



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
XILANASES NATIVAS E RECOMBINANTE DO FUNGO**

Leucoagaricus gongylophorus

Ariele Cristina Moreira*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Ferreira de Souza

***Bolsista CAPES e FAPESP**

**São Carlos – SP
2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Obtenção e caracterização bioquímica de xilanases nativas e recombinante do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*”

Ariele Cristina Moreira*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Dulce Helena Ferreira de Souza

*** bolsista CAPES e FAPESP**

**São Carlos - SP
2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M838oc Moreira, Ariele Cristina.
Obtenção e caracterização bioquímica de xilanases nativas e recombinante do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* / Ariele Cristina Moreira. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
112 f.

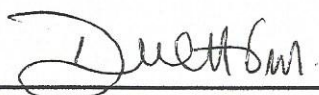
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Química orgânica. 2. Bioquímica. 3. Biologia molecular. 4. Xilanase. 5. Fungos. 6. Proteínas. I. Título.

CDD: 547 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Acadêmico

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico da candidata **Ariele Cristina Moreira**, realizada em 30 de agosto de 2013:*



Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza



Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur



Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann

*Dedico este trabalho aos meus pais **João Bastista Alves Moreira e Maria Theresa da Rocha Moreira** que em nenhum momento mediram esforços para a realização dos meus sonhos e me ensinaram a lutar e não desistir deles, mostrando que a honestidade e o respeito são essenciais à vida. E pelo orgulho que me fazem sentir por suas trajetórias.*

*Dedico também à minha irmã **Ariane Cristina Moreira Garcia e família** por ser parte do que sou e junto com meus pais representarem meu porto seguro.*

“Portanto eu vos digo: pedi e recebereis; procurai e encontrareis; batei e vos será aberto. Pois quem pede recebe; quem procura, encontra ; e para quem bate se abrirá”

Lucas 11:9,10

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais uma etapa concluída, por não me abandonar e por me guiar em todos os momentos de minha vida.

À Prof^a Dr^a. Dulce Helena Ferreira de Souza pela orientação e oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa.

À Dr^a Mônica Rosas da Costa Iemma, que supervisionou a etapa de clonagem e expressão da proteína recombinante e cujo auxílio foi de fundamental importância no desenvolvimento deste projeto. E também pelos momentos de discussão, companheirismo, amizade e diversão.

Ao Prof^o Dr^o João Batista Fernandes pela parceria e apoio.

À Dr^a Ana Paula Terezan pela parceria e apoio.

À Prof^a Dr^a Ana Paula Ulian de Araújo pela parceria e apoio.

Ao Prof^o Dr^o Edson Rodrigues Filho pela parceria, apoio e convivência.

Ao Dr^o Douglas Ferreira pela parceria, convivência e momentos de discussão.

Ao MSc Fernando Gonçalves de Almeida pela parceria.

À Prof^a Dr^a Maria Teresa Marques Novo Mansur pela parceria, convivência e principalmente pela disponibilidade para momentos de discussão.

À MSc Carolina M. Carnielli e ao mestrando André Vessoni Alexandrino pela disponibilidade e paciência.

As amigas doutorandas de laboratório Adriana Miranda dos Santos e Priscila Tomie Leme Ike e a Dr^a Camilla Calemi Golfeto pelos momentos de discussões “filosóficas” e de diversão.

Aos colegas de laboratório Adriana, Caio, Camilla, Caroides, Guilherme, Júlio, Kátia, Paulo, Priscila, Tatiane e também aos agregados do grupo Taícia, Jéssica, Beatriz e Evandro pela troca de conhecimentos, discussões e ambiente harmonioso de trabalho.

Ao meu namorado Carlos Henrique Giampaolo pelo seu amor, paciência, compreensão e apoio, principalmente nos momentos difíceis, e pelos maravilhosos momentos de alegria e descontração.

À Ariane Priscila Pinto por tantos anos de amizade, pelos momentos de alegria e pela força nos momentos difíceis. Mesmo com a correria do dia a dia sempre esteve presente na minha vida.

Aos colegas de graduação, em especial à Ingrid Guarnetti Prandi, Jessica Fernanda Affonso de Oliveira e à Bruna Mattos que me sempre estiveram comigo e me apoiaram.

Aos meus pais, Theresa e João pela dedicação, apoio e paciência durante esses anos.

A minha irmã, Ariane Cristina Moreira Garcia, ao meu cunhado Ricardo Garcia e sobrinhas Thainá Moreira Garcia e Thamy Moreira Garcia pelo companheirismo, apoio e pelo incentivo que me fortalece.

A todos os meus familiares pelo carinho, orações e por acreditarem em mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar.

Aos professores do Departamento de Química da UFSCar pela convivência e conhecimento transmitido.

Às secretárias da pós-graduação: Ariane, Cristina e Luciani pelo apoio.

A CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico

BLAST: Programa computacional para busca de homologias locais entre DNAs ou proteínas (*Basic Local Alignment Search Tool*)

BMGY: meio complexo-glicerol tamponado (*Bufferes Glycerol-complex Medium*)

BMMY: meio complexo-metanol tamponado (*Bufferes Glycerol-complex Methanol*)

BSA: Soro albumina bovina (*Bovine Serum Albumine*)

cDNA: DNA complementar a um mRNA

Da: dalton (s), unidade de massa molecular

DEPC: Dietilpirocarbonato (*Diethyl Pyrocarbonate*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (*Deoxiribonucleic acid*)

dNTP: Desoxinucleotídeos trifosfatados

DO: Densidade Óptica

EC: *Enzyme Comission*

EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético (*Ethylenedinitrilo Tetraacetic Acid*)

g: Unidade de força rotocentrífuga (gravidades) ou unidade de massa (grama)

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kb: kilobase

kDa: kilodalton(s), unidade de massa molecular

K_m : Constante de Michaelis Menten

l: litro

LB: meio de cultura Luria Bertani

LgXyn1: Xilanase recombinante do fungo *L. gongylophorus* depositada sob o número de acesso GenBank: EF208066.1

LgXyn2: Xilanase recombinante do fungo *L. gongylophorus* obtida neste trabalho

M: molar

min: minuto

m/m: proporção massa/massa

MMM: padrão de massa molecular

mg: miligrama

ml: mililitro

mM: milimolar

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro (*messenger Ribonucleic acid*)

NCBI: Centro de Informações Biotecnológicas dos Estados Unidos da América
(*National Center for Biotechnology Information*)

m/v: proporção massa/volume

ng: nanograma

Ni-NTA: Ácido Nitriliacético carregado com íons níquel

nm: nanômetro (unidade de medida correspondente a 10^{-9} metros)

ORF: Fase de leitura aberta (*Open Reading Frame*)

pb: Pares de bases

PCR: Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

pH: potencial de hidrogênio

pI: ponto isoelétrico

poli-dT: Oligonucleotídeo composto de poli-desoxitimidinas

RNase: Ribonuclease que degrada RNA

rpm: rotação por minuto

RT: *Reverse Transcriptase* (Transcriptase reversa)

s: segundos

SDS: Dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

TAE: Tris Acetato EDTA

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

u ou U: Unidade (enzimática)

UV-vis: Ultravioleta visível

$V_{\text{máx}}$: velocidade máxima

v/v: proporção volume/volume

X-GAL: 5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosídeo (análogo da lactose)

YNB: *Yeast Nitrogen Base*

YPD: meio contendo extrato de levedura, peptona, dextrose e Agar (*Yeast extract Peptone Dextrose Agar*)

YPDS: meio contendo extrato de levedura, peptona, dextrose, sorbitol e Agar (*Yeast extract Peptone Dextrose Sorbitol Agar*)

°C: graus Celsius

μg : Micrograma

μL : Microlitro

μm : Micrometro

XyLg1: Xilanase nativa isolada neste trabalho com massa molecular de 38 kDa

XyLg2: Xilanase nativa isolada neste trabalho com massa molecular de 24 kDa

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1: Oligonucleotídeos para amplificação do gene xyl sem o peptídeo sinal.....	30
TABELA 3.2: Condições dos ciclos da reação de PCR para amplificação do gene.	31
TABELA 3.3: Experimentos de lise celular por ultrassom	37
TABELA 4.1: Atividade xilanolítica do extrato bruto dos cultivos	49
TABELA 4.2: Purificação das enzimas XyLg1 e XyLg2 nativas do fungo <i>L. gongylophorus</i>	54
TABELA 4. 3: Parâmetros cinéticos da XyLg1 e XyLg2.	59
TABELA 4.4: Peptídeos identificados por MS/MS da XyLg1.	60
TABELA 4.5: Valores e médias de A260/A280, A260/A230 e concentrações das amostras de RNA total.	69
TABELA 4. 6: Principais características de sequências conhecidas de xilanases da família GH11.	74
TABELA 4.7: Atividade xilanolítica do meio extracelular da colônia Xyl2 em diferentes tempos (T) de indução com metanol.	99

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: A) Representação esquemática da estrutura da parede celular de plantas; B) parede primária e C) parede secundária com seus principais constituintes.	3
FIGURA 1.2: Estrutura típica da xilana e as enzimas necessárias para sua completa degradação..	6
FIGURA 1.3: A) Ninho de formigas cortadeiras ^a e B) cultivo de <i>L. gongylophorus</i> mantido em laboratório (^a Extraído de AYLAWRD <i>et al.</i> , 2012).	9
FIGURA 1. 4: Mecanismo catalítico de hidrólise da xilana pelas enzimas pertencentes à família das GH10 e 11.....	14
FIGURA 4.1: Representação da reação simplificada da reação de hidrólise da cadeia principal da xilana e seus produtos de degradação na reação com ADNS..	47
FIGURA 4.2: Análise em gel de tricina do perfil proteico das culturas sem (CSI) e com indução de 1% de xilana (CI) após 30 dias.	49
FIGURA 4.3: Cromatograma da coluna de troca iônica <i>Hydroxyapatite</i>	51
FIGURA 4.4: Análise em gel de tricina da cromatografia em <i>Hydroxyapatite</i>	51
FIGURA 4. 5: Cromatografia em coluna de troca iônica DEAE FF das frações eluídas da coluna <i>Hydroxyapatite</i> com atividade xilanolítica.	53
FIGURA 4. 6: Análise em gel de tricina das frações coletadas na cromatografia em DEAE FF.	53
FIGURA 4.7: Curvas de atividade relativa em função do pH para as enzimas XyLg1 e XyLg2 utilizando xilana como substrato.....	56
FIGURA 4.8: Curva de atividade relativa em função da temperatura para a enzima XyLg1 utilizando xilana como substrato.	57
FIGURA 4.9: Curva de atividade relativa em função da temperatura para a enzima XyLg2 utilizando xilana como substrato.	58

FIGURA 4.10: Análise dos fragmentos dos peptídeos obtidos por espectrometria de massas.	62
FIGURA 4.11: Curvas de pH e temperatura para a enzima XyLg1 utilizando ácido poligalacturônico como substrato.	64
FIGURA 4.12: Sequência de resíduos de aminoácidos da LgXyn1	67
FIGURA 4.13: Análise da qualitativa das amostras de RNA total por eletroforese em gel de agarose 1%.	68
FIGURA 4.14: Análise em gel de agarose 1% do DNA amplificado por PCR	70
FIGURA 4.15: Alinhamento entre as sequências de resíduos de nucleotídeos da ORF xyl e da LgXyn1 madura.	71
FIGURA 4.16: Alinhamento entre as sequência de resíduos de aminoácidos de LgXyn1 (SCHIØTT et al., 2008) e LgXyn2 (este trabalho).	72
FIGURA 4. 17: Alinhamento múltiplo global de 13 sequências da família 11 das glicosil hidrolases utilizando o ClustalW.	77
FIGURA 4.18: Representação esquemática dos elementos da estrutura secundária da XYNII do <i>T. reesei</i> (extraído e modificado TÖRÖNEN & ROUVINEN, 1997).	78
FIGURA 4.19: Representação esquemática para a construção do clone pET SUMO-xyl.	80
FIGURA 4. 20: Análise em gel de agarose 1% da confirmação da clonagem para obtenção do clone pET SUMO-xyl.	81
FIGURA 4.21: Análise por imunodeteção da expressão e purificação parcial em resina de níquel (pH4,8) da LgXyn2 em linhagem Rosetta(DE3)pLysS.	84
FIGURA 4.22: Análise em gel SDS 15% da purificação parcial em resina de níquel (A) e cobalto (B) (pH 8,0) da expressão da LgXyn2 em Rosetta(DE3)pLysS.	85
FIGURA 4. 23: Análise em gel de tricina da purificação parcial em resina de cobalto (pH 8,0) e clivagem na resina da fusão com a Sumo protease.	86
FIGURA 4.24: Representação esquemática para a construção do clone pPICZ α -A-xyl.	89

FIGURA 4. 25: Representação esquemática da inserção do plasmídeo recombinante na região 5'AOX1 no genoma da <i>P. pastoris</i> (locus AOX1 ou <i>aox1::ARG4</i>).....	90
FIGURA 4.26: Análise em gel de agarose 1% da reação de restrição enzimática do clone pPICZ α -A- <i>xyl</i>	92
FIGURA 4.27: Gel de agarose 1% da linearização com <i>SacI</i> do vetor pPICZ α -A- <i>xyl</i>	94
FIGURA 4. 28: Análise por eletroforese em géis de agarose 1% da transformação do clone pPICZ α -A- <i>xyl</i> em linhagem KM71H de <i>P. pastoris</i>	96
FIGURA 4. 29: Teste da atividade xilanolítica em placa de dois clones (pPICZ α -A- <i>xyl</i>) e o controle (pPICZ α -A) em linhagem KM71H de <i>P. pastoris</i>	98
FIGURA 4. 30: Análise em gel de tricina do sobrenadante da expressão da colônia Xyl2 em linhagem KM71H de <i>P. pastoris</i>	99

RESUMO

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE XILANASES NATIVAS E RECOMBINANTE DO FUNGO *Leucoagaricus gongylophorus*. Xilanases são enzimas que, randomicamente, clivam a cadeia principal da xilana, o polissacarídeo não celulósico mais abundante da parede celular de plantas. As xilanases são comumente produzidas por uma grande gama de organismo incluindo bactérias, algas, fungos, protozoários, sendo que alguns insetos herbívoros e crustáceos também produzem xilanases. *Leucoagaricus gongylophorus*, é um fungo mutualístico da formiga saúva *Atta sexdens*, que secreta enzimas com atividade xilanolítica e o gene que codifica para uma xilanase foi recentemente identificado. Neste trabalho o perfil xilanolítico do fungo *L. gongylophorus* foi estudado e duas enzimas nativas com atividade xilanolítica (XyLg1 e XyLg2) foram isoladas, purificadas e caracterizadas. XyLg1 apresenta massa molecular aproximado de 38kDa e pI maior do que 4,8. Para o substrato xilana de faia a enzima apresentou temperatura ótima de 40°C, pH ótimo entre 8,5 a 10,5 e $K_m 14,7 \pm 7,6 \text{ mg.ml}^{-1}$. Devido a essas características a XyLg1 poderá ser utilizada em processos como o bio-branqueamento da celulose. XyLg1 também foi analisada por espectrometria de massas sendo relacionada com uma poligalacturonase do mesmo fungo. Estudos cinéticos da XyLg1 utilizando ácido poligalacturônico como substrato foram realizados ($\text{pH}_{\text{ótimo}} = 5,5$, temperatura ótima entre 50 e 60°C, $K_m 2,2 \pm 0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$). A XyLg2 apresenta massa molecular aproximada de 24kDa e pI menor que 4,8, sendo assim uma proteína ácida. Parâmetros ótimos de temperatura (70°C) e pH (4,0), assim como o parâmetro cinético ($K_m 7,4 \pm 2,0 \text{ mg.ml}^{-1}$) utilizando xilana de faia como substrato foram determinados para a XyLg2. Esta enzima apresenta características desejáveis para melhoramento da alimentação animal, por exemplo. A LgXyn2 não apresenta atividade frente ao ácido poligalacturônico. Com o propósito de produzir elevados níveis de xilanases do *L. gongylophorus*, a sequência que codifica para a xilanase (LgXyn1, GenBank: EF208066.1) foi utilizada para a síntese de oligonucleotídeos *forward* e *reverse* e foi possível amplificar um gene diferente (*xyl*) que codifica a síntese de uma nova xilanase denominada aqui LgXyn2. O gene foi clonado no vetor pETSUMO e a enzima recombinante expressa em *E. coli* não apresenta atividade mesmo quando a cauda de histidina (fusão) é removida com Sumo protease. Então o gene *xyl* foi clonado no vetor pPICZ α -A e a LgXyn2 foi expressa em *P. pastoris*, secretada para o meio extracelular e a enzima apresenta atividade xilanolítica. Este resultado mostra que o gene (*xyl*) codifica para uma enzima funcional e que a *P. pastoris* é um sistema eficiente para obter esta xilanase.

Palavras chave: xilanases, purificação de enzimas nativas, caracterização enzimática, expressão heteróloga de proteínas.

ABSTRACT

OBTENTION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF NATIVE AND RECOMBINANT XYLANASES FROM *Leucoagaricus gongylophorus* FUNGUS. Xylanases are enzymes which randomly cleave the main chain of xylan, the most abundant non-cellulosic polysaccharide of plants cell wall. Xylanases are commonly produced by a wide range of organisms including bacteria, algae, fungi, protozoa, and certain herbivorous insects and crustaceans also produce xylanases. *Leucoagaricus gongylophorus*, a mutualistic fungus of *leaf-cutting ant Atta sexdens*, secretes enzymes with xylanolytic activity and the gene encoding a xylanase was recently identified. In this work the xylanolytic profile of *L. gongylophorus* was studied and two enzymes with xylanolytic activity (XyLg1 and XyLg2) were isolated, purified and characterized. XyLg1 has a molecular mass of about 38kDa and pI greater than 4.8. For beechwood xylan substrate XyLg1 showed optimum temperature of 40 °C, optimum pH between 8.5 to 10.5 and $K_m = 14, 7 \pm 7.6 \text{ mg.ml}^{-1}$. Due to these features XyLg1 may be used in processes such as bio-bleaching pulp. XyLg1 was also analyzed by mass spectrometry technique being associated with a polygalacturonase of the same fungus. Kinetic studies of the XyLg1 using polygalacturonic acid as substrate were developed (optimum pH= 5.5, optimum temperature between 50 and 60 ° C and $K_m = 2.2 \pm 0.5 \text{ mg.ml}^{-1}$). XyLg2 has molecular weight of about 24kDa and pI less than 4.8, and thus it is an acid protein. Parameter such as optimum temperature (70 °C) and pH (4.0) as well as the kinetic parameters ($K_m 7.4 \pm 2.0 \text{ mg.ml}^{-1}$) using beechwood xylan as substrate were determined for XyLg2. This enzyme exhibits desirable characteristics for improving animal feed, for example. LgXyn2 shows no activity with polygalacturonic acid. For the purpose of producing larger amount of xylanase from the *L. gongylophorus* the gene sequence encoding a xylanase (LgXyn1, GenBank: EF208066.1) was used to synthesize forward and reverse primers and was possible to amplify a different gene (*xyl*) that encodes the synthesis of a new xylanase called here LgXyn2. The gene was cloned into pETSUMO vector and the recombinant expressed in *E.coli* has no activity even when histidine tail (fusion) is removed with Sumo protease. These results suggest that the glycosylation is an important factor for xylanolytic activity. Then the *xyl* gene was cloned into pPICZalphaA vector and LgXyn2 was expressed in *P. pastoris*, secreted into the extracellular medium and the enzyme has xylanolytic activity. This result showed that the new gene (*xyl*) encodes a functional enzyme and that *P. pastoris* is a efficient system to obtain the active enzyme.

Keywords: Xylanase, native enzyme purification, enzymatic characterization, heterologous expression

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. Introdução	1
1.1 A parede celular de plantas	2
1.2 O fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	8
1.3 Xilanases	11
1.4 Aplicações	15
2. Objetivos	18
3. Metodologia.....	19
3.1 Estudos com xilanases nativas.....	19
3.1.1 Condições de cultivo	19
3.1.2 Estudo da melhor condição de cultivo do fungo para expressão de xilanases	19
3.1.3 Isolamento e purificação de xilanases de <i>L. gongylophorus</i>	20
3.1.4 Caracterização enzimática das xilanases	21
3.1.5 Análise das enzimas isoladas através de espectrometria de massas (MS)	24
3.2 Estudos com xilanase recombinante (LgXyn2).....	26
3.2.1 Extração de RNA total do fungo <i>L. gongylophorus</i> e obtenção do gene (chamado <i>xyl</i>) que codifica para a síntese da xilanase	26
3.2.2 Expressão da xilanase (LgXyn2) em <i>E.coli</i>	34
3.2.2.1 Clonagem do gene <i>xyl</i> no vetor de expressão pET SUMO	34
3.2.2.2 Análise da proteína LgXyn2 expressa em <i>E. coli</i>	35
3.2.3 Expressão da xilanase em <i>P. pastoris</i>	40
3.2.3.1 Clonagem do gene <i>xyl</i> no vetor pPICZa-A.....	40
3.2.3.2 Análise da proteínaLgXyn2 expressa em <i>P. pastoris</i>	41
4. Resultados e discussão	46
4.1 Estudos com enzimas nativas	46
4.1.1 Determinação das condições de cultivo para produção de xilanases	46
4.1.2 Purificação do extrato bruto por cromatografia de troca iônica	50
4.1.3.1 Determinação de pH e temperaturas ótimos para as xilanases XyLg1 e XyLg2..	55
4.1.3.2 Análise das enzimas isoladas através de espectrometria de massas (MS)	60
4.1.3.3 Caracterização da XyLg1 frente ao substrato ácido poligalacturônico	63
4.2 Estudos com a enzima recombinante.....	66
4.2.1 Clonagem do DNA que codifica a síntese da LgXyn2 para expressão em <i>E.coli</i>	79
4.2.2 Expressão da proteína recombinante LgXyn2 em <i>E. coli</i>	81

4.2.3 Obtenção do clone pPICZ α -A- <i>xyl</i> e análise da expressão da proteína LgXyn2 em eucarioto (<i>P. pastoris</i>).....	87
5. Conclusões	101
6. Referências Bibliográficas	102

1. Introdução

As enzimas são catalisadores essenciais para a vida por acelerarem reações químicas com elevada especificidade e eficiência. Elas vêm sendo utilizadas desde a antiguidade na produção de alimento, como queijo, pão, cerveja, vinho e *commodities* como couro e linho (KIRK *et al.*, 2002). Estas enzimas normalmente eram produzidas espontaneamente pelo crescimento de micro-organismos ou por enzimas presentes nas etapas de preparação, e não racionalmente, na forma pura ou bem caracterizada (KIRK *et al.*, 2002).

Desde a última metade do século XX houve uma expansão sem precedentes na pesquisa para aplicação industrial das enzimas, baseada no conhecimento dos micro-organismos, seus produtos metabólicos e reações por elas catalisadas (BEG *et al.*, 2001). O uso da tecnologia do DNA recombinante vem auxiliando na comercialização de enzimas que não eram viáveis na escala industrial (KIRK *et al.*, 2002).

A utilização de enzimas nos processos industriais é altamente justificável por aumentar a eficiência do processo e por não gerar produtos nocivos ao meio ambiente. Por estes motivos o mercado global destas macromoléculas apresentando um crescimento acelerado e em 2011 atingiu a marca US\$ 3,9 bilhões, sendo previsto uma velocidade de crescimento anual de 9,1% chegando a US\$ 6 bilhões em 2016 (Global Markets for Enzymes in Industrial Applications, 2012).

Deste montante, em torno de 75% corresponde a enzimas hidrolíticas devido as suas variadas aplicações em diversos ramos da indústria, como a alimentícia, papel, detergente, têxtil e mais recentemente na obtenção de combustíveis gerados a partir de resíduos lignocelulósicos (LI, S. *et al.*, 2012; KIRK *et al.*, 2002; ARANTES & SADDLER, 2010).

Xilanases são enzimas que atuam na endo-hidrólise da xilana que é o polissacarídeo não celulósico mais abundante da parede celular de plantas e é responsável por 20-35% do peso seco total da biomassa de plantas tropicais (COLLINS *et al.*, 2005; PULS, 1997). Desde a década de 80 têm se observado um crescimento no interesse industrial da xilana e no complexo de enzimas xilanolíticas, aplicadas nos processos de suplemento da alimentação animal, na manufatura de pães, alimentos e bebidas, têxtil, bio-branqueamento da polpa de celulose, produção de etanol e xilitol (POLIZELI, *et al.*, 2005).

Para um melhor entendimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* e visando o amplo mercado de aplicação das xilanases iniciamos os estudos desta classe de enzimas, ainda não caracterizadas na literatura para este micro-organismo. Para isso, iniciaremos apresentando brevemente a constituição da parede celular de plantas, que apresenta o substrato para ação das xilanases. Passaremos a uma abordagem do fungo em estudo e produtor desta classe de enzimas, o *L. gongylophorus* e por fim uma apresentação mais detalhada das xilanases e seu mecanismo de ação.

1.1 A parede celular de plantas

A parede celular das plantas constitui a fonte de biomassa lignocelulósica, logo também é a maior fonte de matéria orgânica renovável no solo (HOWARD *et al.*, 2003; STICKLEN, 2008). Este componente realiza um número elevado de funções essenciais, como fornecimento de um formato às células da planta, comunicação intercelular e também atua como um fator de proteção contra patógenos (KEEGSTRA, 2010).

A parede celular de planta é constituída principalmente pelos polissacarídeos celulose, hemicelulose e pectina; a lignina é outra importante macromolécula formada por álcoois aromáticos (sintetizadas por recursos

fenilpropanóicos) (LEE, 1997; van den BRINK & VRIES, 2011). A composição e a proporção destes componentes podem variar dependendo da origem do vegetal, sendo que também podem ser encontrados resinas, ácidos graxos, fenóis, taninos, compostos nitrogenados e sais minerais, principalmente, de cálcio, potássio e magnésio (NEUREITER *et al.*, 2002). A figura 1.1-A representa a estrutura esquemática da parede celular de plantas, a qual é constituída por lamela média, parede primária e secundária. Nas figuras 1.1-B e 1.1-C está representada a parede primária e a parede secundária, respectivamente, com os seus principais constituintes que serão discutidos a seguir.

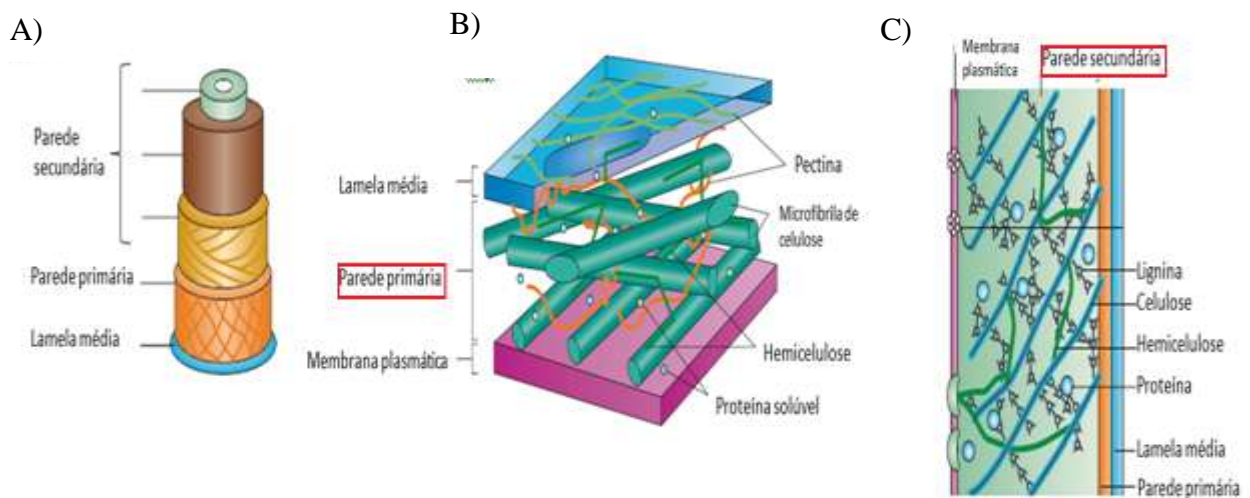


FIGURA 1.1: A) Representação esquemática da estrutura da parede celular de plantas; B) parede primária e C) parede secundária com seus principais constituintes (extraído e modificado de STICKLEN, 2008).

A celulose (23% - 50% da matéria seca da biomassa lignocelulósica) é um homopolímero linear constituído de unidades β -D-glicoses unidas por ligações glicosídicas β -1,4 carbono-carbono. Estes feixes das longas cadeias celulósicas

sem ramificações são unidos por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e por forças de van der Waals (KUMAR *et al.*, 2008, SÁNCHEZ, 2009). As ligações de hidrogênio intermoleculares são responsáveis pela rigidez das fibras de celulose e as ligações intramoleculares são responsáveis pela formação de fibrilas, estruturas altamente ordenadas que se associam formando as fibras de celulose. As fibrilas apresentam regiões com elevado grau de cristalinidade, nas quais as cadeias de glicana estão firmemente ligadas em paralelo. Nesta região as fibras são compactas e capazes de impedir o acesso de enzimas e também proporcionam resistência à tração, ao alongamento e à solvatação (absorção de solvente). As regiões com menor grau de ordenação, chamadas de regiões amorfas, são regiões onde a fibra possui sua maior flexibilidade e é mais suscetível a degradação enzimática (SÁNCHEZ, 2009; SILVA, N. L. C., 2010; FERREIRA, 2010).

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante na parede celular das plantas, constitui de 20-40% do material lignocelulósico seco e encontra-se ligada às microfibrilas de celulose por ligações de hidrogênio (KEEGSTRA, 2010; PRADE, 1996; SAHA, 2003; STICKLEN; 2008). Diferentemente da celulose, a hemicelulose apresenta baixa massa molecular (100-200 unidades glicosídicas) e não é quimicamente homogênea consistindo em cadeias heteropoliméricas ramificadas, devido a esta morfologia a hemicelulose não forma regiões cristalinas como na celulose, sendo mais acessível para hidrólise enzimática e também mais suscetível à hidrólise química sob condições mais brandas (KUMAR *et al.*, 2008; SÁNCHEZ, 2009).

A hemicelulose é um grupo complexo de estruturas compostas de diferentes resíduos. Os diferentes tipos de esqueleto são nomeados de acordo com a unidade de açúcar principal no esqueleto polimérico: xilana (D-xilose), xiloglicana (heteropolímero de D-xilose e D-glicose), glucomanana (D-glicose e D-manose), galactoglucomanana (D-galactose, D-glicose e D-ranose) e

arabinogalactano (D-galactose e arabinose) (POLIZELI *et al.*, 2005; van den BRINK & VRIES, 2011).

A xilana é o principal carboidrato na fração hemicelulósica e corresponde a um terço do carbono renovável disponível na terra (PRADE, 1996). A xilana são heteropolissacarídeos com uma cadeia homopolimérica de unidades β -D-xilopiranosose unidas por ligações β -1,4 carbono-carbono. Além da xilose, a xilana pode conter ainda ramificações de ácidos hexurônicos, como os ácidos β -D-glucurônico, D-4-O-metilglucurônico e β -D-galacturônico, e deoxiexoses (Figura 1.2) (SAHA, 2003; SÁNCHEZ, 2009; SILVA, N. L. C., 2010).

Devido à sua heterogeneidade e complexidade estrutural, a completa degradação da xilana requer uma larga variedade de enzimas cooperativas, são elas: endo- β -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) e β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37) que atuam no esqueleto principal da xilana e α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α -D-glucuronidase (EC 3.2.1.139), acetil xilana esterase (EC 3.1.1.72), ácido ferúlico esterase (3.1.1.73) e ácido *p*-coumárico esterase (EC 3.1.1.-) que atuam removendo os grupos laterais, como pode ser verificado na figura 1.2 (BIELY, 1985; NAKAMURA *et al.*, 1993; SUBRAMANIYAN & PREMA, 2002).

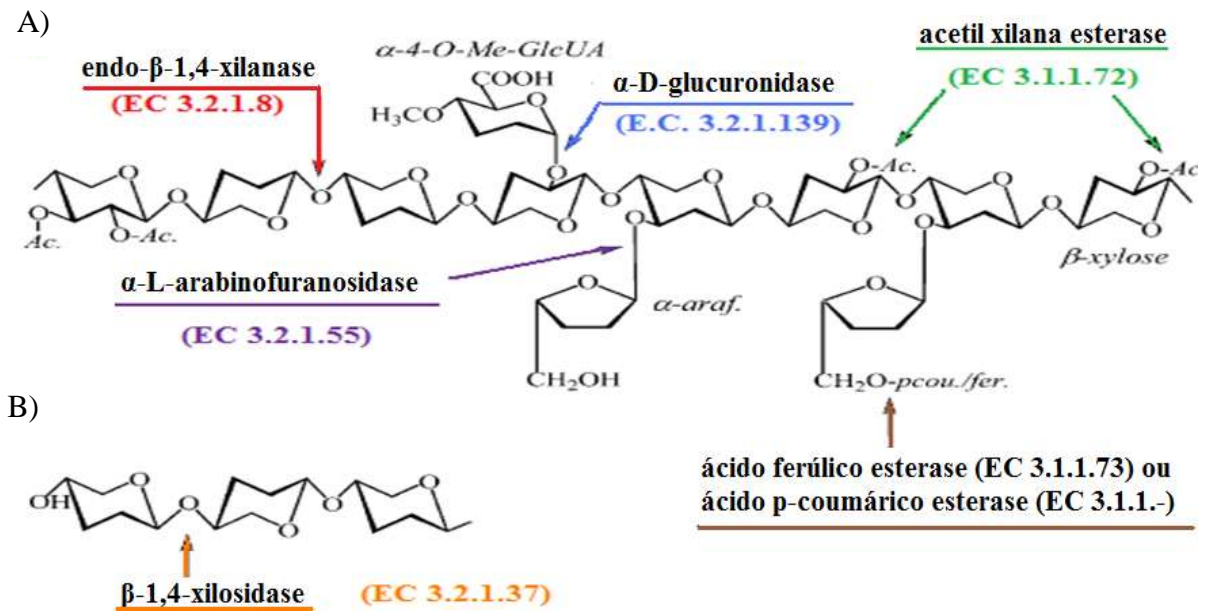


FIGURA 1.2: Estrutura típica da xilana e as enzimas necessárias para sua completa degradação. A) Esquema da xilana e os sítios de ataque por enzimas xilanolíticas; B) hidrólise do xilooligosacarídeo por β-xilosidase (extraído e modificado de COLLINS *et al.*, 2005).

Além da hidrólise enzimática, a xilana também pode ser convertida aos seus monossacarídeos por hidrólise ácida. A hidrólise ácida é mais rápida que a enzimática, entretanto é acompanhada pela formação de compostos tóxicos que impedem a fermentação microbiana subsequente (BIELY, 1985). E em longo prazo, o contato com soluções ácidas podem levar à corrosão dos equipamentos metálicos (POLIZELI *et al.*,2005). Assim o desenvolvimento de processos eficientes de hidrólise enzimática fornece novas perspectivas para o tratamento de resíduos de hemicelulose.

A pectina constitui mais que 15% da matéria seca de biomassa e é o polissacarídeo mais complexo na parede celular de plantas, apresentando função na

defesa da planta, crescimento, morfologia, desenvolvimento, e também serve como polímero de gelificação e estabilização em diversos alimentos, além de efeitos positivos sobre a saúde humana e para múltiplos usos biomédicos (MOHNEN, 2008).

A pectina é uma família complexa de polissacarídeos que contêm resíduos de α -1,4-D-galacturônico, sendo as principais cadeias a homogalacturonana (homopolímero linear de α -1,4-D-galacturônico, onde os grupos carboxilas estão parcialmente metil-esterificados ou O-acetilados) e a ramnogalacturonana I (cadeia principal constituída de um dissacarídeo ligados α -1,4-D-galacturônico- α -1,2-L-ramanose) e as galacturonanas substituídas, como ramnogalacturonana II (consiste de um esqueleto de homogalacturonana de no mínimo oito unidades monoméricas, contendo cadeias laterais de até 12 diferentes tipos de açúcares) e xilogalacturonana (homogalacturonana substituída com xilose) (CANTERI *et al*, 2012; MOHNEN, 2008; RIDLEY, *et al.*, 2001; van den BRINK & VRIES, 2011).

A lignina constitui de 10-25% do material lignocelulósico seco (STICKLEN; 2008). Está ligada tanto a celulose como a hemicelulose, formando um selo físico que é uma barreira impenetrável na parede celular da planta. Sua função é dar suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra ataque microbiano e *stress* oxidativo (SÁNCHEZ, 2009).

Este é um heteropolímero amorfo, não solúvel em água e opticamente inativo que é formado por unidades de *p*-propilfenol unidas por ligação não hidrolisáveis do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si (SÁNCHEZ, 2009). Essa fração, no entanto, desempenha um papel fundamental para o sucesso da tecnologia de hidrólise, uma vez que dificulta o acesso à celulose.

Tendo em vista a complexidade dos materiais lignocelulósicos, os micro-organismos tornam-se um bom alvo para degradação deste material. Os

micro-organismos são bioquimicamente capazes de assimilar os componentes da biomassa como fonte primária de carbono e têm sido encontrados em ambientes onde há acúmulo de material de planta, tanto para reciclar a biomassa no ecossistema como para a associação simbiótica a outros organismos para beneficiá-los nutricionalmente (PRADE, 1996; WONG, 1988). A abundância de xilana nestes materiais indica claramente que enzimas xilanolíticas apresentam um importante papel na bioconversão (WONG, 1988). As xilanases são produzidas por uma grande gama de organismo incluindo bactérias, algas, fungos, protozoários. Alguns insetos herbívoros e crustáceos também produzem xilanases (PULS, 1997; BISSOON *et al.*, 2002).

As ligações na lignocelulose não são todas equivalentes e igualmente acessíveis às enzimas xilanolíticas, além da acessibilidade mudar durante o curso da reação (WONG *et al.*, 1988). Deste modo, os micro-organismos, para aumentar a eficiência de hidrólise desenvolveram um sistema de enzimas com múltiplas xilanases (PAËS *et al.*, 2012; WONG *et al.*, 1988).

1.2 O fungo *Leucoagaricus gongylophorus*

Leucoagaricus gongylophorus é um fungo basidiomiceto que vive em simbiose com formigas cortadeira dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*. As formigas o cultivam no seu ninho (jardim de fungo) e o nutre com folhas frescas. Esta relação obrigatória envolve interações complexas entre os dois organismos, onde o fungo alimenta as formigas com nutrientes facilmente assimilados derivados das plantas em troca de um ambiente altamente protegido (ERTHAL Jr. *et al.*, 2009).

De forma simplificada o mutualismo inicia com as formigas trazendo fragmentos de folhas frescas para o ninho. Estas folhas são fragmentadas em pequenos pedaços pelas formigas, as quais aplicam gotas de fluido fecal neste

material, formando uma polpa de folhas. Um grande número de proteínas permanece intacta após passar pelo trato digestivo das formigas, deste modo, na gota fecal da formiga além de enzimas por ela produzidas também são encontradas proteínas produzidas pelo fungo, que vão auxiliar na degradação do material vegetal. Para que ocorra a degradação deste material a polpa de folhas é então depositada no jardim de fungos e inoculada com pequenos tufos de micélio do fungo. A fonte primária de alimentação das formigas consiste em hifas especializadas produzidas pelo fungo ricas em nutrientes, denominados gongilídeos (SCHIØTT *et al.*, 2010).

A figura 1.3 apresenta formigas cortadeiras levando material para o ninho subterrâneo (A), onde este será integrado ao jardim de fungos para fornecimento de alimento. E também uma cultura isolada do fungo *L. gongylophorus* mantida em laboratório (B).

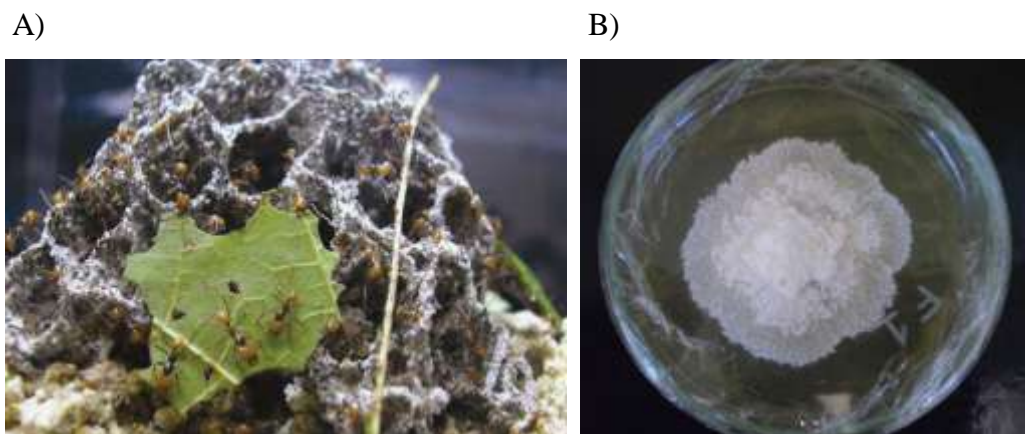


FIGURA 1.3: A) Ninho de formigas cortadeiras^a e B) cultivo de *L. gongylophorus* mantido em laboratório (^a Extraído de AYLAWRD *et al.*, 2012).

Esta relação mutualística entre formigas cortadeiras e seu fungo tem sido objeto de muitos estudos, entre os quais os aspectos bioquímicos estão em relevância porque uma das razões para a interação é o fornecimento de enzimas fúngicas às formigas, incluindo enzimas digestivas (SILVA, A. *et al*, 2006). Martin e Weber, os primeiros pesquisadores a investigar a contribuição destas enzimas na manutenção do mutualismo, determinaram que a celulase fosse a principal enzima fúngica na interação, derivada da habilidade do fungo para metabolizar a celulose das plantas colhidas pelas formigas, e fornecendo açúcares absorvíveis para as formigas (MARTIN & WEBER, 1969). Entretanto, estes resultados são conflitantes com estudos do potencial metabólico do *L. gongylophorus* que mostram que este metaboliza celulose pobremente em relação a outros polissacarídeos (SILVA, A. *et al*, 2006).

Em um recente trabalho utilizando ferramentas genômicas e metaproteômica foi demonstrado que o fungo *L. gongylophorus* codifica uma diversidade de enzimas de degradação de biomassa vegetal, sendo provavelmente o principal condutor da degradação de lignocelulose em jardins de fungo sendo que celulases pertencentes à família das GH6 e 7 foram encontradas em maiores quantidades nos extratos inferiores do jardim de fungos, mostrando que estas enzimas são produzidas quando os polímeros menos recalcitrantes foram esgotados (AYLWARD *et al*, 2013). As pectinases têm sido descritas como as principais enzimas produzidas pelo fungo, além destas as amilases e xilanases são produzidas em quantidades maiores que celulases (SILVA, A. *et al*, 2006).

A descoberta de que as enzimas que degradam hemicelulose estão entre as mais abundantes nos conjuntos de dados de metaproteômica indica que estes polímeros são provavelmente os polissacarídeos primeiramente degradados pelo *L. gongylophorus* no jardim de fungo. A abundância de proteases ao longo de todas as camadas das amostras também sugere que as proteínas da planta podem

ser uma importante fonte de nutrientes para *L. gongylophorus* ao longo de todo o processo de degradação (AYLWARD *et al.*, 2013).

Schiøtt e colaboradores identificaram, em 2008, o gene de uma xilanase do fungo *L. gongylophorus* (GenBank:EF208066), também mutualístico de *Acromyrmex echinator* (SCHIØTT *et al.*, 2008). Os autores concluíram, através de estudo de clonagem do gene e expressão da proteína em *Saccharomyces cerevisiae*, que o fungo é capaz de degradar a parede celular de plantas indicando que este tem origem saprotrófica. A enzima xilanase foi testada para sua atividade xilanolítica, mas não foi isolada nem caracterizada enzimaticamente.

1.3 Xilanases

Embora diversas enzimas estejam associadas à degradação da xilana, denomina-se xilanases as glicosidases (O-glicosídeo hidrolases, EC 3.2.1.8) que catalisam a endo-hidrólise das ligações β -1,4-D-xilosídica da xilana e tem como nome oficial endo- β -1,4-xilanases (COLLINS *et al.*, 2005).

A classificação inicial das enzimas foi realizada pela União Internacional de Bioquímica (1961) com base no tipo de reação que as enzimas catalisam. Esta classificação permitiu o agrupamento das enzimas em seis classes, que podem ser divididos em subclasses relacionadas à ação específica de cada enzima. Para as xilanases foi designado o código EC 3.2.1.8, onde 3 corresponde à classe das hidrolases; 2 ao fato desta enzima hidrolisar ligações glicosídicas (subclasse); 1 à natureza do substrato – O-glicosidase (sub-subclasse) e 8 ao número da enzima na subclasse (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010). Entretanto, esta classificação tornou-se ineficiente, pelo menos para as glicosil-hidrolase, devido à identificação de diversas xilanases com especificidade, sequência primária e enovelamento variado (COLLINS *et al.*, 2005).

Então em uma nova classificação baseada nas propriedades físico-químicas das xilanases foi proposta por Wong e colaboradores em 1988 (WONG *et al.*, 1988). Segundo esta classificação as xilanases são divididas em dois grupos, as enzimas da família F apresentam massas moleculares mais elevadas (maior que 30 kDa) e pI ácido e as da família G apresentam massa molecular menor que 30 kDa e pI básico. No entanto, após o isolamento e estudo de novas xilanases, estas não se adequavam a esta classificação, o que deixou claro a necessidade de outra maneira de classificar as xilanases.

Um sistema mais completo de classificação que permite a classificação não somente das xilanases, mas das glicosil-hidrolases em geral foi introduzido e tornou-se padrão para classificação destas enzimas. Este sistema divide as enzimas em famílias baseado na comparação da estrutura primária dos domínios catalíticos (HENRISSAT, 1991). A similaridade da sequência indica uma similaridade no padrão de enovelamento, assim membros de uma família devem dividir as mesmas características de enovelamento, permitindo assim estudos de modelagem por homologia (HENRISSAT, 1991).

Atualmente, a classificação de consenso para as glicosil-hidrolases está depositada no banco de dados CAZY (Carbohydrate-Active enZymes) (CANTAREL *et al.*, 2009) (www.cazy.org), cuja classificação de enzimas baseia-se na similaridade das sequências do domínio catalítico, sendo atualmente descritas 132 famílias de glicosil hidrolases (GHs). Baseado na identidade sequencial e análise de *clusters* hidrofóbicos as xilanases são normalmente agrupadas em duas famílias, a GH10 (família F) e a GH11 (família G) (JEFFRIES, 1996; ZHOU *et al.*, 2008).

Contudo no banco de dados CAZY as xilanases também podem ser encontradas nas famílias das GHs 5, 8, 16, 26, 30, 43 e 62. As famílias 16, 43 e 62

contêm enzimas que possuem domínios catalíticos bifuncionais (FLINT *et al.*, 1993; HERNANDEZ *et al.*, 2001). Xilanases da família 26 agem sobre ligações β -(1,3) e não nas ligações β -(1,4). Assim, xilanases com um único domínio catalítico agindo em ligações β -(1,4) se restringem às das famílias 5, 8, 10, 11 e 30 das GHs (PAËS *et al.*, 2012).

As xilanases das famílias 5, 10 e 30 compartilham de enovelamento semelhante, do tipo $(\beta/\alpha)_8$ (PAËS *et al.*, 2012). As xilanases da família GH5 são específicas para arabinoxilana (CORREIA *et al.*, 2011). As xilanases da família GH30 precisam de resíduos 4-O-metil-D-glicoronosil (MeGlcA) livres como cadeia principal para serem ativas (St. JOHN *et al.*, 2006; VRŠANSKÁ *et al.*, 2007). As enzimas da família GH10 são mais versáteis, pois hidrolisam muitos tipos de heteroxilanas (PAËS *et al.*, 2012). As xilanases GH8 tem um enovelamento $(\alpha/\alpha)_6$ e são semelhantes às GH10 em especificidade pelo substrato (COLLINS *et al.*, 2002). As xilanases GH11 apresentam arquitetura β -*jelly-roll* e são altamente específicas (BIELY *et al.*, 1997). Como pode ser observada, a classificação de novas xilanases não é uma tarefa fácil, uma vez que o conhecimento de especificidade e de capacidade enzimática é necessário.

As xilanase das famílias 10 e 11 catalisam a hidrólise com retenção de configuração no C-anomérico, sendo que dois resíduos glutamato conservados são cataliticamente ativos (TÖRRÖNEN & ROUVINEN, 1997). Um deles atua como um nucleófilo e o outro como catalisador ácido/base. A figura 1.4 representa o mecanismo catalítico desta classe de enzima. Na primeira etapa, o resíduo ácido-base atua como um ácido e protona o substrato, enquanto o outro resíduo catalítico atua como um nucleófilo e provoca a liberação do grupo de saída e a formação de um intermediário enzima α -glicosil depois da passagem por um estado de transição tipo íon oxo-carbenium. Na segunda etapa o

resíduo ácido-base, atua como uma base e abstrai um próton da molécula de água, que pode então atacar o carbono anomérico do intermediário enzima α -glicosil. Assim a segunda substituição ocorre no C-anomérico que leva á obtenção de um produto com configuração β , como o substrato (PAËS *et al.*, 2012).

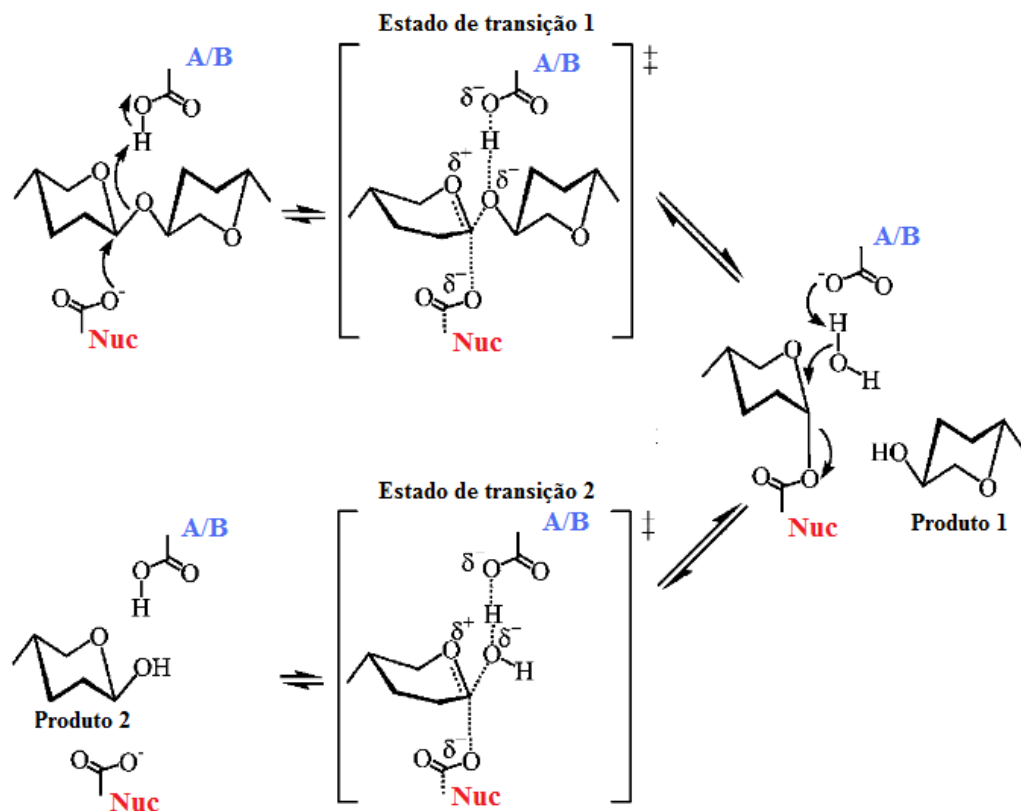


FIGURA 1. 4: Mecanismo catalítico de hidrólise da xilana pelas enzimas pertencentes à família das GH10 e 11. Esta reação ocorre com retenção na configuração do carbono anomérico; A/B corresponde ao resíduo glutamato que atua com ácido-base, inicialmente atua como ácido, por protonar o substrato e posteriormente como base, por abstrair um próton da molécula de água e Nuc corresponde ao resíduo glutamato que atua como um nucleófilo, atacando o carbono anomérico e permitindo a liberação do grupo de saída (extraído e modificado COLLINS *et al.*, 2005).

1.4 Aplicações

Com o advento de avanços tecnológicos houve um aumento considerável no uso biotecnológico de xilanases, sendo que xilanases, celulases e pectinases correspondem por 20% do mercado mundial de enzimas. A utilização de xilanases iniciou em 1980's na preparação de alimentos animal e depois na indústria alimentícia, textil e papel (POLIZELI *et al.*, 2005). Atualmente os principais produtos finais da degradação da xilana são furfural e xilitol. A produção de furfural é derivada principalmente de resíduos agroindustriais enquanto o xilitol é proveniente dos resíduos de madeira (KULKARNI *et al.*, 1999).

A principal aplicação é na indústria do papel, onde as xilanases são utilizadas na etapa de branqueamento polpa de celulose. Nesta etapa a utilização destas enzimas proporcionam uma redução de até 30% de compostos organoclorados, chegando a uma redução de 15-20% de organoclorados nos efluentes. Isto é muito interessante pois a utilização de cloreto nesta etapa leva à obtenção de organoclorados altamente tóxicos e mutagênicos (POLIZELI *et al.*, 2005). As xilanases utilizadas neste processo não precisam ser purificadas, mas devem ser ativas em elevadas temperaturas (55-70°C), em pH alcalino e não devem conter enzimas celulolíticas para prevenir as fibras de celulose (COLLINS *et al.*, 2005; POLIZELI *et al.*, 2005).

Na indústria de alimentação animal, as xilanases são utilizadas para diminuir a viscosidade dos alimentos, o que pode auxiliar na digestão inicial dos nutrientes na parte inicial do trato digestório, resultando em um melhor uso de energia (POLIZELI *et al.*, 2005).

Na indústria alimentícia as xilanases são utilizadas juntamente com outras hemicelulases na produção de pão, onde auxiliam na quebra da hemicelulose da farinha, proporcionando uma melhor distribuição da água e deixando a massa mais macia e fácil de amassar, além de aumentar o volume da

massa (BEG *et al.*, 2001; POLIZELI *et al.*, 2005). Na indústria de sucos e vinho, a produção de sucos de vegetais e frutas requerem métodos de extração, clarificação e estabilização e neste aspecto xilanases, celulases, amilases e pectinases levam a um aumento nos rendimentos destes processos, assim como na recuperação dos aromas, óleos essenciais, vitaminas, sais minerais e também na redução da viscosidade das substâncias hidrolisadas (BIELY, 1985; POLIZELI *et al.*, 2005). As características desejadas das enzimas utilizadas para aplicação nestes processos são alta estabilidade e atividade ótima em pH ácido (POLIZELI *et al.*, 2005).

Há relatos mais recentes descrevendo a incorporação de xilanases na produção de etanol a partir de resíduos da agroindústria - etanol de segunda geração-, tendo sido observado um aumento de 28% na produção de etanol quando foi adicionada xilanase ao processo fermentativo (ALVIRA *et al.*, 2011). Este é um aspecto muito interessante de ser abordado, devido ao alto nível de lixos celulósicos gerados de resíduos de agricultura, florestas e agroindústrias que, se não aproveitados, acumulam na natureza e aumentam os problemas de poluição.

A ação das xilanases nestes processos de hidrólise parece ser devido à interação sinérgica entre celulases e xilanases (HU *et al.*, 2011). Há hipóteses de que as xilanases influenciam nas características da fibra, proporcionando uma maior dilatação e porosidade desta, conseqüentemente aumenta a acessibilidade das celulases à celulose, minimizando a carga de proteína requerida para atingir uma maior eficiência de hidrólise de substratos lignocelulósico pré-tratados (HU *et al.*, 2011). Um dos grandes gargalos da relação custo-benefício do processo de bioconversão da lignocelulose à biocombustível é o elevado custo das enzimas envolvidas no processo. Assim, o estudo de novas fontes de enzimas e o estudo de seu modo de ação é fundamental para tornar o processo viável sob o ponto de vista econômico.

Muitos dos estudos descritos na literatura envolvem o uso de culturas de micro-organismos que expressam xilanases, mas esses sistemas têm um problema pois, na maioria das vezes, os micro-organismos também expressam celulasas, que dificultam, por exemplo o uso em bio-branqueamento de celulose (a contaminação com celulasas leva à hidrólise da celulose). Alguns estudos estão voltados para o descobrimento de micro-organismos que expressem maiores níveis de xilanases e baixo nível de celulasas. Uma solução para esse problema é o desenvolvimento de sistemas de expressão de xilanases recombinantes, que leva à produção da enzima livre de contaminantes. Outro benefício de estudar xilanases recombinantes é a possibilidade de desenvolver estudos de mutação sítio-dirigida, na busca de melhoramento da estabilidade e atividade da enzima.

2. Objetivos

Um dos objetivos deste projeto de mestrado foi fazer um estudo do perfil xilanolítico do fungo *L. gongylophorus*, sendo que até o momento nenhuma xilanase oriunda deste micro-organismo havia sido caracterizada. Para isso duas abordagens foram adotadas.

Uma consiste em isolar e caracterizar enzimas nativas e com atividade xilanolítica obtidas a partir de culturas induzidas deste fungo. E a outra desenvolver um sistema de obtenção de uma xilanase recombinante do fungo baseada em uma sequência que codifica para síntese da xilanase já descrita na literatura. Muitas das enzimas da família das glicosil hidrolases (GHs) são produzidas como isoformas por diversos micro-organismos e este fato pode dificultar o processo de cristalização da molécula, uma etapa necessária no estudo estrutural por cristalografia. O sistema de expressão heteróloga da xilanase também visa à obtenção de maior rendimento da enzima, uma vez que geralmente as concentrações dessas enzimas nativas são baixas.

3. Metodologia

Todos os reagentes utilizados são de pureza analítica.

3.1 Estudos com xilanases nativas

3.1.1 Condições de cultivo

A linhagem de *L. gongylophorus* utilizada neste trabalho foi isolada do ninho de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* no Centro de Estudos de Insetos Sociais – CEIS – UNESP – Campus de Rio Claro/SP. O fungo foi mantido a 25 °C em meio de cultura sólido estéril (2% extrato de malte, 0,5 % peptona bacteriológica, 0,2 % extrato de levedura e 2 % ágar), em placas de Petri. A cultura foi mantida nessas condições e repicada mensalmente.

3.1.2 Estudo da melhor condição de cultivo do fungo para expressão de xilanases

Inicialmente foi realizado um acompanhamento da produção de xilanases secretadas pelo fungo através do cultivo deste em meio líquido na presença de dois indutores diferentes. Para isto, células com 30 dias de cultivo foram raspadas do meio sólido e transferidas para um *erlenmeyer* de 250 ml com 50 ml de meio de cultura líquido indutor estéril constituído por tampão citrato-fosfato 75 mM pH 5,0, YNB (*Yeast Nitrogen Base*) 0,67 % (p/v) e contendo xilana (*xylan, from beechwood* – X4252 Sigma) ou pectina (*pectin, from citrus fruit* – P9135 Sigma) como indutores. Foram testadas duas concentrações de xilana (0,5 e 1%) e uma de pectina (1%). Os meios de cultura permaneceram em crescimento estático a 25°C e após diferentes períodos de incubação (6, 17 e 30 dias) estes foram filtrados em membrana de poro de 0,22 µm. O filtrado, denominado de

extrato bruto, foi dialisado contra água MilliQ durante 24 horas à 4°C e a habilidade de produção de enzimas xilanolíticas foi avaliada através de ensaio enzimático (SUMNER, 1921) como descrito no item 3.1.4. Foi realizado um experimento controle que consistiu em inocular o fungo por 30 dias em meio líquido, nas mesmas condições descritas anteriormente na ausência de indutor.

3.1.3 Isolamento e purificação de xilanases de *L. gongylophorus*

Uma vez estabelecida a melhor condição de cultivo para obtenção de xilanases (item 3.1.2) esta foi utilizada para cultivo de maior volume de meio de cultura. Assim, para os demais experimentos, foram utilizados 100 ml de meio de cultura constituindo de tampão citrato-fosfato 75 mM pH 5,0, YNB 0,67 % (p/v) e 1% de xilana incubados a 25°C durante 30 dias.

Após 30 dias, o meio de cultura foi filtrado e dialisado contra água conforme descrito no item 3.1.2. O extrato bruto foi liofilizado (em torno de 0,4 g) e 10 mg do extrato liofilizado foi ressuscitado em 800 µl de tampão 10 mM fosfato de sódio pH 5,8 (tampão A) acrescido de 0,2 mM CaCl₂ e então 500 µl foram aplicados em coluna de troca iônica de 1 ml contendo CHTTM *Ceramic hydroxyapatite type I* (Bio-Rad), uma resina de troca aniônica e catiônica simultânea. A aplicação da amostra foi feita com fluxo de 0,5 ml.min⁻¹. A eluição foi realizada em fluxo de 1 ml.min⁻¹ com tampão 400 mM fosfato de sódio pH 5,8 contendo 0,0075 mM CaCl₂ (tampão B) com gradiente linear variando de 0-100 % de tampão B em 5 *cv* (*column volume*). As frações eluídas da coluna (1 ml/fração) foram analisadas através de eletroforese em gel de tricina (SCHÄGGER e VON JAGON, 1987) e da atividade xilanolítica (item 3.1.4).

As frações que apresentaram atividade xilanolítica foram reunidas e dialisadas contra tampão 20 mM acetato de sódio pH 4,8 (tampão C) e esta amostra foi aplicada em coluna de troca aniônica fraca (*Hitrapp* DEAE FF 1 ml, GE) previamente equilibrada com o tampão C. A eluição foi feita com tampão D (tampão C acrescido de 1 M de NaCl) em gradiente constituído por três etapas, sendo a primeira uma variação de 0 a 25% de tampão D em 10 *cv*, seguida por manutenção de 25% de tampão D por 7 *cv* e gradiente linear de 25 a 100% de tampão D em 5 *cv*. Foram coletadas frações de 1 ml e o fluxo da cromatografia foi de 1 ml.min⁻¹. As frações eluídas da coluna foram analisadas através de eletroforese em gel de tricina e pela atividade xilanolítica.

3.1.4 Caracterização enzimática das xilanases

Determinação de atividade xilanolítica: A determinação da atividade xilanolítica foi realizada através do método de açúcares redutores (SUMNER, 1921). Para isso foi utilizado como substrato uma solução contendo 1% de xilana em tampão citrato-fosfato 75 mM pH 5,0. Substrato e amostra (200 µl) foram incubados na proporção de 1:1 (v/v) a temperatura ambiente. A reação foi interrompida após 15 minutos pela adição de 320 µl de solução contendo ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) (4,4 mM ADNS/0,4 M NaOH/1,1 M tartarato de sódio e potássio) seguido de aquecimento à 100°C por 5 minutos. Após resfriamento em água corrente a solução foi centrifugada a 16000g por 3 minutos para separar o substrato não hidrolisado e a absorbância do sobrenadante foi analisada em 540 nm. Para zerar o equipamento foi utilizada uma amostra-branco contendo substrato e tampão preparados nas mesmas condições descritas anteriormente. A possível interferência de açúcares redutores no meio foi eliminada realizando uma medida com um branco enzimático que consiste em

incubar o substrato na mesma condição da reação, parar a reação com a solução de ADNS e posteriormente adicionar a amostra (BAILEY, 1992). A absorbância obtida para o branco enzimático foi descontada da absorbância da reação da enzima. Foi feita uma curva padrão com D-xilose em concentrações de 0, 2, 3, 5 e 10 $\mu\text{mol.ml}^{-1}$. Uma unidade de atividade xilanolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de grupos redutores por minuto sob as condições descritas.

Determinação da concentração das enzimas: A concentração proteica foi estimada utilizando o reagente Comassie Brilliant Blue G-250 de acordo com a metodologia de Bradford (BRADFORD, 1976) usando uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA).

Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática: Para determinar as condições ótimas de pH e temperatura de atividade enzimática foi realizado teste de atividade xilanolítica como descrito anteriormente, alterando a proporção enzima:substrato de 1:1 para 1:3 (200 μl de volume final) e volume da solução de ADNS foi alterado para 400 μl . A enzima parcialmente purificada foi concentrada a aproximadamente 7-8 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, dialisada contra água utilizando um centriprep (*centrifugal filter devices* Amicon) e utilizada nos testes descritos a seguir. Para determinação do pH ótimo foi realizado o teste de atividade incubando a enzima com substrato solubilizado em dois diferentes tampões: McIlvaine (pH 2,2 a 8,0) e glicina-NaOH 0,1M (pH 8,5 a 11,5). A reação foi feita nos valores de pH 2,2; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 8,5; 9,3; 9,6; 10,1; 10,5; 11,0 e 11,5.

Para a determinação da temperatura ótima da enzima o pH da solução na qual o substrato foi solubilizado foi mantido constante (pH ótimo determinado) e diferentes temperaturas de incubação (20 a 80°C) foram testadas.

Determinação dos parâmetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ e K_m : Os parâmetros cinéticos de Michaelis–Menten foram determinados nas condições ótimas de pH e temperatura pré estabelecidas variando a concentração de substrato xilana (2,5 a 16 mg.ml⁻¹). As medidas foram realizadas em triplicata e o dados analisados segundo o modelo de Michaelis–Menten através do software GraphPad Prism 5.0.

Habilidade enzimática de degradação de outro substrato: Foi avaliada a habilidade hidrolítica da enzima com ácido poligalacturônico (Fluka Biochemika) 0,5% em tampão citrato-fosfato 60 mM pH 5,0. Para isso a enzima (7-8 µg.ml⁻¹) foi incubada com substrato na proporção de 1:1 (v/v) (50 µl final) a 50°C. A reação foi interrompida após 15 minutos pela adição de uma solução contendo ADNS (200 µl) seguida de aquecimento à 100°C por 5 minutos. Após este procedimento foram adicionados 250 µl de água, a solução foi centrifugada por 16000g por 3 minutos e então foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm da fração solúvel. Foi obtida uma curva padrão de ácido D-(+)-galacturônico monohidratado (Fluka analytical) em concentrações conhecidas (0, 1, 2, 3, 5, 10 e 15 µmol.ml⁻¹). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de grupos redutores por minuto sob as condições descritas.

O pH ótimo da enzima frente a este substrato foi avaliado solubilizando 0,5% de ácido poligalacturônico em tampão citrato-fosfato 60 mM, sendo que os valores de pH testados foram 2,5; 3,5; 4,5; 5,0; 5,5; 6,5 e 7,5. Para a determinação da temperatura ótima, o pH foi mantido constante (pH ótimo determinado) e diferentes temperaturas de incubação (20 a 80°C) foram testadas.

Os parâmetros $V_{\text{máx}}$ e K_m foram determinados variando a concentração de substrato ácido poligalacturônico (0,5 a 15 mg.ml⁻¹), nas condições ótimas de pH e temperatura estabelecidas. As medidas foram realizadas em triplicata e o

dados analisados segundo o modelo de Michaelis–Menten através do software GraphPad Prism 5.0.

3.1.5 Análise das enzimas isoladas através de espectrometria de massas (MS)

O estudo de uma das duas enzimas xilanolíticas isoladas do fungo *L. gongylophorus* através de espectrometria de massas foi feito em colaboração com o Prof^o Dr. Edson Rodrigues Filho e o Dr. Douglas Ferreira do Departamento de Química – UFSCar e com o Dr. Fernando Gonçalves de Almeida do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB IV) – USP.

Para esta análise, a amostra foi aplicada em gel de tricina e após a corrida eletroforética, as bandas foram recortadas do gel. A etapa de corte das bandas do gel foi realizada com extremo cuidado e assepsia para evitar contaminações nas amostras. A banda de interesse foi submetida à digestão trípica usando tripsina (*Trypsin from bovine pancreas suitable for protein sequence-T8658, Sigma-Aldrich*) de acordo com protocolo proposto por SHEVCHENKO *et al*, 1996.

Análises via MALDI-TOF/TOF e NanoLC-MS/MS: Para a análise utilizando MALDI-TOF/TOF foi utilizada a matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) (Part No. 201344, Bruker Daltonics) foi preparada numa concentração de 20 mg.ml⁻¹ em H₂O (0,1% ácido trifluoracético)/acetonitrila 60:40) e homogeneizada com ultrassom por 10 min antes de ser utilizada para a aplicação da amostra. A aplicação da amostra foi realizada misturando volumes iguais (2,0 μ l) de matriz e amostra em microtubos de 1,5 ml e seguida de aplicação sobre a placa de análise. Todos os espectros de MS e MS/MS via MALDI foram realizados no espectrômetro de massa MALDI(+)-TOF/TOF Bruker Autoflex

speed (Bruker Daltonics) com laser Smartbeam-II (355 nm), usando os software FlexControl (versão 3.3, Bruker Daltonics), Biotoools (versão 3.2 SR4). Foi utilizado um padrão para calibração interna do equipamento (Peptide Calibration Standard , Bruker Daltonics) antes da aquisição dos espectros.

As análises via NanoLC-MS/MS foram realizadas utilizando nanoLC-LTQ Orbitrap Velos. Após a sua análise, os arquivos *RAW files* foram processados no *software* Xcalibur com posterior conversão para realizar a busca nos bancos de dados de proteínas. As buscas foram realizadas no banco de dados nrNCBI com filtro para o reino Fungi.

3.2 Estudos com xilanase recombinante (LgXyn2)

Foram utilizados dois diferentes sistemas de expressão para obtenção da xilanase recombinante: o sistema em *E. coli* (procarioto) e o sistema em *P. pastoris* (eucarioto). As primeiras etapas dos processos são similares e serão descritas a seguir e posteriormente serão descritos os experimentos em *E.coli* (item 3.2.2) e em *P. pastoris* (item 3.2.3).

3.2.1 Extração de RNA total do fungo *L. gongylophorus* e clonagem do gene (chamado *xyl*) que codifica para a síntese da xilanase

Preparo do material livre de RNase: Visando impedir a degradação de moléculas ribonucleotídicas, durante a manipulação das amostras e soluções usou-se sempre luvas de látex descartáveis e máscara. Para o preparo de todas as soluções necessárias utilizou-se água livre de RNase (tratada com 0,05% de DEPC (Dietilpirocarbonato), um inibidor de RNases). Todos os materiais utilizados para a extração e manipulação de RNA foram tratados como descrito a seguir. O material foi mantido imerso por 1 hora em solução 0,01% de SDS (p/v), posteriormente foi enxaguado com água destilada e com água ultrapura e então este foi mantido *overnight* em solução 0,05% de DEPC (v/v), a qual permaneceu *overnight* em agitação antes de ser utilizada. No dia seguinte o material (sem enxaguar) foi embalado em papel alumínio, papel Kraft e autoclavado por 20 minutos a 120°C. O material foi seco em estufa.

Extração de RNA total: Para a extração de RNA total a cultura do fungo foi mantida por 30 dias em meio de cultura líquido indutor, nas condições

anteriormente descrita (item 3.1.2). O micélio do fungo foi rapidamente separado por filtração, embalado em papel alumino e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e posteriormente a amostra foi armazenada à -80°C . Para a extração de RNA total, aproximadamente 120-130 mg do micélio congelado foram coletados e então foi iniciado o procedimento de extração utilizando-se o método TRIzol[®], procedimento este melhorado para a metodologia de extração de RNA em uma única etapa desenvolvido por CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987). Para isto foram seguidas as etapas sugeridas pelo fabricante sendo a única diferença no protocolo a inclusão de mais uma etapa de purificação por partição com um volume de ácido fenol:clorofórmio (125:24:1 mistura de fenol, clorofórmio, álcool isoamílico pH 4,3-4,7- Ambion). A amostra foi incubada por 1 minuto à temperatura ambiente e então foi centrifugada à 12000g à 4°C por 15 minutos. Após esta etapa a fase superior aquosa foi transferida para um tubo limpo e a metodologia foi seguida com a precipitação do RNA com isopropanol segundo o protocolo descrito pelo fabricante do TRIzol[®]. O *pellet* de RNA total foi ressuspenso em 40 μl de água tratada com DEPC e posteriormente foi incubada por 10 minutos à 60°C . A qualidade e concentração do RNA total isolado foram estimados através das relações das absorvâncias da amostra medidas em 230, 260 e 280nm (A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}) utilizando BioSpec-nano (Shimadzu). A integridade da amostra de RNA foi verificada por gel de agarose 1% em tampão TAE (80 mM Tris-HCl, 40 mM ácido acético glacial, 2,5 mM EDTA e pH 8,3) em água tratada com DEPC (SAMBROOK & RUSSELL, 2001) contendo brometo de etídio ($0,1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). O gel foi submetido à corrida de 120 V por 30 minutos e posteriormente visualizado e fotografado através do sistema de foto documentação computadorizado (Gel DocTM Ez System – Bio-Rad).

Síntese do cDNA da xilanase através de RT-PCR: O cDNA (DNA complementar) da xilanase foi obtido utilizando-se o RNA total como molécula

molde em RT-PCR. Para isto, foi preparada uma amostra contendo 4µg de RNA total, 2µl de Oligo(dT)15 *primer* 0,5 µg.µl⁻¹ (Promega) e o volume foi completado para 13µl com água tratada com DEPC. A amostra foi incubada por 5 minutos a 65°C e resfriada imediatamente após o tempo de incubação. Então foram adicionados 4µl de 5X *Reaction Buffer*, 2µl de uma mistura de dNTPs 10mM cada (Thermo Scientific) e 1µl de RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). A amostra foi homogeneizada e incubada por 60 minutos a 42°C. A reação foi interrompida por aquecimento a 70°C por 10 minutos.

Amplificação do DNA que codifica a síntese da xilanase: A amplificação do gene de interesse foi realizada utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando como molécula molde o cDNA e oligonucleotídeos *forward* e *reverse* sintetizados. A síntese dos oligonucleotídeos foi realizada baseada na sequência codificadora (CDS) de nucleotídeos do gene da xilanase (LgXyn1) presente no fungo simbiote *L. gongylophorus* de formigas cortadeiras depositada no banco de dados *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov), sob o número de acesso EF208066 e apresentada abaixo:

>gi|126215797|gb|EF208066.1| *Leucoagaricus gongylophorus*
xylanase (Xyn1) gene, complete cds

ATG GTC TCT TTC ATT TTC ACT CGC ATC ATT CTC TTT GCT GCT GCC
ATT AAT GGT GCT GTC GCT CTC CCG ATG AAC ACC ACC GAA CCA
GAG GAC TTC AGC ATT CTT TCC CGC TCT GGA ACA CCA AGT TCT
ACT GGG TAC TCT AAC GGA TAC TAC TAT TCT TGG TGG ACG GAC
GGT GCC GCT CAG GCC ACC TAC GCC AAC GGT GGA GGT GGT CAG
TAT AGC CTC AAC TGG TCA GGT AAC AAC GGT AAC CTC GTC GGT
GGG AAA GGA TGG AAC CCG GGC TTT AAT GGC AGA GTG ATC CAG
TAC AGC GGT ACT TAC CAG CCT AAC GGG AAC AGT TAC CTT TCT
GTC TAT GGC TGG ACA CTG AAC CCT CTC ATC GAG TAC TAT ATC

GTC GAG TCC TAC GGT TCC TAC AAT CCC TCC TCC GCT GCC GCG
 AGG AAG GGG TCT GTG AAC TGT GAC GGT GCT AAC TAC GAC ATC
 CTC ACC ACC ACG CGC TAC AAC GAA CCA TCT ATT AAT GGC ACG
 CAG ACT TTC CAA CAG TTC TGG TCT GTC CGC AAC CCC AAA AAG
 AAC CCG GGA GGA TCT ATC AGT GGC AGT GTT AGT ACC GGA TGC
 CAC TTT ACT GCC TGG GGG AAT TTA GGG ATG AAT TTG GGT TCC
 ACT TGG AAC TAC CAG ATT GTT GCA ACT GAA GGT TAT CAG AGC
 AGC GGT TTC TCT AGT ATC ACC GTC GCT

A presença de peptídeo sinal e provável sítio de processamento foram avaliados utilizando o programa SignalP 4.0 (PETERSEN *et al.*, 2011). Foi verificado que a sequência depositada, LgXyn1, possui um peptídeo sinal na região N-terminal (sublinhado na sequência acima) levando provavelmente à clivagem entre os resíduos de aminoácidos 21 e 22 da proteína. Baseado nessas informações foi sintetizado o oligonucleotídeo *foward* iniciando após os primeiros 69 resíduos de nucleotídeos da sequência depositada, o que leva à eliminação dos primeiros 23 resíduos de aminoácidos da região N-terminal (peptídeo sinal).

Para a subclonagem unidirecional no vetor pET SUMO (Invitrogen) e expressão em *E. coli* foi utilizado o oligonucleotídeo *foward* com sítio de restrição para a enzima *EcoRI* e foi sintetizado oligonucleotídeo *reverse* incluindo na sua extremidade 5' o sítio de restrição para enzima *HindIII* (tabela 3.1). A utilização deste vetor permite a expressão da proteína de interesse em fusão (na região N-terminal) com seis resíduos de histidina (His.tag) e com a SUMO.tag seguida de sítio de reconhecimento pela enzima ULP-1 (aqui chamada de SUMO protease). A proteína de fusão apresenta, portanto, a seguinte sequência His.tag+SUMO.tag+sítio para SUMO protease+proteína de interesse.

Para a subclonagem unidirecional no vetor pPICZ α -A e expressão em *P. pastoris* foi utilizado o mesmo oligonucleotídeo *foward* (com sítio para *EcoRI*) usado para o vetor pET SUMO e foi sintetizado o oligonucleotídeo *reverse* com sítio para enzima *NotI*. Este sistema de clonagem permitirá que a proteína de interesse seja expressa em fase com o fator- α na região N-terminal, que é um sinal de secreção e será processado durante a translocação da proteína. Além disso, a proteína de interesse será expressa em fusão com seis resíduos de histidinas (His.tag) e o epítipo *c-myc* na região C-terminal. Como o vetor não possui sítio de reconhecimento para proteases para separar a enzima da fusão desenhamos o oligonucleotídeo *reverse* contendo uma sequência de resíduos de nucleotídeo que codifique para o sítio de reconhecimento da trombina (em vermelho na tabela 3.1), o que nos permitirá separar a proteína de fusão e obter a xilanase isolada.

TABELA 3.1: Oligonucleotídeos para amplificação do gene *xyl* sem o peptídeo sinal. Os resíduos de nucleotídeos sublinhados representam aqueles dos sítios de restrição das enzimas. Os resíduos de nucleotídeos em vermelho são referentes ao sítio de reconhecimento para a trombina. E os resíduos em verde codificam para a síntese de um *stop* códon.

	Vetor de expressão	Sequência de oligonucleotídeos
<i>Foward</i> (5'-3') (<i>EcoRI</i>)	pPICZ α -A e pETSUMO	5' GCC <u>GAA TTC</u> ATG AAC ACC ACC GAA CCA GAG GAC TTC AGC ATT CTT TCC CGC 3'
<i>Reverse</i> (5'-3') (<i>NotI</i>)	pPICZ α -A	5' GCC <u>GCG GCC GC</u> GGA TCC ACG CGG AAC CAG AGC GAC GGT GAT ACT AGA GAA ACC GCT GCT CTG 3'
<i>Reverse</i> (5'-3') (<i>HindIII</i>)	pET SUMO	5' GCC <u>AAGCTT</u> TTA AGC GAC GGT GAT ACT AGA GAA ACC GCT GCT 3'

Para a amplificação do gene *xyl* foi realizada a PCR utilizando como molde 2 µl de cDNA, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada par de oligonucleotídeo descritos na tabela 3.1 (*forward e reverse*), 2,5 U de *Pfu DNA Polymerase* (Thermo Scientific) e 1X *Pfu Buffer* com MgSO₄ em uma reação de volume final de 50 µl. A reação foi realizada em um termociclador *Eppendorf mastercycler gradient* utilizando o programa descrito na tabela 3.2 que, após o aquecimento inicial, consiste de ciclos que permitem a desnaturação do DNA, hibridização dos oligonucleotídeos no DNA molde e extensão do fragmento pela polimerase. A reação de PCR foi analisada utilizando 5 µl das amostras em gel de agarose 1% contendo 0,1µg.ml⁻¹ de brometo de etídio em tampão TAE. Posteriormente o volume total da reação foi aplicado em um gel de agarose preparativo e os fragmentos de DNA foram recortados e purificados do gel de agarose utilizando o *kit Wizard SV gel and PCR clean-UP System* (Promega) como descrito pelo fabricante.

TABELA 3.2: Condições dos ciclos da reação de PCR para amplificação do gene.

CICLO	1X Desnaturaçã inicial	Desnaturaçã 30X	Anelamento 30X	Extensã 30X	1X Extensã final	<i>HOLD</i>
T(°C)	94	94	68	72	72	4
TEMPO	5 min	1min	1 min	3 min	10 min	∞

Reação de poliadenilação do produto de PCR e ligação no vetor de clonagem pGEM[®]-T Easy: O sistema *pGEM[®]-T Easy vector* (Promega) é um conveniente sistema para clonagem de produto de PCR. Apesar de certas polimerases termoestáveis acrescentarem resíduos de adeninas na porção 3' dos

fragmentos de DNA após a PCR, a enzima utilizada (Pfu) não faz essa modificação e portanto foi necessário fazer uma reação de poliadenilação do DNA amplificado para posterior uso na clonagem com o vetor pGEM[®]-T *Easy*.

Assim, o produto de PCR foi extraído do gel de agarose, purificado e submetido à reação de poliadenilação. Para isso foram utilizados 5 µl do DNA purificado em meio tamponado (1X *Taq Buffer*) contendo 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPmix, 5 U de *Taq* DNA Polimerase e em seguida a amostra foi incubada a 70°C por 30 minutos. O produto desta reação foi utilizado para clonagem no vetor pGEM seguindo as condições descritas pelo fabricante para uma reação com volume final de 10 µl. A reação de ligação foi mantida à 4°C por 16 horas.

O volume total do produto da reação de ligação foi transformado em células de *E. coli* linhagem DH5α quimio competentes segundo o método de cloreto de cálcio e choque térmico (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). As células transformadas (aproximadamente 100 µl) foram plaqueadas em 25 ml de meio LB (Luria Bertani – 1% (m/v) triptona, 0,5% (m/v) extrato de levedura, 1% (m/v) cloreto de sódio pH7,5 e 1,5% (m/v) de ágar) contendo 100 µg.ml⁻¹ de ampicilina, 0,4 mM de IPTG e 32 µg.ml⁻¹ de X-Gal. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. As colônias brancas obtidas foram repicadas individualmente e cultivadas em 5 ml de meio LB líquido contendo 100 µg.ml⁻¹ de ampicilina, sob agitação de 250 rpm a 37°C por 16 horas. A extração do DNA plasmidial das células crescidas em meio líquido foi feita com a utilização do *kit Wizard[®] Plus SV Miniprep* (Promega) de acordo com o fabricante e o DNA plasmidial foi analisado em gel de agarose 1%.

A clonagem (obtenção do clone pGEM-*xyl*) foi confirmada por PCR utilizando como DNA molde o DNA plasmidial, *Taq* DNA polimerase (Thermo

Scientific) em uma reação de 25 µl, os oligonucleotídeos e o programa descrito na tabela 3.2. A clonagem foi confirmada também por análise de restrição, que consiste na digestão dupla do DNA plasmidial com as enzimas de restrição incluídas nos pares de oligonucleotídeos (*forward* e *reverse*) correspondentes para cada construção (tabela 3.1). Os clones confirmados por estas técnicas foram sequenciados em colaboração com a Prof^a Dr^a Ana Paula Ulian de Araújo do Instituto de Física de São Carlos, USP.

O resultado do sequenciamento foi analisado pelo alinhamento com o banco de dados do NCBI utilizando o Blastx. A predição da estrutura primária da enzima foi realizada a partir da tradução da sequência de nucleotídeo utilizando o *software online TRANLATE tool* (<http://web.expasy.org/translate/>). A presença de domínios conservados na sequência de resíduos de aminoácidos foi realizada utilizando o *software online ScanProsite* (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>).

Foram analisadas as possíveis modificações pós-traducionais da ORF obtida com relação aos sítios de O- e N- glicosilação foram realizados utilizando os *softwares online* NetOGluc 3.1 (JULIENIUS *et al.*, 2005) e o NetNGlyc 1.0 (GUPTA *et al.*, 2004). A sequência de resíduos de nucleotídeo de outras xilanases de fungos descritas na literatura foram obtidas no banco de dados UniProt (www.uniprot.org) e foram utilizados os programas Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e LAlign (http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html) para realizar o alinhamento destas sequências.

3.2.2 Expressão da xilanase (LgXyn2) em *E.coli*

3.2.2.1 Clonagem do gene *xyl* no vetor de expressão pET SUMO

Para a clonagem do DNA que codifica a síntese da LgXyn2 no vetor pET SUMO foi realizada a amplificação do DNA por PCR usando como molécula molde o clone pGEM-*xyl* e os oligonucleotídeos *forward* e *reverse* mostrados na tabela 3.1. O DNA amplificado foi digerido a 37°C por 3 horas com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* (Thermo Scientific) assim como o vetor pET SUMO. Posteriormente foi realizado um gel preparativo de agarose 1% com as amostras e os DNAs foram purificados com o Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* da *Promega* como descrito pelo fabricante.

Os DNAs previamente digeridos com as enzimas de restrição e purificados foram quantificados em um espectrofotômetro BioSpec-nano (Shimadzu) (absorbância à 260 nm). Foi realizada uma reação de ligação na proporção de 1:3 de vetor e inserto, contendo 2 µl de 10X T4 DNA *ligase buffer* e 2 µl de T4 DNA Ligase (5U.µl⁻¹) em um volume final de 20 µl. A reação de ligação foi incubada a 16°C por 16 horas.

O produto da reação de ligação foi transformado em células de *E. coli* DH5α competentes por choque térmico para propagação do plasmídeo (pET SUMO-*xyl*). As células transformadas foram semeadas e selecionadas em placas contendo 25 ml de meio LB e 50 µg.ml⁻¹ de canamicina, mantidas a 37°C por 16 horas. Os clones transformantes foram repicados individualmente e cultivados em 5 ml de meio LB líquido contendo 50 µg.ml⁻¹ de canamicina para posterior extração de DNA plasmidial. A clonagem foi confirmada por PCR utilizando como DNA molde o DNA plasmidial e também por análise de restrição enzimática. Os

clones foram sequenciados para verificar se o gene estava em fase de leitura correta com o vetor.

3.2.2.2 Análise da proteína LgXyn2 expressa em *E. coli*

Expressão heteróloga da proteína em células de *E. coli*: O DNA plasmidial de um dos clones foi transformado em duas diferentes linhagens de *E. coli*: BL21(DE3)pT-GroE e Rosetta(DE3)pLysS. Após a transformação 80 µl de cada amostra celular foi semeada em placas de Petri individuais contendo 25 ml de meio LB ágar, 50 µg/ml de canamicina em e 40 µg/ml de clorafenicol. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

Foi realizada a expressão da proteína LgXyn2 em fusão com a proteína SUMO e o peptídeo de 6 histidinas (His.Tag) nas duas diferentes linhagens de *E. coli*, utilizando diferentes concentrações de indutor e temperatura (descritas a seguir) para verificar a maior produção de proteína solúvel. O pré-inóculo foi preparado com 5 ml de meio LB estéril contendo os antibióticos e uma colônia transformante. O pré-inóculo foi incubado a 37°C por 16 horas sob agitação de 200 rpm.

O inóculo para produção da proteína recombinante foi preparado a partir de 1% do pré-inóculo em 250 ml de meio LB na presença dos antibióticos. As culturas foram mantidas sob agitação a 37°C até atingir entre 0,6 e 0,8 de densidade óptica (DO) a 600 nm que corresponde ao início da fase exponencial de crescimento bacteriano. Então foi coletada uma amostra da cultura denominada de T₀. A expressão da proteína foi induzida em duas condições diferentes de concentração de IPTG, uma consistindo na adição de 1,0 mM de IPTG e cultivo

por 4 horas a 37°C ou por 18 horas a 18 °C e a outra com indução com 0,3 mM de IPTG no cultivo por 18 horas a 18 °C. Ao término do tempo de indução foi coletada uma amostra dos meios de indução, denominadas T₄ e T₁₈ baseado nos tempos de indução para cada cultura.

Análise da solubilidade da proteína LgXyn2 expressa em células de *E. coli* e purificação em resina de afinidade: Após os respectivos tempos de indução os cultivos foram analisados quanto à expressão e solubilidade da proteína LgXyn2. Para isto, os meios de cultura (250ml) foram centrifugados a 9000 rpm durante 10 min a 4°C e as células foram ressuspensas em 5% do volume inicial de cultura em tampão 20mM acetato de sódio pH 4,8 ou 25 mM Tris, 300 mM NaCl e 10% de glicerol pH 8,0 (tampão A). Diferentes condições de lise celular foram testadas, dentre elas, a lise por ultrassom (Sonic Desmembrator Fisher Scientific mode 500) a 17 % de amplitude durante 5 minutos (30 segundos de pulso e 10 segundos de repouso). Com a amplitude de 20% foram testadas duas condições, uma por 5 minutos (59,9 segundos de pulso e 30 segundos de repouso) e outra por 7 minutos (30 segundos de pulso e 30 segundos de repouso). A lise por 7 minutos com amplitude de 20 % também foi testada com a adição de 0,5 e 1 % de triton-X100 (Sigma). Esses experimentos estão resumidamente descritos na tabela 3.3.

TABELA 3.3: Experimentos de lise celular por ultrassom

Experimento	Amplitude (%)	Tempo (minutos)	Ciclos (pulso/repouso)	Triton-X100 (%)
1	17	5	30 segundos/10 segundos	----
2	20	5	59,9 segundos/30 segundos	----
3	20	7	30 segundos/30 segundos	----
5	20	7	30 segundos/30 repouso	0,5
6	20	7	30 segundos/30 segundos	1,0

Também foi realizada a lise por choque térmico com nitrogênio líquido, sendo realizados 5 ciclos de congelamento com nitrogênio e descongelamento em banho à 37°C.

Após cada um dos testes de lise celular, a suspensão foi centrifugada a 4°C por 20 minutos a 8000 rpm. O precipitado celular foi armazenado e o sobrenadante (pré-coluna) foi então aplicado em coluna de 1 ml de níquel (Ni-NTA *Superflow* da Qiagen) ou cobalto (TALON® *Metal Affinity Resins* da Clontech) para purificação por afinidade. A resina foi previamente lavada com água *milliQ* e equilibrada com o tampão A. Após a aplicação da amostra as frações que não se ligaram na resina foram reunidas (*void*). O processo foi seguido pela lavagem da resina com 5 ml de tampão A e essa fração foi coletada (fração aqui chamada de lavagem). A eluição das proteínas foi realizada com o tampão A acrescido de 150 mM de imidazol. Foi também testada a eluição com gradiente de imidazol, sendo que as concentrações utilizadas foram de 50, 100, 150, 200 e 250 mM de imidazol. Então a coluna foi lavada com água e posteriormente lavada e

armazenada em etanol 20%. Para o acompanhamento dessas etapas foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de tricina ou gel SDS 15% (LAEMMLI, 1970) e teste de atividade com ADNS (item 3.1.4.).

Obtenção da enzima SUMO protease para utilização nos ensaios de clivagem da fusão: Cepas de BL21(DE3) transformadas com o clone para expressão da SUMO protease, gentilmente cedidas pela Prof^a Dr^a Ana Paula Ulian de Araújo do Instituto de Física de São Carlos-USP, foram utilizadas e a enzima foi purificada como descrito a seguir. Resumidamente, uma colônia transformante foi inoculada em 5 ml de meio LB estéril contendo $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de canamicina e incubada a 37°C por 16 horas sob agitação de 250 rpm (pré-inóculo). O inóculo para produção da proteína recombinante foi preparado a partir de 2% do pré-inóculo com canamicina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. As culturas foram mantidas sob agitação a 37°C até atingir densidade óptica (DO) a 600 nm em torno de 0,7. Então a expressão da proteína foi induzida com 0,1 mM de IPTG e o cultivo foi mantido 18 horas a 18°C sob agitação de 250 rpm. Após o tempo de indução o cultivo foi centrifugado a 9000 rpm durante 20 min a 4°C e as células foram ressuspensas em 2% do volume inicial de cultura em tampão 25 mM Tris, 300 mM NaCl e 10% de glicerol pH 8,0 (tampão A). As células foram lisadas por ultrassom (Sonic Desmembrator Fisher Scientific mode 500) a 20 % de amplitude durante 7 minutos (30 segundos de pulso e 30 segundos de repouso). A suspensão foi centrifugada a 4°C por 20 minutos a 8000 rpm. O sobrenadante da centrifugação foi então aplicado em coluna de níquel de 1 ml (HisTrapTM HP GE) para purificação por afinidade. A cromatografia foi realizada em um fluxo de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ e como eluente foi utilizado o tampão A acrescido de 500 mM de imidazol, sendo que foi realizado um gradiente linear de 0-100% de eluente em 20 mL. As frações foram analisadas por SDS-PAGE 15% e as frações mais puras foram dialisadas contra tampão 25 mM Tris, 300 mM NaCl pH 8,0 e dosadas por Bradford.

Clivagem da proteína de fusão na resina de afinidade: A

clivagem da proteína de fusão foi realizada com a amostra ainda imobilizada na resina de afinidade, utilizando a enzima SUMO protease que foi expressa em nosso laboratório. Para realizar a clivagem da proteína de fusão ligada à resina, foi necessário ter uma estimativa da concentração da amostra ligada na coluna. Assim, primeiramente foi feito um experimento eluindo a amostra da coluna e medindo a concentração da amostra eluída através do método de Bradford. Para os testes de clivagem, a resina foi lavada com o mesmo tampão A na ausência de glicerol, a coluna foi fechada e então foi mantido o volume em torno de 1 ml de tampão acima do nível da resina. A clivagem foi realizada na proporção de 1 mg de SUMO protease para 50 mg de proteína de fusão imobilizada (1:50). Esta mistura foi mantida por 16 horas a 4°C e então a coluna foi aberta, coletado o eluato e a seguir a coluna foi lavada com 2 ml de tampão A sem glicerol. A eluição foi realizada com 3 ml deste tampão A acrescido de 250 mM de imidazol. Esta etapa foi acompanhada por eletroforese em gel de tricina, *immunoblotting* utilizando anti-His como anticorpo e por teste de atividade com ADNS (item 3.1.4).

3.2.3 Expressão da xilanase em *P. pastoris*

3.2.3.1 Clonagem do gene *xyl* no vetor pPICZ α -A

Para a clonagem do DNA que codifica a síntese da LgXyn2 no vetor pPICZ α -A foi feita a amplificação do DNA por PCR usando como molécula molde o clone pGEM-*xyl* e os oligonucleotídeos *forward* e *reverse* mostrados na tabela 3.1.

O DNA amplificado e vetor pPICZ α -A foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*, purificados e quantificados em um espectrofotômetro pela absorvância à 260 nm. Foi realizada a reação de ligação na proporção de 1:3 de vetor e inserto, contendo 2 μ l de 10X T4 DNA *ligase buffer* e 2 μ l de T4 DNA Ligase (5U. μ l⁻¹) em um volume final de 20 μ l. A reação de ligação foi incubada a 16°C por 16 horas.

O produto da reação de ligação foi transformado em células de *E. coli* DH5 α competentes por choque térmico para propagação do plasmídeo pPICZ α -A-*xyl*. As células transformadas foram semeadas e selecionadas em placas contendo 25 ml de meio LB *low salt* (1% (m/v) triptona, 0,5% (m/v) extrato de levedura, 0,5% (m/v) cloreto de sódio pH7,5 e 1,5% (m/v) ágar) e 25 μ g.ml⁻¹ do antibiótico zeocina. As placas foram mantidas a 37°C por 16 horas. Os clones transformantes foram repicados individualmente e cultivados em 5 ml de meio LB-*low-salt* líquido contendo o antibiótico para posterior extração de DNA plasmidial. A clonagem foi confirmada por PCR utilizando como DNA molde o DNA plasmidial e também por análise de restrição enzimática. Os clones foram sequenciados para verificar se o gene estava em fase de leitura correta com o vetor.

3.2.3.2 Análise da proteína LgXyn2 expressa em *P. pastoris*

Transformação dos clones pPICZ α -A-*xyl* em linhagens de *P. pastoris* eletrocompetentes: Células de *P. pastoris* KM71H eletrocompetentes foram preparadas de acordo com o manual *EasySelectTM Pichia Expression Kit* (InvitrogenTM) e a transformação das células competentes com o plasmídeo pPICZ α -A-*xyl* foi realizada por eletroporação. Como em *Saccharomyces cerevisiae*, um DNA linear pode gerar transformantes estáveis de *P. pastoris* via recombinação homóloga entre o DNA transformado e regiões de homologia no genoma. Ao utilizar o vetor pPICZ α -A a integração ocorrerá somente no *locus AOX1* devido a presença de uma região homóloga a esta, onde ocorrerá a linearização do vetor quando utilizada a enzima *SacI*. Para isto, foi realizada a linearização de aproximadamente 15 μ g de DNA plasmidial (pPICZ α -A-*xyl*) com 15 μ l da enzima *SacI* (Thermo Scientific) por 16 horas à 37°C. O mesmo foi feito com o vetor pPICZ α -A para ser usado posteriormente como um controle dos experimentos de clonagem/expressão. Posteriormente uma alíquota da amostra linearizada foi analisada em gel de agarose 1%. O restante da amostra foi purificado através da adição de clorofórmio (1:1, v/v). A amostra foi homogeneizada por agitação e então centrifugada à 15000g por 2 minutos e a fase superior foi transferida para um tubo de 1,5 ml limpo. Então o DNA foi precipitado com 1 volume de acetato de sódio 3M gelado para cada 10 volumes de DNA. Ao precipitado foram adicionados 2,5 volumes de etanol 100% gelado, a amostra foi homogeneizada e mantida -20°C por 16 horas. Após este período a mistura foi centrifugada a 15000g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão rápida e então 1 ml de etanol 70% gelado foi adicionado e centrifugado novamente a 15000g a 4°C por 2 minutos. O sobrenadante foi vertido e o *pellet* seco a 37°C por 30 minutos. O *pellet* foi ressuscitado em 10 μ l de água ultrapura

autoclavada e o DNA foi utilizado para transformação em *P. pastoris* eletrocompetente.

A transformação por eletroporação em *P. pastoris* eletrocompetentes foi realizada incubando 10 µl de DNA linearizado e purificado (contendo de 5-10 µg de DNA linearizado) com 80 µl de células. Após a homogeneização a mistura foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm previamente resfriada e esta foi mantida no gelo por 5 minutos. As células foram submetidas à eletroporação de acordo com os parâmetros sugeridos pelo manual do vetor pPICZα-A (Invitrogen): 2.000V, 200Ω, 25µF e tempo de choque de 4,9ms, utilizando um eletroporador GenePulser (BioRad).

Imediatamente após a eletroporação foi adicionado à cubeta 1 ml de sorbitol 1M estéril e gelado e esta mistura foi homogeneizada lentamente. O conteúdo da cubeta foi transferido para um tubo de 15 ml estéril e este foi incubado 1 hora e meia a 30°C, sem agitação. Então 25, 50, 75 e 150 µl de células transformadas foram semeadas em placas de Petri contendo 25 ml meio YPDS ágar com 100 µg.ml⁻¹ de zeocina. Foi realizada uma seleção inicial de transformantes resistentes à zeocina em placas de Petri contendo 25 ml meio YPDS ágar (1% de extrato de levedura, 2% peptona bacteriológica, 2% dextrose, 2% ágar bacteriológico e 1M de sorbitol) com 500 µg.ml⁻¹ de zeocina. As placas foram incubadas por 2 a 3 dias a 30°C até a formação de colônias. Após o crescimento das colônias fez-se a seleção dos clones em elevada concentração de zeocina, através do repique das colônias para placas de meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% peptona bacteriológica, 2% dextrose e 2% ágar bacteriológico) com 1000 µg.ml⁻¹ de zeocina.

Para a confirmação das colônias recombinantes foi extraído o DNA genômico das colônias que cresceram em 1000 µg.ml⁻¹ de zeocina. Para isso, 600

μl de tampão de extração (0,5 M NaCl, 0,05 M de EDTA, 0,1 M Tris, 0,2% v/v β-mercaptoetanol, pH 8,0) foi inoculado com células de colônias transformantes, homogeneizado e então 50 μl de SDS 20% foram adicionados e a mistura foi agitada por 1 minuto. A reação foi incubada a 60°C por 15 minutos, posteriormente 300 μl de acetato de potássio 5M foram adicionados e a reação homogeneizada por agitação durante 1 minuto. A reação foi centrifugada a 15000g por 10 minutos, 700 μl do sobrenadante foram transferidos para um tubo de 1,5 ml limpo e foram acrescentados 700 μl de isopropanol. A mistura foi agitada brevemente seguida por centrifugação 15000g por 10 minutos. O sobrenadante foi vertido e ao *pellet* foram adicionados 500 μl de etanol 70%, a reação foi centrifugada a 15000g por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado seco por 20 minutos a 60°C. O DNA precipitado foi ressuspensionado em 50 μl de água ultrapura autoclavada e a integridade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 1%.

O DNA genômico íntegro foi usado para confirmar a recombinação gênica através de PCR em duas condições diferentes: para a amplificação do DNA *xyl* usando os oligonucleotídeos *forward* e *reverse* mostrados na tabela 3.1 e para a amplificação da região AOX1-*xyl* com os oligonucleotídeos 5' e 3'AOX. As colônias transformantes confirmadas por PCR nas duas condições anteriormente descritas foram utilizadas na expressão da proteína heteróloga.

Expressão heteróloga da proteína LgXyn2 em linhagem KM71H de *P. pastoris*

Expressão em pequena escala: Inicialmente foi realizada a expressão de 3 clones em pequena escala com o propósito de selecionar o clone hiper produtor da enzima de interesse. Para isso, as colônias foram inoculadas em 100

ml de meio BMGY (1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona, 100 mM fosfato de potássio (pH 6,0), 1,34% (m/v) YNB, 0,0004% (m/v) biotina e 1% (v/v) glicerol) em *erlenmeyers* de 500 ml. A cultura foi mantida a 30°C sob agitação de 250 rpm até atingir $DO_{600nm} = 2-6$ (aproximadamente 16 horas) e então foi centrifugada a 1500g por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado celular foi ressuscitado em 15 mL meio BMMY (1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona, 100 mM fosfato de potássio (pH 6,0), 1,34% (m/v) YNB, 0,0004% (m/v) biotina e 0,5% (v/v) metanol) em tubo de 50 ml para induzir a expressão heteróloga. A cultura foi mantida sob agitação de 250 rpm à 30°C por 144 horas, sendo que a cada 24 horas a cultura foi induzida com 0,7% de metanol e alíquotas de 500 µl em cada um destes intervalos foram retiradas, centrifugadas e o sobrenadante armazenado para posterior análise por SDS-PAGE.

O mesmo procedimento descrito foi realizado com uma colônia de *P. pastoris* KM71H transformada com o vetor pPIC α -A como controle.

Expressão em larga escala: Foi realizada a expressão em larga escala para dois clones testados na pequena escala na linhagem KM71H com o gene de interesse e uma para o controle. Para isso foi utilizada a mesma metodologia estabelecida para a pequena escala, sendo que o volume de meio BMGY foi alterado para 2 l e o de BMMY para 200 ml. Ao término do tempo de indução, 144 horas, o volume total restante foi centrifugado e o sobrenadante foi deslevedurado por filtração em membrana de 0,20 µm e armazenado a -20°C.

A expressão da proteína em larga escala foi acompanhada a cada 24hs com a análise do meio extracelular por eletroforese em géis de tricina e por ensaio de atividade xilanolítica em placa como descrito na literatura (JEYA *et al.*, 2009). Para este experimento, as mesmas colônias utilizadas na expressão em larga escala

foram semeadas em placa contendo meio BMMY com $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de zeocina, 2% de ágar e 1 % de xilano. As placas foram mantidas a 30°C e a cada 24 horas foram acrescentados $100 \mu\text{l}$ de metanol PA na tampa invertida. Após 144h as placas foram lavadas com água destilada para remoção das colônias, coradas com 1% de vermelho de congo (Vetec) e descoradas com 2M de NaCl. Colônias com atividade xilanolítica apresentam um halo de coloração amarelada. A colônia que apresentou atividade em placa foi também avaliada quanto à atividade xilanolítica em solução por ADNS. Para isso, as alíquotas dos diferentes tempos de indução foram dialisadas contra tampão 25 mM Tris pH8,0 e submetidas à reação como substrato xilano e reveladas com ADNS.

4. Resultados e discussão

4.1 Estudos com enzimas nativas

4.1.1 Determinação das condições de cultivo para produção de xilanases

A produção de enzimas xilanolíticas pelo fungo *L. gongylophorus* foi avaliada em duas diferentes fontes de carbono/indutor: xilana ou pectina. O teste para detectar a atividade xilanolítica consiste na incubação do extrato bruto com o substrato e após determinado intervalo de tempo a reação foi interrompida pela adição de uma solução contendo ADNS/NaOH (SUMNER, 1921). Açúcares redutores podem ser oxidados por agentes oxidantes relativamente fracos sendo que o carbono carbonil é oxidado a um grupo carboxil e esta oxidação ocorre apenas com a forma linear dos carboidratos, a qual existe em equilíbrio com a forma cíclica. Deste modo, quando o carbono anomérico está envolvido em uma ligação glicosídica aquele resíduo não pode assumir a forma linear e, portanto, torna-se uma extremidade não redutora. Entretanto a extremidade de uma cadeia que possui um carbono anomérico livre (não envolvido na ligação glicosídica) normalmente é chamada de extremidade redutora (NELSON & COX, 2011). A atividade xilanolítica foi determinada sabendo que a xilana é constituída, em sua cadeia principal, por uma cadeia β -1,4-D-xilopirranose e que a degradação do esqueleto de xilana é catalisada por endo- β -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8), que clivam randomicamente o esqueleto de xilana em xilo-oligossacarídeo e por β -1,4-xilosidases (EC 3.2.1.37) que separam os monômeros de xilose a partir das extremidades não redutoras do xilo-oligossacarídeo (BIELY, 1985; NAKAMURA *et al.*, 1993). Baseada na hidrólise das ligações glicosídicas, o aumento de

extremidade redutora/açúcar redutor no meio proveniente a ação da enzima pode ser detectada na presença de ADNS (agente oxidante), o qual é reduzido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, enquanto que no caso mais simples o grupamento aldeído parece ser oxidado a grupos carboxil (ácido aldônico) (HOSTETTLER *et al.*, 1951; SILVA, R. N. *et al*, 2003), como está ilustrado na figura 4.1.

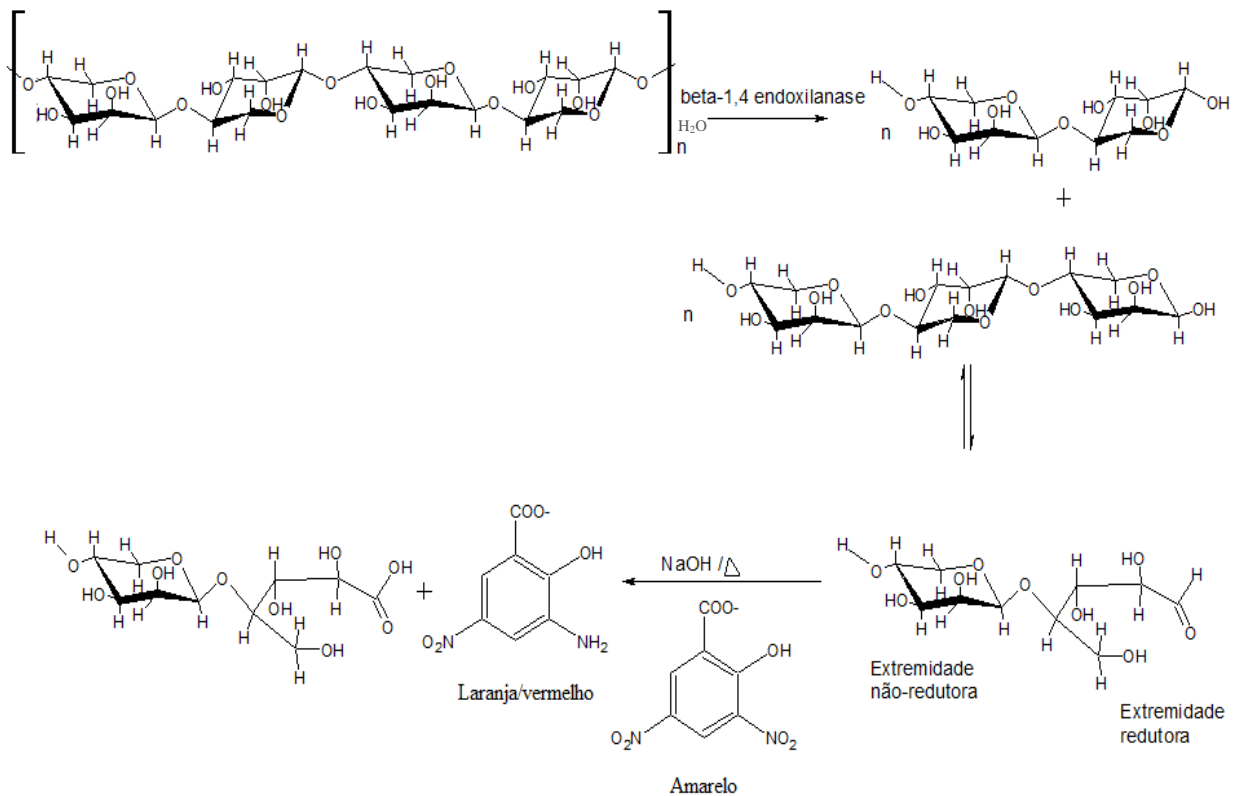


FIGURA 4.1: Representação da reação simplificada da reação de hidrólise da cadeia principal da xilana e seus produtos de degradação na reação com ADNS (NELSON & COX, 2011; SILVA, R. N. *et al*, 2003).

A atividade xilanolítica foi analisada no extrato bruto após o cultivo do fungo e os resultados estão apresentados na tabela 4.1. A pectina foi o pior indutor para produção de enzimas xilanolíticas, diferentemente do proposto por Silva e colaboradores (SILVA, A. *et al.*, 2006), que detectaram uma maior indução de enzimas xilanolíticas pelo fungo na presença de pectina. Esta diferença nos resultados pode estar relacionada com o indutor utilizado, uma vez que no trabalho desses autores foi utilizada pectina de maçã (*Pectin, from apple*) e xilana de bétula (*Xylan, from birchwood*) e neste trabalho utilizamos pectina de citrus (*pectin, from citrus fruit*) e xilana de faia (*Xylan, from beechwood*). Foi observada uma pequena atividade xilanolítica no controle negativo, sugerindo que mesmo na ausência do indutor as enzimas podem ser expressas pelo fungo. Este resultado está de acordo com o mecanismo de indução de xilanases, uma vez que estas enzimas expressas constitutivamente e com baixo nível de atividade são responsáveis por iniciar a hidrólise da xilana, produzindo pequenos xilo-oligossacarídeos, os quais entram na célula e atuam como indutores da síntese de enzimas com atividade de degradação da xilana (BIELY, 1985; KULKARNI *et al.*, 1999; POLIZELI *et al.*, 2005).

Podemos verificar que o cultivo com 1,0% de xilana após 30 dias de indução é o que apresenta maior atividade xilanolítica, apesar de inicialmente ser menor quando comparada com 0,5% de xilana. Assim, 1,0% de xilana foi a condição estabelecida para a indução de enzimas xilanolíticas e esta foi mantida para obtenção do extrato bruto utilizado nas etapas subsequentes deste trabalho.

TABELA 4.1: Atividade xilanólítica do extrato bruto dos cultivos (10^{-2} U.ml⁻¹).

Substrato	Tempo de cultivo (dias)		
	6	17	30
0,5% xilana	7,3 ± 0,7	7,6 ± 0,4	6,6 ± 0,3
1,0% xilana	3,2 ± 0,8	10,2 ± 1,2	13,2 ± 0,5
1,0% pectina	0	1,6 ± 0,7	7,2 ± 0,5
Sem indutor (controle)	--	--	3,1 ± 0,9

Para verificar as alterações do perfil proteico da cultura induzida com 1,0% de xilana (quando comparado com o controle, cultura sem indutor) após 30 dias de cultivo foi realizada a análise através de eletroforese em gel de tricina. A figura 4.2 ilustra o gel obtido onde pode ser observada alteração no perfil de bandas proteicas, tanto uma diminuição no número de bandas como um aumento na intensidade de algumas destas. Xilanases de fungos descritas na literatura têm massa molecular variando de 39 a 19 kDa (SAPAG, *et al.*, 2002).

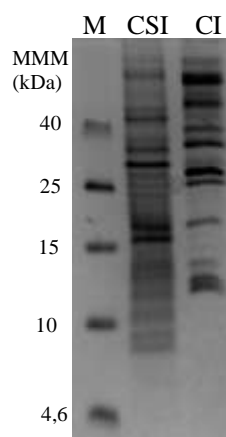


FIGURA 4.2: Análise em gel de tricina do perfil proteico das culturas sem (CSI) e com indução de 1% de xilana (CI) após 30 dias. M: padrão de massa molecular (Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder – Thermo). As amostras foram concentradas 10X antes de serem analisadas e o gel foi corado com prata.

4.1.2 Purificação do extrato bruto por cromatografia de troca iônica

O processo de purificação de xilanases do fungo *L. gongylophorus* foi iniciado com uma coluna *Hydroxyapatite type I* que tem caráter ácido e básico. Foi verificado que muitas das purificações de xilanases descritas na literatura iniciam com uma cromatografia de troca iônica e que não há um protocolo pré-estabelecido para este objetivo devido às características diferenciadas de cada enzima (Sá-Pereira *et al.*, 2003).

Após diálise e ressuspensão do extrato bruto em tampão, este foi aplicado na coluna *Hydroxyapatite* e a figura 4.3 ilustra o cromatograma característico obtido nesta cromatografia. As frações eluídas da coluna foram avaliadas através de atividade enzimática tendo sido encontrada atividade nas frações que não se ligaram à coluna (marcadas na figura 4.3 com *). As frações foram também analisadas em gel de tricina (figura 4.4) que mostrou uma purificação significativa nas frações ativas, tendo a presença de bandas correspondentes a proteínas de massa molecular de 38 a 12 kDa.

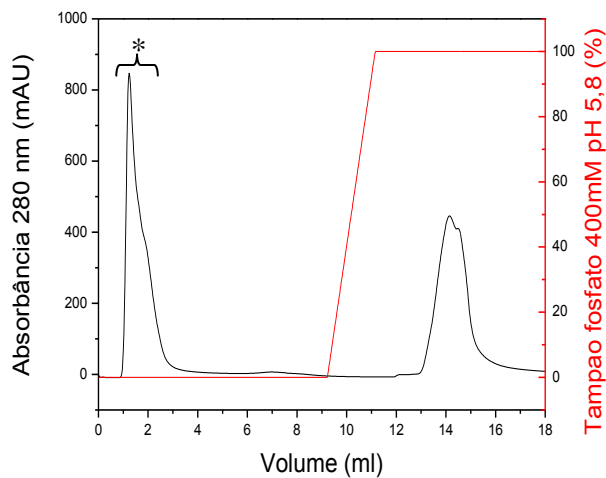


FIGURA 4.4: Cromatograma da coluna de troca iônica *Hydroxyapatite*. Em vermelho, gradiente de eluente (tampão fosfato 400mM pH 5,8). As frações marcadas com * no cromatograma indicam as frações que apresentaram atividade xilanolítica.

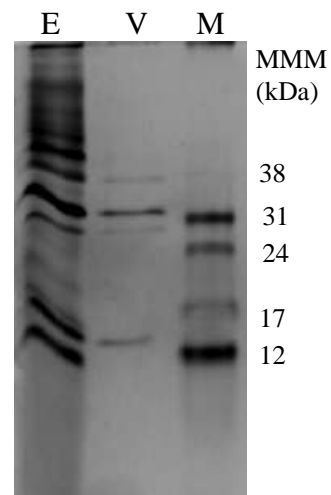


FIGURA 4.3: Análise em gel de tricina da cromatografia em *Hydroxyapatite*. E) amostra de extrato bruto – pré-coluna; V) *pool* das frações que apresentaram atividade xilanolítica; M) Padrão de massa molecular de baixo peso (Low-Range Rainbow Molecular Weight Marker- GE). As amostras foram concentradas 10X antes de serem analisadas e o gel foi corado com prata.

Esta etapa cromatográfica foi repetida cinco vezes e as frações com atividade xilanolítica foram reunidas e dialisadas contra tampão 20 mM acetato de sódio pH 4,8 e esta amostra foi aplicada em coluna de troca aniônica fraca DEAE FF. Foram observados dois picos correspondentes à proteínas com atividade xilanolítica, sendo um composto de frações que não se ligaram à coluna e o outro pico com frações que eluíram no gradiente salino (figura 4.5). Estas amostras foram então analisadas por eletroforese em gel de tricina (figura 4.6) que mostrou que a fração com atividade xilanolítica que não apresenta afinidade pela resina apresenta massa molecular aparente em torno de 38 kDa (*pool* contendo as frações 2 a 12 da cromatografia em DEAE FF-figura 4.5) e encontra-se com bom grau de

pureza. Esta proteína de aproximadamente 38kDa e isolada do extrato bruto foi denominada XyLg1. Como essa fração não se ligou na resina de troca aniônica em pH 4,8 é esperado que a proteína tenha carga líquida positiva nesse pH e a enzima XyLg1 deve ter um pI (ponto isoelétrico) maior do que 4,8.

As frações que interagiram com a matriz foram analisadas por eletroforese (figura 4.6). As frações 26 e 27 da cromatografia em DEAE FF-figura 4.5, apresentaram atividade xilanólica, mas não se encontram com elevado grau de pureza. Baseado nos testes de atividade foi determinado que a banda de aproximadamente 24kDa (figura 4.6) deve ser correspondente à xilanase. Esta enzima foi chamada XyLg2 e deve ter um pI menor do que 4,8, já que neste pH a enzima encontra-se carregada negativamente. Assim, a XyLg2 pode ser classificada com uma proteína ácida. O que está de acordo com dados da literatura, uma vez que xilanases nativas de *T. lanuginosus* normalmente possuem massa molecular variando de 22,5 a 29,0 kDa e pI entre 3,8 e 4,1(SINGH *et al.*, 2003).

A presença de múltiplas xilanases em um micro-organismo não é nenhuma novidade e isto provavelmente está associada ao fato das ligações xilosídicas nos materiais lignocelulósicos não serem equivalentes e igualmente acessíveis pelas enzimas xilanólicas (WONG *et al.*, 1988) A produção de um sistema de enzimas, onde cada enzima apresenta uma função especializada pode ser utilizada como uma estratégia dos micro-organismos em atingir elevados níveis de hidrólise da xilana (WONG *et al.*, 1988). Sendo que as enzimas isoladas podem apresentar desde diferentes valores de massa molecular e pI, até diferentes condições ótimas de ação, como pH, temperatura e afinidade ao substrato como descrito para duas xilanases majoritárias de *Trichoderma reesei* (TÖRRÖNEN *et al.*, 1992).

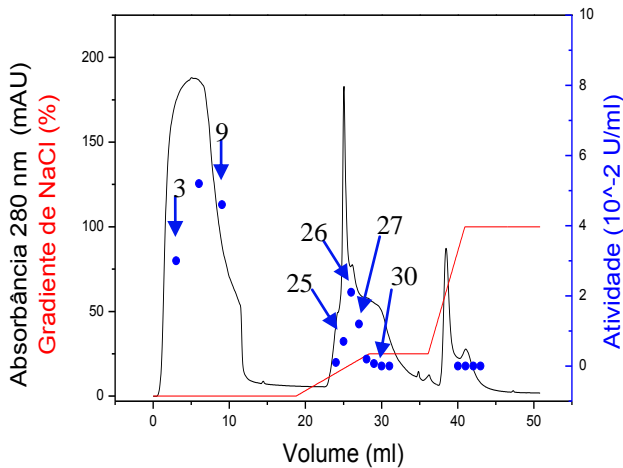


FIGURA 4. 6: Cromatografia em coluna de troca iônica DEAE FF das frações eluídas da coluna *Hydroxyapatite* com atividade xilanolítica. Em vermelho, gradiente de eluente (NaCl). Os pontos em azul representam as frações analisadas quanto à atividade xilanolítica. As setas em azul no cromatograma indicam as frações analisadas em gel de tricina.

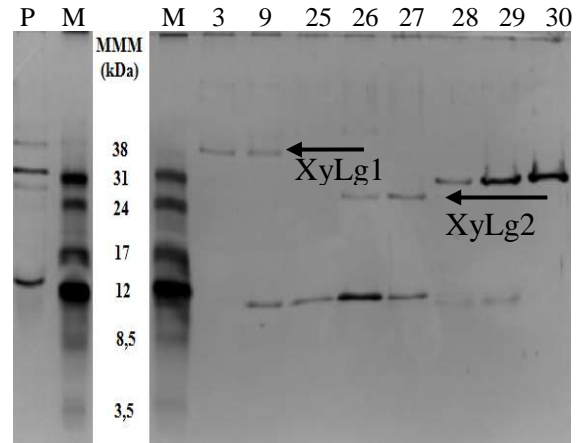


FIGURA 4. 5: Análise em gel de tricina das frações coletadas na cromatografia em DEAE FF. M) Padrão de massa molecular de baixo peso (GE); P) pré-coluna DEAE FF. Os números indicam as frações da saída da cromatografia na DEAE FF, mostradas no cromatograma da figura 4.5. As setas indicam as proteínas XyLg1 e XyLg2. As amostras foram concentradas 10X antes de serem analisadas e o gel foi corado com prata.

Os rendimentos para estas etapas de purificação foram calculados. Para isso, as frações contendo a XyLg1 com maior grau de pureza (fração 3 da figura 4.6) e as frações contendo a XyLg2 (frações 26 e 27 da figura 4.6) foram utilizadas para este fim. Na tabela 4.2 estão resumidos estes resultados, onde pode ser verificado um aumento da atividade específica após cada uma das etapas de purificação.

TABELA 4.2: Purificação das enzimas XyLg1 e XyLg2 nativas do fungo *L. gongylophorus*.

Amostra	Atividade total* (U.ml ⁻¹)	Concentração de proteína total (µg.ml ⁻¹)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)	Rendimento (%)	Purification fold
Extrato bruto (E)	0,4024	20,54	19,75	100	1,0
Pré-DEAE (P)	0,1283	2,85	45,72	31,9	2,3
XyLg1	0,0961	1,77	53,45	23,9	2,7
XyLg2	0,0763	0,96	86,14	19,0	4,4

*Ensaio de atividade utilizando xilana de faia (*beechwood xylan*).

E: Extrato bruto após liofilização e ressuspensão em tampão antes de aplicar na *Hydroxyapatite*.

P: pool das frações saídas da *Hydroxyapatite* com atividade xilanolítica e dialisadas, antes de iniciar a cromatografia em coluna DEAE FF.

Como apresentado anteriormente, a classificação de novas xilanases não é uma tarefa fácil, uma vez que o conhecimento de especificidade e de capacidade enzimática é necessário. Para isso foram iniciados os estudos de caracterização enzimática das enzimas isoladas.

4.1.3 Caracterização das xilanases XyLg1 e XyLg2

4.1.3.1 Determinação de pH e temperaturas ótimos para as xilanases XyLg1 e XyLg2

A atividade das enzimas, XyLg1 e XyLg2, em vários valores de pH foi acompanhada utilizando xilana de faia (*beechwood xylan*) como substrato, o qual foi preparado em tampão com diferentes valores de pH. Para isso, as amostras contendo as enzimas tiveram o tampão trocado por água e as amostras foram concentradas em concentrador centricon até a concentração de aproximadamente 7 a 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Curvas de atividade xilanolítica em função do pH para a enzima XyLg1 e para XyLg2 foram construídas e são mostradas na figura 4.7.

Para XyLg1 foi observado um amplo perfil de atividade de pH 2,2 a 11,5. A atividade máxima foi observada em pH 8,5, com um pico secundário de atividade em pH 10,5. Mais de 80% da atividade de XyLg1 foi mantida no intervalo de pH de 8,0 a 11,0. Têm sido descritas na literatura xilanases de outros organismos que apresentam dois picos de pH ótimos, como por exemplo para *Bacillus sp. Strain 41M-1* (NAKAMURA *et al.*, 1993) e *Streptomyces* (BRITO-CUNHA *et al.*, 2013). Segundo BRITO-CUNHA e colaboradores este fato tem sido associado à presença de isoformas. O alto valor de pH ótimo da XyLg1 é uma característica interessante, pois uma das mais importantes aplicações de xilanases é em indústrias de papel, quando são usadas como auxiliares no branqueamento de polpas Kraft (BEG *et al.*, 2001; POLIZELI *et al.*, 2005). Este processo industrial ocorre a altos valores de temperaturas e pH e as enzimas com aplicabilidade precisam ser ativas nestas condições.

O máximo de atividade observado para XyLg2 foi em pH 4,0 sendo que XyLg2 mantém atividade relativa de 90% mesmo a pH 2,0 o que confere a essa enzima uma interessante perspectiva para uso em alimento animal, pois para essa finalidade a enzima deve continuar ativa após passar através do estômago que apresenta pH baixo (em torno de 3,0) (AHMED *et al.*, 2009).

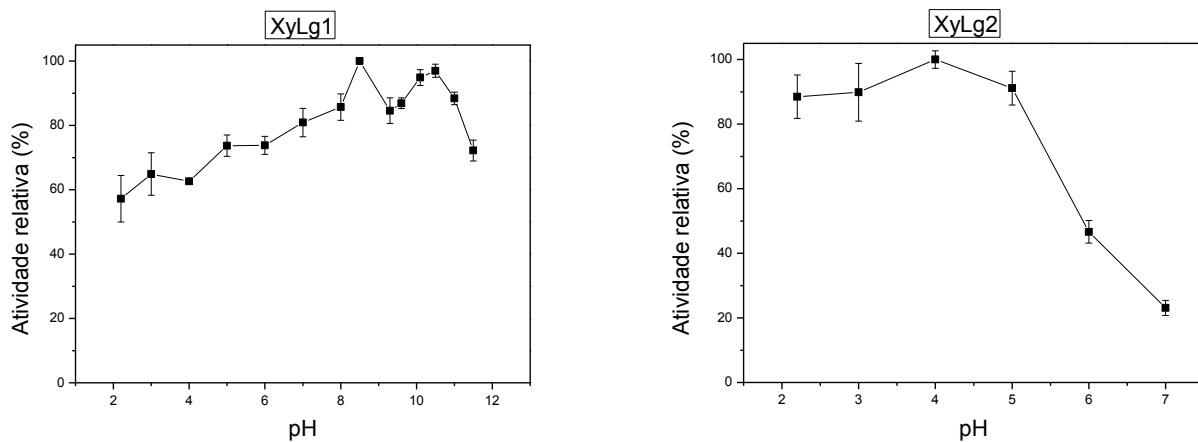


FIGURA 4.7: Curvas de atividade relativa em função do pH para as enzimas XyLg1 e XyLg2 utilizando xilana como substrato.

A temperatura ótima de ação de cada enzima foi determinada pela variação da temperatura no pH ótimo estabelecido para cada uma delas. A figura 4.8 mostra o resultado obtido para a XyLg1 (glicina–NaOH pH 8,5), onde foi observada atividade máxima da enzima a 40°C. Esse experimento foi feito em triplicata e devido ao estranho comportamento enzimático foi repetido em mais três ocasiões. Pode ser analisado que a enzima apresenta atividade relativa alta em um amplo intervalo de temperatura: mais de 80% de atividade entre 30-80°C. Este comportamento, mais uma vez remete à presença de isoformas, como sugerido na análise da atividade enzimática com a variação do pH. O fato das enzimas apresentarem elevada atividade relativa em baixas temperaturas (20-30°C) pode

corresponder ao fato da melhor condição de cultivo do *L. gongylophorus* ser à 25°C em estado estacionário (SILVA, A *et al.*, 2006). O processo de branqueamento nas indústrias de papel requer altas temperaturas (ao redor de 60°C) e portanto, a enzima XyLg1 apresenta potencial aplicação nesse processo, por apresentar maior atividade em altos valores de pH e temperatura.

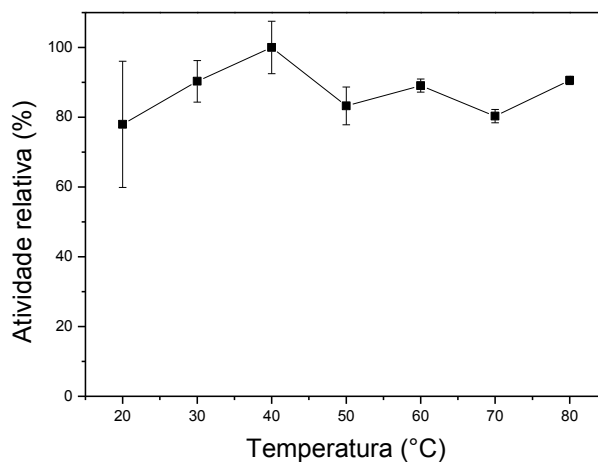


FIGURA 4.8: Curva de atividade relativa em função da temperatura para a enzima XyLg1 utilizando xilana como substrato.

A temperatura ótima de atividade enzimática da XyLg2 (McIlvaine pH 4,0) também foi avaliada, de maneira semelhante à XyLg1. Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 4.9, onde pode ser verificado que a enzima tem atividade xilanolítica máxima a 70°C e mantém em torno de 60% da atividade a de 20 a 40°C e a 80°C. Esta elevada temperatura ótima de atividade enzimática corresponde à temperatura de ótima de xilanases de fungos termófilos (crescimento ótimo de 50-80°C) (KULKARNI *et al.*, 1999; COLLINS *et al.*, 2005), que têm

tido bastante estudados como promissores produtores de enzimas termofílicas de potencial uso biotecnológico.

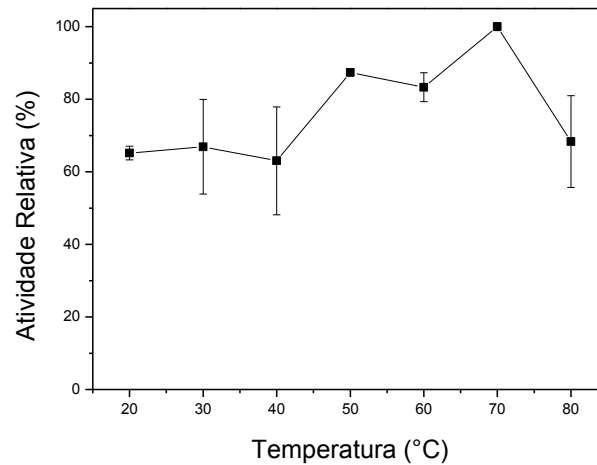


FIGURA 4.9: Curva de atividade relativa em função da temperatura para a enzima XyLg2 utilizando xilana como substrato.

4.1.3.2 Determinação dos parâmetros cinéticos para as enzimas XyLg1 e XyLg2

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram determinados para ambas as enzimas nas condições ótimas de pH e temperatura de cada uma, utilizando como substrato xilana de faia (*beechwood xylan*). Assim, os experimentos para a XyLg1 foram realizados em tampão glicina–NaOH pH 8,5 a 50°C e os da XyLg2 foram em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70°C. A tabela 4.3 mostra os valores dos parâmetros cinético obtidos para cada enzima.

TABELA 4. 3: Parâmetros cinéticos da XyLg1 e XyLg2.

Parâmetros	XyLg1	XyLg2
K_m (mg.ml ⁻¹)	14,7 ± 7,6	7,4 ± 2,0
$V_{máx}$ (μmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	87,4 ± 28,2	22,6 ± 1,8
$V_{máx}/K_m$	5,9	3,0

Os valores de K_m obtido para xilanases comumente são utilizados para correlacionar a afinidade destas enzimas ao substrato (KANG *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 2012). Assim os valores de K_m associado ao fato da XyLg1 apresentar elevada massa molecular (em torno de 38 kDa) e a XyLg2 baixa (em torno de 24 kDa) pode direcionar para uma possível classificação para destas enzimas.

Segundo descrito na literatura xilanases de elevada massa molecular normalmente são menos específicas e podem atuar sobre uma maior variedade de substrato, sendo encontradas na família das GH10 (BIELY *et al.*, 1997; COLLINS *et al.*, 2005). Entretanto as xilanases da família das GH11 apresentam menor massa molecular são descritas como “xilanases verdadeiras” devido a sua maior especificidade ao substrato e menor versatilidade catalítica que as GH10 (COLLINS *et al.*, 2005). Assim, devido a estas características a XyLg1 provavelmente poderá ser classificada com uma GH10 e a XyLg2 como pertencente à família das GH11.

4.1.3.2 Análise das enzimas isoladas através de espectrometria de massas (MS)

Para uma melhor identificação e caracterização das enzimas isoladas do fungo *L. gonylophorus* foi utilizada a técnica de espectrometria de massas sendo analisada a amostra referente à XyLg1 isolada do gel de poliacrilamida. A justificativa para utilizar amostra extraída do gel se baseia na elevada sensibilidade da técnica de análise e apesar da amostra estar com bom grau de pureza, apresenta de possíveis contaminantes, mesmo em baixas concentrações poderiam interferir nos resultados. A análise levou a identificação dos fragmentos mostrados na tabela 4.4.

TABELA 4.4: Peptídeos identificados por MS/MS da XyLg1.

Amostra	Técnica	Peptídeos
XyLg1	MALDI-TOF/TOF	ISMSGTFSNVKVLNSPAR GANIVFKNNHCSGGHGISVGSIN SGVTVNGITITGNTITNNDQALR
		FGVIIDQSYSTIGTPGSGVLLSAVNFVSPQT SITVNSGAERVAVNCGVGSCTGTWNWSNLK
	NanoLC-MS/MS	LYINDFNIEGTGAK

A busca no banco de dados mostrou que o fragmento identificado na análise por NanoLC-MS/MS apresenta 4% de identidade com a sequência (depositada no NCBI como gi|3123335) de uma xilanase do *Agaricus bisporus* (figura 4.10-A), um fungo da mesma família do *L. gonylophorus* (Agaricaceae).

Assim, este resultado identifica a XyLg1 como uma endo- β -1,4-xilanase pertencente à família das GH10, como sugerido anteriormente.

Entretanto a análise via MALDI-TOF/TOF para XyLg1 encontrou uma cobertura de 34% de identidade com a sequência de uma poligalacturonase (depósito no NCBI como gi|317468146) de *L. gongylophorus* (figura 4.10-B), que é um resultado inesperado uma vez que a enzima isolada tem atividade xilanolítica. Duas hipóteses podem ser levantadas: a primeira é o fato de a amostra ser constituída de mistura de duas enzimas (poligalacturonase e xilanase) de mesma massa molecular e a outra baseia-se no fato de a enzima ser bifuncional, isto é, a enzima possui duas capacidades catalíticas distintas na mesma cadeia polipeptídica com domínios para atividade poligalacturonase e xilanase.

Na literatura o surgimento de enzimas multifuncionais ao longo da evolução foi identificado como uma combinação de genes que codificam para enzimas que apresentam forte correlação com relação à funcionalidade (YOURNO *et al.*, 1970). A multifuncionalização de certas enzimas para hidrolisar diferentes tipos de substrato auxilia na degradação da parede celular de planta, embora esta funcionalização das proteínas seja comum em sistemas vivos sua significância ainda não é clara e os mecanismos de ação destes sistemas complexos ainda não foram elucidados (KHANDEPARKER & NUMAN, 2008).

Com relação à aplicabilidade, a associação de enzimas em complexos bi/multifuncionais fornece várias vantagens, principalmente com relação às aplicações no setor industrial, que vão desde a utilização destas enzimas na indústria alimentícia até a obtenção de etanol de segunda geração a partir de materiais lignocelulósicos, onde os gastos com enzimas pode ser um dos gargalos do processo (KHANDEPARKER & NUMAN, 2008).

Na literatura existem diversos relatos de enzimas bifuncionais nativas com atividade xilanolítica, são elas xilanase-celulase, xilanase-arabinosidase, xilanase-deacetilase, xilanase-xilanase e até mesmo trifuncionais com atividade

xilanase-endoglucanase-celulobiohidrolase como discutido por KHANDEPARKER & NUMAN (2008). Embora não tenha relato na literatura de enzima bifuncional xilanase-poligalacturonase não descartamos esta possibilidade, pois o surgimento destas enzimas está associado à semelhança ao substrato de ação destas enzimas, o que justifica esta hipótese.

A)

1 MYLVAFMLLA ILPTGYCQLN TLAVRAGKKY FGTATDNPEL GDAPYVAQLG
 51 NTADFNQITA GNSMKWDATE PSRGTFTFSN GDTVANMARN RGQLLRGHTC
 101 VWHSQLPNWV TSGNFDNSTL LSIVQNHCSST LVSHYRGQMY SWDVVNEPFN
 151 EDGSFRQSVF FQKTGTAYIA TALRAARNAD PNTKLYINDF NIEGTGAKST
 201 GMINLVRSLQ QQNVPIDGIG VQAHLIVGQI PSSIQQLQN FANLGVEVAI
 251 TELDIRMTLP VTQKLEQQQ EDYRTVIRAC KAVSRCVGVT VWDWTDRYSW
 301 VPGVFNGEGA ACPWDENLAK KPAYQGIVDG WSQ

B)

1 MWTRFLSLLV LVVSGYASSD CTGTINSMAD VAAAVACTTV NLNSFQVPAG
 51 QTLALKLLTG TTVNMNGDIT FAHENWAGPL FQISGSSITF NGNGHTFDGN
 101 GPLYWDGLGG NGGVTKPAPM MKISMSGTFS NVKVLNSPAR TYSVSNPAPL
 151 VMDGLTIDNS LGDQPNSNSN GLAAGHNTDG FFASTENLTI QNSVIMNQDD
 201 CLAINRGANI VFKNNHCSGG HGISVGSINS GVTVNGITIT GNTITNNDQA
 251 LRIKTDAAT GSTVTNITYS GNTATGCKRF GVIIDQSYPSTIGTPGSGVL
 301 LSAVNFVSPQ TSITVNSGAE RAVVNCVGS CTGTWNWSNL KVSGGTTGKI
 351 TNFNGITGFS Q

FIGURA 4.10: Análise dos fragmentos dos peptídeos obtidos por espectrometria de massas. A) Sequência da endo-β-1,4-xilanase do *A. bisporus* (gi|3123335) e B) Sequência da polygalacturonase (PG) do *L. gongylophorus* (gi|317468146). Em vermelho estão indicados os peptídeos encontrados para a XyLg1 por espectrometria de massas.

Entretanto ao realizar a análise *in silico* das duas enzimas maduras identificados por espectrometria de massas verificamos que a xilanase do *A. bisporus* (gi|3123335) apresenta massa molecular de 34,9 kDa e a poligalacturonase do *L. gongylophorus* (gi|317468146) 35,1 kDa reforçando a hipótese de se tratar de uma amostra constituída de mistura das duas enzimas, uma vez que esta variação de massa molecular dificilmente podem ser verificadas como bandas isoladas em gel de tricina. Além disso, baseado nas características físico-químicas das proteínas foi observado que ambas apresentam pI teórico próximos (5,98 para a xilanase e 5,63 para a poligalacturonase), assim a análise em gel bidimensional não será efetiva, pois a separação em dois *spots* correspondentes a cada uma das enzimas também será de difícil obtenção.

A amostra de XyLg2 não foi avaliada por espectrometria de massas até o momento.

4.1.3.3 Caracterização da XyLg1 frente ao substrato ácido poligalacturônico

Como o resultado de espectrometria de massas mostrou que a amostra XyLg1 apresenta identidade com poligalacturonase do fungo *L. gongylophorus* a atividade desta fração purificada foi avaliada frente ao substrato ácido poligalacturônico. Para isso o método dos açúcares redutores foi novamente utilizado e os dados obtidos foram comparados com uma curva padrão de ácido galacturônico. A atividade da amostra foi de aproximadamente 35 U.mg⁻¹, sendo U definido como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de grupos redutores por minuto. O mesmo experimento foi realizado com a XyLg2 e esta enzima não apresentou atividade frente ao ácido poligalacturônico.

A atividade de hidrólise do ácido poligalacturônico foi avaliada em vários valores de pH. Na figura 4.11-A a curva de pH mostra um pH ótimo em

torno de 5,5, sendo que mais de 80% da atividade é mantida entre pH 4,5 e 5,0. A temperatura ótima de ação da enzima utilizando ácido poligalacturônico em pH 5,5 foi observada entre 50 e 60°C (figura 4.11-B), mantendo em torno de 70% da atividade em 70°C.

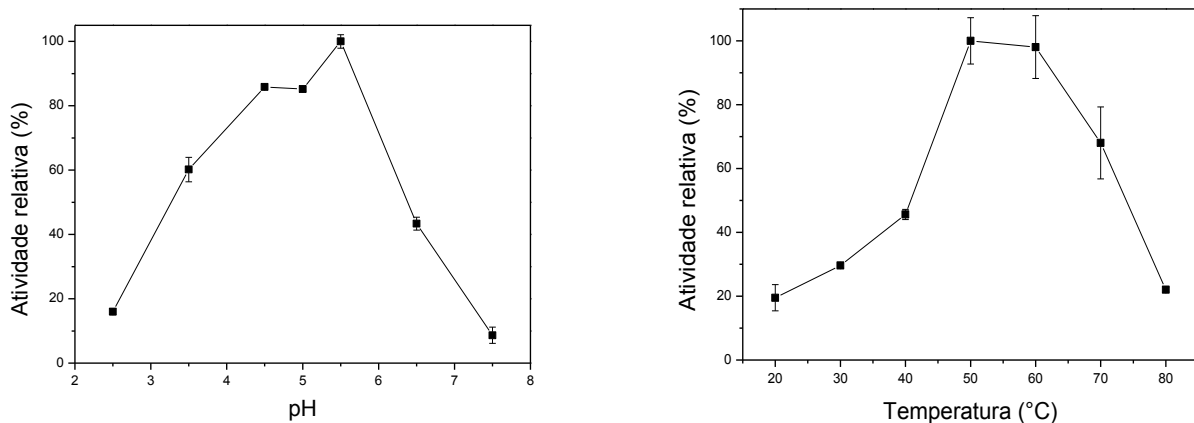


FIGURA 4.11: Curvas de pH e temperatura para a enzima XyLg1 utilizando ácido poligalacturônico como substrato. A) Curva da atividade relativa em função do pH utilizando ácido poligalacturônico como substrato para a XyLg1. B) Curva de atividade relativa em função da temperatura utilizando ácido poligalacturônico como substrato para a XyLg1.

Os experimentos para calcular os parâmetros cinéticos foram realizados em pH 5,5 e 50°C. Os valores obtidos para esta enzima foram K_m igual a $2,2 \pm 0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ e $V_{m\acute{a}x}$ $138,6 \pm 16,0 \text{ }\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. O valor de K_m encontra-se acima dos valores relatados para outras poligalacturonases descritas na literatura que apresentam valores na faixa de 0,24 a $1,87 \text{ mg.ml}^{-1}$ (XIAO *et al.*, 2008).

Estudos recentes (ADALBERTO *et al.*, 2012; GOLFETO, 2013) mostram que uma poligalacturonase foi isolada de cultivo de *L. gongylophorus* através de duas etapas de purificação que consistem em uma precipitação com

sulfato de amônio (30-70% de saturação) seguida de uma cromatografia de exclusão molecular (superdex 75). A enzima isolada por esta metodologia apresenta massa molecular aparente em torno de 31 kDa, pH ótimo em 5,0, temperatura ótima em 60°C, K_m $0,5 \pm 0,05 \text{ mg.ml}^{-1}$ e $V_{m\acute{a}x}$ $5,2 \pm 0,1 \text{ }\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{ml}^{-1}$. Baseados nas diferentes massas moleculares e nos parâmetros cinéticos podemos inferir que se trata de duas enzimas diferentes. Na tabela 4.5 estão compilados os valores de pH e temperatura ótimos, assim como os parâmetros cinéticos para as enzimas XyLg1 e XyLg2 utilizando xilana e ácido poligalacturônico como substrato e para a poligalacturonase (PG) deste mesmo micro-organismo descrita na literatura.

TABELA 4. 5: Parâmetros cinéticos, pH ótimo e temperatura ótima para as enzimas isoladas neste trabalho e descritas na literatura.

Amostra	Substrato	K_m (mg.ml^{-1})	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)
XyLg1	Xilana	$14,7 \pm 7,6$	$87,4 \pm 28,2$	8,5	40
XyLg2		$7,4 \pm 2,0$	$22,6 \pm 1,8$	4,0	70
XyLg1	Ác. poligal.	$2,2 \pm 0,5$	$138,6 \pm 16,0$	5,5	50
PG ¹		$0,5 \pm 0,05$	$5,2 \pm 0,1$	5,0	60

¹Dados para uma poligalacturonase (PG) do fungo *L. gongylophorus* – ADALBERTO *et al.*, 2012; GOLFETO, 2013.

4.2 Estudos com a enzima recombinante

Neste capítulo são mostrados e discutidos os resultados obtidos nos experimentos realizados com o objetivo de obtenção de uma xilanase recombinante do fungo *L. gongylophorus*, aqui denominada LgXyn2. Até este momento não foi possível correlacionar a LgXyn2 com as duas enzimas nativas isoladas, de modo que esta pode ser considerada uma terceira enzima com atividade xilanolítica deste micro-organismo.

Até o momento havia uma sequência de DNA codificante para a síntese de uma xilanase do fungo *L. gongylophorus*, cujos dados estão depositados no banco de *GenBank*, sob o número de acesso EF208066. Esta enzima mostrou atividade para degradação de xilana e foi chamada pelos autores de LgXyn1 (SCHIØTT *et al.*, 2008). A partir da sequência depositada foi realizada a análise *in silico* desta proteína e foi verificado que esta possui 234 resíduos de aminoácidos, massa molecular estimada de 25155,5 Da e pI 6,55 (ProtParam *tool*). Foi previsto para esta sequência um peptídeo sinal na porção N-terminal, que segundo o software Signal.P 4.0 deve ser reconhecido tanto por eucarioto como por bactéria *gram* negativas, levando ao processamento entre os resíduos de aminoácidos 21 e 22 ao ser secretada para o meio extracelular. Após este processamento a proteína madura passa a ter 213 resíduos de aminoácidos, massa molecular estimada de 22947,8 Da e pI 5,74. Além destas características também devemos levar em consideração que a proteína, por ser naturalmente secretada por um micro-organismo eucarioto, pode sofrer processamento pós-traducional, como glicosilação. A predição dos sítios de N- e O- glicosilação foi realizada, sendo que a proteína madura apresenta 4 possíveis sítios de N-glicosilação (²⁵NTTE²⁸, ⁷⁵NWSG⁷⁸, ¹³⁵NPSS¹³⁸ e ¹⁶⁷NGTQ¹⁷⁰) e dois de O-glicosilação (²⁷Thr e ²³²Thr), como pode ser verificado na figura 4.12.

MV**S**FIF**T**RIILFAAAINGAVALPM**NTTE**PEDF**S**
 ILSRSGT**P**SS**T**GY**S**NGY**Y**YS**W**WT**D**GA**A**Q**A**TY**A**
 N**G**GGG**G**Q**Y**SL**NWSG**N**N**GN**L**V**G**G**K**G**W**NP**G**F**N**G
 R**V**I**Q**Y**S**G**T**Y**Q**P**N**G**N**S**Y**L**S**V**Y**G**W**T**L**N**P**L**I**E**Y**Y**I**V
 E**S**Y**G**S**Y****NPS**S**A**A**A**R**K**G**S**V**N**C**D**G**A**N**Y**D**I**L**T**T**T**R
 Y**N**E**P**S**I****NGTQ**T**F**Q**Q**F**W**S**V**R**N**P**K**K**N**P**G**G**S**I**S**G**S**V
 S**T**G**C**H**F**T**A**W**G**N**L**G**M**N**L**G**S**T**W**N**Y**Q**I**V**A**T**E**G**Y**Q
 S**S**G**F**S**S**I**T**V**A** Stop

FIGURA 4.12: Sequência de resíduos de aminoácidos da LgXyn1 (SCHIØTT et al., 2008). Os resíduos de aminoácidos destacados em negrito indicam um possível peptídeo sinal para secreção extracelular. Os resíduos sublinhados em vermelho indicam possíveis sítios de N-glicosilação e os destacados em amarelo estão os possíveis sítios de O-glicosilação.

Assim, esta sequência foi utilizada no desenho de oligonucleotídeos para amplificação por PCR do DNA codificante da xilanase e era prevista a obtenção de uma xilanase com as características descritas acima, idênticas às LgXyn1.

Extração de RNA total do fungo *L. gongylophorus* e obtenção de cDNA

A extração do RNA total foi realizada a partir de massa do micélio do fungo. Como o RNA sofre degradação facilmente várias tentativas de extração deste material foram realizadas até a obtenção de um RNA íntegro. A extração do RNA total foi realizada utilizando o micélio do fungo e TRIzol[®], como sugerido

pelo fabricante. A amostra foi analisada quanto a sua integridade/qualidade por gel de agarose 1% (figura 4.13). Pode ser verificado que a extração resultou em produtos parcialmente íntegros, onde são observadas as bandas correspondentes às frações de RNA ribossômico 28S e 18S, indicando que os mRNAs (não visualizados) não estão degradados.

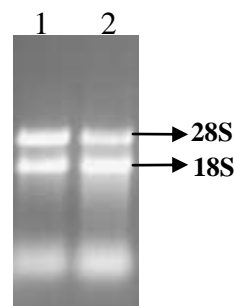


FIGURA 4.13: Análise da qualitativa das amostras de RNA total por eletroforese em gel de agarose 1%. 1 e 2: RNA íntegro mostrando as bandas correspondentes às frações de RNA ribossômico 28S e 18S.

A amostra de RNA foi quantificada com base nos valores das absorvâncias a 230, 260 e 280 nm e nas relações A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} (tabela 4.6). Um RNA pode ser considerado puro, livre de proteínas, se $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ (SAMBROOK & RUSSELL, 2001), como o valor obtido para esta relação foi de 2,19 esta amostra foi utilizada para a síntese do cDNA.

TABELA 4.6: Valores e médias de A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} e concentrações das amostras de RNA total.

	Absorbância		Concentração ($\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)
	260/280	260/230	
RNA extraído	2,19	1,00	840,95

O RNA total foi utilizado como molde para a síntese de cDNA. É importante lembrar que o cDNA irá conter apenas sequências codificantes dos genes expressos naquele tipo celular específico (MICKLOS, FREYER & CROTTY, 2005); por esta razão foi de fundamental importância verificar a atividade xilanolítica dos extratos de *L. gongylophorus* induzido com xilano antes de realizar a extração de RNA.

Amplificação por PCR da sequência que codifica para a síntese da xilanase (*xyl*) do fungo *L. gongylophorus*

A sequência (*xyl*) que codifica para a síntese da xilanase do fungo *L. gongylophorus* foi amplificada através de PCR utilizando o cDNA como molécula molde e os oligonucleotídeos descritos na tabela 3.1. Na figura 4.14 verificamos a amplificação por PCR de um fragmento de DNA com massa molecular aparente em torno de 600 bp. Este valor é próximo ao esperado uma vez que a sequência depositada apresenta 633 bp.

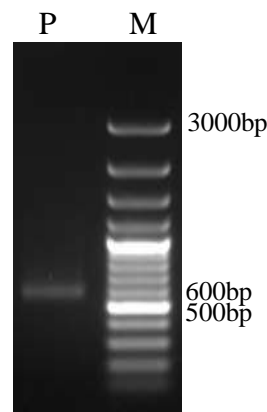


FIGURA 4.14: Análise em gel de agarose 1% do DNA amplificado por PCR. M: Marcador de massa molecular O'Gene Ruler™ 100 bp Plus *DNA Ladder* (Thermo Scientific); P: produto da amplificação utilizando a *Pfu* DNA polimerase e cDNA como molde na reação de PCR.

Assim, o DNA amplificado por PCR este foi submetido à reação de poliadenilação, pois devido à atividade exonucleásica $3' \rightarrow 5'$ da enzima *Pfu* DNA polimerase são geradas extremidades cegas durante a amplificação por PCR, diferentemente de produto amplificado com *Taq* DNA polimerase que por possuir apenas atividade exonucleásica $5' \rightarrow 3'$, gera uma calda poliA na extremidade $3'$. O DNA adenilado foi clonado no vetor de clonagem *pGEM[®]-T Easy* na presença de T4 DNA ligase. A clonagem foi identificada inicialmente por um *screening* de coloração, pois a ORF inserida no vetor *pGEM[®]-T Easy* interrompe a sequência que codifica para a β -galactosidase (gene *lacZ*), levando a obtenção de colônias brancas quando semeadas em meio contendo IPTG e X-Gal (mimetiza o substrato normal para a β -galactosidase).

A confirmação da clonagem foi realizada por PCR e por restrição enzimática (dados não apresentados). Os clones positivos foram analisados por sequenciamento. Na figura 4.15 mostramos o sequenciamento dos resíduos de

nucleotídeos da ORF amplificada e alinhada com a sequência de resíduos de nucleotídeos esperada para a LgXyn1 madura (sem sequência codificadora para o peptídeo sinal). Neste alinhamento podemos verificar que o gene *xyl* apresenta 578 bp, uma diferença de 55 resíduos de nucleotídeos do esperado para a sequência da LgXyn1 madura (633 bp).

```

LgXyn1_SCHIØTT      ATGAACACCACCGAACCAGAGGACTTCAGCATTCTTCCCGCTCTGGAACACCAAGTCT 60
xyl                  ATGAACACCACCGAACCAGAGGACTTCAGCATTCTTCCCGCTCTGGAACACCAAGTCT 60
*****

LgXyn1_SCHIØTT      ACTGGGTACTCTAACGATACTACTATTCTTGGTGGACGGACGGTGCCGCTCAGGCCACC 120
xyl                  ACTGGGTACTCTAACGATACTACTATTCTTGGTGGACGGACGGTGCCGCTCAGGCCACC 120
*****

LgXyn1_SCHIØTT      TACGCCAACGGTGGAGGTGGTCACTATAGCCTCAACTGGTCAGGTAACAACGGTAACCTC 180
xyl                  TACGCCAACGGTGGAGGTGGTCACTATAGCCTCAACTGGTCAGGTAACAACGGTAACCTC 180
*****

LgXyn1_SCHIØTT      GTCGGTGGGAAAGGATGGAACCCGGGCTTTAATGGCAGAGTGATCCAGTACAGCGGTACT 240
xyl                  GTCGGTGGGAAAGGATGGAACCCGGGCTTTAGTGGCAGAGTGATCCAGTACAGCGGTACT 240
*****

LgXyn1_SCHIØTT      TACCAGCCTAACGGGAACAGTTACCTTTCGTCTATGGCTGGACACTGAACCCCTCTCATC 300
xyl                  TACCAGCCTAACGGGAACAGTTACCTTTCGTCTATGGCTGGACACTGAACCCCTCTCATC 300
*****

LgXyn1_SCHIØTT      GAGTACTATATCGTCGAGTCCTACGGTTCCTACAATCCCTCCTCCGCTGCCGCGAGGAAG 360
xyl                  GAGTACTATATCGTCGAGTCCTACGGTTCCTACAATCCCTCCTCCGCTGCCGCGAGGAAG 347
*****

LgXyn1_SCHIØTT      GGGTCTGTGAACTGTGACGGTGTAACTACGACATCCTCACCACCACGCGCTACAACGAA 420
xyl                  -----ACCACGCGCTACAACGAA 365
*****

LgXyn1_SCHIØTT      CCATCTATTAATGGCAGCAGACTTCCACAGTTCTGGTCTGTCCGCAACCCCAAAAAG 480
xyl                  CCATCTATTAATGGCAGCAGACTTCCACAGTTCTGGTCTGTCCGCAACCCCAAAAAG 425
*****

LgXyn1_SCHIØTT      AACCCGGGAGGATCTATCAGTGGCAGTGTAGTACCGGATGCCACTTTACTGCCTGGGGG 540
xyl                  AACCCGGGAGGATCTATCAGTGGCAGTGTAGTACCGGATGCCACTTTACTGCCTGGGGG 485
*****

LgXyn1_SCHIØTT      AATTTAGGGATGAATTTGGGTCCACTTGGAACACCAGATTGTTGCAACTGAAGGTTAT 600
xyl                  AATTTAGGGATGAATTTGGGTCCACTTGGAACACCAGATTGTTGCAACTGAAGGTTAT 545
*****

LgXyn1_SCHIØTT      CAGAGCAGCGGTTTCTCTAGTATCACCGTCGCT 633
xyl                  CAGAGCAGCGGTTTCTCTAGTATCACCGTCGCT 578
*****
    
```

FIGURA 4.15: Alinhamento entre as sequências de resíduos de nucleotídeos da ORF *xyl* e da LgXyn1 madura.

Ao realizar a tradução *in silico* da sequência *xyl* observamos o deslocamento de uma trinca de resíduos de nucleotídeos o que leva à obtenção de uma proteína conservada na porção N-terminal, sendo observadas variações na

porção C-terminal (figura 4.16) quando comparada com a sequência da LgXyn1. Além disso, também foi observada a formação de um *stop codon*, levando à obtenção de uma ORF com 163 resíduos de aminoácidos e massa molecular estimada de 17764,3Da, enquanto esperávamos uma proteína com 211 resíduos de aminoácidos com massa molecular estimada de 22947,8 Da. Esta nova sequência de polipeptídica foi denominada aqui de LgXyn2.

Foi realizada também a predição dos sítios de N- e O- glicosilação para esta nova sequência. A proteína LgXyn2 apresenta quatro possíveis sítios de N-glicosilação (²NTTE⁵, ⁵²NWSG⁵⁵, ¹¹²NPSS¹¹⁵ e ¹³²NSSG¹³⁵) e seis de O-glicosilação (³Thr, ⁴Thr, ¹⁰Ser, ¹³⁹Thr, ¹⁴³Thr e ¹⁵⁷Thr). Na figura 4.16 podem ser verificadas as alterações no padrão de glicosilação para esta nova enzima.

```

LgXyn1_SCHIØTT      MNTTEPEDFSILSRSGTPSSTGYSNGYYSWWTDGAAQATYANGGGQYSLNWSGNNGNL 60
LgXyn2              MNTTEPEDF5ILSRSGTPSSTGYSNGYYSWWTDGAAQATYANGGGQYSLNWSGNNGNL 60
*****

LgXyn1_SCHIØTT      VGGKGNPFGFNGRVIQYSGTYQPNGNSYLSVYGWTLNPLIEYYIVESYGSYNPSSAARK 120
LgXyn2              VGGKGNPFGFNGRVIQYSGTYQPNGNSYLSVYGWTLNPLIEYYIVESYGSYNPSSAPRAT 120
*****

LgXyn1_SCHIØTT      GSVNCDGANYDILTTTRYNEPSI112NGTQTFQQFWSVRNPKKNPGGSISGSVSTGCCHFTAWG 180
LgXyn2              -----TNHLLMARRLS112NSSGLSAT115P-----KR115REDP-----SVAV----- 151
          *:  ::  *.....*          :.....*          **:..

LgXyn1_SCHIØTT      NLGMNLGSTWNYQIVATEGYQSSGFSSI211TVA 211
LgXyn2              -----LVPDA163LLPGGI----- 163
          :*.      ..*:
    
```

FIGURA 4.16: Alinhamento entre as sequência de resíduos de aminoácidos de LgXyn1 (SCHIØTT et al., 2008) e LgXyn2 (este trabalho). A LgXyn2 apresenta em torno de 57% de identidade com a LgXyn1. Os resíduos sublinhados em vermelho indicam possíveis sítios de N-glicosilação e os destacados em amarelo estão os possíveis sítios de O-glicosilação.

Como a classificação destas enzimas leva em consideração a similaridade dos domínios catalíticos, a LgXyn2 pode ser classificada como uma endo-β-1,4-xilanase pertencente à família das GH11. Esta família é composta por

enzimas, tanto de eucarioto, como de bactérias que são altamente específicas e de baixa massa molecular, na qual a identidade das sequências varia de 40 a 90% (TÖRÖNEN & ROUVINEN, 1997).

Micro-organismos normalmente expressam mais de um tipo de xilanases, enzimas sintetizadas por um mesmo micro-organismo, como é o caso da XYNI e XYNII do *T. reesei* apresentam em torno de 50% de identidade (TÖRÖNEN & ROUVINEN, 1995). Com os resultados obtidos mostramos que a LgXyn2 por ser uma sequência obtida a partir de mRNA do *L.gongylophorus* e apresentar 57% de identidade com a LgXyn1 corresponde a uma outra enzima produzida pelo mesmo fungo.

Com o objetivo de identificar os domínios conservados da LgXyn2 com relação às xilanases da família das GH11 foi realizado o alinhamento desta sequência de aminoácidos com mais 12 enzimas de fungos pertencentes a esta mesma família (tabela 4.7). Dentre elas 5 apresentam estrutura resolvida, 8 são enzimas nativas e 1 é um fungo termofílico (tabela 4.7).

TABELA 4. 7: Principais características de sequências conhecidas de xilanases da família GH11.

Organismo	Nome da xilanase	UniProt ID ^c	Massa molecular (kDa) ^d	pI	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Referências
<i>Aspergillus kawachii</i>	XYLB (<i>Nat</i>) ^b	P48824	22,2	4,4	4,5	55	ITO <i>et al.</i> , 1992b
<i>Aspergillus kawachii</i> ^a	XYLC (<i>Nat</i>)	P33557	19,9	3,5	2,0	50	ITO <i>et al.</i> , 1992a
<i>Aspergillus niger</i> ^a	XYLA (<i>Rec</i>)	P55329	19,9	3,7	3,0	-	KRENGEL & DIJKSTRA, 1996
<i>Aspergillus niger</i>	XYN5 (<i>Rec</i>)	Q12549	22,8	-	4,0	60	LUTTING <i>et al.</i> , 1997
<i>Aspergillus awamori</i>	EXLA (<i>Nat</i>)	P55328	19,9	3,7	3,5	50	HESSING, <i>et al.</i> , 1994
<i>L. gongylophorus</i>	LgXyn1	A6YAP7	22,9	-	-	-	SCHIØTT <i>et al.</i> , 2008
<i>L. gongylophorus</i>	LgXyn2	_____	17,7	-	-	-	Este trabalho
<i>Penicillium sp. 40</i>	XYNA (<i>Rec</i>)	Q9UUQ2	24,1	4,7	2,0	50	KIMURA <i>et al.</i> , 2000
<i>Schizophyllum commune</i>	XYNA (<i>Nat</i>)	P35809	20,9	4,5	5,0	50	OKU <i>et al.</i> , 1993
<i>Trichoderma Reesei</i> ^a	XYNI (<i>Nat</i>)	P36218	19,0	5,2	3-4	-	TÖRRÖNEN <i>et al.</i> , 1992
<i>Trichoderma Reesei</i> ^a	XYNII (<i>Nat</i>)	P36217	21,0	9,0	5-5,5	-	TÖRRÖNEN <i>et al.</i> , 1992
<i>Trichoderma Reesei</i>	XYN2 (<i>Rec</i>)	Q99015	27,0	-	6,0	60	La GRANGE <i>et al.</i> , 1996
<i>Thermomyces lanuginosus</i> ^a	XYNA (<i>Nat</i>)	O43097	21,3	4,1	6,5	65	GOMES, <i>et al.</i> , 1993; SCHLACHER, <i>et al.</i> , 1996.

^a os organismos em negrito apresentam estrutura resolvida.^b *Nat* ou *Rec* indica que as propriedades listadas correspondem à enzima nativa ou recombinante, respectivamente.^c www.uniprot.org^d A massa molecular foi calculada com base na sequência de aminoácidos e não considera o peptídeo sinal, quando presente.

A figura 4.17 representa o alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos das enzimas selecionadas. Neste experimento foi realizado o alinhamento com sequências maduras das enzimas, ou seja, as sequências depositadas foram analisadas quanto à presença do peptídeo sinal, utilizando o software Signal.P 4.0, sendo este eliminado quando presente.

No topo do alinhamento (figura 4.17) estão representados os elementos de estrutura secundária observada na estrutura da XYNII do *T. reesei* (TÖRRÖNEN *et al.*,1994). E estes elementos são mostrados na figura 4.18 (TÖRRÖNEN & ROUVINEN, 1997).

Podemos verificar que a região N-terminal possui uma maior divergência nesta família (TÖRRÖNEN & ROUVINEN, 1997). O sítio catalítico é localizado em uma fenda, o qual correlaciona bem com a atividade endo desta classe de enzimas (TÖRRÖNEN & ROUVINEN, 1997). Dois resíduos glutâmicos (E) estão localizados em lados opostos na fenda catalítica e estes correspondem aos resíduos catalíticos (TÖRRÖNEN *et al.*,1994), em negrito e destacado em amarelo na figura 4.17. O primeiro resíduo (elemento B6 da estrutura secundária) atua como um nucleófilo e seu ambiente hidrofílico é mais conservado que o do segundo resíduo (elemento B4 da estrutura secundária), que atua como um catalisador ácido base (TÖRRÖNEN & ROUVINEN, 1997). Para a sequência obtida para a LgXyn2 o segundo resíduo corresponde ao ácido aspártico (D), que apresenta as mesmas propriedades que o ácido glutâmico, assim mesmo com esta alteração pode ser que a atividade da enzima seja mantida.

Os resíduos de tirosina (Y) conservados próximo ao resíduo nucleofílico (destacados em azul) auxiliam a manter o ambiente hidrofílico, o que pode ajudar a manter o nucleófilo ionizado (TÖRRÖNEN & ROUVINEN, 1997). Além disso, dentre estes o segundo resíduo Y conservado em todas as xilanases

atua como estabilizante de carga formando uma ligação entre os resíduos catalíticos em momentos diferentes durante o rompimento da ligação glicosídica (TÖRÖNEN & ROUVINEN, 1997).

Na literatura vem sendo reportado um número elevado de enzimas que apresentam pH ótimo em baixos valores de pH, denominadas enzimas acidofílicas (SAPAG *et al.*, 2002). Existe um postulado que apresenta uma boa correlação para o pH ótimo destas enzimas, segundo este os resíduos espacialmente adjacentes ao glutamato catalítico ácido/base influencia no pH ótimo das enzimas (TÖRÖNEN & ROUVINEN, 1995). São estes os resíduos de asparagina (N) ou aspartato (D) conservados próximo ao elemento estrutural B3 (destacados em vermelho na figura 4.17). Quando as enzimas possuem o resíduo D apresentam pH ótimo abaixo de 5 e quando apresentam o resíduo N, na mesma posição, o pH ótimo é de 5 ou mais (TÖRÖNEN & ROUVINEN, 1997). Assim LgXyn1 e LgXyn2 devem apresentar pH ótimo maior ou igual a 5, por possuírem o resíduo N.

Estudos mostraram que estas enzimas apresentam quatro regiões com elevada homologia, correspondente aos elementos B5, B6, B8 e a α -hélice na região C-terminal (SAPAG *et al.*, 2002). A LgXyn2 não apresenta a região correspondente à α -hélice e até o momento não foi encontrado na literatura enzimas com deleções nesta região.

Com base na conservação dos resíduos responsáveis pela atividade enzimática das GH11, continuamos os experimentos com a LgXyn2 para verificar se esta sequência codifica para a síntese de uma enzima funcional.

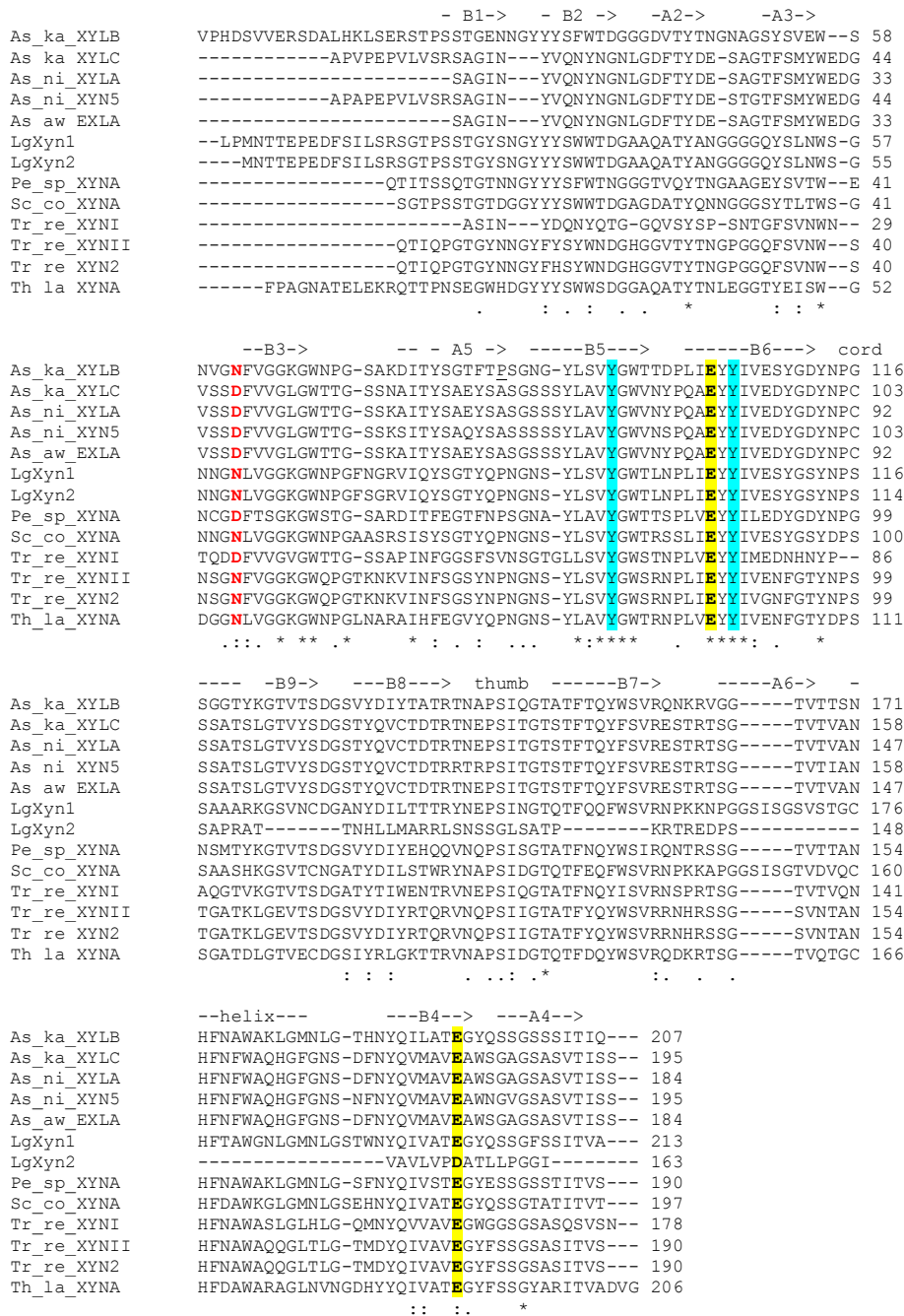


FIGURA 4. 17: Alinhamento múltiplo global de 13 sequências da família 11 das glicosil hidrolases utilizando o ClustalW. A sequência segue a mesma ordem apresentada na tabela 4.6. No topo do alinhamento, elementos da estrutura secundária observados no cristal da XYNII do *T.reesei* (TÖRRÖNEN *et al.*,1994). Os resíduos destacados em amarelo identificam os resíduos catalíticos. Os resíduos destacados em azul envolvem os resíduos que auxiliam na estabilização das cargas do sítio catalítico. Os resíduos em vermelho correspondem aos resíduos envolvidos na determinação do pH ótimo de cada enzima.

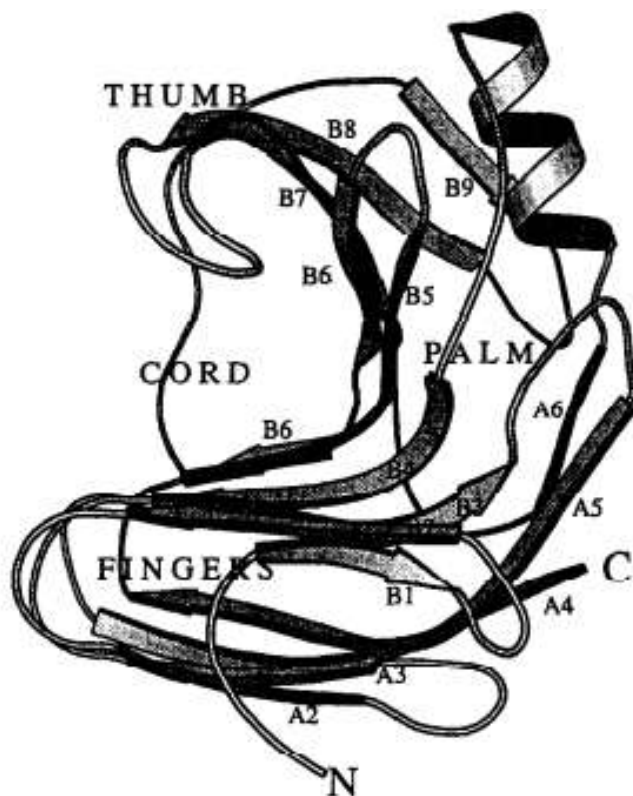


FIGURA 4.18: Representação esquemática dos elementos da estrutura secundária da XYNII do *T. reesei* (extraído e modificado TÖRÖNEN & ROUVINEN, 1997).

4.2.1 Clonagem do DNA que codifica a síntese da LgXyn2 para expressão em *E.coli*

O sistema de expressão de proteínas recombinantes em *E.coli* é muito utilizado por ser bastante estudado, conhecido e permite a superprodução de enzimas recombinantes (AHMED *et al.*, 2009). A característica negativa deste sistema é que *E.coli* não apresenta maquinário metabólico para realizar modificações pós-traducionais (tais como glicosilação, formação de ligações dissulfeto e processamento proteolítico). Mesmo assim, este sistema tem sido utilizado na expressão de proteínas de eucariotos com sucesso, como revisado por AHMED *et al.*, 2009 para a produção de xilanases de fungos. Por estes motivos, inicialmente foi proposto o uso deste sistema para obtenção da xilanase recombinante.

Obtenção do clone pET SUMO-*xyl*

A clonagem do gene *xyl* no vetor pET SUMO foi realizada a partir da clivagem do produto de PCR e do vetor pET SUMO com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. A representação esquemática para esta construção, denominada pET SUMO-*xyl*, esta apresentada na figura 4.19. O sistema de expressão pET SUMO produz elevados níveis de proteínas solúveis em *E. coli*, por utilizar um pequeno modificador ubiquitina relacionado (fusão SUMO) envolvido na estabilização e localização das proteínas *in vivo*, que permite um aumento na solubilidade das proteínas expressas em fusão. Após a expressão, o motivo SUMO pode ser clivado pela ação da protease SUMO (ULP-1) na porção C-terminal da SUMO.tag. O interessante é que a SUMO protease pode ser expressa e purificada no próprio laboratório, o que reduz os custos de obtenção desta enzima.

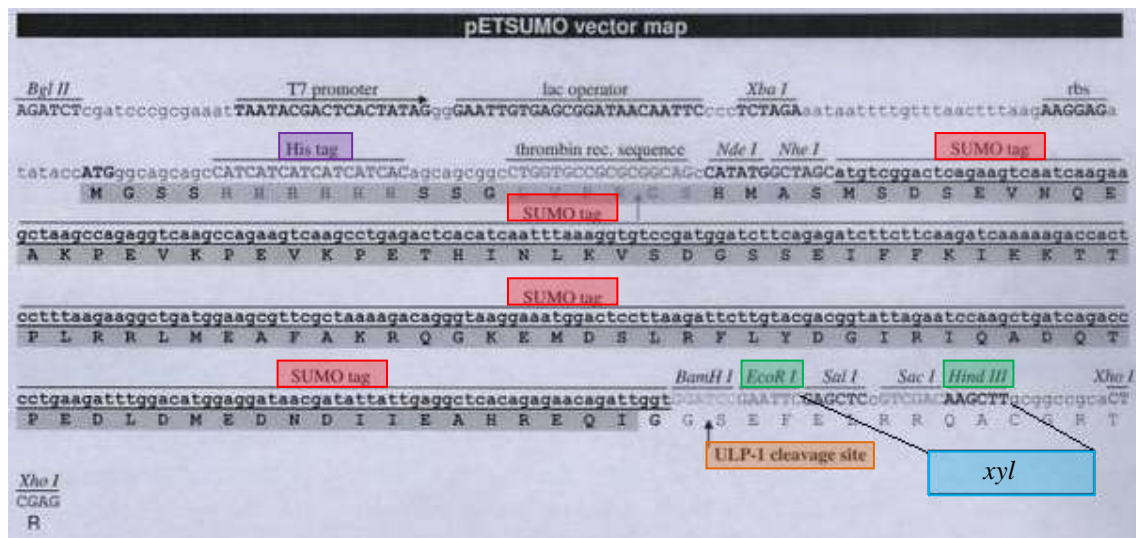


FIGURA 4.19: Representação esquemática para a construção do clone pET SUMO-*xyl*. Em destaque, a fusão N-terminal (His.tag em roxo e SUMO.tag em vermelho), as enzimas de restrição utilizadas na clonagem (em verde), o local de inserção da ORF *xyl* (em azul) e o sítio de clivagem pela SUMO protease ULP-1 (em laranja).

Os clones transformantes obtidos foram analisados para a confirmação da clonagem por reação de PCR utilizando o DNA plasmidial como DNA molde e os mesmos oligonucleotídios utilizados na amplificação do gene. Na figura 4.20-A, podemos confirmar a clonagem devido a amplificação de um fragmento de DNA com aproximadamente 600 bp. A confirmação da clonagem por restrição enzimática utilizando as enzimas *EcoRI* e *HindIII* deve fornecer dois fragmentos, um correspondente ao plasmídeo, pET SUMO (5600 bp) e a outro correspondente ao gene de interesse (600 bp), como mostrado na figura 4.20-B. Com estes experimentos confirmamos a clonagem do gene *xyl* no vetor pET SUMO. Também foi realizado o sequenciamento do clone pET SUMO-*xyl* confirmando que o gene estava em fase de leitura com o plasmídeo.

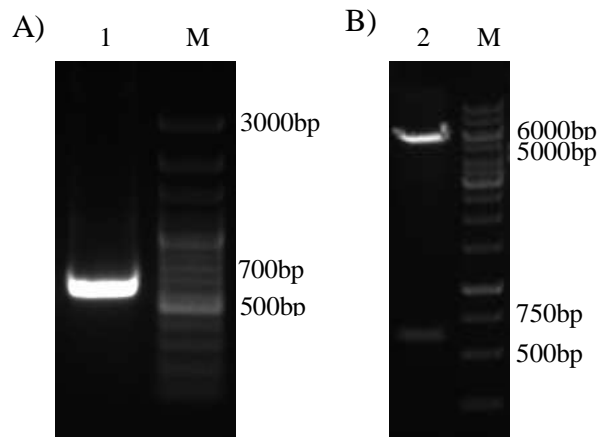


FIGURA 4. 20: Análise em gel de agarose 1% da confirmação da clonagem para obtenção do clone pET SUMO-*xyI*. (A) Confirmação da clonagem por PCR: 1) produto da amplificação da reação de PCR e M) Marcador de massa molecular (Thermo Scientific). B) Confirmação da clonagem por análise de restrição enzimática: 2) Digestão do DNA plasmidial de um dos transformantes com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*; M) Marcador de massa molecular GeneRulerTM 1kb *DNA Ladder* (Thermo scientific).

4.2.2 Expressão da proteína recombinante LgXyn2 em *E. coli*

Após obtenção do clone pET SUMO-*xyI* este foi transformado em linhagens de *E. coli* BL21(DE3)pT-GroE e Rosetta(DE3)pLysS. Foram testadas duas concentrações diferentes de indutor (IPTG) e temperatura para avaliar a melhor condição para obtenção da proteína solúvel. As culturas foram crescidas em meio LB acrescido de canamicina e cloranfenicol. A canamicina confere resistência aos transformantes que contém o plasmídeo pET SUMO e as linhagens BL21(DE3)pT-GroE e Rosetta(DE3)pLysS são naturalmente resistentes à cloranfenicol, atuando como fator de seleção das linhagens.

O acompanhamento do crescimento das linhagens de *E.coli* em meio seletivo foi realizado através da medida espectrofotométrica à 600nm, de modo que turvação do meio de cultivo foi o indicador do crescimento bacteriano. A indução com IPTG foi realizada na fase de crescimento exponencial das linhagens. A proteína LgXyn2 será expressa em fusão com a His.tag (figura 4.19), o que facilita a purificação da enzima recombinante em resina de afinidade imobilizada com metal, os resíduos de histidinas da His.tag ligam-se de forma específica à matriz através dos íons de Ni^{2+} ou Co^{2+} . A proteína é então desligada da resina pela adição de uma solução contendo imidazol, o anel imidazólico é parte integrante da estrutura da histidina. Deste modo, o imidazol competirá com a histidina na ligação aos íons metálicos da matriz, permitindo assim a eluição da proteína.

Para cada condição de expressão foi realizada a lise celular e a purificação parcial em resina de níquel ou cobalto. A proteína LgXyn2 (17764,3 Da) expressa neste sistema em fusão com a His.tag-SUMO.tag (13657,3 Da) deve apresentar massa molecular estimada de 31421,6 Da.

O experimento utilizando a linhagem BL21(DE3)pT-GroE não apresentou banda de expressão visível, nem identificação por imunodeteccção (*immunobloting*) utilizando como anticorpo o anti-His, que identifica a fusão His.tag (dados não apresentados). Entretanto para a linhagem Rosetta(DE3)pLysS foi observada uma banda de expressão com massa molecular aparente entre 31 e 38 kDa. Esta diferença na expressão para as duas linhagens de *E.coli* pode estar relacionada ao fato da linhagem Rosetta(DE3)pLysS ser capaz de expressar proteínas de eucariotos que contenham códons raros para *E.coli* (Invitrogen). A LgXyn2 possui uma trinca de nucleotídeo $^{45}GGA^{48}$ na porção N-terminal que corresponde a um destes códons raros para *E.coli*.

A LgXyn2 expressa em Rosetta(DE3)pLysS apresentou-se majoritariamente como corpos de inclusão, e mesmo após as diversas tentativas de aumentar a solubilidade da proteína expressa através de diferentes processos de lise celular, concentração de IPTG, temperatura e tempo de indução, a proteína permaneceu majoritariamente insolúvel. Esses experimentos foram acompanhados e analisados por eletroforese e ensaios de atividade (dados não mostrados). No entanto, as melhores condições encontradas (0,3 mM de IPTG por 18 horas a 18°C e lise com ultrassom por 7 minutos com pulso de 30 segundos e repouso de 30 segundos) foram mantidas para subseqüentes análises da proteína solúvel.

Os processos de expressão e purificação parcial da proteína LgXyn2 foram também acompanhados por ensaio de *immunoblotting* utilizando como anticorpo o anti-His. Na figura 4.21 está apresentado o resultado do *immunoblotting* para a expressão de LgXyn2 e purificação parcial em resina de níquel em pH 4,8. Grande quantidade de enzima foi obtida na fração insolúvel, uma pequena parcela na fração solúvel que foi aplicada em resina de níquel e eluída com imidazol. Foi observado também uma parcela da enzima solúvel na fração que não apresenta afinidade pela resina, isto está associado ao fato de que neste pH o átomo de nitrogênio da cauda de histidina responsável pela ligação ao íon metálico estar protonado na maioria das moléculas, o que justifica esta a perda.

Não foi observada atividade enzimática frente à xilana nas frações eluídas da coluna. Com base nestes resultados duas suposições podem ser sugeridas, a proteína de fusão pode estar em uma conformação inadequada impedindo o acesso do substrato ao sítio catalítico da enzima ou a ausência de glicosilação influencia na atividade da LgXyn2.

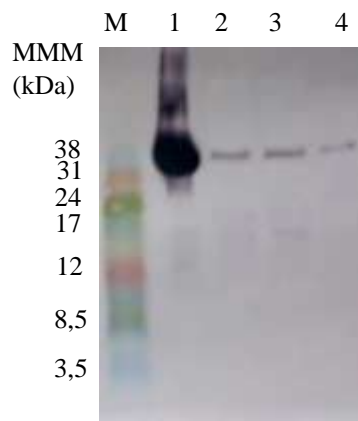


FIGURA 4.21: Análise por imunodeteção da expressão e purificação parcial em resina de níquel (pH4,8) da LgXyn2 em linhagem Rosetta(DE3)pLysS.M) Padrão de massa molecular (GE); 1) fração insolúvel após lise celular com ultrassom por 7min (30s on/30s off); 2) fração solúvel após lise celular; 3) fração que não apresenta afinidade pela resina (*void*); 4) eluição da resina de níquel com 200 mM de imidazol. Com excessão da fração insolúvel, as demais amostras foram concentradas 10 vezes antes de serem analisadas.

Uma nova tentativa de purificação da enzima recombinante foi realizada em pH 8,0 (25 mM Tris, 300 mM NaCl e 10% glicerol) mantendo as condições de lise para tentar minimizar a perda da enzima durante a purificação por afinidade. Esta purificação foi realizada em resina de níquel e em resina de cobalto, sendo que a eluição foi realizada em condições crescentes de imidazol (50 a 250 mM) (figura 4.22). A banda da proteína de interesse apresentou-se mais intensa na eluição da resina de cobalto, sendo que esta resina foi escolhida para realizar o ensaio subsequente de clivagem da proteína de fusão com a SUMO protease.

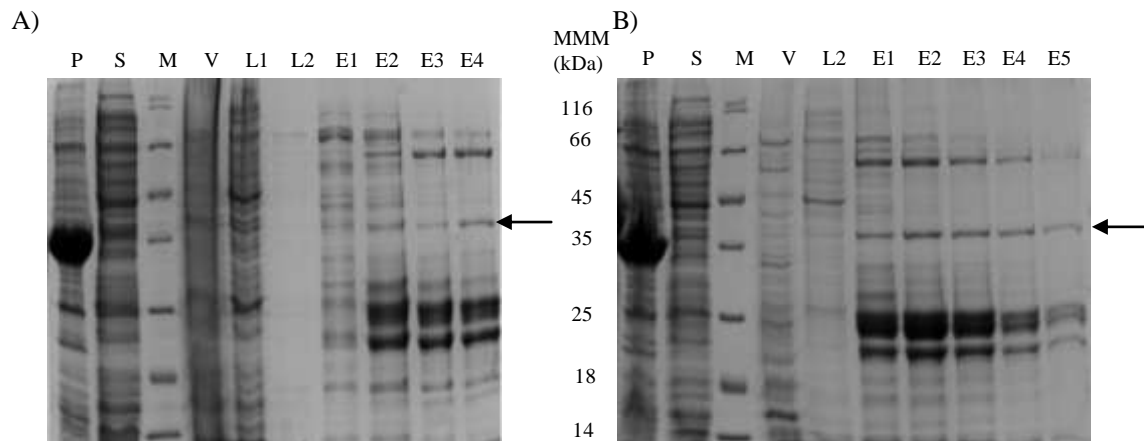


FIGURA 4.22: Análise em gel SDS 15% da purificação parcial em resina de níquel (A) e cobalto (B) (pH 8,0) da expressão da LgXyn2 em Rosetta(DE3)pLysS.P) fração insolúvel após lise celular com ultrassom por 7min (30s on/30s off); S) fração solúvel após lise celular; M) Padrão de massa molecular (Thermo); V) fração que não apresenta afinidade pela resina (*void*); L1) lavagem da resina com o mesmo tampão de lise celular; L2) lavagem da resina com o tampão de lise sem glicerol; E1 a E5) eluição da resina de níquel com 50,100,150, 200 e 250 mM de imidazol respectivamente. Com exceção da fração insolúvel, as demais amostras foram concentradas 10 vezes antes de serem analisadas.

A concentração de proteína total que se liga na resina de cobalto e é eluída com imidazol foi estimada pela quantificação utilizando o método de Bradford. Foi verificado que para cada 500 ml de meio de cultura são eluídos da resina de cobalto em torno de 1 mg de proteína total. Esta concentração foi utilizada como estimativa para a concentração da proteína de fusão no ensaio de clivagem em resina, no qual utilizamos 1 mg de ULP-1 para cada 50 mg de fusão com His, como descrito no subitem 3.2.2.2.

Na figura 4.23 pode ser verificada que a proteína de fusão com massa molecular aparente abaixo de 40 kDa não está presente nem nas frações do eluato nem nas frações eluídas com imidazol, comprovando a eficiência da ação da

SUMO protease. Nas frações do eluato pode ser verificado uma banda acima de 15 kDa, que deve corresponder à enzima LgXyn2 enquanto que nas frações eluídas com imidazol a banda acima de 25 kDa deve corresponder à SUMO protease e a banda em torno de 15 kDa à fusão His.tag-SUMO.tag. Este experimento também foi acompanhado por *immunobloting* (dados não apresentados) e as bandas de proteína de 15 e 25 kDa apresentaram reação com o anticorpo, detectando portanto a presença da fusão His.tag nas mostras.

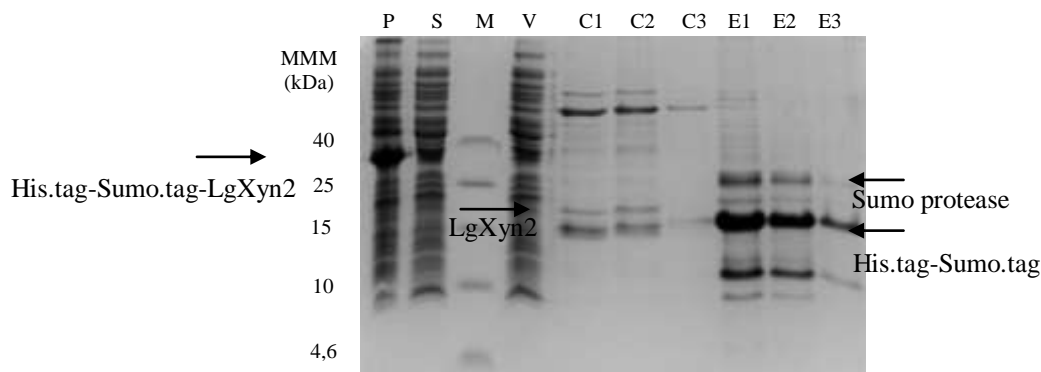


FIGURA 4. 23: Análise em gel de tricina da purificação parcial em resina de cobalto (pH 8,0) e clivagem na resina da fusão com a Sumo protease. P) fração insolúvel após lise celular; S) fração solúvel após lise celular; M) Padrão de massa molecular (Thermo); V) fração que não apresenta afinidade pela resina (*void*); C1 a C3) frações que não apresentaram afinidade pela resina de níquel após clivagem com a Sumo protease (eluato); E1 a E3) eluição da resina de níquel com 250 mM de imidazol. Com exceção da fração insolúvel, as demais amostras foram concentradas 10 vezes antes de serem analisadas.

As frações desta etapa de purificação cromatográfica foram avaliadas com relação à atividade xilanolítica e foi constatado que esta não apresentam

atividade de degradação do xilano. Assim, a hipótese de que proteína de fusão poderia estar impedindo estericamente o sítio catalítico da enzima não foi confirmada, logo as modificações pós-traducionais, como a glicosilação, torna-se um importante fator a ser avaliado quanto à influência na atividade da LgXyn2.

Com estes experimentos foi concluído que o sistema de expressão da LgXyn2 em *E.coli* não foi eficiente para obtenção de uma enzima solúvel e ativa.

4.2.3 Obtenção do clone pPICZ α -A-xyl e análise da expressão da proteína LgXyn2 em eucarioto (*P. pastoris*)

O sistema de expressão heteróloga em *P. pastoris* tornou-se interessante neste trabalho porque foi detectado que o fungo *L. gongylophorus* produz xilanases ativas que são naturalmente secretadas para o meio extracelular. Além disso, a expressão em sistema procarioto levou à obtenção majoritária da enzima como corpos de inclusão e a pequena fração solúvel não se apresenta ativa quanto à atividade xilanolítica.

A *P. pastoris* é um sistema de expressão heteróloga de proteína que vem sendo amplamente utilizada nas últimas décadas sendo que as vantagens deste sistema estão relacionadas à simplicidade das técnicas de manipulação genética e similaridade a outros sistemas de expressão bem conhecidos, como para a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, também apresenta capacidade de produção de elevados níveis de proteínas tanto intra como extracelulares corretamente enoveladas, associada à habilidade de realizar modificações pós-traducionais requeridas para a funcionalidade da proteína, como O- e N-glicosilação, formação de pontes de dissulfeto e processamento proteolítico (CERENGHINO & CREGG, 2000; DALY & HEARN, 2005).

A *P. pastoris* é uma levedura metilotrófica, ou seja, pode se desenvolver em meio contendo metanol como única fonte de carbono atingindo elevados níveis de densidade celular. Outras características da *P. pastoris* também são exploradas no seu uso como sistema de expressão heteróloga de proteínas, tais como inabilidade fermentativa e presença do promotor forte AOX que pode ser reprimido e regulado por outras fontes de carbono, na ausência de metanol ou induzido na presença deste álcool (CERENGHINO & CREGG, 2000).

Baseado nestes fatores foi realizada a expressão da proteína LgXyn2 em linhagens de *P. pastoris* e foi escolhido o vetor pPICZ α -A para a clonagem do gene *xyl*. Nesta construção o gene *xyl* será expresso em fusão na região N-terminal com o fator- α de secreção, o qual permitirá que esta proteína seja secretada para o meio extracelular. O epítipo *c-myc* e a cauda contendo 6 resíduos de histidina (His.tag) na porção C-terminal que vão auxiliar nas etapas de purificação. A figura 4.24 representa esquematicamente a construção denominada pPICZ α -A-*xyl*.

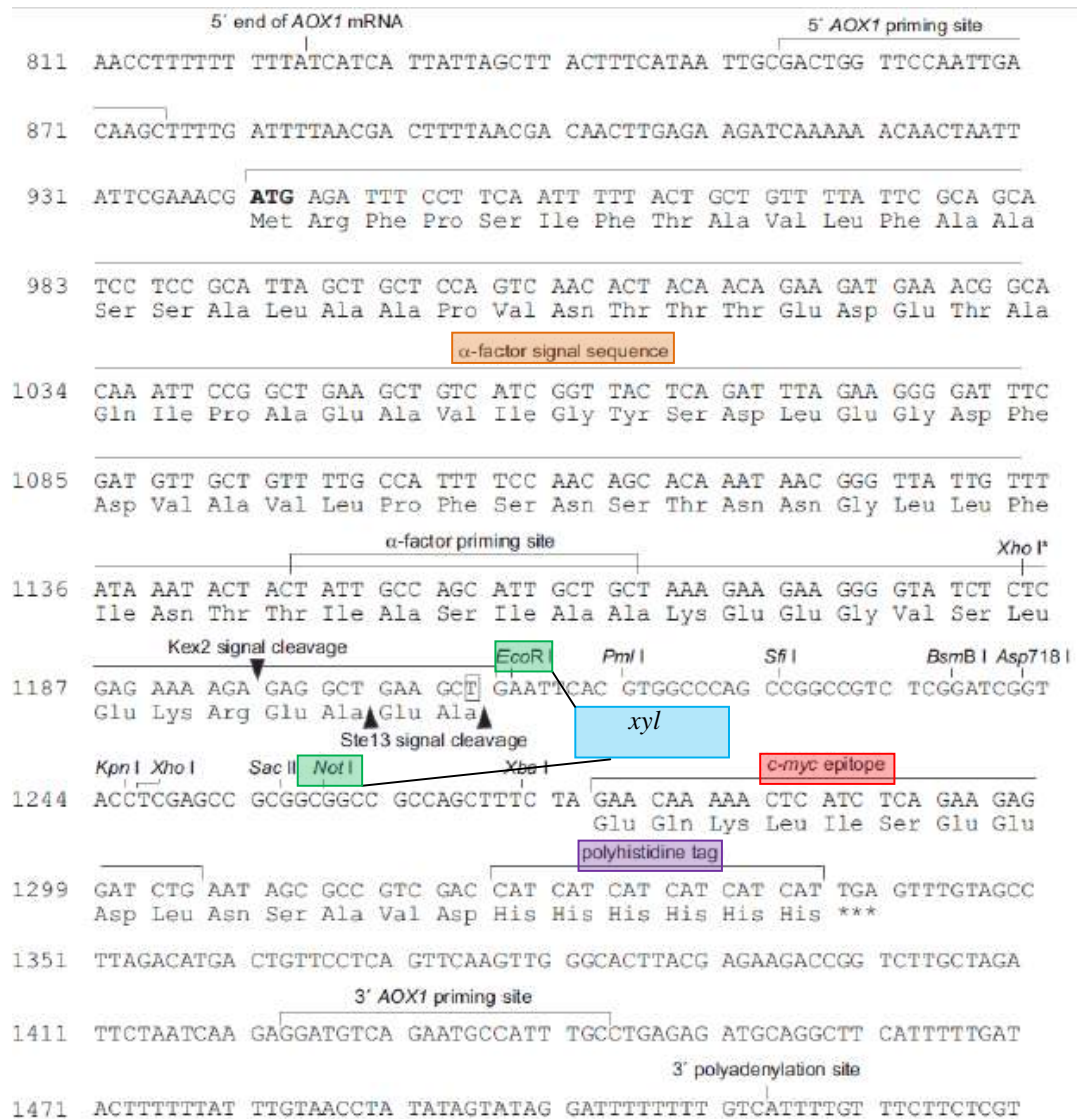


FIGURA 4.24: Representação esquemática para a construção do clone pPICZα-A-xyl. Em destaque a fusão N-terminal (sequência do fator-α em laranja), a fusão C-terminal (epitopo *c-myc* em vermelho e His.tag em roxo), as enzimas de restrição utilizadas na clonagem (em verde) e o local de inserção da ORF *xyl* (em azul) (representação do sítio múltiplo de clonagem modificado da Invitrogen).

A transformação em linhagens de *P. pastoris* leva à obtenção de transformantes geneticamente estáveis, uma vez que a transformação ocorre por recombinação homóloga do cassete de expressão no DNA cromossômico em *locus* específicos (CERENGHINO & CREGG, 2000). O *locus* de integração é determinado pelo vetor utilizado e o local da linearização do DNA plasmidial antes de realizar a eletroporação (CERENGHINO & CREGG, 2000).

O vetor pPICZ α -A possui uma região homóloga à região 5' AOX1 do genoma de linhagens de *P. pastoris*, assim a linearização nesta região (com a enzima *SacI*) leva à recombinação homóloga por inserção do cassete no *locus* AOX1 ou *aox1::ARG4* das linhagens (descritas a seguir). Segundo dados apresentados no manual da *P. pastoris* (Invitrogen), múltiplos eventos de inserção podem ocorrer espontaneamente em aproximadamente 1-10% de cada evento de inserção. Assim ocorrerá inserção de uma ou múltiplas cópias do vetor a montante do gene AOX1 ou *aox1::ARG4* (figura 4.25).

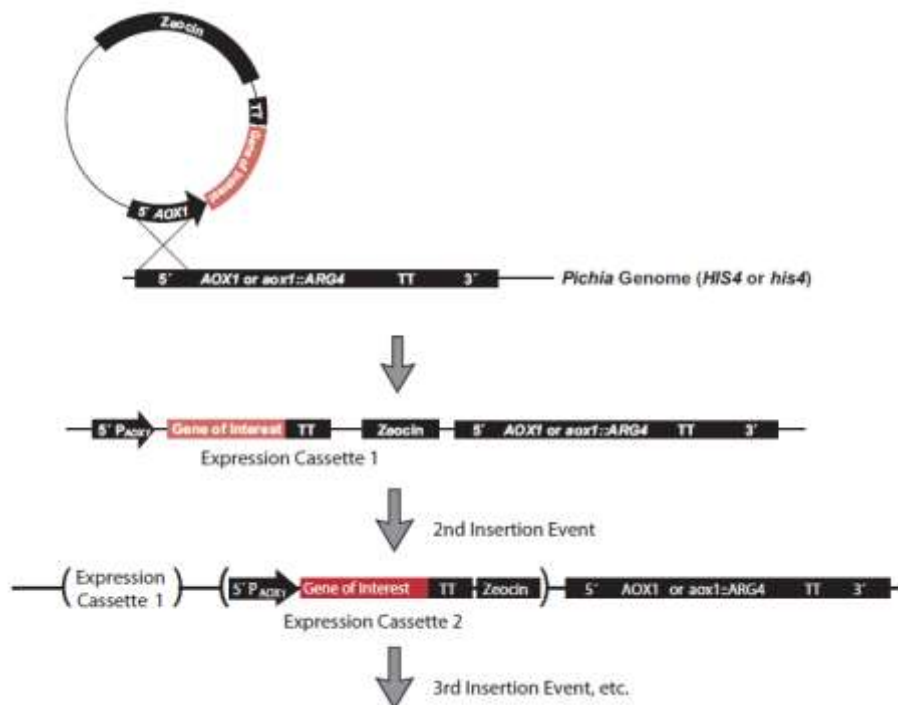


FIGURA 4. 25: Representação esquemática da inserção do plasmídeo recombinante na região 5' AOX1 no genoma da *P. pastoris* (locus AOX1 ou *aox1::ARG4*) (extraído e modificado da Invitrogen).

As linhagens de *P. pastoris* possuem dois genes que transcrevem para álcool oxidase, o AOX1 e o AOX2, sendo que as enzimas produzidas por ambos apresentam mesma atividade específica (CREGG *et al*, 1989; DALY & HEARN, 2005). Entretanto, a álcool oxidase 1 é responsável por aproximadamente 85% da utilização do metanol, devido aos elevados níveis transcricionais deste gene flanqueado pelo promotor forte do gene AOX1. Linhagens de *P. pastoris* que possuem o gene funcional AOX1 são denominadas por Mut⁺, como é o caso da GS115 (CREGG *et al*, 1989; DALY & HEARN, 2005). Por outro lado, linhagens como a KM71H, onde o gene AOX1 foi parcialmente substituído pelo gene ARG4 (*aox1::ARG4*), o AOX1 é não funcional, de modo que a álcool oxidase produzida é proveniente do gene AOX2; logo esta linhagem consumirá metanol lentamente devido ao baixo nível de expressão deste gene (promotor fraco). Linhagens que utilizam apenas o gene AOX2 para produção de álcool oxidase são denominados Mut^S (CREGG *et al*, 1989; DALY & HEARN, 2005). Como o vetor pPICZα-A apresenta homologia com a região 5' AOX1 do gene de linhagens de *P. pastoris* a expressão heteróloga da proteína ficará sob o controle do promotor forte AOX1, sendo que as características Mut⁺ ou Mut^S das linhagens recombinantes dependerá das linhagens utilizadas.

Confirmação da clonagem do gene *xyl* no vetor pPICZα-A

Para a clonagem unidirecional do gene *xyl* no vetor pPICZα-A foi realizada a reação de amplificação por PCR deste gene utilizando os oligonucleotídeos *foward* e *reverse* que permitem a reação de digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. Os fragmentos de DNA amplificados e o vetor foram digeridos com estas enzimas de restrição, então foram submetidos à reação

de ligação e o produto desta reação foi transformado em *E. coli* DH5 α . O vetor clonado foi denominado pPICZ α -A-*xyl*.

A clonagem do DNA foi confirmada por reação de PCR utilizando como DNA molde o DNA plasmidial extraído dos transformantes, levando à amplificação de um fragmento de DNA em torno de 600 bp, (dados não mostrados). E por restrição enzimática, onde foi possível verificar dois fragmentos após a ação das enzimas de restrição no DNA plasmidial (figura 4.26). Um destes fragmentos apresenta massa molecular aparente acima de 3000 bp, correspondendo ao vetor pPICZ α -A e o outro entre 750 e 500 bp referente ao gene *xyl*. Com estes experimentos foi confirmada a clonagem do gene *xyl* no vetor pPICZ α -A,

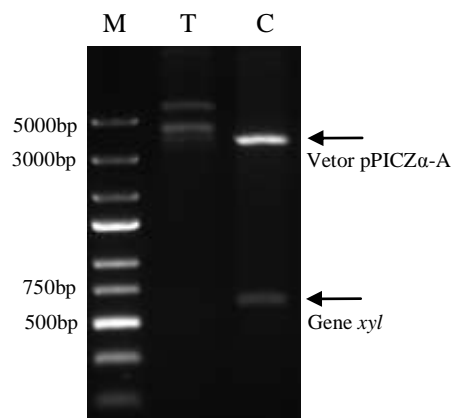


FIGURA 4.26: Análise em gel de agarose 1% da reação de restrição enzimática do clone pPICZ α -A-*xyl*. M) padrão de massa molecular O'Gene Ruler™ Express DNA Ladder (Thermo Scientific); T) DNA plasmidial do transformante antes da digestão e C) DNA plasmidial do transformante após digestão com as enzimas *EcoRI* e *NotI*.

O sequenciamento do clone pPICZ α -A-*xyl* foi realizado utilizando os oligonucleotídeos 5'AOX1 e 3'AOX1 para confirmar se o gene estava em fase de leitura com o plasmídeo. O sequenciamento mostrou que o gene *xyl* está em fase de

leitura com o fator- α (dados não mostrados). Neste caso é importante ressaltar que a presença de um códon de parada do gene *xyl* elimina a fusão c-myc e His.tag que estão situadas na região C-terminal. Espera-se que a proteína seja expressa sem fusão e que tenha uma massa molecular estimada de 17764,3 Da (baseado na sequência de DNA) sem contar com as modificações pós-traducionais, como N e O-glicosilação.

Confirmação da transformação dos clones pPICZ α -A-*xyl* em linhagem KM71H de *P. pastoris* eletrocompetentes

Transformantes de *P. pastoris* podem ser obtidos via recombinação homóloga entre uma região do DNA transformante que apresente homologia dentro do genoma do micro-organismo. Na linhagem KM71H utilizada os eventos de inserção ocorrem no *loci* *aox1::ARG4*, a partir de um único evento ou múltiplas inserções de cruzamento entre o *loci* e a região AOX1 do vetor pPICZ α -A. Para a obtenção da linhagem recombinante de *P. pastoris* KM71H por eletroporação é necessário realizar a linearização do vetor recombinante pPICZ α -A-*xyl* com a enzima de restrição *SacI* (figura 4.27), cujo sítio de restrição está localizado na região 5' AOX1.

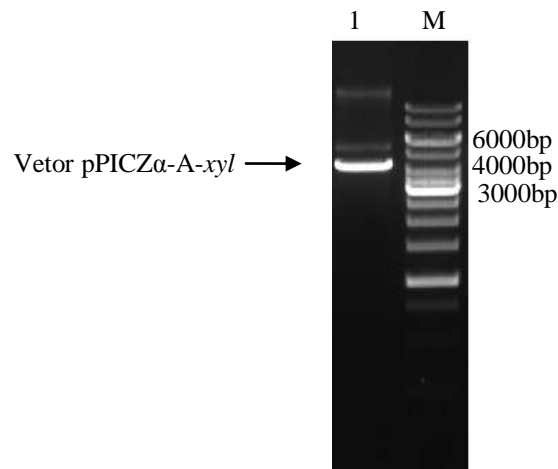


FIGURA 4.27: Gel de agarose 1% da linearização com *SacI* do vetor pPICZ α -A-xyl. 1) Linerização com *SacI* do vetor pPICZ α -A-xyl e M) Marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Thermo scientific).

Após a confirmação da linearização do clone pPICZ α -A-xyl o produto da reação foi precipitado com acetato de sódio e etanol para purificação, ressuspenso em água e este foi utilizado na eletroporação de *P. pastoris* KM71H eletrocompetentes. Várias colônias foram obtidas nas diluições das placas contendo 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de zeocina. O plaqueamento em placa contendo 500 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de zeocina foi realizado com o objetivo de pré-selecionar transformantes com maior número de integração. Posteriormente, 16 colônias da placa de maior concentração de zeocina foram semeadas em placa contendo YPD ágar com 1000 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de zeocina com o mesmo objetivo.

Todos os transformantes em KM71H serão Mut^S devido ao rompimento do gene AOX1 (*aox1::ARG4*). Este rompimento leva a célula a utilizar apenas o gene transcricional AOX2, que produz baixos níveis de álcool oxidase devido ao promotor fraco deste gene e por isso utiliza menos metanol que a linhagem Mut⁺ (CERENGHINO & CREGG, 2000; DALY & HEARN, 2005).

O DNA genômico de 7 colônias transformadas com o clone pPICZ α -A-*xyl* e crescidas em 1000 μ g.ml⁻¹ de zeocina foi extraído, sendo que o DNA de 6 colônias foram eficientemente obtidos (figura 4.28 A). O DNA genômico foi utilizado para confirmação da transformação por PCR, onde foi observada a amplificação de fragmento de DNA entre 750 e 500 bp para os 6 transformantes (figura 4.28 B). Também foi realizada a PCR utilizando os oligonucleotídeos 5'AOX1 e 3'AOX1 para verificar a integração do cassete de expressão nos transformantes de *P. pastoris*. A figura 4.28 C mostra a amplificação do fragmento de DNA entre 1000 e 1500 bp para 3 transformantes, como esperado, uma vez que o fragmento de DNA amplificado por este par de oligonucleotídeo deve levar à obtenção de banda de 1166 bp que corresponde à 588 bp do vetor pPICZ α -A e 578 bp para o gene *xyl*.

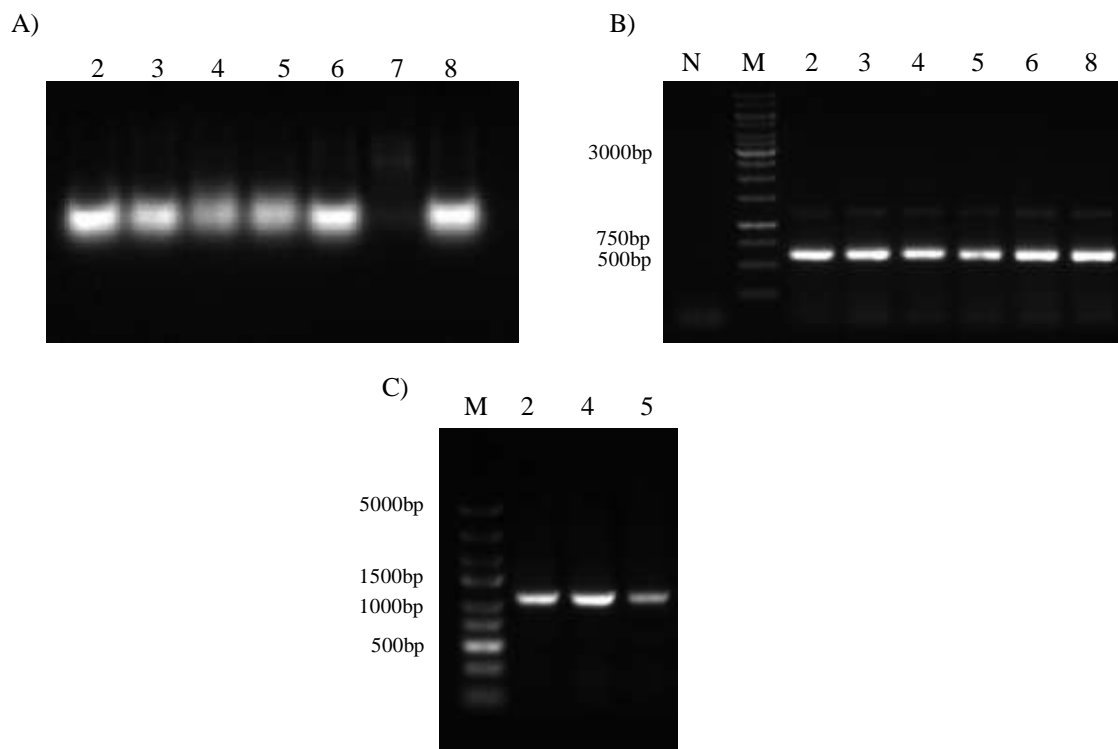


FIGURA 4. 28: Análise por eletroforese em géis de agarose 1% da transformação do clone pPICZ α -A-*xyl* em linhagem KM71H de *P. pastoris*. A) (2-8) DNA genômico das 7 colônias transformantes. B) Produto de PCR utilizando o DNA genômico e os oligonucleotídeos do gene *xyl*. N: branco da reação; M: Marcador de massa molecular GeneRuler™ 1kb *DNA Ladder* (Thermo scientific); 2 a 8: reação de amplificação dos clones 2-6 e 8. C) Reação de PCR utilizando o DNA genômico e os oligonucleotídeos AOX. M: Marcador de massa molecular; poços 2, 4 e 5: reação de amplificação dos clones 2,4,5.

Com estes experimentos foi confirmada a clonagem do gene *xyl* em linhagem KM71H de *P. pastoris*. Um experimento-controle foi realizado utilizando o vetor pPICZ α -A para análise das proteínas secretadas pela levedura e os mesmos testes para a confirmação da clonagem do vetor pPICZ α -A nesta linhagem foram realizados e a clonagem também foi confirmada (dados não apresentados).

Análise da expressão da proteína recombinante LgXyn2 em *P. pastoris*

Confirmado o cassete de expressão na linhagem KM71H foi realizada a expressão em pequena escala de três dos clones, uma vez que dados da literatura mostram que existe uma boa relação entre a análise de clones por PCR e níveis de expressão da proteína, de modo que não é necessário realizar o *screening* de mais do que dois clones confirmados por PCR (BOETTNER *et al.*, 2002). Para isso, as colônias foram inoculadas em meio de crescimento contendo glicerol (BMGY) e como controle foi utilizada uma colônia de *P. pastoris* KM71H transformada com o vetor pPICZ α -A. As células foram induzidas em meio contendo metanol (BMMY) e a cada 24 horas de cultivo foram coletadas alíquotas e o meio foi induzido com 0,7% de metanol. As alíquotas foram centrifugadas e os sobrenadantes analisados em SDS-PAGE 15%.

A expressão em pequena escala não foi conclusiva, mesmo assim passamos para a expressão em larga escala de duas colônias. Os sobrenadantes das alíquotas dos diferentes tempos de indução foram analisados em gel de tricina e em paralelo à expressão em solução foi realizado o teste qualitativo da atividade xilanolítica em placa. Para isso foram inoculados dois clones na linhagem KM71H, são eles pPICZ α -A-*xyl* Xyl 2 e Xyl 4 e um de controle (pPICZ α -A em linhagem KM71H) em placa contendo meio BMMY, ágar e xilano.

A placa foi corada com vermelho de congo, um corante que altera sua coloração dependendo no pH do meio. A atividade xilanolítica foi verificada em uma das colônias (Xyl2) pela formação de um halo amarelado (figura 4.29), isto ocorre devido a diminuição do pH do meio quando a ligação β -1,4 do substrato xilana é hidrolisada e a extremidade redutora do aldeído é oxidada à ácido carboxílico (figura 4.1).

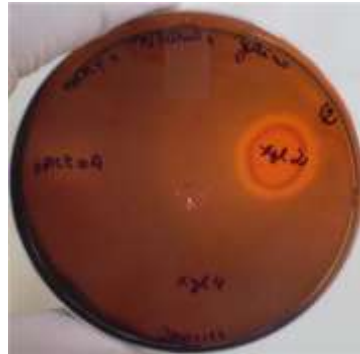


FIGURA 4. 29: Teste da atividade xilanolítica em placa de dois clones (pPICZ α -A-xyl) e o controle (pPICZ α -A) em linhagem KM71H de *P. pastoris*. A placa foi corada com vermelho de congo.

Baseado na atividade xilanolítica em placa, o sobrenadante da expressão da colônia Xyl2 foi dialisado contra tampão 25 mM Tris pH8,0 e a atividade xilanolítica foi acompanhada em solução (tabela 4.8). Podemos verificar uma atividade xilanolítica crescente com o tempo de indução e uma atividade xilanolítica residual no tempo de indução T144 do controle. Muitas bandas foram observadas no meio extracelular na análise em gel de tricina (figura 4.30), o que não é esperado para os padrões de expressão em *P. pastoris*.

Com base no teste de atividade e a espessura das bandas analisadas em gel de tricina sugerimos que a proteína de interesse esteja sendo expressa com massa molecular aparente entre 25 e 15 kDa, como identificada na figura 4.30. O elevado número de bandas de proteínas secretadas para o meio pela colônia Xyl2 leva à hipótese de que pode ter ocorrido uma contaminação do meio com o precipitado celular, isto é, a separação do meio de cultura e das células de *P. pastoris* pode não ter sido eficiente. Esta hipótese é reforçada pelo fato do controle (após 144hs de indução- figura 4.30) apresentar poucas bandas. Este experimento de expressão deve ser repetido e realizado com maior controle para evitar a

contaminação com células de *P. pastoris*, que também pode estar relacionado à lise celular (por congelamento/descongelamento da amostra).

TABELA 4.8: Atividade xilanolítica do meio extracelular da colônia Xyl2 em diferentes tempos (T) de indução com metanol.

Amostras	Atividade (10^{-2} U.ml ⁻¹)
T0	7,2
T24	4,5
T48	18,2
T72	32,1
T96	31,7
T120	42,9
T144	44,4
T144 Controle	0,3

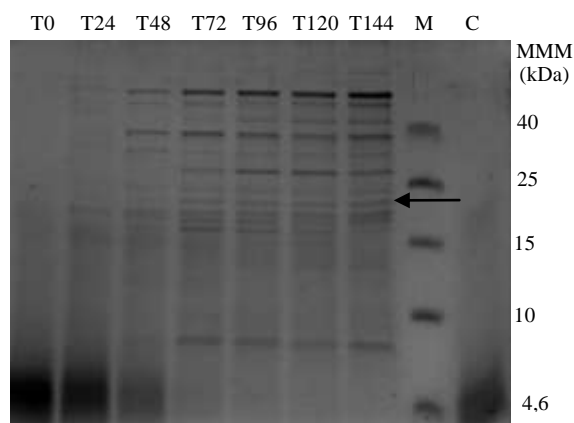


FIGURA 4. 30: Análise em gel de tricina do sobrenadante da expressão da colônia Xyl2 em linhagem KM71H de *P. pastoris*. T0 a T144) alíquotas dos diferentes tempos de indução da expressão. C) controle - alíquota do sobrenadante da expressão da linhagem KM71H clonada com o vetor pPICZ- α -A após 144 horas de indução. M: marcador de massa molecular (Thermo).

Esta colônia, Xyl2, apresenta-se promissora na continuidade do estudo de expressão da LgXyn2, pois mostrou atividade xilanolítica em placa e em solução e apesar de não ter sido possível, até o momento, realizar a purificação da LgXyn2 (principalmente porque a enzima não tem fusão com his.tag) conclui-se que o sistema de expressão da LgXyn2 em *P. pastoris* mostrou-se eficiente para obtenção da enzima solúvel e ativa. Otimizações no processo de expressão podem levar à obtenção da LgXyn2 em quantidade e pureza necessários para os futuros estudos estruturais.

5. Conclusões

O perfil de xilanolítico do fungo *L. gongylophorus* foi avaliado e duas enzimas nativas (XyLg1 e XyLg2) com atividade xilanolítica foram isoladas e caracterizadas sob o ponto de vista bioquímico e cinético. A amostra contendo a XyLg1 também apresenta atividade de degradação do ácido poligalacturônico, devido a presença da poligalacturonase (PG) do *L. gongylophorus*, identificada por espectrometria de massas. Devido as características específicas avaliadas (pI, afinidade ao substrato e massa molecular) a enzima XyLg1 pode ser classificada como pertencente à família das GH10, o que também foi confirmado por espectrometria de massas, enquanto que a XyLg2, avaliada sob os mesmos critérios pode ser classificada como pertencente à família das GH11.

Um novo gene que codifica para síntese da xilanase do fungo *L. gongylophorus* foi obtido a partir do mRNA de cultura induzida com xilana. O sistema de expressão em *E. coli* não foi eficiente para obtenção da enzima solúvel e ativa, porém mostrou que a glicosilação é um fator importante para a atividade da enzima. A expressão da proteína recombinante em *P. pastoris* mostrou que este gene codifica para a síntese de uma enzima funcional quanto à atividade xilanolítica.

Futuros estudos estruturais com as enzimas nativas e recombinante permitirão uma maior elucidação da funcionalidade destas.

6. Referências Bibliográficas

ADALBERTO, P. R.; SANTOS, F. J.; GOLFETO, C. C.; IEMMA, M. R. C.; SOUZA, D. H. F. & CASS, Q. B. “Immobilization of pectinase from *Leucoagaricus gongylophorus* on magnetic particles”. *Analyst*, **137**:4855-4859, 2012.

AHMED, S.; RIAZ, D & JAMI, A. “Molecular cloning of fungal xylanases: an overview”. *Appl Microbiol Biotechnol*, **84**:19-35, 2009.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; JOSÉ NEGRO, M. & BALLESTEROS, M. “Strategies of xylanase supplementation for an efficient saccharification and cofermentation process from pretreated wheat straw”. *Biotechnology Progress*, **27**(4):944-950, 2011.

ARANTES, V. & SADDLER, J. N. “ Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis”. *Biotechnology for Biofuels*, **3**:4, 2010.

AYLWARD, F. O.; CURRIE, C. R. & SUEN, G. “ The evolutionary innovation of nutritional symbioses in leaf-cutter ants”. *Insects*, **3**:41-61, 2012.

AYLWARD, F. O.; BURNUM-JOHNSON, K. E.; TRINGE, S. G. *et al.* “*Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens”. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**(12):3770-3778, 2013.

BAILEY, M. J.; BIELY, P. & POUTANEN, K. “Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity”. *Journal of Biotechnology*, **23**: 257-270, 1992.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L. & HOODAL, G. S. “ Microbial xylanases and their industrial applications: a review”. *Appl Microbiol Biotechnol* , **56**:326–338, 2001.

BIELY, P. “Microbial xylanolytic systems”. *Trends in Biotechnology*, **3** (11), 1985.

BIELY, P.; VRŠANSKÁ, M.; TENKANEN, M. & KLUEPFEL, D. “Endo- β -1,4-xylanases families: differences in catalytic properties”. *J Biotechnol*, **57**:151–66, 1997.

BISSOON, S.; CHRISTOV, L. & SINGH, S. “Bleach boosting effects of purified xylanase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP on bagasse pulp”, *Process Biochem.*, **37**, 567, 2002.

BOETTNER, M.; PRINZ, B. HOLZ, C. STAHL, U. & LANG, C. “High-throughput screening for expression of heterologous protein in yeast *Pichia pastoris*”. *Journal of Biotechnology*, **99**:51-62, 2002.

BRADFORD, M M. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Analytical Biochemistry*. **72**(1-2), 248-254, 1976.

BRITO-CHUNHA, C. C. Q.; CAMPOS, I. T. N.; FARIA, F. P. & BATAUS, A. M. “Screening and xylanase production by *Streptomyces* sp. grown on lignocellulosic wastes”. *Appl Biochem Biotechnol* , **170**:598–608, 2013.

CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T. LOMBARD, V. & HENRISSAT, B. “The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZY): na expert resource for glycogenomics”. *Nucleic Acids Res.*, **37**:D233-238, 2009.

CANTERI, M. H. G, MORENO, L., WOSIACKI, G. & SCHEER, A. P. “Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final”. *Polímeros*, **22**(2):149, 2012.

CERENGHINO, J. L. & CREGG, J. M. “Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*”. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**:45-66, 2000.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. “Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction”. *Analytical Biochemistry*, **162**(1): 156-159, 1987.

COLLINS, T.; GERDAY, C. & FELLER, G. “Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases”. *FEMS Microbiology Reviews*, **29**: 3, 2005.

COLLINS, T.; MEUWIST, M.-A.; STALS, I.; CLAEYSSSENS, M.; FELLERT, G. & GERDAY, C. “A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization”. *J Biol Chem*, **277**:35133–35139, 2002.

CORREIA, M. A. S., MAZUMDER, K.; BRÁS, J. L. A.; FIRBANK, S. J.; ZHU, Y. P.; LEWIS, R. J.; YORK, W. S.; FONTES, C. M. & GILBERT, H. J. “Structure and function of an arabinoxylan-specific xylanase”. *J Biol Chem*, **286**:22510–22520, 2011.

CREGG, J. M.; MADDEN, K. R.; BARRINGER, K. J.; THILL, G. P. & STILLMAN, C. A. “Functional Characterization of the Two Alcohol Oxidase Genes from the Yeast *Pichia pastoris*”. *Molecular and cellular biology*, **9**(3):1316-1323, 1989.

DALY, R. & HEARN, M. T. W. “Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production”. *J. of Mol. Recognit.*, **18**:119-138, 2005.

DIES, G. & HENRISSAT, B. “Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases”. *Structure*, **3**(9):3:853-859, 1995.

ERTHAL Jr. M; SILVA, C. P.; COOPER, R. M. & SAMUELS, R. I. “Hydrolytic enzymes of leaf-cutting ant fungi”. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, **152**, 54-59, 2009.

ESPOSITO, E. & AZEVEDO, J. L. “Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia”. Caixias do sul: Educs, 2010.

FERREIRA, V. “Produção de β -glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração”. Tese (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

FLINT, H. J.; MARTIN, J.; McPHERSON, C. A.; DANIEL, A. S. & ZHANG, J-X. “A bifunctional enzyme, with separate xylanase and beta(1,3-1,4)-glucanase domains, encoded by the xynD gene of *Ruminococcus flavefaciens*”. *J Bacteriol*, **175**:2943–2951, 1993.

Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. *BBC Research Market forecasting*, **BIO030G**, 2012.

GOLFETO, C. C. “Estudos funcionais de pectinases do fungo *leucoagaricus gongylophorus* simbiote de formigas cortadeiras”. Tese de Doutorado. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2013.

GOMES, J.; GOMES, I.; KREINER, W.; ESTERBAUER, H.; SINNER, M. & STEINER, W. “Production of high level of cellulose-free and thermostable xylanase by a wild strain of *Thermomyces lanuginous* using beechwood xylan”. *J. Biotechnol.*, **30**:283-297, 1993.

GUPTA, R., JUNG, E. & BRUNAK, E. “Prediction of N-glycosylation sites in human proteins” 2004 – Tipo referência: trabalho não publicado, 2011.

HENRISSAT, B. “A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities”. *Biochem. J.*, **280**, 309-316, 1991.

HERNANDEZ, A.; COPA-PATINO, J. L. & SOLIVERI, J. “xln23 from *Streptomyces chattanoogensis* UAH23 encodes a putative enzyme with separate xylanase and arabinofuranosidase catalytic domains”. *DNA Seq*, **12**:167–77, 2001.

HESSING, J. G. M.; van ROTTERDAM, C.; VERBAKEL, J. M. A.; ROZA, M; MAAT, J. & van GORCOM, R. F. M. *et al.* “Isolation and characterization of a 1,4-β-endoxylanase gene of *A. awamori*”. *Curr Genet*, **26**:228–32, 1994.

HOSTETTLER, F.; BOREL, E. & DEUEL, H. “Über die Reduktion der 3,5-Dinitrosalicylsäure durch Zucker”. *Helvetica Chimica Acta*, 34 (6) 2132–2139, 1951.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, R.; JANSEN van RENSBURG, E. L. & HOWARD, S. “Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production”. *African Journal of Biotechnology*, **2**(12): 602-619, 2003.

HU, J.; ARANTES, V. & SADDLER, J. N. “The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect?” *Biotechnology for Biofuels*, **4**:36, 2011.

ITO, K.; IWASHITA, K. & IWANO, K. “Cloning and sequencing of the xynC gene encoding acid xylanase of *Aspergillus kawachii* ”. *Biosci Biotechnol Biochem*, **56**:1338-1340, 1992a.

ITO, K.; OGASAWARA, H.; SUGIMOTO, T. & ISHIKAWA T. “Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachi*”. *Biosci Biotechnol Biochem*, **56**:547–550, 1992b.

JEFFRIES, T. W. “Biochemistry and genetics of microbial xylanases”. *Curr. Opin. Biotechnol*, **7**:337-342, 1996.

JEYA, M.; THIAGARAJAN, S.; LEE, J.K. & GUNASEKARAN, P. “Cloning and expression of GH11 xylanase gene from *Aspergillus fumigates* MKU1 in *Pichia pastoris*”. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **108** (1): 24-29, 2009.

JULENIUS, K., MØLGAARD, A., GUPTA, R., BRUNAK, S. “Prediction, conservation analysis and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation site”. *Glycobiology*, **15**: 153, 2005.

KANG, M. K.; MAENG, P. J. & RHEE, Y. H. “Purification and Characterization of Two Xylanases from Alkalophilic *Cephalosporium* sp. Strain RYM-202”. *Aplied and environmental microbiology*, **62**(9):3480–3482, 1996.

KEEGSTRA, K. “ Plant cell walls”. *Plant Physiology*, **154**:483–486, 2010.

KEN K. Y. WONG, K. K. Y; TAN, L. U. L. & SADDLER, J. N. “Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications”. *Microbiological reviews*, **52**:305-317, 1988.

KHANDEPARKER, R. & NUMAN, M. Th. “Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology”. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **35**:635–644, 2008.

KIMURA, T.; ITO, J.; KAWANO, A. MAKINO, T. KONDO, H.; KARITA, S.; SAKKA, K. OHMIYA, K. “Purification, characterization and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium* sp. 40”. *Biotechnol. Biochem.*, **64**:1230-1237, 2000.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V. & FUGLSANG, C. C. “ Industrial enzyme applications”. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**:345–351, 2002.

KRENGEL, U. & DIJKSTRA, B. W. “Three-dimensional structure of endo-1,4- β -xylanase I from *Aspergillus niger*: molecular basis for its low pH optimum”. *J Mol Biol*, **263**:70–78, 1996.

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

KUMAR, R.; SINGH, S. & SINGH, O. V. “Bioconversion of lignocelulosic biomass: biochemical and molecular perspectives”. *J. Ind. Microbiol Biotechnol*, **35**, 377-391, 2008

La GRANGE, D. C.; PRETORIUS, I. S.; VAN ZYL, W. H. "Expression of a *Trichoderma reesei* beta-xylanase gene (XYN2) in *Saccharomyces cerevisiae*." *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**:1036-1044, 1996.

LAEMMLI, U. K. “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”. *Nature*, **227**(5259):680-685, 1970.

LEE, J. “Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol”. *Journal of Biotechnology*, **56**, 1-24, 1997.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M. & WANG, X. “Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering”. *Computacional and structural biotechnology journal*, **2**(3), 2012.

LUTTIG, M.; PRETORIUS, I. S. & VANZYL, W. H. “Cloning of two beta-xylanase-encoding genes from *Aspergillus niger* and their expression in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Biotechnol Lett*, **19**:411–415, 1997.

MARTIN, M. M. & WEBER, N. A. “Cellulose-Utilizing Capability of Fungus Cultured by Attine Ant *Atta Colombica Tonsipes*”. *Annals of the Entomological Society of America*, **62**(6):1386, 1969.

McIlvaine, T.C. “A buffer solution for colorimetric comparison”. *J. Biol. Chem.*, **49**(1), 183–186.

MICKLOS, D. A., FREYER, G. A., CROTTY, D. A. A ciência do DNA. Porto Alegre: Artmed, 2005.

MOHNEN, D. “ Pectin structure and biosynthesis”. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**:266–277, 2008.

NAKAMURA,S.; WAKABAYASHI,K.;NAKAI,R.; AONO,R & HORIKOSHI, K.” Purification and Some Properties of an Alkaline Xylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41M-1”. *Applied and Enviromental Microbiology*, **59** (7):2311-2316, 1993.

NELSON, D. L. & COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger -5. ed.- Porto Alegre: Artmed, 2011.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.& BRAUN, R. “Dillute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **98**, 49-58, 2002.

OKU, T.; ROY, C.; WATSON, D. C.; WAKARCHUK, W. W.; CAMPBELL, R. L.; YAGUCHI, M. *et al.* “Amino acid sequence and thermostability of xylanase A from *Schizophyllum commune*”. *FEBS Lett*, **334**:296–300, 1993.

PAËS, G.; BERRIN, J-G. & BEAUGRAND, J. “GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications”. *Biotechnology Advances*, **30**, 564–592, 2012.

PETERSEN, T. N., BRUNAK, S., von HEIJINE, G., NIELSEN, H. “SignalP4.0: discriminating signal peptide from transmembrane regions”. *Nature methods*, **8**:785, 2011.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATI, A. C. S.; MONTI, R., TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. “Xylanases from fungi: properties and industrial applications”. *Appl Microbiol Biotechnol*, **67**:577–591, 2005.

PRADE, R. A. “Xylanases: from Biology to BioTechnology”. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **13**(1), 101-132, 1996.

PULS, J., Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: “Relationship between hemicelluloses structure and enzymes required for hydrolysis”. *Macromolecular Symposia*, **120**(1), 183-196, 1997.

RIDLEY, B. L.; O’NEILL, M. A. & MOHNEN, D. “Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling”. *Phytochemistry*, **57**:929–967, 2001.

SÁ-PEREIRA, P., PAVEIA, H., COSTA-FERREIRA, M., AIRES-BARROS, M. R. “A new look at xylanases”. *Molecular Biotechnology*, **24**:257, 2003.

SAHA, B. C. “Hemicellulose bioconversion”. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, **30**,279-291, 2003.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3^o ed.. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SÁNCHEZ, C. “Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi”. *Biotechnology Advances*, **27**, 185-194, 2009.

SAPAG, A.; WOUTERS, J.; LAMBERT, C.; IOANNES, P.; EYZAGUIRRE, J. & DEPIEREUX, E. “The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships”. *Journal of Biotechnology*, **95**: 109-131, 2002.

SCHÄGGER, H. & von JAGOW. G. “Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa”. *Anal. Biochem.*, **166**(2), 368-379, 1987.

SCHIØTT, M.; LICHT, H.H.F.; LANGE, L.& BOOMSMA, J. J. “Towards a molecular understanding of symbiont function: Identification of a fungal gene for the degradation of xylan in the fungus gardens of leaf-cutting ants”. *BMC Microbiology*, **8**, 40, 2008.

SCHIØTT, M.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; ROEPSTORFF, P. & BOOMSMA, J. J. “Leaf-cutting ant fungi produce cell wall degrading pectinase complexes reminiscent of phytopathogenic fungi”. *BMC Biology*, **8**(156):1, 2010.

SCHLACHER, A.; HOLZMANN, K.; HAYN, M.; STEINER, W. & SCHWAB, H. “Cloning and characterization of the gene for the thermostable xylanase XynA from *Thermomyces lanuginosus*”. *J Biotechnol*, **49**:211–218, 1996.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. “Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels”. *Anal. Chem.*, **68**(5): 850-858, 1996.

SILVA, A.; BACCI JR., M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. & HEBLING, M. J. A. “Production of Polysaccharidases in Different Carbon Sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer), the Symbiotic Fungus of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens* Linnaeus”. *Current Microbiology*. , **53**: 68-71, 2006.

SILVA, N. L. C. “Produção de bietanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose”. Tese (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, R. N., MONTEIRO, V. N., ALCANFOR, J. D. X., ASSIS, E. M., ASQUIERI, E. R. “Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel”. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **23**(3): 337, 2003.

SINGH, S. MADLALA, A. M. & PRIOR, B. A. “Thermomyces lanuginosus: properties of strains and their hemicellulases”. *FEMS Microbiology Reviews*, **27**:3-16, 2003.

St. JOHN, F. J.; RICE, J. D. & PRESTON, J. F. “Characterization of XynC from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* Strain 168 and analysis of its role in depolymerization of Glucuronoxylan”. *J Bacteriol*, **188**:8617–8626, 2006.

STICKLEN, M. B. “ Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol”. *Nature Reviews: genetics*, **9**:433-443, 2008.

SUBRAMANIYAN, S.& PREMA, P. “Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application”. *Critical Reviews in Biotechnology*, **22**(1), 33-46, 2002.

SUMNER, J. B. “ Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine”. *J. Biol. Chem.*, **47**: 5, 1921.

TÖRRÖNEN, A. & ROUVINEN, J. "Structural and functional properties of low molecular weight endo- 1,4-p –xylanases”. *Journal of Biotechnology* , **57**:137-149, 1997.

TÖRRÖNEN, A. & ROUVINEN, J. “Structural Comparison of Two Major endo-1,4-Xylanases from *Trichoderma reesei*”. *Biochemistry*, **34**:847-856, 1995.

TÖRRÖNEN, A. ; MACH,R. L.; MESSNER, R.; GONZALEZ, R.; KALKKINEN, N.; HARKKI, A & KUBICEK, C. P. “The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: characterization of both enzymes and genes”. *Biotechnology (N Y)*, **10**(11): 1461-1465, 1992.

TÖRRÖNEN, A.; HARKKI, A. ROUVINEN, J. “Three-dimensional structure of endo-1,4- β -xylanase II from *Trichoderma reesei*: two conformational states in active site. *EMBO J.*, **13**, 2493-2501, 1994.

van den BRINK, J. & VRIES, R. P. “Fungal enzymes sets for plant polysaccharide degradation”. *Appl. Microbiol Biotechnol*, **91**:1477-1492, 2011.

VRŠANSKÁ, M.; KOLENOVÁ, K.; PUCHART, V. & BIELY, P. “Mode of action of glycoside hydrolase family 5 glucuronoxylan xylanohydrolase from *Erwinia chrysanthemi*”. *FEBS J.*, **274**:1666–77, 2007.

WANG, S-Y.; HU, W.; LIN, X-Y; WU, Z-H. “ A novel cold-active xylanase from the cellulolytic myxobacterium *Sorangium cellulosum* So9733-1: gene, cloning, expression and enzymatic characterization”. *Appl. Microbiol Biotechnol*, **93**(4):1503-1512, 2012.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L. & SADDLER, J. N. “Multiplicity of β -1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications”. *Microbiol Rev*, **52**:305–317, 1988.

XIAO, Z.; BOYD, J.; GROSSE, S.; BEAUCHEMIN, M.; COUPE, E. & LAU, P. C. K. “Mining *Xanthomonas* and *Streptomyces* genomes for new pectinase-encoding sequences and their heterologous expression in *Escherichia coli*”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **78**:973, 2008.

YOURNO, J.; KOHNO, T. & ROTH, J. R. “Enzyme evolution: Generation of a bifunctional enzyme by fusion of adjacent genes. *Nature*, **228**:820–825, 1970.

ZHOU, C. Y.; BAI, H. Y.; DENG, S. S.; WANG, J.; ZHU, J.; WU, M. C., & WANG, W. “Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usamii* and its expression in *Escherichia coli*”. *Bioresour Technol*, **99**: 831-838, 2008.