen and Siika-aho 2000). However, this enzyme showed limited activity against birchwood acetyl-glucuronoxylan due to the high amount of acetyl substituents. In addition, it needed a xylanase to improve its activity against soluble deacetylated glucuronoxylan. According to Tenkanen and Siika-aho (2000), this enzyme prefers to remove MeGlcA groups mainly from soluble substrates, since it showed a limited action on xylan with low solubility.  $\alpha$ -Glucuronidase from *Thermoascus aurantiacus* was described to be highly active towards polymeric xylan, showing a similar initial hydrolysis rate on 4-*O*-methylglucuronic acid side groups in different lengths of xylo-oligosaccharides and xylan (Khandke et al. 1989).

Chong et al. (2011) reported  $\alpha$ -glucuronidase with activity against polymeric xylan. This enzyme was classified as member of a novel glycoside hydrolase family (GH115, EC 3.2.1.131). These enzymes are commonly found in basidiomycetes and ascomycete, showing a broader substrate specificity (van den Brink and de Vries, 2011). A novel extracellular  $\alpha$ -glucuronidase of *Pichia stipitis* was reported to be active against hardwood glucuronoxylan (Ryabova et al. 2009). This enzyme acts on substrates in which the uronic acid is linked to the non-reducing xylopyranosyl residues of main chain fragments, and was able to remove MeGlcA residues directly from polymeric substrate. Furthermore, it also exhibits typical catalytic activity of  $\alpha$ -glucuronidases from GH67, acting on the shortest acidic product of glucuronoxylan hydrolysis by xylanase. This is confirmed by its action on aldotetraauronic acid Xyl(MeGlcA) Xyl–Xyl, the shortest acidic product of glucuronoxylan hydrolysis by GH 10 endoxylanases. However, there is no evidence whether the enzyme recognize GlcA residues in a similar way as MeGlcA residues. The phylogenetic comparison of this enzyme with GH67 and GH4  $\alpha$ -glucuronidases showed no close relation between these GH families, being this enzyme (PsAgu115) further classified as a member of the GH115 family (Kolenová et al. 2010). According to Ryabova et al. (2009), the heterosynergism involving  $\alpha$ -glucuronidases and xylanases of families 10 and 11 will create new sites for the productive binding to the enzymes hydrolyzing the xylan main chain. On the other hand, Vrřanská et al. (2007) observed that the debranching activity on glucuronoxylan hindered the action of the appendage-dependent GH5 xylanase that recognizes MeGlcA side chains as its specificity determinants. According to Coughlan et al. (1993), the action of one type of enzyme preventing the action of a second enzyme is known as antisynergy. Therefore, the removal of a substituent such as 4-O-methyl- $\alpha$ -D-glucuronic acid by  $\alpha$ -glucuronidase would prevent action by the xylanase.

The inverting mechanism is characteristic of  $\alpha$ -glucuronidases from GH67 family (Nurizzo et al. 2002, Golan et al. 2004). The hydrolysis of the glycosidic bond occurs with inversion of anomeric configuration liberating the  $\beta$ -anomer of the MeGlcA as the reaction product. The first report of  $\alpha$ -glucuronidase acting by inverting mechanism was made by Biely et al. (2000a). In this report,  $\alpha$ -glucuronidase from *A. tubingensis*, belonging to GH67 family, was able to release MeGlcA only from those beechwood glucuronoxylan fragments in which the acid is attached to the non-reducing

terminal xylopyranosyl residue. In addition, the charged groups in these carbohydrate residues influenced the selection of the hydrolytic mechanism, since other hydrolases attacking  $\alpha$ -glycosidic linkages of uronic acids, endo- and exopolygalacturonases also utilized the single displacement mechanism of hydrolysis. An  $\alpha$ -glucuronidase of *Aspergillus niger* hydrolyzes *O*- $\alpha$ -D-glucosyluronic acid  $\alpha$ -D-glucosyluronic acid to produce  $\alpha$ - and  $\beta$ -anomers of D-glucuronic acid in an equimolar ratio (Kiryu et al. 2005), suggesting that inversion of the anomeric configuration of the substrate is involved in the hydrolysis mechanism. In addition, it showed no activity against  $\alpha$ -glucuronyl linkages of 4-*O*-methyl-D-glucosyluronic acid- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-xylooligosaccharides derived from xylan. The inverting characteristic was also described for  $\alpha$ -glucuronidases of GH115 family of *P. stipitis* (PSAgu115) and *S. commune* (ScAgu115) (Kolenová et al. 2010). Both enzymes released MeGlcA as their  $\beta$ -anomer and were active against a series of aldouronic acids – aldotriouronic acid MeGlcA<sub>2</sub>Xyl<sub>2</sub>, aldotetraouronic acids MeGlcA<sub>3</sub>Xyl<sub>3</sub> and MeGlcA<sub>2</sub>Xyl<sub>3</sub>, aldopentaouronic acid MeGlcA<sub>3</sub>Xyl<sub>4</sub>, aldohexaouronic acid MeGlcA<sub>3</sub>Xyl<sub>5</sub> and beechwood glucuronoxylan. The specific activity of ScAgu115 also increased with the length of xylooligosaccharide chain and the activity against aldotetraouronic acid MeGlcA<sub>2</sub>Xyl<sub>3</sub>, aldopentaouronic acid MeGlcA<sub>3</sub>Xyl<sub>4</sub> and aldohexaouronic acid MeGlcA<sub>3</sub>Xyl<sub>5</sub> was similar. The above results suggest the binding of the MeGlcA-substituted xylopyranosyl residue and two adjacent xylopyranosyl residues are the most important factor for the activity of ScAgu115. PSAgu115 lower activity on aldopentaouronic acid MeGlcA<sub>3</sub>Xyl<sub>4</sub> and aldohexaouronic acid MeGlcA<sub>3</sub>Xyl<sub>5</sub> indicates an inhibitory role of increased chain length. These results indicate that GH115  $\alpha$ -glucuronidases recognize not only the uronic acid substituent but also a part of the xylan main chain. The lowest specific activity of ScAgu115 and PSAgu115 on glucuronoxylan at a concentration corresponding to about 10 mM of MeGlcA residues may be a consequence of the formation of non-productive complexes of the enzymes with unsubstituted parts of the xylan main chain, but it may also be the result of a steric hindrance by substituents in the vicinity of the enzyme active site. Maximal activity of *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1 recombinant  $\alpha$ -glucuronidase against aldouronic acids increased with increasing chain length, in spite of a decrease in affinity for the substrate with increasing chain length. Catalytic efficiency was consequently the

highest for the shortest possible substrate for  $\alpha$ -glucuronidase (aldobiouronic acid), and decreased with aldotriouronic and aldotetraouronic acids as the substrates (de Wet et al. 2006).

Kolenová et al. (2010) suggest that the major difference between the GH115 and GH67  $\alpha$ -glucuronidase families consists in the topography of substrate binding site. Thus, the  $\alpha$ -glucuronidases from GH67 family present a pocket type substrate binding site which selects specifically for short acidic xylooligosaccharides, with the uronic acid linked to the non-reducing xylopyranosyl residue. Experiments carried out by Golan et al. (2004) and Nagy et al. (2003) show that these enzyme interactions are not only restricted to the uronic acid residue but also with one or two xylopyranosyl residues, including the residue substituted with the uronic acid. Within this context, the role of the xylose aldobiouronic acid moiety is important for the action of GH67  $\alpha$ -glucuronidases, since these enzymes are not able to act on aryl  $\alpha$ -glucuronides as substrates.

The phylogenetic analysis of  $\alpha$ -glucuronidases shows that these enzymes can be divided into three subfamilies: groups I and II, composed of bacterial  $\alpha$ -glucuronidases, and group III, containing fungal  $\alpha$ -glucuronidases (Shallom et al. 2004). The three subfamilies differ in the N- and C-terminal ends and in the lengths of their amino acid sequences. In this case,  $\alpha$ -glucuronidases from group II are longer at the C terminus by about 22 residues compared to group I enzymes. On the other hand, the fungal  $\alpha$ -glucuronidases (group III) are much longer than the bacterial enzymes, containing about 110 additional residues at the C terminus. Phylogenetic analysis also showed that the fungal GH115  $\alpha$ -glucuronidases are distinctly separate from the prokaryotic clade and distributed over three branches (Chong et al. 2011). The first one consisted exclusively of basidiomycete sequences and included the *S. commune*  $\alpha$ -glucuronidase (Agu1). The second branch consisted exclusively of ascomycete sequences and contained the GH115  $\alpha$ -glucuronidase from *P. stipitis* (Ryabova et al. 2009). The third branch presented no biochemically characterized sequences and consisted mostly of sequences from ascomycetes, but it also included a second GH115 protein from *S. commune*. It is noteworthy that this last group was more distant from the first two, suggesting that a distinct enzyme activity or substrate specificity may be found in this group.

The first report of  $\alpha$ -glucuronidase (Agu4B) belonging to GH4 family and produced by bacterium was made by Suresh et al. (2003). In this family,  $\alpha$ -glucuronidase produced by *Thermotoga maritime* was active against chromophoric synthetic substrate, *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucuronopyranoside (*p*NP-GUA), previously reported by Fontana et al. (1988) and Bronnenmeier et al. (1995a). Agu4B was able to hydrolyze *p*NP-GUA and did not hydrolyze 4-*O*-methyl-D-glucuronoxylan or its fragments oligosaccharides. It showed no sequence similarity to any of the known  $\alpha$ -glucuronidases, and therefore it cannot be considered to be a hemicellulolytic glycosidase. The  $\alpha$ -glucuronidase of GH4 family requires a cofactor and cysteine for its activity (Hall et al., 2009). Agu4B showed cofactor and reducing agent requirements for increasing its activity, being more active in the presence of NAD<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and thiol compounds. To date, the *p*NP-GUA hydrolyzing  $\alpha$ -glucuronidase activity was not reported in fungal species.

Some procedures for the measurement of  $\alpha$ -glucuronidase activity are described in the literature (Puls et al. 1987, Fontana et al. 1988, Wood and Wilson 1995, Bronnenmeier et al. 1995a, 1995b), including the liberation of MeGlcA from aldouronic acids followed by determination of the reducing power of the free acid, by the Somogyi and Nelson reagents modified according to Milner and Avigad (1967), the nonmodified procedure for determining reducing sugars with reduction of aldouronic acids in the presence of NaBH<sub>4</sub>, and the HPLC determination of free MeGlcA or the equivalent amount of xylooligosaccharide. The alkaline deesterification of 4-nitrophenyl 2-*O*-(methyl 4-*O*-methyl- $\alpha$ -D-glucuronopyranosyl)- $\beta$ -D-xylopyranoside (Nph-Xyl-MeGlcA) was used by Biely et al. (2000b) as alternative to determine  $\alpha$ -glucuronidase activity. In this case, the  $\alpha$ -glucuronidase-catalyzed formation of 4-nitrophenyl  $\beta$ -D-xylopyranoside was coupled with hydrolysis by  $\beta$ -xylosidase. Thus, the coordinated action of both enzymes makes the 4-nitrophenyl glycoside of the aldobiuronic acid available as specific chromogenic substrate of  $\alpha$ -glucuronidase (Biely and Puchart 2006).

### **Purification and Characterization of $\alpha$ -glucuronidases**

A number of  $\alpha$ -glucuronidases has been purified and characterized from a great variety of fungal species (Khandke et al. 1989, Margolles-Clark et al. 1996, Tenkanen and

Siika-aho 2000, Heneghan et al. 2007, Hinz et al. 2009). The relevant enzyme has been detected in filtrates of various microorganisms, such as *Trichoderma reesei*, *A. bisporus*, *Talaromyces emersonii*, *T. aurantiacus* and *Chrysosporium lucknowense*. The purification of  $\alpha$ -glucuronidases is based on a number of alternative combinations of procedures, such as ultrafiltration, gel filtration and ion-exchange chromatographic methods (Puls et al. 1987, Kiryu et al. 2005, de Wet et al. 2006). Purification of  $\alpha$ -glucuronidases to homogeneity is necessary for detailed characterization studies and for the determination of their structures. An  $\alpha$ -glucuronidase from *P. stipitis* was purified to electrophoretic homogeneity in several steps using ultrafiltration, anion-exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography (Ryabova et al. 2009). The enzyme showed a single band of approximately 120 kDa on SDS-PAGE electrophoresis. Uchida et al. (1992) reported the purification of two variants of  $\alpha$ -glucuronidases (CM-I and CM-II) from *A. niger* 5-16. CM-I and CM-II were purified about 2200- and 3800-fold, respectively, by ammonium sulfate precipitation, ion-exchange and gel filtration chromatography. An  $\alpha$ -glucuronidase was purified from a commercial preparation from *A. niger* by a combination of chromatography procedures, including gel filtration and ion-exchange (Kiryu et al. 2005). The enzyme was purified 586-fold and its molecular weight was estimated to be 120 kDa and 58 kDa by gel filtration and SDS-PAGE, respectively. Two kinds of  $\alpha$ -glucuronidase from *Agaricus bisporus* were purified by preparative gel filtration (Puls et al. 1987). The major  $\alpha$ -glucuronidase component of *Agaricus bisporus* was identified in the molecular weight range > 450 kDa. The heterologous  $\alpha$ -glucuronidase of *Aureobasidium pullulans*, expressed in *Escherichia coli*, was purified to homogeneity by ultrafiltration, Ni-chelation affinity chromatography, and displayed an electrophoretic mobility of 157 kDa on SDS-PAGE. An  $\alpha$ -glucuronidase from *S. commune* was purified by anion exchange, hydrophobic interaction and gel filtration chromatography procedures (Tenkanen and Siika-aho 2000). The purification of  $\alpha$ -glucuronidase from *Thermoascus aurantiacus* by ammonium sulfate precipitation, desalting on Sephadex G-25, ion-exchange on DEAE-Sephadex A-50 and gel filtration on Ultrogel HA lead to 394-fold purification (Khandke et al. 1989).

Some biochemical properties of  $\alpha$ -glucuronidases isolated from fungal source are listed in Table 1. Most of the enzymes show molecular weights varying from 58 to

157 kDa, pI value range from 3.6 to 6.2, and pH and temperature optimum values range from 3.0 to 6.3 and 40 to 70°C, respectively. Most of the enzymes investigated belong to GH67 family and are stable at 40°C. Despite their important role for xylan breakdown, few enzymes from fungal source have been isolated and characterized. It is also probable that other  $\alpha$ -glucuronidases differing in specificity will be discovered.

## **Conclusions**

This review provides information on most of the aspects of the mechanism of action of  $\alpha$ -glucuronidases. The efficient exploitation of xylans as source of fuels and industrial chemicals requires an improvement of the understanding of the xylan-degrading enzymes system that effect their conversion (Filho et al. 1996), including main- and side chain-cleaving enzymes. Because of the structural complexity of plant cell walls, a wide variety of enzyme systems have been developed by different sources in nature, including bacteria and fungi, as strategy to overcome the matrix components. Within this context,  $\alpha$ -glucuronidases are key enzymes in the breakdown of xylan structure, which is carried out by an ensemble of enzymes which hydrolyze glycosidic bonds in xylooligomers and xylan structure (Siqueira and Filho 2010). Thus, it is clear that one must have a thorough understanding of the enzyme systems required for the hydrolysis of each of the major components of the plant cell wall, as well as the microorganisms that produce these enzymes systems. The discovery and development of novel plant cell wall degrading enzymes is a key step towards more efficient depolymerization of polysaccharides to fermentable sugars for the production of bioethanol and other bioproducts (King et al. 2011). It should be noted that, besides their direct use in the saccharification of xylan,  $\alpha$ -glucuronidases have potential applications in several other areas, including the production of chemical feedstocks and fuels and improved products in the pulp and paper industry. Despite extensive research on xylan-degrading enzymes, there are still major gaps in our understanding of how they hydrolyze, act synergistically, and the role of carbohydrate binding modules. The function of each xylan-degrading enzyme in the plant cell wall break down may be defined by enzymes interacting in dynamic and cooperative ways in time and space such as an interactome of enzymes.

**Table 1 Some properties of  $\alpha$ -glucuronidases from fungal source**

Microorganism	Family	Optimum temp (°C)	Thermostability	Optimum pH	Isoelectric point	MW (kDa)	K <sub>m</sub>	V <sub>m</sub> (μmol/min/mg)	Reference
<i>Agaricus bisporus</i>	NR <sup>d</sup>	52	NR <sup>d</sup>	3.3	NR <sup>d</sup>	>450 <sup>b</sup>	NR <sup>d</sup>	NR <sup>d</sup>	Puls et al. 1987
<i>Aspergillus niger</i>	NR <sup>d</sup>	40	NR <sup>d</sup>	3.0-3.5	NR <sup>d</sup>	58 <sup>a</sup> , 120 <sup>b</sup>	4.4 <sup>gh</sup>	50 <sup>h</sup>	Kyriu et al. 2005
<i>Aspergillus niger</i> 5-16	NR <sup>d</sup>	60	NR <sup>d</sup>	5.0	NR <sup>d</sup>	NR <sup>d</sup>	NR <sup>d</sup>	NR <sup>d</sup>	Uchida et al. 1992
<i>Aspergillus tubingensis</i>	NR <sup>d</sup>	70	1440 hr (60°C)	4.5-6.0	5.18 <sup>c</sup>	107 <sup>a</sup> , 100 <sup>b</sup>	0.14 ± 0.03 <sup>fi</sup>	NR <sup>d</sup>	de Vries et al. 1998
<i>Aureobasidium pululans</i>	GH67	65	>120 hr (45°C)	5.0-6.0	NR <sup>d</sup>	157 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.009 <sup>fj</sup>	14.1 ± 0.08 <sup>j</sup>	de Wet et al. 2006
<i>Aureobasidium pululans</i>							1.54 ± 0.19 <sup>fk</sup>	60.0 ± 4.3 <sup>k</sup>	de Wet et al. 2006
<i>Aureobasidium pululans</i>							3.7 ± 0.23 <sup>fl</sup>	135 ± 6.2 <sup>l</sup>	de Wet et al. 2006
<i>Aureobasidium pululans</i>							17.4 ± 2.8 <sup>fm</sup>	126 ± 14.1 <sup>m</sup>	de Wet et al. 2006
<i>Chrysosporium luckonowense</i> C1	GH67	50	NR <sup>d</sup>	6.0	NR <sup>d</sup>	NR <sup>d</sup>	NR <sup>d</sup>	NR <sup>d</sup>	Hinz et al. 2009
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	NR <sup>d</sup>	50	NR <sup>d</sup>	3.5	4.6 <sup>e</sup>	112 <sup>a</sup>	NR <sup>d</sup>	NR <sup>d</sup>	Castanares et al. 1995
<i>Pichia stiptis</i>	NR <sup>d</sup>	60	3 hr (40°C)	4.4	4.0-4.64 <sup>ce</sup>	120 <sup>a</sup>	NR <sup>d</sup>	NR <sup>d</sup>	Ryabova et al. 2009
<i>Piromonas communis</i>	NR <sup>d</sup>	50	NR <sup>d</sup>	5.5	NR <sup>d</sup>	103 <sup>b</sup>	NR <sup>d</sup>	NR <sup>d</sup>	Wood and Wilson 1995
<i>Schizophyllum comunne</i>	NR <sup>d</sup>	40	24 hr (40°C)	5.8	3.6 <sup>e</sup>	125 <sup>a</sup>	NR <sup>d</sup>	NR <sup>d</sup>	Tenkanen and Siika-Aho 2000;
<i>Schizophyllum comunne</i>	GH115	NR <sup>d</sup>	NR <sup>d</sup>	NR <sup>d</sup>	4.47 <sup>c</sup>	107 <sup>c</sup>	NR <sup>d</sup>	NR <sup>d</sup>	Chong et al. 2011
<i>Talaromyces emersonii</i>	GH67	50	NR <sup>d</sup>	5.0	NR <sup>d</sup>	91.6 <sup>c</sup>	NR <sup>d</sup>	NR <sup>d</sup>	Heneghan et al. 2007
<i>Thermoascus auranticus</i>	NR <sup>d</sup>	65	6 hr (50°C)	4.5	NR <sup>d</sup>	118 <sup>a</sup> , 107 <sup>b</sup>	0.145 <sup>fn</sup>	2.5 <sup>n</sup>	Khandke et al. 1989;
<i>Trichoderma reesei</i> RUT c30	NR <sup>d</sup>	60	24 hr (40°C)	4.5-6.0	5.0-6.2 <sup>e</sup>	91 <sup>a</sup>	NR <sup>d</sup>	NR <sup>d</sup>	Siika-aho et al. 1994

a - Determined by SDS-PAGE

b - Determined by gel filtration

c - Predicted by aminoacid sequence

d- Not reported

e - Determined by isoelectric focusing

f - mM

g- mg/mL

h -  $K_m$  value for trehalose dicarboxylate as the substrate

i -  $K_m$  value for aldotriouronic acid-aldobiuronic acid as the substrate

j -  $K_m$  value for aldobiouronic acid as the substrate

k -  $K_m$  value for aldotriouronic acid as the substrate

l -  $K_m$  value for aldotetrauronic acid as the substrate

m -  $K_m$  value for aldopentauronic acid as the substrate

n -  $K_m$  value for xylotriose as the substrate

## Acknowledgments

E.X.F.F. acknowledges the receipt of a research fellowship from the Brazilian Research Council (CNPq). This work was funded by CNPq (research grants 563260/2010-6 and 563823/2010-0), Foundation for Research Support of Federal District (Brazil, Pronex Program) and National Institute of Science and Technology of Bioethanol.

## References

- Andreas, J., E.X.F. Filho, and E.P.S. Bon. 2008. A review on Biotechnology of Holocellulose-Degrading Enzymes. pp.1-41. *In*: C.T. Hou and J.F. Shaw [eds] Biocatalysis and Bioenergy. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Aspinall, G.O. 1959. Structural chemistry of the hemicelluloses. *Adv. Carbohydr. Chem.* 14: 429-468.
- Bachmann, S.L., and A.J. McCarthy. 1991. Purification and cooperative activity of enzymics constituting the xylan-degrading system of *Thermomonospora fusca*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2121-2130.
- Biely, P., R.P. de Vries, M. Vranská, and J. Visser. 2000a. Inverting characteristic of  $\alpha$ -glucuronidase from *Aspergillus tubingensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1474: 360-364.
- Biely, P., J. Hirsch, D.C. la Grange, W.H. van Zyl, and B.A. Prior. 2000b. A chromogenic substrate for a  $\beta$ -xylosidase-coupled assay of  $\alpha$ -glucuronidase. *Anal. Biochem.* 286: 289-294.
- Biely, P., and V. Puchart. 2006. Recent progress in the assay of xylanolytic enzymes. *J. Sci. Food Agric.* 86: 1636-1647.
- Bronnenmeier, K., H. Meissner, S. Stocker, and W.L. Staudenbauer. 1995a.  $\alpha$ -Glucuronidases from the xylanolytic thermophiles *Clostridium stercorarium* and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Microbiol.* 141: 2033-2040.
- Bronnenmeier, K., A. Kern, W. Liebl, and W.L. Staudenbauer. 1995b. Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1399-1407
- Cantarel, B.L., P.M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, and B. Henrissat. 2009. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycomics. *Nucleic Acids Res.* 37: D233-D2.
- Castanares, A., A.J. Hay, A.H. Gordon, S.I. McCrae, and T.M. Wood. 1995. D-Xylan-degrading enzyme system from the fungus *Phanerochaete chrysosporium*: isolation and partial characterisation of an  $\alpha$ -(4-O-methyl)-D-glucuronidase. *J. Biotechnol.* 43: 183-194.

- Chong, S.-L., E. Battaglia, P.M. Coutinho, B. Henrissat, M. Tenkanen, and R.P. de Vries. 2011. The  $\alpha$ -glucuronidase Agu1 from *Schizophyllum commune* is a member of a novel glycoside hydrolase family (GH115). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90: 1323-1332.
- Coughlan, M.P, M.G. Tuohy, E.X.F. Filho, J. Puls, M. Claeysens, M. Vrsanská, and M.M. Hughes. 1993. pp. 53-84. *In* M.P. Coughlan and G.P. Hazlewood (eds.) *Hemicellulose and Hemicellulases*. Portland Press Research Monograph IV. Cambridge, Great Britain.
- de Vries, R.P., C.H. Poulsen, S. Madrid, and J. Visser 1998. aguA, the gene encoding an extracellular  $\alpha$ -glucuronidase from *Aspergillus tubingensis*, is specifically induced on xylose and not on glucuronic acid. *J. Bacteriol.* 180: 243–249.
- de Wet, B.J.M., W.H. van Zyl, and B.A. Prior. 2006. Characterization of the *Aureobasidium pullulans*  $\alpha$ -glucuronidase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 38: 649-656.
- Filho, E.X.F., J. Puls, and M.P. Coughlan. 1996. Purification and characterization of two arabinofuranosidases from solid-state cultures of the fungus *Penicillium capsulatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 168-173.
- Filho, E.X.F. 1994. The xylan-degrading enzyme system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27: 1093–1109.
- Fontana, J.D., M. Gebara, M. Blumel, H. Schneider, C.R. McKenzie, and K.G. Johnson. 1988.  $\alpha$ -4-O-Methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. *Methods Enzymol.* 160: 560–571.
- Golan, G., D. Shallom, A. Teplitsky, G. Zaide, S. Shulami, T. Baasov, V. Stojanoff, A. Thompson, Y. Shoham, and G. Shoham. 2004. Crystal structures of *Geobacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -glucuronidase complexed with its substrate and products. *J. Biol. Chem.* 279: 3014-3024.
- Hall, B.G., A. Pikis, and J. Thompson. 2009. Evolution and biochemistry of family 4 glycosidases: implications for assigning enzyme function in sequence annotations. *Mol. Biol. Evol.* 26: 2487-2497.
- Heneghan, M.N., L. McLoughlin, P.G. Murray, and M. Tuohy. 2007. Cloning, characterisation and expression analysis of  $\alpha$ -glucuronidase from the thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. *Enzyme Microb. Technol.* 61: 677-682.
- Hinz, S. W.A., L. Pouvreau, R. Joosten, J. Bartels, M. C. Jonathan, J. Wery, and H.A. Schols. 2009. Hemicellulase production in *Chrysosporium lucknowense* C1. *J. Cereal Sci.* 50: 318-323.
- Jordan, D.B., M.J. Bowman, J.D. Braker, B.S. Dien, R.E. Hector, C.C. Lee, J.A. Mertens, and K. Wagschal. 2012. Plant cell walls to ethanol. *Biochem. J.* 442: 241-252.

- Khandke, K.M., P.J. Vithayathil, and S.K. Murthy. 1989. Purification and characterisation of an  $\alpha$ -glucuronidase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. Arch. Biochem. Biophys. 274: 511-517.
- Khandeparker, R., and M.T. Numan. 2008. Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35: 635-644.
- King, B.C., K.D. Waxman, N.V. Nenni, L.P. Walker, G.C. Bergstrom, and D.N. Gibson. 2011. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. Biotechnology for Biofuels 4:4
- Kiryu, T., H. Nakano, T. Kiso, and H. Murakami. 2005. Purification and characterization of a novel  $\alpha$ -glucuronidase from *Aspergillus niger* specific for *O*- $\alpha$ -D-glucosyluronic acid  $\alpha$ -D-glucosiduronic acid. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69: 522-529.
- Kolenová, K., O. Ryabova, M. Vranská, and P. Biely. 2010. Inverting characteristic of family GH115  $\alpha$ -glucuronidases. FEBS Lett. 584: 4063-4068.
- Margolles-Clark, E., M. Saloheimo, M. Siika-aho, and M. Penttillä. 1996. The  $\alpha$ -glucuronidase-encoding gene of *Trichoderma reesei*. Gene 172: 171-172.
- McCleary, B.V., and N.K. Matheson. 1986. Polysaccharides having a  $\beta$ -D-xylan backbone. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 44: 158-164.
- Milner, Y., and G. Avigad, 1967. A copper reagent for the determination of hexuronic acids and certain ketohexoses. Carbohydr. Res. 4: 359-361.
- Nagy, T., K. Emami, C.M.G.A. Fontes, L.M.A. Ferreira, D.R. Humphry, and H.J. Gilbert. 2002. The membrane-bound  $\alpha$ -glucuronidase from *Pseudomonas cellulosa* hydrolyzes 4-*O*-methyl-D-glucuronoxyloligosaccharides but not 4-*O*-methyl-D-glucuronoxylan. J. Bacteriol. 184: 4925-4929.
- Nagy, T., D. Nurizzo, G.J. Davies, P. Biely, J.H. Lakey, D.N. Bolam, and H.J. Gilbert. 2003. The  $\alpha$ -glucuronidase, GlcA67A, of *Cellvibrio japonicus* utilizes the carboxylate and methyl groups of aldobiouronic acid as important substrate recognition determinants. J. Biol. Chem. 278: 20286-20292.
- Nurizzo, D.T. Nagy, H.J. Gilbert, and G.J. Davies. 2002. The structural basis for catalysis and specificity of the *Pseudomonas cellulosa*  $\alpha$ -glucuronidase, GlcA67A. Struct. 10: 547-556.
- Polizeli, M.L.T.M., A.C.S. Rizzatti, R. Monti, H.F. Terenzi, J.A. Jorge, and D.S. Amorim. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67: 577-591.
- Puls, J., O. Schmidt, and C. Granzow. 1987.  $\alpha$ -Glucuronidase in two microbial xylanolytic systems. Enzyme Microb. Technol. 9: 83-88.

- Ryabova, O., M. Vršanská, S. Kaneko, W.H. van Zyl, and P. Biely. 2009. A novel family of hemicellulolytic  $\alpha$ -glucuronidase. *FEBS Lett.* 583: 1457-1462.
- Sánchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.* 27: 185-194.
- Shallom, D., and Y. Shoham. 2003. Microbial hemicellulases. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 219-228.
- Shallom, D., G. Golan, G. Shoham, and Y. Shoham. 2004. Effect of dimer dissociation on activity and thermostability of the  $\alpha$ -glucuronidase from *Geobacillus stearothermophilus*: dissecting the different oligomeric forms of family 67 glycoside hydrolases. *J. Bacteriol.* 186: 6928-6937.
- Shao W, S.K.C. Obi, J. Puls, and J. Wiegel. 1995. Purification and characterization of the  $\alpha$ -glucuronidase from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485, an important enzyme for the utilization of substituted xylans. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1077-1081
- Siika-aho, M., M. Tenkanen, J. Buchert, J. Puls, and L. Viikari. 1994. An  $\alpha$ -glucuronidase from *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 813-819.
- Siqueira, F.G., and E.X.F. Filho. 2010. Plant cell wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications. *Mini-Rev. Org. Chem.* 7: 54-60.
- Suresh, C., M. Kitaoka, and K. Hayashi. 2003. A thermostable non-xylanolytic  $\alpha$ -glucuronidase *Thermotoga maritima* MSB8. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 2359-2364.
- Uchida, H., T. Nanri, Y. Kawabata, I. Kusakabe, and K. Murakami. 1992. Purification and characterization of intracellular  $\alpha$ -glucuronidase from *Aspergillus niger* 5-16. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 1608-1615.
- Tenkanen, M., and M. Siika-aho. 2000. An  $\alpha$ -glucuronidase of *Schizophyllum commune* acting on polymeric xylan. *J. Biotechnol.* 78: 149-161.
- Timell, T.E. 1964. Wood hemicelluloses: part I. *Carbohydr. Chem.* 19: 247-302
- Timell, T.E. 1967. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sci. Technol.* 1: 45-70.
- Varnai, A., L. Huikko, J. Pere, M. Siika-aho, and L. Viikari. 2011. Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. *Biores. Technol.* 102: 9096-9104.
- van den Brink, J., and R.P. de Vries. 2011. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91: 1477-1492.

- Vršanská, M., K. Kolenová, V. Puchart, and P. Biely. 2007. Mode of action of glycoside hydrolase family 5 glucuronoxylan xylanohydrolase from *Erwinia chrysanthemi*. FEBS J. 274: 1666–1677.
- Wood, T.M., and C.A. Wilson. 1995.  $\alpha$ -(4-O Methyl)-D-glucuronidase activity produced by the rumen anaerobic fungus *Piromonas communis*. A study of selected properties. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 893-900.
- Wong, K.K.Y., L.U.L. Tan, and J.N. Saddler. 1988. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications. Microbiol. Rev. 52: 305-317.
- Zhang, J.P. Tuomainen, M. Siika-aho, and L. Viikari. 2011. Comparison of the synergistic action of two thermostable xylanases from GH families 10 and 11 with thermostable cellulases in lignocellulose hydrolysis. Biores. Technology 102: 90909095.

**ANEXO A - PROTOCOLO PARA DETERMINAÇÃO DE CELULOSE, HEMICELULOSE, LIGNINA E EXTRAÍVEIS** [adaptado de Li et al. (2004) e Lin et al.(2010)]

**Análise dos Extraíveis**

Pesar, com precisão, 5 g do material lignocelulósico (m0) e transferir para um extrator Soxhlet. Deixar em extração por 8 horas, usando cerca de 300 mL de hexano PA. Após a extração, secar a 35-40°C e pesar (m1). A diferença de massa corresponde ao teor de extraíveis (m1 – m0). O percentual de extraíveis (%E) pode ser calculado por:

$$\%E = \frac{m1 - m0}{m0} * 100$$

**Análise da Hemicelulose**

Pesar, com precisão, 1 g (m1) do material lignocelulósico (livre de extraíveis) e acrescentar 10 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio (500 mmol.L-1; 20 g.L-1). Ferver a mistura por 3,5 horas, filtrar e lavar com água destilada. O resíduo sólido deverá ser seco a 35-40°C e pesado (m2). A diferença das massas corresponde a hemicelulose. O percentual de hemicelulose (%HC) pode ser determinado por:

$$\%HC = \frac{m2 - m1}{m1} * 100$$

**Análise de Lignina**

Pesar, com precisão, 1 g (m3) do material lignocelulósico (livre de extraíveis) e acrescentar 30 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico (72%; 72 mL de ácido sulfúrico concentrado com 28 mL de água destilada). Deixar a mistura em repouso por 24 horas. Depois, diluir com 300 mL de água destilada e aquecer, levando a ebulição por 1 hora. Filtrar e lavar o resíduo sólido com água destilada. O resíduo sólido deverá ser seco a 35-40°C e pesado (m4). Esta massa corresponde ao teor de lignina. O percentual de lignina (%L) pode ser determinado por:

$$\%L = \frac{m4}{m3} * 100$$

**Análise de Celulose**

A celulose será determinada pela diferença entre a massa original e os teores de hemicelulose, lignina e extraíveis. O percentual de celulose (%/C) pode ser determinado por:

$$\%C = 100 - \%E - \%HC - \%L$$

### **Referências Bibliográficas**

Li S, Xu S, Liu Y, et al. Fast pyrolysis of biomass in free-fall reactor for hydrogen-rich gas. *Fuel Processing Technology*. 2004. 85:1201-11.

Lin L, Yan R, Liu Y, Jiang W. In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass wastes based on three major components: Cellulose, hemicellulose and lignin. *Bioresource Technology*. 2010. 101:8217-23.

## **ANEXO B – PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *A. oryzae***

Para a confirmação da posição taxonômica do fungo por meio de análise molecular, um disco de micélio com 0,7 cm de diâmetro, foi crescido em meio de cultura Czapek (em 100 mL de água destilada, 30 g de NaNO<sub>3</sub>, 5 g de KCl, 5 g de MgSO<sub>4</sub>, 0,1 g de FeSO<sub>4</sub>) com extrato de levedura (CYA) (Pitt e Hocking, 1985) por três dias, 28°C, a 120rpm. A recuperação do micélio foi feita por meio de filtração com auxílio de uma bomba de vácuo, com lavagem com água destilada e esterilizada, para remoção de todo resíduo do meio de cultura. A maceração manual foi conduzida com auxílio de nitrogênio líquido. O DNA genômico foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (Raeder e Broda, 1985), contendo no tampão de extração Tris HCl 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM e SDS 0,5% pH 7,0. A quantificação do DNA total foi realizada visualmente por comparação com o marcador padrão *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) por meio de eletroforese em gel de agarose 1% e 1 µg/mL de brometo de etídio.

A amplificação das regiões espaçadoras intergênicas do DNA ribossomal (rDNA) nuclear (ITS 1 e 2) utilizando *primers* universais ITS5 e ITS4 foi conduzida em um volume final de 25 µL, contendo 14,37 µL de água Milli-Q, 2,5 µL de Tampão da *Taq* polymerase (*Phonotria*) 1X, 1,0 µL do *primer forward* e 1,0 µL do *primer reverse* (10mM), 2,0 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,125 µL de *Taq* polymerase (*Phonotria*) (5 U/µl) e 4,0 µL de DNA (concentração de 20 ng/µL). O programa de termociclagem utilizado foi de desnaturação inicial à 94°C por 4 minutos, desnaturação do DNA à 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento do *primer* de 50°C por 1 minuto, extensão de 72°C por 1 minuto, extensão final de 72°C por 5 minutos e conservação da reação à 10°C. Os três passos de desnaturação do DNA, anelamento e extensão foram repetidas 39 vezes.

O seqüenciamento da região rDNA ITS foi realizado em seqüenciador ABI 3130xl (Applied Biosystems) nos sentidos *forward* e *reverse*, onde a reação de seqüenciamento foi conduzida com 15ng do produto da PCR, 3,2 pmol.L<sup>-1</sup> do *primer forward* (ITS5) e 3,2 pmol.L<sup>-1</sup> do *primer reverse* (ITS4), e 3 µL do *kit* BigDye V3.1 (Applied Biosystems). A análise de bioinformática das sequências foi realizada

utilizado o programa *Sequencher* v4.8 (Gene Codes Corporation) para o alinhamento, edição e formação de *contigs*, e o BLASTn das sequências contra o banco de dados GenBank no NCBI.

### **Referências Bibliográficas**

Pitt JI, Hocking AD. Fungi and food spoilage. Academic Press: Sydney and Orlando. 1985:413.

Raeder U, Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*. 1985. 1:17-20.