

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

PURIFICAÇÃO DA XILANASE DE *Thermomyces lanuginosus* E SUAS
PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E CATALÍTICAS

CARLA LIEKO DELLA TORRE

CASCAVEL

2017

CARLA LIEKO DELLA TORRE

**PURIFICAÇÃO DA XILANASE DE *Thermomyces lanuginosus* E SUAS
PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E CATALÍTICAS**

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
COMO PRÉ-REQUISITO PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS. ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. MARINA
KIMIKO KADOWAKI**

**CO-ORIENTADORA: PROF^a. DR^a.
ROSEMEIRE APARECIDA DA SILVA DE
LUCCA**

CASCADEL

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

T644p Torre, Carla Lieko Della
Purificação da xilanase de *Thermomyces lanuginosus* e suas propriedades estruturais e catalíticas. / Carla Lieko Della Torre. — Cascavel, 2017.
65 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marina Kimiko Kadowaki
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rosemeire Aparecida da Silva de Lucca

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2017
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas

1. Dicroísmo circular. 2. Estrutura secundária. 3. Fluorescência. 4. Fungo. 5. Termoestabilidade. I. Kadowaki, Marina Kimiko. II. Silva-Lucca, Rosemeire Aparecida da. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 20.ed. 615
CIP – NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Beijo – CRB 9^a/965

CARLA LIEKO DELLA TORRE

PURIFICAÇÃO DA XILANASE DE *Thermomyces lanuginosus* E SUAS
PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E CATALÍTICAS

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
COMO PRÉ-REQUISITO PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

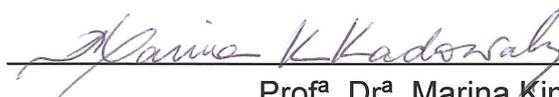
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Alexandre Maller
CCMF/UNIOESTE



Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Vilela Oliva
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA/UNIFESP



Prof^a. Dr^a. Marina Kimiko Kadowaki
CCMF/UNIOESTE

CASCADEL

2017

BIOGRAFIA RESUMIDA

Carla Lieko Della Torre, nascida em 29 de janeiro de 1991, goioerense (Paraná), graduada em Farmácia pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (*campus* de Cascavel) em 2014 e mestranda pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa intitulada Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações em Saúde.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

A Deus
À minha família, amigos e professores

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por esta conquista. Não existe recompensa maior na vida do que alcançar qualquer meta através de nossos esforços. Obrigada por me guiar, me dar forças nos momentos difíceis e por me abençoar com pessoas maravilhosas que encontrei durante esta caminhada.

Meu eterno agradecimento aos meus pais, Júlio Cezar Della Torre e Reiko Tanaka Della Torre. Vocês são meu maior exemplo e tudo o que eu tenho de mais precioso.

À tia Celma, tio Arlindo, Andressa e minha querida avó, Edith, pelas orações e apoio.

Aos meus tios, Hideyoshi e Márcia, e primos, Diego e Douglas, por todos os momentos que passei em São Paulo durante os períodos de experimentos. Vocês foram essenciais para que parte deste trabalho se tornasse possível. Obrigada por todo o carinho, dedicação e preocupação que tiveram comigo.

À minha querida amiga Dany, que esteve sempre presente ao meu lado durante esta longa jornada acadêmica. Não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim, pelo cuidado, atenção, ombro amigo, palavras e conselhos. Guardarei com carinho todos os momentos que passamos juntas durante esses sete anos.

Aos meus amigos e professores do Laboratório de Bioquímica, minha segunda família, pela oportunidade de aprender a cada dia, pelo apoio quando mais precisei, pelas dúvidas sanadas e festinhas de confraternização. Vocês foram imprescindíveis para que essa caminhada fosse mais leve e alegre. Agradeço especialmente ao Paulo, pela amizade e por todo auxílio e disponibilidade durante minha pesquisa e que, mesmo longe, não mediu esforços para contribuir com o trabalho.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Marina Kimiko Kadowaki. Existem pessoas que marcam nossas vidas e nos fazem sentir gratidão por causa de algum presente valioso que nos ofereceram. Posso dizer com toda certeza que é esse o meu sentimento por tudo o que você me proporcionou desde o meu segundo ano de graduação até o presente momento. Foi um privilégio tê-la como orientadora e espero que nossa parceria perdure por longos anos. Sinto que não formamos apenas laços entre orientadora e orientada, mas também de amizade, que resultaram em compreensão, respeito, preocupação, consideração e cuidado. Obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos, por acreditar e confiar em mim e no meu trabalho, por não me abandonar em nenhum momento e por ser essa pessoa admirada por todos, tanto como pessoa quanto como profissional.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Rosemeire Aparecida da Silva de Lucca, por todos os seus ensinamentos, paciência e esforços para que a realização deste trabalho fosse possível. Agradeço também por me fazer superar os medos de ir para São Paulo. Foram experiências únicas e que com certeza me fizeram crescer como pessoa e profissionalmente.

À Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Vilela Oliva, pela receptividade em seu laboratório para que eu pudesse realizar grande parte dos experimentos, pela oportunidade, contribuição científica e disponibilidade. Agradeço também às técnicas, Magda e Patrícia, e a todos os alunos, em especial ao Rodrigo, Mariana, André e Luciana, que me acompanharam durante todos os experimentos, mesmo na correria do dia a dia. Foi uma ótima experiência, de muito aprendizado e que me concedeu novas amizades.

Agradeço às minhas vizinhas, Daniele e Camila, pela amizade, companheirismo e conversas. Aos meus amigos da academia pelo incentivo, por me proporcionarem momentos de descontração e alegria e por me escutarem principalmente nos momentos de desespero e angústia.

Agradeço à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, por permitir a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

Meus agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

PURIFICAÇÃO DA XILANASE DE *Thermomyces lanuginosus* E SUAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E CATALÍTICAS

RESUMO

As enzimas do complexo xilanolítico, provenientes de microrganismos, têm se tornado uma ferramenta biotecnológica cada vez mais importante, principalmente em processos industriais que requerem temperaturas elevadas, como na indústria de panificação, de rações animais, têxtil, polpa e celulose. Dentre os fungos produtores de enzimas termoestáveis, *Thermomyces lanuginosus* tem se destacado como bom produtor de xilanases. Nesse contexto, a xilanase do fungo termofílico recentemente isolado da Mata Atlântica do Paraná, *T. lanuginosus*, foi purificada, caracterizada bioquimicamente, bem como um estudo de correlação estrutura-atividade da enzima foi investigado através das espectroscopias de dicroísmo circular e fluorescência. A xilanase extracelular foi purificada após quatro etapas cromatográficas envolvendo colunas de troca iônica e filtração molecular. A pureza e massa molecular (21,3 kDa) da enzima foram determinadas por SDS-PAGE e MALDI-TOF/MS. A xilanase é altamente específica para o substrato xilano de beechwood e gerou principalmente xilobiose (X_2) e xilotriose (X_3), produtos característicos da ação de endoxilanase. A enzima foi capaz de clivar os xilooligosacarídeos xitotetraose e xilopentaose, exceto a xilobiose e xilotriose. Exibe maior atividade em pH 6,5 e temperatura de 75°C, com estabilidade entre os pH 5,0-8,0 durante 100 horas e termoestabilidade entre 40 e 75°C durante 5 horas. A deconvolução do espectro de dicroísmo circular (CD) da enzima revela uma conformação secundária rica em estruturas- β , com temperatura do ponto médio da transição (T_m) de $73,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Neste estudo estrutural, a xilanase revelou que, para desempenhar elevada atividade enzimática, foi necessário ocorrer mudança conformacional. Sua estrutura secundária é conservada mesmo em extremos de pH, em temperaturas até 70°C e na presença de MnCl_2 (1 mM), DTT (5 mM) e elevada concentração de guanidina (6 M). A fluorescência intrínseca revela que a estrutura terciária sofre influência do pH, guanidina (1 M) associado à temperatura e na presença de MnCl_2 e DTT, enquanto a fluorescência extrínseca, utilizando a sonda ANS, revela mudanças em extremos de pH e na presença de MnCl_2 e DTT. Os resultados da fluorescência sugerem que tanto o aumento da atividade enzimática na presença dos cofatores quanto a perda da atividade em valores extremos de pH relacionam-se às alterações da estrutura terciária da enzima. Dessa forma, a xilanase de *T. lanuginosus* possui características bioquímicas interessantes para aplicação em diversos setores industriais que utilizam principalmente condições de temperatura elevada.

PALAVRAS-CHAVE: Dicroísmo circular, estrutura secundária, fluorescência, fungo, termoestabilidade.

PURIFICATION OF XYLANASE FROM *Thermomyces lanuginosus* AND ITS STRUCTURAL AND CATALYTIC PROPERTIES

ABSTRACT

Enzymes of the xylanolytic complex, from microorganisms, have been an increasingly important biotechnological tool mainly in industrial processes that require high temperatures, such as in the baking industry, animal feed, textile, pulp and cellulose. Among the fungi producing thermostable enzymes, *Thermomyces lanuginosus* has been evidenced as a good producer of xylanases. In this context, xylanase from the recently isolated thermophilic fungus of the Paraná Atlantic Forest, *T. lanuginosus*, was purified, biochemically characterized, as well as a structure-activity correlation study of the enzyme was investigated through circular dichroism and fluorescence spectroscopy. Extracellular xylanase was purified after four steps of ion exchange chromatographic columns and molecular filtration. The purity and molecular mass (21.3 kDa) of the enzyme were determined by SDS-PAGE and MALDI-TOF/MS. The xylanase is highly specific to the beechwood xylan substrate and generated mainly xylobiose (X₂) and xylotriose (X₃), products characteristic of the action of endoxylanase. The enzyme was able to cleave the xylo-oligosaccharides xylotetraose and xylopentaose, except xylobiose and xylotriose. It exhibit higher activity at pH 6.5 and temperature of 75°C, with stability between pH 5.0-8.0 for 100 hours and thermostability between 40 and 75°C for 5 hours. The deconvolution of the circular dichroism spectrum (CD) enzyme revealed a secondary conformation rich in β -structures with transition midpoint temperature (T_m) of 73.0 \pm 0.2°C. In this structural study, xylanase reveals that to perform high enzymatic activity, it was necessary a conformational change. Its secondary structure is conserved even at pH extremes at temperatures up to 70°C and in the presence of MnCl₂ (1 mM), DTT (5 mM) and high concentration of guanidine (6 M). Intrinsic fluorescence reveals that the tertiary structure is influenced by pH, guanidine (1 M) associated with temperature and in the presence of MnCl₂ and DTT, whereas extrinsic fluorescence, using the ANS probe, shows changes in pH extremes and in the presence of MnCl₂ and DTT. Fluorescence results suggest that both the increased enzymatic activity in the presence of cofactors and the loss of activity at extreme pH values are related to changes in the tertiary structure of the enzyme. Thus, *T. lanuginosus* xylanase has interesting biochemical characteristics for application in several industrial sectors that mainly use high temperature conditions.

KEYWORDS: Circular dichroism, fluorescence, fungus, secondary structure, thermostability.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Propriedades bioquímicas de xilanases produzidas por <i>T. lanuginosus</i>	12
Tabela 2 Sumário das etapas de purificação da xilanase de <i>T. lanuginosus</i>	24
Tabela 3 Especificidade ao substrato pela xilanase de <i>T. lanuginosus</i>	25
Tabela 4 Influência dos compostos na atividade enzimática da xilanase de <i>T. lanuginosus</i>	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ação da xilanase na estrutura do xilano.....	5
Figura 2 Espectros de dicroísmo circular na região do UV distante de diferentes tipos de estrutura secundária.....	9
Figura 3 Análise da pureza e determinação da massa molecular da xilanase	25
Figura 4 Análise por CCD dos produtos de hidrólise do xilano de beechwood pela xilanase purificada.....	26
Figura 5 Análise por CCD dos produtos de hidrólise a partir de diferentes XOS pela xilanase purificada.....	27
Figura 6 Temperatura ótima e termoestabilidade da xilanase de <i>T. lanuginosus</i>	29
Figura 7 Espectros de CD na região UV distante e curva normalizada da desnaturação térmica da xilanase.....	30
Figura 8 Efeito da temperatura na fluorescência intrínseca da xilanase com excitação em 295 nm.....	31
Figura 9 pH ótimo e estabilidade ao pH da xilanase de <i>T. lanuginosus</i>	33
Figura 10 Influência do pH na estrutura terciária da xilanase.....	35
Figura 11 Influência dos compostos $MnCl_2$ e DTT na conformação da xilanase.....	36

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
1. Objetivo Geral	3
2. Objetivos Específicos	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. Enzimas microbianas	4
2. Xilanases	5
3. Xilanases termoestáveis e suas características	6
4. Análise do comportamento estrutural	7
5. <i>Thermomyces lanuginosus</i>	11
CAPÍTULO 1	13
Xilanase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>: Purificação, caracterização e correlação entre estrutura e atividade catalítica	14
CONCLUSÕES GERAIS	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
1. Revisão bibliográfica	41
2. Capítulo 1	48

INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores que atuam em inúmeras reações químicas. Dentre elas, encontram-se as xilanases, cuja função é clivar as ligações glicosídicas presentes no xilano, maior constituinte da hemicelulose, e produzir moléculas menores, denominadas xilo-oligossacarídeos. Essas enzimas são produzidas por bactérias, leveduras, fungos filamentosos, dentre outros.

Os fungos filamentosos são considerados bons produtores de xilanases por secretarem quantidades elevadas no meio de cultura, diferentemente das bactérias, e por isso são preferíveis quando se trata da utilização enzimática em escala industrial. As aplicações industriais das xilanases são variadas, compreendendo o biobranqueamento da polpa celulósica, a clarificação de sucos, vinhos e cervejas, a melhoria da qualidade de pães, a produção de bioetanol, a melhoria na digestibilidade da ração pelos animais, a melhoria na remoção de manchas provenientes de origem vegetal e a limpeza do algodão, entre outras utilidades.

Tendo em vista essa ampla aplicabilidade, são necessários estudos tanto para elevar a quantidade da produção de enzimas como investigar as propriedades catalíticas, que serão essenciais para determinar a sua aplicação em diferentes setores industriais. Um exemplo disso é a utilização de xilanases termoestáveis nos processos que requerem elevadas temperaturas, como é o caso da peletização da ração animal, que ocorre entre 70 e 95°C. Conseqüentemente, enzimas que não possuem a capacidade de tolerar elevadas temperaturas não poderiam ser empregadas para este fim. Assim, uma forma de obter enzimas termotolerantes seria a partir de fungos termofílicos, visto que suas enzimas geralmente são mais termoestáveis do que as produzidas por organismos mesofílicos.

Dentre as espécies termofílicas, destaca-se o fungo filamentoso *Thermomyces lanuginosus*, por produzir elevada quantidade de xilanase livre de celulasas, utilizando fontes de carbono de baixo custo, bem como por apresentar potencial biotecnológico, devido à xilanase suportar elevadas temperaturas e extremos de pH por longos períodos de tempo.

Embora tenham muitos relatos sobre caracterização bioquímica da xilanase de *T. lanuginosus*, há uma carência sobre a correlação da estrutura conformacional da enzima frente às diferentes condições físico-químicas e sua atividade. Dessa forma, ressalta-se a importância deste estudo, no sentido de investigar as alterações

conformacionais, tanto na estrutura secundária como na terciária, da xilanase purificada de *T. lanuginosus* por técnicas espectroscópicas em condições variadas de temperaturas, pH e na presença dos compostos cloreto de manganês ($MnCl_2$) e ditioneitol (DTT), que são cofatores em sua atividade enzimática.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

- Purificar a xilanase de *T. lanuginosus*, bem como investigar suas propriedades bioquímicas, sua estrutura e correlacioná-la com sua atividade enzimática em diferentes condições físico-químicas.

2. Objetivos Específicos

- Purificar a enzima xilanase produzida pelo fungo *T. lanuginosus* através de técnicas cromatográficas;
- Verificar a pureza da xilanase, bem como determinar a massa molecular por eletroforese em condições desnaturantes e por espectrometria de massa;
- Determinar pH e temperatura de maior atividade enzimática, estabilidade ao pH e à temperatura da xilanase;
- Avaliar a especificidade da xilanase em diferentes substratos;
- Analisar os produtos de hidrólise do xilano de beechwood e dos xilo-oligossacarídeos pela xilanase purificada;
- Estimar o conteúdo da estrutura secundária da xilanase por espectroscopia de dicroísmo circular (CD);
- Verificar por dicroísmo circular e fluorescência intrínseca e extrínseca as possíveis alterações conformacionais na estrutura secundária e terciária da xilanase, em função de pH, temperatura, íons e agentes redutores relacionando-as com a atividade enzimática.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Enzimas microbianas

As enzimas são conhecidas como catalisadores de inúmeras reações químicas (ANBU et al., 2013). O número de enzimas conhecidas é de aproximadamente 4000, sendo que cerca dos 200 tipos existentes comercialmente são oriundas de microrganismos, como bactérias e fungos. Entretanto, sabe-se que, em escala industrial, a utilização limita-se a apenas 20 destas enzimas (LI et al., 2012; TOPAKAS; ANAGIOTOU; CHRISTAKOPOULOS, 2013).

As enzimas provenientes de microrganismos são mais interessantes no setor industrial, por serem produzidas em breve período de tempo e em quantidades elevadas (ANBU et al., 2015). Dentre esses microrganismos, os fungos filamentosos destacam-se por secretarem maior quantidade de enzimas no meio de cultivo quando comparados às bactérias, e têm sido foco de muitas pesquisas, que envolvem desde a otimização da produção da enzima até a sua purificação, e possível aplicação em setores industriais (DOBREV et al., 2007; DU et al., 2013; GOSWAMI; PATHAK, 2013; HE et al., 2015). Entretanto, a obtenção de enzimas puras é trabalhosa e muitas vezes demandam tempo e custo. Além disso, o processo de purificação enfrenta algumas limitações, como as propriedades intrínsecas das proteínas, que podem acarretar em diminuição da sua atividade e perda da solubilidade (DAKO et al., 2012).

Determinados produtos que requerem alto grau de pureza, como os farmacêuticos, exigem procedimentos de purificação de alto nível, acarretando em gasto elevado, visto que aproximadamente 80% do custo final do produto é referente a esta etapa (JUNIOR; KILIKIAN, 2005). Portanto, existe a necessidade de buscar estratégias que reduzam os custos, garantam melhor e maior rendimento, mantendo a atividade enzimática e pureza da proteína (SÁ-PEREIRA, 2003).

Nas indústrias, cerca de 75% das enzimas mais utilizadas são as com atividade hidrolítica, que atuam sob diversas substâncias. Destacam-se as proteases, celulasas, amilases, xilanases, fitases, lipases, pectinases, galactosidases, dentre outras; cada uma delas envolvidas em um ou mais setores, por exemplo, na indústria de polpa e papel, de panificação e de rações animais (POLIZELI et al., 2005; LI et al., 2012).

2. Xilanases

As xilanases (EC 3.2.1.8) podem ser produzidas por bactérias, algas marinhas, leveduras e fungos filamentosos, sendo estes a principal fonte comercial. Estas enzimas pertencem à família das glicosil hidrolases (GH), que catalisam a hidrólise das ligações 1,4- β -D-xilosídicas da cadeia principal do xilano (Figura 1), segundo polissacarídeo mais abundante presente na parede celular vegetal (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; ZHANG; KIM, 2012). Entretanto, outras enzimas também são requeridas para a completa despolimerização do xilano, dentre elas as β -xilosidases (EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -glucuronidases (EC 3.2.1.1), acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72), ácido ferúlico esterases (EC 3.1.1.73) e ácido *p*-cumárico esterases (EC 3.1.1 x.) (MARTINS et al., 2011; WONGWISANSRI et al., 2013).

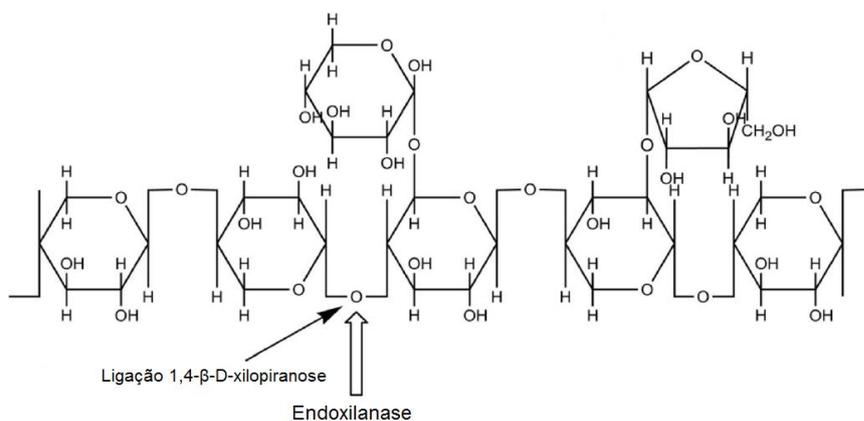


Figura 1 Ação da xilanase na estrutura do xilano (Adaptado de Shen et al., 2016).

O sistema de classificação CAZy (Carbohydrate Active Enzymes database – www.cazy.org), baseado no princípio da similaridade de seqüências, apresenta mais de 100 famílias de GH reconhecidas pelo Enzyme Commission (EC) (CANTAREL et al., 2009). Dentre elas, as xilanases pertencem às famílias GH 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51, e 62, cujas principais são as GH10 e GH11, que diferem entre si pelas propriedades catalíticas e físico-químicas (QU; SHAO, 2011; KANWAR; DEVI, 2012).

As diferenças catalíticas entre essas duas famílias podem ser conferidas pela estrutura terciária, visto que as xilanases GH11 são menores, mais compactas e constituídas principalmente por folhas- β pregueadas, enquanto as xilanases GH10 possuem domínio catalítico $(\alpha/\beta)_8$ barril e seu sítio de ligação ao substrato é menos

profundo do que os sítios das GH11 (SHARMA; KUMAR, 2013). Além disso, as xilanases GH10 diferem das GH11 por não serem totalmente específicas ao xilano, catalisando, por exemplo, outros substratos (BIELY et al., 1997). Sobre as propriedades físico-químicas, as xilanases pertencentes à família GH10 possuem massa molecular de aproximadamente 40 kDa e ponto isoelétrico (pI) ácido e as xilanases da família GH11 possuem menor massa molecular do que as GH10 (aproximadamente 20 kDa) e pI básico (GEORIS et al., 2000; BEAUGRAND et al., 2004).

3. Xilanases termoestáveis e suas características

A descoberta de novas xilanases termoestáveis, que suportem pH extremos e exibem atividade enzimática elevada são requisitos essenciais em alguns processos industriais (HAKULIEN et al., 2003). Uma forma de obter enzimas termofílicas seria a partir de fungos que crescem em temperaturas elevadas, visto que suas enzimas geralmente são mais termoestáveis do que as produzidas por fungos mesofílicos (TECHAPUN et al., 2003). Exemplos de linhagens fúngicas que produzem xilanases termoestáveis são *Humicola brevis* var. *thermoidea* (MASUI et al., 2012), *Paecilomyces thermophila* J18 (YANG et al., 2006) e *Thermoascus aurantiacus* RCKK (JAIN et al., 2015).

Além da descoberta, é possível obter essas enzimas através do melhoramento de alguma característica por meio de engenharia de proteínas, como mutagênese sítio-dirigida (XIE et al., 2011; WANG et al., 2014; ZHENG et al., 2014;), a substituição da região N-terminal de uma xilanase mesofílica por uma termofílica (ZHANG et al., 2010) e a inserção de pontes dissulfeto na região N-terminal da α -hélice (XIONG et al., 2004).

A termoestabilidade enzimática é uma das características mais reportadas na literatura, entretanto, não é totalmente entendida. Compreender os fatores que interferem nessa propriedade é muito importante, tanto para entender as funções das proteínas quanto sua utilização nos setores industriais (RULLER et al., 2008). As vantagens de se empregar altas temperaturas nos processos industriais são: menor risco de contaminação microbiana, melhora na solubilidade dos substratos, aumento da velocidade de reação e diminuição da viscosidade (JOO et al., 2011).

A tolerância das enzimas a altas temperaturas por longos períodos pode estar relacionada à estrutura conformacional, composição e/ou sequência de aminoácidos e também à sua origem (TECHAPUN et al., 2003; GOMES et al., 2007). As

xilanases termoestáveis já reportadas geralmente pertencem às famílias GH10 e GH11 (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

Enzimas de uma mesma família, cuja estrutura e sequência são semelhantes, não deixam de exibir termoestabilidade distinta (YOU et al., 2010). Hakulien e colaboradores (2003) analisaram 12 estruturas de xilanases cristalizadas pertencentes à família GH11 e relataram que as estruturas de xilanases mesofílicas e termofílicas são semelhantes e que pequenas modificações alteram a termoestabilidade. Dentre as alterações, destacam-se: maior número de resíduos de aminoácidos na folha beta e estabilização da região alfa hélice; relação Treonina:Serina maior; aumento de resíduos carregados, como arginina, levando à melhora nas interações polares; estrutura mais compacta e maior número de resíduos aromáticos ou pares de íons na superfície protéica.

Segundo You e colaboradores (2010), verificou-se que a cisteína substituída no sítio 201 melhorou a termoestabilidade da xilanase (GH11), devido à forte interação hidrofóbica com a cisteína presente no sítio 50. Portanto, a formação de ponte dissulfeto e a interação hidrofóbica contribuem para o aumento da estabilidade térmica da xilanase.

Song, Tsang e Sylvestre (2015), reportaram a importância dos aminoácidos da região N-terminal da xilanase de *Aspergillus niger* (Xyn10A_ASPNG) para melhorar a termoestabilidade, através de duas abordagens, sendo a primeira a racional (computacional) e a segunda a mutação randomizada. Como resultado, obtiveram um mutante (4S1) com o tempo de meia vida a 60°C trinta vezes maior do que a enzima nativa e temperatura de fusão 17,4°C (68,8°C) mais elevada do que a enzima original (51,4°C). O estudo demonstrou que a região N-terminal da enzima foi importante para a estabilização desta e sugere que interações hidrofóbicas forçadas neste local melhoraram a estabilidade térmica de Xyn10A_ASPNG.

4. Análise do comportamento estrutural

Entender como as proteínas se comportam e sua relação estrutura-atividade diante de diferentes condições, como força iônica, pH, temperatura, agentes químicos e constituição do solvente, é de extrema importância para o emprego dessas proteínas em aplicações biotecnológicas (DUBEY; JAGANNADHAM, 2003; SILVA-LUCCA et al., 2014).

Tendo em vista essa necessidade, as técnicas espectroscópicas auxiliam na avaliação das mudanças conformacionais, sejam elas tanto na estrutura secundária

como na estrutura terciária das proteínas. Dentre as técnicas, destacam-se o infravermelho com transformada de Fourier (Fourier Transform Infra Red, FTIR) (WANG et al., 2008), a fluorescência (SHEN et al., 2008) e o dicroísmo circular (Circular Dichroism, CD) (GREENFIELD, 2006).

A espectroscopia de dicroísmo circular é uma técnica que permite estimar o conteúdo e monitorar as alterações de estrutura secundária de proteínas. Deste modo, pode ser empregada nos mais variados estudos, dentre eles, processos de desnaturação/renovelamento de proteínas, a interação destas com ligantes, bem como, as mudanças estruturais das biomoléculas em função de determinadas condições, tais como pH, temperatura, solvente, força iônica e íons metálicos. Possui algumas vantagens: medidas simples e rápidas, alta sensibilidade às mudanças conformacionais, realizada em moléculas em solução, isto é, na condição real em que as proteínas exercem suas funções e, além disso, é uma técnica não destrutiva (MANAVALAN; JUNIOR, 1985; KELLY; JESS; PRICE, 2005; MATSUO; YONEHARA; GEKKO, 2005; GREENFIELD, 2006; CORRÊA; RAMOS, 2009).

A origem do sinal de CD está na assimetria das moléculas e, no caso das proteínas, a presença de átomos de carbono assimétrico é responsável pela atividade óptica. Os principais grupos opticamente ativos nas proteínas são as ligações amida da cadeia peptídica, monitoradas na região do ultravioleta (UV) distante (190-250 nm); as cadeias laterais aromáticas e ligações dissulfeto, monitoradas no UV próximo (250-360 nm). Desse modo, os espectros de CD na região do UV distante relacionam-se à estrutura secundária das proteínas, enquanto os registrados na região do UV próximo relacionam-se à estrutura terciária destas biomoléculas (CORRÊA; RAMOS, 2009).

Os motivos de estruturas secundárias possuem espectros de CD muito diferentes entre si, indicando que o espectro de uma proteína relaciona-se com as frações de seus componentes de estrutura secundária. Para analisar as estruturas secundárias e suas alterações, os espectros CD as classificam de acordo com a posição (comprimento de onda) e intensidade de cada banda. Por exemplo, nas moléculas do tipo α -hélice, tem-se uma banda negativa em 222 nm e outra em torno de 208 nm, como também uma banda positiva em torno de 193 nm; as do tipo folha- β antiparalela geralmente possuem a banda negativa em torno de 218 nm e a positiva aproximadamente em 195 nm; enquanto as proteínas desordenadas possuem banda negativa intensa em torno de 195 nm e pode apresentar banda positiva menos intensa em 210 nm (VENYAMINOV; YANG, 1996; RAUSSENS;

RUYSSCHAERT; GOORMAGHTIGH, 2003; GREENFIELD, 2006). A estrutura volta beta tipo I possui banda negativa em torno de 190 nm e banda positiva próxima de 210 nm, enquanto a poli (Pro) II apresenta uma forte banda negativa em torno de 195 nm e banda positiva em 215 nm. Na Figura 2, estão ilustrados os espectros de CD na região do UV distante de cinco estruturas secundárias de proteínas.

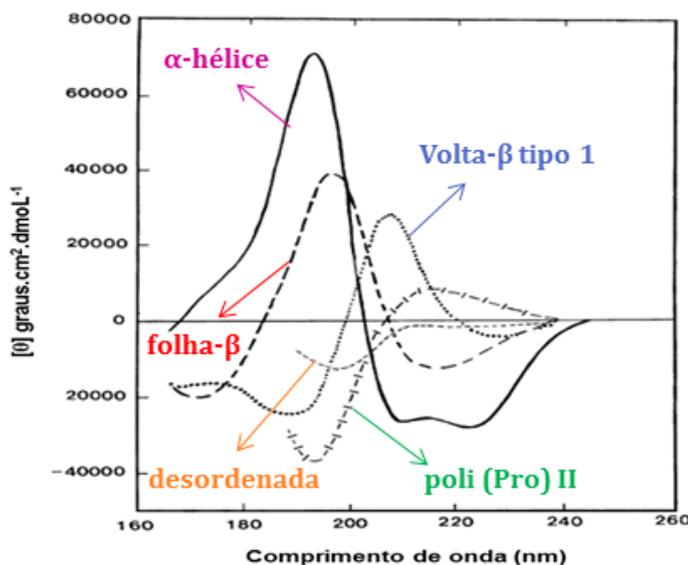


Figura 2 Espectros de dicroísmo circular na região do UV distante de diferentes tipos de estrutura secundária (Adaptado de Kelly; Jess; Price, 2005).

Desse modo, as alterações conformacionais podem ser acompanhadas de maneira qualitativa pela inspeção visual das alterações espectrais ou ainda de forma quantitativa pela utilização de métodos computacionais. Neste caso, a estrutura secundária proteica é estimada a partir da deconvolução do espectro de CD na região do ultravioleta distante (Far UV, 175 - 250 nm) em uma combinação linear de espectros de base, cujos espectros foram derivados de proteínas com estrutura secundária previamente determinadas por cristalografia de raio-X (MANNING, 1989). Para prever a composição das diferentes estruturas de uma proteína, são utilizados diversos programas (SELCON, CONTIN-CD, DICHROWEB, DICROPROT e CDPro), os quais, quando são utilizados associados, resultam em uma melhora na confiabilidade dos resultados (CORRÊA; RAMOS, 2009).

A espectroscopia de fluorescência é uma metodologia muito utilizada no estudo das alterações conformacionais em proteínas. A emissão de fluorescência baseia-se na propriedade que algumas moléculas, denominadas fluoróforos, possuem de emitir a luz que foi absorvida. Essa emissão de radiação é devida a

transições entre estados eletrônicos excitados e estados de menor energia (LAKOWICZ, 2006). Essa técnica pode fornecer informações importantes, como a exposição das cadeias laterais dos aminoácidos em determinados solventes, a distância entre os sítios na proteína e também sua taxa de difusão rotacional (EFTINK, 1991).

A fluorescência de proteínas pode ser monitorada por meio da utilização de fluoróforos intrínsecos ou extrínsecos. Os intrínsecos são aqueles que ocorrem naturalmente, como os aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), entre outros. Já os extrínsecos são aqueles que são adicionados às amostras para modificar suas propriedades espectrais ou ainda complementar informações obtidas de seus fluoróforos naturais, dentre os quais se destacam a rodamina, a fluoresceína, o cloreto de dansila, o 1-anilino-8-naftaleno-sulfonato (ANS) e o 2-p-toluidino-6-naftaleno-sulfonato (TNS) (LAKOWICZ, 2006). Os fluoróforos intrínsecos, principalmente os resíduos de triptofano, fornecem informações locais, isto é, da microvizinhança que se encontram na biomolécula, enquanto alguns extrínsecos como ANS e TNS, podem fornecer informações globais da estrutura terciária da biomolécula (LAKOWICZ, 2006; SILVA-LUCCA et al., 2014).

Devido à sensibilidade do anel indol do triptofano à polaridade do solvente, os espectros de emissão de fluorescência deste aminoácido refletem a polaridade de seu meio ambiente. Desse modo, dependendo da localização dos resíduos de triptofano na proteína, sua emissão máxima pode ser observada em diferentes comprimentos de onda. Por exemplo, quando uma proteína presente em uma solução aquosa sofre desnaturação, geralmente ocorre uma mudança no microambiente do triptofano e este é exposto ao ambiente polar, levando à mudança no seu comprimento de onda de emissão máxima (λ_{max}^{emis}) para a região do vermelho (red shift), região de maior comprimento de onda e menor energia. Se ocorrer o contrário, o λ_{max}^{emis} é deslocado para a região do azul (blue shift), em direção ao comprimento de onda menor, e o triptofano retorna ao seu microambiente hidrofóbico (SHARMA; KALONIA, 2003; LAKOWICZ, 2006).

Para resíduos de triptofano localizados em ambiente polar, na superfície da proteína e totalmente expostos ao solvente, a emissão máxima será em torno de 350 nm, similar à observada para o aminoácido em solução aquosa. Entretanto, se o triptofano estiver protegido do solvente aquoso, menores comprimentos de onda

serão observados para a sua emissão, podendo chegar em torno de 302 nm, valor observado para o aminoácido em solvente apolar, por exemplo, ciclohexano. Além da desnaturação proteica, alterações na emissão de fluorescência do triptofano podem resultar de transições conformacionais, ligação de substratos e associação de subunidades (LAKOWICZ, 2006).

5. *Thermomyces lanuginosus*

O fungo *Thermomyces lanuginosus* (sinonímia de *Humicola lanuginosa* - National Center for Biotechnology Information, NCBI) é classificado como um fungo filamentoso termofílico por crescer em temperaturas acima de 45°C. Apresenta-se inicialmente de coloração branca, tornando-se marrom escuro após o seu amadurecimento (KHUCHAROENPHAISAN; SINMA, 2010). É conhecido por produzir uma diversidade de enzimas, como invertase (CHAUDHURI; MAHESHWARI, 1996), β -xilosidase (CHEN et al., 2012; CORRÊA et al., 2016), quitinase (KHAN et al., 2015), protease (LI; YANG; SHEN, 1997), inulinase (FLORES-GALLEGOS et al., 2015), esterase (LI et al., 2014), amilase (KUNAMNENI; PERMAUL; SINGH, 2005), glucoamilase (GONÇALVES et al., 2008), α -galactosidase (REZESSY-SZABÓ et al., 2007), bem como as duas enzimas mais reportadas, lipase (ÁVILA-CISNEROS et al., 2014; FANG et al., 2014; WANG et al., 2015) e xilanase (MANIMARAN et al., 2009; SHRIVASTAVA et al., 2013; STEPHENS et al., 2014; JIANG; WU; LI, 2015; TORRE; KADOWAKI, 2017). Além de produzir todas essas enzimas, *T. lanuginosus* é conhecido por não produzir celulases (DAMASO; ANDRADE; JUNIOR, 2002; LI et al., 2005; MANIMARAN et al., 2009), cuja característica é muito interessante para aplicação no setor de polpa e papel, pois impede a degradação da celulose e comprometimento da qualidade da polpa de papel (BEG et al., 2001).

As propriedades bioquímicas da xilanase de *T. lanuginosus* têm sido estudadas desde 1996 até os dias atuais (Tabela 1).

Tabela 1 Propriedades bioquímicas de xilanases produzidas por *T. lanuginosus*.

Linhagem	Massa molecular (kDa)	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Estabilidade ao pH	Estabilidade térmica (°C)	Referência(s)
195	22	NR	NR	3-10	60-100	Gaffney et al., 2009
ATCC 46882	26,3	6,0-6,5	75	4-10	45-60	Bennett et al., 1998
CAU 44	25,6	6,2	75	5,6-10,3	30-80	Jiang et al., 2005
CBS 288.54	26,2	7,0-7,5	70-75	6,5-10	40-85	Li et al., 2005
DSM 10635	25,5	6,5	70	4-9	50-100	Xiong et al., 2004
DSM 5826	25,5	6,5	60-70	4-12	65-70	Cesar; Mrša, 1996
SS-8	23,79	6,0	60	5-11	60	Shrivastava et al., 2013
SSBP	23,6	6,5-7,0	70-75	5-12	60-75	Lin et al., 1999
THKU-49	24,9	6,0	70	NR	50-70	Khucharoenphaisan; Tokuyama; Kitpreechavanich, 2008
THKU-9	24,9	6,0	70	NR		

NR: Não Relatado

Nota-se que as xilanases de diferentes cepas de *T. lanuginosus* possuem baixa massa molecular; isso facilita a atuação da enzima no polímero de hemicelulose e melhora a hidrólise enzimática (JUTURU; WU, 2012); possui temperatura ótima elevada (60-75°C), assim como estabilidade térmica e ao pH. Embora existam muitos estudos já descritos sobre a xilanase de *T. lanuginosus*, há poucos relatos sobre as características estruturais e a relação entre a estrutura e a atividade xilanásica.

CAPÍTULO 1

Xilanase de *Thermomyces lanuginosus*: Purificação, caracterização e correlação entre estrutura e atividade catalítica

Esse artigo será submetido na Revista International Journal of Biological Macromolecules: Qualis/Capes em Farmácia: A2

Xilanase de *Thermomyces lanuginosus*: Purificação, caracterização e correlação entre estrutura e atividade catalítica

Carla Lieko Della Torre *et al.*

RESUMO

A xilanase de *Thermomyces lanuginosus* foi purificada após quatro etapas cromatográficas envolvendo colunas de troca iônica e filtração molecular. A pureza e massa molecular (21,3 kDa) da enzima foram determinadas por SDS-PAGE e MALDI-TOF/MS. A xilanase possui elevada especificidade por xilano de beechwood e seus principais produtos de hidrólise são xilobiose e xilotriose. A enzima é capaz de hidrolisar também os xilo-oligossacarídeos (XOS), xilopentaose (X_5) e xilotetraose (X_4), porém, não possui nenhuma atividade sobre xilobiose (X_2) e xilotriose (X_3). Exibe maior atividade em condições de pH 6,5 e temperatura de 75°C, e é estável por longos períodos em ampla faixa de pH e temperatura. A deconvolução do espectro de dicroísmo circular (CD) mostra uma estrutura secundária rica em estruturas- β , com temperatura do ponto médio da transição (T_m) de $73,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Neste estudo estrutural, a xilanase revela que para desempenhar elevada atividade enzimática é necessário ocorrer mudança conformacional. A estrutura secundária da xilanase é conservada mesmo em extremos de pH, em temperaturas até 70°C e na presença de MnCl_2 (1 mM), DTT (5 mM) e elevada concentração de guanidina (6 M). Por outro lado, as alterações da estrutura terciária da enzima, monitoradas por fluorescência intrínseca e/ou extrínseca (sonda ANS), observadas na presença de MnCl_2 , DTT e valores extremos de pH, podem estar relacionadas às variações de sua atividade. Portanto, a xilanase de *T. lanuginosus* mostra-se interessante para aplicações que necessitem de elevada temperatura por manter-se ativa nessa condição e ainda revela ser uma molécula com alto grau de rigidez e resistente à desnaturação, pois condições muito extremas são necessárias para alterar a estrutura secundária e/ou terciária da enzima.

PALAVRAS-CHAVE: Dicroísmo circular, fluorescência, xilo-oligossacarídeos

***Thermomyces lanuginosus* xylanase: purification, characterization and correlation between structure and catalytic activity**

Carla Lieko Della Torre *et al.*

ABSTRACT

The xylanase from *Thermomyces lanuginosus* was purified after four chromatographic steps involving columns of ion exchange and molecular filtration. The purity and molecular mass (21.3 kDa) of the enzyme were determined by SDS-PAGE and MALDI-TOF/MS. Xylanase exhibit high specificity for beechwood xylan and its main hydrolysis products are xylobiose and xylotriose. The enzyme is also capable of hydrolyzing xilopentaose (X_5) and xyloetraose (X_4), however, it has no activity on xylobiose (X_2) and xylotriose (X_3). It exhibits increased activity at pH 6.5 and temperature of 75°C and is stable for long periods over a wide range of pH and temperature. Circular dichroism (CD) spectrum deconvolution shows a β -structure rich secondary structure, with transition midpoint temperature (T_m) of $73.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$. In this structural study, xylanase reveals that to perform high enzymatic activity, conformational change is necessary. The secondary structure of xylanase is preserved even at extremes pH, at temperatures up to 70°C and in the presence of MnCl_2 (1 mM), DTT (5 mM) and high concentration of guanidine (6 M). On the other hand, changes in the tertiary structure of the enzyme, monitored by intrinsic and/or extrinsic fluorescence (ANS probe), observed in the presence of MnCl_2 , DTT and extreme values of pH may be related to the variations of its activity. Therefore, *T. lanuginosus* xylanase is interesting for applications that use high temperature because it remains active in this condition and still proves to be a molecule with a high degree of rigidity and resistant to denaturation, since very extreme conditions are necessary to alter the secondary and/or tertiary structure of the enzyme.

KEYWORDS: Circular dichroism, fluorescence, xylo-oligosaccharides

1. Introdução

As xilanases (EC 3.2.1.8) pertencem à família das glicosil hidrolases (GH) que catalisam a hidrólise de ligações 1,4- β -D-xilosídicas da cadeia principal da xilano (COLLINS, 2005). O xilano possui natureza complexa e heterogênea e, portanto, para sua completa despolimerização, são necessárias diversas xilanases, cujas propriedades bioquímicas, estruturais, especificidade ao substrato e modo de ação diferem entre si (BERRIN; JUGE, 2008).

Dentre as principais famílias das xilanases, destacam-se as famílias 10 e 11 das GH, cujas propriedades catalíticas e físico-químicas são distintas (QU; SHAO, 2011; KANWAR; DEVI, 2012). As diferenças catalíticas entre essas duas famílias podem ser conferidas pela estrutura terciária, visto que as xilanases GH11 são menores, mais compactas e constituídas principalmente por folhas- β pregueadas, enquanto as xilanases GH10 possuem domínio catalítico (α/β)₈ barril e seu sítio de ligação ao substrato é menos profundo do que os sítios das GH11 (SHARMA; KUMAR, 2013). Além disso, as xilanases GH10 diferem das GH11 por não serem totalmente específicas ao xilano, catalisando, por exemplo, outros substratos (BIELY et al., 1997). Sobre as propriedades físico-químicas, as xilanases pertencentes à família GH10 possuem massa molecular de aproximadamente 40 kDa e ponto isoelétrico (pI) ácido e as xilanases da família GH11 possuem menor massa molecular do que as GH10 (aproximadamente 20 kDa) e pI básico (GEORIS et al., 2000; BEAUGRAND et al., 2004).

As xilanases podem ser obtidas de bactérias, algas marinhas, leveduras e fungos filamentosos, sendo estes últimos a principal fonte comercial (ZHANG; KIM, 2012). A ampla aplicabilidade destas enzimas, como no biobranqueamento da polpa celulósica, na produção de bioetanol, no tratamento de resíduos agroindustriais e em processos fermentativos, tem se tornado atraente para as indústrias (JUTURU, 2012; GOSWAMI, 2013). Visto isso, o foco dos estudos recentes compreende desde a pesquisa básica, que envolve a purificação e caracterização de moléculas (GOLUGURI et al., 2016), até a pesquisa aplicada, sendo essa em escala piloto ou industrial (SHARMA et al., 2014).

Entretanto, o custo da enzima para aplicação industrial ainda é elevado. Dessa forma, diferentes estratégias estão sendo desenvolvidas, como encontrar espécies fúngicas que possam secretar maiores quantidades dessas enzimas, assim como aumentar a produção de xilanase, otimizando o crescimento fúngico, e

também caracterizá-las bioquimicamente com o propósito de encontrar xilanases resistentes a temperaturas elevadas e estáveis, tanto à temperatura quanto ao pH (KUMAR et al., 2009; SHARMA; KUMAR, 2013).

Thermomyces lanuginosus é um fungo filamentosso termofílico que se destaca pela produção de diversas enzimas, incluindo as xilanases. É considerado um ótimo produtor de xilanase livre de celulase, característica importante no branqueamento da polpa celulósica (WINGER et al., 2014) e exibe propriedades notáveis, como termoestabilidade e resistência em ampla faixa de pH (GAFFNEY et al., 2009; KHUCHAROENPHAISAN; TOKUYAMA; KITPREECHAVANICH, 2010).

Embora a literatura tenha relatado extensivamente sobre os atributos dessa enzima, ainda há uma carência nos estudos que correlacionam estrutura com atividade enzimática. Dentro desse contexto, este estudo teve como objetivo purificar e caracterizar a xilanase de *T. lanuginosus*, bem como investigar a relação estrutura-atividade catalítica através de técnicas espectroscópicas em diferentes condições de pH, temperatura e na presença dos compostos $MnCl_2$ e DTT.

2. Material e métodos

2.1. Microrganismo e condição de cultivo para produção enzimática

O fungo *T. lanuginosus* utilizado neste estudo foi previamente isolado do solo da Mata Atlântica do Oeste do Paraná através do projeto Sisbiota. A sequência da região de ITS1 a ITS4 do fungo *T. lanuginosus* encontra-se depositada com número de acesso KJ934703 no GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A manutenção do fungo foi realizada conforme a metodologia descrita por Corrêa e colaboradores (2016).

Para a produção xilanásica, *T. lanuginosus* foi cultivado em meio líquido Czapeck (WISEMAN, 1975) suplementado com 1% (p/v) de palha de milho. Os esporos foram suspensos em água destilada estéril e 1,0 mL dessa suspensão (10^7 esporos/mL) foi inoculada em frascos contendo 25 mL de meio líquido. Após 4 dias de crescimento em incubadora tipo shaker com rotação orbital (150 rpm) a 42°C, o extrato bruto enzimático foi obtido por filtração à vácuo em papel de filtro estéril (Whatman n° 1) e dialisado contra água destilada por aproximadamente 12 horas.

2.2. Ensaio enzimático e determinação proteica

A atividade da xilanase foi determinada utilizando substrato xilano de beechwood 1% (p/v) (Sigma) em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 6,5, a 75°C, por 10 min. Os açúcares redutores produzidos foram quantificados conforme o método de Miller (1959), utilizando D-xilose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um micromol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio. A atividade específica foi expressa em unidade por miligrama de proteína.

A concentração da proteína foi estimada por espectrofotometria (280 nm) e pelo método de Bradford (1976), empregando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.3. Purificação da xilanase

Para a purificação da xilanase de *T. lanuginosus*, todas as etapas cromatográficas foram realizadas a 4°C, utilizando-se tampão Tris-HCl 0,02 M pH 7,2. Inicialmente, o extrato bruto foi dialisado contra água destilada por 12 horas e centrifugado (3500 rpm, 20 minutos). Sucessivamente, o sobrenadante obtido foi aplicado na coluna de troca aniônica DEAE Sepharose (2 x 20 cm), previamente equilibrada com tampão e a enzima foi eluída com gradiente (0,05 – 1 M) de cloreto de sódio (NaCl). As frações com atividade xilanásica foram reunidas, dialisadas contra água destilada e concentradas através de dispositivo de ultrafiltração (Vivaspin Turbo 15 – 30 kDa; Sartorius). A amostra pós-DEAE foi aplicada em coluna de gel filtração Sephadex G75 (2 x 60 cm), previamente equilibrada com tampão, e a xilanase foi eluída em um fluxo de 0,5 mL/min. As frações com atividade enzimática foram reunidas, dialisadas e concentradas com dispositivo de ultrafiltração. A terceira cromatografia foi realizada em coluna Superdex 75 10/300 GL pré-equilibrada com tampão, no sistema de purificação de proteínas ÄKTA avant (GE Healthcare), com fluxo ajustado de 0,5 mL/min e coleta de frações contendo 1 mL por tubo. As frações com atividade xilanásica foram reunidas, dialisadas e concentradas em dispositivo de ultrafiltração. No sistema de purificação ÄKTA purifier (GE Healthcare), foi utilizada a coluna Mono-Q HR 5/5, previamente equilibrada com tampão e a xilanase foi eluída com gradiente linear de NaCl (0 – 1 M), com fluxo de 1 mL/min e coleta de 0,5 mL por tubo. As frações com atividade xilanásica foram reunidas e dialisadas.

2.4. Análise da pureza e determinação da massa molecular

A análise da pureza da enzima foi realizada por eletroforese SDS-PAGE, de acordo com Laemmli (1970), utilizando gel na concentração de 10% de acrilamida e a coloração por prata descrita por Blum e colaboradores (1987). Os marcadores de massa molecular (GE Healthcare) foram as seguintes proteínas: Fosforilase b (97 kDa), Albumina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa), Inibidor da tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

Paralelamente, o zimograma também foi realizado, mediante incubação do gel em xilano de beechwood 1% (p/v) em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 6,5 por 30 minutos a 75°C. Em seguida, o gel foi corado com solução de Vermelho de Congo (0,2%, p/v) durante 10 minutos e descorado com NaCl 1 M até a revelação da banda de atividade enzimática.

A técnica MALDI-TOF/MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-Flight/Mass Spectrometry) foi utilizada para confirmar a pureza e determinar a massa molecular exata da xilanase. Resumidamente, 1 μ L (1 mg/mL) da xilanase foi depositado sobre a placa, seca em temperatura ambiente, e recoberta com 1 μ L da matriz ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) 10 mg/mL. Sucessivamente, foi realizada a homogeneização e, após a secagem da mistura, a placa foi submetida ao espectrômetro Bruker Daltonics Autoflex Speed, que foi calibrado com o padrão proteico (Protein Standard II – Bruker) (Adaptado de Ferreira et al., 2013).

2.5. Ensaio de especificidade ao substrato

A especificidade da xilanase purificada ao substrato foi conduzida mediante a incubação da enzima com 1% (p/v) de cada substrato (xilano de beechwood, xilano de birchwood, xilana oat spelt e carboximetilcelulose) em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 6,5 durante 10 minutos a 75°C. A atividade xilanásica foi determinada pelo método de Miller (1959). Para o cálculo da atividade relativa dos outros substratos, o xilano de beechwood foi utilizado como controle (100%) por apresentar maior atividade enzimática.

2.6. Análise por cromatografia em camada delgada (CCD) dos produtos de hidrólise do xilano e dos xilo-oligossacarídeos (XOS)

Os produtos de hidrólise do xilano de beechwood foram analisados por CCD após a incubação da xilanase com xilano de beechwood 1% (p/v) em tampão fosfato

de sódio 0,05 M pH 6,5 por 180 minutos a 75°C. Os produtos da hidrólise dos XOS (xilobiose- X_2 , xilotriose- X_3 , xilotetraose- X_4 e xilopentaose- X_5 ; Megazyme) foram formados após a incubação da enzima com cada xilo-oligossacarídeo 1 mg/mL a 75°C. Alíquotas foram retiradas, fervidas por 10 minutos e submetidas à análise por CCD. Como controle, foi realizada a mesma reação, alterando a enzima por tampão, a fim de comprovar que a hidrólise dos XOS foi devido à ação da enzima e não da temperatura. O solvente de corrida foi constituído de butanol:etanol:água (5:3:2, v/v/v) e os produtos foram revelados por orcinol 0,3% (p/v) em solução de metanol:ácido sulfúrico (9:1, v/v) após incubação da placa em estufa a 100°C até o aparecimento das bandas. A xilose (X_1) e os xilo-oligossacarídeos X_2 , X_3 , X_4 e X_5 foram empregados como padrão.

2.7. Efeito da temperatura e pH na atividade e estabilidade da xilanase

A influência da temperatura na atividade enzimática da xilanase foi investigada entre as temperaturas de 35 e 95°C, após 10 minutos de incubação, enquanto a termoestabilidade foi conduzida pré-incubando a enzima nas temperaturas 40, 50, 65 e 75°C por até 5 horas. O pH de maior atividade da xilanase foi determinado após a incubação da enzima com os seguintes tampões: Tampão McIlvaine (fosfato de sódio dibásico e ácido cítrico) (1921) 0,1 M no intervalo de pH 2,5 a 8,0 e tampão Tris-HCl 0,1 M para o pH 8,5. A estabilidade ao pH foi avaliada pré-incubando a xilanase em tampão McIlvaine (pH 5,0 a 8,0), a 4°C, por até 100 horas. Para a determinação da atividade xilanásica residual, foi utilizado o método de Miller (1959).

2.8. Espectroscopia de dicroísmo circular

A espectroscopia de dicroísmo circular foi realizada de acordo com Silva-Lucca e colaboradores (2014), em que as medidas de CD foram registradas utilizando o espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Corporation, Japão), na região de UV distante (190-250 nm) e cubeta retangular de quartzo de 1 mm de caminho óptico. A amostra foi submetida a varreduras de 50 nm/min com tempo de resposta de 4 segundos. A concentração proteica da xilanase nativa foi de 0,23 mg/mL em tampão fosfato/borato/acetato 0,01 M, pH 6,5, a 25°C. Os espectros foram obtidos após a média de 4 varreduras que foram convertidos de miligraus para elipticidade molar por resíduo ($[\theta]$), dada em graus.cm².dmoL⁻¹, com base na equação 1:

$$[\theta] = \frac{\theta_{obs}}{10.l.C.N} \quad (1)$$

onde θ_{obs} é a elipticidade medida (miligráus), l é o caminho óptico da cubeta em centímetros, C é a concentração molar da proteína e N é o número médio de resíduos de aminoácidos, que foi estimado em aproximadamente 163 resíduos para a xilanase.

2.9. Estimativa da estrutura secundária da xilanase

A estimativa da estrutura secundária da xilanase de *T. lanuginosus* foi analisada a partir de espectros de CD, utilizando o programa CDPro, o qual reúne três programas de determinação de estrutura, SELCON3, CONTIN/LL e CDSSTR. Neste programa, estão disponíveis sete grupos de proteínas de referência, sendo que dois deles incluem cinco espectros de proteínas desnaturadas, facilitando a análise para proteínas com conteúdo significativo de estrutura desordenada ou em processo de desnaturação (SREERAMA; WOODY, 2000). O programa Cluster também está incluso no CDPro e é responsável pela análise do espectro de CD da proteína e sua correlação com a classe da estrutura terciária à qual pertence (toda α , toda β , $\alpha+\beta$, α/β e desordenada) (SREERAMA; VENYAMINOV; WOODY, 2001).

2.10. Espectroscopia de fluorescência intrínseca e extrínseca

As medidas de emissão da fluorescência da xilanase foram realizadas em espectrofluorímetro Hitachi F-2500 (Tóquio, Japão). As amostras foram mantidas a 25°C com o auxílio de um banho termostático com circulação de água (Micronal B15, São Paulo, Brasil). As medidas foram realizadas em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico e a concentração proteica da amostra nativa foi de 0,1 mg/mL em tampão fosfato/borato/acetato 0,01 M, pH 6,5.

Para a emissão de fluorescência intrínseca, as amostras foram excitadas em 295 nm, excitando-se exclusivamente os resíduos de triptofano, e sua emissão foi monitorada no intervalo de 305 a 450 nm. As correções da linha de base foram realizadas subtraindo-se o espectro do tampão em cada amostra.

Para a fluorescência extrínseca, a sonda 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato (ANS) foi adicionada nas amostras, utilizadas previamente para a fluorescência

intrínseca, e após 30 minutos de reação no escuro, foi realizada a medida com excitação em 380 nm e emissão entre 400 e 650 nm.

2.11. Influência do pH e temperatura na estrutura da xilanase

O efeito do pH na estrutura da xilanase (0,23 mg/mL) foi avaliado mantendo as amostras incubadas em tampão fosfato/borato/acetato 0,01 M nos seguintes pH: 1,8; 2,8; 3,8; 6,5 e 10,0 durante 30 minutos. Posteriormente, foram realizadas as medidas de CD, fluorescência intrínseca e extrínseca nas mesmas condições de medidas da amostra nativa.

A influência da temperatura na estrutura secundária da enzima (0,23 mg/mL) em tampão fosfato/borato/acetato 0,01 M, pH 6,5, foi investigada por CD, com controle da temperatura monitorado pelo equipamento Peltier. A faixa de temperatura utilizada foi de 25 a 95°C, em intervalos de 1°C, com taxa de aquecimento de 0,5°C/min, repetindo-se as condições gerais de medidas descritas para a xilanase nativa. A partir dos espectros nas diversas temperaturas, obteve-se a curva de desnaturação da enzima monitorando-se o sinal da elipticidade (θ) em 220 nm e calculando-se a fração desnaturada da proteína (f_D) para cada temperatura com as seguintes equações:

$$f_D = \frac{\theta_N - \theta_{obs}}{\theta_N - \theta_D} \quad (2)$$

$$f_N + f_D = 1 \quad (3)$$

onde os índices N , D e obs correspondem aos valores de θ característicos do estado nativo, desordenado e em uma temperatura particular, respectivamente. A temperatura do ponto médio da transição (T_m) foi obtida após o ajuste dos dados de CD para a curva sigmoideal, utilizando a função Boltzmann, pelo software Origin 8.5.

O efeito da temperatura na emissão de fluorescência intrínseca da enzima (0,1 mg/mL) foi observado incubando-a nas temperaturas de 25, 70 e 100°C, por 30 min, na presença ou não do agente desnaturante guanidina (GdnHCl). Esse agente foi utilizado para potencializar a ação da temperatura. As amostras foram resfriadas em banho de gelo para interromper a reação e em seguida foram medidas nas mesmas condições estabelecidas para a xilanase nativa.

2.12. Influência de $MnCl_2$ e DTT na atividade e estrutura da xilanase

Em estudo prévio, os compostos cloreto de manganês ($MnCl_2$) e ditioneitol (DTT) atuaram como cofatores da xilanase, elevando sua atividade enzimática. Dessa forma, a fim de correlacionar o aumento da atividade com uma possível alteração conformacional da xilanase, esses compostos foram incubados em três concentrações (1, 5 e 15 mM) com a enzima (0,23 mg/mL) durante 10 minutos a 70°C e em seguida foram analisados os espectros de CD e fluorescência.

3. Resultados e discussão

3.1. Purificação e determinação da massa molecular da xilanase

A xilanase extracelular de *T. lanuginosus* foi purificada após quatro etapas cromatográficas que estão sumarizadas na Tabela 2.

Tabela 2 Sumário das etapas de purificação da xilanase de *T. lanuginosus*.

Etapa de purificação	Volume (mL)	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica total (U/mg)	Recuperação Fator de purificação	(%)
Extrato bruto	1.119	328.236,3	18911,1	17,4	1	100
DEAE Sepharose	5,78	119.191,6	626,9	190,1	11	36
Sephadex G75	4,82	55.996,7	100,9	555,0	32	17
Superdex 75	2,00	1.033,6	7,6	136,5	8	0,3
Mono-Q	1,45	299,7	1,5	197,2	11	0,1

Nota: Volume inicial do extrato bruto foi 1,119 L.

A pureza da xilanase foi analisada por gel SDS-PAGE e zimograma e exibiu banda única com massa molecular estimada de 28 kDa (Figura 3A). Para comprovar sua pureza e obter a massa molecular exata da xilanase, foi realizada a espectrometria de massa MALDI-TOF/MS, cujo espectro está apresentado na Figura 3B. Nota-se que houve a ionização da proteína em dois prótons moleculares, cujas relações massa/carga foram de 21,3 e 10,6 kDa, ambas referentes à mesma proteína, comprovando a pureza da xilanase, com massa molecular de 21,3 kDa, ao final de quatro etapas cromatográficas.

Estudos realizados por outros autores com xilanasas de *T. lanuginosus* também relataram a necessidade de várias etapas de purificação (KHUCHAROENPHAISAN; TOKUYAMA; KITPREECHAVANICH, 2010; LI et al.,

2005), bem como diferença nas massas moleculares obtidas pelo gel de eletroforese (25,5 kDa) e pela espectrometria de massa (21,3 kDa) (XIONG et al., 2004).

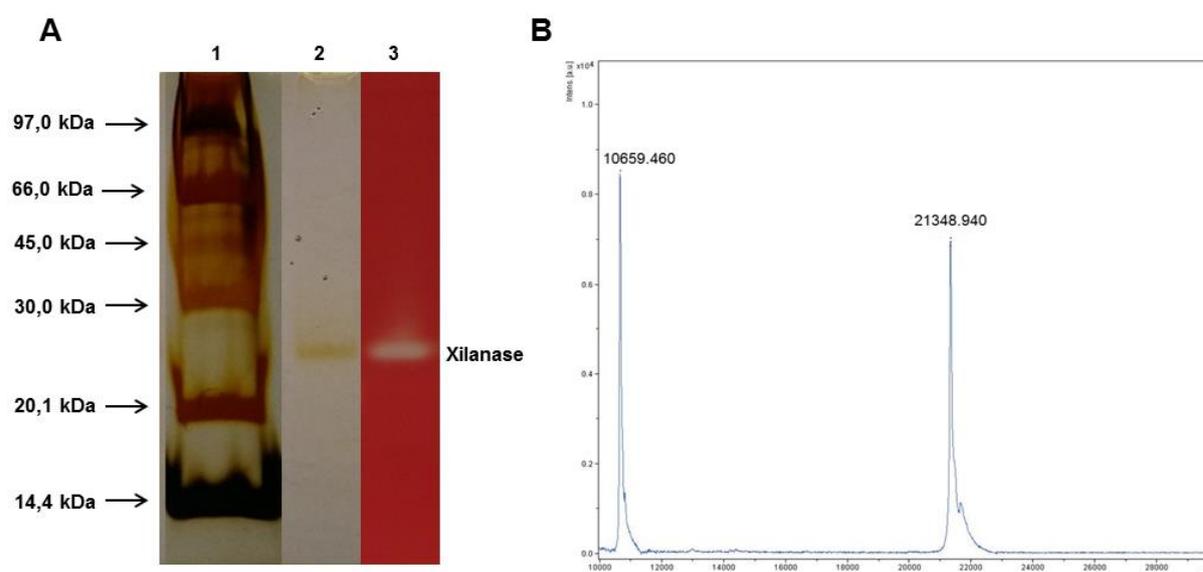


Figura 3 Análise da pureza e determinação da massa molecular da xilanase. (A) Eletroforese SDS-PAGE: Linha 1: marcador de baixo peso molecular; Linha 2: xilanase purificada; Linha 3: zimograma da xilanase purificada. (B) Espectrometria de massa MALDI-TOF/MS da xilanase purificada.

3.2. Especificidade ao substrato

Quatro substratos foram testados, todos exibindo a mesma ligação principal (β -1,4), porém, a especificidade da xilanase purificada pelos substratos foi diferente. Os resultados da Tabela 3 revelam que a xilanase apresentou maior especificidade ao xilano de beechwood, seguido do xilano de birchwood e xilana oat spelt. A xilanase não foi capaz de hidrolisar a carboximetilcelulose, cujo resultado é similar aos descritos em outros estudos (KHUCHAROENPHAISAN; TOKUYAMA; KITPREECHAVANICH, 2010; LI et al., 2005), indicando a ausência de atividade CMCase, característica desejável no emprego dessa xilanase para o biobranqueamento da polpa celulósica (LI et al., 2005).

Tabela 3 Especificidade ao substrato pela xilanase de *T. lanuginosus*.

Substratos (1%)	Ligação principal	Atividade Relativa (%)
Xilano de beechwood	β -1,4	100
Xilano de birchwood	β -1,4	97,2
Xilana oat spelt	β -1,4	26,6
Carboximetilcelulose	β -1,4	0

Nota: As atividades relativas foram obtidas considerando o xilano de beechwood como 100% por apresentar maior atividade enzimática.

3.3. Identificação por CCD dos produtos de hidrólise do xilano e dos XOS com a xilanase purificada

Os produtos de hidrólise liberados pela ação da xilanase no substrato xilano de beechwood e nos XOS (X_2 - X_5) estão ilustrados nas Figuras 4 e 5, respectivamente. Nota-se que está bem evidente a presença de X_2 e X_3 , revelando que o perfil da hidrólise do xilano pela xilanase é característico de uma endoxilanase, por atuar nas ligações glicosídicas do tipo β -1,4 do xilano (Figura 4). Não foi observada a formação de xilose mesmo após 180 minutos de reação.

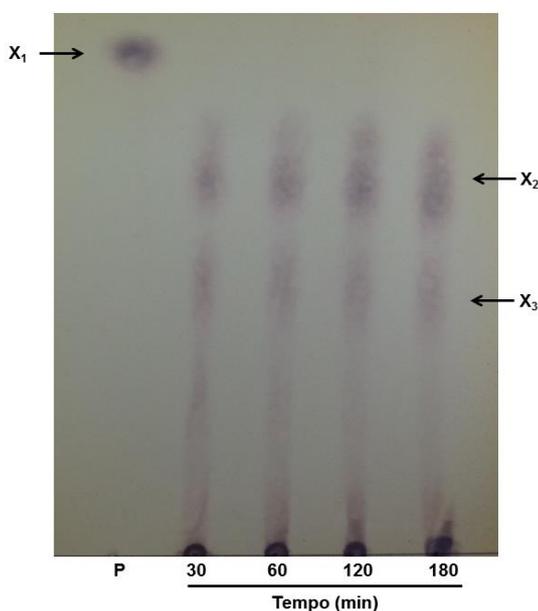


Figura 4 Análise por CCD dos produtos de hidrólise (X_2 , xilobiose; X_3 , xilotriose) do xilano de beechwood pela xilanase purificada após 180 minutos de reação utilizando xilose (X_1) como padrão (P).

A atuação da xilanase nos XOS (X_2 - X_5) liberou diferentes produtos de hidrólise (Figura 5).

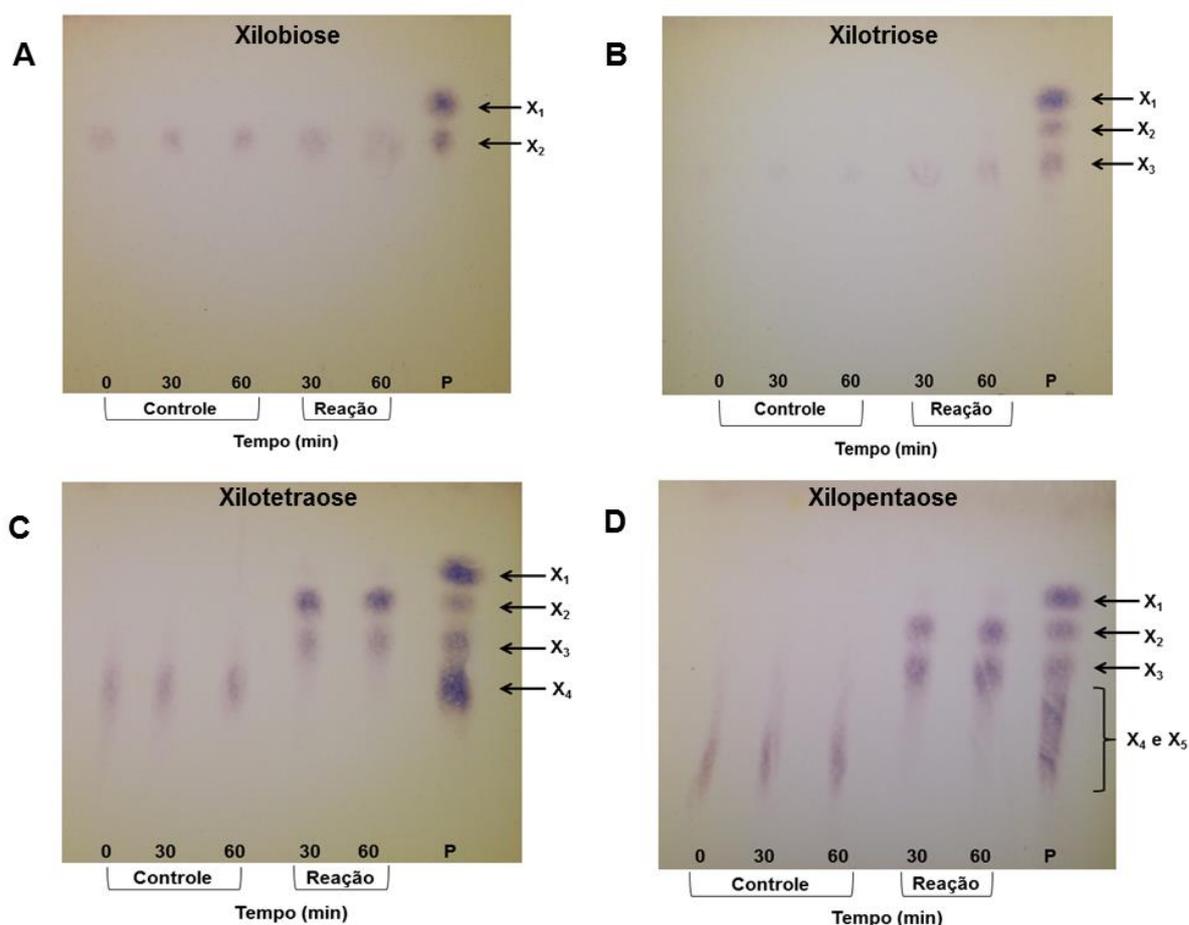


Figura 5 Análise por CCD dos produtos de hidrólise a partir de diferentes XOS pela xilanase purificada após 60 minutos de reação. P: Padrão (X₁, X₂, X₃, X₄ e X₅).

A xilanase purificada não foi capaz de romper as ligações xilosídicas da xilobiose (X₂) (Figura 5A) e xilotriose (X₃) (Figura 5B), e conseqüentemente não houve a formação de xilose (X₁), mesmo após 60 minutos de reação.

Os produtos de hidrólise mais evidentes pela ação da xilanase na X₄ foram X₂ e X₃, sendo que a X₂ apresenta-se em maior intensidade (Figura 5C), indicando que a xilanase clivou mais especificamente a ligação interna da cadeia da X₄. Os mesmos produtos, X₂ e X₃, foram liberados após a reação entre a xilanase e o substrato X₅, qualitativamente na mesma proporção, sugerindo que a enzima preferencialmente clivou a segunda ligação glicosídica da X₅ (Figura 5D).

Bennett e colaboradores (1998) também relataram que a xilanase de *T. lanuginosus* ATCC 46882 não foi capaz de hidrolisar a X₂, porém, a xilanase atuou na primeira ligação glicosídica da extremidade não-redutora da X₃ liberando os produtos X₁ e X₂. No ensaio com X₄, a frequência de clivagem foi maior na ligação do meio, mas também uma pequena frequência foi relatada na primeira ligação

glicosídica a partir da extremidade não redutora. A X_5 foi hidrolisada pela xilanase, liberando como produtos finais X_2 e X_3 , sendo este último em maior quantidade.

Similarmente, Li e colaboradores (2005) reportaram que a xilanase de *T. lanuginosus* CBS 288.54, quando incubada com X_2 , não hidrolisou esse xilo-oligossacarídeo, entretanto, atuou na X_3 após meia hora de reação, liberando X_2 e X_4 provavelmente pela ação de uma glicosiltransferase. Portanto, o comportamento das xilanases neste estudo em comparação com o realizado por Li et al. (2005), oriundas da mesma espécie fúngica, atuaram de forma semelhante com a xilobiose, entretanto, hidrolisaram de forma diferente a X_3 .

3.4. Estimativa da estrutura secundária da xilanase

O espectro de CD na região do ultravioleta distante da xilanase purificada apresentou duas bandas, uma positiva em torno de 197 nm e uma negativa em torno de 220 nm, caracterizando uma proteína com estrutura do tipo folha- β (Figura 7A, linha preta). Este tipo de espectro é semelhante ao relatado por Corrêa e Ramos (2009), em que proteínas com essa estrutura possuem banda positiva entre 195 – 200 nm e banda negativa entre 210 – 220 nm. Ainda, a xilanase de *T. lanuginosus* deste estudo apresentou espectro de CD semelhante ao reportado por Damaso et al. (2003) e Jia e colaboradores (2010). Embora nos três estudos todos os espectros exibiram a presença da banda negativa, em torno de 220 nm, apenas no presente estudo a banda positiva foi totalmente evidenciada (197 nm), visto que Damaso e colaboradores (2003) não mensuraram até 190 nm, ou seja, a banda positiva não foi demonstrada em sua totalidade, enquanto Jia et al. (2010) avaliaram somente até 200 nm.

O conteúdo da estrutura secundária da xilanase de *T. lanuginosus* foi estimado pela deconvolução dos espectros de CD, resultando em aproximadamente 3% de hélices- α , 39% de folhas- β , 20% de voltas β e 38% de estruturas desordenadas, com um desvio médio quadrático de 3%. Esse resultado é similar aos dados cristalográficos obtidos para a xilanase de *T. lanuginosus* que está depositada no banco de dados UniProt (UniProtKB – O43097 – XYNA_THELA).

3.5. Efeito da temperatura na relação estrutura-atividade da xilanase

A temperatura ótima para a xilanase de *T. lanuginosus* foi de 75°C (Figura 6A), a mesma temperatura encontrada nas xilanases de *T. lanuginosus* ATCC 46882 (BENNETT et al., 1998) e *T. lanuginosus* CAU44 (JIANG et al., 2005). Outros

estudos relataram uma temperatura ótima inferior, de 70°C, para *T. lanuginosus* DSM 10635 (XIONG et al., 2004), *T. lanuginosus* THKU-9 e *T. lanuginosus* THKU-49 (KHUCHAROENPHAISAN; TOKUYAMA; KITPREECHAVANICH, 2008).

A enzima do presente trabalho exibiu estabilidade de 100% nas temperaturas de 40, 50 e 65°C após 5 horas de incubação e 99,8% após 3 horas em sua temperatura ótima (Figura 6B), diferentemente da xilanase de *T. lanuginosus* CAU44, que foi termoestável até 65°C por apenas 30 minutos em pH 6,2 (JIANG et al., 2005).

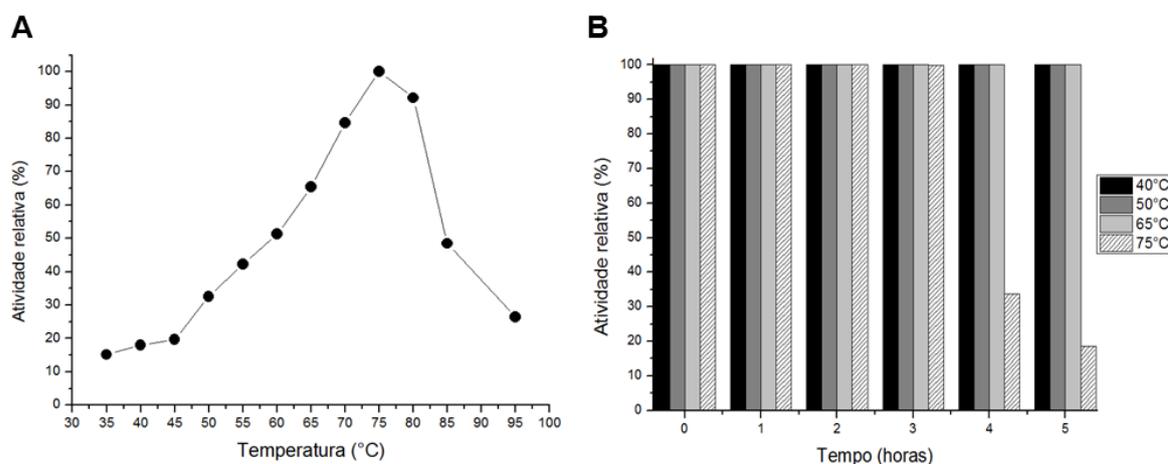


Figura 6 (A) Temperatura ótima e (B) termoestabilidade da xilanase de *T. lanuginosus*.

Sobre a influência da temperatura na estrutura secundária da xilanase de *T. lanuginosus*, foram observadas mudanças acentuadas nos espectros de CD apenas nas temperaturas acima de 70°C, com perda da banda positiva (197 nm), diminuição da intensidade da banda negativa original (220 nm) e surgimento de banda negativa em torno de 200 nm (Figura 7A). Alguns espectros foram omitidos para melhor visualização.

As proteínas desnaturadas pertencem à classe de proteínas desordenadas e o aparecimento da banda negativa em torno de 200 nm pode ser relacionado ao aumento do conteúdo destas estruturas, porém, a xilanase mesmo submetida a 95°C, reteve uma fração de estrutura secundária ordenada (Figura 7A), embora, a 96°C, já tenha perdido 75% da sua atividade enzimática (Figura 6A). De acordo com Venyaminov e Yang (1996), os espectros da classe de proteínas desordenadas são caracterizados por uma banda intensa negativa em torno de 200 nm e bandas de baixa intensidade entre 220 e 230 nm, que podem ser positivas ou negativas.

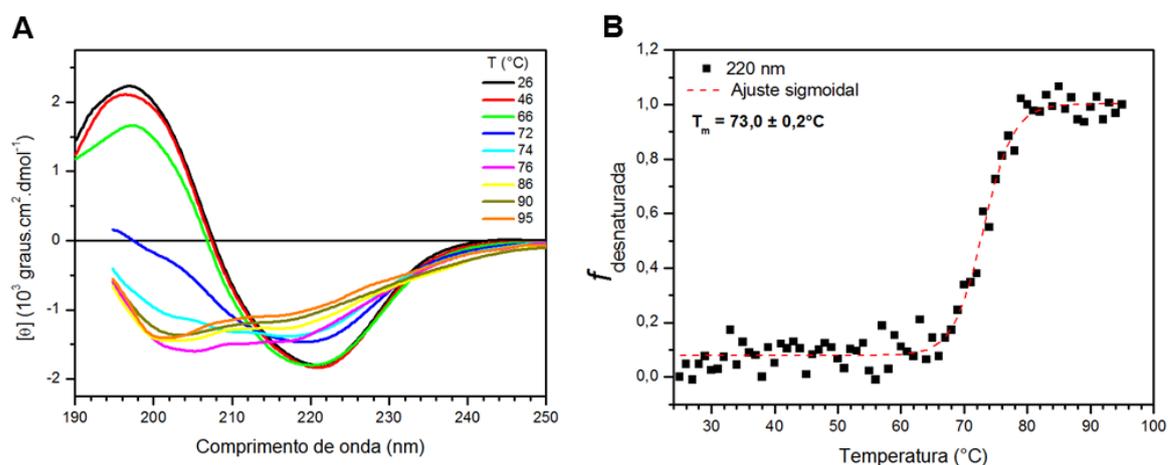


Figura 7 (A) Espectros de CD na região UV distante da xilanase (0,23 mg/mL) em tampão fosfato/borato/acetato 0,01 M (pH 6,5) sob a influência de diferentes temperaturas. (B) Curva normalizada da desnaturação térmica da xilanase. As frações foram calculadas com a equação 1 e valores de elipticidade molar por resíduo em 220 nm. O ajuste sigmoide dos dados forneceu um coeficiente de correlação de aproximadamente 0,98.

A xilanase, mesmo incubada com GdnHCl em concentração elevada (6 M), apresentou espectro de CD não compatível com estrutura totalmente desordenada, perdendo apenas cerca de 40% da intensidade em 220 nm em relação ao espectro da amostra nativa (dados não mostrados).

A Figura 7B apresenta a curva de desnaturação construída a partir dos valores normalizados de elipticidade molar por resíduo em 220 nm. O ajuste da curva sigmoide (linha tracejada) aos dados da desnaturação térmica revelou uma transição de dois estados (Nativo \rightarrow Desnaturado) para este processo, com temperatura do ponto médio da transição (T_m) de $73,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$, ou seja, nesta temperatura a proteína encontra-se 50% na forma nativa e 50% na forma desordenada. O monitoramento deste processo em 197 nm corroborou o resultado anterior, revelando também uma transição de dois estados (Nativo \rightarrow Desnaturado), com T_m de $73,4 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (dados não mostrados). Os coeficientes de correlação obtidos para o monitoramento do processo em 197 e 220 nm foram 0,96 e 0,98, respectivamente.

Esses dados, aliados aos resultados da atividade enzimática (Figura 6A), indicam uma correlação entre a alteração estrutural da xilanase induzida por temperatura e sua atividade ótima, que é alcançada aos 75°C , sugerindo que para melhor desempenhar sua função xilanásica, a enzima deve adquirir conformação mais aberta e flexível, como sugerido pela diminuição da estrutura beta acima de

70°C. Por outro lado, a curva da temperatura ótima da atividade enzimática mostra que este aumento não pode ser indiscriminado, pois, em 85°C, a atividade diminui em aproximadamente 60% (Figura 6A), ainda que os valores de elipticidade monitorados, tanto em 197 como em 220 nm (Figura 7B), não mostrem alterações significativas a partir de aproximadamente 82°C.

No estudo de Murakami e colaboradores (2005), o ensaio de desnaturação térmica revelou que a xilanase recombinante (rXynA) de *Bacillus subtilis* 1A1 iniciou a mudança do estado nativo para o desnaturado a partir de 55°C, a mesma temperatura que a ótima para a atividade catalítica, sendo que, acima dessa temperatura, a rXynA perdeu sua atividade e sua estrutura secundária folha- β . O conhecimento da estrutura primária dessa enzima permitiu aos pesquisadores realizarem simulações de modelagem molecular, e estas revelaram que, abaixo de 55°C, duas regiões ligadas à atividade da enzima, denominadas “thumb domain” e “palm domain”, encontram-se em uma conformação mais fechada. Entretanto, na temperatura ótima, esses dois domínios se abrem, facilitando o acesso do substrato à fenda do sítio catalítico.

Baseado nos resultados, observados por CD, sobre o efeito da temperatura na estrutura secundária da xilanase, foi investigada a influência de algumas temperaturas na estrutura terciária da xilanase de *T. lanuginosus*. Inicialmente, foi monitorada a emissão da fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano da xilanase (Figura 8). O espectro de fluorescência da xilanase nativa (25°C) é característico de resíduos de triptofano parcialmente expostos ao solvente, exibindo um comprimento de onda de emissão máxima (λ_{max}^{emis}) de 341 nm (Figura 8).

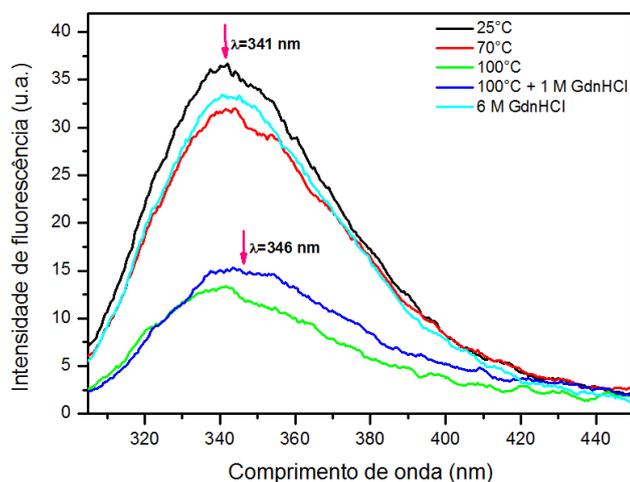


Figura 8 Efeito da temperatura na fluorescência intrínseca da xilanase (0,1 mg/mL) em tampão fosfato/borato/acetato 0,01 M, pH 6,5, com excitação em 295 nm.

Os resultados sugerem que, nas temperaturas de 70 e 100°C, a xilanase conservou sua estrutura terciária, pois não houve deslocamento do λ_{max}^{emis} quando comparado com o espectro de emissão da proteína a 25°C, embora a intensidade de fluorescência tenha sido levemente suprimida a 70°C (13%) e fortemente a 100°C (59%) (Figura 8).

Devido à aparente manutenção da estrutura terciária da xilanase a 100°C, esta foi incubada com GdnHCl 6 M, um agente desnaturante de proteínas, porém, mesmo nesta condição extrema não ocorreu deslocamento do λ_{max}^{emis} , apenas observou-se a supressão da fluorescência, sugerindo que não ocorreu desnaturação. Entretanto, ao associar a GdnHCl 1 M e temperatura de 100°C, a xilanase apresentou diminuição da intensidade da fluorescência e deslocamento do λ_{max}^{emis} para a região do vermelho, 346 nm, indicando mudança na estrutura terciária da enzima por expor o triptofano ao solvente (Figura 8).

Segundo Lakowicz (2006), os resíduos de triptofano em água emitem a fluorescência em 350 nm, como consequência; visto que os triptofanos dessa xilanase encontram-se parcialmente expostos ao solvente (341 nm), estes não são considerados uma sonda satisfatória para detectar as mudanças na estrutura terciária da enzima, pois as alterações de fluorescência intrínseca revelam apenas mudanças na microvizinhança dos fluoróforos.

Dessa forma, para detectar possíveis alterações estruturais globais, foram realizados ensaios de fluorescência extrínseca utilizando a sonda ANS. Essa sonda, quando em meio hidrofílico, possui pouca intensidade de fluorescência, porém, ao ligar-se nas regiões hidrofóbicas de uma biomolécula, ocorre acentuado aumento na emissão de fluorescência, bem como o deslocamento do λ_{max}^{emis} para a região do azul (LAKOWICZ, 2006). Este comportamento auxilia o monitoramento de processos de desnaturação das proteínas. Sendo assim, o ANS foi adicionado às mesmas amostras anteriores e seus espectros de emissão demonstraram que o fluoróforo não foi capaz de se ligar à xilanase em nenhuma das três temperaturas testadas, mesmo na temperatura de 100°C, referente ao seu estado desnaturado, pois manteve baixa intensidade de fluorescência e o λ_{max}^{emis} em torno de 500 nm. O mesmo comportamento foi observado para as demais amostras, pois, na presença de guanidina 1 M, associada ou não à temperatura de 100°C, e na presença de 6 M de guanidina, a emissão de fluorescência da sonda ANS não sofreu alterações (dados

não mostrados). Portanto, esses resultados sugerem que não houve a exposição dos sítios hidrofóbicos da proteína ao solvente mesmo em condições extremas de desnaturação. Desse modo, os resultados da fluorescência extrínseca corroboram os resultados de CD no sentido de que a enzima acima de 70°C modifica sua estrutura secundária, porém, não está totalmente desenovelada.

3.6. Efeito do pH na relação estrutura-atividade da xilanase

A xilanase de *T. lanuginosus* apresentou maior atividade em pH 6,5 (Figura 9A). Shrivastava e colaboradores (2013) reportaram pH 6,0 como sendo o pH ótimo para a xilanase de *T. lanuginosus* SS-8, entretanto, a xilanase de *T. lanuginosus* CBS 288.54 foi mais ativa em pH entre 7,0 e 7,5 (LI et al., 2005). Sobre a estabilidade ao pH, a xilanase deste trabalho foi totalmente estável na faixa de pH 5,0 a 7,0 por até 100 horas de incubação a 4°C e resistiu ao pH 8,0 com 98,3% após o mesmo período (Figura 9B).

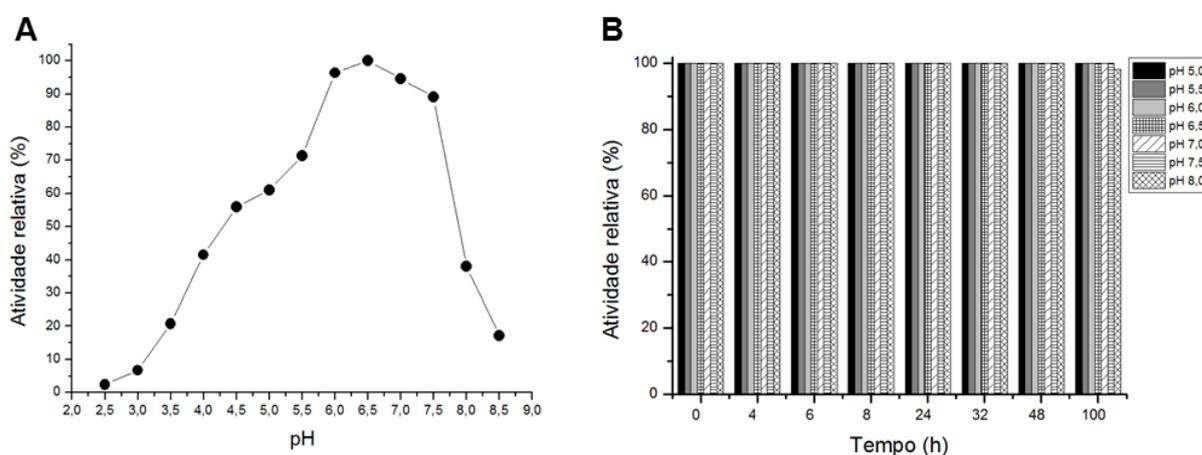


Figura 9 (A) pH ótimo e (B) estabilidade ao pH da xilanase de *T. lanuginosus*.

A influência de diferentes valores de pH (1,8; 2,8; 3,8; 6,5 e 10) na estrutura da xilanase e sua correlação com a atividade enzimática foi estudada por CD e fluorescência. Os espectros de CD revelaram que a enzima conservou sua estrutura secundária em ampla faixa de pH, pois nestes não foram observadas alterações significativas (dados não mostrados), diferentemente do que ocorreu com a atividade enzimática, que foi reduzida principalmente em extremos de pH (Figura 9A). Dessa forma, os dados sugerem que a manutenção da estrutura secundária não é suficiente para manter a atividade enzimática; outros fatores podem ser cruciais,

como a carga dos resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio catalítico, ou ainda particularidades da estrutura terciária.

Nath e Rao (2001), estudaram por CD, as mudanças conformacionais e estruturais da xilanase de *Bacillus* sp. (NCIM 59) em relação ao pH e relataram que não houve mudança conformacional na enzima em pH 7 e 8, pois a elipticidade monitorada em 222 nm não foi alterada, entretanto, em pH mais alcalinos (9 e 10), ocorreu a diminuição da elipticidade residual, sugerindo mudança na estrutura da xilanase, que pode estar influenciando diretamente a atividade catalítica dessa enzima nesses valores de pH.

Os efeitos da variação de pH na estrutura terciária da xilanase foram monitorados pela emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano (Figura 10A), como também pelo auxílio da sonda ANS (Figura 10B). A Figura 10A demonstra que, em pH 6,5, a enzima apresentou o máximo da emissão de fluorescência no comprimento de onda de 341 nm (λ_{max}^{emis}). Em pH muito alcalino (pH 10), houve diminuição de aproximadamente 10% da intensidade de emissão de fluorescência, mas não ocorreu deslocamento no λ_{max}^{emis} quando comparado ao espectro no pH ótimo. A supressão de fluorescência pode ocorrer devido à ocorrência de caminhos não radioativos para o decaimento da energia, tais como transferências de energia, porém, a invariabilidade do λ_{max}^{emis} sugere que não há modificações na exposição dos resíduos de triptofano. Em pH 3,8 e 1,8, foi observado pequeno deslocamento para a região do vermelho (344 nm), evidenciando maior exposição do triptofano ao solvente, e em pH 1,8 também ocorreu a supressão da intensidade de emissão da fluorescência em torno de 30% (Figura 10A).

De acordo com Nath e Rao (2001), a xilanase de *Bacillus* sp. (NCIM 59) teve sua fluorescência diminuída, na faixa de pH entre 8 e 10, e deslocamento de 4 nm do comprimento de emissão máximo para a região do vermelho. Os pesquisadores sugeriram que a supressão da fluorescência poderia estar relacionada com a desprotonação dos aminoácidos tirosina, lisina e arginina.

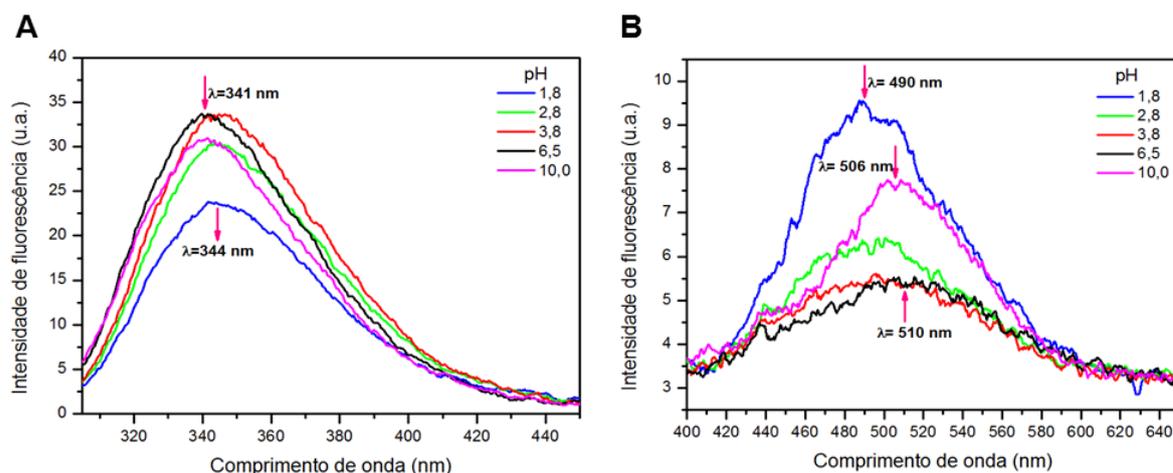


Figura 10 Influência do pH na estrutura terciária da xilanase em tampão fosfato/borato/acetato 0,01 M. (A) Espectros da emissão da fluorescência intrínseca da xilanase (0,1 mg/mL) com excitação em 295 nm. (B) Espectros de emissão de fluorescência da sonda ANS com excitação em 380 nm.

Na Figura 10B, a emissão de fluorescência da sonda ANS incubada com a xilanase sob os diferentes valores de pH revelou que em pH muito ácido (1,8) ocorre o deslocamento do λ_{max}^{emis} para a região de menor comprimento de onda (490 nm) em relação ao controle (pH 6,5; 510 nm) e a sonda ANS eleva sua intensidade em 79%, comparado ao pH 6,5. Em pH 2,8 e 3,8, também ocorreu o “blue shift”, entretanto, nesses dois pH, o aumento da intensidade de fluorescência foi menor, 19 e 6%, respectivamente. Em pH alcalino (10,0), houve pequeno “blue shift” (506 nm) e aumento de 42% de intensidade de emissão de fluorescência, comparado ao controle.

A fluorescência intrínseca em conjunto com a extrínseca revelou que, em extremos de pH, a estrutura terciária da enzima não é tão estável, ocorrendo maior exposição dos resíduos de triptofanos ao solvente e ligação da sonda aos sítios hidrofóbicos da enzima, sugerindo início de desenovelamento estrutural.

3.7. Influência de $MnCl_2$ e DTT na estrutura-atividade da xilanase

Os compostos $MnCl_2$ e DTT atuaram como cofatores da xilanase e elevaram sua atividade enzimática, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 Influência dos compostos na atividade enzimática da xilanase de *T. lanuginosus*.

Composto	Atividade relativa (%)		
	1 mM	5 mM	15 mM
Controle	100,00	100,00	100,00
MnCl ₂	129,69	131,35	141,33
DTT	129,61	168,63	182,35

De acordo com Knob e colaboradores (2013), a ativação enzimática da xilanase por agentes protetores do grupo tiol pode ser explicada pela prevenção da oxidação dos grupos sulfidrilas. Outros estudos reportaram sobre a ativação na atividade enzimática por esses compostos (HEINEN et al., 2014; MCPHILLIPS et al., 2014; SILVA; TERRASAN; CARMONA, 2015), entretanto, a influência desses agentes na estrutura da xilanase de *T. lanuginosus* não foi relatada em nenhum trabalho.

Dessa forma, o comportamento estrutural da xilanase na presença desses agentes foi monitorado por CD e fluorescência intrínseca e está descrito na Figura 11.

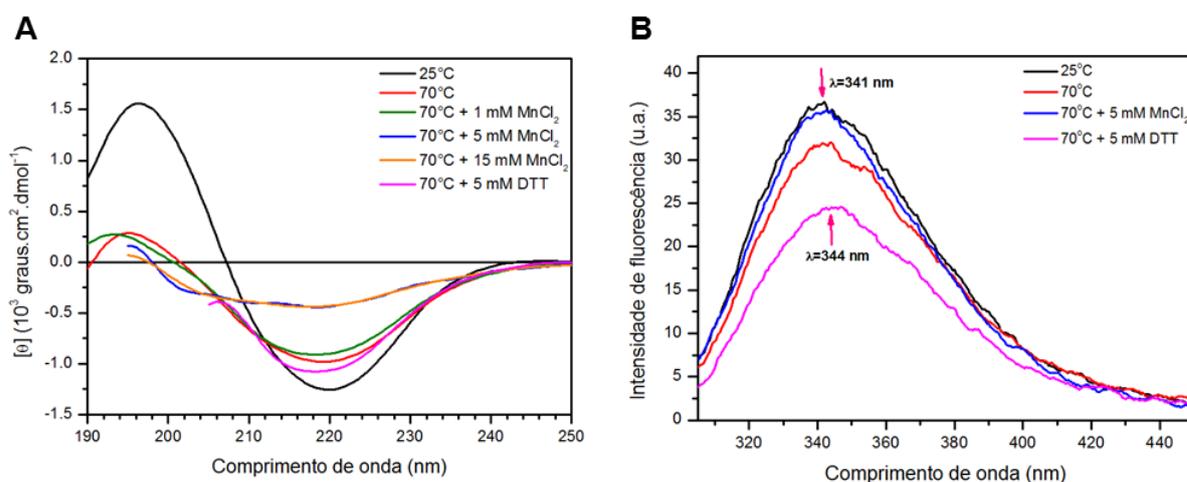


Figura 11 Influência dos compostos MnCl₂ e DTT na conformação da xilanase em tampão fosfato/borato/acetato 0,01 M, pH 6,5. (A) Espectros de CD da xilanase (0,23 mg/mL) na região UV distante. (B) Espectros da fluorescência intrínseca da xilanase (0,1 mg/mL) com excitação em 295 nm.

Os resultados de CD revelaram que a xilanase, quando incubada a 70°C com 1 mM de MnCl₂, não teve a estrutura secundária alterada em relação ao controle (70°C, sem MnCl₂) (Figura 11A), enquanto sua atividade aumentou aproximadamente 30% (Tabela 4). O aumento da concentração de MnCl₂ para 5 mM e 15 mM provocou igual diminuição da intensidade da estrutura beta em 220 nm

(Figura 11A), porém, as amostras incubadas nestas duas concentrações apresentaram aumentos diferentes na atividade enzimática em relação ao controle, em torno de 30 e 40%, respectivamente (Tabela 4). Desse modo, não foi possível estabelecer a correlação entre o aumento da atividade xilanásica e as alterações na estrutura secundária na presença desse composto.

O espectro de CD da xilanase não sofreu alterações significativas, na região de 220 nm, em relação ao controle, quando a enzima foi incubada a 70°C na presença do agente redutor DTT a 5 mM (Figura 11A). Esse resultado sugere que sua estrutura secundária não foi modificada, entretanto, ocorreu aumento de 68% na atividade enzimática desta amostra (Tabela 4). Analogamente aos resultados obtidos para o MnCl₂ (1 mM) não foi possível relacionar o aumento da atividade na presença de DTT com a ausência de modificação estrutural.

Os efeitos dos compostos MnCl₂ e DTT na estrutura terciária da xilanase foram acompanhados, utilizando a emissão de fluorescência de seus triptofanos. A Figura 11B apresenta os espectros de emissão de fluorescência intrínseca da enzima em diferentes condições. Observa-se que a presença de MnCl₂ levemente diminuiu a intensidade da fluorescência e não deslocou o λ_{max}^{emis} . Tendo em vista esse resultado, foi realizada a fluorescência extrínseca, que revelou que o MnCl₂ na concentração de 5 mM associado à temperatura de 70°C deslocou o λ_{max}^{emis} do ANS para a região de menor comprimento de onda (467 nm) em relação ao controle (ANS em tampão a 70°C; 500 nm), expondo os sítios hidrofóbicos ao solvente e sugerindo mudanças na estrutura terciária da xilanase (dados não mostrados).

No ensaio de fluorescência intrínseca, o DTT foi capaz de reduzir a intensidade da fluorescência em torno de 33% e deslocar o λ_{max}^{emis} em 3 nm para a região do vermelho (344 nm), provavelmente resultante de maior exposição dos resíduos de triptofano ao solvente (Figura 11B). Portanto, os resultados sugerem que a presença de MnCl₂ e DTT alteram a estrutura terciária da xilanase, favorecendo a atividade enzimática.

4. Conclusões

A xilanase purificada de *T. lanuginosus* exibiu características similares às xilanases pertencentes à família GH11, tais como pequena massa molecular e estrutura secundária com predominância de folhas- β . Além disso, a xilanase mostrou

elevada especificidade ao substrato xilano de beechwood, produzindo xilobiose e xilotriose, apresentando perfil característico de uma endoxilanase. A enzima hidrolisou ainda xilotetraose e xilopentaose, porém, não exibiu atividade catalítica sobre xilobiose e xilotriose.

O estudo da relação estrutura-atividade da xilanase, por CD, revelou que na temperatura de maior atividade, a enzima alterou sua estrutura secundária e elevou sua atividade catalítica, enquanto, na presença de cofatores ou em condições variadas de pH, não foram observadas modificações conformacionais. Por outro lado, os resultados da fluorescência sugerem que a xilanase, na presença dos cofatores, modificou sua estrutura terciária e elevou sua atividade enzimática, e em valores extremos de pH, houve a alteração conformacional, porém, com diminuição da atividade xilanásica.

Dessa forma, foi possível concluir que a endoxilanase apresentou características relevantes, visto que este é o primeiro estudo que aborda a relação estrutura-atividade da xilanase de *T. lanuginosus* em diferentes pH, temperaturas e ativadores da enzima. Além disso, a enzima mostrou-se promissora para aplicações industriais que necessitem de temperaturas elevadas, como no branqueamento da polpa celulósica, na peletização da ração animal e na melhoria dos produtos de panificação.

Conflito de interesse

Os autores declaram nenhum conflito de interesse financeiro ou comercial.

Agradecimentos

Carla Lieko Della Torre é bolsista da CAPES/Fundação Araucária, Brasil. Os autores agradecem ao Laboratório de Bioquímica/Biofísica do Instituto de Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil e à Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

CONCLUSÕES GERAIS

Os fungos filamentosos têm sido explorados por produzirem diferentes tipos de enzimas com características interessantes para serem aplicadas em diversos setores, como os de panificação, bebidas, biocombustíveis, têxteis, rações animais, farmacêutico e de polpa e papel. Dentro desse contexto, a xilanase de *T. lanuginosus* foi purificada e caracterizada bioquimicamente e a influência do pH, temperatura e agentes ativadores (MnCl_2 e DTT) na relação estrutura-atividade foi investigada por dicróismo circular e fluorescência. A endoxilanase exibiu pequena massa molecular e estrutura secundária com predominância de folhas- β , apresentando características pertencentes à família GH11. Mostrou-se altamente ativa em pH 6,5 e temperatura de 75°C, bem como foi estável em ampla faixa de pH e temperatura. O estudo estrutural da xilanase revelou que, para desempenhar elevada atividade enzimática, foi necessário ocorrer mudança conformacional. Sua estrutura secundária foi conservada mesmo em extremos de pH, em temperaturas até 70°C e na presença de MnCl_2 (1 mM), DTT (5 mM) e elevada concentração de guanidina (6 M). A fluorescência intrínseca revelou que a estrutura terciária sofreu influência do pH, guanidina (1 M) associado à temperatura e na presença de MnCl_2 e DTT, enquanto a fluorescência extrínseca, utilizando a sonda ANS, revelou mudanças em extremos de pH e na presença de MnCl_2 e DTT. Os resultados da fluorescência sugerem que tanto o aumento da atividade enzimática na presença dos cofatores quanto a perda da atividade em valores extremos de pH relacionam-se a alterações da estrutura terciária da enzima. Pode-se concluir que a endoxilanase obtida do fungo isolado da Mata Atlântica do Paraná, *T. lanuginosus*, por exibir características de tolerância às condições extremas, como pH e temperatura, mostrou-se promissora para aplicações industriais que necessitem de tais condições, como no branqueamento da polpa celulósica e na melhoria de rações animais e produtos de panificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Revisão bibliográfica

ANBU, P.; GOPINATH, S. C. B.; CHAULAGAIN, B. P.; TANG, T. H.; CITARTAN, M. Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2014. [Editorial]. **BioMed Research International**, v. 2015, p.1-3, 2015.

ANBU, P.; GOPINATH, S. C. B.; CIHAN, A. C.; CHAULAGAIN, B. P. Microbial enzymes and their applications in industries and medicine. [Editorial]. **BioMed Research International**, v. 2013, p.1-2, 2013.

AVILA-CISNEROS, N.; VELASCO-LOZANO, S.; HUERTA-OCHOA, S.; CÓRDOVA-LÓPEZ, J.; GIMENO, M.; FAVELA-TORRES, E. Production of thermostable lipase by *Thermomyces lanuginosus* on solid-state fermentation: selective hydrolysis of sardine oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 5, p. 1859-1872, 2014.

BEAUGRAND, J.; CHAMBAT, G.; WONG, V. W.; GOUBET, F.; RÉMOND, C.; PAËS, G.; BENAMROUCHE, S.; DEBEIRE, P.; O'DONOHUE, M.; CHABBERT, B. Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 15, p. 2529-2540, 2004.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326-338, 2001.

BENNETT, N. A.; RYAN, J.; BIELY, P.; VRSANSKA, M.; KREMICKY, L.; MACRIS, B. J.; KEKOS, D.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; CLAEYSSENS, M.; NERINCKX, W.; NTAUMA, P.; BHAT, M. K. Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Thermomyces lanuginosus* ATCC 46882. **Carbohydrate Research**, v. 306, n. 3, p. 445-455, 1998.

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

CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D233-238, 2009.

CAZY, CARBOHYDRATE ACTIVE ENZYMES. Disponível em: <www.cazy.org>. Acesso em: 23 dez. 2016.

CESAR, T.; MRŠA V. Purification and properties of the xylanase produced by *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 4, p. 289-296, 1996.

CHAUDHURI, A.; MAHESHWARI, R. A novel invertase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*: its requirement of thiol and protein for activation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 327, n. 1, p. 98-106, 1996.

CHEN, Z.; JIA, H.; YANG, Y.; YAN, Q.; JIANG, Z.; TENG, C. Secretory expression of a β -xylosidase gene from *Thermomyces lanuginosus* in *Escherichia coli* and

characterization of its recombinant enzyme. **Letters in Applied Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 330-337, 2012.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005.

CORRÊA, D. H. A.; RAMOS, C. H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 3, n. 5, p. 164-173, 2009.

CORRÊA, J. M.; CHRISTI, D.; TORRE, C. L. D.; HENN, C.; CONCEIÇÃO-SILVA, J. L.; KADOWAKI, M. K.; SIMÃO, R. C. G. High levels of β -xilosidase in *Thermomyces lanuginosus*: potential use for saccharification. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 680-690, 2016.

DAKO, E.; BERNIER, A.; DADIE, A. T.; JANKOWSKI, C. The Problems Associated with Enzyme Purification. In: EKINCI, D. (ed.). **Chemical Biology**. Croatia: Intech Open Access Publisher, 2012. p. 19-40.

DAMASO, M. C. T.; ANDRADE, C. M. M. C.; JUNIOR, N. P. Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 333-338, 2002.

DOBREV, G. T.; PISHTIYSKI, I. G.; STANCHEV, V. S.; MIRCHEVA, R. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 14, p. 2671-2678, 2007.

DU, Y.; SHI, P.; HUANG, H.; ZHANG, X.; LUO, H.; WANG, Y.; YAO, B. Characterization of three novel thermophilic xylanases from *Humicola insolens* Y1 with application potentials in the brewing industry. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 161-167, 2013.

DUBEY, V. K.; JAGANNADHAM, M. V. Differences in the unfolding of procerain induced by pH, guanidine hydrochloride, urea, and temperature. **Biochemistry**, v. 42, n. 42, p. 12287-12297, 2003.

EFTINK, M. R. Fluorescence techniques for studying protein structure. In: SUELTER, C. H. (Ed.). **Methods of Biochemical Analysis: Protein Structure Determination**. USA: John Wiley & Sons, 1991. p. 127-205.

FANG, Z.; XU, L. PAN, D.; JIAO, L.; LIU, Z.; YAN, Y. Enhanced production of *Thermomyces lanuginosus* lipase in *Pichia pastoris* via genetic and fermentation strategies. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1541-1551, 2014.

FLORES-GALLEGOS, A. C.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; MORLETT-CHÁVEZ, J. A.; AGUILAR, C. N.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R. Comparative study of fungal strains for thermostable inulinase production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 4, p. 421-426, 2015.

GAFFNEY, M.; CARBERRY, S.; DOYLE, S.; MURPHY, R. Purification and characterization of a xylanase from *Thermomyces lanuginosus* and its functional expression by *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 5, p. 348-354, 2009.

GEORIS, J.; DE LEMOS ESTEVES, F.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; BOUGNET, V.; DEVREESE, B.; GIANNOTTA, F.; GRANIER, B.; FRÈRE, J. M. An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study. **Protein Science**, v. 9, n. 3, p. 466-475, 2000.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; DA SILVA, R. Enzimas termoestáveis: Fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GONÇALVES, A. Z. L.; CARVALHO, A. F. A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Localization and partial characterization of thermostable glucoamylase produced by newly isolated *Thermomyces lanuginosus* TO3 in submerged fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 4, p. 657-665, 2008.

GOSWAMI, G. K.; PATHAK, R. R. Microbial xylanases and their biomedical applications: a review. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 237-246, 2013.

GREENFIELD N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876-2890, 2006.

HAKULINEN, N.; TURUNEN, O.; JÄNIS, J.; LEISOLA, M.; ROUVINEN, J. Three-dimensional structures of thermophilic β -1,4-xylanases from *Chaetomium thermophilum* and *Nonomuraea flexuosa*. Comparison of twelve xylanases in relation to their thermal stability. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 7, p. 1399-1412, 2003.

HE, H.; QIN, Y.; LI, N.; CHEN, G.; LIANG, Z. Purification and Characterization of a Thermostable Hypothetical Xylanase from *Aspergillus oryzae* HML366. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 6, p. 3148-3161, 2015.

JAIN, K. K.; BHANJA DEY, T.; KUMAR, S.; KUHAD, R. C. Production of thermostable hydrolases (cellulases and xylanase) from *Thermoascus aurantiacus* RCKK: a potential fungus. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 4, p. 787-796, 2015.

JIANG, Y.; WU, Y.; LI, H. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* xylanase on aluminum hydroxide particles through adsorption: Characterization of immobilized enzyme. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 2016-2023, 2015.

JIANG, Z. Q.; YANG, S. Q.; TAN, S. S.; LI, L. T.; LI, X. T. Characterization of a xylanase from the newly isolated thermophilic *Thermomyces lanuginosus* CAU44 and its application in bread making. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 69-76, 2005.

JOO, J. C.; PACK, S. P.; KIM, Y. H.; YOO, Y. J. Thermostabilization of *Bacillus circulans* xylanase: computational optimization of unstable residues based on thermal fluctuation analysis. **Journal of Biotechnology**, v. 151, n. 1, p. 56-65, 2011.

JUNIOR, A. P.; KILIKIAN, B. V. Introdução. **Purificação de produtos biotecnológicos**. São Paulo: Editora Manole, 2005. p. 1-5.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1219-1227, 2012.

KANWAR, S. S.; DEVI, S. Thermostable xylanases of microbial origin: recent insights and biotechnological potential. **The International Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 1-20, 2012.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.

KHAN, F. I.; GOVENDER, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S.; BISETTY, K. Thermostable chitinase II from *Thermomyces lanuginosus* SSBP: Cloning, structure prediction and molecular dynamics simulations. **Journal of Theoretical Biology**, v. 374, p. 107-114, 2015.

KHUCHAROENPHAISAN, K.; SINMA, K. β -xylanase from *Thermomyces lanuginosus* and its biobleaching application. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 13, n.11, p. 513-526, 2010.

KHUCHAROENPHAISAN, K.; TOKUYAMA, S.; KITPREECHAVANICH, V. Characterization of the thermostability of xylanase produced by new isolates of *Thermomyces lanuginosus*. **Science Asia**, v. 34, p. 187-192, 2008.

KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 2, p. 168-171, 2005.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, 3 ed., USA: Springer, 2006. 954p.

LI, D. C.; YANG, Y. J.; SHEN, C. Y. Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Mycological Research**, v. 101, n. 1, p. 18-22, 1997.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, 2012.

LI, X. J.; ZHENG, R. C.; WU, Z. M.; DING, X.; ZHENG, Y. G. Thermophilic esterase from *Thermomyces lanuginosus*: molecular cloning, functional expression and biochemical characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 101, p. 1-7, 2014.

LI, X. T.; JIANG, Z. Q.; LI, L. T.; YANG, S. Q.; FENG, W. Y.; FAN, J. Y.; KUSAKABE, I. Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 12, p. 1370-1379, 2005.

LIN, J.; NDLOVU, L. M.; SINGH, S.; PILLAY, B. Purification and biochemical characteristics of β -D-xylanase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. **Biotechnology and Applied of Biochemistry**, v. 30, p. 73-79, 1999.

MANAVALAN, P.; JUNIOR, C. J. Protein secondary structure from circular dichroism spectra. **Proc. Int. Symp. Biomol. Struct. Interactions**, v. 8, n. 1, p. 141-149, 1985.

MANIMARAN, A.; KUMAR, K. S.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Hyper production of cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* SSBP on bagasse pulp and its application in biobleaching. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 5, p. 887-893, 2009.

MANNING, M. C. Underlying assumptions in the estimation of secondary structure content in proteins by circular dichroism spectroscopy - a critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 7, n. 10, p. 1103-1119, 1989.

MARTINS, D. A. B.; PRADO, H. F. A.; LEITE, R. S. R.; FERREIRA, H.; MORETTI, M. M. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production. In: Kumar, S. (Ed). *Integrated Waste Management - Volume II*: Intech, 2011, p. 319-361.

MASUI, D. C.; ZIMBARDI, A. L.; SOUZA, F. H.; GUIMARÃES, L. H.; FURRIEL, R. P.; JORGE, J. A. Production of a xylose-stimulated β -glucosidase and a cellulase-free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var. *thermoidea* under solid state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 8, p. 2689-2701, 2012.

MATSUO, K.; YONEHARA, R.; GEKKO, K. Improved estimation of the secondary structures of proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy. **Journal of Biochemistry**, v. 138, n. 1, p. 79-88, 2005.

NCBI. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5541&vl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>>. Acesso em: 23 dez. 2016.

POLIZELI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.

QU, W.; SHAO, W. Cloning, expression and characterization of glycoside hydrolase family 11 endoxylanase from *Bacillus pumilus* ARA. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 1407-1416, 2011.

RAUSSENS, V.; RUYSSCHAERT, J. M.; GOORMAGHTIGH, E. Protein concentration is not an absolute prerequisite for the determination of secondary structure from circular dichroism spectra: a new scaling method. **Analytical Biochemistry**, v. 319, p. 114-121, 2003.

REZESSY-SZABÓ, J. M.; NGUYEN, Q. D.; HOSCHKE, A.; BRAET, C.; HAJÓS, G.; CLAEYSSSENS, M. A novel thermostable α -galactosidase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b: Purification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 1, p. 55-62, 2007.

RULLER, R.; DELIBERTO, L.; FERREIRA, T. L.; WARD, R. J. Thermostable variants of the recombinant xylanase A from *Bacillus subtilis* produced by directed evolution show reduced heat capacity changes. **Proteins**, v. 70, n. 4, p. 1280-1293, 2008.

SÁ-PEREIRA, P.; PAVEIA, H.; COSTA-FERREIRA, M.; AIRES-BARROS, M. A new look at xylanases: an overview of purification strategies. **Molecular Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 257-281, 2003.

SHARMA, M.; KUMAR, A. Xylanases: An overview. **British Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-28, 2013.

SHARMA, V. K.; KALONIA, D. S. Steady-state tryptophan fluorescence spectroscopy study to probe tertiary structure of proteins in solid powders. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 4, p. 890-899, 2003.

SHEN, C.; MENOR, R.; DAS, D.; BANSAL, N.; NAHAR, N.; GUDURU, N.; JAEGLE, S.; PECKHAM, J.; RESHETNYAK, Y. K. The protein fluorescence and structural toolkit: Database and programs for the analysis of protein fluorescence and structural data. **Proteins**, v. 71, n. 4, p. 1744-1754, 2008.

SHEN, R.; LI, H. Q.; ZHANG, J.; XU, J. Effects of impurities in alkali-extracted xylan on its enzymatic hydrolysis to produce xylo-oligosaccharides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-13, 2016.

SHRIVASTAVA, S.; SHUKLA, P.; DEEPALAKSHMI, P. D.; MUKHOPADHYAY, K. Characterization, cloning and functional expression of novel xylanase from *Thermomyces lanuginosus* SS-8 isolated from self-heating plant wreckage material. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 12, p. 2407-2415, 2013.

SILVA-LUCCA, R. A.; ANDRADE, S. S.; FERREIRA, R. S.; SAMPAIO, M. U.; OLIVA, M. L. Unfolding studies of the cysteine protease baupain, a papain-like enzyme from leaves of *Bauhinia forficata*: effect of pH, guanidine hydrochloride and temperature. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 233-246, 2014.

SONG, L.; TSANG, A.; SYLVESTRE, M. Engineering a thermostable fungal GH10 xylanase, importance of n-terminal amino acids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 6, p. 1081-1091, 2015.

STEPHENS, D. E.; KHAN, F. I.; SINGH, P.; BISETTY, K.; SINGH, S.; PERMAUL, K. Creation of thermostable and alkaline stable xylanase variants by DNA shuffling. **Journal of Biotechnology**, v. 187, p. 139-146, 2014.

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

TOPAKAS, E.; PANAGIOTOU, G.; CHRISTAKOPOULOS, P. Xylanases: Characteristics, sources, production and applications. In: YANG, S-T.; EI-Enshasy, H. A.; THONGCHUL, N. (Eds.). **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**. United States: John Wiley & Sons Inc, 2013. p. 147-165.

TORRE, C. L. D.; KADOWAKI, M. K. Thermostable xylanase from thermophilic fungi: Biochemical properties and industrial applications. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 2, p. 28-37, 2017.

VENYAMINOV, S. Y.; YANG, J. T. Determination of protein secondary structure. In: FASMAN, G. D. (ed.). **Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules**. New York: Springer US, 1996. p. 69-107.

WANG, K.; LUO, H.; TIAN, J.; TURUNEN, O.; HUANG, H.; SHI, P.; HUA, H.; WANG, C.; WANG, S.; YAO, B. Thermostability improvement of a *Streptomyces* xylanase by introducing proline and glutamic acid residues. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 7, p. 2158-2165, 2014.

WANG, X. Y.; JIANG, X. P.; LI, Y.; ZENG, S.; ZHANG, Y. W. Preparation Fe₃O₄@chitosan magnetic particles for covalent immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 44-50, 2015.

WANG, Y.; BOYSEN, R. I.; WOOD, B. R.; KANSIZ, M.; MCNAUGHTON, D.; HEARN, M. T. Determination of the secondary structure of proteins in different environments by FTIR-ATR spectroscopy and PLS regression. **Biopolymers**, v. 89, n. 11, p. 895-905, 2008.

WONGWISANSRI, S.; PROMDONKOY, P.; MATETAVIPAREE, P.; ROONGSAWANG, N.; EURWILAICHITR, L.; TANAPONGPIPAT, S. High-level production of thermotolerant b-xylosidase of *Aspergillus* sp. BCC125 in *Pichia pastoris*: Characterization and its application in ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 410-413, 2013.

XIE, J.; SONG, L.; LI, X.; YI, X.; XU, H.; LI, J.; QIAO, D.; CAO, Y. Site-directed mutagenesis and thermostability of xylanase XYNB from *Aspergillus niger* 400264. **Current Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 242-248, 2011.

XIONG, H.; FENEL, E. F.; LEISOLA, M.; TURUNEN, O. Engineering the thermostability of *Trichoderma reesei* endo-1,4- β -xylanase II by combination of disulphide bridges. **Extremophiles**, v. 8, p. 393-400, 2004.

XIONG, H.; NYSSÖLÄ, A.; JÄNIS, J.; PASTINEN, O.; VON WEYMARN, N.; LEISOLA, M.; TURUNEN, O. Characterization of the xylanase produced by submerged cultivation of *Thermomyces lanuginosus* DSM 10635. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 1, p. 93-99, 2004.

YANG, S. Q.; YAN, Q. J.; JIANG, Z. Q.; LI, L. T.; TIAN, H. M.; WANG, Y. Z. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1794-1800, 2006.

YOU, C.; HUANG, Q.; XUE, H.; XU, Y.; LU, H. Potential hydrophobic interaction between two cysteines in interior hydrophobic region improves thermostability of a family 11 xylanase from *Neocallimastix patriciarum*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, n. 5, p. 861-870, 2010.

ZHANG, C.; KIM, S. K. Application of marine microbial enzymes in the food and pharmaceutical industries. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 65, p. 423-435, 2012.

ZHANG, S.; ZHANG, K.; CHEN, X.; CHU, X.; SUN, F.; DONG, Z. Five mutations in N-terminus confer thermostability on mesophilic xylanase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 395, n. 2, p. 200-206, 2010.

ZHENG, H.; LIU, Y.; SUN, M.; HAN, Y.; WANG, J.; SUN, J.; LU, F. Improvement of alkali stability and thermostability of *Paenibacillus campinasensis* Family-11 xylanase

by directed evolution and site-directed mutagenesis. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 153-162, 2014.

2. Capítulo 1

A. Knob, S.M. Beitel, D. Fortkamp, C.R.F. Terrasan, A.F. Almeida. Production, purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate. *Biomed Res. Int.* 2013 (2013) 1-8.

A. Sharma, V.V. Thakur, A. Shrivastava, R.K. Jain, R.M. Mathur, R. Gupta, R.C. Kuhad. Xylanase and laccase based enzymatic kraft pulp bleaching reduces adsorbable organic halogen (AOX) in bleach effluents: A pilot scale study. *Bioresour. Technol.* 169 (2014) 96-102.

A. Wiseman. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Ltd John Wiley & Sons, editors. 1975.

AM. Winger, J.L. Heazlewood, L.J. Chan, C.J. Petzold, K. Permaul, S. Singh. Secretome analysis of the thermophilic xylanase hyper-producer *Thermomyces lanuginosus* SSBP cultivated on corn cobs. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41 (2014) 1687-1696.

B.R. Goluguri, C. Thulluri, U. Addepally, P.R. Shetty. Novel alkali-thermostable xylanase from *Thielaviopsis basicola* (MTCC1467): Purification and kinetic characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* 82 (2016) 823-829.

C. Zhang, S.K. Kim. Application of marine microbial enzymes in the food and pharmaceutical industries. *Adv. Food Nutr. Res.* 65 (2012) 423-435.

D. Nath, M. Rao. pH dependent conformational and structural changes of xylanase from an alkalophilic *Bacillus* sp. (NCIM 59). *Enzyme Microb. Technol.* 28 (2001) 397-403.

D.H.A. Corrêa, C.H.I. Ramos The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *Afr. J. Biochem. Res.* 3 (2009) 164-173.

G.K. Goswami, R.R. Pathak. Microbial xylanases and their biomedical applications: a review. *Int. J. Basic Clin. Pharm.* 3 (2013) 237-246.

G.L. Miller. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(1959) 424-426.

H. Blum, H. Beier, H.J. Cross. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8 (1987) 93-99.

H. Xiong, A. Nyssölä, J. Jänis, O. Pastinen, N. Von Weymarn, M. Leisola, O. Turunen. Characterization of the xylanase produced by submerged cultivation of *Thermomyces lanuginosus* DSM 10635. *Enzyme Microb. Technol.* 35 (2004) 93-99.

- J. Beaugrand, G. Chambat, V.W. Wong, F. Goubet, C. Rémond, G Paës, S. Benamrouche, P Debeire, M. O'Donohue, B. Chabbert. Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans, *Carbohydr. Res.* 15 (2004) 2529-2540.
- J. Georis, F. de Lemos Esteves, J. Lamotte-Brasseur, V. Bougnet, B. Devreese, F. Giannotta, B. Granier, J.M. Frère. An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study. *Protein Sci.* 9 (2000) 466-475.
- J. Jia, W. Chen, H. Ma, K. Wang, C. Zhao. Use of a rhodamine-based bifunctional probe in N-terminal specific labeling of *Thermomyces lanuginosus* xylanase. *Mol. BioSyst.* 6 (2010) 1829-1933.
- J.G. Berrin, N. Juge. Factors affecting xylanase functionality in the degradation of arabinoxylans. *Biotechnol. Lett.* 30 (2008) 1139-1150.
- J.M. Corrêa, D. Christi, C.L.D. Torre, C. Henn, J.L. Conceição-Silva, M.K. Kadowaki, R.C.G. Simão. High levels of β -xilosidase in *Thermomyces lanuginosus*: potential use for saccharification. *Braz. J. Microbiol.* 47 (2016) 680-690.
- J.R. Lakowicz. Principles of Fluorescence Spectroscopy, third ed., USA, Springer, 2006.
- K. Khucharoenphaisan, S. Tokuyama, V. Kitpreechavanich. Characterization of the thermostability of xylanase produced by new isolates of *Thermomyces lanuginosus*. *Sci. Asia* 34 (2008) 187-192.
- K. Khucharoenphaisan, S. Tokuyama, V. Kitpreechavanich. Purification and characterization of a high-thermostable β -xylanase from newly isolated *Thermomyces lanuginosus* THKU-49. *Mycoscience* 51 (2010) 405-410.
- K. McPhillips, D.M. Waters, C. Parlet, D.J. Walsh, E.K. Arendt, P.G. Murray. Purification and characterisation of a β -1,4-xylanase from *Remersonia thermophila* CBS 540.69 and its application in bread making. *App. Biochem. Biotechnol.* 172 (2014) 1747-1762.
- K.S. Kumar, A. Manimaran, K. Permaul, S. Singh. Production of beta-xylanase by a *Thermomyces lanuginosus* MC 134 mutant on corn cobs and its application in biobleaching of bagasse pulp. *J. Biosci. Bioeng.* 107 (2009) 494-498.
- L.A.O. Silva, C.R.F. Terrasan, E.C. Carmona. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. *Eletron. J. Biotechnol.* 18 (2015) 307-313.
- M. Gaffney, S. Carberry, S. Doyle, R. Murphy. Purification and characterization of a xylanase from *Thermomyces lanuginosus* and its functional expression by *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Techol.* 45 (2009) 348-354.
- M. Sharma, A. Kumar. Xylanases: An overview. *Br. Biotechnol. J.* 3 (2013) 1-28.
- M.C. Damaso, M.S. Almeida, E. Kurtenbach, O.B. Martins, N.Jr. Pereira, C.M. Andrade, R.M. Albano. Optimized expression of a thermostable xylanase from

Thermomyces lanuginosus in *Pichia pastoris*. Appl. Environ. Microbiol. 69 (2003) 6064-6072.

M.M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254.

M.T. Murakami, R.K. Arni, D.S. Vieira, L. Degrève, R. Ruller, R.J. Ward. Correlation of temperature induced conformation change with optimum catalytic activity in the recombinant G/11 xylanase A from *Bacillus subtilis* strain 168 (1A1). FEBS Lett. 579 (2005) 6505-6510.

Ncbi. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Acesso em 23.12.16)

N. Sreerama, R.W. Woody. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. Anal. Biochem. 287 (2000) 252-260.

N. Sreerama, S.Y. Venyaminov, R.W. Woody. Analysis of protein circular dichroism spectra based on the tertiary structure classification. Anal. Biochem 299 (2001) 271-274.

N.A. Bennett, J. Ryan, P. Biely, M. Vrsanska, L. Kremnický, B.J. Macris, D. Kekos, P. Christakopoulos, P. Katapodis, M. Claeysens, W. Nerinckx, P. Ntauma, M.K. Bhat. Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Thermomyces lanuginosus* ATCC 46882. Carbohydr. Res 306 (1998) 445-455.

P. Biely, M. Vrsanská, M. Tenkanen, D. Kluepfel Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic proprieties. J. Biotechnol. 57 (1997) 151-166.

P.R. Heinen, C. Henn, R.M. Peralta, A. Bracht, R.C.G. Simão, J.L.C. Silva; M.L.T.M. Polizeli, M.K. Kadowaki. Xylanase from *Fusarium heterosporum*: Properties and influence of thiol compounds on xylanase activity. Afr. J. Biotechnol. 13 (2014) 1047-1055.

R.A. Silva-Lucca, S.S. Andrade, R.S. Ferreira, M.U. Sampaio, M.L. Oliva. Unfolding studies of the cysteine protease baupain, a papain-like enzyme from leaves of *Bauhinia forficata*: effect of pH, guanidine hydrochloride and temperature. Molecules 19 (2014) 233-246.

R.S. Ferreira, D. Zou, J.G. Ferreira, M.C.C. Silva, R.A. Silva-Lucca, R. Mentele, E.J. Paredes-Gamero, T.C. Bertolin, M.T.S. Correia, P.M.G. Paiva, A. Gustchina, A. Wlodawer, M.L.V. Oliva. Crystal structure of *Crataeva tapia* Bark protein (CrataBL) and its effect in human prostate cancer cell lines. PLoS One. 18 (2013) 1-14.

S. Shrivastava, P. Shukla, P.D. Deepalakshmi, K. Mukhopadhyay. Characterization, cloning and functional expression of novel xylanase from *Thermomyces lanuginosus* SS-8 isolated from self-heating plant wreckage material. World J. Microbiol. Biotechnol. 29 (2013) 2407-2415.

S.S. Kanwar, S. Devi. Thermostable xylanases of microbial origin: recent insights and biotechnological potential. IJBT. 1 (2012) 1-20.

S.Y. Venyaminov, J.T. Yang. Determination of protein secondary structure, in: G.D. Fasman (ed.), Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. New York, Springer US, 1996.

T. Collins, C. Gerday, G. Feller. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29 (2005) 3-23.

T.C. McIlvaine. A buffer solution for colorimetric comparison. *JBC* 49 (1921) 183-186.

U.K. Laemmli. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.

Uniprot. <http://www.uniprot.org/uniprot/O43097>, 2016 (Acesso em 23.12.16)

V. Juturu, J.C. Wu. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 1219-1227.

W. Qu, W. Shao. Cloning, expression and characterization of glycoside hydrolase family 11 endoxylanase from *Bacillus pumilus* ARA. *Biotechnol. Lett.* 33 (2011) 1407-1416.

X.T. Li, Z.Q. Jiang, L.T. Li, S.Q. Yang, W.Y. Feng, J.Y. Fan, I. Kusakabe. Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. *Bioresour. Technol.* 96 (2005) 1370-1379.

Z.Q. Jiang, S.Q. Yang, S.S. Tan, L.T. Li, X.T. Li. Characterization of a xylanase from the newly isolated thermophilic *Thermomyces lanuginosus* CAU44 and its application in bread making. *Lett. Appl. Microbiol.* 41 (2005) 69-76.