

SILVANA RODRIGUES PIRES

**ENZIMAS CELULOLÍTIICAS FÚNGICAS E APLICAÇÃO NO
BRANQUEAMENTO DE POLPA KRAFT E NA SACARIFICAÇÃO DE
BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P667e
2013

Pires, Silvana Rodrigues, 19810-

Enzimas celulolíticas fúngicas e aplicação no branqueamento de polpa kraft e na sacarificação de biomassa lignocelulósica / Silvana Rodrigues Pires. – Viçosa, MG, 2013.

xiv, 84f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: José Humberto de Queiroz

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Enzimas de fungos. 2. Branqueamento. 3. Hidrólise.
4. Biomassa vegetal. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola.
II. Título.

CDD 22. ed. 572.7

SILVANA RODRIGUES PIRES

**ENZIMAS CELULOLÍTICAS FÚNGICAS E APLICAÇÃO NO
BRANQUEAMENTO DE POLPA KRAFT E NA SACARIFICAÇÃO DE
BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2013.

Prof. Gustavo Costa Bressan

Prof^a. Joana Gasperazzo Ferreira

Prof^a. Marli Lourdes de Oliveira

Prof^a. Luciano Gomes Fietto

Prof. José Humberto de Queiroz
(Orientador)

A minha filha, Maria Luísa, pelo amor incondicional e sorriso nos momentos difíceis.

*Ao meu esposo, Gabriel,
pela força e amor dedicados.*

*Aos meus pais, Sonia e Walter e meus irmãos,
Adriana, Viviane e Rochiel pela segurança e por confiar em mim.*

A minhas amigas Adriane, Ana Paula, Joana, Vanessa e Josiane pelo carinho e apoio.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante, que me guiou e deu força neste período.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pelo apoio e por sempre acreditarem em mim. Aos meus irmãos, pelo amor, carinho e apoio.

A minha família Gabriel e Maria Luísa, pela força, por acreditar. Por compreenderem a minha ausência. Por serem meus amores.

Ao amigo Thiago Dutra, pela ajuda nos experimentos e todo apoio nos momentos difíceis, pelas palavras de sabedoria e orações. Valeu mesmo meu amigo.

A meu orientador, professor José Humberto de Queiroz, por toda confiança e apoio no momento em que mais precisei.

Aos professores Valéria Monteze Guimarães, Sebastião Tavares de Resende, Maria Goreti de Almeida Oliveira e Jorge Luiz Colodette pelo apoio para que este trabalho se tornasse real.

Aos professores, Joana Gasperazzo Ferreira, Gustavo Costa Bressan e Ana Paula Gomes Soares pela presença nos momentos difíceis e pela participação na banca examinadora.

Aos professores Luciano Gomes Fietto e Marli Lourdes de Oliveira pela participação na banca examinadora.

A professora Maria Cristina Baracat Prereira e todos em seu laboratório pela ajuda.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela contribuição acadêmica e motivação.

À Eduardo Monteiro pelo apoio.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, pela formação acadêmica.

Aos amigos dos Laboratórios de Tecnologia Bioquímica, Análises Bioquímicas e Biologia Molecular e Fitogeografia, alguns de vocês foram realmente especiais.

Às amigas Adriane, Ana Paula, Joana, Vanessa e Josiane por toda força e oração.

Aos amigos da UEMG, pela compreensão e apoio.

A funcionária Marlene pela ajuda sempre que precisei.

Às agências financiadoras: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais–FAPEMIG e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico–CNPq, Brazil.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para o sucesso deste trabalho, meus agradecimentos.

BIOGRAFIA

SILVANA RODRIGUES PIRES, filha de Walter José Pires e Sônia Maria Rodrigues Pires, nasceu no dia primeiro de dezembro de 1981, em Ubá, MG.

Em março de 2001, ingressou no curso de Bioquímica, na Universidade Federal de Viçosa, MG, graduando-se como Bacharel em Bioquímica em janeiro de 2005.

Em agosto de 2005, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, em nível de mestrado, na mesma instituição, concentrando seus estudos na área de Biologia Molecular de Plantas, defendendo sua dissertação em outubro de 2007.

Ingressou, em março de 2008, no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola da UFV, em nível de doutorado, submetendo-se a defesa em 28 de fevereiro de 2013.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Atual Contexto Energético.....	3
2.2. Biomassa Lignocelulósica	4
2.3. O Complexo Lignocelulósico e sua Degradação	7
2.3.1 Celulose e a Ação das Celulases	7
2.3.1.1. Produção e Estudos com Celulases	10
2.3.1.2. Técnicas Aplicadas à Produção e Estudo de Celulases	11
2.3.2. Hemicelulose e a Ação das Hemicelulases.....	12
2.3.3. Lignina.....	14
2.4. Microrganismos Lignocelulolíticos.....	14
2.5. Aplicações Biotecnológicas das Celulases e Hemicelulases	15
2.5.1. Produção de Etanol a partir de Material Lignocelulósico	15
2.5.1.1. Pré-tratamento	16
2.5.1.2. Sacarificação	18
2.5.1.3. Fermentação Etanólica.....	19
2.5.1.4. Principais Gargalos no Processo de Obtenção de Etanol a Partir de Material Lignocelulósico.....	20
2.5.2. Branqueamento de Polpa de Celulose	21
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
4. OBJETIVOS	31
4.1. Objetivos Gerais.....	31
4.2. Objetivos Específicos	31
5. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA XILANASE DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> E APLICAÇÃO NA SACARIFICAÇÃO DE BIOMASSA E NO BRANQUEAMENTO DE POLPA	32
5.1. RESUMO.....	32
5.2. INTRODUÇÃO	33
5.3. MATERIAL E MÉTODOS	35

5.3.1. Cultivo do Microrganismo e Produção da Enzima	35
5.3.2. Ensaio Enzimático	35
5.3.3. Concentração Protéica	36
5.3.4. Purificação da Xilanase	36
5.3.5. SDS-PAGE	36
5.3.6. Zimograma.....	37
5.3.7. Efeitos do pH e da Temperatura na Atividade e na Estabilidade da Xilanase..	37
5.3.8. Estabilidade Térmica e Tempo de Meia-vida da Xilanase	37
5.3.9. Determinação dos Parâmetros Cinéticos e Especificidade de Substratos	38
5.3.10. Efeito de Íons, EDTA e SDS	38
5.3.11. Aplicações da Xilanase	39
5.3.11.1 Sacarificação de Bagaço de Cana Pré-tratado.....	39
5.3.11.2 Branqueamento de Polpa de Celulose.	40
5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.4.1. Purificação da Xilanase	42
5.4.2. Efeitos do pH e da Temperatura na Atividade e na Estabilidade da Xilanase de <i>F. oxysporum</i>	45
5.4.3. Parâmetros Cinéticos e Especificidade de Substratos	47
5.4.4. Efeito de Íons, EDTA e SDS na Atividade da Xilanase.....	48
5.4.5. Sacarificação de Bagaço de Cana.....	50
5.4.6. Branqueamento de Polpa Kraft	52
5.5. CONCLUSÕES.....	55
5.6. AGRADECIMENTOS	56
5.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
6. PRODUÇÃO, CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE UMA ENDOGLICANASE B DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i>	60
6.1. RESUMO	60
6.2. INTRODUÇÃO	61
6.3. MATERIAL E MÉTODOS	63
6.3.1. Microrganismo e Manutenção da Cultura	63
6.3.2. Condições de Cultivo.....	63
6.3.3. Ensaio de Atividade de Endoglicanase.....	63
6.3.4. Clonagem do Gene da Endoglicanase de <i>A. niger</i>	64

6.3.4.1. Busca em Banco de Dados e Desenho de <i>Primers</i> Específicos para Amplificação.....	64
6.3.4.2. Extração de RNA Total.....	64
6.3.4.3. Síntese da Primeira Fita de cDNA.....	65
6.3.4.4. Amplificação do Gene da Endoglicanase Via Reação de PCR.....	66
6.3.4.5. Purificação dos Produtos de Amplificação da Reação de PCR	66
6.3.4.6. Clonagem do Fragmento de PCR.....	66
6.3.4.7. Transformação de <i>E. coli</i> e Diagnóstico Molecular dos Transformantes	67
6.3.4.8. Extração do DNA Plasmidial e Sequenciamento	68
6.3.5. Caracterização <i>in silico</i> do Gene da Endoglicanase B de <i>A. niger</i>	68
6.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
6.4.1. Clonagem do Gene da Endoglicanase B de <i>A. niger</i>	70
6.4.2. Caracterização <i>in silico</i> do Gene da Endoglicanase B de <i>A. niger</i>	72
6.4.2.1. Predição de Peptídio Sinal	72
6.4.2.2. Estudo de Prováveis Modificações Pós-traducionais	72
6.4.2.3. Alinhamentos Múltiplos de Sequencias.....	73
6.5. CONCLUSÕES.....	75
6.6. PERSPECTIVAS	76
6.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
CONCLUSÃO GERAL	79
ANEXO I.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica	6
Figura 2. Ilustração das partes cristalina e amorfa da celulose. A: celulose cristalina no centro da microfibrila envolta pelo substrato amorfo. B: Regiões cristalinas e amorfas alternadas ao longo da estrutura	7
Figura 3. Representação da atividade das celulasas celobiohidrolase, endo- β -1,4-glicanase e β -glicosidase	9
Figura 4. Ação da celulase na superfície da fibra de celulose, interação entre o domínio de ligação à celulose (CBD) e a superfície do polímero	11
Figura 5. Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana.....	13
Figura 6. Esquema da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica	16
Figura 7. Alterações estruturais na microfibrila celulósica determinada pelo pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.....	17
Figura 8. Esquema representativo de um processo de produção da polpa de celulose.....	22
Figura 9. Perfis de eluição da xilanase de <i>F. oxysporum</i> . (A) Cromatografia de Troca Iônica em CM-Sepharose. (B) Cromatografia de Exclusão Molecular em coluna Sephacryl S-200. Absorbância a 280 nm (\circ); Atividade de xilanase (\bullet); Gradiente linear de NaCl (-); (*) Pico de xilanase	43
Figura 10. SDS-PAGE (A) e Zimograma (B) da xilanase de <i>F. oxysporum</i> . Linha M: marcador de peso molecular; Linha 1: xilanase de <i>F. oxysporum</i> ; (B): atividade de xilanase sobre o gel não desnaturado, examinado com Vermelho Congo. A seta X indica a banda obtida no gel	44
Figura 11. Efeitos do pH sobre a atividade (\bullet) e estabilidade (\circ) (A) e os efeitos da temperatura na atividade da xilanase purificada de <i>F.oxysporum</i> (B).....	46
Figura 12. Efeitos de diferentes temperaturas sobre a estabilidade da xilanase de <i>F. oxysporum</i> . Temperaturas: 50° C (A); 55 °C (B) e 60 °C (C).....	47
Figura 13. Liberação de açúcares redutores durante a sacarificação enzimática de bagaço de cana alcalinamente tratado usando o coquetel de celulasas comerciais, Multifect ® CL e Multifect ® CL suplementado com xilanase de <i>F. oxysporum</i> . Multifect ® CL (\bullet); Multifect ® CL + 150 U de xilanase de <i>F. oxysporum</i> (\circ); Multifect ® CL + 300 U de xilanase de <i>Fusarium oxysporum</i> (\blacktriangledown))......	51
Figura 14. Gel de agarose para visualização do diagnóstico dos transformantes por PCR. (M) marcador de peso molecular de 100 pb (FERMENTAS); 1-6: sequencia da <i>AncEGLB</i>	

amplificada com oligonucleotídios específicos para a proteína. Em vermelho, destacadas as bandas 1 e 4, nas quais o fragmento de DNA foi inserido ao vetor..... 70

Figura 15. Sequencia nucleotídica (CDS) da endoglicanase B de *A. niger* (Número de acesso: AJ224452). Destacada, em vermelho, a CDS da endoglicanase B de *A. niger* clonada. As preditas regiões de anelamento dos primers foram sublinhadas.....71

Figura 16. Sequencia deduzida de aminoácidos do cDNA da endoglicanase B de *A. niger* (Número de acesso: CAA11965). A sequencia deduzida de aminoácidos da endoglicanase B de *A. niger* clonada foi sublinhada. Em vermelho, resíduos conservados na sequencia de alguns membros desta família 71

Figura 17. Predição de Modificações pós-traducionais no programa InterProscan para a endoglicanase B de *A. niger* 73

Figura 18. Dendrograma construído a partir do alinhamento múltiplo da sequencia nucleotídica de *AncEGLB* com as sequencias nucleotídicas de celulasas depositadas no banco de dados da NCBI. Foram alinhadas as seguintes sequencias nucleotídicas: *AnEGLB*, endoglicanase B de *A. niger* (AJ224452); *AkEGLB*, endoglicanase B de *A. kawachii* (AB055432); *AndEGLB*, endo- β -1,4-glicanase B de *A. nidullans* (AF420021); *AnEGLA*, endoglicanase A de *A. niger* (XM-001400865); *SrEGL*, endoglicanase de *S. rochei* (X73953); *RmCELA*, celulase A de *R. marinus* (U72637); e *AoEGLA*, celulase A de *A. oryzae* (D83731). No retângulo azul estão agrupadas as endoglicanasas B. No retângulo vermelho foi destacada a endoglicanase B clonada..... 74

Figura 1A. Alinhamento múltiplo da sequencia de aminoácidos da proteína (*AncEGLB*) com outros membros da família 12 das glicosil-hidrolases depositadas no banco de dados da NCBI. Resíduos conservados estão destacados com estrela. Foram alinhadas as seguintes sequencias aminoacídicas: *AnEGLB*, endoglicanase B de *A. niger* (CAA11965); *SrEGL*, endoglicanase de *S. rochei* (CAA52139); *RmCELA*, celulase A de *R. marinus* (AAB65594); e *AoEGLA*, celulase A de *A. oryzae* (BAA22588) 80

Figura 2A. Alinhamento múltiplo da sequencia nucleotídica da proteína (*AncEGLB*) com as sequencias nucleotídicas de celulasas depositadas no banco de dados da NCBI. Resíduos conservados estão marcados com estrela. Foram alinhadas as seguintes sequencias nucleotídicas: *AnEGLB*, endoglicanase B de *A. niger* (AJ224452); *AkEGLB*, endoglicanase B de *A. kawachii* (AB055432); *AndEGLB*, endo- β -1,4-glicanase B de *A. nidullans* (AF420021); *AnEGLA*, endoglicanase A de *A. niger* (XM-001400865); *SrEGL*, endoglicanase de *S. rochei* (X73953); *RmCELA*, celulase A de *R. marinus* (U72637); e *AoEGLA*, celulase A de *A. oryzae* (D83731) 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção mundial de etanol (milhões de litros).....	4
Tabela 2. Composição de alguns materiais lignocelulósicos.	5
Tabela 3. Procedimentos analíticos para caracterização físico-química de polpas de celulose branqueadas.	41
Tabela 4. Etapas para a purificação da xilanase de <i>F. oxysporum</i>	44
Tabela 5. Especificidade de substratos da xilanase de <i>F. oxysporum</i> purificada.	48
Tabela 6. Efeito de íons, EDTA e SDS sobre a atividade da xilanase de <i>F. oxysporum</i>	49
Tabela 7. Efeitos da utilização de xilanases no branqueamento de polpas Kraft de <i>E. urograndis</i>	53

RESUMO

PIRES, Silvana Rodrigues, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013.
Enzimas celulolíticas fúngicas e aplicação no branqueamento de polpa Kraft e na sacarificação de biomassa lignocelulósica. Orientador: José Humberto de Queiroz.

O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto com elevada concentração de carboidratos e disponível em grande quantidade. É constituído por celulose, hemicelulose e lignina, que juntas formam um complexo extremamente resistente ao ataque de microrganismos. Muitos fungos produzem enzimas hidrolíticas, como celulasas e hemicelulasas, capazes de promover a hidrólise desta biomassa, liberando açúcares para a fermentação. Este trabalho visou a caracterização de enzimas fúngicas e algumas de suas possíveis aplicações industriais. Neste contexto, foi realizada a produção, purificação e caracterização bioquímica de uma xilanase de *Fusarium oxysporum* e sua aplicação no processo de branqueamento de polpa Kraft e na sacarificação de bagaço de cana. A xilanase exibiu massa molecular de aproximadamente 21 kDa no SDS-PAGE. A proteína foi purificada através de ultrafiltração e cromatografia de troca iônica e de exclusão molecular. A xilanase exibiu máxima atividade a 60 °C e pH 6,0. A enzima foi capaz de hidrolizar substratos como xilana *birchwood* e xilana *oat spelts*. Os valores de K_M e V_{max} , utilizando o substrato xilana *birchwood*, foram 0,85 mM e 0,23 μ M/min, respectivamente. A atividade enzimática foi inibida por SDS, Fe^{+2} , Cu^{+2} , Al^{+3} , dentre outros e foi ativada por Mg^{+2} . A xilanase exibiu alta termoestabilidade a 50 °C, com $t_{1/2}$ de 26,1 h, o que pode ser importante para futuras aplicações industriais. A enzima aumentou significativamente a taxa de hidrólise do bagaço de cana alcalinamente tratado, quando adicionada a um coquetel de celulose comercial. Foi avaliada também a ação da xilanase em testes de branqueamento de polpa Kraft, nos quais a adição da enzima ao licor de branqueamento promoveu decréscimo do número Kappa. Neste trabalho também foi realizada a clonagem de uma endoglicanase B produzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* e sua caracterização *in silico*. Foram executadas análises computacionais com o fragmento sequenciado, como predição de peptídeo sinal e modificações pós-traducionais. A proteína clonada foi designada AncEGLB (endoglicanase B de *A. niger* clonada). Foram realizados também, alinhamentos múltiplos de sequencia com outras celulasas.

ABSTRACT

PIRES, Silvana Rodrigues, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2013. **Fungal cellulolytic enzymes and application in bleaching of the pulp Kraft and in the saccharification of lignocellulosic biomass.** Adviser: José Humberto de Queiroz.

The sugarcane bagasse is a by-product with high carbohydrate concentration and available in great amount. It is constituted by cellulose, hemicellulose and lignin, that when joined form an extremely resistant compound to the attack of microorganisms. Many fungus produce hydrolytic enzymes, as cellulases and hemicellulases, capable to promote the hydrolysis of this biomass, liberating sugars for the fermentation. In this context, the production, purification and biochemical characterization of a xylanase of *Fusarium oxysporum* and your application in the process of bleaching of the pulp Kraft and in the saccharification of cane bagasse was realized. The xylanase exhibited molecular mass of approximately 21 kDa in SDS-PAGE. The protein was purified using ultrafiltration and ion exchange and molecular exclusion chromatography. The xylanase exhibited maxim activity at 60°C and pH 6.0. The enzyme was capable of hydrolyze substrates as birchwood xylan and oat spelt xylan. The K_M and V_{max} values, using the substrate birchwood xylan were 0.85 mM e 0.23 $\mu\text{M}/\text{min}$, respectively. The enzymatic activity was inhibited by SDS, Fe^{+2} , Cu^{+2} , Al^{+3} , among other and it was activated by Mg^{+2} . The xylanase exhibited high thermostability at 50 °C, with $t_{1/2}$ of 26.1 h, what can be important for future industrial applications. The enzyme increased the rate of hydrolysis of the alkali-treated sugarcane bagasse significantly, when added it to the commercial cocktail cellulose. It was also evaluated the action of the xylanase in tests of bleaching of the pulp Kraft, in which the addition of the enzyme to the liqueur of bleaching promoted decrease of Kappa number. This work was also performed the cloning of an endoglucanase the cloning of an endoglucanase B produced by the fungus filamentous *Aspergillus niger* and your characterization *in silico* were accomplished. Computing analyses were executed with the sequenced fragment, as prediction of signal peptide and post-translational modifications. The cloned protein was designated *AncEGLB* (endoglucanase B from *A. niger* cloned). They were also accomplished, multiple alignments of sequence with other cellulases.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A conversão de biomassa lignocelulósica em combustível, de maneira economicamente viável, é um objetivo ainda não alcançado. O processo biológico para a conversão de biomassa lignocelulósica em etanol requer deslignificação e despolimerização da celulose e hemicelulose promovendo a formação de açúcares livres e a fermentação da mistura de pentoses e hexoses.

Até o momento, o custo de produção de etanol a partir de biomassa é mais alto que a partir da cana de açúcar e do amido. Para se tornar competitiva, a conversão da biomassa em etanol necessita utilizar enzimas com maior capacidade de hidrólise e com preços menores que os praticados atualmente. Além disso, a identificação de microrganismos melhores e mais eficientes, com capacidade de fermentar pentose, e com alta produção de enzimas hidrolíticas deverá contribuir para a redução dos custos de produção. Outra etapa que pode ser melhorada é a sacarificação, que compreende o pré-tratamento, seguido da hidrólise ácido/enzimática da biomassa lignocelulósica, para liberação de açúcares fermenticíveis.

Muitos microrganismos presentes na natureza, como os fungos e as bactérias, são capazes de fazer a bioconversão dos substratos lignocelulósicos em unidades de fácil assimilação para o seu metabolismo (Pandey et al., 2000). As enzimas hidrolíticas, como celulasas e hemicelulasas têm papel fundamental nessa bioconversão. As chamadas enzimas celulolíticas são utilizadas em variados setores e possuem vasta aplicação industrial. Podemos destacar aplicações nas indústrias: têxtil, nos processos de biopolimento (desfibrilação de tecidos como algodão, linho, lã e viscose) e bioestonagem (amaciamento e desbotamento do brim); de polpa e papel, para a modificação controlada de propriedades mecânicas da polpa e liberação de tintas da superfície das fibras a serem recicladas; em lavanderia, de forma a aumentar o brilho, a remoção de sujeiras e a maciez dos tecidos, além de amenizar o desgaste das peças, também utilizadas na produção de ração animal e biocombustíveis, processamento de amido, fermentação de grãos para produção de álcool, extração de sucos de frutas, dentre outras.

Não podemos deixar de citar a aplicação destas enzimas nas indústrias de papel e celulose. A habilidade de promover a degradação seletiva de xilanas confere as xilanases um grande potencial biotecnológico. Na indústria de papel e celulose as xilanases podem ser utilizadas durante o processo de branqueamento da polpa,

auxiliando na remoção de resíduos de xilanas que precipitam sobre as fibras de celulose durante o processo de polpação. A fração xilana precipitada sobre as fibras está geralmente associada à resíduos de lignina, os quais são responsáveis pela cor escura da polpa de celulose.

Com base nas diversas aplicações destas enzimas e na possibilidade de maior entendimento da atuação de enzimas celulolíticas, o presente trabalho estudou o crescimento de microrganismos produtores de celulasas e hemicelulasas, de forma a maximizar a produção destas enzimas. Foi realizada a produção, isolamento e caracterização bioquímica de uma nova xilanase de *Fusarium oxysporum* e sua aplicação no processo de branqueamento de polpa Kraft e na sacarificação de bagaço de cana como aditivo em coquetel celulósico. Foi executada também a clonagem de uma endoglicanase B produzida pelo fungo *Aspergillus niger* e sua caracterização *in silico*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Atual Contexto Energético

Torna-se cada vez mais visível a crescente demanda mundial por aumento do consumo e utilização de energia em contraste com a diminuição das reservas de combustíveis fósseis, especialmente petrolíferas. Vários países vêm discutindo e procurando alternativas para substituição de combustíveis fósseis por fontes renováveis, visando à diminuição dos impactos ambientais (Souza, 2011).

A matriz energética mundial tem participação total de 80% de fontes de carbono fóssil, sendo 36% de petróleo, 23% de carvão e 21% de gás natural. O Brasil tem se destacado pela elevada participação das fontes renováveis em sua matriz energética (cerca de 44%), por possuir uma rica bacia hidrográfica (com vários rios de planalto e água em abundância) e características especiais como grande biodiversidade e intensa radiação solar, além de possuir grande área para expansão da agricultura (Biodieselbr, 2012).

O etanol ganha importância no cenário mundial como principal opção de fonte de energia alternativa ao petróleo, apresentando baixo custo de produção, bem como baixos níveis de poluição, além de ser renovável (Tabela 1). O Brasil domina a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar (mais viável econômica e ambientalmente) (Lin e Tanaka, 2006). O país vem desenvolvendo novas tecnologias para obtenção de biocombustíveis, sem precisar aumentar a área de terra plantada e, principalmente, sem necessidade de desmatamentos (Pereira Jr. et al., 2009; Santos et al., 2012). Entre as novas tecnologias destacam-se: introdução de novas variedades de cana-de-açúcar e desenvolvimento de novas tecnologias que aproveitem integralmente a biomassa residual da planta para produzir etanol. Neste contexto, a produção do chamado etanol lignocelulósico ou de segunda geração, a partir de resíduos agroindustriais, como o bagaço de cana-de-açúcar, apresenta-se como promissora fonte de substituição de combustíveis fósseis, podendo representar um aumento substancial da produção de etanol, o que tem motivado as pesquisas na área.

Tabela 1. Produção mundial de etanol (milhões de litros). Adaptado de Bioagência, 2012.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Europa	1,627	1,882	2,855	3,645	4,254	4,429	4,973
África	0	55	65	100	130	150	235
América do Norte e Central	18,716	25,271	35,946	42,141	51,584	54,765	54,580
América do Sul	16,969	20,275	24,456	24,275	25,964	31,637	21,335
Ásia/Pacífico	1,940	2,142	2,753	2,927	3,115	3,520	3,965
Mundo	39,252	49,625	66,075	73,088	85,047	84,501	85,088

2.2. Biomassa Lignocelulósica

Ao contrário da energia dos combustíveis fósseis, a biomassa é renovável e não contribui para o acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera terrestre, já que praticamente todo CO₂ liberado durante seu uso é absorvido novamente no processo de fotossíntese para sua formação.

Segundo Souza (2011) a biomassa é definida como toda matéria orgânica, seja de origem vegetal ou animal, terrestre ou aquática, oriunda do processo de fotossíntese. São designadas “biomassas tradicionais” a madeira de desflorestamento, resíduos florestais e dejetos de animais (Karekesi et al., 2004). São consideradas “biomassas modernas” as matérias-primas lignocelulósicas como madeira de reflorestamento, bagaço de cana-de-açúcar e outras fontes, desde que utilizadas de maneira sustentável, em processos tecnológicos avançados e eficientes (Guardabassi, 2006).

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, sendo compreendidas, pelos resíduos agroindustriais, pelos resíduos urbanos e madeiras. Dentre essas, os resíduos agroindustriais ganham destaque por serem derivados do processamento de matérias-primas com maior valor agregado (Castro e Pereira Jr., 2010). Em 2007, o Brasil produziu aproximadamente 600 milhões de toneladas de subprodutos agroflorestais, incluindo os resíduos obtidos da indústria de celulose (Silva, 2010).

As biomassas lignocelulósicas representam tecnologias menos agressivas e mais limpas, inseridas no contexto de “Desenvolvimento Sustentável”. A Tabela 2 mostra a composição química parcial de diferentes biomassas lignocelulósicas.

Tabela 2. Composição de alguns materiais lignocelulósicos (Santos et al., 2012).

Biomassa Lignocelulósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38-40	28	7-21
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Fibra de bananeira	60-65	6-8	5-10
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19

A biomassa é constituída por três frações principais (Figura 1): celulose (35-50%), hemicelulose (20-35%) e lignina (10-25%), que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa e recalcitrante, resistente a ataques microbianos. Internamente, as fibrilas da fração celulósica encontram-se dispostas como espirais, de forma a conferir força e flexibilidade ao material. Esta fração encontra-se envolvida pela lignina, cuja função é aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos. A terceira e última fração principal, a hemicelulose, atua como um elo químico entre a celulose e a lignina. Estas características resultam em materiais flexíveis, porém altamente resistentes a espécies químicas (Castro, 2006).

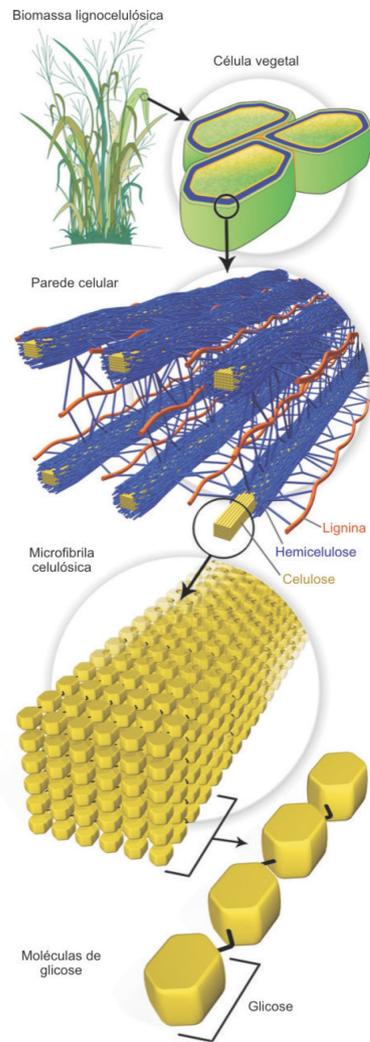


Figura 1. Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica (Santos et al., 2012).

A cana-de-açúcar é uma gramínea de origem asiática pertencente ao gênero *Saccharum* e à espécie *Saccharum officinarum*. É muito cultivada em regiões tropicais e subtropicais e apresenta significativa capacidade de armazenar sacarose em seus tecidos de reserva (Bortolazzo, 2011). O Brasil ocupa atualmente, a primeira posição na produção mundial da cultura (Rodrigues, 2010). Como mostrado na tabela 2 o bagaço de cana apresenta em sua constituição celulose, hemicelulose e lignina com potencial significativo para aumentar a produção de bioetanol (Bortolazzo, 2011).

2.3. O Complexo Lignocelulósico e sua Degradação

Para a utilização da celulose e da hemicelulose, como fonte de açúcares para a fermentação, é necessário que estes polissacarídeos sejam antes hidrolisados através da ação combinada de muitas endo e exo enzimas. A hidrólise completa da celulose e da hemicelulose é catalisada pelas celulases e hemicelulases, respectivamente, capazes de realizar a hidrólise do complexo lignocelulolítico.

2.3.1. Celulose e a Ação das Celulases

A celulose é o composto mais abundante nos materiais lignocelulósicos. É normalmente encontrada associada à hemicelulose e à lignina e possui alto grau de polimerização. Sua estrutura é formada por monômeros de D-glicose unidos por ligações glicosídicas β -1,4. Apresenta estrutura cristalina, em que as fibrilas são unidas por ligações de hidrogênio tanto intra quanto intercadeias de celulose. As regiões cristalinas da celulose são intermediadas por regiões menos compactas, chamadas amorfas, em que as fibras apresentam maior distância uma das outras, permitindo assim maior acesso de moléculas, como enzimas celulolíticas, ao interior das fibras (Figura 2) (Lynd et al., 2002; Jardine et al., 2009; Rabelo, 2010).

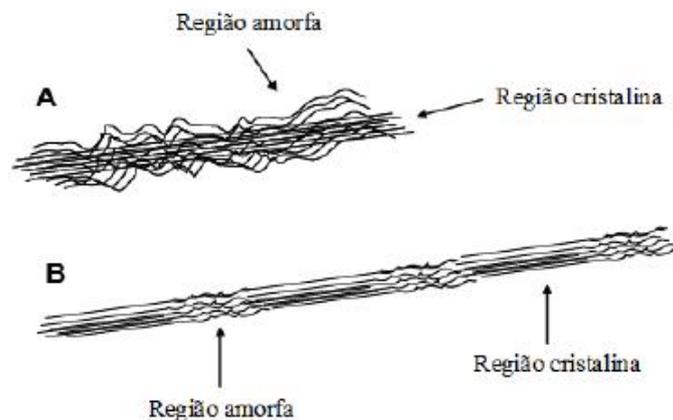


Figura 2. Ilustração das partes cristalina e amorfa da celulose. A: celulose cristalina no centro da microfibrila envolta pelo substrato amorfo. B: Regiões cristalinas e amorfas alternadas ao longo da estrutura (Rabelo, 2010).

As chamadas enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações *O*-glicosídicas, sendo classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a celulase avaliada.

As celulasas são enzimas capazes de clivar a estrutura da celulose. Elas reconhecem as ligações β -1,4 entre as moléculas de glicose e são expressas quando há a necessidade de serem secretadas pelos microrganismos para que estes cresçam em celulose (Kubicek et al., 1993).

As celulasas podem ser agrupadas em três classes principais, as endoglicanases, (EC 3.2.1.4), as exoglicanases (EC 3.2.1.91), e as β -glicosidases (EC 3.2.1.21). As endoglicanases catalisam, de forma aleatória, a hidrólise de ligações glicosídicas β -1,4 no interior da cadeia de celulose nas regiões amorfas, diminuindo o comprimento da cadeia e, conseqüentemente, gerando novos terminais, sendo um redutor e um não redutor. Já as exoglicanases, atuam processivamente nos terminais da cadeia de celulose, promovendo a liberação de celobioligossacarídeos. São constituídas pelas celobiohidrolases (CBH) e glicano hidrolases (GH) que atuam liberando como produtos glicose e principalmente, celobiose (que atua como inibidor da hidrólise). E as β -glicosidases, enzimas que catalisam a formação de resíduos de D-glicose a partir dos celobioligossacarídeos (resíduos de celodextrina e celobiose) (Aristidou e Penttilä, 2000).

Essas três classes de celulasas atuam em sinergia para a hidrólise da celulose (Figura 3). Assim a eficiência do ataque ao complexo celulósico é bem maior do que se cada enzima atuar separadamente. Apesar de serem enzimas diferentes, as celulasas apresentam um modo de ação similar proporcionado por suas características estruturais comuns.

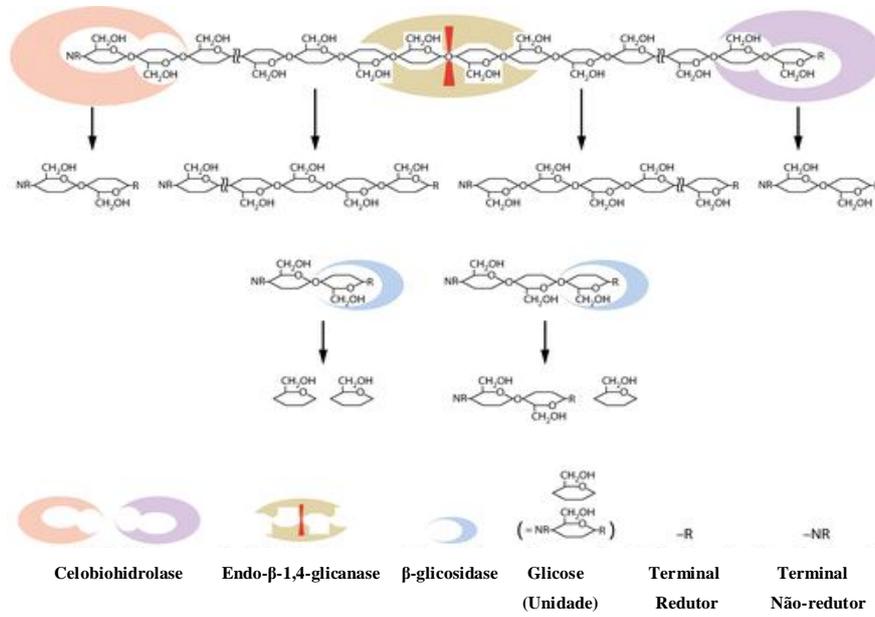


Figura 3. Representação da atividade das celulasas celobiohidrolase, endo-β-1,4-glicanase e β-glicosidase. Adaptado de Watanabe e Tokuda, 2010.

As celulasas possuem diversas aplicações nas indústrias: têxtil, nos processos de biopolimento (desfibrilação de tecidos) e bioestonagem (amaciação e desbotamento do brim); de polpa e papel, na modificação de propriedades mecânicas da polpa; em lavanderia para a remoção de sujeiras e a aumento de maciez, além de amenizar o desgaste das peças; também utilizadas na produção de ração animal, fermentação de grãos para produção de álcool, extração de sucos de frutas, dentre outros. Entretanto, seu uso pode tornar-se ainda maior com a consolidação da produção industrial do etanol de biomassa lignocelulósica.

As indústrias *Novozymes* e *Genencor Danisco* têm se consagrado na produção comercial de celulasas para conversão de biomassa. Ambas têm adotado novas tecnologias para reduzir o custo de produção dos preparados celuláticos. Recentemente, a *Genencor* lançou o *Accelerase® 1500*, um complexo celulolítico específico para indústrias que processam a biomassa lignocelulósica. *Accelerase® 1500* é produzido com uma linhagem geneticamente modificada de *T. reesei*. Este preparado enzimático contém níveis elevados de atividade β-glicosidásica, de modo a assegurar grande conversão de celobiose à glicose (Singhania et al., 2010).

2.3.1.1 Produção e Estudos com Celulases

Os avanços das pesquisas sobre celulases ocorreram em diversas áreas do conhecimento. Contribuições científicas vêm sendo geradas no que tange ao isolamento de microrganismos, ao aumento da expressão de celulases por mutações gênicas, à purificação e caracterização de componentes deste complexo enzimático, ao entendimento sobre os mecanismos de ataque à celulose, à clonagem e expressão de genes, à determinação de estruturas tridimensionais das celulases e à demonstração do potencial industrial dessas enzimas (Castro e Pereira Jr., 2010).

O foco das pesquisas relacionadas às celulases fúngicas passou a ser o melhoramento de sua produção. Mandels e Reese publicaram diversos estudos sobre a influência dos principais fatores que afetam a produção dessas enzimas e formulações de meio de cultivo ideais para o crescimento dos microrganismos (Castro e Pereira Jr., 2010). Estudos feitos na Índia com palhada de cana indicam que os fungos *Aspergillus terreus*, *Cellulomonas uda*, *Trichoderma reesei* e *Zymomonas mobilis* podem ser “chaves” na degradação do material lignocelulósico (Singh *et al.*, 2008). No Brasil, grupos de pesquisa também estão empenhados na prospecção de fungos e na caracterização, imunolocalização e purificação de enzimas fúngicas (Rizzati *et al.*, 2008).

Visando a obtenção celulases termoestáveis, microrganismos termofílicos passaram a ser mais estudados e caracterizados. Dentre estes, destacam-se as bactérias *Clostridium thermocellum*, *Thermonospora fusca* e *Microbispora bispora* e os fungos *Chaetomium thermophile*, *Thermoascus aurantiacus*, *Sporotrichum thermophile* e *Humicola grisea* var. *thermoidea* (Haki e Rakshit, 2003).

Muitos trabalhos tem se concentrado quanto ao aspecto estrutural destas enzimas. Estudos destacam características comuns às celulases, como a presença de uma longa cavidade de uma das regiões da proteína que se liga a resíduos consecutivos de açúcar do substrato. Nas endoglicanases esta cavidade se apresenta em forma de fenda, já as celobiohidrolases possuem uma espécie de túnel que envolve a microfibrila de celulose (Sandgren *et al.*, 2005). A maioria das endoglicanases e celobiohidrolases de microrganismos celulolíticos possui um domínio de ligação à celulose (CBD–*cellulose binding domain*) que é ligado ao domínio catalítico por um peptídeo de ligação flexível. O CBD apresenta especificidade de ligação pela superfície da celulose cristalina e enfraquece as pontes de hidrogênio das microfibrilas de celulose vizinhas. As enzimas

que possuem o CBD apresentam maior atividade sobre substratos sólidos, principalmente sobre celulose cristalina (Ito et al., 2004; Sandgren et al., 2005). A Figura 4 ilustra a ação do CBD de celulase sobre a fibra de celulose.

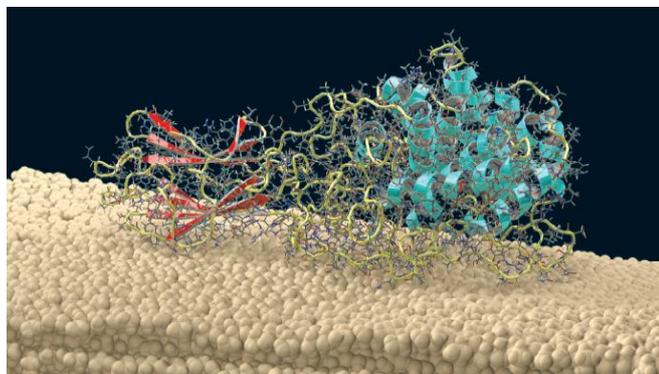


Figura 4. Ação da celulase na superfície da fibra de celulose, interação entre o domínio de ligação à celulose (CBD) e a superfície do polímero (Scidac, 2010).

2.3.1.2 Técnicas Aplicadas à Produção e Estudo de Celulases

Microrganismos com elevado potencial para a produção de celulases são normalmente submetidos a técnicas como a mutação clássica (aleatória) e a expressão gênica. Tais alterações possibilitam um aumento na produtividade enzimática, redução da inibição por glicose durante a expressão de celulases, dentre outros efeitos (Lynd et al., 2002; Castro e Pereira Jr., 2010).

A mutação clássica vem sendo aplicada há décadas sobre linhagens de *Trichoderma reesei*, gerando diversas linhagens, dentre as quais a mais reportada é a linhagem Rut C30. Esta linhagem teve seu potencial celulolítico aumentado devido à mutação do gene *cre1*, o que promoveu um menor efeito de repressão catabólica da glicose pelas células, durante a expressão das enzimas e um aumento da quantidade de retículo endoplasmático (promovendo aumento nas taxas de *O*-glicosilação das proteínas). Dentre as técnicas mais utilizadas para obtenção das linhagens mutantes, pode-se citar a radiação ultravioleta, o acelerador linear e o uso de nitrosoguanidina (Castro e Pereira Jr., 2010).

Com relação à expressão gênica, as formas mais conhecidas de manipulação do conteúdo genético são a expressão homóloga e a expressão heteróloga, que se distinguem conforme a procedência do material genético inserido na célula hospedeira.

Dentre os organismos hospedeiros mais comumente utilizados para a expressão heteróloga de proteínas, estão a bactéria *Escherichia coli* e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*. O sistema de *S. cerevisiae*, embora tenha se mostrado eficiente em alguns casos, apresenta forte tendência a hiperglicosilar (50 a 150 resíduos de manose) as proteínas produzidas, acarretando, no caso das celulases, em uma redução da capacidade destas em adsorver-se em substratos sólidos. Em relação ao sistema de expressão de *E. coli*, uma das principais desvantagens é a deficiência de etapas pós-traducionais, que decorre em organização estrutural errônea da cadeia polipeptídica, além do fato desta ficar localizada em corpos de inclusão, os quais dificultam a extração do produto. Por fim, o sistema de expressão de *P. pastoris*, embora tenha apresentado hiperglicosilação em alguns casos, mostra-se como um dos mais adequados dentre os conhecidos atualmente, por proporcionar elevada produção da proteína de interesse. Entretanto, se o objetivo for a produção das enzimas celulolíticas para a conversão de biomassa lignocelulósica a etanol, *S. cerevisiae* configura-se como o mais adequado sistema de expressão heteróloga, pois além de expressar as enzimas de interesse é capaz de fermentar os produtos de hidrólise, produzindo também etanol de biomassa lignocelulósica (Ferreira, 2010).

Trabalhos têm sido realizados visando à expressão de proteínas em *P. pastoris*. Um exemplo foi a overexpressão, purificação e caracterização de uma enduglicanase de *Aspergillus*, em *Pichia pastoris*. Foi obtida uma proteína recombinante com elevada atividade específica ($63.83 \pm 4.68 \text{ U.mg}^{-1}$), e grande estabilidade térmica em faixa de temperatura entre 30 e 50 °C e pH entre 2.0 e 7.0. A proteína expressa se mostrou promissora em estudos de sacarificação de biomassa (Quay et al., 2011).

Em estudos objetivando a produção de etanol foram produzidas linhagens de *S. cerevisiae* co-expressando três enzimas: uma endoglicanase, uma celobiohidrolase e uma β -glicosidase, as quais foram testadas, mostrando serem capazes de gerar açúcares e produzir etanol (Fujita et al., 2004).

2.3.2. Hemicelulose e a Ação das Hemicelulases

Devido ao fato da hemicelulose ser formada por uma estrutura complexa de carboidratos poliméricos (xilanas, arabinanas, arabinoxilanas, mananas e galactomananas), para sua hidrólise completa é necessária a atuação de diferentes enzimas (Ferreira, 2010). Sua cadeia principal é constituída por resíduos de D-xilose

unidos por ligação glicosídica β -1,4, apresentando várias ramificações com os resíduos de D-arabinose, D-manose, D-galactose, D-ácido glicurônico, etc. O grau de ramificação das xilanas e a natureza do açúcar ligado à cadeia principal varia de acordo com o tipo de planta (Shallom e Sahoham, 2003).

As hemiceluloses são constituídas por frações amorfas e conseqüentemente menos resistentes a enzimas ou agentes químicos, ao contrário das celuloses que apresentam tanto regiões amorfas quanto cristalinas. Este fato facilita o contato das hemicelulases e sua ação hidrolítica, liberando mais facilmente açúcares para a fermentação. A interação entre a celulose e a hemicelulose resulta em importantes características para as fibras, contribuindo para a passagem de água, mobilidade interna e aumento de flexibilidade (Bianchi, 1995).

Sendo a xilana o principal constituinte da fração hemicelulósica (Collins et al., 2005), para sua hidrólise completa é necessária a atuação de um complexo de enzimas que formam o complexo xilanolítico. Fazem parte deste complexo, enzimas que hidrolisam a cadeia principal (endo- β -(1 \rightarrow 4)-xilanase e β -xilosidase), e enzimas que hidrolisam as cadeias laterais (α -glicuronidase, α -L-arabinofuranosidase e acetilsterase) (Biely, 1985).

O principal grupo de enzimas que atuam na degradação da xilanas são as endo- β -(1 \rightarrow 4)-xilanases, que atuam aleatoriamente, liberando xilooligossacarídeos (Shallom e Sahoham, 2003). Já as xilosidases ou β -1,4-D-xilohidrolases (EC 3.2.1.37) hidrolisam xilobiose e outros pequenos xilooligossacarídeos, a partir da extremidade não redutora, resultantes da ação das endoxilanases, liberando xilose (Basaran e Ozcan, 2008) (Figura 5).

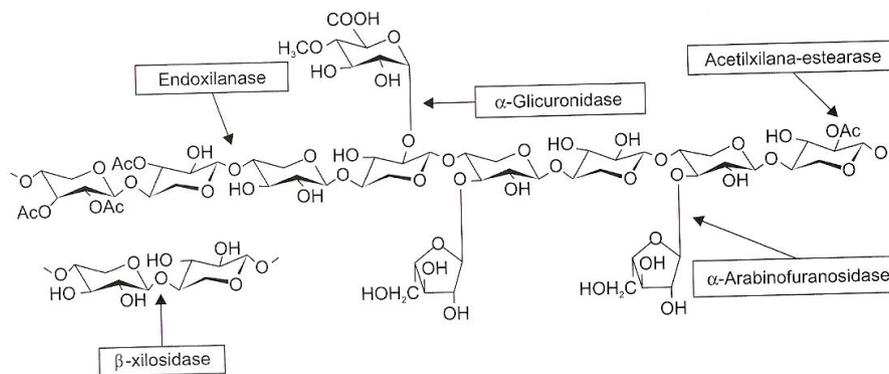


Figura 5. Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana (Sunna e Antranikian, 1997).

Uma parte majoritária dos trabalhos publicados sobre hemicelulases lida com as propriedades e modos de ação, assim como com aplicações das xilanases. Xilanases constituem-se como uma das principais enzimas produzidas por fungos e bactérias saprofíticas, sendo fundamental para o processo de colonização e degradação de tecidos hemicelulósicos. A habilidade de promover a degradação seletiva de xilanas confere às xilanases um grande potencial biotecnológico, sendo esta enzima empregada em uma série de processos industriais, destacando-se principalmente o seu uso na indústria de papel e celulose e na indústria de biocombustíveis (Chantasingh, 2006).

Recentemente, estudos vêm sendo realizados com xilanases, como enzimas auxiliares às celulases, facilitando a ação e o acesso das celulases durante o processo de sacarificação da biomassa, bem como promovendo a hidrólise da hemicelulose (fração xilana), o que favorece um grande aumento de rendimento no processo de produção de etanol (Bhat, 2000; Duarte et al., 2003).

2.3.3. Lignina

É constituída por polímeros fenólicos complexos, formados por unidades fenilpropano. A lignina se encontra associada à celulose na parede celular, podendo formar ligações covalentes com a hemicelulose. Devido à sua estrutura, a lignina é responsável por conferir rigidez e proteção à parede celular, impermeabilidade e resistência à ataques microbiológicos e mecânicos (Ferraz, 2001).

A estrutura dos materiais lignocelulósicos pode variar de espécie para espécie, apesar da composição química não variar entre materiais de mesma origem. A lignina é capaz de impedir ou retardar a ação microbiana sobre o material, inviabilizando o processo de sacarificação para produção de bioetanol (Castro e Pereira Jr., 2010). Este processo pode ocorrer seja pela adsorção das enzimas hidrolíticas, impedindo sua ação sobre a celulose; ou por sua característica hidrofóbica, evitando o intumescimento da fibra celulósica, o que diminui a área superficial acessível às enzimas (Damasceno et al., 2010).

2.4. Microrganismos Lignocelulolíticos

Os fungos filamentosos são microrganismos extremamente versáteis e responsáveis pela produção de uma grande quantidade de enzimas microbianas do

mercado (Frisvad et al., 2008). São considerados uma classe de microrganismos amplamente distribuídos (em solos, vegetais e animais), podendo ter hábitos saprófitos ou parasitas. Além disso, estes fungos podem associar-se, simbioticamente, com raízes de plantas, formando micorrizas, ou viver como microrganismos endofíticos, no interior das plantas, sem causar danos (Grimm et al., 2005). Devido à esta ampla capacidade de adaptação a diferentes substratos (inclusive lignocelulósicos) os fungos são capazes de degradar a celulose e a hemicelulose e utilizá-las como fonte de carbono e energia (Tavares et al., 1998).

Embora as celulasas possam ser produzidas por uma grande gama de organismos, incluindo bactérias, leveduras, fungos, plantas e animais (Lynd et al., 2002; Palomer et al., 2004), os fungos filamentosos são os mais utilizados industrialmente na produção de celulasas, principalmente os dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Phanerochaete* (Singhania et al., 2010).

Os do gênero *Aspergillus* são fungos filamentosos com capacidade de produzir um sistema completo de celulasas e hemicelulasas (Jørgensen et al., 2003). Apresentam uma reduzida necessidade nutricional e são muito importantes na indústria de alimentos, remédios e agricultura (Javed et al., 2009). No entanto, várias espécies são capazes de produzir diferentes micotoxinas nocivas aos seres humanos e animais (Hedayati et al., 2007).

Já o gênero *Fusarium* é composto por fungos amplamente distribuídos no solo e em associação com plantas. Algumas espécies patogênicas são capazes de produzir micotoxinas em cereais, que se consumidos podem causar danos ao homem (Burgess et al., 1994). Outras, como o *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, durante a infecção, secretam enzimas hidrolíticas, como xilanases capazes de degradar a parede celular e atacar folhas e frutos (Di Pietro et al., 2003).

2.5 Aplicações Biotecnológicas das Celulasas e Hemicelulasas

2.5.1. Produção de Etanol a Partir de Material Lignocelulósico

Durante o processo biológico para converter os materiais lignocelulósicos em etanol são requeridos: um pré-tratamento para quebrar a estrutura da lignina e da hemicelulose; despolimerização da celulose para produzir açúcares livres

(sacarificação); fermentação dos açúcares resultantes para produzir etanol; e separação do etanol produzido por destilação (Figura 6) (Santos et al., 2012).

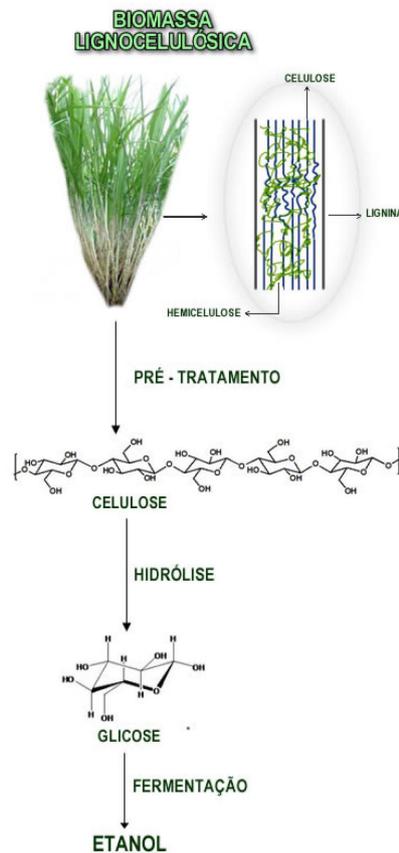


Figura 6. Esquema da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (Santos et al., 2012).

2.5.1.1. Pré-tratamento

Industrialmente a conversão enzimática da celulose a etanol envolve operações de pré-tratamento (físicos, químicos ou enzimáticos) para retirar ligninas e expor celulose e hemicelulose ao ataque das enzimas, aumentando assim, o rendimento do processo (Figura 7) (McMillan, 1994) Um pré-tratamento pode aumentar a digestibilidade da biomassa, evitar a perda de carboidratos e evitar a formação de inibidores (Sun e Chung, 2002). A escolha do pré-tratamento depende do tipo de matéria-prima (cana-de-açúcar, amido de milho, beterraba, resíduos de composição lignocelulósica, dentre outros) e do agente biológico a ser utilizado na fermentação (Pereira Jr., 2005).

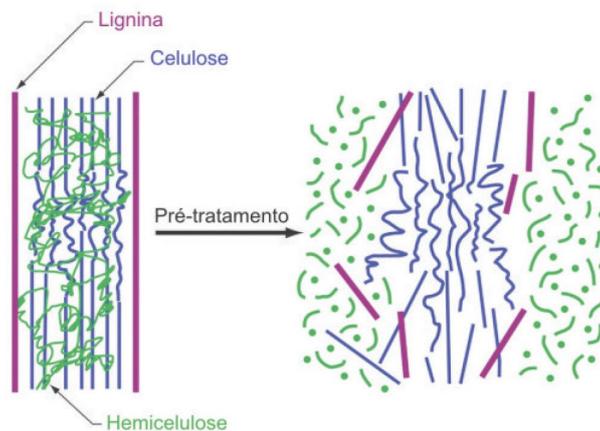


Figura 7. Alterações estruturais na microfibrila celulósica determinada pelo pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (Santos et al., 2012).

Os pré-tratamentos físicos atuam na redução do tamanho da partícula através de moagem, aumentando o desempenho da enzima, pelo aumento da área superficial e, em alguns casos, pela redução do grau de polimerização e cristalinidade da celulose (Santos et al., 2012).

Os pré-tratamentos químicos, incluindo pré-tratamentos ácidos, alcalinos ou oxidativos também são muito utilizados. Variam de muito ácido até bastante alcalino, tendo assim, diferentes efeitos nos principais componentes da biomassa. Por exemplo, o pré-tratamento ácido hidrolisa a fração de hemicelulose, já os pré-tratamentos alcalinos têm mais efeito na digestibilidade da celulose e na estrutura da lignina. Estes pré-tratamentos liberam uma maior quantidade de celulose como substrato, aumentando o rendimento do processo (McMillan, 1994). O pré-tratamento ácido pode ser conduzido em altas ou baixas concentrações de ácido. As altas concentrações podem levar à formação de furfurais, que atuam como inibidores da fermentação, por isso são menos desejados (Alvira et al, 2010). Já os pré-tratamentos básicos podem ser realizados em variadas concentrações de base (como hidróxido de sódio, de potássio e de cálcio). Tem a vantagem de promover uma menor degradação de açúcares que os tratamentos ácidos (Kumar et al, 2009). A base mais utilizada é o hidróxido de sódio que atua promovendo um inchaço na estrutura da celulose, o que aumenta a superfície interna e diminui a cristalinidade, promovendo maior desestruturação da lignina presente no complexo (Taherzadeh e Karimi, 2008).

Existem ainda os pré-tratamentos biológicos que normalmente utilizam fungos e algumas bactérias. Durante o processo, estes microrganismos secretam enzimas extracelulares como lignina peroxidases e lacases que ajudam a remover uma quantidade considerável de lignina da biomassa.

Um pré-tratamento eficiente, pode substancialmente reduzir o requerimento de enzimas no processo de sacarificação da celulose e, conseqüentemente, reduzir os custos de produção (Mosier et al., 2005). Normalmente, hidrólises enzimáticas proporcionam um rendimento de açúcar menor que 20%, enquanto que, se uma etapa de pré-tratamento for utilizada, o rendimento pode ser superior a 90% (Ghosh e Ghose, 2003).

2.5.1.2. Sacarificação

Após a etapa de pré-tratamento, é realizada a sacarificação (conversão dos polissacarídeos em açúcares fermenticíveis). Hemicelulose e celulose podem ser hidrolisadas a açúcares e estes, fermentados por microrganismos (Rabinovich et al., 2002). A hidrólise da celulose produz glicose e celobiose. Por outro lado, a hidrólise de ligninas e hemicelulose produz açúcares e subprodutos (principalmente, difenóis, derivados de fenilpropano, cetonas, furfural e ácido acético), que muitas vezes inibem a fermentação (Hahn-Hägerdal et al., 2006).

Neste processo, é possível aplicação de hidrólise química (ácida ou alcalina) ou de hidrólise enzimática do material pré-tratado. A hidrólise da hemicelulose pode ser catalisada pelas hemicelulases ou por ácidos diluídos como o ácido sulfúrico (com uso de temperaturas de 100-200 °C) (Tamaru et al., 1999). A hidrólise da celulose pode ser conduzida com ácido concentrado a baixas temperaturas (cerca de 30 °C) e resulta em rendimentos altos tanto de hexoses quanto de pentoses (Sakon et al., 1997; Spiridonov e Wilson, 1998). Podem ser utilizados também os ácidos diluídos, como o H₂SO₄, em baixas concentrações (< 1%), o que demanda o uso de altas temperaturas (180-230 °C). Mas, geralmente, a maior parte da celulose é cristalina, e condições extremas (altas temperaturas e altas concentrações de ácido) são necessárias. O que pode produzir, entretanto, alcatrão e outros produtos secundários difíceis de lidar, sendo este mais um desafio comercial a ser enfrentado (Ogeda e Petri, 2010).

Processos de hidrólise catalisada por enzimas (sacarificação enzimática) são os mais utilizados. Enzimas vêm sendo amplamente utilizadas com a finalidade de um

melhor aproveitamento dos materiais lignocelulósicos, já que podem evitar a formação de inibidores da etapa fermentativa (Rabinovich et al., 2002). No processo de hidrólise enzimática a taxa de hidrólise aumenta de forma não-linear até que todos os sítios de ligação estejam saturados com o substrato. Normalmente, a hidrólise é realizada em valores de pH entre 4-8 e temperaturas entre 45-50 °C. Durante o processo, a solução de hidrólise deve ser suavemente agitada, de forma a evitar a perda de enzimas (Duff e Murray, 1996).

2.5.1.3. Fermentação Etanólica

A fermentação etanólica é um processo biológico em que matérias orgânicas são fermentadas por microrganismos para produzir etanol e CO₂. O grande desafio tem sido o desenvolvimento de um microrganismo engenheirado que tenha a capacidade de metabolizar não só hexoses (como a glicose), mas também e com eficiência seja capaz de metabolizar pentoses (principalmente xilose) (Hahn-Hägerdal et al., 2006).

É importante que este microrganismo não seja inibido por compostos gerados durante o pré-tratamento e hidrólise dos materiais lignocelulósicos (Hahn-Hägerdal e Pamment, 2004). Os fungos filamentosos seriam uma alternativa, porém não são utilizados nos processos industriais devido ao processo de fermentação catalisado por eles ocorrer muito lentamente.

Os microrganismos mais comumente usados para produzir etanol são as leveduras, que têm a flexibilidade de crescer em um meio contendo açúcares simples, como a glicose, e em meio contendo dissacarídeos como a sacarose. A mais utilizada, inclusive na indústria, tem sido a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, microrganismo capaz de produzir etanol em altas concentrações.

Os açúcares derivados da biomassa lignocelulósica são constituídos por uma mistura de hexoses (principalmente glicose) e pentoses (principalmente xilose) e a maioria das espécies selvagens de *S. cerevisiae* não são capazes de metabolizar xilose. Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são capazes de fermentar xilose. As bactérias anaeróbicas fermentam pentoses, mas são inibidas com baixas concentrações de açúcar e etanol. A levedura que fermenta naturalmente a xilose, como a *Pichia stipitis* CBS 6054, fermenta a xilose em etanol com um rendimento e produtividade razoáveis, entretanto esta espécie de levedura é inibida pelos compostos gerados durante o pré-tratamento e a sacarificação (Hahn-Hägerdal et al., 2004). Logo, muitos esforços têm

sido feitos para obter cepas recombinantes de bactérias e leveduras que podem ser usadas na fermentação industrial de materiais lignocelulósicos (Hahn-Hägerdal et al., 2006).

O líquido resultante, após consumo dos componentes do meio de fermentação, é destilado com o intuito de concentrar o etanol até um nível determinado ou até o limite possível, o azeótropo etanol-água (95,5% de etanol). Este azeótropo é comumente comercializado como etanol hidratado, sendo possível sua utilização direta nos motores automotivos. No entanto, para ser misturado à gasolina o etanol necessita estar na sua forma anidra, cuja obtenção se dá por meio de processos de desidratação como o arraste com benzeno ou o uso de absorventes regeneráveis (Pereira Jr., 2005).

2.5.1.4 Principais Gargalos no Processo de Obtenção de Etanol a Partir de Material Lignocelulósico

As principais barreiras existentes para a maior utilização das energias renováveis são de ordem econômica, pois as tecnologias empregadas são novas, ainda em desenvolvimento e por isso têm elevado custo de implantação. Para que esta barreira possa ser superada é preciso suporte governamental e investimentos em tecnologia.

No processo de obtenção de etanol a partir de material lignocelulósico existem dois principais gargalos da tecnologia: os métodos de pré-tratamento impostos à biomassa (por vezes muito drásticos) e os altos custos de produção das celulasas (que poderiam ser menores com o uso de preparados com elevada atividade específica). Contudo, o aumento do volume produtivo das celulasas, devido a sua aplicação em diversos setores, também pode contribuir significativamente para a redução dos custos de produção dessas enzimas (Singhania et al., 2010).

As celulasas são produzidas por uma gama de microrganismos, contudo a maioria apresenta grandes restrições que dificultam ou oneram o processo de produção. Para superar estas restrições a biologia molecular é uma favorável ferramenta (Singhania et al., 2010). Diversas estratégias estão em desenvolvimento ou poderão ser conduzidas visando melhorias no processo fermentativo. Um exemplo seria se a produção das enzimas hidrolíticas fosse realizada durante o próprio processo de fermentação, conduzida por um microrganismo capaz de produzir não apenas o etanol, mas também todas as enzimas necessárias à hidrólise da celulose (McBride et al. 2005).

Outra estratégica interessante seria adicionar nas leveduras uma rota metabólica adicional que as permitissem fermentar pentoses (Gray et al., 2006) ou quem sabe a expressão das celulasas dentro da própria biomassa (Lynd et al., 2002). A redução dos teores de lignina ou o aumento do teor de carboidratos da biomassa também podem ser promissores. Nestes casos, deve ser analisado se estas modificações não alterariam o sistema de defesa da planta contra patógenos e insetos (Sticklen, 2006).

O principal objetivo ainda é a obtenção de glicose a partir de celulose usando métodos “limpos” e economicamente viáveis, nos quais altas temperaturas e pressão sejam desnecessárias. Mas a crescente demanda e o espírito científico certamente conduzirão os pesquisadores da área a novas descobertas para que este processo seja não só mais viável economicamente como também esteja cada vez mais inserido no contexto do desenvolvimento sustentável.

2.5.2 Branqueamento de Polpa de Celulose

Uma das principais aplicações das xilanases é no pré-branqueamento da polpa de celulose na indústria de papéis. O uso de xilanases no branqueamento pode ser realizado visando à diminuição dos custos e à obtenção de fibras de melhor qualidade, além de serem produzidos menos resíduos tóxicos no processo (Duarte, 2003).

Tradicionalmente são necessários dois processos para a obtenção de uma polpa de celulose pura: cozimento e branqueamento. O processo de cozimento mais importante é o Kraft, que envolve o uso de sulfito, bissulfito e meio básico para degradar a lignina da madeira, deixando-a solúvel no licor de cozimento (Patel et al., 1993). Sob alta temperatura e pressão, 90 a 95% da lignina é modificada ou solubilizada e o conteúdo das fibras se separa. A xilana é dissolvida no licor de cozimento devido à alta temperatura e pH. No entanto, à medida que o processo se desenvolve, a alcalinidade diminui e a xilana degradada precipita-se de forma mais ou menos cristalina sobre a celulose (Buchert et al., 1992). Na sequência, são realizadas algumas lavagens para a limpeza da polpa e retirada do licor remanescente, mas as fibras ainda são escuras, devido à presença de lignina residual.

O branqueamento da polpa divide-se em dois estágios: o pré-branqueamento e o branqueamento propriamente dito. O pré-branqueamento remove mais uma parte desta lignina residual do cozimento e pode ser realizado por diversos processos, tais como, hidrólise enzimática, reações de substituição ou adição de oxigênio, dependendo da

indústria. O processo de branqueamento pode ser dividido em três estágios: o primeiro estágio é usado ozônio (O_3) e dióxido de cloro (ClO_2); no segundo estágio, hidróxido sódio ($NaOH$), oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e no último é realizado outro tratamento com dióxido de cloro. O uso de cloro resulta na produção de organoclorados que são produtos da degradação da lignina, os quais são altamente tóxicos e mutagênicos, necessitando tratamento dos efluentes na planta da fábrica de papel (Polizelli et al., 2005). A figura 8 é um esquema representativo das diversas etapas do processo de produção da polpa de celulose.

O uso de xilanases no branqueamento é um processo amplamente empregado pelas indústrias de papel e celulose do hemisfério norte e seu uso vêm proporcionando uma maior economia durante o processo.

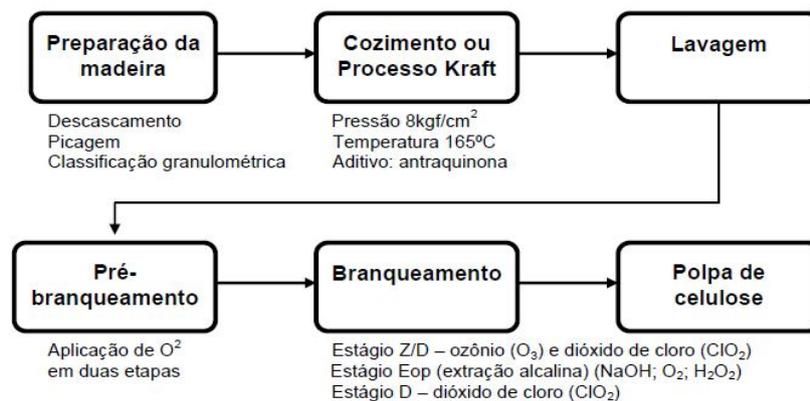


Figura 8. Esquema representativo de um processo de produção da polpa de celulose (Rizzatti, 2004).

Diversas pesquisas relacionadas à indústria de papel e celulose indicam a participação de xilanases no refino da polpa, na melhora da qualidade, na modificação das propriedades das fibras. Além de permitirem desaguamento, o que aumenta a velocidade de fabricação do papel e tem a função de colaborar no processo de despigmentação da matriz celulósica, favorecendo o aumento da drenagem da água presente na polpa de papel (Bhat, 2000).

Alguns estudos mostram o uso de xilanases no processo Kraft do branqueamento de polpa, auxiliando no desligamento da lignina da fibra, o que faz com que o material fique mais suscetível ao tratamento químico e um menor uso de cloro seja necessário (Duarte et al., 2003). Já foi provado que a utilização de extratos contendo atividade de

manase juntamente com a xilanase são mais eficientes para o biobranqueamento do papel (Bhat, 2000).

Um estudo recente avaliou o impacto do processo de branqueamento no teor de xilanas de polpas Kraft de *Eucalyptus grandis* e de *Eucalyptus urograndis* produzidas por diferentes protocolos de cozimento e o efeito do teor de xilanas da polpa na sua branqueabilidade. Observou-se que o conteúdo de xilanas das polpas influenciou negativamente a sua branqueabilidade, aumentando o consumo de reagentes químicos (Pedrazzi et al., 2011).

Entretanto, grande parte dos estudos concentram esforços na melhoria das propriedades das xilanas já caracterizadas e especialmente na detecção de novas enzimas, sua purificação, caracterização e aplicação em processos de branqueamento de polpa. Um exemplo a citar seria a purificação e caracterização de uma xilanase de *Aspergillus ficuum*, AF-98, uma proteína monomérica de 35,0 kDa, que apresentou temperatura e pH ótimos de 45 °C e 5,0 respectivamente, sendo portanto, promissora para a utilização na indústria (Fengxia et al., 2008). Outro exemplo em escala industrial foi a produção de uma xilanase livre de celulase, por *Trichoderma reesei* SAF3, isolado a partir de solo. O crescimento máximo do fungo foi obtido após 48h em condições submersas em meio de cultura contendo xilana, enquanto a produção máxima de enzima (4,75 U.mL⁻¹) ocorreu em 72 h. Durante o período de cultivo, não foi detectada atividade celulásica. A enzima parcialmente purificada hidrolizou xilana a xilose (Kar et al., 2006).

Em processos industriais as xilanas podem proporcionar tanto a diminuição de gastos com compostos químicos de alto custo, quanto dos impactos ambientais causados pelos tratamentos convencionais. Neste sentido, é justificada a realização deste trabalho que muito tem a contribuir para um objetivo maior de utilização de métodos “limpos” e economicamente viáveis.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour Technol.*, 101(13), 4851-61.
- Aristidou, A., Penttilä, M., 2000. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 187-198.
- Basaran, P., Ozcan, M., 2008. Characterization of β -xylosidase enzyme from a *Pichia stipitis* mutant. *Bioresource Technology*, 99(1), 38-43.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, 355–383.
- Bianchi, M.L., 1995. Polpação de palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolventes. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo-SP, p.77. (Dissertação M.S.).
- Biely, P., 1985. Microbial Xylanolytic Systems. *Trends in Biotechnology*, 3, 286–295.
- Bioagência. Produção mundial de etanol atinge 85,2 milhões de metros cúbicos. Disponível em: <<http://www.bioagencia.com.br/noticias/index.php/detail/2881/producao-mundial-de-etanol-atinge-852-milhoes-de-metros-cubicos>>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2013.
- Biodiesel. Panorama Energético Atual e Perspectivas Futuras. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/energia/alternativa/agro-energia.htm>>. Acesso em: 10 de novembro de 2012.
- Bortolazzo, N.G., 2011. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de- açúcar. Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, p.77. (Dissertação M.S.).
- Buchert, J., Ranua, M., Kantelinem, A., Viikari, L., 1992. The role of two *Trichoderma reesei* xylanases in the bleaching of Kraft pulp. *Appl Microbiol Biotechnol*, 37, 825–829.
- Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P., Backhouse, D., 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research. Sydney, University of Sydney.
- Castro, A.M., 2006. Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos obtidas a partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp*). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ. (Dissertação M.S.).

- Castro, A.M., Pereira Jr., N., 2010. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, 33, 1-12.
- Chantasingh, D., Pootanakit, K., Champreda, V., Kanokratana, P., Eurwilaichitr, L., 2006. Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 46 (1), 143-149.
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 3-23.
- Damasceno, C.M.B., Sousa, S.M.D., Noda, R.W., Parrella, R.A.D.C., Schaffert, R.E., Magalhães, J.V., 2010. A importância da Lignina para a produção de etanol de segunda geração. In: *Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG*, 1, 1-36.
- Di Pietro, A., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., Roncero, M.I.G., 2003. *Fusarium oxysporum*: Exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol. Plant Pathol.*, 4, 315-325.
- Duarte, M.C.T., Silva, E.C., Gomes, I.M.B., Ponezi, A.N., Portugal, E.P., Vicente Jr., Davanzo, E., 2003. Xylan-hydrolysing enzyme system from *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 and its effects on *Eucalyptus grandis* kraft pulp for bleaching improvement *Bioresource Technology*, 88, 9-15.
- Duff, S. J. B., Murray, W. D., 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 55, 1-33.
- Fengxia, L., Mei, L., Zhaoxin, L., Xiaomei, B., Haizhen, Z., Yi, W., 2008. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresource Technology*, 99, 5938-5941.
- Ferraz, A., 2001. Aplicações da biotecnologia na produção de papel e celulose. In: Lima, U. A. *Biotecnologia Industrial*. Edgar Blücher, 3, 465-484.
- Ferreira, V., 2010. Produção de β -glicosidase 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. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, p.155. (Tese D.S.).
- Frisvad, J.C., Andersen, B., Thrane, U., 2008. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological Research.*, 112(2), 231-240.
- Fujita, Y., Ito, J., Ueda, M., Fukuda, H., Kondo, A., 2004. Synergistic Saccharification, and Direct Fermentation to Ethanol, of Amorphous Cellulose by Use of an

- Engineered Yeast Strain Codisplaying Three Types of Cellulolytic Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1207-1212.
- Ghosh, P., Ghose, T.K., 2003. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, Scheper 85.
- Gray, K.A., Zhao, L., Emptage, M., 2006. *Bioethanol. Current Opinion in Chemical Biology*, 10, 141–146.
- Grimm, L.H., Kelly, S., Krull, R., Hempel, D.C., 2005. Morphology and production of filamentous fungi. *Applied Microbiology Biotechnology*, 69, 375-384.
- Guardabassi, P.M., 2006. *Sustentabilidade da biomassa como fonte de energia perspectivas para países em desenvolvimento*. Universidade de São Paulo, São Paulo-SP. (Dissertação M.S.).
- Hahn-Hägerdal, B., Pamment, N., 2004. Microbial pentose metabolism. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 113–116, 1207–1209.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-grauslund, M.F., Lidén, G., Zacchi, G., 2006. Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24(12), 549-556.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89, 17-34.
- Hedayati, M.T., Pasqualatto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P., Denning, D.W., 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153, 1677-1692.
- Ito, J., Fujita, Y., Ueda, M., Fukuda, H., Kondo, A., 2004. Improvement of Cellulose-Degrading Ability of a Yeast Strain Displaying *Trichoderma reesei* Endoglicanase by Recombination of Cellulose-Binding Domains. *Biotechnology Progress*, 20, 688-691.
- Jardine, J.G.; Dispatto, I.; Peres, M.R., 2009. Considerações Sobre o bioetanol lignocelulósico para subsidiar a elaboração de conteúdo da árvore do conhecimento agroenergia. In: *Embrapa informática Agropecuária*, Campinas, São Paulo, 1, 1-32.
- Javed, M.R., Rashid, M.H., Riaz, M., Perveen, R., 2009. Catalytic and Thermodynamic Characterization of Endoglicanase (CMCase) from *Aspergillus oryzae* cmc-1. *Appl Biochem Biotechnol*, 157, 483–497.
- Jørgensen, H., Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F., Olsson, L., 2003. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 851-861.

- Kar, S., Mandal, A., Mohapatra, P.K., Mondal, K.C., Pati, B.R., 2006. Production of cellulase-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4).
- Karekesi, S., Coelho, S.T., Lata, K., 2004. Traditional Biomass Energy: Improving its Use and Moving to Modern Energy Use. In: International Conference for Renewable Energies, Bonn. Thematic Background Paper.
- Kubicek, C.P., Messner, R., Gruber, F., Mach, R.L.E., Kubicek-pranz, E.M., 1993. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 90-99.
- Kumar, R., Wyman, C.E., 2009. Effects of cellulose and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnol. Prog.*, 25, 302-314.
- Lin, Y., Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current states and prospects. *Applied Microbiology Biotechnology*, 69, 627-642.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 (3), 506-577.
- McBride, J.E., Zietsman, J.J., Van Zyl, W.H., Lynd, L.R., 2005. Utilization of cellobiose by recombinant β -glucosidase expressin strains of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evaluation of the sufficiency of expression. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 93-101.
- McMillan, J.D., 1994. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, American Chemical Society Symposium, 556, 292-324.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzaple, M., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96, 673-686.
- Ogeda, T.L., Petri, D.F.S., 2010. Hidrólise enzimática de Biomassa: Revisão. *Quím. Nova*, 33(7), 1549-1558.
- Palomer, X. et al., 2004. Study of the strawberry Cell endo- β -(1,4)-glucanase protein accumulation and characterization of its in vitro activity by heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Plant Science*, 167, 509-518.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugar-cane bagasse. *Bioresour Technol.*, 74, 69-80.

- Patel, R.N., Grabski, A.C., Jefries, T.W., 1993. Chromophore release from kraft by purified *Srepmomices roseiscleroticus* xylanase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 39, 405–412.
- Pedrazzi, C., Colodette, J.L., Gomide, J.L., Oliveira, R.C., Muguet, M.C.S., 2011. Influência do processo de polpação e do conteúdo de xilanas da polpa na branqueabilidade. *O Papel*, 72(5), 37– 55.
- Pereira Jr., N., 2005. Biotechnology of Lignocellulosics: Trends & Challenges. In: VIII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa, Maringá.
- Pereira Jr., N., Aranda, D., Melo, W.C., Schlittler, L.A.F.S., Costa, A.C.A., 2009. Biocombustíveis Líquidos no Brasil. In: Silvia Daniela Romano. (Org.). *Biocombustíveis Líquidos em Iberoamérica*. Ediciones Cooperativas, 1, 59-86.
- Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 577–591.
- Quay, D.H.X., Bakar, F.D.A., Rabu, A., Said, M., Illias, R.M., Mahadi, N.M., Hassan, O., Murad, A.M.A., 2011. Overexpression, purification and characterization of the *Aspergillus niger* endoglycanase, *EglA*, in *Pichia pastoris*. *African Journal of Biotechnology*, 10, 2101-2111.
- Rabelo, S.C., 2010. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção etanol de segunda geração. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo-SP, p.447. (Tese D.S.).
- Rabinovich, M.L., Melnik, M.S., Boloboba, A.V., 2002. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 38, 305.
- Rizzatti, A.C.S., Freitas, F.Z., Bertolini, M.C., Peixoto-Nogueira, S.C., Jorge, J.Á., Terenzi, H.F., Polizeli, M.L.T.M., 2008. Regulation of xylanase in *Aspergillus phoenicis*: a physiological and molecular approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 237-244.
- Rizzatti, A.C.S., 2004. Propriedades regulatórias e funcionais do sistema xilanolítico do fungo *Aspergillus phoenici*. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP. (Tese D.S.).
- Rodrigues, L.D., 2010. A cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de biocombustíveis: impactos ambientais e o zoneamento agroecológico como ferramenta para mitigação. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora-MG, p.64. (Dissertação Monografia).

- Sandgren, M., Sahlberg, J., Mitchinson, C., 2005. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog. Bioph. Mol. Biol.*, 89, 246-291.
- Santos, F.A., Queiróz, J.H.D., Colodette, J.L., Fernandes, A.S., Guimarães, V.M., Rezende, S.T., 2012. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*, 200, 15, 1-7.
- Sakon, J., Irwin, D., Wilson, D.B., Karplus, P.A., 1997. Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 4(10), 810-8.
- Scidac- Scientific Discovery through Advanced Computing. Disponível em: <<http://www.scidacreview.org>>. Acesso em: 15 de Junho de 2010.
- Shallom, D., Sahoham, Y., 2003. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Biotechnology*, 6, 219–228.
- Silva, N.L.C., 2010. Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, p.123. (Dissertação M.S.).
- Singh, P., Suman, A., Tiwari, P., Arya, N., Gaur, A., Shrivastava, A.K., 2008. Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. *World Journal Microbiological Biotechnology*, 24, 664 – 673.
- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, A., 2010. Advancement and comparative profiles in the production Technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46, 541-549.
- Spiridonov, N.A., Wilson, D.B., 1998. Regulation of biosynthesis of individual cellulases in *Thermomonospora fusca*. *J. Bacteriol.*, 180(14), 3529-32.
- Souza, C.J.A.D., 2011. Produção de etanol por sacarificação e fermentação simultâneas do bagaço de cana-de-açúcar utilizando leveduras termotolerantes. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, p.63. (Dissertação M.S.).
- Sticklen, M., 2006. Plant genetic engineering to improve biomass characteristics for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 315–319.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review. *Bioresource technology*, 83, 1-11.
- Sunna, A., Antranikian, G., 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 17, 39–67.

- Tamaru, Y., Liu, C.C., Ichi-Ishi, A., Malburg, L., Doi, R.H., 1999. Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation. Uni Publishers Co. 488.
- Tavares, V.B., Sivieri, K., Ceron, C.R., Da Silva, R., Trabuco, E., 1998. Utilização de resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. Química Nova, 21(6), 722-725.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. Int. J. Mol. Sci., 9(9), 1621–1651.
- Watanabe, H., Tokuda, G., 2010. Cellulolytic Systems in Insects. Annual Review of Entomology, 55, 609-632.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos Gerais

Os objetivos deste trabalho foram produzir, caracterizar e aplicar uma xilanase de *Fusarium oxysporum* em branqueamento de polpa Kraft e na sacarificação de bagaço de cana. Posteriormente, clonar uma endoglicanase B de *Aspergillus niger* e realizar sua caracterização *in silico*

4.2. Objetivos Específicos

- Purificar e caracterizar bioquimicamente uma xilanase de *Fusarium oxysporum*;
- Aplicar a xilanase de *Fusarium oxysporum* no processo de branqueamento de polpa Kraft e na sacarificação de bagaço de cana como aditivo em coquetel celulósico;
- Clonar uma endoglicanase B de *Aspergillus niger* e realizar sua caracterização *in silico*.

5. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA XILANASE DE *FUSARIUM OXYSPORUM* E APLICAÇÃO NA SACARIFICAÇÃO DE BIOMASSA E NO BRANQUEAMENTO DE POLPA

S.R. Pires^a, J. H. de Queiroz^a, T. R. Dutra^a, V. M. Guimarães^a, S. T. de Rezende^a, J. G. Ferreira^a

^aDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-000, Brasil.

5.1. RESUMO

A degradação da parede celular de plantas por fungos envolve a ação combinada de enzimas hidrolíticas, incluindo xilanases. Neste trabalho, uma xilanase de *Fusarium oxysporum* foi purificada utilizando procedimento de ultrafiltração, e cromatografia de troca iônica e de exclusão molecular. A xilanase exibiu massa molecular de aproximadamente 21 kDa no SDS-PAGE e uma maior atividade a 60 °C e pH 6.0. A enzima foi capaz de hidrolisar substratos específicos, incluindo xilana *birchwood* e xilana *oat spelts*. O valor de K_M foi 0,85 mM e o valor de V_{max} foi 0,23 $\mu\text{M}/\text{min}$, no substrato xilana *birchwood*. A atividade enzimática foi drasticamente inibida por SDS, Fe^{+2} , Cu^{+2} , Al^{+3} , dentre outros. A xilanase foi ativada por Mg^{+2} e demonstrou uma alta termoestabilidade a 50 °C, com $t_{1/2}$ de 26,1 h. Em testes de aplicação, a adição da xilanase de *Fusarium oxysporum* na hidrólise do bagaço de cana alcalinamente tratado promoveu uma sacarificação significativamente superior quando comparada á hidrólise realizada somente com o coquetel de celulose comercial. A ação da xilanase de *F. oxysporum* foi também avaliada em testes de branqueamento nos quais a adição da enzima ao licor de branqueamento promoveu um decréscimo do número Kappa.

Palavras-chave: Xilanase; *Fusarium oxysporum*; Aplicações Industriais.

5.2. INTRODUÇÃO

O fungo patogênico *Fusarium oxysporum* é amplamente distribuído, e coloniza os mais diversos hospedeiros como animais e diferentes espécies de plantas (Di Pietro et al., 2001). Tem sido caracterizado como um bom produtor de diversas enzimas hidrolíticas, e como um importante microorganismo envolvido na penetração de plantas por patógenos (Di Pietro et al., 2001; Saha, 2002).

Celulose, hemicelulose e lignina são os maiores componentes da parede celular de plantas (Ahmed et al., 2009). As hemicelulases são enzimas produzidas por muitas espécies de bactérias, fungos e plantas e são responsáveis pela degradação da hemicelulose na parede celular de plantas. As xilanases (E.C.3.2.1.8) são hemicelulases que atuam na despolimerização das fibras de celulose. Elas agem junto com outras hemicelulases, tais como as β -xilosidases (E.C. 3.2.1.37), mananases (E.C. 3.2.1.78), α -arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55), dentre outras, sendo fundamentais no processo de exibição das fibras de celulose, devido à habilidade de promover a degradação seletiva das xilanas (Gottschalk et al., 2010; Falkoski et al., 2012). As xilanases catalisam a hidrólise da xilana produzindo xilooligossacarídeos, que podem ser convertidos a açúcares. Devido a estas características, as hemicelulases têm sido muito estudadas com referência às suas propriedades e aplicações comerciais, tendo sido consideradas enzimas com grande potencial nas indústrias de biocombustível, e de papel e celulose (Ahmed et al., 2009).

Nesse sentido, estão sendo realizadas pesquisas buscando técnicas para o uso de bagaço de cana-de-açúcar como fonte alternativa na produção de biocombustíveis (Ogeda e Petri, 2010). A estrutura complexa do bagaço de cana apresenta em sua constituição, celulose, hemicelulose e lignina, apresentando significativo potencial para aumentar a produção de biocombustível a partir de matéria-prima renovável (Bortolazzo, 2011). Celulose e hemicelulose podem ser hidrolisadas por produtos químicos (ácidos) ou enzimas (sacarificação) a açúcares que podem ser fermentados a diversos produtos, como o etanol (Costa, 2011; Santos et al., 2012).

Outra aplicação industrial destas enzimas é no branqueamento da polpa de celulose, no qual as xilanases facilitam o processo de degradação da lignina. Estas enzimas podem ser usadas durante o processo de branqueamento da polpa, auxiliando na remoção de resíduos de xilana que se precipitam sobre as fibras de celulose durante o processo. A fração xilana precipitada sobre as fibras é geralmente associada a resíduos

de lignina, que são responsáveis pela cor escura da polpa de celulose. Alguns estudos mencionam como as xilanas afetam o branqueamento da polpa, no entanto, podemos encontrar trabalhos que confirmam que o conteúdo de xilana das polpas influencia o branqueamento negativamente, aumentando o consumo de reagentes químicos (Pedrazzi et al., 2011).

Este artigo descreve a purificação e caracterização de uma xilanase de *Fusarium oxysporum* e suas potenciais aplicações biotecnológicas. Descrevemos sua aplicação em processo de sacarificação de biomassa, usando um complexo de celulase comercial na presença e na ausência de atividade da xilanase de *Fusarium oxysporum* e estabelecemos comparações. Além disso, investigamos o efeito desta enzima no branqueamento da polpa Kraft de eucalipto.

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Cultivo do Microrganismo e Produção da Enzima

O fungo *Fusarium oxysporum* utilizado neste estudo, foi obtido da coleção de fungos do Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. A cultura foi mantida em meio BDA (Batata Dextrose Agar), incubada a 28 °C durante 7 dias e, em seguida, armazenada a 4 °C. O volume da suspensão de esporos para obter uma concentração final de 10⁶ esporos/mL foi transferido para o meio líquido contendo 1% (p/v) de farelo de trigo como fonte de carbono e (em g/L): 1,5 KH₂PO₄, 0,5 MgSO₄.7H₂O, 0,25 CuSO₄, 1,0 NH₄NO₃ e 2,0 de extrato de levedura. Além disso, o meio foi suplementado com MnCl₂ (0,09mg), H₃BO₃ (0,07mg), NaMoO₄ (0,02mg), FeCl₃ (1,0mg) e ZnSO₄ (3,5mg) em p/v, como elementos traço. Após incubação a 28 °C, por quatro dias, o micélio foi removido usando papel de filtro e o filtrado foi submetido à centrifugação (21.350 x g, 30 min, 4 °C). O sobrenadante contendo xilanase foi armazenado a 4 °C e utilizado nos ensaios enzimáticos e nas etapas de purificação.

5.3.2 Ensaio Enzimático

A atividade de xilanase foi determinada utilizando 400 µL de xilana *birchwood* (concentração final de 1,5% p/v) em 100 mM de tampão acetato de sódio como substrato, pH 5,0 e 100 µl de solução de enzima. A reação foi realizada por 10 min a 50 °C, paralisada com a adição de 500 µl de reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), e fervida por 5 minutos. Este ensaio foi denominado "ensaio padrão de xilanase". Todos os ensaios foram realizados com três repetições, e os valores médios calculados.

Os valores de absorvância a 540 nm foram determinados e convertidos em moles de açúcar redutor produzido utilizando uma curva padrão de xilose. Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de xilose por minuto nas condições de ensaio.

5.3.3 Concentração Protéica

A concentração de proteína nas amostras enzimáticas foi determinada de acordo com Bradford (1976). O meio de reação continha uma mistura de 0,2 ml do reagente de Bradford, 0,5 a 0,8 ml da solução da amostra e 0,0-0,3 ml de água destilada. Após 15 minutos de incubação, a concentração de proteína foi determinada a 595 nm utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

5.3.4 Purificação da Xilanase

O sobrenadante da cultura de *F. oxysporum* foi concentrado a 4 °C no sistema de ultrafiltração Amicon, modelo 8400, utilizando uma membrana de tamanho de poro de exclusão de 30 kDa (Millipore co., Billerica, MA, EUA). A amostra foi então aplicada em uma coluna de CM-Sepharose (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) (3 x 9 cm), incubada em tampão de acetato de sódio 0,025 M, pH 4,5. As proteínas adsorvidas foram eluídas em um gradiente de sal (0-1 M NaCl) a uma vazão de 60 mL/h (3 mL por tubo). As frações eluídas que mostraram atividade de xilanase foram combinadas e concentradas no sistema de ultrafiltração Amicon, usando uma membrana com um poro de exclusão de 3 kDa. Este processo foi realizado em uma centrífuga refrigerada, a 2.025 x g, por 1 h em 4 °C. A fração concentrada foi aplicada em uma coluna de Sephacryl S-200 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) (1.6 x 60 cm), em FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*, Amersham Pharmacia), incubada em tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 6,0, com uma vazão de 60 mL/h e frações de 3 mL foram coletadas. Todas as frações com atividade de xilanase foram agrupadas e utilizadas em estudos adicionais. As etapas de purificação da enzima foram realizadas à temperatura ambiente.

5.3.5 SDS-PAGE

A massa molecular da enzima foi estimada por eletroforese em gel de poli(acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) usando um gel de poli(acrilamida de 10% (p/v) (Laemmli, 1970). Os marcadores de peso molecular (S8445 *Sigma Marker™*) correspondiam a 200,0 kDa miosina, 116,0 kDa β-galactosidase, 97,0 kDa fosforilase b, 66,0 kDa albumina de soro bovino, 45,0 kDa ovalbumina, 36,0

kDa gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 29,0 kDa anidrase carbónica, 24,0 kDa tripsinogênio, inibidor de tripsina 20,0 kDa, 14,2 kDa α -lactoalbumin e 6,5 kDa aprotinina. O gel foi corado com prata (Heukeshoven e Dernick, 1988) ou com *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Meyer e Lambert, 1965).

5.3.6 Zimograma

O SDS-PAGE foi carregado em um gel de poliacrilamida 10% (p/v) contendo 0,1% (p/v) xilana *birchwood* polimerizada na matriz do gel. SDS e β -mercaptoetanol foram omitidos do gel e do tampão, respectivamente, e as amostras não foram aquecidas antes da análise. Após a eletroforese, o gel foi lavado duas vezes com isopropanol 25% (v/v) em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 6.0, por 30 min. Em seguida, o gel foi incubado em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 6.0 a 50 °C por 15 min. Após a incubação, o gel foi corado com Vermelho Congo (5 mg/ml) por 1h e lavado com NaCl 1 M até que bandas claras fossem observadas contra um fundo vermelho, o que indicou a hidrólise do substrato.

5.3.7 Efeitos do pH e da Temperatura na Atividade e na Estabilidade da Xilanase

O efeito do pH na atividade e estabilidade da xilanase foi medido dentro do intervalo de pH de 3.0-8.0, usando tampão McIlvaine (fosfato de sódio/ácido cítrico), para preparação das soluções de xilana *birchwood* (McIlvaine, 1921). O ensaio padrão de xilanase foi desenvolvido a 50 °C (como descrito acima). Da mesma forma, a influência da temperatura na atividade e estabilidade da xilanase foi avaliada em diferentes temperaturas de incubação (30-70 °C), também usando o ensaio padrão de xilanase.

5.3.8 Estabilidade Térmica e Tempo de Meia-vida da Xilanase

A estabilidade térmica da xilanase purificada foi determinada a 50, 55 e 60 °C por períodos de 30, 7 e 1 h respectivamente. O extrato enzimático foi diluído em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6.0. Durante o período de incubação, alíquotas foram retiradas para determinação da atividade residual em conformidade com o ensaio padrão

de xilanase. Em seguida, foi calculado o tempo de meia-vida, correspondente à perda de metade da atividade enzimática inicial.

5.3.9 Determinação dos Parâmetros Cinéticos e Especificidade de Substratos

Os experimentos de cinética foram realizados usando xilana *birchwood* em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6.0, como substratos, em diferentes concentrações. Os ensaios foram realizados a 50° C. A constante de Michaelis-Menten (K_M) e a Velocidade Máxima de Reação (V_{max}) foram calculadas pelas curvas de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk, usando o *software* Curve Expert versão 1.4 para Windows e o programa Sigma Plot®, versão 10.0.

A especificidade de substratos da xilanase foi avaliada através do ensaio enzimático, utilizando os substratos naturais xilana *birchwood* (concentração final de 1,5% p/v) e xilana *oat spelts* (concentração final de 1,5% p/v) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6.0, de acordo com o ensaio padrão de xilanase. Foi também avaliada a especificidade de substrato com o substrato sintético ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (ρ NP β Xil) na concentração final de 4,0 mM. Para este substrato a mistura de reação foi composta por 275 μ L de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6.0, 125 μ L de 4,0 mM de ρ NP β Xil, diluído em água destilada e 100 μ L de xilanase purificada. A reação foi incubada a 50 °C por 20 min e interrompida com a adição de 0,5 mL de Na₂CO₃ 0,5 M, sendo, em seguida, determinada a concentração de ρ -nitrofenil (ρ NP) a 410 nm.

5.3.10 Efeito de Íons, EDTA e SDS

Com o objetivo de se avaliar a ação de efetores na atividade de xilanase, 100 μ L das amostras de enzima em tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 6.0, foram pré-incubados com vários efetores durante 15 minutos à temperatura ambiente. Foram testados os íons Cu²⁺, Fe²⁺, Al³⁺, Mg²⁺, K⁺, Zn²⁺ e Ca²⁺ nas concentrações de 1 mM, o inibidor EDTA (1 mM) e o detergente Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) na concentração de 0,1% (v/v). Depois da pré-incubação, foram determinadas as alterações na atividade enzimática devido à adição dos efetores usando o ensaio padrão de xilanase.

5.3.11 Aplicações da Xilanase

Para os testes de aplicação da xilanase o extrato enzimático bruto contendo atividade de xilanase (obtido como mencionado anteriormente) foi concentrado por liofilização (*Lyophilizer* LC1500 - Terroni) e usado nos ensaios seguintes. Os dados foram analisados usando o programa Sigma Plot ®, versão 11.0 e as médias calculadas pelo teste-t.

5.3.11.1 Sacarificação de Bagaço de Cana Pré-tratado

Bagaço de cana moído (menos de 1 mm de dimensão das partículas), obtido localmente, foi submetido ao pré-tratamento alcalino antes de iniciar o teste de sacarificação. A biomassa foi seca em estufa a 70 °C até atingir uma massa constante. Hidróxido de sódio a uma concentração de 1% foi utilizado para pré-tratamento de 25 g de amostras de bagaço de cana de açúcar moído contendo 3% (0,75g) de matéria seca (p/v). O bagaço de cana utilizado continha 79% de carboidratos totais (0,59g) antes deste ser submetido ao pré-tratamento.

Os tratamentos foram realizados em duplicata em autoclave a 120 °C por 60 min. O material pré-tratado foi separado em fração sólida e líquida, usando um funil de *Buchner*, equipado com papel de filtro. Após o pré-tratamento, o sólido foi lavado com água destilada e seco a 105 °C durante 6 h. As amostras secas foram dispostas em recipiente hermético e armazenadas a 20 °C para o teste de hidrólise enzimática.

Para determinar o efeito da enzima na conversão da biomassa celulósica, foram aplicados, em experimento de sacarificação de biomassa, o extrato bruto enzimático do fungo *Fusarium oxysporum* contendo atividade de xilanase e o complexo de celulasas comerciais, Multifect ® CL, Genencor International Inc. (Rochester, NY, EUA). Como parâmetro de comparação, foi usado como grupo controle o bagaço de cana hidrolisado apenas com o complexo de celulasas comerciais, Multifect ® CL. Ao mesmo tempo, a hidrólise da biomassa foi testada com o Multifect ® CL suplementado com 150 U ou 300 U de xilanase.

A sacarificação enzimática do bagaço de cana alcalinamente tratado foi realizada em tubos de ensaio de 100 mL numa concentração de sólidos inicial de 3% de matéria seca (p/v) em 25 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5. A enzima foi utilizada na concentração de 15 unidades de FPU por grama de biomassa. Azida de

sódio (10 mM) e tetraciclina (40 µg mL⁻¹) foram adicionadas à mistura de reação para inibir a contaminação microbiana.

A reação foi realizada em um *shaker* orbital a 50 °C por 72 h. Durante a hidrólise, alíquotas (0,5 mL) foram retiradas periodicamente da mistura reacional em diferentes tempos (3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h), imediatamente aquecidas a 100 °C por 15 min para desnaturar as enzimas, resfriadas e então centrifugadas por 5 min a 21.389 x g. O sobrenadante foi utilizado para a determinação dos açúcares redutores totais liberados durante a reação. A concentração de açúcar redutor foi quantificada pelo método DNS (Miller, 1959). Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados em duplicata. O controle foi feito substituindo o extrato enzimático ativo do mesmo extrato inativado após ser fervido durante 10 minutos. A taxa de hidrólise de carboidratos totais (celulose e hemicelulose) foi calculada através da equação abaixo, onde 0,9 é um fator de desidratação usado para converter glicose em glicano:

$$\text{Redimento de açúcar redutor (\%)} = \frac{\text{Quantidade de açúcar redutor liberado(g)} \times 0,9 \times 100}{\text{Quantidade de carboidrato no bagaço pré-tratado(g)}}$$

5.3.11.2 Branqueamento da Polpa de Celulose

Para os experimentos de branqueamento da polpa de celulose foi utilizado extrato enzimático bruto de *F. oxysporum* contendo atividade de xilanase e a xilanase comercial NS22083, da *Novozymes*. Os resultados do branqueamento realizado com a adição destas enzimas foram comparados com os resultados obtidos sem a adição das enzimas (grupo controle). Para este grupo, utilizou-se um volume correspondente de água destilada em vez de enzima. Foram utilizadas neste experimento polpas Kraft de *Eucalipto urograndis* com número Kappa 10,8, 52,3% ISO de alvura e viscosidade de 880 dm³/kg. Após serem submetidas ao protocolo de cozimento, polpas pré-branqueadas com O₂ foram branqueadas acima de 90-91% ISO de alvura utilizando as seguintes sequências de branqueamento: (AX) - D1-(EP) - D - P (clareamento realizado com incremento das enzimas) e um - D1-(EP) - D - P (clareamento realizado sem incremento das enzimas), onde: (X) tratamento enzimático, (D1) deslignificação com dióxido de cloro, extração alcalina com peróxido de hidrogênio (EP), (D) - branqueamento com dióxido de cloro e (P) branqueamento com peróxido de hidrogênio. Em todas as etapas de branqueamento as amostras de polpas foram condicionadas em

sacos de polietileno na temperatura exigida e foram lavadas entre as etapas com 9 m³ de água por tonelada de celulose. Todas as etapas foram realizadas em duplicata e as análises de branqueamento foram executadas no Laboratório de Celulose e Papel da Universidade Federal da Viçosa.

Nas polpas foram realizadas as análises de Número Kappa, Viscosidade, Alvura e Reversão da Alvura. As análises foram realizadas em conformidade com os procedimentos e normas constantes na Tabela 3.

Tabela 3. Procedimentos analíticos para caracterização físico-química de polpas de celulose branqueadas.

Parâmetros	Referências
Número Kappa	TAPPI um 245
Viscosidade	SCAN-CM 15:99
Alvura	TAPPI T 525 om 86
Reversão da Alvura	TAPPI UM 200 4h, 105° C, 0% UR, após aclimação das folhas por 4 horas em sala climatizada
Titulação de soluções e resíduos dos produtos químicos do branqueamento	Kraft, P., In: Pulp & Paper Manufacture, Vol. 1, McDonald, R.G. (editor), 2 nd ed., McGraw-Hill Book Company, New York, 1967, p. 628-725

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Purificação da Xilanase

A purificação da xilanase de *F. oxysporum* foi realizada em várias etapas seguidas. Após o cultivo do fungo, o sobrenadante foi concentrado, e o extrato foi submetido à cromatografia de troca aniônica, seguida de procedimentos de ultrafiltração e cromatografia de exclusão molecular. As frações adsorvidas na resina CM-Sepharose que apresentaram atividade de xilanase (Fig. 9A) foram combinadas, concentradas por ultrafiltração e submetidas a uma cromatografia de exclusão molecular (Fig. 9B).

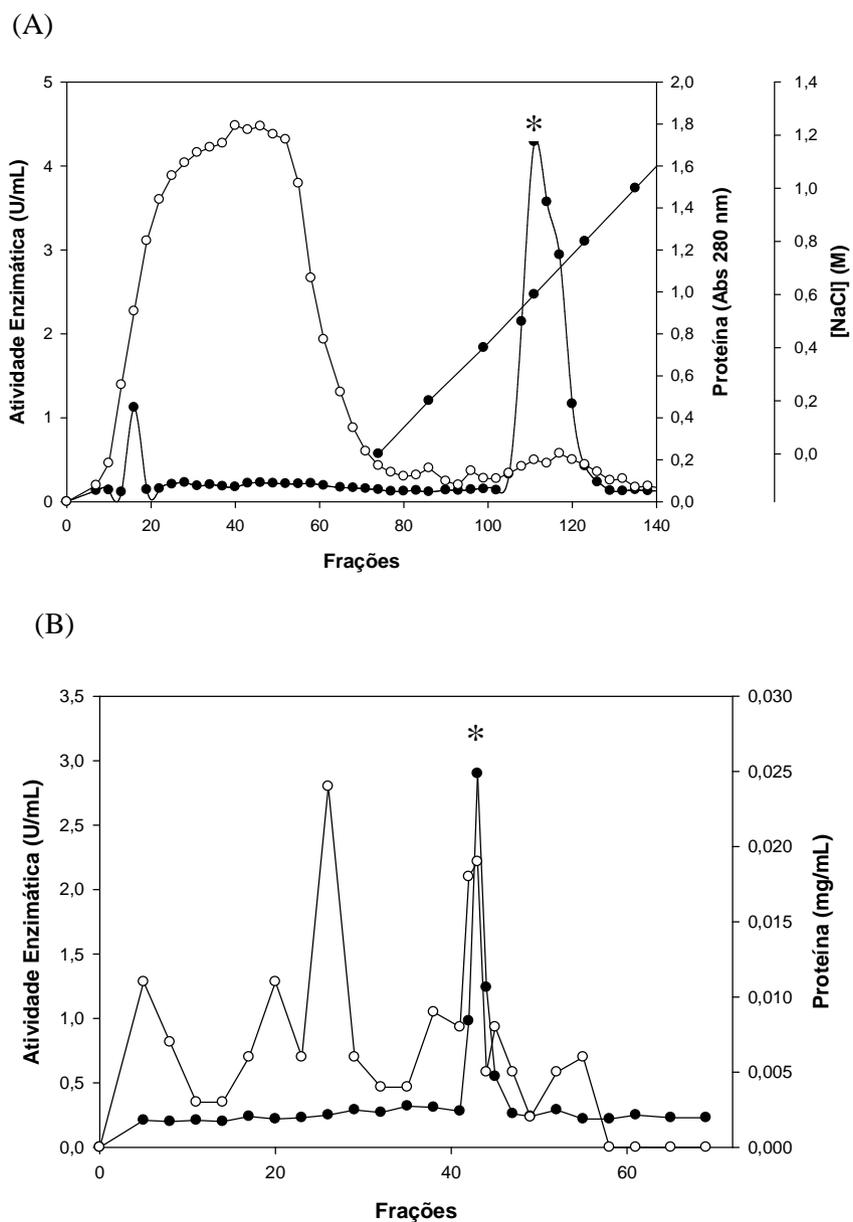


Figura 9. Perfis de eluição da xilanase de *F. oxysporum*. (A) Cromatografia de Troca Iônica em CM-Sepharose. (B) Cromatografia de Exclusão Molecular em coluna Sephacryl S-200. Absorbância a 280 nm (○); Atividade de xilanase (●); Gradiente linear de NaCl (-); (*) Pico de xilanase.

Obeve-se um fator de purificação de 2,11 com rendimento de cerca de 10,83% (tabela 4). O SDS-PAGE da fração isolada revelou uma banda simples com massa molecular de cerca de 21 kDa (Fig. 10A).

Tabela 4. Etapas para a purificação da xilanase de *F. oxysporum*.

Etapa de Purificação	Proteínas totais (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato Bruto	2,92	375,0	128,42	1,00	100,00
Troca iônica	0,69	90,16	130,66	1,02	24,04
Ultrafiltração	0,30	73,6	245,33	1,91	19,63
Filtração de gel	0,15	40,6	270,66	2,11	10,83

A análise do zimograma indicou que o extrato bruto apresentou dois polipeptídeos com atividade de xilanase (Fig. 10B). Uma xilanase com massa molecular similar, de 25 kDa, foi descrita na caracterização da xilanase acidófila de *Penicillium SP 40* (Kimura, et al., 2000). Além disso, a caracterização de uma xilanase de *Fusarium proliferatum* e de uma xilanase do fungo *Aspergillus terreus*, com massas moleculares de 22,4 kDa e 23.0 kDa foram, observadas por SDS-PAGE (Saha, 2002; Sorgatto et al., 2012).

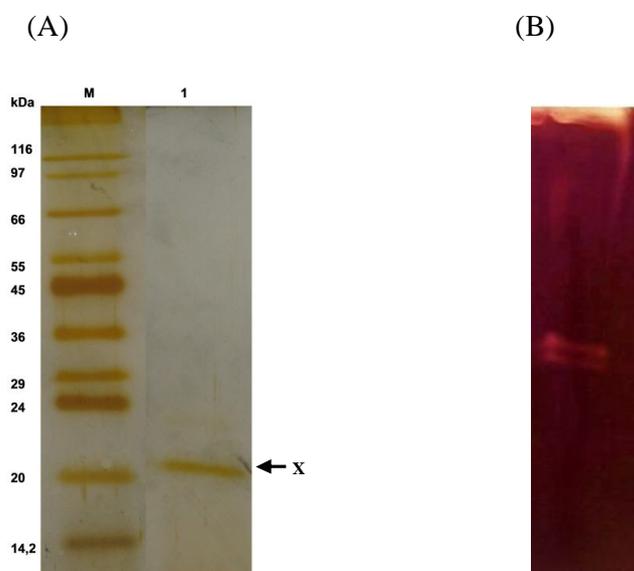


Figura 10. SDS-PAGE (A) e Zimograma (B) da xilanase de *F. oxysporum*. Linha M: marcador de peso molecular; Linha 1: xilanase de *F. oxysporum*; (B): atividade de xilanase sobre o gel não desnaturado, examinado com Vermelho Congo. A seta X indica a banda obtida no gel.

5.4.2 Efeitos do pH e da Temperatura na Atividade e na Estabilidade da Xilanase de *F. oxysporum*

A xilanase mostrou pH ótimo de 6,0 (Fig. 11A). O resultado foi comparável ao observado para outras xilanases de fungos, variando de 5.0 a 6.0 (Saha, 2002; Xiong et al., 2004; Fengxia et al., 2008). Verificamos que a enzima também apresentou comportamento semelhante em relação à estabilidade na mesma faixa de pH. A xilanase apresentou estabilidade máxima em pH 6.0 (Fig. 11A), demonstrando ser ainda bastante estável na faixa de pH de 3.5-8.0.

Da mesma forma, em temperaturas de incubação variando de 30-70 °C, a xilanase apresentou maior atividade a 60 °C (Fig. 11B), mantendo cerca de 55% da sua atividade a 70 °C, como outras xilanases de fungos (Ruiz-Arribas et al., 1995; Fengxia et al., 2008; Sorgatto et al., 2012).

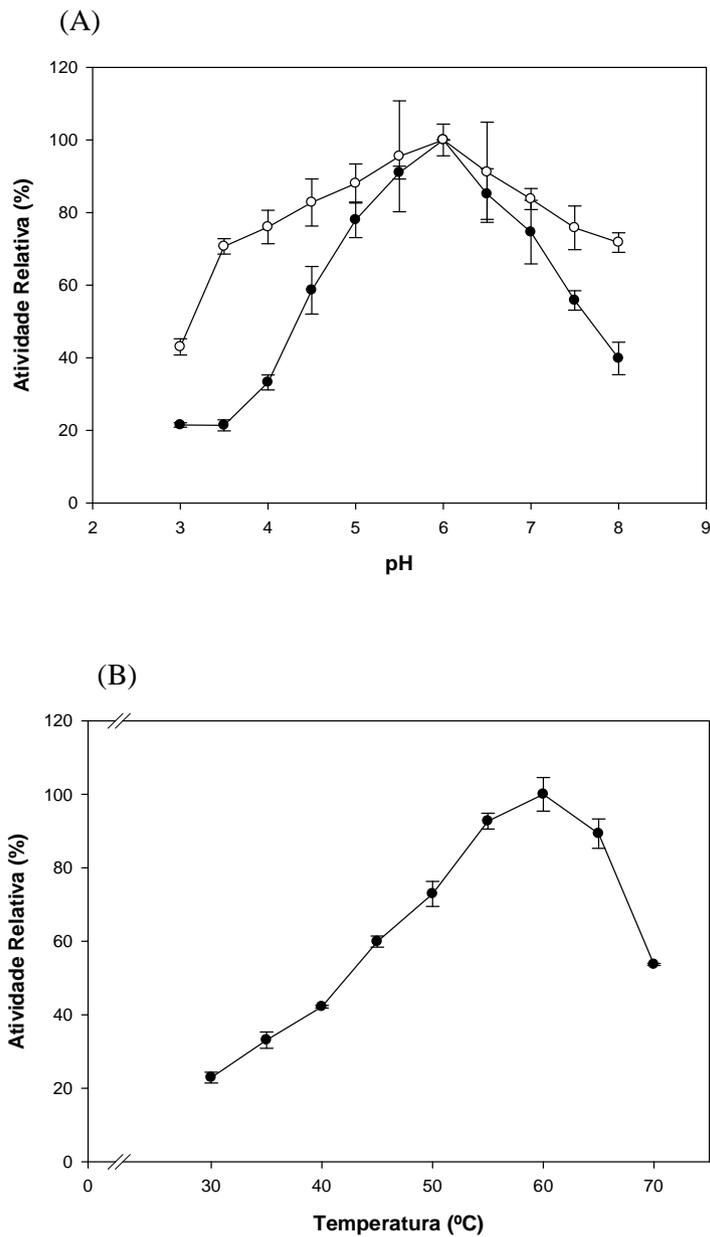


Figura 11. Efeitos do pH sobre a atividade (●) e estabilidade (○) (A) e os efeitos da temperatura na atividade da xilanase purificada de *F. oxysporum* (B).

A estabilidade térmica da xilanase purificada foi determinada em 50, 55 e 60 °C. A xilanase manteve mais de 45% de sua atividade a 50 °C durante 30 h, com um $t_{1/2}$ de 26,1 h. A 55 °C cerca de 40% da atividade foi mantida após 7 h de incubação, com $t_{1/2}$ de 3,69 h. No entanto, a 60 °C a xilanase mostrou baixa estabilidade: mantendo

menos de 40% de sua atividade após 1 h, com $t_{1/2}$ de 0,48 h. (Fig. 12). De forma semelhante, outros trabalhos mostram perda de grande parte da atividade de xilanase após 1h de incubação em temperaturas acima de 55 a 60 °C (Ruiz-Arribas et al., 1995). Essas propriedades tornam a xilanase atraente para possíveis aplicações industriais, tais como sacarificação de biomassa e branqueamento da polpa de celulose (Polizeli et al., 2005; Sorgatto et al., 2012).

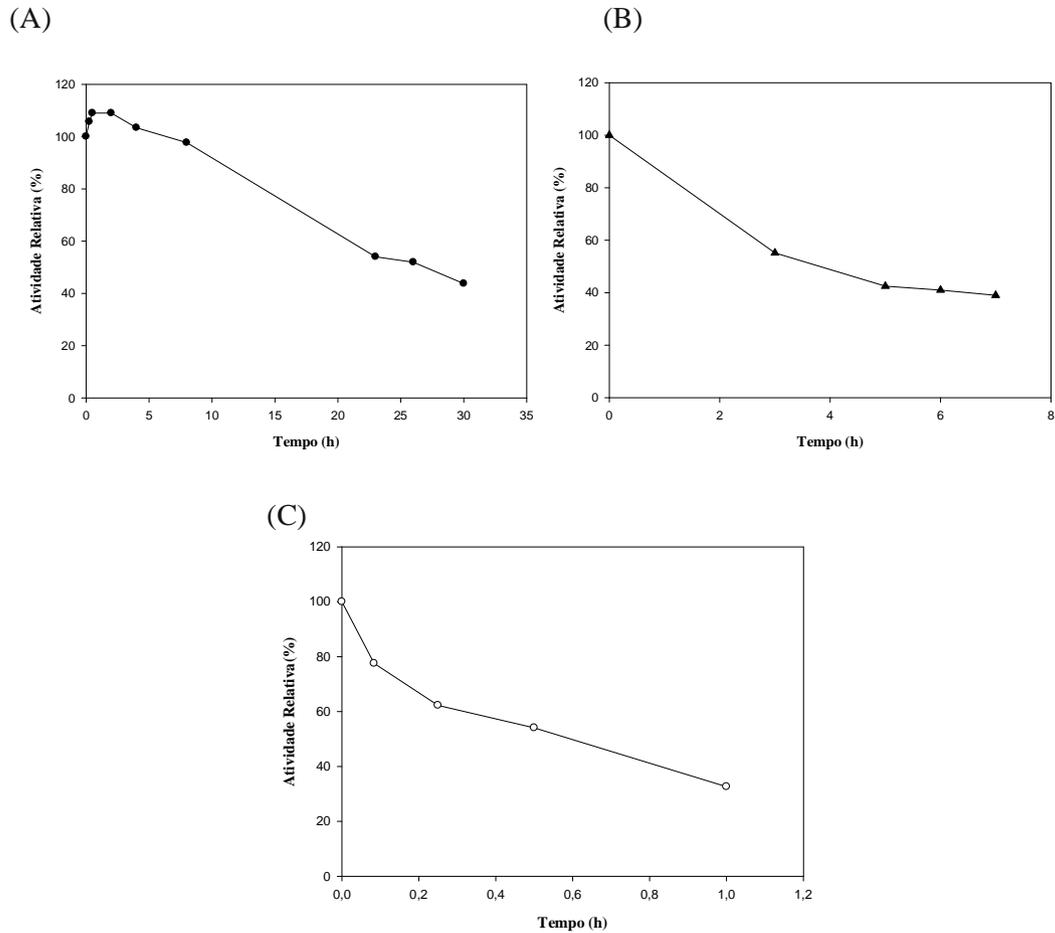


Figura 12. Efeitos de diferentes temperaturas sobre a estabilidade da xilanase de *F. oxysporum*. Temperaturas: 50° C (A); 55 °C (B) e 60 °C (C).

5.4.3 Parâmetros Cinéticos e Especificidade de Substratos

Nos experimentos de cinética usando xilana *birchwood*, foram calculadas a constante de Michaelis-Menten (K_M) e a velocidade máxima (V_{max}) obtendo-se os

valores de 0,85 mM e 0,23 μ M / min, respectivamente. Os valores encontrados de K_M e V_{max} foram relativamente menores do que os relatados na literatura para outras xilanases, que variam de 0,09 a 40,9 mg/ml para K_M e de 0,106 a 6300 μ M/min/mg para V_{max} (Sorgatto et al., 2012). O baixo valor de K_M indica alta afinidade da xilanase para xilana *birchwood*. Podemos citar trabalhos onde foram encontrados os seguintes valores de K_M e V_{max} , respectivamente: *Aspergillus ficuum* (3,747 mg/mL, 11,1 M/min/mg de xilana *birchwood*), (Fenixia et al., 2008) e *Bacillus alkaliphilic* (3,3 mg/mL e 1.10 umol/min/mg) (Nakamura et al., 1993).

Entre os substratos testados, a xilanase purificada exibiu especificidade para os substratos naturais xilana *birchwood* e xilana *oat spelts* em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6.0. Ao mesmo tempo, a enzima não promoveu a hidrólise do substrato sintético ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (ρ NP β Xil) na concentração final de 4,0 mM (Tabela 5). A especificidade da enzima foi de 14,5% maior para xilana *oat spelts* (composta de xilose e arabinose, além de glicose e galactose) do que para xilana *birchwood* (composta basicamente de xilose).

Tabela 5. Especificidade de substratos da xilanase de *F. oxysporum* purificada.

Substrato	Atividade relativa (%)^a
Xilana <i>Birchwood</i> 1,5%	100,0 \pm 4,51
Xilana <i>Oat Spelts</i> 1,5%	114,5 \pm 2,17
p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo	Nenhuma atividade detectada

^a Valores de Média \pm SD de três repetições. As atividades relativas são apresentadas como percentagens da atividade específica (100%) quando xilana *birchwood* foi utilizada como substrato.

Os resultados indicam que a xilanase promove eficientemente a hidrólise dos dois substratos naturais, sendo menor a taxa de hidrólise com o substrato solúvel xilana *birchwood*. Esses resultados são contrários a outros da literatura, nos quais a especificidade enzimática foi maior para xilana *birchwood* do que para xilana *oat spelts* (Lee et al., 2009; Sorgatto et al., 2012).

5.4.4 Efeito de Íons, EDTA e SDS na Atividade da Xilanase

A ação de efetores na atividade da xilanase foi investigada. Entre todos os efetores testados apenas Mg^{2+} estimulou a atividade da xilanase, indicando potencial

como cofator em reações catalisadas por esta enzima. Todos os demais agentes (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Al^{+3} , K^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , EDTA e SDS) inibiram a atividade da enzima, com destaque para o detergente SDS (atividade relativa de 45,3%) (Tabela 6). Muitos destes, como Cu^{2+} , Fe^{2+} e EDTA, já foram confirmados como inibidores da atividade de xilanase em outras pesquisas. O EDTA, devido a seu efeito quelante de íons metálicos, é conhecido como inibidor de muitas enzimas que necessitam da ação de íons para que possam atuar, entre elas, as xilanases (Sorgatto et al., 2012). O íon Mg^{2+} é um ativador da atividade da xilanase, diferente de algumas publicações, nas quais ele atuou como inibidor da atividade de xilanases (Saha, 2002; Sorgatto et al., 2012). Segundo Fenxia et al. (2008) a atividade da xilanase de *Aspergillus ficuum* AF-98 não foi afetada pelos íons Ca^{2+} e Zn^{2+} , diferente deste trabalho que mostrou uma inibição de 21,28% da atividade da xilanase na presença destes íons. O detergente aniônico SDS inibiu a atividade da xilanase em 54,7%. Este efeito pode ser atribuído ao fato de que o SDS se liga à enzima e induz à mudanças estruturais e desnaturação da mesma. A inibição da xilanase por SDS já foi relatada em outro trabalho, no qual o detergente usado em alta concentração (5% (p/v)) inibiu completamente a atividade da xilanase (Do et al., 2012).

Tabela 6. Efeito de íons, EDTA e SDS sobre a atividade da xilanase de *F. oxysporum*.

Efator	Concentração (mM)	Atividade Relativa (%) ^a
Controle	-	100,00 ± 5,46
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1	51,6 ± 0,36
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	51,48 ± 0,42
AlCl_3	1	55,3 ± 1,6
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	114,9 ± 11,71
KCl	1	91,5 ± 10,87
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	61,7 ± 2,57
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	78,72 ± 0,44
EDTA	1	65,96 ± 7,06
SDS	-	45,3 ± 0,99

^a Valores de Média ±SD de três experimentos. Atividade residual da xilanase em porcentagem da reação do controle.

5.4.5 Sacarificação de Bagaço de Cana

Com o objetivo de determinar o efeito da xilanase na conversão de biomassa celulósica, foi realizado um ensaio de sacarificação enzimática (15 unidades FPU por grama de biomassa) em bagaço de cana tratado alcalinamente com hidróxido de sódio a 1%. FPase foi usado como padrão de comparação por ser representativo da atividade total de celulase presente no coquetel (Martins et al., 2008; Falkoski et al., 2012). Neste teste, o efeito do coquetel de celulases comerciais, Multifect® CL, foi comparado ao resultado da hidrólise usando o mesmo coquetel suplementado com 150 U ou 300 U de xilanase de *F. oxysporum* (por grama de biomassa). Foi avaliada, pelo método DNS, a porcentagem total de açúcar redutor liberado em relação à quantidade inicial de carboidratos presentes no bagaço de cana antes deste ser submetido ao pré-tratamento, em cada um dos três experimentos de sacarificação enzimática, durante 72 h de reação (Fig. 13). Através da análise do gráfico, observamos que, com 24 horas de hidrólise, usando o Multifect® CL suplementado com 150 U ou 300 U de xilanase cerca de 20% de açúcar redutor é liberado na reação, enquanto que com o Multifect® CL não suplementado esta taxa não chega a 15%. Esta diferença continua acentuada até aproximadamente 50 h de reação. Mesmo depois de 72 horas de ensaio, o Multifect® CL não suplementado libera aproximadamente 19% de açúcar redutor, ao mesmo tempo em que, com o uso do Multifect® CL, suplementado com 300 U de xilanase cerca de 23% de açúcar redutor é liberado.

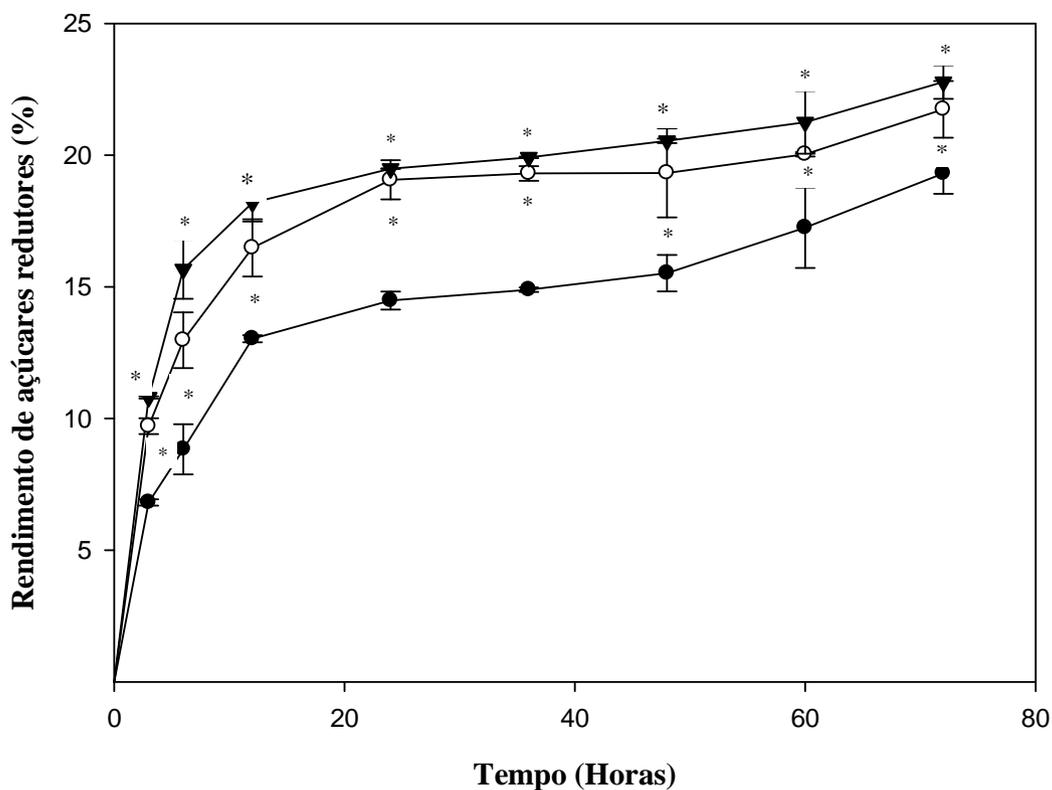


Figura 13. Liberação de açúcares redutores durante a sacarificação enzimática de bagaço de cana alcalinamente tratado usando o coquetel de celulases comerciais, Multifect® CL e Multifect® CL suplementado com xilanase de *F. oxysporum*. Multifect® CL (●); Multifect® CL + 150 U de xilanase de *F. oxysporum* (○); Multifect® CL + 300 U de xilanase de *Fusarium oxysporum* (▼).

* Diferença significativa pelo Teste-t.

A maior velocidade na liberação de açúcares redutores, quando Multifect® CL é suplementado com a xilanase pode representar uma grande economia de tempo e maior faturamento na indústria. O fato do coquetel suplementado com xilanase ser mais eficiente na hidrólise da biomassa pode ser explicado por alguns fatores. Já foi dito que Multifect® CL é um complexo celulolítico, rico em atividade de endoglicanase (Falkoski et al., 2012). A presença de enzimas acessórias (como as xilanases) facilitam o acesso de celulases à biomassa, por remover polissacarídeos não celulolíticos depositados sobre as fibras de celulose (McIntosh e Vancov, 2010; Falkoski et al., 2012). Assim, com o uso do coquetel suplementado com xilanase, temos uma maior taxa de sacarificação do bagaço de cana, visando o maior desempenho das enzimas na hidrólise da biomassa (McIntosh e Vancov, 2010). Os resultados obtidos indicam que o

uso de Multifect ® CL suplementado com xilanase promove uma maior taxa de hidrólise do bagaço de cana que o uso de Multifect ® CL não suplementado. No entanto, novos estudos e novas variáveis devem ser analisadas de forma a obter uma maior eficiência no processo de sacarificação.

5.4.6 Branqueamento de Polpa Kraft

Os resultados do branqueamento de polpas que receberam tratamento enzimático (extrato enzimático bruto de *F. oxysporum* contendo atividade de xilanase ou a xilanase comercial NS22083, da Novozymes) foram comparados com os resultados obtidos no branqueamento de polpas sem o uso de enzimas (grupo controle) (tabela 7).

Tabela 7. Efeitos da utilização de xilanases no branqueamento de polpas Kraft de *E. urograndis*.

Condições e Resultados	Amostras		
	Polpas não tratadas	Polpas tratadas com	Polpas tratadas
	com xilanase (controle)	xilanase de <i>F. oxysporum</i>	com xilanase comercial NS22083
Número Kappa após Estágio O	10,8	10,8	10,8
ClO₂, kg/tas	10,7	10,6	10,6
H₂O₂, kg/tas	7,0	7,0	7,0
NaOH, kg/tas	13,5	13,0	13,7
H₂SO₄, kg/tas	2,7	3,1	3,1
Xilanase, U/t	0	900000	900000
Cloro Ativo Total (CAT), kg/tas**	42,8	42,5	42,5
Branqueabilidade * * *	0,2	0,2	0,2
Alvura, ISO %	90,2 ± 0,2	91,0 ± 0,2	91,1 ± 0,2
Reversão da Alvura, % ISO	1,5 ± 0,1	1,8 ± 0,3	2,0 ± 0,2
Número Kappa	0,8 ± 0,0	0,6 ± 0,0*	0,7 ± 0,1
Viscosidade Final, kg/dm³	717 ± 8,5	674 ± 9,9*	660,5 ± 9,2*

* Diferença significativa pelo t-teste

** CAT (%) = (ClO₂ (kg/tas) * 2,63 + H₂O₂(kg/tas)*2.09)

* * * ud kappa/CAT

Verificou-se que polpas Kraft tratadas com xilanase de *F. oxysporum* exibiram propriedades que interferiram positivamente no branqueamento, e para alguns parâmetros, os resultados obtidos foram ainda mais pronunciados do que os resultados quando foi utilizada a xilanase comercial. Neste aspecto, o incremento da xilanase de *F. oxysporum* promoveu uma redução de 0,27 unidades do Número Kappa, em relação às polpas do grupo controle, sem incremento de enzima. Em relação ao Número Kappa inicial, a redução foi de 9,95 unidades (94,63% de redução) ao final dos estágios de branqueamento, o que confirma a eficácia da enzima. A redução do Número Kappa pela ação de xilanases tem sido frequentemente relatada na literatura (reduções significativas

de 26-30%) (Polizeli et al., 2005; Bae et al., 2008). O Número Kappa representa uma medida do conteúdo de lignina da polpa de celulose. A redução do Número Kappa promovida pelo tratamento com a xilanase pode ser relacionada com a remoção de xilanas depositadas na lignina das fibras ou à ação de xilanases na clivagem de ligações entre xilana e lignina, o que irá promover um maior acesso dos reagentes químicos usados no branqueamento à estrutura da polpa de celulose (Polizeli et al., 2005). Já as polpas tratadas com a xilanase comercial, tiveram uma redução não significativa do Número Kappa, em relação ao grupo controle. Em relação à viscosidade final das polpas, os resultados obtidos não foram promissores, uma vez que o uso de xilanases promoveu uma redução da viscosidade final. Polpas com viscosidade inicial de 880,0 dm³/kg atingiram após o processo de branqueamento, um valor de 674,0 dm³/kg para polpas tratadas com xilanase de *F. oxysporum* e 660,5 dm³/kg para polpas tratadas com xilanase comercial, uma redução em comparação ao valor de 717,0 dm³/kg obtidos para polpas branqueadas sem o uso das enzimas. Tanto em relação à Alvura, como em relação à Reversão da Alvura, os resultados obtidos com uso de xilanases não diferiram significativamente dos resultados obtidos pelo grupo controle. Outros estudos relatam que a administração de xilanase à polpa promoveu aumento de Alvura em 15 % (Bae et al., 2008). A branqueabilidade das polpas não foi afetada significativamente com a adição de xilanases no processo.

5.5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a xilanase de *Fusarium oxysporum* possui características importantes para aplicação industrial. A enzima apresentou alta estabilidade térmica a 50° C e demonstrou efeitos promissores tanto na hidrólise do bagaço de cana alcalinamente tratado como no branqueamento da polpa de celulose. Sua adição a um coquetel de celulases comerciais promoveu um aumento significativo do açúcar redutor liberado no processo de sacarificação e a ação da xilanase foi comparada à ação da xilanase comercial nos testes de branqueamento.

5.6. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Brasil.

5.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, S., Riaz, S., Jamil, A., 2009. Mini-review. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 84, 19–35.
- Bae, H.J., Kim, H.J., Kim, Y.S., 2008. Production of a recombinant xylanase in plants and its potential for pulp biobleaching applications. *Bioresource Technology*, 99, 3513–3519.
- Bortolazzo, N.G., 2011. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de- açúcar. Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, p.77. (Dissertação M.S.).
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Costa, D.A., 2011. Caracterização de leveduras termotolerantes para produção de etanol celulósico. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-MG, p.73. (Dissertação M.S.).
- Di Pietro, A., Huertas-González M.D., Gutierrez-Corona, J.F., Martínez-Cadena, G., Méglecz, E., Roncero, M.I., 2001. Molecular Characterization of a Subtilase from the Vascular Wilt Fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact.*, 14(5), 653-62.
- Do, T.T., Quyen, D.T., Dam, T.H., 2012. Purification and characterization of an acid-stable and organic solvent-tolerant xylanase from *Aspergillus awamori* VTCC-F312. *Science Asia*, 38, 157–16.
- Falkoski, D.L., Guimarães, V.M., De Almeida, M.N., Alfenas, A.C., Colodette, J. L., De Rezende, S.T., 2012. Characterization of Cellulolytic Extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and Its Application in Biomass Saccharification. *Appl Biochem Biotechnol*, 166, 1586–1603.
- Fengxia, L., Mei, L., Zhaoxin, L., Xiaomei, B., Haizhen, Z., Yi, W., 2008. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresource Technology*, 99, 5938–5941.
- Gottschalk, L.M.F., Oliveira, R.A., Bon, E.P.D.S., 2010. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemical Engineering Journal*, 51, 72–78.

- Heukeshoven, J., Dernick, R., 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*, 9, 28-32.
- Kimura, T., Ito, J., Kawano, A., Kondo, H., Karita, S., Sakka, K., Ohmiya, K., 2000. Purification, Characterization, and Molecular Cloning of Acidophilic Xylanase from *Penicillium* sp.40. *Biosci. Biotechnol Biochem.*, 64(6), 1230-7.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-683.
- Lee, J.W., Park, J.Y., Kwon, M., Choi, I.G., 2009. Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. *J. Biosci Bioeng.*, 107(1), 33-7.
- Martins, L. F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, A. J. P., Ramos, L. P., 2008. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresource Technology*, 99, 1417-1424.
- McIlvaine, T.C., 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Biochemistry*, 49, 183-186.
- McIntosh, S., Vancov, T., 2010. Enhanced enzyme saccharification of Sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresource Technology*, 101(17), 6718-6727.
- Meyer T.S., Lambert B.L., 1965. Use of Coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochem. Biophys. Acta*, 107, 144-145.
- Miller, G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-430.
- Nakamura, S., Wakabayashi, K.; Nakai, R., Aono, R.; Horikoshi, K., 1993. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(7), 2311-2316.
- Ogeda, T.L, Petri, D.F.S., 2010. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova*, 33(7), 1549-1558.
- Pedrazzi, C., Colodette, J.L., Gomide, J.L., Oliveira, R.C., Muguet, M.C.S., 2011. Influência do processo de polpação e do conteúdo de xilanas da polpa na branqueabilidade. *O Papel*, 72(5), 37- 55.

- Polizeli, M.L., Rizzatti, A.C., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67(5), 577-91.
- Ruiz-Arribas, A., Fernández-Abalos, J.M., Sánchez, P., Garda, A.L., Santamariá R.I., 1995. Overproduction, purification, and biochemical characterization of a xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8. *Appl Environ Microbiol.*, 61(6), 2414-9.
- Saha, B.C., 2002. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Process Biochemistry*, 37, 1279-1284.
- Santos, F.A., Queiróz, J.H.D., Colodette, J.L., Fernandes, S.A., Guimarães, V.M., Rezende, S.T., 2012. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*, 15(200), 1-7.
- Sorgatto, M., Guimarães, N.C.A., Zanoelo, F.F., Marques, M.R., Peixoto-Nogueira, S.C., Giannesi, G.G., 2012. Purification and characterization of an extracellular xylanase produced by the endophytic fungus, *Aspergillus terreus*, grown in submerged fermentation. *African Journal of Biotechnology*, 11(32), 8076-8084.
- Xiong, H., Nyssölä, A., Jänis, J., Pastinen, O., Weymarn, N.V., Leisola, M., Turunen, O., 2004. Characterization of the xylanase produced by submerged cultivation of *Thermomyces lanuginosus* DSM 10635. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 93–99.

6. PRODUÇÃO, CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE UMA ENDOGLICANASE B DE *ASPERGILLUS NIGER*.

6.1 RESUMO

A biomassa lignocelulósica é composta por um material extremamente complexo, formado por celulose, hemicelulose e lignina. Para aproveitá-la como matéria prima é necessário desestabilizar sua estrutura recalcitrante e transformá-la em açúcares passíveis de serem fermentados. Enzimas microbianas são capazes de atuar na biomassa realizando sua completa hidrólise. Neste contexto, o presente trabalho realizou o estudo de uma endoglicanase B produzida pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger*. Seu cultivo foi realizado em meio de cultivo indutor da atividade de endoglicanase. Através de estudos na literatura, foi proposta uma estratégia de clonagem. A clonagem foi confirmada e o fragmento sequenciado. A partir da sequencia obtida, foi realizada a caracterização *in silico* da endoglicanase. Foram realizados ainda, alinhamentos múltiplos de sequencia com outras celulasas, com o intuito de caracterizar a proteína clonada. A partir desta construção o trabalho tem como perspectiva a expressão da endoglicanase B em *Pichia pastoris*, e posteriormente, serem realizados experimentos de caracterização bioquímica e aplicações industriais da proteína expressa.

6.2. INTRODUÇÃO

A parede celular de plantas é um complexo estrutural composto de polissacarídios, e representa uma abundante fonte de biomassa a ser utilizada como fonte de energia renovável. A completa hidrólise da biomassa requer a ação combinada de muitas endo e exoenzimas, atuando sobre os polissacarídios formadores da celulose, hemicelulose e lignina. Desta forma, os monossacarídeos liberados poderão ser utilizados, como substrato de baixo custo, para geração de biocombustível.

A celulose é o principal constituinte da biomassa. É formada de polímeros de D-glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, formando uma estrutura cristalina, compacta e muito resistente ao ataque enzimático. Celulases são enzimas que atuam em sinergia para degradar a rígida estrutura do complexo lignocelulósico. Os três maiores grupos de celulases são: endo-1,4- β -D-glicanases (EC 3.2.1.4), que catalisam a hidrólise aleatória de ligações glicosídicas β -1,4 no interior da cadeia de celulose; exo-1,4- β -D-glicanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91 e EC 3.2.1.176) que atuam processivamente nos terminais da cadeia de celulose removendo dímeros (celobiose) e as 1,4- β -D-glicosidasas (EC 3.2.1.21), enzimas que catalisam a formação de resíduos de D-glicose a partir dos celobioligossacarídios (Sun e Cheng, 2002).

Embora as celulases sejam produzidas por uma gama de microrganismos, a maioria apresenta grandes restrições que dificultam ou oneram o seu uso para as indústrias. Para superar estas restrições a biologia molecular é uma poderosa ferramenta na produção enzimática, capaz de tornar o processo mais viável e potencialmente aplicável a nível industrial.

Neste sentido, o fungo *Aspergillus niger*, tem sido amplamente pesquisado e se constitui numa das maiores fontes para a produção industrial de celulases. As endo- β -1,4-glicanases são os maiores componentes das celulases de *A. niger* e pertencem à família 12 da superfamília das glicosil-hidrolases (composta por 131 famílias), conforme classificação do Cazy (*Carbohydrate Active Enzymes*) (Khademi, et al., 2002; Cantarel et al., 2009). Neste tópico, foi realizado um estudo com a endoglicanase B de *A. niger*. Em *A. niger* o gene *XlnR* codifica um ativador transcricional que regula a transcrição de genes que codificam para as endoglicanases A e endoglicanases B e que são requeridos para a hidrólise de polissacarídios em plantas (Van Peji et al., 1998a; Quay et al., 2011). As endoglicanases B possuem uma sequência consenso na região *upstream*, 5'-GGCTAA-3', na qual se liga o ativador transcricional XlnR. Já as

endoglicanases A possuem duas cópias desta sequência em sua região promotora (Van Peji et al., 1998b; Lockington et al., 2002).

A literatura relata a clonagem de uma endoglicanase A de *A. niger* no vetor pGEM- T *Easy* de forma semelhante à realizada neste trabalho. Neste estudo com a endoglicanase A de *A. niger* foi realizada a sua expressão em *Pichia pastoris*, seguida da purificação e a caracterização bioquímica da proteína obtida (Quay et al., 2011).

O presente trabalho teve como objetivos a produção de uma endoglicanase B do fungo filamentoso *Aspergillus niger*, sua clonagem e caracterização *in silico*, visando futuras aplicações industriais.

6.3. MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1. Microrganismo e Manutenção da Cultura

O fungo *Aspergillus niger*, utilizado nestes experimentos foi isolado a partir de bagaço de cana em decomposição e cedido pelo Laboratório de Tecnologia Bioquímica-UFV. As culturas foram mantidas e multiplicadas em placas de Petri contendo meio sólido BDA (batata-dextrose-ágar), o qual foi autoclavado por 20 min a 121 °C. Os fungos foram incubados, a 28 °C, em estufa B.O.D., por dez dias. Após cultivo, foram mantidos sob refrigeração a 4 °C.

6.3.2. Condições de Cultivo

Para inoculação em cultura submersa, o fungo foi ativado em meio sólido, em placas de Petri. Para crescimento em meio líquido, o fungo foi cultivado em meio mineral contendo 0,2% de extrato de levedura, 0,3% NaNO₃, 0,05% KCl, 0,05% MgSO₄.7H₂O, 0,01% FeSO₄.7H₂O, 0,1% K₂HPO₄ e 1,5% da fonte de carbono carboximetilcelulose (CMC), todas em p/v. O pH do meio mineral foi ajustado para 6,0.

O fungo foi cultivado em erlenmeyers de 250 mL por 9 dias sob agitação constante de 180 rpm em *shaker* a 28 °C. Após o cultivo, o meio foi filtrado em filtro de poliéster e posteriormente centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante, constituído pelo extrato bruto, foi recolhido e armazenado em freezer a -20 °C para análise de atividade enzimática.

6.3.3. Ensaio de Atividade de Endoglicanase

A atividade de endoglicanase foi determinada quantificando-se o açúcar redutor liberado durante o ensaio utilizando-se o reagente ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1956). A Unidade Endoglicanásica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de equivalente redutor em 1 minuto de reação, nas condições de ensaio. O meio de reação foi constituído por 400 μL de solução de carboximetilcelulose (CMC) 0,63% preparada em tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5 e 100 μL de solução enzimática diluída. A reação foi conduzida a 50 °C durante 30 minutos sendo interrompida pela adição de 500 μL do reativo de DNS. Após os testes

terem sido fervidos por 5 min, foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm e os valores convertidos em U de atividade enzimática utilizando-se uma curva padrão de glicose, anteriormente preparada.

6.3.4. Clonagem do Gene da Endoglicanase de *A. niger*

6.3.4.1 Busca em Banco de Dados e Desenho de *Primers* Específicos para Amplificação

Foram realizadas buscas nos bancos de dados da *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) de sequencias de genes que pudessem ser utilizadas como modelo para o desenho de oligonucleotídios para a amplificação dos genes de uma endoglicanase de *A. niger*, via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Assim, foi selecionada a sequencia da endoglicanase B de *A. niger* (Número de acesso: AJ224452), com 2441 bp, a partir da qual foram desenhados os seguintes oligonucleotídios específicos para a amplificação: F: 5' TGGCTCCGGACATAAGAAGA 3' e R: 5' CCCGTGTAAGCAGTTCCATC 3'. O desenho dos *primers* foi realizado com o auxílio do programa *Primer3* (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3).

6.3.4.2. Extração de RNA Total

O RNA total foi extraído de acordo com o procedimento proposto por Specht et al. (1982). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Em seguida, foram transferidas aproximadamente 3g do pó obtido para microtubos contendo 1 mL de Trizol e 150 µL de PVP-40 20% (p/v). As amostras foram homogeneizadas em vortex por 15 segundos e incubadas à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 20 min, a temperatura de 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, livre de RNase. O RNA foi precipitado com 0,5 mL de isopropanol à temperatura ambiente por 10 min e centrifugado a 12.000 g por 10 min. Após precipitação, o RNA foi lavado com etanol 75% (v/v), preparado com água DEPC (água deionizada tratada com dietil

pirocarbonato), e centrifugado a 7.500 x g por 10 min. Posteriormente, o RNA foi deixado à temperatura ambiente por aproximadamente 5 min para secagem. O RNA seco foi ressuspenso em 20 µL de água livre de RNase e estocado à temperatura de -80 °C.

As amostras de RNA total foram quantificadas em espectrofotômetro a 260 nm sendo a concentração do RNA expressa em µg.µL⁻¹. A sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão de corrida TBE 1X, contendo 0,1 µg.mL⁻¹ de brometo de etídeo. O padrão de bandas do RNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com o sistema de fotodocumentação *Eagle Eye II* (STRATAGENE).

6.3.4.3. Síntese da Primeira Fita de cDNA

As amostras de RNA quantificadas foram tratadas com *RQI DNase RNase-free* (PROMEGA), conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, foram incubadas em tampão de reação (Tris-HCl 40 mM, pH 8.0; MgSO₄ 10 mM e CaCl₂ 1 mM), a 37 °C, por 45 min, e extraídas com igual volume de fenol e de clorofórmio: álcool isoamílico após centrifugação a 11.000 x g, a 4 °C, por 2 min. Após transferência da fase aquosa para um novo tubo, foi realizada nova lavagem com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa foi submetida à precipitação com acetato de sódio 3M e etanol 96%, a -20 °C, por 1 hora, e depois centrifugada a 12.000 g por 15 min, na mesma temperatura. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspenso em água DEPC. As amostras de RNA foram devidamente quantificadas no espectrofotômetro a 260 nm.

Para síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o *Kit SuperScriptTM First-Strand Synthesis System* (INVITROGEN) segundo as recomendações do fabricante. O RNA total (2 µg), usado como molde, foi incubado por 20 min, a 70 °C com 1 µL de oligonucleotídios Oligo(dT) 12-18. Para a reação foram adicionados tampão de PCR (Tris-HCl 20 mM, pH 8.4 e KCl 50 mM), MgCl₂ mM, dNTP's 0,5 mM e DTT 5mM. Esta reação foi aquecida e mantida a 65 °C por 5 min. Em seguida foi transferida para o gelo e foram adicionadas 200U da enzima transcriptase reversa e as amostras foram incubadas a 37 °C por 50 min e a 70 °C por 15 min para síntese da primeira fita de cDNA. Posteriormente, o RNA foi degradado pela adição de 1U de RNase H sob incubação a 37 °C por 20 min e armazenado a -20 °C até o momento de uso. Como

controle negativo foram realizadas reações que continham todos os reagentes, exceto a enzima transcriptase reversa.

6.3.4.4. Amplificação do Gene da Endoglicanase Via Reação de PCR

O cDNA correspondente ao gene que codifica para a endoglicanase foi utilizado como molde para a amplificação por PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos.

Para cada reação de PCR foi utilizada uma mistura contendo 5,0 µL de DNA genômico, 2,5 mL de tampão *Thermophilic DNA* 10X (100 mM de Tris, 500 mM de KCl e 1% de Triton X - 100), 2,4 µL de MgCl₂ 25 mM, 1,0 µL de cada *primer* (5 µM), 2,0 µL de solução 2,5 mM de dNTP e 1,0 µL da enzima Taq polimerase (1 U.µL⁻¹), sendo o volume completado para 25,0 µL com água deionizada autoclavada.

Essa reação de PCR foi desenvolvida em termociclador, onde inicialmente foi incubada a 94 °C por 3 min, seguida pela realização de 37 ciclos de amplificação. Cada ciclo foi constituído nas etapas de separação das fitas a 94 °C por 1 min, anelamento dos *primers* a 59 °C por 1 min e alongamento da fita a 72 °C por 2 min. Ao final, foi realizado um ciclo a 72 °C por 7 min. Os produtos do PCR foram visualizados em gel de agarose 1,2% com brometo de etídeo (10 µg.mL⁻¹).

Para a otimização das condições de realização do PCR, foram realizados vários testes variando a temperatura de anelamento dos *primers*.

6.3.4.5. Purificação dos Produtos de Amplificação da Reação de PCR

Os produtos da reação de PCR foram purificados pelo *QIAquick PCR Purification Kit*, segundo o protocolo descrito pelo fabricante. Ao final do processo de purificação, o DNA foi eluído da coluna, adicionando 30 µL do tampão de eluição.

6.3.4.6. Clonagem do Fragmento de PCR

A reação de ligação do fragmento de DNA que codifica para a endoglicanase B de *A. niger* ao vetor foi realizada utilizando o Kit pGEM[®]- T *Easy Vector System I* da Promega, e foi conduzida conforme procedimento descrito pelo fabricante. Para preparo da reação foram utilizados 5,0 µL do tampão *2X Rapid Ligation Buffer*, T₄ DNA Ligase

(60 mM Tris HCl pH 7,8, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 1 mM ATP, 10% PEG), 1,0 µL do pGEM[®]- T *Easy Vector*, 3,0 µL do produto de PCR purificado a partir do gel de agarose (aproximadamente 50 ng), 1,0 µL de T₄ DNA Ligase (10 mM Tris HCl pH 7,4, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 50% de glicerol), totalizando um volume de 10,0 µL. Após o preparo, a reação foi incubada a 4 °C, por um período de 12 h.

6.3.4.7. Transformação de *E. coli* e Diagnóstico Molecular dos Transformantes

Com o plasmídeo obtido foi realizada a transformação de células ultracompetentes de *E. coli* DH5α, por choque térmico de acordo com Sambrook et al. (1989). A transformação foi realizada segundo o protocolo: 5 µL do fragmento fusionado ao vetor foram adicionados à 100µL de células ultracompetentes e esta mistura foi incubada no gelo por 30 min. Após choque térmico, a 42 °C por 50 s, as células permaneceram no gelo por mais 2 min, para incorporar o plasmídeo. Em seguida, foram adicionados 800 µL de meio LB (triptona 10 g.L⁻¹; extrato de levedura 5 g.L⁻¹; NaCl 10 g.L⁻¹). Após incubação por 1 h a temperatura de 37 °C a 150 rpm, as células foram concentradas por centrifugação a 1.500 x g por 10 min, ressuspensas em meio LB, e plaqueados em meio LB com ampicilina 50 µg.µL⁻¹, 1 mg de X-Gal e 10 mM de IPTG. As placas foram incubadas por 12 h a 37 °C, para crescimento e multiplicação celular.

Após incubação das placas contendo as células transformadas foi realizada a seleção de 10 colônias brancas por placa, das quais foram feitas uma réplica de cada. Para selecionar as colônias transformantes e recombinantes, ou seja, que apresentam o plasmídeo contendo o fragmento de DNA de interesse inserido na célula bacteriana estas foram testadas quanto á incorporação. Assim, foi utilizada uma mistura contendo o material genético de uma colônia transformada, 2,5 µL de tampão *Thermophilic DNA* 10X (100 mM de Tris, 500 mM de KCl e 1% de Triton X - 100), 2,4 µL de MgCl₂ 25 mM, 1,0 µL de cada *primer*, 2,0 µL de solução 2,5 mM de dNTP e 1,0 µL da enzima Taq polimerase (1 U.µL⁻¹), sendo o volume completado para 25,0 µL com água deionizada autoclavada. Essa reação de PCR foi realizada no termociclador nas mesmas condições descritas no item 6.3.4.4.

Os produtos do PCR de colônia foram visualizados em gel de agarose 1%, em TBE, com brometo de etídeo 0,1 µg.mL⁻¹ para análise dos fragmentos amplificados.

Após eletroforese, a integridade dos fragmentos amplificados foi determinada sob luz ultravioleta e o gel fotografado com o sistema de fotodocumentação.

6.3.4.8. Extração do DNA Plasmidial e Sequenciamento

Cada colônia recombinante contendo o fragmento de interesse, foi transferida para tubos com meio LB e ampicilina $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e incubada a 37°C e agitação de 180 rpm por 12 h. O clone foi estocado, posteriormente, a -80°C , em glicerol 25%.

A extração do DNA plasmidial foi realizada utilizando o *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* da *Promega*, conforme procedimento indicado pelo fabricante. Ao final, o DNA foi eluído em $50 \mu\text{L}$ de *Nuclease-Free Water* e sua concentração verificada em gel de agarose. A clonagem foi confirmada através de reações de PCR, realizadas como anteriormente descrito.

O DNA foi sequenciado pela empresa Macrogen (Seoul, Coréia do Sul) e as sequencias obtidas foram analisadas pelo programa computacional *Sequencher* versão 4.1.4, sendo o alinhamento com outras sequencias disponíveis no *Genbank* realizado através do programa ClustalW (Thompson et al., 1994).

6.3.5. Caracterização *in silico* do Gene da Endoglicanase B de *A. niger*

Foram realizados estudos *in silico* da endoglicanase B de *A. niger* clonada em pGEM- T *Easy* e sequenciada. Através da sequencia codificante (CDS) foi realizada a predição da sequencia de aminoácidos. Sequencias protéicas foram alinhadas no programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (Thompson et al., 1994).

A pesquisa de peptídios sinal foi realizada usando o software SignalP. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Já o estudo de Modificações Pós-traducionais foi realizado usando o InterProscan (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_proscan.html), realizando predições de sítios de glicosilação, fosforilação, meristoilação, entre outros.

Alinhamentos múltiplos de sequencias e construção de árvore filogenética da proteína foi realizada usando o programa MEGA versão 4 (Tamura et al., 2007) e o método Neighbour-Joining (NJ) (Saitou e Nei, 1987) com testes para até 1000 repetições.

Foi realizada também a classificação da proteína na superfamília glicosil hidrolases (GH) baseado no Carbohydrate-Active Enzyme database (Cazy; <http://www.cazy.org/>).

6.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.4.1 Clonagem do Gene da Endoglicanase B de *A. niger*

Após a realização da clonagem, as colônias transformantes foram confirmadas por PCR (Fig. 14). No gel, podemos observar a presença de dois transformantes (bandas 1 e 4), com uma banda de aproximadamente 904 pb. A visualização desta banda confirmou a clonagem do fragmento que codifica para a endoglicanase B de *A. niger*, a qual passamos a designar de *AncEGLB* (endoglicanase B de *A. niger* clonada).

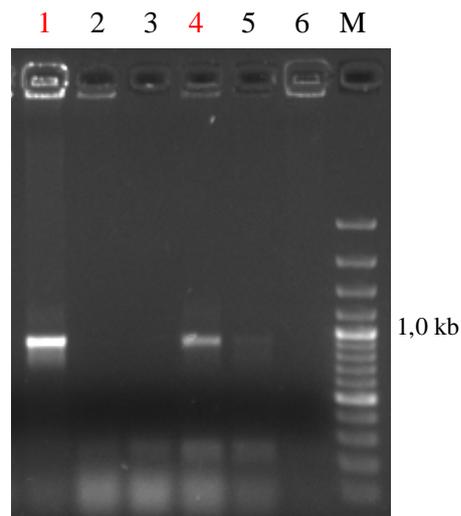


Figura 14. Gel de agarose para visualização do diagnóstico dos transformantes por PCR. (M) marcador de peso molecular de 100 pb (FERMENTAS); 1-6: sequencia da *AncEGLB* amplificada com oligonucleotídios específicos para a proteína. Em vermelho, destacadas as bandas 1 e 4, nas quais o fragmento de DNA foi inserido ao vetor.

O DNA plasmidial foi extraído destes tubos e os transformantes foram novamente selecionados por PCR com os *primers* específicos para o gene *AncEGLB*. O fragmento de 904 pb amplificado foi sequenciado e analisado (Fig. 15). A partir da sequencia do fragmento obtido, foi predita a sequencia deduzida de aminoácidos da endoglicanase B de *A. niger* clonada (Fig. 16). Estudos anteriores comprovam a grande similaridade de sequencia entre os membros desta família (família 12 das glicosil-hidrolases) e a presença de resíduos conservados, conforme destacado na figura 16

(Khademi, et al., 2002). Foi realizado ainda um alinhamento múltiplo de sequencias deduzidas de aminoácidos entre membros da família 12 das glicosil-hidrolases, no qual estão destacados estes resíduos conservados (Anexo 1. Fig. 1A).

ATGAAGTTTCAGAGCACTTTGCTTCTTGCCGCCGCGGCTGGTTCCGCGTTGGCTGTGCCTCATGGCTCCG
GACATAAGAAGAGGGCGTCTGTGTTTGAATGGTTCCGGATCGAACGAGTCTGGTGTGAATTTGGGACCAA
TATCCCAGGCGTCTGGGGAACCGACTACATCTTCCCGACCCCTCGACCATCTCTACGTTGATTGGCAAG
GGAATGAACTTCTTCCGCGTCCAGTTCATGATGGAGAGGTTGCTTCTGACTCGATGACTGGTTCATACG
ACGAGGAGTATCTGGCCAACTTGACGACTGTGGTAAAAGCGGTCACGGATGGAGGCGCGCATGCGCTCAT
CGACCCTCATAACTATGGCAGATAACAACGGGGAGATCATCTCCAGTACATCGGATTTCCAGACTTTCTGG
CAGAATCTGGCGGGCCAGTACAAAGATAACGACTTGCTCATGTTTGATACCAACAACGAATACTACGACA
TGGACCAGGATCTCGTGTGAATCTCAACCAAGCAGCCATTAACGGCATCCGCGCTGCAGGTGCAAGCCA
GTACATTTTCGTGCGAAGGCAACTCCTGGACCGGAGCTTGGACATGGGTCGATGTCAACGATAATATGAAG
AATTTGACCGACCCAGAAGACAAGATCGTCTATGAAATGCACCAGTACCTAGACTCCGACGGTTCCGGCA
CTTCGGAGACCTGTGTCTCCGGGACAATCGGAAAGGAGCGGATCACTGATGCTACACAGTGGCTCAAGGA
CAATAAGAAGGTCGGCTTCATCGGCGAATATGCCGGGGGTCCAATGATGTGTGTGCGGAGTGCCGTGTCC
GGGATGCTAGAGTACATGGCGAACAAACCCGACGTATGGAAGGGTGCCTCGTGGTGGGAGCCGGGCCAT
GGTGGGGAGACTACATTTTCAGCCTGGAGCCCCAGATGGAAGTCTTACACGGGTATGCTGGATATCCT
GGAGACGTATCTCTGA

Figura 15. Sequencia nucleotídica (CDS) da endoglicanase B de *A. niger* (Número de acesso: AJ224452). Destacada, em vermelho, a CDS da endoglicanase B de *A. niger* clonada. As preditas regiões de anelamento dos *primers* foram sublinhadas.

MKFQSTLLLLAAAAGSALAVPHGSGHKKRASVFEWFGSNESGAIEFGTNI PGVWGTDYIFPDPSTIISTLIGK
GMNFFRVQFMERLLPDSMTGSYDEEYLANLTTVVKAVTDGGAHALIDPHNYGRYNGEIISSTSDFQTFW
QNLAQYKDNLDLVMFDTNNEYDMDQDLVLNLNQAAINGIRAAGASQYIFVEGNSWTGAWTWVDVNDNMK
NLTDPEDKIVYEMHQYLDSDGSGTSETCVSGTIGKERITDATQWLKDNKVGFIGEYAGGSNDVCRSAVS
GMLEYMANNTDVWKGASWAAAGPWWGDYIFSLEPPDGTAYTGMLDILETYL

Figura 16. Sequencia deduzida de aminoácidos do cDNA da endoglicanase B de *A. niger* (Número de acesso: CAA11965). A sequencia deduzida de aminoácidos da endoglicanase B de *A. niger* clonada foi sublinhada. Em vermelho, resíduos conservados na sequencia de alguns membros desta família.

6.4.2 Caracterização *in silico* do Gene da Endoglicanase B de *A. niger*

6.4.2.1 Predição de Peptídeo Sinal

Foi realizada a pesquisa de peptídeo sinal presente na sequência com uso do *software* SignalP, identificando que o peptídeo sinal não foi clonado. Assim, a endoglicanase B de *A. niger* foi clonada sem o peptídeo sinal que a direcionaria para uma região específica da célula, quando a proteína fosse excretada. Este foi o motivo de não termos clonado a proteína inteira, assim, a proteína clonada provavelmente ficaria intracelular quando fosse expressa, já que não possui peptídeo sinal. A literatura relata, com frequência, a predição de peptídeo sinal usando programas computacionais, como o utilizado neste estudo (Chulkin et al., 2009; Hartl et al., 2011).

6.4.2.2 Estudo de Prováveis Modificações Pós-traducionais

Foi realizado estudo de Modificações Pós-traducionais no programa InterProScan. Inserida a sequência de aminoácidos da endoglicanase B de *A. niger*, foram realizadas predições de sítios prováveis de glicosilação, fosforilação, meristoilação, entre outros. Como não foi clonada a proteína inteira, somente modificações pós-traducionais a partir do aminoácido 66 poderão ser preditas para a endoglicanase B de *A. niger* clonada (*AncEGLB*). O que faz com que tenhamos três sítios de N-glicosilação, cinco sítios de fosforilação caseína kinase, um sítio de fosforilação tirosina quinase e seis sítios de N-meristoilação para a *AncEGLB* (Fig. 17). A presença de possíveis Modificações Pós-traducionais, como as preditas para a endoglicanase B de *A. niger* faz com que esta proteína seja um possível alvo de regulação quando for expressa. Porém, na literatura, temos relatos de que modificações pós-traducionais podem não influenciar a atividade da proteína produzida. Um exemplo é a hiperglicosilação de uma proteína recombinante produzida em *P. pastoris*, que mostrou não influenciar a atividade enzimática da proteína (Gastebois et al., 2010).

Similarity percentage 100

N-glycosylation site.
 Prosite access number: PS00001
 Prosite documentation access number: PDOC00001
 N-{P}-[ST]-{P}.
 Randomized probability: 5.138e-03.

Site : 38 to 41 NESG. Identity.
 Site : 100 to 103 NLTT. Identity.
 Site : 211 to 214 NLTD. Identity.
 Site : 288 to 291 NNTD. Identity.

cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site.
 Prosite access number: PS00004
 Prosite documentation access number: PDOC00004
 [RK](2)-x-[ST].
 Randomized probability: 1.572e-03.

Site : 27 to 30 KRAS. Identity.

Casein kinase II phosphorylation site.
 Prosite access number: PS00006
 Prosite documentation access number: PDOC00006
 [ST]-x(2)-[DE].
 Randomized probability: 1.482e-02.

Site : 30 to 33 SVFE. Identity.
 Site : 40 to 43 SGAE. Identity.
 Site : 92 to 95 SYDE. Identity.
 Site : 132 to 135 STSD. Identity.
 Site : 157 to 160 TNNE. Identity.
 Site : 201 to 204 TWVD. Identity.
 Site : 213 to 216 TDPE. Identity.

Tyrosine kinase phosphorylation site.
 Prosite access number: PS00007
 Prosite documentation access number: PDOC00007
 [RK]-x(2,3)-[DE]-x(2,3)-Y.
 Randomized probability: min = 4.074e-04 max = 4.083e-04

Site : 218 to 226 KIVYEMHQY. Identity.

N-myristoylation site.
 Prosite access number: PS00008
 Prosite documentation access number: PDOC00008
 G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P}.
 Randomized probability: 1.397e-02.

Site : 14 to 19 GSALAV. Identity.
 Site : 36 to 41 GSNESG. Identity.
 Site : 41 to 46 GAFTGT. Identity.
 Site : 50 to 55 GVWGTG. Identity.
 Site : 111 to 116 GGAHAL. Identity.
 Site : 179 to 184 GIRAAG. Identity.
 Site : 193 to 198 GNSWTG. Identity.
 Site : 231 to 236 GSGTSE. Identity.
 Site : 233 to 238 GTSETC. Identity.
 Site : 317 to 322 GTAYTG. Identity.

Figura 17. Predição de Modificações pós-traducionais no programa InterProscan para a endoglicanase B de *A. niger*.

6.4.2.3 Alinhamentos Múltiplos de Sequencias

O alinhamento da sequencia de aminoácidos da proteína clonada (*AncEGLB*) com a sequencia de aminoácidos da endoglicanase B de *A. niger*, depositada no banco

de dados da NCBI (*AnEGLB*) (Número de acesso: CAA11965) permitiu a confirmação de que a clonagem foi realizada com sucesso. Foi obtida 100% de identidade entre as duas sequências ammoacídicas, indicando que a sequência clonada é idêntica à sequência depositada no banco de dados.

Foi realizado também o alinhamento múltiplo da sequência nucleotídica da proteína clonada (*AncEGLB*) com as sequências nucleotídicas de celulases depositadas no banco de dados da NCBI (Anexo 1. Fig. 2A). Foram alinhadas as seguintes sequências nucleotídicas: *AnEGLB*, endoglicanase B de *Aspergillus niger* (AJ224452); *AkEGLB*, endoglicanase B de *Aspergillus kawachii* (AB055432); *AndEGLB*, endo- β -1,4-glicanase B de *Aspergillus nidullans* (AF420021); *AnEGLA*, endoglicanase A de *Aspergillus niger* (XM-001400865); *SrEGL*, endoglicanase de *Streptomyces rochei* (X73953); *RmCELA*, celulase A de *Rhodothermus marinus* (U72637); e *AoEGLA*, celulase A de *Aspergillus oryzae* (D83731). A partir deste alinhamento, foi construído um dendrograma, no qual as endoglicanases B foram agrupadas em ramos separadas das demais celulases, indicando domínios conservados presentes (Fig. 18).

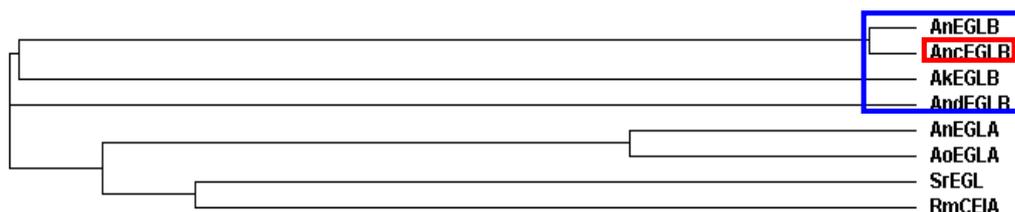


Figura 18. Dendrograma construído a partir do alinhamento múltiplo da sequência nucleotídica de *AncEGLB* com as sequências nucleotídicas de celulases depositadas no banco de dados da NCBI. Foram alinhadas as seguintes sequências nucleotídicas: *AnEGLB*, endoglicanase B de *A. niger* (AJ224452); *AkEGLB*, endoglicanase B de *A. kawachii* (AB055432); *AndEGLB*, endo- β -1,4-glicanase B de *A. nidullans* (AF420021); *AnEGLA*, endoglicanase A de *A. niger* (XM-001400865); *SrEGL*, endoglicanase de *S. rochei* (X73953); *RmCELA*, celulase A de *R. marinus* (U72637); e *AoEGLA*, celulase A de *A. oryzae* (D83731). No retângulo azul estão agrupadas as endoglicanases B. No retângulo vermelho foi destacada a endoglicanase B clonada.

6.5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizado o estudo de uma endoglicanase B produzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger*. Após sua clonagem ter sido confirmada, o fragmento foi sequenciado e realizada sua caracterização *in silico*. Os alinhamentos múltiplos de sequencia com outras celulasas indicaram domínios conservados presentes na sequencia clonada e serão essenciais para posteriores estudos tanto de expressão, quanto de caracterização bioquímica da proteína.

6.6. PERSPECTIVAS

Este trabalho visa o desenvolvimento de estudos futuros, uma vez que, o fragmento clonado pode ser expresso em microrganismos, como *Pichia pastoris*, e posteriormente, serem realizados experimentos de caracterização bioquímica e aplicações industriais da proteína expressa. Estes estudos poderão contribuir para o estabelecimento de um processo para a conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermenticíveis ou serem aplicados em outros setores da indústria, nos quais as celulasas tem se mostrado essenciais.

6.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B., 2009. The Carbohydrate-Active Enzymes database (Cazy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37, D233-238.
- Chulkin, A.M., Loginov, D.S., Vavilova, E.A., Ayanova, A.R., Zorov, I.N., Kurzeev, S.A., Koroleva, O.V., Benevolenskii, S.V., 2009. Enzymological Properties of Endo-(1-4)- β -Glicanase Eg12p of *Penicillium canescens* and Characteristics of Structural Gene *egl2*. *Biochemistry (Moscow)*, 74 (6), 655-662.
- Gastebois, A., Mouyna, I., Simenel, C., Clavaud, C., Coddeville, B., Delepierre, M., Latgé, J.P., Fontaine, T., 2010. Characterization of a new β (1-3)-glucan branching activity of *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.*, 285, 2386-2396.
- Hartl, L., Gastebois, A., Amanianda, V., Latgé, J.P., 2011. Characterization of the GPI-anchored endo β -1,3-glicanase Eng2 of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 185-191.
- Khademi, S., Zhang, D., Swanson, S.M., Wartenberg, A., Witteb, K., Meyera, E.F., 2002. Determination of the structure of an endoglicanase from *Aspergillus niger* and its mode of inhibition by palladium chloride. *Acta Cryst.*, D58, 660-667.
- Lockington, R.A., Rodbourn, L., Barnett, S., Carter, C.J., Joan, M., Kelly, J.M., 2002. Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 37, 190-196.
- Miller, G.L., 1956. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
- Quay, D.H.X., Bakar, F.D.A., Rabu, A., Said, M., Illias, R.M., Mahadi, N.M., Hassan, O., Murad, A.M.A., 2011. Overexpression, purification and characterization of the *Aspergillus niger* endoglicanase, *EglA*, in *Pichia pastoris*. *African Journal of Biotechnology*, 10, 2101-2111.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.*, 4, 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning, a Laboratory Manual*. 2nd ed. USA, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Specht, C.A., Dirusso, C.C., Novotny, C.P., Ullrich, R.C., 1982. A method for molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Analytical Biochemistry*, 119, 158-163.

- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83, 1-11.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.*, 24, 1596-1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.
- Van Peij, N.N.M.E., Gielkens, M.M.C., Devries, R.P., Visser, J., de Graaff, L.H., 1998a. The transcriptional activator *XlnR* regulates both xylanolytic and endoglycanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3615–3619.
- Van Peij, N.N.M.E., Visser, J., de Graaff, L.H., 1998b. Isolation and analysis of *xlnR*, encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *A. niger*. *Mol. Microbiol.*, 27, 131–142.

CONCLUSÃO GERAL

Estamos vivenciando o avanço e inovação de técnicas no ramo das pesquisas e dos estudos de enzimas com potencial biotecnológico. Estes estudos têm se destacado especialmente na área industrial, com o intuito de entender melhor os mecanismos de atuação enzimática visando assim, diminuir os custos de produção de enzimas.

Neste contexto, os resultados obtidos neste trabalho vêm complementar e ampliar o conhecimento sobre enzimas celulolíticas que atuam no branqueamento de polpa Kraft e na sacarificação de biomassa lignocelulósica. Com o auxílio de novas tecnologias aplicadas aos processos de produção de celulases, tem-se obtido preparados enzimáticos com proporções ideais entre as diversas enzimas do complexo celulolítico, como o coquetel de celulases utilizado neste estudo. A xilanase de *Fusarium oxysporum* purificada e caracterizada neste trabalho se mostrou promissora para futuras aplicações industriais. Pode-se destacar sua alta estabilidade térmica a 50° C e sua atuação tanto na hidrólise do bagaço de cana (promovendo um aumento significativo do açúcar redutor liberado) como no branqueamento da polpa de celulose.

Estudos que visam à caracterização bioquímica e aplicações industriais de enzimas celulolíticas são essenciais na compreensão dos processos de conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermenticíveis. Assim, a clonagem e caracterização *in silico* de uma endoglicanase B produzida pelo fungo *Aspergillus niger* realizada neste trabalho, poderá contribuir para o desenvolvimento de estudos futuros, de forma a se obter maiores informações a respeito dos mecanismos de atuação destas enzimas.

Pelos resultados já obtidos e perspectivas futuras dos estudos ainda em desenvolvimento, percebe-se que novas ferramentas e estratégias serão desenvolvidas visando não só aumento de produção de enzimas por microorganismos, mas como sua aplicação nos processos de hidrólise de materiais de origem lignocelulósica.


```

AkEGLB -----
RmCELA -----
SrEGL -----
AncEGLB -----
AnEGLB ATGAAGTTTCAGAGCACTTTGCTTCTTGCCGCCGCGGCTGGTCCGCGTTGGCTGTGCCT 60
AnEGLA -----
AoEGLA -----
AndEGLB -----

AkEGLB -ATG-----AAGACTAC-----CACCTACAG 20
RmCELA -ATG-----AACGTCA----- 10
SrEGL -ATGCC-----ACGGTTACGGCA-----CCACCCCGCAC 29
AncEGLB -TGG-----CTCC-----GGACATAA-----GAAGAG 21
AnEGLB CATGG-----CTCC-----GGACATAA-----GAAGAG 83
AnEGLA -ATGA-----AGCTCCCC-----GTGTCAC-----TTGC 23
AoEGLA -ATGA-----AGCTCTCA-----TTGGCAC-----TTGC 23
AndEGLB -ATGGCTCTGTTACTATCTCTCAGCCTTCTTGCCACAACAATCTCAGCCCAACAGATTGG 59
          ** *

AkEGLB TTTGCTCGCT--CTGGCA--GCGGC-----TTCCAAGCTGGCCTCCGC 59
RmCELA --TGCGTGC---GGTA--CTGG-----TCCTGAGC----- 33
SrEGL CCTGCGCGCC--GTGTCG--GCGGCGC-----TCCTCA----- 58
AncEGLB GCGCTCTG-----TGTTGAATGGT-----TCGGAT----- 47
AnEGLB GCGTCTG-----TGTTGAATGGT-----TCGGAT----- 109
AnEGLA TATGCTTG-----CGGC--ACCGC-----CATGGGC----- 48
AoEGLA TACGCTCG-----TGGCC--ACAGC-----ATTGAGT----- 48
AndEGLB GACGCCAGAAATCCGGCC--ACGTCTTACTACCTACCACTGTACTTCCGC----- 107
          * * *

AkEGLB CCACACCACCGTCCAGGCC-----GT-CTGGATCAACGGCGAGGA 98
RmCELA -----CTGTTATTGCT-----GT-TTGGAT----- 52
SrEGL -----CCGCCCTCGCC-----GC-CC--TC----- 75
AncEGLB -----CGAACGA-GTC-----TGGTGCTGAAT----- 68
AnEGLB -----CGAACGA-GTC-----TGGTGCTGAAT----- 130
AnEGLA -----CAGACGATGT-----GCTCTCAAT----- 67
AoEGLA -----CAAGAGCTGT-----GTGCACAGT----- 67
AndEGLB -----CAACGGCTGTACAGAGCAGAATACTTATGTGGTGCTCGATGC---CGCCAC 155
          * * *

AkEGLB CCAGGGTCTCGGTAA-----CACCGACGATGGCTACA-----T 131
RmCELA -----GCGA-----C-----TGGCT----- 62
SrEGL -----GCGG-----CGCTGC--TGACCGCG-----A 94
AncEGLB -----TTGGGA-----CCAATATCCCAGGCGTCT-----GGGGAA 98
AnEGLB -----TTGGGA-----CCAATATCCCAGGCGTCT-----GGGGAA 160
AnEGLA -----ATGA-----CAGTGCTCGAGCCCC----- 87
AoEGLA -----ACGA-----CAGTGCTCGAGCCCT----- 87
AndEGLB GCACCCATCCACGATGCATCAACCCCGAGTGTTCGTGCACCACCTCAAATGGGCTAAA 215
          * *

AkEGLB CCG---CTCTCCCCCTAGC--AACAGCCCCGTACCGACGTACCTCCACCGACATGAC 185
RmCELA -----CTTCCCGATGGC--GACA-----ACGGAAAGGAA 90
SrEGL CCG---CCCCCGCACAGGCC--GACA-----CCACGAT 122
AncEGLB CCGACTACATCTTCCCCGACCCTCG-----ACC--AT 129
AnEGLB CCGACTACATCTTCCCCGACCCTCG-----ACC--AT 191
AnEGLA CCG-----TATTCAGTG---AACC-----AG--AAC 108
AoEGLA CCG-----TACTCAGTG---AACA-----AC--AAC 108
AndEGLB CCG-----TGCTCTATGCCAGACA-----AGCAGAC 242
          * *

AkEGLB CTGCAACGTCAACGGT-----GACCAG-----GCTG-CTT 214
RmCELA CCGGAGCCTGAGC-----CCGA-----GCCGACCG 115
SrEGL CTGGGAAGAGTTCGG-----CTCG-----ACGTCAT 149
AncEGLB CTCTACGTTGATT-----GGCAAG-----GGAATGAACTT 159
AnEGLB CTCTACGTTGATT-----GGCAAG-----GGAATGAACTT 221
AnEGLA CTCTGGGGCAGT-----ACCAA-----GGCACCGGCAG 137
AoEGLA CTCTGGGGACAGG-----ACTCG-----GGAACCGGCTC 137
AndEGLB TTGCGCAGACAATTGCCTCATCGACGGCATAACTGACTATGCTGCCACGGAGTCGAAAC 302
          *

AkEGLB CCAAGACCCTCTCCGTCAAGGCCGGTGACGTTGTACCTTCGA-GTGGCACCACAGCGAC 273
RmCELA TCGAG----CTGTGCGGACGCTGG-GACG----CGCGCGATGTGGC----CGGGGG 159
SrEGL CCAGGGCCG-TTACGTCG--TCCAG-AACA-----ACCGTGGGGC----ACCAG 191
AncEGLB CTTC-----CGCGTCCA-GTTCATGATGGAGA-GGTTGCTTCTGACTCGATGACTGG 210
AnEGLB CTTC-----CGCGTCCA-GTTCATGATGGAGA-GGTTGCTTCTGACTCGATGACTGG 272
AnEGLA CCAG-----TGTGTATATGTCGACAAA-----CTCTCCAGC-----AGTGG 173
AoEGLA TCAG-----TGCGTCTACGTTGACAAC-----CTCTCCAGC-----TCAGG 173

```