

ROBERTA RIBEIRO COURA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA β -XILOSIDASE DO
FUNGO FITOPATOGÊNICO *Ceratocystis fimbriata* RM 35**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

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

T

C858p
2012

Coura, Roberta Ribeiro, 1985-

Purificação e caracterização de uma β -xilosidase do fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata* RM 35 / Roberta Ribeiro Coura. – Viçosa, MG, 2012.
xii, 60f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Valéria Monteze Guimarães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 54-60

1. Xilosidase. 2. *Ceratocystis fimbriata*. 3. Enzimas de fungos. 4. Hemicelulose. 5. Xilana. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 572.792

ROBERTA RIBEIRO COURA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA β -XILOSIDASE DO
FUNGO FITOPATOGÊNICO *Ceratocystis fimbriata* RM 35**

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

APROVADA: 24 de fevereiro de 2012.

Daniel Luciano Falkoski

Juliana Rocha Lopes Soares Ramos

Valéria Monteze Guimarães
(Orientadora)

Dedico este trabalho

A Deus

Aos meus pais

Aos meus irmãos

Aos meus amigos

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ter concedido o dom da vida, por me permitir construir este trabalho e por estar sempre comigo nos momentos difíceis.

Ao meu pai, Roberto, pelo incentivo, pelos conselhos, e principalmente pelo exemplo de caráter.

À minha mãe, Nilce, pelo carinho, pela empolgação em todas as etapas da minha vida e por me ensinar a importância dos estudos.

Aos meus irmãos, Matheus e Marcela, que sempre me apoiaram e tiveram muita preocupação comigo. Muito obrigada pela confiança e pela amizade de vocês!

À Dane e ao Ciro, que estiveram sempre presente em todos os momentos da minha vida acadêmica. Muito obrigada pelo amor, pela atenção, pela paciência, por toda preocupação e incentivo!

Ao Lucas, João e Poeiras por estarem sempre por perto, com os conselhos mais sábios, por todo incentivo, pela preocupação e pela amizade.

As meninas da república, Déborah, Bruna, Moreninha, Júnia, Lorena e Lívia, por toda a participação, preocupação e torcida durante a realização deste trabalho.

À toda minha família que sempre está presente, me dá forças e me apoia em todas as minhas decisões. Principalmente à minha avó Eugênia, pelo carinho, preocupação e pelas orações.

Agradeço à minha professora e orientadora Valéria Monteze Guimarães, pela orientação na realização deste trabalho e na minha formação profissional, pelo apoio, pela paciência, pelo carinho, pelos conselhos e por sempre me incentivar a prosseguir com os experimentos.

Um agradecimento especial ao Daniel, pela enorme contribuição que deu neste trabalho. Muito obrigada pelos ensinamentos, por todas as críticas e valiosas sugestões apresentadas, por todo o incentivo, pela ajuda, pelo apoio, pela dedicação e pela confiança. Toda sua contribuição foi de fundamental importância por todos os conhecimentos que adquiri neste período do mestrado.

Ao professor Sebastião Tavares de Rezende, pela amizade, pelo carinho e pelos conhecimentos transmitidos durante esses anos, como professor e co-orientador.

A todos os demais professores pelos ensinamentos, que contribuíram para minha formação profissional.

À Marcele, pelo tempo dedicado a este trabalho e pela amizade que acabamos construindo. Muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Bioquímica, Enzimologia Aplicada e Análises Bioquímicas, onde a maior parte deste experimento foi realizada. Obrigada a vocês todos por toda ajuda!

Também agradeço ao Professor Acelino Couto Alfnas do Laboratorio de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta Patógeno (BIOAGRO - UFV), do departamento de Fitotecnia por ter gentilmente cedido a linhagem do fungo *Ceratocystis fimbriata* RM 35 para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, especialmente ao secretário Eduardo Pereira Monteiro, pela atenção, pela amizade e por literalmente me salvar em várias ocasiões.

A todos os meus amigos que mesmo distantes estiveram sempre presentes, em especial Mara, Jocarstea, Francielly e Fernanda. Meninas, muito obrigada pela força!

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo suporte técnico concedido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, agradeço a todos aqueles que passaram pela minha vida e contribuíram para que eu pudesse crescer como pessoa! Mais uma vez, muito obrigada!

BIOGRAFIA

Roberta Ribeiro Coura, filha de Antônio Roberto Coura e Nilce Aparecida Ribeiro Coura, nasceu na cidade de Timóteo, Minas Gerais, em 9 de abril de 1985.

Em março de 2005 iniciou seus estudos em Bioquímica, pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em janeiro de 2010, graduou-se em Bacharel em Bioquímica, pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

Em março de 2010, iniciou o Curso de Mestrado em Bioquímica Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae*, no dia 24 de fevereiro de 2012, com a defesa de dissertação.

SUMÁRIO

Página

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivos Gerais	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1. As enzimas hemicelulases	5
3.2. Hemicelulases microbianas	8
3.3. β -xilosidases.....	9
3.4. Considerações gerais sobre o fungo <i>Ceratocystis fimbriata</i>	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Reagentes	13
4.2. Microrganismo	13
4.3. Manutenção da cultura	13
4.4. Meio de cultura, fonte de carbono e tempo para produção de β -xilosidases por <i>Ceratocystis fimbriata</i> RM 35.....	14
4.5. Cultivo de <i>Ceratocystis fimbriata</i> RM 35 e produção das β -xilosidases	14
4.6. Determinação da atividade da β -xilosidase	14
4.6.1. Com os substratos sintéticos.....	14
4.6.2. Com açúcares não redutores.....	14
4.7. Purificação das β -xilosidases	16
4.7.1. Cromatografia de troca aniônica DEAE-Sepharose	16
4.7.2. Ultrafiltração	17
4.7.3. Cromatografia de filtração em gel	17
4.7.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturantes – Gel nativo.....	17
4.7.4.1. Preparo do gel – Gel nativo	18
4.7.4.2. Preparo da amostra	18
4.7.4.3. Condições utilizadas durante a eletroforese	18

4.7.4.4. Localização e identificação da banda protéica contendo atividade de β -xilosidase	19
4.7.4.5. Extração da β -xilosidase do gel	19
4.8. Determinação da concentração de proteína nos extratos enzimáticos.....	20
4.9. Determinação do grau de pureza da enzima β -xilosidase	21
4.9.1. Eletroforese	21
4.9.2. Coloração dos géis de eletroforese	22
4.10. Determinação da massa molecular	22
4.10.1. Por eletroforese	22
4.10.2. Por cromatografia de filtração em gel.....	23
4.11. Caracterização enzimática	23
4.11.1. Efeito do pH	23
4.11.2. Efeito do pH na estabilidade e atividade da β -xilosidase.....	24
4.11.3. Efeito da temperatura.....	24
4.11.4. Análise da termoestabilidade.....	24
4.11.5. Determinação das constantes de Michaelis-Menten (K_M) e das velocidades máximas (V_{max})	24
4.11.6. Determinação da especificidade da β -xilosidase para diversos substratos	25
4.11.7. Efeitos de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da β -xilosidase	25
4.11.8. Determinação da constante de inibição (K_i) da β -xilosidase por xilose.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1. Purificação e Caracterização da β -xilosidase extracelular de <i>Ceratocystis fimbriata</i> RM 35	27
5.1.1. Purificação da β -xilosidase extracelular de <i>Ceratocystis fimbriata</i> RM 35	28
5.1.2. Determinação do grau de pureza e da massa molecular da β -xilosidase de <i>Ceratocystis fimbriata</i> RM 35	32
5.1.3. Determinação do tempo de ensaio para a hidrólise do p-NP- β Xil pela β -xilosidase de <i>Ceratocystis fimbriata</i> RM 35	36

5.1.4. Caracterização enzimática	38
5.1.4.1. Efeito do pH	38
5.1.4.2. Efeito da temperatura	41
5.1.4.3. Análise da termoestabilidade	42
5.1.4.4. Constante de Michaelis-Menten (KM) e veocidade máxima (Vmax)	43
5.1.4.5. Especificidade da β -xilosidase extracelular purificada de <i>Ceratocystis fimbriata</i> RM 35	45
5.1.4.6. Efeitos dos íons e açúcares na atividade da β - xilosidase extracelular purificada de <i>Ceratocystis</i> <i>fimbriata</i> RM 35	47
5.1.4.7. Determinação da constante de inibição (Ki) da enzima β -xilosidase extracelular de <i>Ceratocystis</i> <i>fimbriata</i> RM 35	49
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

RESUMO

COURA, Roberta Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Purificação e caracterização de uma β -xilosidase do fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata* RM 35.** Orientadora: Valéria Monteze Guimarães. Coorientador: Sebastião Tavares de Rezende.

Os objetivos deste trabalho foram cultivar o fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata* RM 35 para produção de β -xilosidases, purificar e caracterizar esta enzima, visando sua aplicação em processos industriais de branqueamento de polpa de celulose, produção de biocombustíveis, e na produção de xilitol, utilizado na indústria alimentícia e na área odontológica e médica. Para produção da β -xilosidase extracelular, o fungo foi cultivado por 168 h em meio mineral contendo farelo de trigo como fonte de carbono. Após este período, o meio foi filtrado, centrifugado e utilizado como fonte de enzimas β -xilosidases. A enzima foi purificada por cromatografias de troca iônica, filtração em gel e eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições não desnaturante. Ao final do processo de purificação, a β -xilosidase apresentou um fator de purificação de 18,29 vezes, com um rendimento de 22,5 %. A massa molecular da enzima foi de aproximadamente 161,6 kDa, quando estimada por SDS-PAGE, e de aproximadamente 204,2 kDa, quando estimada por filtração em gel. A enzima apresentou atividade máxima em pH 3,9 e na temperatura de 65 °C, sendo estável na temperatura de 60 °C por 24h. Os valores de K_M e V_{max} , utilizando o substrato p -NP- β Xil, foram 0,326 mM e $0,91 \times 10^{-3}$ mM/min, respectivamente. A enzima apresentou atividade muito reduzida com o substrato sintético p -nitrofenil- β -glicopiranosídeo. A atividade enzimática foi parcialmente inibida por sulfato de cobre II, cloreto de alumínio III, SDS e xilose, todos nas concentrações finais de 1 e 10 mM. *C. fimbriata* é um fungo fitopatogênico e encontrada causando doenças em diversas culturas de grande valor econômico. Assim, a caracterização bioquímica e cinética de β -xilosidase, e a avaliação dos potenciais para aplicação dessas enzimas, pode ser uma alternativa promissora e econômica para melhorar a qualidade de processos industriais da produção de xilitol, do branqueamento de polpa de celulose e da produção de biocombustíveis, além de um passo

importante na elucidação da interação planta-patógeno, no desenvolvimento da doença causada por este fungo.

ABSTRACT

COURA, Roberta Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Purification and characterization of a β -xylosidase from the phytopathogenic fungus *Ceratocystis fimbriata* RM 35.** Adviser: Valéria Monteze Guimarães. Co-adviser: Sebastião Tavares de Rezende.

The objectives were to cultivate the plant pathogenic fungus *Ceratocystis fimbriata* RM 35 for the production of β -xylosidases, purify and characterize this enzyme, for their application in industrial bleaching of cellulose pulp, biofuel production and production of xylitol, used in the food industry and industrial and medical. For production of extracellular β -xylosidase, the fungus was grown for 168 h in mineral medium containing wheat bran as carbon source. After this period, the medium was filtered, centrifuged and used as a source of β -xylosidases enzymes. The enzyme was purified by ion exchange chromatography, gel filtration and polyacrylamide gel electrophoresis under nondenaturing conditions. At the end of the purification process, the β -xylosidase showed a purification factor of 18.29 fold with a yield of 22.5 %. The molecular weight of the enzyme was approximately 161.6 kDa, as estimated by SDS-PAGE, and about 204.2 kDa, as estimated by gel filtration. The enzyme showed maximum activity at pH 3.9 and temperature 65 ° C and was stable at 60 ° C for 24h. The K_M and V_{max} values, using the substrate p-NP- β Xil were 0.326 mM to 0.91×10^{-3} mM/min, respectively. The enzyme showed very low activity with the synthetic substrate p-nitrophenyl- β -glucopyranoside. The enzymatic activity was partially inhibited by copper II sulfate, aluminum chloride III SDS and xylose, all final concentrations of 1 and 10 mM. *C. fimbriata* is a plant pathogenic fungus causing disease and found in various cultures of high economic value. Thus, the biochemical and kinetic characterization of β -xylosidase, and assessment of potential for application of these enzymes may be a promising and cost to improve the quality of industrial processes for the production of xylitol of bleaching of cellulose pulp and the production of biofuels, and an important step in the elucidation of plant-pathogen interaction in the development of disease caused by this fungus.

1. INTRODUÇÃO

As xilanases, enzimas constituídas de endoxilanase e β -xilosidase, desempenham um papel importante nas reações de hidrólise da xilana, que é o principal componente da fração hemicelulósica de biomassas lignocelulósicas (Zhou et al, 2011). Este complexo enzimático tem potencial para aplicação em diferentes setores industriais, principalmente na etapa de pré-branqueamento da polpa Kraft na indústria de papel e celulose e na sacarificação da hemicelulose para produção de biocombustíveis (Sunna e Antrankian, 1997). Atenção especial tem sido dada ao uso das β -xilosidases, devido à sua importância biológica, como nas reações de transxilosilação para a síntese de β -xilósídeos (Pan et al., 2001), na completa degradação de subprodutos hemicelulolíticos da biomassa para produção de biocombustíveis (Balat et al., 2008) e na produção de xilitol, utilizado na indústria alimentícia e na área odontológica e médica, como tratamento e prevenção de doenças (Mussatto et al., 2002).

As β -xilosidases (EC 3.2.1.37) são exo glicosidases que removem sucessivamente resíduos de β -1,4-xilosil na região terminal não redutora de xilobiose e xilo-oligossacarídeos, função essencial em muitos processos biológicos. Estas enzimas são alvo de grande interesse para a bioquímica e biotecnologia. As funções postuladas para a β -xilosidase juntamente com outras hemicelulases são diversas: resíduos lignocelulósicos podem ser hidrolisados enzimaticamente e convertidos em aditivos alimentares (Moure et al., 2006), em biocombustíveis, produtos químicos, ou serem utilizados como fontes alternativas de energia (Howard et al., 2003). Também deve ser destacada a utilização dessas enzimas em processos para produção do álcool combustível e do 2,3-butenodiol (Saha, 2003a), além de serem utilizadas no pré-tratamento da forragem fornecida a ruminantes, promovendo aumento na qualidade nutritiva e resultando num ganho de peso superior a 35 % (Beauchemin et al., 1995).

As β -xilosidases podem ser obtidas do intestino de humanos (Shin et al., 2003), intestino de insetos (Mattéotti, 2009) e a partir de micro-

organismos. A enzima tem sido produzida por bactérias (Zhou et al., 2011; Kim et al., 2010), fungos (Wakiyama et al., 2008; Somera et al., 2009) e leveduras recombinantes (La Grange et al., 2001).

Ultimamente, as indústrias têm utilizado enzimas isoladas de micro-organismos para obtenção de vários produtos. A demanda para tais enzimas é elevada porque são específicas e não produzem resíduos tóxicos (Tortora et al., 2005). Os micro-organismos têm a vantagem de alta produção de enzimas e, assim, há um grande interesse por β -xilosidases de fungos, com a finalidade de aplicação em processos industriais. O aumento na utilização de enzimas é provocado principalmente pela tendência mundial de substituição de processos industriais já estabelecidos por novos, especialmente biotecnológicos, mais específicos, de menor custo energético e menos agressivos ao ambiente.

Ceratocystis fimbriata é uma espécie de fungo fitopatogênico, amplamente encontrado em diversos ambientes, principalmente atacando culturas em ambientes de clima tropical (Ferreira et al., 2006). Os fungos são dispersos por insetos patogênicos de madeira, infecta seus hospedeiros através das feridas e causa nestas plantas uma doença denominada murcha-de-ceratocystis, uma enfermidade que afeta a cultura e causa perdas significativas na produção de eucalipto (Alfenas et al, 2004). Um dos desafios que envolvem a patologia de plantas é determinar as bases moleculares que relacionam a patogenicidade do fungo em relação à planta hospedeira. Como as hemicelulases estão envolvidas no processo de degradação da parede celular das plantas, as β -xilosidases, secretadas pelo fungo, podem participar do fenômeno patogênico. Assim, a caracterização bioquímica e estrutural de moléculas possivelmente envolvidas na interação fungo-hospedeiro é de grande importância para a compreensão dos eventos iniciais que levam ao desenvolvimento da doença.

Assim, a caracterização bioquímica e cinética de β -xilosidases extracelulares produzidas pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* RM 35, e a avaliação dos potenciais de aplicações dessas enzimas, pode ser uma alternativa promissora e econômica para melhorar a qualidade de processos

industriais do branqueamento de polpa de celulose e da produção de biocombustíveis, além de um passo importante na elucidação da interação planta-patógeno, no desenvolvimento da doença causada por este fungo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar uma β -xilosidase extracelular produzida pelo fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata* RM 35, visando sua aplicação em processos industriais na produção de xilitol, do branqueamento de polpa de celulose e produção de biocombustíveis.

2.2. Objetivos Específicos

- Produzir a β -xilosidase a partir do cultivo do fungo *Ceratocystis fimbriata* RM 35 em condições pré-estabelecidas;
- Isolar e purificar as β -xilosidases obtidas;
- Caracterizar, bioquímica e cineticamente, a enzima purificada: efeitos de pH, temperatura, termoestabilidade, estabilidade em diferentes valores de pH, efeito de íons e outros compostos na atividade enzimática, determinação da especificidade da enzima por diferentes substratos sintéticos e determinação dos valores de K_M , V_{max} e K_i ;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. As enzimas hemicelulases

As hemicelulases são componentes-chave na degradação da biomassa vegetal e no fluxo de carbono na natureza. Os substratos dessas enzimas, as hemiceluloses, são formados por um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados e lineares que são ligados através de ligações de hidrogênio, formando uma robusta rede de microfibrilas na parede celular das plantas. Hemiceluloses estão também covalentemente ligadas à lignina e celulose, formando uma estrutura altamente complexa (Shallom e Shoham, 2003).

A degradação da celulose e da hemicelulose é realizada por micro-organismos que podem ser encontrados tanto livres na natureza, quanto como parte do trato digestivo de animais superiores. A estrutura variável e organização da hemicelulose requer uma ação conjunta de muitas enzimas para a sua completa degradação. Em alguns nichos, este processo é muito lento devido à estrutura rígida e insolúvel da parede celular da planta, e à disponibilidade limitada de micro-organismos celulolíticos e hemicelulolíticos eficientes. Grande parte desse polímero ou é insolúvel, ou está intimamente associado com a matriz insolúvel da celulose. Muitas hemicelulases são proteínas modulares e, além dos domínios catalíticos, incluem outros módulos funcionais (Shoham et al, 1999). Os módulos de ligação aos carboidratos facilitam o direcionamento das enzimas para os polissacarídeos insolúveis, e os módulos doquerinas, medeiam a ligação dos domínios catalíticos via interação coesina-doquerina, seja para superfície da célula microbiana ou a grandes complexos enzimáticos, como o celulosoma (Henrissat e Davies, 2000).

As hemicelulases são classificadas pelas famílias das glicosídeos hidrolases (GHs), que hidrolisam ligações glicosídicas, e das carboidratos esterases (EC), que hidrolisam ligações éster de acetato ou grupos ácido ferúlico. Estes grupos enzimáticos se baseiam na homologia da sequência primária aminoacídica e podem ser designados por número dentro de

famílias. Algumas famílias, com dobramento global semelhante da molécula protéica, podem ainda ser agrupadas em clãs, marcadas em ordem alfabética (Shallom e Shoham, 2003). As várias ligações químicas hidrolisadas por hemicelulases são mostradas na Figura 1.

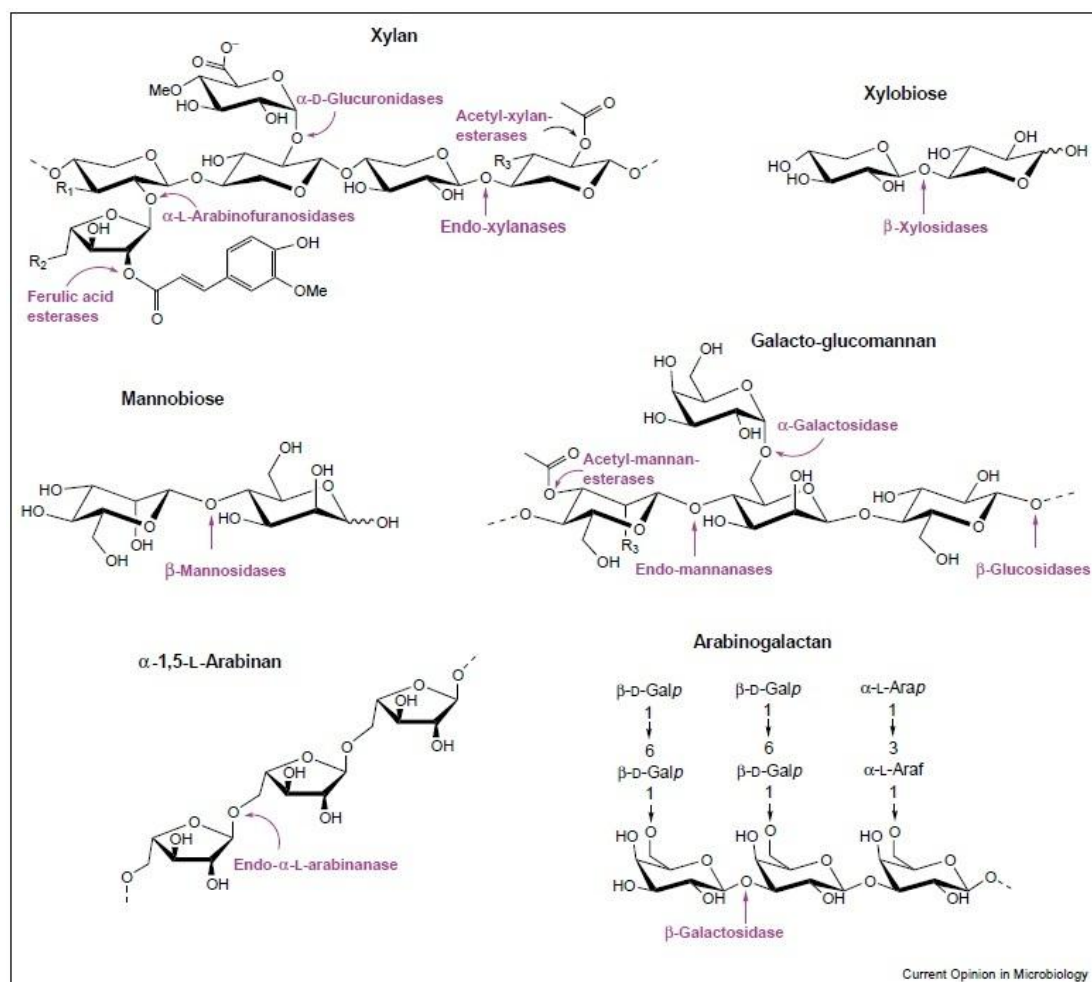


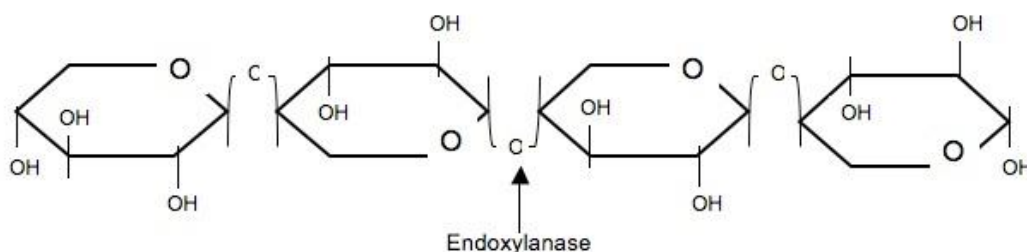
Figura 1. Os componentes básicos estruturais encontrados na hemicelulose e as hemicelulases responsáveis pela respectiva degradação. Me, metil; R_1 , OH ou grupo arabinofuranosil; R_2 , OH ou ácido ferúlico; R_3 , OH ou grupo acetil (Shallom e Shoham, 2003).

A xilana é o principal componente dos polissacarídeos presentes nos tecidos vegetais, depois da celulose. Consiste em uma cadeia de homopolímero de resíduos 1,4- β -D-xilopiranosose, apresentando substituições por vários grupos com ligações (1,2)- ou (1,3)- α -L-arabinofuranosil, α -D-ácido glicurônico, ligações de grupos acetato esterificados nas posições O-2- e/ou O-3, substituições fenólicas de p-ácido cumárico e de ácido ferúlico e

outros grupos substituintes dependendo da fonte de biomassa (Zhou et al., 2011). A abundância e os vários tipos dessas substituições variam entre xilanas de diferentes fontes (Shallom e Shoham, 2003).

A completa degradação da hemicelulose requer a ação combinada de várias hemicelulases, incluindo enzimas de degradação das ligações do polissacarídeo, como endoxilanases (EC 3.2.1.8), β -xilosidases (EC 3.2.1.37), glicuronoxilana hidrolases (EC 3.2.1.136) e enzimas capazes de hidrolisar as ligações de grupos substituintes ligados a xilana, como as α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72), feruloil esterases (EC 3.1.1.73) α -glucuronidases (EC 3.2.1.39) e outras enzimas acessórias (Zhou et al., 2011). As principais enzimas de degradação da xilana são as β -1,4-endoxilanases, que clivam as ligações glicosídicas internas da cadeia do polissacarídeo, resultando em um menor nível de polimerização da cadeia, e a enzima β -D-xilosidase, que hidrolisa os curtos xilo-oligossacarídeos e xilobiose em xilose (Michelin et al., 2010). Estas enzimas estão representadas na Figura 2.

A



B

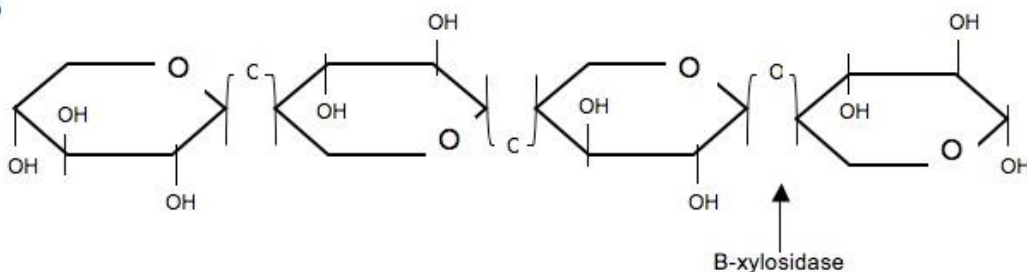


Figura 2. Ponto de clivagem da xilana por (A) endoxilanase e (B) β -xilosidase. (Goldman, 2009).

3.2. Hemicelulases microbianas

A degradação da hemicelulose impõe vários desafios intrínsecos para os micro-organismos, devido ao polímero ser de alto peso molecular, insolúvel e associado com celulose e/ou lignina. A hemicelulose é também altamente variável em relação a sua estrutura, e embora o número real de diferentes ligações químicas seja limitado, podem estar presentes em diferentes ambientes estruturais. A degradação eficiente do polímero requer a ação conjunta das várias hemicelulases que trabalham sinergicamente. A hidrólise desses polissacarídeos por micro-organismos ocorre fora das células, assim, as células microbianas precisam de um mecanismo para detectar a presença do polímero e induzir a expressão das enzimas correspondentes. Considerando todos estes desafios juntos, a natureza proporcionou uma variedade espetacular de estruturas modulares e estratégias fisiológicas diferentes para degradar a parede celular vegetal (Shallom e Shoham, 2003).

As diferentes estratégias tomadas pelo mundo microbiano podem ser divididas em três tipos gerais:

- Fungos aeróbicos, tais como *Trichoderma* e *Aspergillus*, secretam em altas concentrações uma grande variedade de celulasas e hemicelulasas que trabalham em sinergia. Este conjunto de enzimas degradam os polímeros em monossacarídeos ou dissacarídeos que podem ser utilizados pelos micro-organismos (Vries e Visser, 2001).
- Bactérias aeróbicas, tais como *Bacilli* e *Cellvibrio*, secretam um número moderado de enzimas que degradam o polissacarídeo, e produzem um número relativamente grande de produtos oligossacarídeos. A quebra completa desses oligossacarídeos é realizada pelas enzimas intracelulares ou associada às células (Beylot et al., 2001; Shulami et al., 1999). Esta última estratégia, tem a vantagem de que os produtos da degradação extracelular não são facilmente disponíveis para micro-organismos competidores não-hemicelulolíticos.

- Finalmente, bactérias anaeróbicas, tais como a Clostridia, evoluíram para um único complexo multi-enzimático, o celulosoma, que integra muitas enzimas celulolíticas e hemicelulíticas (Kosugi et al., 2002). Entender o arranjo celulosoma do *Clostridium thermocellum* com novos domínios estruturais catalíticos em torno de um único domínio estrutural peptídico não catalítico está sendo um desafio.

3.3. β -Xilosidases

As β -xilosidases são exo glicosidases que removem sucessivamente resíduos de β -xilosil na região terminal não redutora de xilobiose e xilo-oligossacarídeos, processo essencial para aliviar a inibição pelo produto final das endoxilanases, durante a hidrólise completa da xilana. As β -xilosidases são atualmente classificadas dentro de sete famílias (família GH 3, 28, 30, 39, 43, 52 e 54) e suas reações procedem via inversão (família GH 43) ou via retenção (família GH 3, 28, 30, 39, 52 e 54) do mecanismo de configuração estereoquímica do carbono anomérico. (Zhou et al, 2011; Shallom e Shoham, 2003).

Com base nas semelhanças nos dobramentos da molécula protéica, a família GH 43 é classificada como parte do clã GH-F, juntamente com a família GH 52, que compartilham um domínio catalítico composto de cinco estruturas β -hélice (Henrissat et al., 1995). A família GH 43 das β -xilosidases não exibem atividade transglicosilação mesmo quando submetidas a condições de alta concentração de substrato, e a maior queda da eficiência catalítica das xilosidases está contida nesta família (Jordan e Li, 2007). As glicosídeo hidrolases da família 30 são enzimas do clã GH-A que utilizam o mecanismo de retenção. As atividades enzimáticas atualmente atribuídas à família GH 30 incluem glicosilceramidase (EC 3.2.1.45), β -glicosidase (EC 3.2.1.21), β -xilosidase (EC 3.2.1.37) e endo- β -1,6-glucanase (EC 3.2.1.75) (St John et al., 2010).

As moléculas D-xilopirranose e L-arabinofuranose são espacialmente similares, de tal forma que as ligações glicosídicas e os grupos hidroxilas podem ser sobrepostos, assim a atividade bifuncional da β -D-xilosidase/ α -L-arabinofuranosidase pode ser maior que a atividade de β -xilosidase (Zhou et

al, 2011; Jordan e Li, 2007). A enzima arabinofuranosidase remove as unidades arabinofuranosil da molécula de xilana, facilitando assim a atividade hidrolítica das endoxilanases. A capacidade bifuncional da xilosidase/arabinofuranosidase auxilia na hidrólise completa da hemicelulose (Wagschal et al., 2009a).

Entre estas enzimas, a atividade da endoxilanase e da β -xilosidase têm uma importância maior na degradação da xilana. As endoxilanases degradam a xilana em xilo-oligossacarídeos por ataque das ligações xilosídicas internas na estrutura do polissacarídeo e, subsequentemente, a β -xilosidase hidrolisa a xilobiose e xilo-oligossacarídeos curtos em D-xilose. A xilose é considerada um importante açúcar fermentativo para a produção de produtos de valor, incluindo xilitol, xilulose e etanol (Zhang e Lynd, 2010; Kim e Yoon, 2010).

As β -xilosidases são, portanto, importantes para a degradação completa da xilana e são produzidas por uma variedade de fungos e bactérias. Com algumas exceções (Kim e Yoon, 2010), a maioria das β -xilosidases de bactérias são intracelulares, enquanto essas enzimas de fungos são ligadas a células ou extracelular. Estas enzimas podem possuir componentes monoméricos (Lee e Zeikus, 1993; Tsujibo et al., 2001), diméricos (Contreras et al., 2008; shao e Wiegel, 1992) ou tetraméricos (Sakka et al., 1993). As β -xilosidases têm sido intensamente estudadas em relação às suas estruturas e seus resíduos catalíticos a partir de *Selenomonas ruminantium* (Jordan et al., 2007) e *Geobacillus stearothermophilus* (Brux et al., 2006), enquanto que várias enzimas foram purificadas e caracterizadas a partir de *Bacillus* (Lama et al., 2004), *Clostridium* (Sakka et al., 1993), *Geobacillus* (Wagschal et al., 2009b), *Streptomyces* (Tsujibo et al., 2001), *Thermoanaerobacter* (Shao e Wiegel, 1992), *Thermoanaerobacterium* (Lee e Zeikus, 1993) e *Thermotoga* (Xue e Shao, 2004).

3.4. Considerações gerais sobre o fungo *Ceratocystis fimbriata*

Os fungos do gênero *Ceratocystis* são organismos hemibiotróficos, que vivem no solo e na matéria orgânica (Ferreira et al., 2006) e são

dispersos por insetos patogênicos de madeira de plantas, infectando seus hospedeiros através das feridas. O *Ceratocystis fimbriata* Ellis e Halsted causa nas plantas uma doença denominada murcha-de-ceratocystis, uma enfermidade que afeta a cultura e causa perdas significativas na produção (Alfenas et al, 2004). Esta doença é de grande importância devido à sua natureza letal, ampla distribuição geográfica, variada gama de hospedeiros e variabilidade genética na população do patógeno (Alfenas e Guimarães, 2007).

O *Ceratocystis fimbriata* é notável por sua ampla gama de hospedeiros, apresentando pelo menos 31 espécies de plantas de 14 famílias confirmadas (Johnson et al., 2005). Entre os hospedeiros de *Ceratocystis fimbriata* estão incluídos espécies arbóreas, como eucalipto (*Eucalyptus spp.*), mangueira (*Mangifera indica*), cacaueteiro (*Theobroma cacao*), cafeeiro (*Coffea arábica*), seringueira (*Hevea brasiliensis*), plátano (*Platanus spp.*), acácia (*Acacia spp*) e fícus (*Ficus carica*) (Baker et al., 2003) e plantas não lenhosas como *Colocasia esculenta* (taro) e *Ipomoea batata* (batata doce), a partir do qual as espécies foram originalmente descritas (Halsted, 1890). A faixa geográfica e diversidade genética de *C. fimbriata* são igualmente impressionantes, embora a maioria da diversidade das espécies seja encontrada nas Américas (Baker et al., 2003; Barnes et al., 2001; Harrington, 2000).

No Brasil, este fungo foi relatado pela primeira vez causando murcha e morte de plantas de *Eucalyptus spp.* no sudeste do Estado da Bahia, em 1997 (Ferreira et al., 1999). Em plantas lenhosas, *C. fimbriata* é típico patógeno de xilema, cujo sintoma marcador é constatável nas secções transversais de órgãos lenhosos, na forma de estrias radiais escuras, da medula para o exterior do lenho, ou da periferia do lenho para a medula (Ferreira et al., 2006). O patógeno penetra na planta por ferimentos nos troncos e pelo contato das raízes, atingindo o coleto e tronco via parênquima medular, de onde, em diversas alturas, surgem estrias escuras. Estas estrias progridem, via parênquima radial, matando uma porção de câmbio vascular, do floema e da feloderme, resultando numa lesão longitudinal externamente

no tronco, contínua ou descontínua, levando à murcha e ao secamento da planta (Ferreira et al., 2006).

Webster e Butler (1967) concluíram que a infertilidade e falta de diferenças morfológicas impede o reconhecimento de novas espécies dentro de *C. fimbriata*, mas as sequências de regiões espaçadoras de transcritos internos (ITS) do DNA ribossômico nuclear e outras análises genéticas mostram que existem vários subgrupos ou clades dentro de *C. fimbriata* (Harrington, 2000). Um destes principais clades parece estar centrado na América Latina, onde *C. fimbriata* infecta inúmeros hospedeiros nativos e não nativos.

Um dos desafios que envolvem a patologia de plantas é determinar as bases moleculares que relacionam a patogenicidade do fungo na planta hospedeira. Algumas moléculas protéicas foram estudadas (Oguni et al., 1974), como a ceratoplatanina, uma proteína moderadamente hidrofóbica localizada na parede celular do fungo ascomiceto *Ceratocystis fimbriata*, que participa dos fenômenos fitopatológicos e de reações imunológicas (Oliveira, 2008). Como as hemicelulases estão envolvidas no processo de degradação da parede celular das plantas, as β -xilosidases secretadas pelo fungo podem participar do fenômeno patogênico. Assim, a caracterização bioquímica e estrutural de moléculas possivelmente envolvidas na interação fungo-hospedeiro é de grande importância para a compreensão dos eventos iniciais que levam ao desenvolvimento da doença.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Enzimologia Aplicada e Tecnologia Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, e no Laboratório de Análises Bioquímicas do BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

4.1. Reagentes

Os reagentes xilose, arabinose, frutose, glicose, xilana oat spelt, xilana birchwood, ρ -nitrofenol (ρ NP), ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ NP β Glc), ρ -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (ρ NP α Glc), ρ -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (ρ NP α Gal), ρ -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ρ NP β Gal), ρ -nitrofenil- α -D-manopiranosídeo (ρ NP α Man), ρ -nitrofenil- β -D-manopiranosídeo (ρ NP β Man), ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (ρ NP β Xyl), ρ -nitrofenil- α -D-arabinopiranosídeo (ρ NP α Ara) e CuSO₄ foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

As resinas DEAE-Sepharose, Sephacryl S-300 e Sephacryl S-200 foram obtidas da GE Healthcare (Uppsala, Sweden).

Os demais reagentes utilizados para a execução deste trabalho apresentam procedência e grau de pureza analíticos.

4.2. Microrganismo

A linhagem de *Ceratocystis fimbriata* RM 35 pertence à coleção de fungos do Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta Patógeno- BIOAGRO - UFV.

4.3. Manutenção da cultura

O fungo mantido em estoque de glicerol e NaCl 0,85%, foi ativado em meio BDA sólido (39 g/L de BDA), e incubado em câmara de crescimento por 7 dias a 28 °C. As placas foram mantidas a 4 °C e este estoque foi repicado e utilizado para padronização do inóculo.

4.4. Meio de cultura, fonte de carbono e tempo para produção de β -xilosidases por *Ceratocystis fimbriata* RM 35

O meio de cultura utilizado para o crescimento do fungo *C. fimbriata* foi Meio mineral (MME) com extrato de levedura: contém, por litro de água destilada, 1,5 g de KH_2PO_4 , 1,0 g de NO_3NH_4 , 0,2 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,004 g de MnSO_4 , 0,003 g de FeSO_4 , 0,005 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,5 g de extrato de levedura.

A fonte de carbono utilizado foi farelo de trigo, na concentração de 1,5 % (p/v). O tempo de incubação pré-estabelecido no Laboratório de Análises Bioquímicas (BIOAGRO) para produção das β -xilosidases por *Ceratocystis fimbriata* RM 35 foi de 7 dias (Dados não mostrados).

4.5. Cultivo de *Ceratocystis fimbriata* RM 35 e produção das β -xilosidases

O fungo *C. fimbriata* mantido em placas a 4 °C foi ativado em placas de BDA e incubadas por 7 dias, a 28 °C. Após este período, discos da cultura do fungo foram inoculados em meio MME líquido com farelo de trigo como fonte de carbono, em erlenmeyers de 500 mL e incubada em B.O.D., a 180 rpm, por 7 dias, a 28 °C. Após este período de incubação, a cultura foi filtrada em filtro de pano e, posteriormente, centrifugada a 15.300 g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado como fonte da enzima β -xilosidase extracelular.

4.6. Determinação da atividade de β -xilosidase

4.6.1. Com os substratos sintéticos

Para o ensaio da atividade da β -xilosidase de *C. fimbriata* foi utilizado os substratos sintéticos $p\text{NP}\beta\text{Xil}$ (4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo), $p\text{NP}\alpha\text{Glc}$ (p -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo), $p\text{NP}\beta\text{Glc}$ (p -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo), $p\text{NP}\alpha\text{Gal}$ (p -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo), $p\text{NP}\beta\text{Gal}$ (p -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo), $p\text{NP}\alpha\text{Man}$ (p -nitrofenil- α -D-

manopiranosídeo), ρ NP β Man (ρ -nitrofenil- β -D-manopiranosídeo), ρ NP α Ara (ρ -nitrofenil- α -D-arabinopiranosídeo),. A mistura de reação continha 275-375 μ L de tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 4,5, 125 μ L de solução sintético 4 mM e 0 - 100 μ L do extrato enzimático. As reações foram conduzidas por 10 min, em banho-maria a 50 °C, e interrompidas pela adição de 500 μ L de solução de Na₂CO₃ 0,5 M. Os valores de absorbância obtidos a 410 nm foram transformados em μ moles de ρ NP, utilizando uma curva padrão obtida com 0 - 0,2 μ moles de ρ NP a partir de uma solução estoque de concentração 2 μ moles/mL.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de ρ NP por minuto, nas condições de ensaio.

4.6.2. Com açúcares não-redutores

Para os ensaios com os substratos xilana Oat Spelts e xilana Birchwood, a atividade da β -xilosidase foi determinada medindo-se a quantidade de açúcar redutor produzida com o uso do reagente dinitrossalicilato (DNS) pelo método de Miller (1956). A mistura de reação continha 100 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 350 μ L de solução de substrato xilana Oat Spelts ou Birchwood (1,0 %). O ensaio foi conduzido por 60 min a 50 °C. Após este período, foi adicionado 0,5 mL do reagente DNS e 1,0 mL de água, as amostras foram fervidas por 5 min e deixadas em repouso por 10 min a temperatura ambiente. Os valores de absorbância obtidos a 540 nm foram transformados em μ moles de glicose, utilizando uma curva padrão construída com 0-2 μ moles de glicose, a partir de uma solução estoque de concentração 2 mg/mL.

A unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de açúcar redutor por min, nas condições do ensaio.

4.7. Purificação da β -xilosidase

A β -xilosidase de *C. fimbriata* RM 35 foi purificada de acordo com o processo representado no fluxograma abaixo (Figura 3). Cada uma destas etapas está descrita nas seções 4.6.1 a 4.6.5.

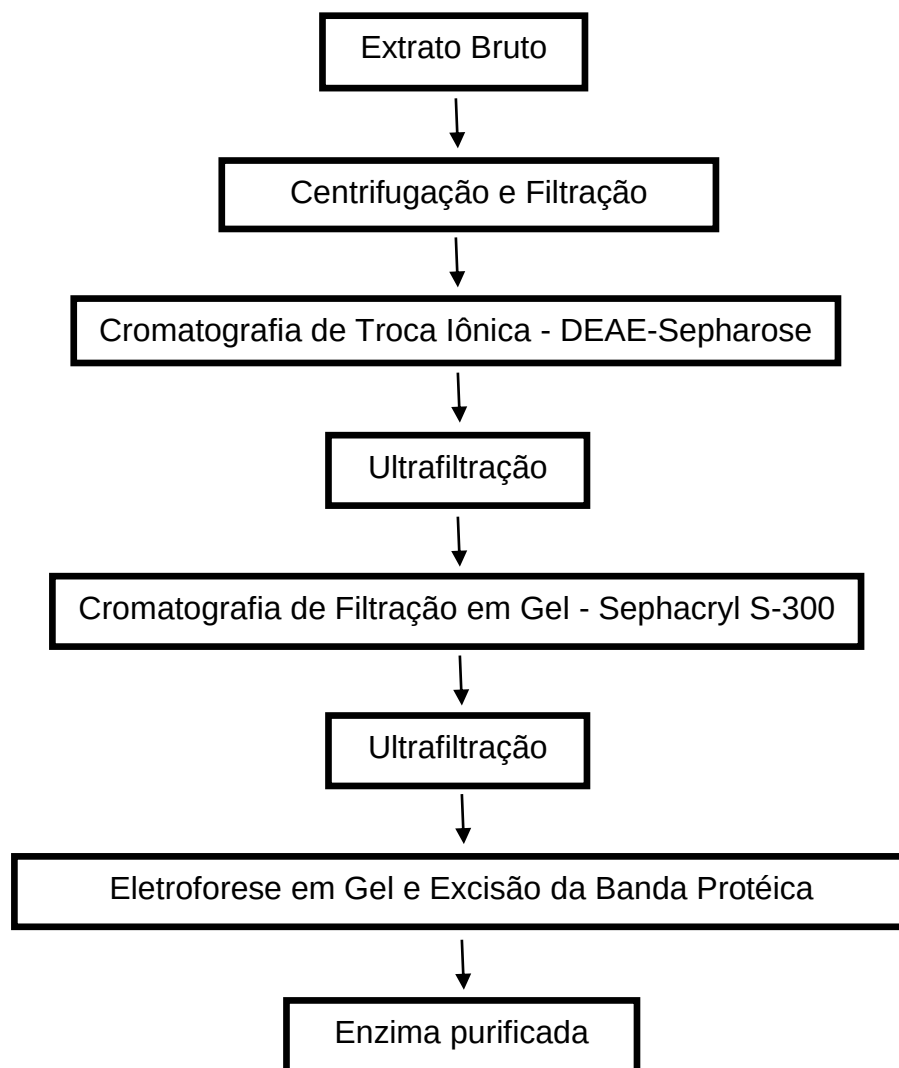


Figura 3: Sequência da metodologia de fracionamento de proteínas utilizada no processo de purificação da β -xilosidase de *Ceratocystis fimbriata* RM 35.

4.7.1. Cromatografia de troca aniônica DEAE-Sepharose

Após a centrifugação, o extrato enzimático foi submetido à cromatografia de troca iônica em uma coluna catiônica DEAE-Sepharose. A coluna (2,0 x 10,0 cm) de DEAE-Sepharose foi previamente equilibrada com

tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 4,5. As proteínas que aderiram a resina foram eluídas por um gradiente salino crescente formado por tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 4,5, e o mesmo tampão contendo 1 M de NaCl. Todo o processo foi realizado a 4°C, com fluxo de 60 mL/h. Frações de 4 mL foram coletadas e as frações protéicas que apresentaram atividade de β -xilosidase, como descrito no item 4.7.1. foram reunidas e submetidas ao próximo passo de purificação.

4.7.2. Ultrafiltração

O processo de ultrafiltração foi utilizado para concentração da amostra enzimática contendo atividade β -xilosidase, proveniente da cromatografia de troca iônica e filtração em gel. Foi utilizada uma membrana de ultrafiltração Amicon® Ultra, Millipore (Billerica, MA, USA) com um poro de exclusão de 3 kDa, e o processo foi realizado em centrífuga refrigerada Beckman J2-MI a 4.000 rpm, por 1 hora, à 4 °C (rotor JA-17).

4.7.3. Cromatografia de filtração em gel

A amostra concentrada, proveniente da ultrafiltração, foi submetida à cromatografia de filtração em gel em FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) em uma coluna (26/60) de Sephacryl S-300 previamente equilibrada com tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 4,5. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão com fluxo contínuo de 60 mL/h e foram coletadas frações de 2 mL. As frações com atividade de β -xilosidase foram reunidas.

4.7.4. Eletroforese em Gel de poliacrilamida não desnaturante – Gel Nativo

A eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições não desnaturantes, foi utilizada como uma etapa do processo de purificação da β -xilosidase do fungo *Ceratocystis fimbriata*.

4.7.4.1. Preparo do gel - Gel nativo

A eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970), com algumas modificações. O gel separador foi preparado a partir da mistura de uma solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida 30% (p/v) (4 mL), tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,6 (2,5 mL), persulfato de amônio 10% (p/v) (0,05 mL), N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino (TEMED) (0,010 mL) e água destilada (3,35 mL).

O gel empilhador foi preparado a partir de uma mistura de uma solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida 30% (p/v) (1,3 mL), tampão Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8 (2,5 mL), persulfato de amônio 10% (p/v) (0,05 mL), N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino (TEMED) (0,020 mL) e água destilada (6,2 mL).

A montagem dos sistemas foi feita utilizando placas de vidro com dimensões de 20 x 12 cm (placa maior) e 20 x 10 cm (placa menor). O gel foi formado por uma camada de 6 cm para o gel separador e 1,5 cm para o gel empilhador, sendo o restante do espaço do sistema designado para a amostra.

4.7.4.2. Preparo da amostra

As alíquotas com atividade de β -xilosidase derivadas da cromatografia de filtração em gel foram concentradas como descrito no item 4.6.2 e preparadas para serem submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições não desnaturantes. Para cada 1 mL da amostra concentrada, foram adicionados 0,154 mL de tampão Tris/HCl, 0,5 M, pH 6,8; 0,128 mL de glicerol e um “traço” de azul de bromofenol, para sinalizar o “status” da corrida eletroforética.

4.7.4.3. Condições utilizadas durante a eletroforese

O tampão de corrida utilizado durante a eletroforese foi uma solução de Tris/HCl 0,025 M, pH 8,3, contendo glicina 0,192 M. A eletroforese foi conduzida a temperatura ambiente, empregando-se uma voltagem de 150 mV, durante 4 h.

4.7.4.4. Localização e identificação da banda protéica contendo atividade de β -xilosidase

Após a corrida eletroforética, uma faixa de aproximadamente de 1 cm de largura, foi longitudinalmente excisada do gel para a localização da banda protéica contendo atividade de β -xilosidase. A faixa extraída do gel foi acondicionada em uma placa de petri e lavada 3 vezes, com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, durante 10 min. Após a lavagem, a faixa foi cuidadosamente coberta com uma solução tamponada (tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0) de p -NP- β Xil (3 mg.mL^{-1}) e incubada por 15 min a 50 °C em banho-maria. A banda protéica correspondente à enzima β -xilosidase pode ser evidenciada pelo surgimento de uma banda amarela, após a adição do carbonato de sódio 0,5 M.

4.7.4.5. Extração da β -xilosidase do gel

Após a localização da enzima β -xilosidase, a faixa foi realinhada ao gel original, e excisada a região de gel relativa a posição da β -xilosidase. Esta faixa de gel foi triturada, a seco, em almofariz e pistilo. Após a total dissolução do gel, 10 mL de tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0 foram adicionados ao macerado e posteriormente transferidos para um béquer de 20 mL. Esta mistura foi mantida sob agitação, em agitador magnético, a temperatura ambiente, durante 12 h, com o objetivo de maximizar a extração da enzima da malha do gel. Ao final do processo, a mistura foi então centrifugada em microcentrífuga a 13.000 rpm, por 15 min, a 4 °C. Os passos descritos no item 4.6.4.4 e 4.6.4.5 estão resumidos na Figura 4.

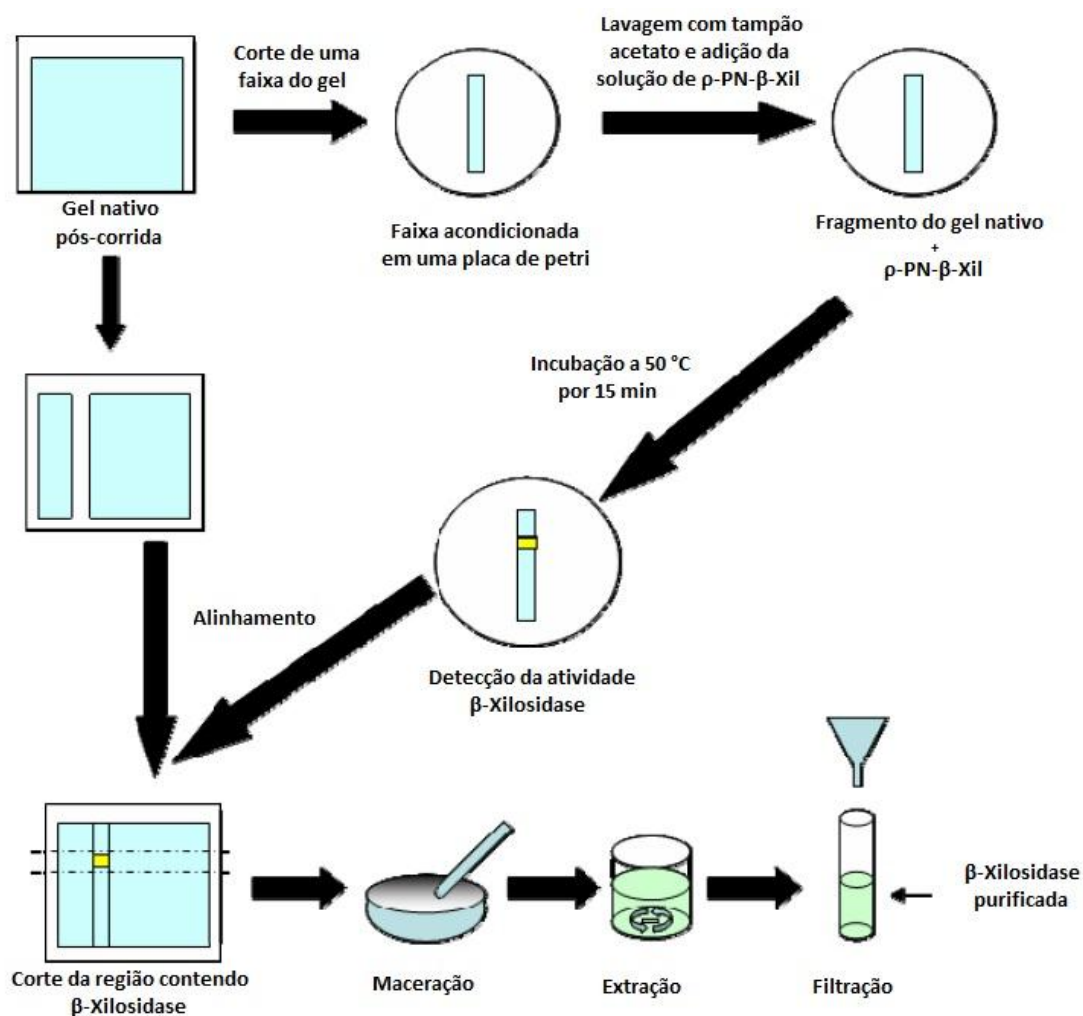


Figura 4. Esquema ilustrando as principais etapas do processo de purificação das β -xilosidases do fungo *Ceratocystis fimbriata* utilizando o gel nativo (Falkoski, 2007; modificado).

4.8. Determinação da concentração de proteína nos extratos enzimáticos

As concentrações protéicas nas preparações enzimáticas das β -xilosidases de *Ceratocystis fimbriata* foram determinadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). O reagente de Bradford concentrado 5 vezes foi preparado misturando-se 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL de etanol 95 % (v/v) e 100 mL de ácido fosfórico 85 % (v/v). Após solubilização, o volume foi completado para 200 mL e agitado por 30 min, filtrando-se a solução em algodão. Este método baseia-se no

desenvolvimento da cor em função da ligação da proteína com o pigmento Coomassie Brilliant Blue G-250.

O ensaio para determinação do teor protéico das preparações enzimáticas foram conduzidas a partir da mistura de 50-800 µL do extrato protéico, 0-750 µL de água destilada e 200 µL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada em vórtex e mantida por 15 min a temperatura ambiente. Os valores de absorbância foram avaliados a 595 nm e convertidos em valores de massa protéica, utilizando uma curva padrão construída com BSA.

4.9. Determinação do grau de pureza da β -xilosidase

4.9.1. Eletroforese

A eletroforese em gel de poliacrilamida (12,0 %), contendo SDS e β -mercaptoetanol foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970). Os mini-géis foram preparados a partir de solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30 % (p/v), tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,6, para o gel separador e tampão Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8, para o gel empilhador, persulfato de amônio 10 % (p/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 % (p/v) e, N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino de sódio (TEMED). As corridas eletroforéticas foram realizadas à temperatura ambiente, a 100 mV, em placas do Sistema Mini-Gel da Sigma Chemical Company. As amostras submetidas à eletroforese foram, anteriormente, precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 50 % (p/v), lavadas com acetona gelada e adicionadas ao tampão de amostra desnaturante 3 vezes concentrado (0,19 M Tris/HCl, pH 6,8, 2,3 % p/v de SDS, 1 % v/v de glicerol, 5 % v/v de β -mercaptoetanol e azul de bromofenol), fervidas durante 4 minutos e aplicadas no gel (Laemmli, 1970).

Os marcadores de massa molecular utilizados foram os da Fermentas Life Sciences, uma mistura de 14 proteínas altamente purificadas, com suas massas moleculares pré-definidas. As massas moleculares das frações protéicas foram estimadas correlacionando-se, por meio de curva padrão, os

perfis de migração das proteínas-padrão (distância percorrida no gel) com logaritmo da massa molecular.

4.9.2. Coloração dos géis de eletroforese

As proteínas presentes nos géis foram reveladas com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Blum et al. (1987).

Após a corrida eletroforética, os géis foram colocados em 50 mL de solução fixadora (metanol, ácido acético glacial e água, na proporção de 50:12:38 em volume) por no mínimo 2 h, seguido de 3 lavagens de 10 minutos com solução de etanol 50 % (p/v). Os géis foram lavados, por 1 minuto, em solução de tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v). Em seguida, os géis foram rapidamente lavados, por 3 vezes de 20 segundos, com água destilada e incubados, por 30 minutos, em solução de nitrato de prata 0,2 % (p/v), contendo 37 µL de formaldeído 37 % (v/v) e lavados 3 vezes, por 20 segundos, com água destilada. Posteriormente, os géis foram tratados com solução reveladora (carbonato de sódio 2 %, contendo 1 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02 % e 25 µL de formaldeído 37 %), até a visualização das bandas protéicas. A reação foi interrompida pela adição de 3 mL de ácido acético.

4.10. Determinação da massa molecular

A determinação da massa molecular da β -xilosidase de *C. fimbriata* RM 35 foi realizada por duas técnicas descritas nas seções 4.10.1 e 4.10.2, eletroforese e cromatografia de filtração em gel, respectivamente.

4.10.1. Por eletroforese

Para a determinação da massa molecular da β -xilosidase de *C. fimbriata* RM 35, foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (12,0 %). Os marcadores de massa molecular utilizados foram uma mistura de 8 proteínas altamente purificadas, com suas massas moleculares pré-definidas (Sigma). A massa molecular da β -xilosidase foi estimada correlacionando-se, por meio de uma curva padrão, os perfis de migração das proteínas

padrão (distância percorrida no gel, em centímetros) com o logaritmo das massas moleculares.

4.10.2. Por cromatografia de filtração em gel

A massa molecular da β -xilosidase de *C. fimbriata* RM 35, na sua conformação nativa, foi estimada por cromatografia de filtração em gel utilizando a resina Sephacryl S-200, em FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*). A coluna (16/60), foi previamente equilibrada com tampão acetato de sódio, 50 mM, pH4,5. O fluxo utilizado em todas as cromatografias foi de 60 mL/h, sendo que as frações coletadas tinham um volume de 2 mL. Uma cromatografia utilizando azul de dextrana foi executada, com o objetivo de determinar o volume vazio da coluna.

A massa molecular da β -xilosidase foi estimada correlacionando-se, por meio de uma curva padrão, as constantes de eluição das proteínas padrão (relação entre o volume de eluição da proteína e o volume vazio da coluna) com as massas moleculares das respectivas proteínas. Os padrões de massa molecular foram Albumina (66 KDa), Álcool desidrogenase (150 KDa), Anidrase carbônica (29 KDa), β -amilase (200 KDa) e Citocromo c (12,4 KDa), todos da Sigma Chemical Company.

4.11. Caracterização enzimática

4.11.1. Efeito do pH

Para o estudo do efeito do pH na atividade da β -xilosidase do fungo *C. fimbriata*, as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 4.7.1, exceto que, o ensaio foi realizado em diferentes valores de pH utilizando-se tampões McIlvaine citrato-fosfato (McIlvaine, 1921), na faixa de 2,9 a 8,0.

4.11.2. Efeito do pH na estabilidade e atividade da β -xilosidase

O efeito do pH na estabilidade da β -xilosidase de *C. fimbriata* foi testado pré-incubando a solução da enzima na faixa de pH de 2,9 a 8,0, por 12 horas, em temperatura ambiente. Após o período de pré-incubação, a atividade da enzima foi obtida como descrito no item 4.7.1.

4.11.3. Efeito da temperatura

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade da β -xilosidase do fungo *C. fimbriata*, as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 4.7.1, exceto que, o ensaio foi realizado em várias temperaturas, compreendidas entre 30 e 75 °C.

4.11.4. Análise da termoestabilidade

A estabilidade térmica da β -xilosidase do fungo *C. fimbriata* foi avaliada em várias temperaturas. Alíquotas (0-100 μ L) da enzima purificada foram pré-incubadas em solução tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0, nas temperaturas de 60, 65 e 70 °C, por diferentes tempos. Após cada tempo de pré-incubação, os ensaios para atividade foram conduzidos como descrito no item 4.7.1.

4.11.5. Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_M) e da velocidade máxima (V_{max})

Para obtenção dos valores de K_M e V_{max} para a enzima β -xilosidase, os ensaios de atividade enzimática foram realizados utilizando-se concentrações crescentes do substrato sintético pNP β Xil. Os ensaios enzimáticos foram conduzidos como descrito no item 4.7.1, porém, utilizando-se concentrações de 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 e 4,0 mM de pNP β Xil.

Os valores de K_M e V_{max} para a enzima β -xilosidase foram calculados pela curva de velocidade em função da concentração de substrato, curva de Michaelis-Menten, e pelo gráfico duplo-recíproco, Gráfico de Lineweaver-

Burk, pelo programa Curve Expert, versão 1.4 para Windows e o programa Sigma Plot®, versão 10.0. Todos os parâmetros cinéticos apresentados neste trabalho foram obtidos por ajuste da equação de Michaelis-Menten ($V = (V_{\max} \cdot [S]) / (K_M + [S])$).

4.11.6. Determinação da especificidade da β -xilosidase para diversos substratos

Ensaio enzimáticos foram realizados com diversos substratos sintéticos com o objetivo de determinar a especificidade da β -xilosidase purificada.

As atividades da β -xilosidase extracelular foram estimadas com outros substratos sintéticos, além do p NP β Xil, como, p -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (p NP α Glc), p -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (p NP β Glc), p -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (p NP α Gal), p -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (p NP β Gal), p -nitrofenil- α -D-manopiranosídeo (p NP α Man), p -nitrofenil- β -D-manopiranosídeo (p NP β Man), p -nitrofenil- α -D-arabinopiranosídeo (p NP α Ara). Os ensaios foram realizados como descrito no item 4.7.1.

4.11.7. Efeitos de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da β -xilosidase

O efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da β -xilosidase do fungo *C. fimbriata*, foram analisados utilizando-se 305 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 20 μ L da enzima purificada e soluções 1 mM de cada um dos seguintes compostos: ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), dodecil sulfato de sódio (SDS), cloreto de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de cobalto, cloreto de alumínio, sulfato de zinco, sulfato de cobre II, sulfato ferroso e sulfato de magnésio. Os ensaios das atividades foram conduzidos conforme descrição no item 4.7.1.

Os ensaios com os açúcares xilose, arabinose, glicose e frutose na concentração de 10 mM continham 305 μ L de tampão acetato de sódio, 100

mM, pH 5,0, e a solução enzimática. A mistura foi pré-incubada em temperatura ambiente por 15 min, sendo logo em seguida, adicionado o substrato ρ NP β Xil, e a reação conduzida em banho-maria a 50 °C, por 40 min. O efeito destes efetores sobre a atividade da enzima foi determinado em termos percentuais, utilizando um ensaio sem efetor como referência.

4.11.8. Determinação da constante de inibição (K_i) da β -xilosidase por xilose

A constante de inibição (K_i) foi obtida por meio da determinação da atividade da β -xilosidase de *C. fimbriata* RM 35 com o substrato ρ -NP- β Xil na presença de diferentes concentrações do inibidor xilose. A enzima foi pré-incubada a 50 °C com várias concentrações do substrato ρ -NP- β Xil, na ausência e na presença de xilose nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 mM, em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. Os valores da velocidade da reação na presença do inibidor foram submetidos à análise dos duplos recíprocos, permitindo a determinação dos valores de K_M aparente e V_{max} para cada condição experimental.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA β -XILOSIDASE EXTRACELULAR DE *Ceratocystis fimbriata* RM 35

5.1.1. Purificação da β -xilosidase extracelular de *Ceratocystis fimbriata* RM 35

O extrato contendo a β -xilosidase extracelular de *Ceratocystis fimbriata* RM 35, obtido após 168 h de cultivo do fungo em meio contendo farelo de trigo como fonte de carbono apresentou atividade enzimática para a enzima β -xilosidase de 14,4 U, foi submetido ao processo de purificação. O resumo dos resultados obtidos em cada etapa de purificação está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Resumo das etapas para purificação da β -xilosidase extracelular de *C. fimbriata* RM 35.

Etapa	Proteína (mg)	Atividade (U)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato bruto	10,5	14,40	1,37	1	100
DEAE-Sepharose	1,54	13,90	9,03	6,58	96,5
Ultrafiltração	1,06	9,11	8,63	6,28	63,3
Sephacryl S-300	0,15	3,86	25,09	18,29	26,8
Eletroforese	n.d.*	3,24	n.d.*	n.d.*	22,5

* Não Detectável

O perfil da cromatografia de troca iônica está representado na Figura 5.

O perfil da eluição da cromatografia em coluna de troca iônica revelou a presença de mais de uma fração protéica com atividade de β -xilosidase, que foi eluída com aproximadamente 0,48 M de NaCl. Este fato pode ter ocorrido pela possibilidade de o organismo expressar mais de uma enzima com atividade β -xilosidase.

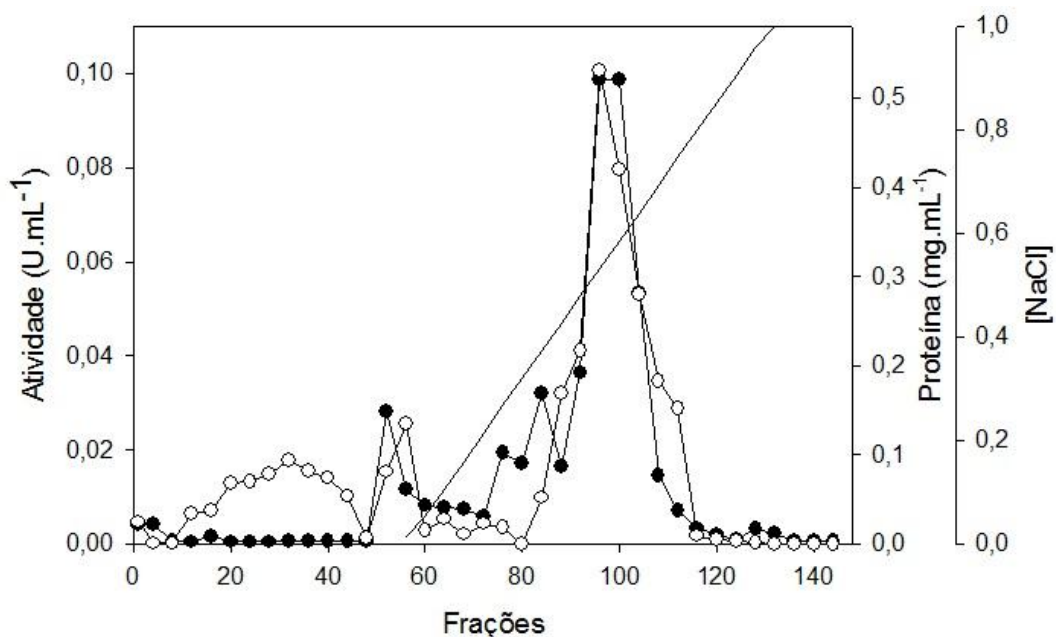


Figura 5. Perfil cromatográfico da amostra de β -xilosidase extracelular de *C. fimbriata* RM 35 em cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose. Atividade de β -xilosidase (●); proteína (○); gradiente de NaCl de 0 a 1 M (—).

A fração protéica contendo a maior atividade de β -xilosidases, foi aproximadamente 70,9 % maior que os outros picos, oriundas da cromatografia em coluna DEAE-Sepharose. Este resultado sugere que na condição de cultivo do fungo especificadas neste trabalho, esta é a β -xilosidase preferencialmente expressa por *C. fimbriata*. A maior parte das proteínas foi eluída em um pico que sobrepõem ao pico de atividade de β -xilosidase (Figura 5). No entanto, esta primeira etapa de purificação foi bastante eficiente, uma vez que promoveu um fator de purificação da enzima de 6,58 vezes, com alto rendimento, equivalente a 96,5 % da atividade de β -xilosidase recuperada após esta etapa de purificação (Tabela 1).

Embora, no processo de purificação, tenha sido necessária a concentração da amostra proveniente da cromatografia de troca iônica para posterior aplicação na etapa cromatográfica seguinte, a ultrafiltração da amostra em membrana com limite de exclusão de 3 kDa, não promoveu, como esperado, aumento no fator de purificação da enzima, que se manteve praticamente igual ao da etapa anterior (Tabela 1). Entretanto, a concentração da amostra por ultrafiltração promoveu uma queda acentuada

no rendimento da enzima, que reduziu para 63,3 % (Tabela 1). Este resultado sugere que parte da β -xilosidase pode ter ficado aderida à membrana de ultrafiltração, não tendo sido recuperada.

O perfil da cromatografia de filtração em gel está representado na Figura 6.

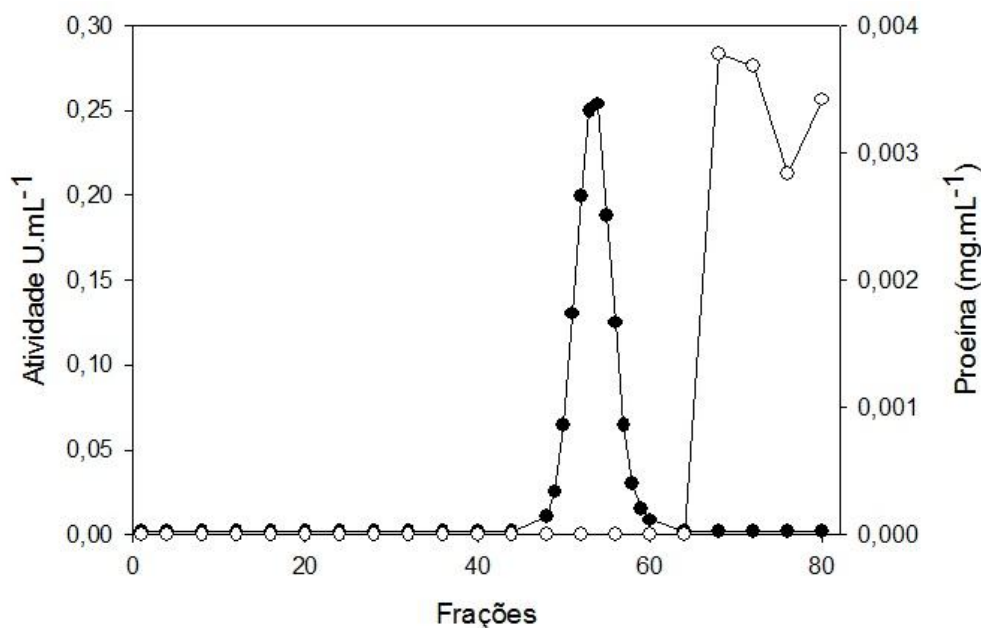


Figura 6. Perfil cromatográfico da fração enzimática contendo a β -xilosidase extracelular de *C. fimbriata* RM 35 proveniente da cromatografia de troca aniônica, em cromatografia de filtração em gel, em coluna de Sephacryl S-300 em FPLC. Atividade de β -xilosidase (●) e proteína (○).

O perfil de eluição da cromatografia de filtração em gel revelou a presença de apenas um pico protéico com atividade de β -xilosidase. Esta etapa foi bastante eficiente, permitindo a purificação da enzima em 18,3 vezes, com recuperação de 26,3 % da atividade enzimática inicial.

Visando melhorar ainda mais a purificação da β -xilosidase, após a última etapa cromatográfica, as frações ativas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições não desnaturantes. Esta técnica, quando utilizada para purificação, tem como uma das principais vantagens, permitir que a proteína mantenha a maioria das características físico-químicas normalmente detectadas em seu estado nativo, como a sua estrutura tridimensional e suas propriedades catalíticas.

Desta forma, ao término da corrida eletroforética, a banda protéica relativa a β -xilosidase foi excisada do gel e a enzima extraída.

As bases químicas que garantiram o sucesso do emprego desta técnica para a identificação da β -xilosidase no gel são facilmente compreensíveis. Uma vez que o produto da hidrólise do p-NP- β Xil pela β -xilosidase, o p-NP, possui uma coloração amarelada quando está em seu estado desprotonado, isto ocorre devido a adição do carbonato de sódio, assim o pH da mistura se eleva e, a banda relativa a β -xilosidase pode ser visualizada no gel (Figura 7).

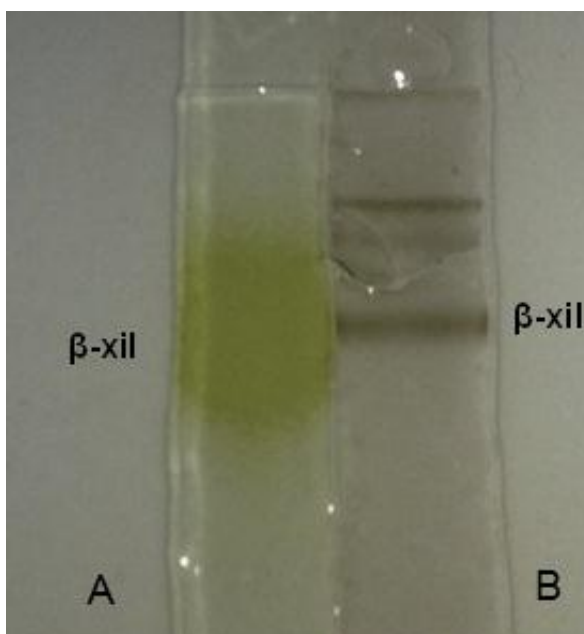


Figura 7. Zimograma (A) e SDS-PAGE (B) para revelação da β -xilosidase extracelular de *C. fimbriata* RM 35.

Após esta etapa de purificação da β -xilosidase de *C. fimbriata*, a enzima extraída do gel apresentou atividade total de 3,24 U, ou seja, o rendimento final do processo de purificação foi de 22,5 %. Entretanto, não foi possível fazer a quantificação da concentração de proteínas presentes na amostra enzimática final, devido à sensibilidade do método colorimétrico utilizado.

Após a cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Toyopearl e em coluna de gel filtração Superdex 650S, a β -xilosidase extracelular do fungo *Aspergillus japonicus* foi purificada 12,3 vezes com um rendimento de

59,4 % (Wakiyama et al., 2008). Shin et al. (2003) purificaram uma β -xilosidade de *Bifidobacterium breve* numa combinação de precipitação por sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e filtração em gel e obtiveram atividade específica de $51,8 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. A enzima β -xilosidase do fungo *Scytalidium thermophilum* foi purificada por precipitação por sulfato de amônio, filtração em gel Sephadex G-100 e cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex A-50, por Zanoelo et al. (2003), e que obtiveram uma purificação enzimática 125,0 vezes com um rendimento de 19,0 %. Guerfali et al. (2008) purificaram a enzima β -xilosidase do fungo *Talaromyces thermophilus* por precipitação por sulfato de amônio seguida por cromatografias de DEAE-celulose e gel filtração (HPLC) e obtiveram uma purificação de 73,7 vezes com um rendimento de 9,5 %. Peyer et al. (2004) purificaram a enzima β -xilosidase a partir da batata *Solanum tuberosum* e obtiveram uma purificação de 341 vezes, um rendimento de 1,34 %, com atividade específica de 85,33 mU/mg.

A literatura demonstra que as enzimas β -xilosidase de diversas fontes e tamanhos são purificadas, em regra gerais, por precipitação por sulfato de amônio, uma cromatografia de troca iônica e uma cromatografia de filtração em gel. No protocolo de purificação que adotamos, a enzima obteve uma purificação em menos vezes que o encontrado na literatura, enquanto o rendimento foi superior a muitos protocolos adotados. Apesar dessas taxas não terem influenciado no grau de pureza da enzima no final do processo.

5.1.2. Determinação do grau de pureza e da massa molecular das β -xilosidases de *Ceratocystis fimbriata* RM 35

Para confirmar a purificação da β -xilosidase do fungo *C. fimbriata* RM 35, as frações ativas, eluídas de cada etapa do processo de purificação, foram submetidas à eletroforese (SDS-PAGE 12,0 %) e o perfil de migração no gel está apresentado na Figura 8.

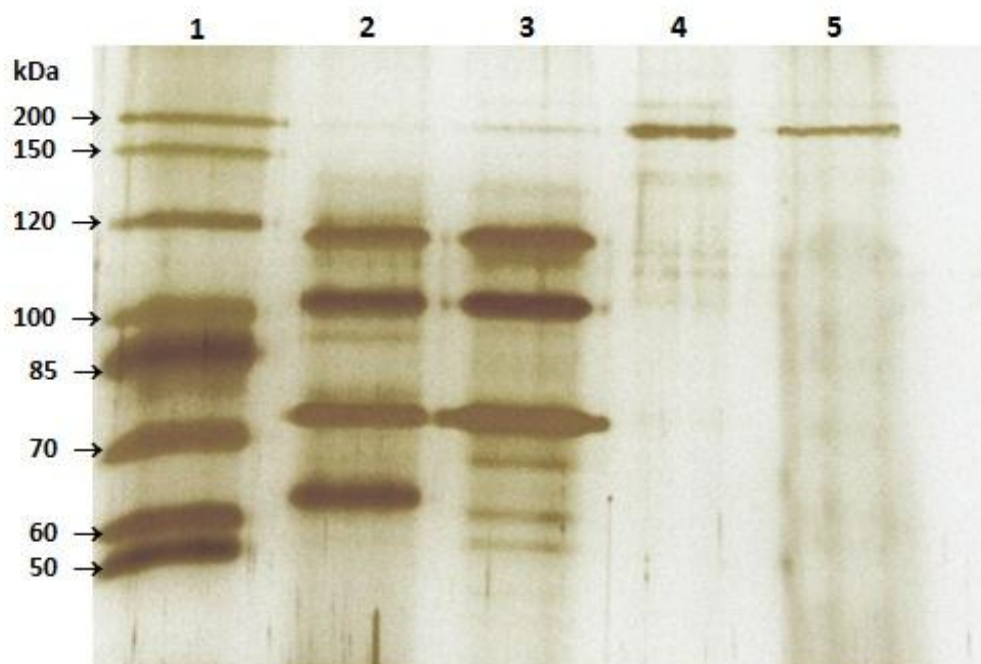


Figura 8. Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12,0 %) corado com prata de amostras contendo β -xilosidase extracelular de *C. fimbriata* RM 35. **1**- marcadores de massa molecular, **2** - extrato bruto, **3** - fração protéica proveniente troca aniônica Sepharose-DEAE, **4** - fração protéica proveniente de filtração em gel, **5** - fração enzimática proveniente da eletroforese em gel não desnaturante.

Como pode ser verificado, com base no SDS-PAGE obtido, observa-se que o número de bandas protéicas diminuiu consideravelmente do extrato bruto para as etapas seguintes de purificação. Observa-se claramente no gel, uma única banda protéica na canaleta 4, onde foi aplicada a amostra da enzima β -xilosidase do fungo *C. fimbriata*, proveniente da última etapa cromatográfica (Figura 8). Portanto, foi confirmado o alto grau de pureza desta proteína e a eficácia do protocolo de purificação utilizado. Isso valida a tabela de purificação apresentada anteriormente (Tabela 1), pois confirma o alto grau de pureza da β -xilosidase de *C. fimbriata* RM 35, obtida após todas as etapas cromatográficas.

A massa molecular da β -xilosidase extracelular de *C. fimbriata* RM 35, estimada a partir da regressão linear obtida correlacionando-se o logaritmo das massas moleculares das proteínas padrão com a distância percorrida no SDS-PAGE, foi de aproximadamente 161,6 kDa (Figura 9).

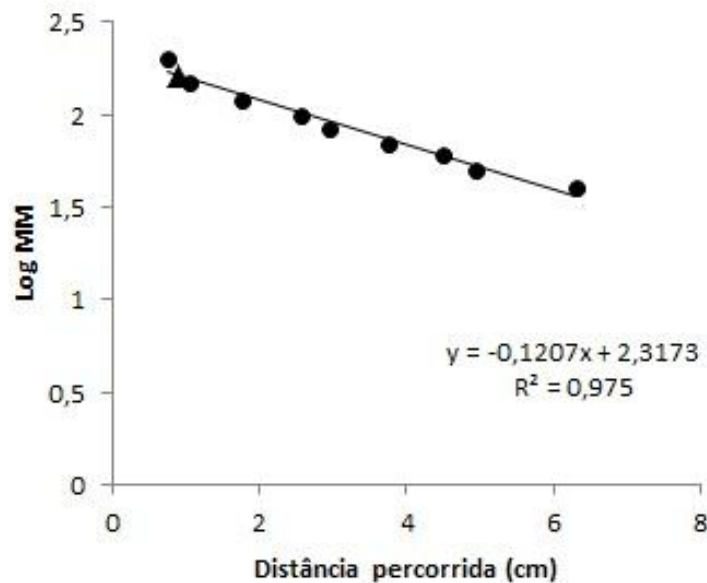


Figura 9. Determinação da massa molecular da β -xilosidase extracelular purificada de *C. fimbriata* RM 35. O coeficiente para a regressão foi calculado utilizando o programa Sigma Plot®, versão 10.0. Distâncias percorridas pelos padrões protéicos (●) e pela β -xilosidase (▲).

Além disso, a massa molecular da β -xilosidase extracelular de *C. fimbriata* RM 35, na sua conformação nativa, foi determinada por cromatografia de filtração em gel em coluna Sephacryl S-200, em FPLC. A massa molecular da enzima foi estimada a partir da regressão linear obtida correlacionando-se as massas moleculares das proteínas padrão com a constante de eluição das mesmas (Figura 10). Como o volume de eluição do composto azul de dextrana foi de 37,5 mL e o volume de eluição da β -xilosidase foi de 43,5 mL, a constante de eluição da β -xilosidase foi 1,16 e, assim, o valor estimado para a massa molecular da enzima foi de aproximadamente 204,2 kDa.

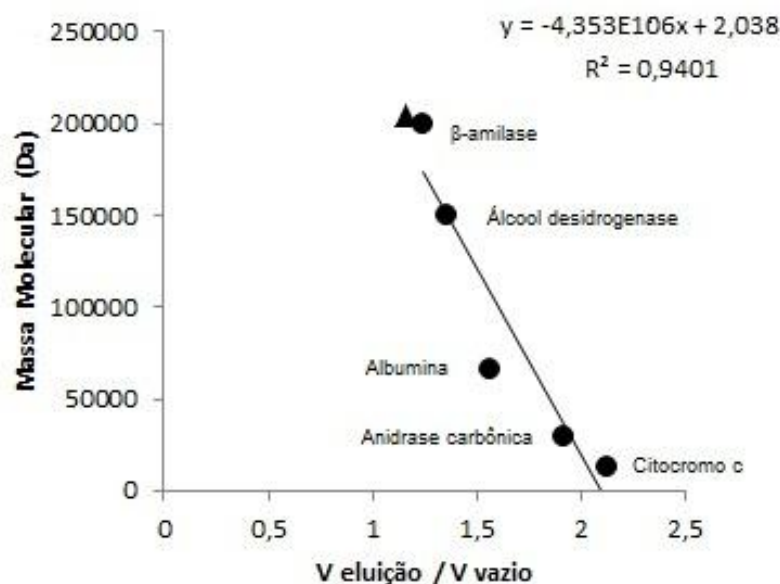


Figura 10. Massa molecular da β -xilosidase de *C. fimbriata* RM 35 por filtração em gel em resina Sephacryl S-200, em FPLC. Os coeficientes para a regressão foram calculados utilizando o programa Sigma Plot®, versão 10.0. Constantes de eluição dos padrões de massa molecular (●); constante de eluição da β -xilosidase (▲).

Comparando os resultados de massa molecular obtidos por SDS-PAGE e por filtração em gel, percebe-se que a banda visualizada no gel eletroforético equivale a uma massa molecular de 161,6 kDa, que é um valor relativamente próximo ao obtido pela cromatografia de filtração em gel, de 204,2 kDa. Baseado nestes valores pode-se pressupor que a β -xilosidase seja uma proteína monomérica, formada apenas por uma subunidade, quando se encontra em solução e no seu estado nativo. Obviamente seria necessário um estudo mais aprofundado para tal afirmação como, por exemplo, a realização da técnica de espectrometria de massa.

As massas moleculares estimadas de uma série de β -xilosidases descritas na literatura indicam diferentes massas moleculares para as enzimas provenientes de diversas fontes, principalmente devido ao grau de glicosilação e quantidade de subunidades protéicas. Shao et al. (2011) relataram que a β -xilosidase extracelular recombinante do fungo *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* apresentou-se como um homotrímero, sendo que a massa molecular de cada um dos monômeros foi de 78 kDa, por SDS-PAGE, e a massa total determinada por cromatografia

filtração em gel foi de 210 kDa e a enzima contém 6 % (p/p) de carboidrato. De acordo com Kimura et al. (1999), a enzima β -xilosidase/ β -glicosidase de *Aspergillus sojae* teve sua massa molecular estimada em 250 e 118 kDa, por cromatografia de filtração em gel e SDS-PAGE, respectivamente, contendo 23,8 % de carboidratos por peso. Wakiyama et al. (2008) demonstraram que a β -xilosidase de *A. japonicus* é um monômero e sua massa molecular nativa foi de aproximadamente 113,2 kDa determinada por SDS PAGE, com 27,6 % (p/p) de glicosilação.

Alguns autores purificaram β -xilosidases com massas moleculares consideravelmente menores que a enzima de *C. fimbriata* RM 35. Shin et al. (2003) concluíram que a massa molecular da β -xilosidase de *B. breve* foi de 49 kDa, quando determinada por SDS-PAGE e cromatografia de filtração em gel. A enzima β -xilosidase do fungo *Scytalidium thermophilum* é um monômero e possui uma massa molecular de 45 kDa e 38 kDa estimadas por SDS PAGE e gel filtração, respectivamente, com 12 % (p/p) de glicosilação (Zanoelo et al., 2004). Guerfali et al. (2008) concluíram que a massa molecular da β -xilosidase de *T. thermophilus* foi de 97 kDa, quando determinada por SDS-PAGE e cromatografia de filtração em gel. A enzima recombinante β -xilosidase do fungo *Aspergillus niger* apresentou massa molecular 90 kDa por SDS-PAGE (Amaro-Reyes et al., 2011). A massa molecular da enzima β -xilosidase de *Solanum tuberosum* foi de 40 kDa, determinada por SDS-PAGE e classificada como um monômero (Peyer et al., 2004).

5.1.3. Determinação do tempo de ensaio para a hidrólise de p-NP- β Xil pela β -xilosidase de *Ceratocystis fimbriata* RM 35

O primeiro passo a se tomar em qualquer estudo cinético envolvendo enzimas é estabelecer os limites de linearidade, ou seja, estabelecer a concentração máxima de produto que pode ser acumulado antes que as respostas de [P] vs tempo e velocidade de hidrólise vs [E] se tornem não lineares (Segel, 1979).

Desta forma, ensaios de hidrólise do substrato p-NP- β Xil com a enzima β -xilosidase foram conduzidos para a determinação de um tempo de reação adequado, que seria posteriormente utilizado como padrão para as demais análises. O resultado dos ensaios (365 μ L de tampão de acetato de sódio, pH 5,0, 100 mM, 10 μ L de extrato purificado da β -xilosidase e 125 μ L de uma solução 4 mM do substrato p-NP- β Xil) conduzidos a 50 °C por 5 - 60 min podem ser observados na Figura 11.

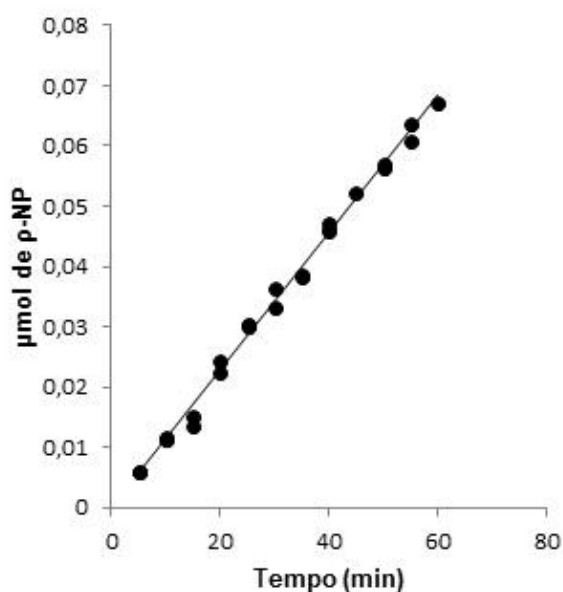


Figura 11. Taxa de hidrólise do substrato p-NP- β Xil pela β -xilosidase em diferentes tempos de reação.

Como observado na Figura 11, as taxas de hidrólise do p-NP- β Xil pela β -xilosidase do fungo *C. fimbriata* manteve-se constantes durante todo o período de tempo avaliado (60 min). Por motivos de segurança e praticidade, o tempo de ensaio para as demais análises realizadas com a β -xilosidase foi dentro do intervalo de 10 - 60 min, de acordo com a amostra enzimática analisada.

5.1.4. Caracterização Enzimática

5.1.4.1. Efeito do pH

O efeito do pH sobre a atividade da β -xilosidase de *C. fimbriata* RM 35 contra o substrato p-NP- β Xil foi avaliado (Figura 12). A atividade máxima da enzima foi detectada em pH 3,9. A β -xilosidase de *C. fimbriata* manteve mais de 90% de sua atividade máxima em uma faixa restrita de pH, compreendida entre os valores de pH 3,8 e 4,3, o que indica uma grande sensibilidade desta enzima em relação ao pH. Atividades menores foram observadas em pH 3,1 e 5,2, nos quais a enzima manteve 45 % da sua atividade máxima. A enzima manteve atividade de 40 % em pH 2,9, no entanto, em pH 8,0, pode-se observar que a enzima reteve somente 3,0 % da atividade máxima (Figura 12).

Esses resultados indicam que a β -xilosidase de *C. fimbriata* é uma enzima ácida. Essa propriedade é particularmente interessante para aplicação da enzima em processos biotecnológicos cujo pH do meio seja ácido, como é o caso da sacarificação de biomassa pré-tratada com ácido diluído para produção de etanol. Normalmente após o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica utilizando ácido diluído, o pH do meio tem que ser ajustado com base para atingir o pH de atividade das enzimas para a etapa de hidrólise dos polissacarídeos. Este ajuste de pH acrescenta custos ao processo. Portanto a utilização de enzimas que atuem em pH mais ácido, como é o caso da β -xilosidase de *C. fimbriata* é bastante interessante do ponto de vista industrial.

Valores de pH ótimo próximos ao encontrado para a β -xilosidase de *C. fimbriata* RM 35 foram encontrados para a β -xilosidase de *B. breve*, pH ótimo de 4,0 (Shin et al., 2003). De acordo com Amaro-Reyes et al. (2011) a β -xilosidase do fungo *Aspergillus niger* apresentou máxima atividade em pH 3,6. A atividade enzimática diminui 85,6, 74,9, e 44,4 % nos valores de pH 4,0, 5,0 e 6,0, respectivamente. A β -xilosidase de *S. tuberosum* apresentou atividade máxima no intervalo de pH 4,0-4,5 (Peyer et al., 2004). Shao et al. (2011) encontraram um valor de pH ótimo 6,0 para uma β -xilosidase

recombinante de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. De acordo com Zanoelo et al. (2004), o pH ótimo para a β -xilosidase de *S. thermophilum* foi de 5,0 e num intervalo de pH 4,4 a 6,3 a enzima manteve 80 % de sua atividade máxima. A β -xilosidase do fungo *A. japonicus* exibiu máxima atividade em pH 5,0, a 45 °C (Wakiyama et al., 2008). Um estudo conduzido por Wagschal et al. (2008) revelou que a β -xilosidase recombinante de *Geobacillus thermoleovorans* exibiu alta atividade em valores de pH 5,0 e em torno dos pH 4,8 a 6,9 mantiveram 75 % da atividade total. Guerfali et al. (2008) encontraram para β -xilosidase de *T. thermophilus* atividade máxima em pH 6-7.

A estabilidade da β -xilosidase, foi determinada após 12 h de incubação em diferentes valores de pH, e as atividades residuais são mostradas na Figura 12.

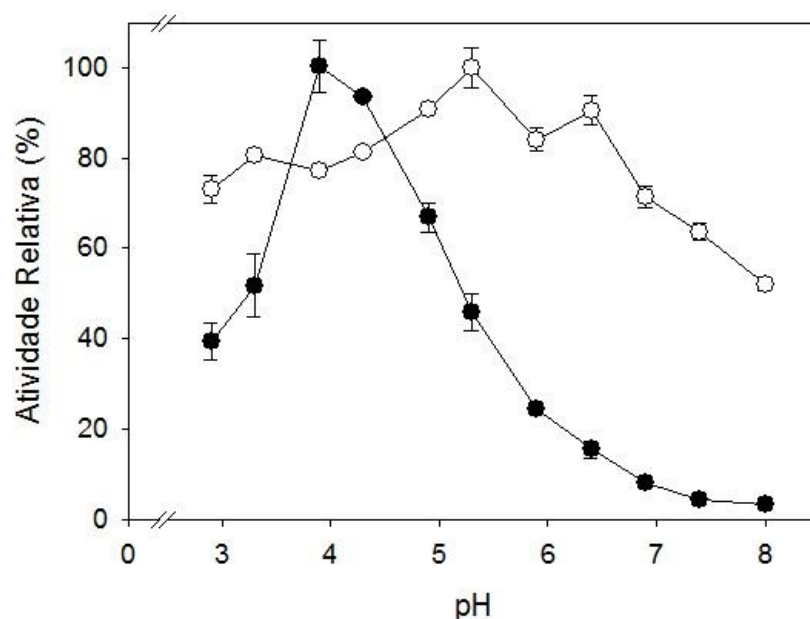


Figura 12. Efeito do pH na atividade da β -xilosidase extracelular purificada de *C. fimbriata* RM 35 na temperatura de 50 °C (●) e estabilidade (○) da β -xilosidase.

Após pré-incubação da β -xilosidase de *C. fimbriata* RM 35 em valores de pH entre 2,9 e 8,0, à temperatura ambiente, por 12 horas, a enzima mostrou maior atividade quando foi pré-incubada em pH 5,2. A enzima manteve atividade consideravelmente alta, acima de 95 %, quando pré-incubada em pH 5,0 e 5,5 e acima de 80 % entre os valores de pH de 4,2 a

6,6, demonstrando a grande estabilidade da enzima nesses valores de pH (Figura 12). Quando pré-incubada em pH 8,0 e 2,9, a enzima reteve ainda 51,5 % e 73,1% de sua atividade máxima, respectivamente. Estes resultados demonstram que, quando a β -xilosidase de *C. fimbriata* foi avaliada em pH acima de 5,5, até 8,0, sua atividade era reduzida para menos de 20% da atividade máxima, sugerindo que nesses valores de pH, possivelmente grupos carregados da enzima eram desprotonados, alterando a estrutura e levando a acentuada perda de atividade. Entretanto, quando a enzima foi pré-incubada por 12 h em valores de pH acima de 5,5-8,0, mas o ensaio de atividade foi conduzido em pH 5,0, a atividade foi grandemente restabelecida, demonstrando a capacidade de renaturação da enzima nesse intervalo de pH.

A β -xilosidase de *T. thermophilus* se manteve estável no intervalo de pH 6-9, por 3 h (Guerfali et al., 2008). De acordo com Amparo-Reyes et al. (2011), a β -xilosidase do fungo *A. niger* permaneceu estável durante 2 h de incubação nos valores de pH 4,0 e 5,0, mas a atividade diminui 58,4 % em pH 6,0 e após 24 h de incubação a enzima manteve aproximadamente 50 % da atividade inicial nos intervalos de pH 4-6. Wakiyama et al. (2008) determinaram que as β -xilosidases do fungo *A. japonicus* mantiveram suas atividades elevadas, acima de 90 %, nos valores de pH entre 2,0 e 7,0, por 3 h.

Segel (1979) descreve que os efeitos do pH na estabilidade de uma enzima devem ser levados em conta em qualquer estudo do efeito do pH na ligação do substrato e na catálise. Somente a curva para determinação do pH ótimo não dá indicações das razões pelas quais a velocidade declina acima e abaixo do pH ótimo. O declínio poderia resultar da constituição de uma forma iônica não adequada do substrato ou da enzima (ou de ambos), ou pela inativação da enzima, ou ainda combinação destes efeitos.

Assim, a perda da eficiência catalítica da β -xilosidase de *C. fimbriata*, verificada nos ensaios realizados em valores de pH entre 6,0 e 8,0 deve-se a uma constituição iônica não adequada da enzima.

5.1.4.2. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura sobre a atividade da β -xilosidase de *Ceratocystis fimbriata* RM 35 contra o substrato p-NP- β Xil foi avaliado (Figura 13). A enzima exibiu a atividade máxima quando ensaiada a 65 °C e nas temperaturas acima de 65°C, foi detectada uma queda brusca na atividade de β -xilosidase (Figura 13).

A β -xilosidase apresentou em torno de 42,7 % de sua atividade máxima quando ensaiadas a 50 °C. Para os ensaios realizados a 30 e 75 °C observou-se que as enzimas mantiveram 18,8 e 21,4 % da sua atividade máxima, respectivamente.

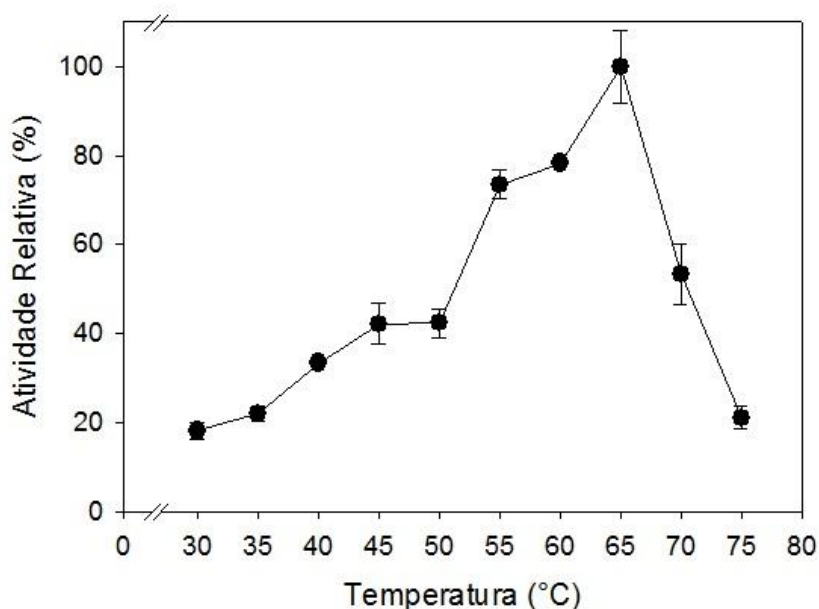


Figura 13. Efeito da temperatura na atividade da β -xilosidase extracelular purificada de *C. fimbriata* RM 35 em pH 5,0.

Para a β -xilosidase recombinante de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, a temperatura ótima foi também de 65 °C (Shao et al., 2011) e, de acordo com Wakiyama et al. (2008), a β -xilosidase extracelular do fungo *A. japonicus* apresentou temperatura ótima de 70 °C. De acordo com Amaro-Reyes et al. (2011) a enzima β -xilosidase purificada do fungo *A. niger* apresentou atividade ótima em 70 °C, enquanto a 50 e 60 °C, a enzima exibiu 57,5 % e 93,6 % da atividade máxima, respectivamente. Zanoelo et al. (2004) determinaram que a temperatura ótima para a enzima β -xilosidase

de fungo *S. thermophilum* foi de 60 °C. Para a β -xilosidase de *T. thermophilus*, a temperatura ótima foi de 50 °C (Guerfali et al., 2008). A enzima β -xilosidase de *S. tuberosum* apresentou atividade máxima no intervalo de temperatura de 55-60 °C (Peyer et al., 2004).

5.1.4.3. Análise da termoestabilidade

A termoestabilidade da β -xilosidase de *C. fimbriata* foi avaliada nas temperaturas de 60, 65 e 70 °C.

A β -xilosidase purificada manteve 86 % de sua atividade inicial quando pré-incubada a 60 °C, por um período de 60 minutos, perdendo apenas 30 % de sua atividade após 24 h. No entanto, a 65 °C, a enzima manteve 68,8 % e 43 % de sua atividade inicial após 15 e 60 minutos, respectivamente. A 70 °C, a enzima perdeu 74 % da sua atividade em 5 minutos de pré-incubação, sendo praticamente inativada após 60 minutos (Figura 14).

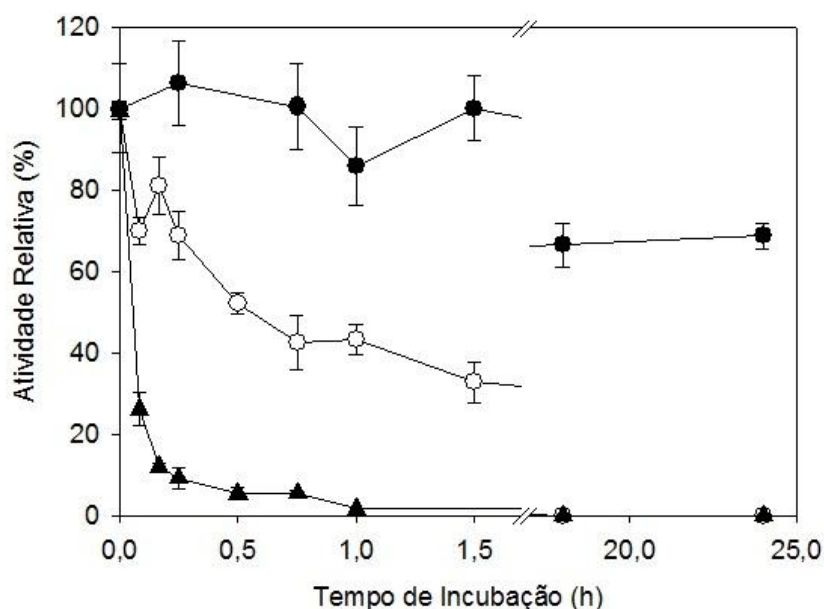


Figura 14. Efeito da temperatura na estabilidade da β -xilosidase extracelular purificada de *C. fimbriata* RM 35. As amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 60 °C (●); 65 °C (○) e 70 °C (▲). As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade sem pré-incubação como 100 %.

A termoestabilidade de uma enzima é uma propriedade muito importante do ponto de vista biotecnológico. O fato da β -xilosidase de *C. fimbriata* RM 35 manter aproximadamente 70 % da sua atividade inicial, mesmo após 25 h a 60 °C mostra que esta enzima é bastante estável e pode ser indicada para utilização em processos industriais que se desenvolvem em temperatura próxima a 60 °C. A β -xilosidase de *C. fimbriata* RM 35 mostrou ser mais termoestável quando comparada com outras β -xilosidases descritas na literatura.

A enzima β -xilosidase de *S. thermophilum* foi estável a 50 e 60 °C, mantendo sua atividade por 60 min de incubação (Zanoelo et al., 2004). De acordo com Amparo-Reyes et al. (2011) a β -xilosidase do fungo *A. niger* foi estável a 50 °C por 2 h, enquanto a atividade residual da enzima depois de 1 h nas temperaturas de 65, 70 e 75 °C diminui significativamente para 30 %, 25 % e 0 %, respectivamente. A β -xilosidase de *T. thermophilus* se manteve estável durante 24 h a 40 °C, perdendo 50 % da sua atividade máxima depois de 12 h a 45 °C e aproximadamente 60 % da atividade a 50 °C (Guerfali et al., 2008).

5.1.4.4. Constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{max})

O efeito da concentração do substrato p -NP- β Xil na velocidade da reação catalisada pela β -xilosidase extracelular purificada de *C. fimbriata* RM 35, foi determinado pela curva de Michaelis-Menten (Figura 15).

Os valores de K_M e V_{max} , calculados a partir da curva de Michaelis-Menten, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de K_M e V_{max} , obtidos para a enzima β -xilosidase de *C. fimbriata*, determinados pela curva de Michaelis-Menten para o substrato p -NP- β Xil.

Substrato	K_M (mM)	V_{max} (μ mol/min)
p -NP β -Xil	0,326	$0,91 \times 10^{-3}$

A constante cinética K_M indica a “adequacidade” relativa de diferentes substratos para uma determinada enzima, ou seja, o substrato que apresenta um menor valor de K_M possui uma maior afinidade aparente para a enzima.

Os valores de K_M e V_{max} para a β -xilosidase extracelular de *C.fimbriata* RM 35, calculados pela curva de Michaelis-Menten, foram 0,326 mM e $0,91 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectivamente.

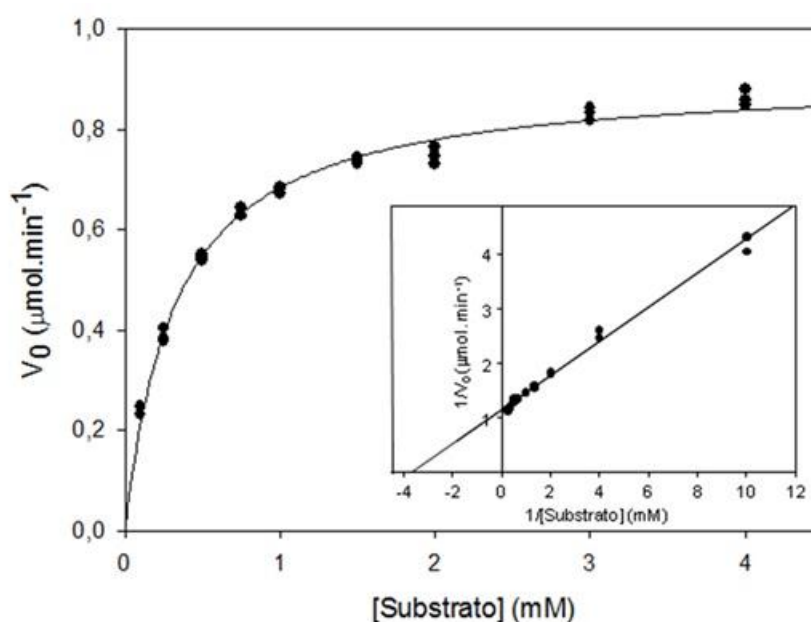


Figura 15. Efeito da concentração do substrato p -NP- β Xil na velocidade da reação catalisada pela enzima β -xilosidase extracelular de *C. fimbriata* RM 35.

Os dados encontrados na literatura sugerem que o valor absoluto de K_M para um determinado substrato varia essencialmente de acordo com a origem da enzima. Isto pode ser exemplificado, comparando-se os valores de K_M de diferentes β -xilosidases com o substrato p -NP- β Xil.

A β -xilosidase da bactéria *B. breve* apresentou um valor de K_M de 1,54 mM e V_{max} igual a $121,8 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Shin et al., 2003). Shao et al. (2011) determinaram que a β -xilosidase do fungo *T. saccharolyticum* apresentou valores de K_M e V_{max} , 0,68 mM e 276 U/mg proteína, respectivamente. De acordo com Wakiyama et al. (2008), a β -xilosidase do

A. japonicus apresentaram valores de K_M e V_{max} , 0,314 mM e 114 $\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectivamente. Wagschal et al. (2008) determinaram que a β -xilosidase do fungo *G. thermoleovorans* apresentou K_M , 0,55 mM. Zanoelo et al. (2004) determinaram que a β -xilosidase do fungo *S. thermophilus* apresentou valor de K_M 1,3 mM. A β -xilosidase do fungo *T. thermophilus* apresentou um valor de K_M de 2,37 mM e V_{max} igual a 0,049 $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ (Guerfali et al., 2008).

5.1.4.5. Especificidade da β -xilosidase extracelular purificada de *Ceratocystis fimbriata* RM 35

A enzima β -xilosidase extracelular purificada de *C. fimbriata* RM 35 foi avaliada quanto à capacidade de hidrolisar diferentes substratos (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade da β -xilosidase extracelular purificada de *C. fimbriata* RM 35 com substratos sintéticos.

Substrato	Concentração final	Atividade ($\mu\text{mol.min}^{-1}$)
$\rho\text{NP}\beta\text{Xyl}$	1 Mm	0,126
$\rho\text{NP}\alpha\text{Ara}$	1 mM	0
$\rho\text{NP}\beta\text{Gal}$	1 mM	0
$\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$	1 mM	0
$\rho\text{NP}\beta\text{Glc}$	1 mM	0,014
$\rho\text{NP}\alpha\text{Glc}$	1 mM	0
$\rho\text{NP}\alpha\text{Man}$	1 mM	0
$\rho\text{NP}\beta\text{Man}$	1 mM	0
Xilana Oat Spelts	1 %	n.d.*
Xilana Birchwood	1 %	n.d.*
n.d.* Não Detectável		

A β -xilosidase de *C. fimbriata* RM 35 catalisou a hidrólise da ligação de xilose em configuração β . A enzima foi incapaz de hidrolisar galactose e manose em configurações α ou β ; e arabinose e glicose em configuração α . Entretanto a enzima mostrou atividade reduzida sobre $\rho\text{NP}\beta\text{Gli}$. Isto sugere que embora a enzima não tenha tido especificidade absoluta para hidrólise

de xilose, uma vez que catalisou a hidrólise de glicose, a enzima apresentou seletividade para configuração β . Dessa forma, a β -xilosidase de *C. fimbriata* RM 35 demonstrou ser capaz de hidrolisar outro substrato, obtendo atividades xilosidase/glicosidase, uma vez que hidrolisou os substratos ρ NP β Xil e ρ NP β Gli, este último em menor escala (10 vezes menor). Esta propriedade é vantajosa para aplicação dessa enzima na hidrólise de hemicelulose da parede vegetal, visto que este polímero e, especialmente a xilana, é altamente complexo, apresentando ramificações com resíduos de açúcares como glicose e outros.

Na literatura, várias β -xilosidases apresentaram ser bifuncionais. A β -xilosidase purificada do fungo *S. thermophilum* hidrolisou ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo, enquanto não teve atividade de hidrólise para ρ -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo, ρ -nitrofenil- α -D-arabinofuranosídeo e o -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (Zanoelo et al., 2004). Em um estudo conduzido por Wakiyama et al. (2008), a β -xilosidase de *A. japonicus* foi capaz de hidrolisar substratos sintéticos com configurações β , em concentrações de 5 mM, como ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo, e ρ -nitrofenil- β -D-arabinofuranosídeo, além dos substratos xilana, celobiose, xilobiose e xilotriose a 10 mM. A β -xilosidase de *T. saccharolyticum* foi capaz de hidrolisar ρ NP β Xil, mas não apresentou atividade para os substratos ρ -NP- α Xil, ρ -NP- α Ara, ρ -NP- β Gli (Shao et al., 2011). Shin et al. (2003) purificaram uma β -xilosidase de *B. breve* e a enzima hidrolisou a xilana, mas não apresentou atividade para os substratos ρ -NP- β Glicopiranosídeo, ρ -NP- β Galactocopiranosídeo e ρ -NP- β Fucopiranosídeo. A β -xilosidase do fungo *G. thermoleovorans* purificada por Wagschal et al. (2008) hidrolisou o substrato ρ -nitrofenil- β -D-arabinofuranosídeo.

A atividade hidrolítica de β -xilosidase de *C. fimbriata* RM 35 nos polímeros de xilana Birchwood e Oat Spelts não foi detectada. A enzima mostrou atividade reduzida sobre os polímeros, isto devido a enzima β -xilosidase hidrolisar a região terminal não redutora de xilobiose e xilooligossacarídeos, e sua ação na degradação de um polímero é conjunta com várias enzimas, como as xilanases. Yan et al. (2008) observaram fato semelhante, em que a enzima β -xilosidase purificada de *Paecilomyces*

thermophila é capaz de hidrolisar xilooligossacarídeos, mas é incapaz de hidrolisar a xilana. Identificaram também que a quantidade de açúcares redutores liberados com a atividade de uma xilanase purificada pelo mesmo organismo aumentou significativamente quando em ação conjunta com a β -xilosidase, cerca de 1,5-1,7 vezes.

5.1.4.6. Efeito dos íons e açúcares na atividade da β -xilosidase extracelular purificada de *Ceratocystis fimbriata* RM 35

O efeito de íons e açúcares sobre a atividade da β -xilosidase extracelular de *C. fimbriata* RM 35 estão apresentados na Tabela 4 e Figura 16.

Tabela 4. Atividade relativa da β -xilosidase extracelular purificada de *C. fimbriata* RM 35 submetida aos diferentes efetores.

Efector	Concentração (mM)	Atividade Relativa (%) $\pm$ DP
Controle	-	100,00 $\pm$ 4,31
CuSO ₄	1	69,87 $\pm$ 4,17
KCl	1	108,67 $\pm$ 3,72
CaCl ₂	1	103,56 $\pm$ 2,55
CoCl ₂	1	98,58 $\pm$ 2,39
MgSO ₄	1	96,56 $\pm$ 8,27
ZnSO ₄	1	110,20 $\pm$ 1,64
AlCl ₃	1	87,61 $\pm$ 5,48
FeSO ₄	1	65,75 $\pm$ 0,28
SDS	1	83,50 $\pm$ 5,02
EDTA	1	106,92 $\pm$ 1,42
Glicose	10	106,18 $\pm$ 1,29
Xilose	10	65,75 $\pm$ 1,45
Arabinose	10	106,52 $\pm$ 2,10
Frutose	10	97,84 $\pm$ 8,77

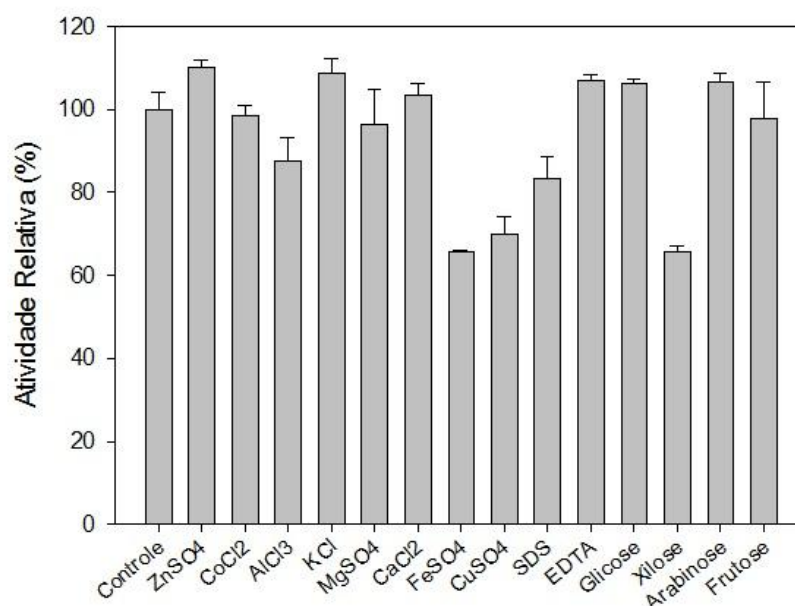


Figura 16. Atividade relativa da β -xilosidase extracelular purificada de *C. fimbriata* RM 35 submetida aos diferentes efetores.

Íons monovalentes e divalentes e açúcares promoveram efeitos diversos sobre a atividade da β -xilosidase extracelular de *C. fimbriata* RM 35 (Tabela 4 e Figura 16). Dentre os íons metálicos analisados, a atividade da β -xilosidase sofreu maior redução na presença de sulfato ferroso, seguido de sulfato de cobre II, os quais promoveram perda de aproximadamente 34 e 30 % da atividade enzimática, respectivamente. Cloreto de alumínio promoveu discreta redução da atividade, em torno de 12%. Por outro lado, cloreto de potássio e sulfato de zinco exerceram pequeno efeito ativador na atividade enzimática.

Uma vez que a atividade enzimática não sofreu redução pela presença de EDTA, pode-se sugerir que não houve dependência de íons metálicos para a atividade catalítica da β -xilosidase, ou que esta não é uma metaloenzima. Ao contrário, a presença de EDTA promoveu pequeno aumento da atividade enzimática, que pode ser explicado pelo fato do EDTA, um agente quelante, ter seqüestrado algum íon que possivelmente interferia na atividade da β -xilosidase.

Pelo fato da atividade de β -xilosidase ter sido parcialmente reduzida na presença de SDS, pode-se deduzir que, nas condições do ensaio, a

integridade da estrutura tridimensional da enzima, fundamental para a atividade catalítica, foi comprometida em função da ação desnaturante desse detergente aniônico.

A β -xilosidase foi muito pouco ou não foi afetada por arabinose, frutose e glicose na concentração final de 10 mM. Entretanto, a atividade enzimática foi parcialmente inibida por xilose. A enzima manteve em torno de 65 % da atividade, o que demonstra que a enzima é inibida pelo seu produto.

Retenção de alta porcentagem da atividade de β -xilosidase na presença de detergente, alguns sais e EDTA, evidencia uma característica importante desta enzima, o que representa uma vantagem em aplicações industriais em que a presença destes compostos muitas vezes é necessária.

Contrariamente, Shao et al. (2011) estudaram a inibição de uma β -xilosidase pelo produto xilose. Os autores demonstraram que a enzima foi bastante tolerante a inibição pelo produto, em que até 70 mM de xilose não afetou a atividade enzimática e 70 % da atividade permaneceu quando a enzima foi submetida a 200 mM de xilose. De acordo com Zanoelo et al. (2004) a atividade da β -xilosidase do fungo *S. thermophilum* não foi afetada Mg^{+2} , Al^{+3} , Co^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2} , K^{+} , Ba^{+} e Fe^{+} a 1 mM e foi inibida 22, 100 e 91 % por Zn^{+2} , Ag^{+3} e Hg^{+2} , respectivamente. EDTA 1 mM inibiu a enzima em 20 %, enquanto cloreto de cálcio estimulou fortemente a atividade enzimática. De acordo com esses autores, a atividade não foi afetada por xilose, com ensaios realizados em concentrações de até 200 mM, sugerindo a alta tolerância à inibição pelo produto de hidrólise. De acordo com Guerfali et al. (2008) a atividade enzimática de β -xilosidase do fungo *T. thermophilus* foi inibida drasticamente por Hg^{+2} , Cu^{+2} e Zn^{+2} . A enzima foi também inibida na presença de SDS e EDTA, enquanto foi fortemente estimulado na presença de Ca^{+2} , Mn^{+2} e Co^{+2} . A enzima β -xilosidase do fungo *A. niger* foi inibida 58,5 e 72,5 %, por Cu^{+2} e Li^{+} , respectivamente e fracamente inibida por EDTA e SDS em aproximadamente 83 % (Amparo-Reyes et al., 2011). A enzima β -xilosidade de *S. tuberosum* apresentou maior atividade na

presença dos íons Mn^{+2} e Ca^{+2} na concentração de 10 mM e menor atividade na presença de Ni^{+2} e Cu^{+2} (Peyer et al., 2004).

5.1.4.7. Determinação da constante de inibição (K_i) da enzima β -xilosidase de *Ceratocystis fimbriata* RM 35 por xilose

Os dados apresentados na Figura 16 mostram que a enzima β -xilosidase do *C. fimbriata* foi parcialmente inibida por xilose. Os valores de K_i para a β -xilosidase na presença desse açúcar foi determinado utilizando o substrato p-NP- β Xil.

A figura 18 representa o gráfico do duplo recíproco, que relaciona a velocidade da reação de hidrólise de p-NP- β Xil pela β -xilosidase na ausência e na presença de diferentes concentrações de xilose. Observa-se que para uma mesma concentração do substrato p-NP- β Xil, a velocidade da reação é maior na ausência de xilose e, diminui com o aumento da concentração de xilose, caracterizando-se um efeito de inibição. A figura também mostra que as retas convergem para o mesmo ponto no eixo Y indicando que, o valor de V_{max} permanece constante, mesmo na presença do inibidor e a K_M diminui, sugerindo assim, uma inibição competitiva.

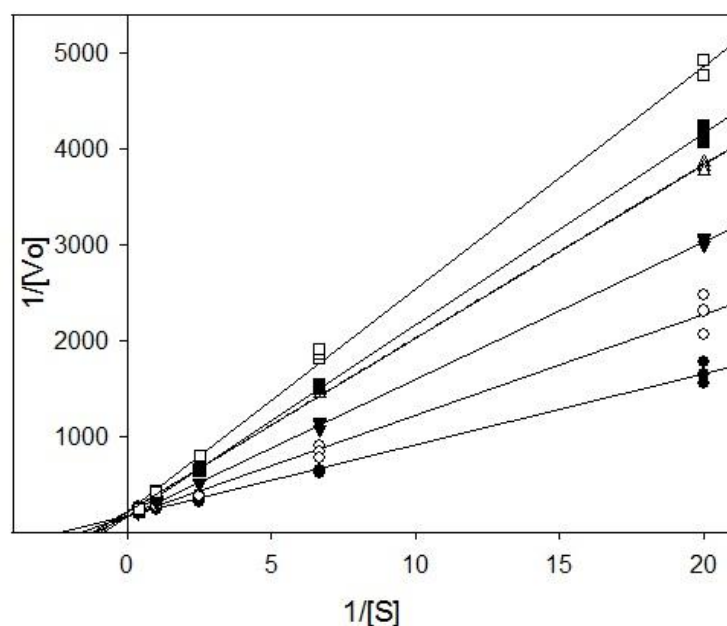


Figura 17. Gráfico do duplo recíproco, para um inibidor competitivo correlacionando o inverso da concentração de substrato p-NP- β Xil e o inverso da velocidade da reação na presença de várias concentrações de xilose 0,0 (●), 2,0 (○), 4,0 (▼), 6,0 (△), 8,0 (■) e 10 mM (□).

O tipo de inibição e o valor de K_i foram determinados pelo gráfico de Dixon (Figura 18) e pela equação de Michaelis-Menten, que se altera na presença do inibidor não competitivo $V_0 = (V_{\max} \cdot [S] / (\alpha \cdot K_M + [S]))$, onde $\alpha = 1 + ([I] / K_i)$ e $K_i = [E][I] / [EI]$. A inibição da hidrólise do substrato p-NP- β Xil pela β -xilosidase na presença do inibidor xilose mostrou ser do tipo competitiva com o valor de K_i de 4,79 mM.

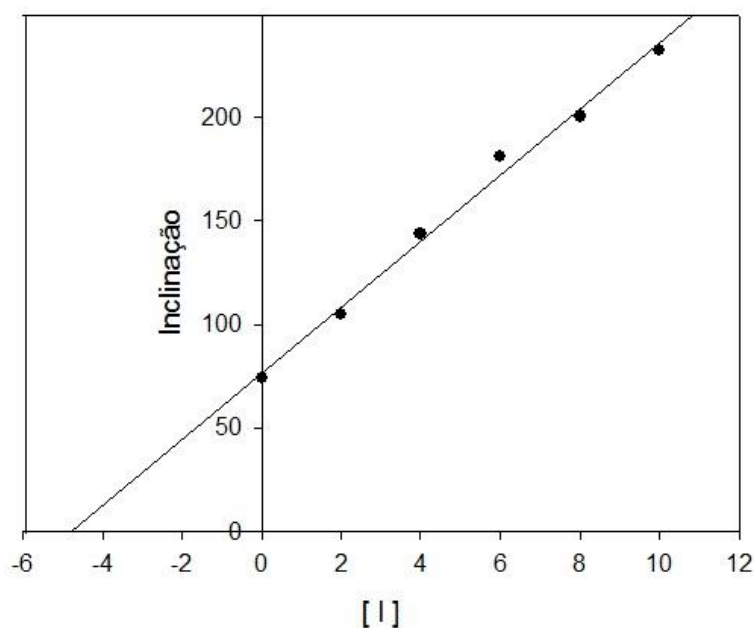


Figura 18. Gráfico de Dixon para um inibidor competitivo.

De acordo com a cinética de um inibidor competitivo (Figura 19), conforme aumentam a concentração do inibidor, maiores concentrações de substrato são necessárias para atingir uma determinada velocidade de reação. O que caracteriza a inibição competitiva é que ela pode ser anulada por uma concentração suficientemente alta de substrato.

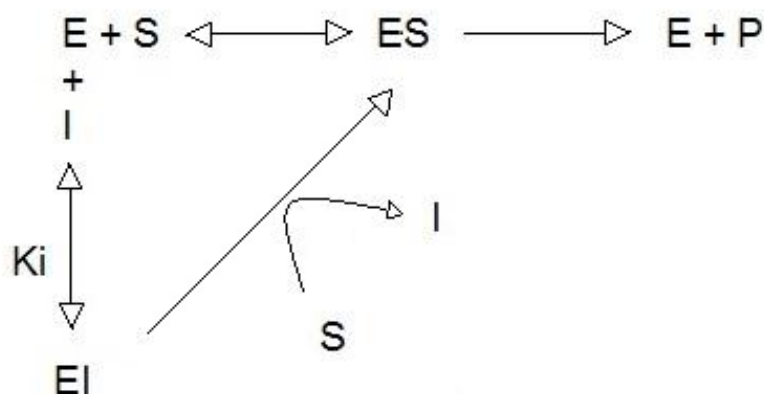


Figura 19. Reações de equilíbrio para um inibidor competitivo.

A maioria das β -xilosidases que foram caracterizadas são inibidas por xilose, e exibem um valor de K_i na faixa de 2 a 10 mM. Saha et al. (2003b) determinaram que a atividade de β -xilosidase do fungo *Fusarium proliferatum* com o substrato p-NP- β Xil foram inibidas na presença do inibidor xilose, com o valor de K_i de 5,0 mM. A enzima β -xilosidase do fungo *Trichoderma reesei* foi inibida por xilose com o substrato p-NP- β Xil e obteve um valor de K_i de 2,4 mM (Herrmann et al., 1997). Algumas β -xilosidases apresentam maior tolerância a xilose. Zhou et al. (2011) determinaram que a atividade de duas β -xilosidases identificadas por metagenoma do rúmem, com o substrato p-NP- β Xil foram inibidas na presença de xilose, com o valor de K_i de 76,0 e 10,6 mM. A atividade da β -xilosidase do fungo *Paecilomyces thermophila* foi determinada com o substrato p-NP- β Xil e foi competitivamente inibida por xilose com um valor de K_i de 139 mM (Yan et al., 2008).

6. CONCLUSÕES

- O fungo *Ceratocystis fimbriata* RM 35 produziu, em meio contendo farelo de trigo, uma β -xilosidase extracelular ácida, de massa molecular aproximada de 161,1 kDa, estimada por SDS-PAGE, e de 204,2 kDa, estimada por cromatografia de filtração em gel, sendo provavelmente um monômero.
- A β -xilosidase extracelular apresentou atividade máxima em pH 3,9 sendo extremamente instável quando exposta a pH superiores a pH 6.
- A β -xilosidase extracelular apresentou atividade máxima a 65 °C e demonstrou ser bastante termoestável a 60 °C, mantendo 70 % de sua atividade máxima por 24 h.
- A β -xilosidase purificada apresentou capacidade de hidrólise dos substratos sintéticos p -NP- β Xil e p -NP- β Gli e pelo substrato xilana birchwood e oat spelts.
- A enzima β -xilosidase apresentou valor de K_M para o substrato p -NP- β Xil de 0,326 mM.
- A β -xilosidase extracelular purificada foi parcialmente inibida por cloreto de alumínio, sulfato de cobre II, sulfato ferroso e SDS, todos nas concentrações finais de 1 mM.
- A enzima foi inibida competitivamente por xilose, com K_i de 4,79 mM

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas, A.C., Zauza, E.A.V., Mafia, R.G., Assis, T.F. (2004). Clonagem e doenças do eucalipto. **Ed. Viçosa MG. UFV.**
- Alfenas, A.C., Guimarães, L.M.S. (2007). Resistência genética em patossistemas florestais. **Fitopatologia Brasileira** **32** (Supl.): 89-91
- Amaro-Reyes, A., García-Almendárez, B.E., Vázquez-Mandujano, D.G., Amaya-Llano, S., Castaño-Tostado, E., Guevara-González, R.G., Loera, O., Regalado, C. (2011). Homologue expression of a b-xylosidase from native *Aspergillus niger*. **J Ind Microbiol Biotechnol**. Vol.38.p.1311–1319.
- Balat, M., Balat, H., Öz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**. Vol.34.p.551-553.
- Barnes, I., Gaur, A., Burgess, T., Roux, J., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. (2001). Microsatellite markers reflect similar relationships between isolates of the vascular wilt and canker pathogen *Ceratocystis fimbriata*. **Mol Plant Path.** Vol.2.p.319–325.
- Baker, C.J., Harrington, T.C., Krauss, U., Alfenas, A.C. (2003). Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**. Vol.93.p.1274-1284.
- Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Sewalt, V.J.H. (1995). Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Can. J. Anim. Sci.** Vol.75.p.641-644.
- Beylot, M.H., Emami, K., McKie, V.A., Gilbert, H.J., Pell, G. (2001). *Pseudomonas cellulosa* expresses a single membrane-bound glycoside hydrolase family 51 arabinofuranosidase. **Biochem J.** p.599-605.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**. Vol.8.p.93-99.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Vol.72.p.248-254.
- Brüx, C., Ben-David, A., Shallom-Shezifi, D., Leon, M., Niefind, K., Shoham, G., Shoham, Y., Schomburg, D. (2006). The structure of an inverting GH43 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its substrate reveals the role of the three catalytic residues. **J. Mol. Biol.** Vol.359.p.97-109.

Contreras, L.M., Gómez, J., Prieto, J., Clemente-Jiménez, J.M., Las Heras-Vázquez, F.J., Rodríguez-Vico, F., Blanco, F.J., Neira, J.L. (2008). The family 52 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* is a dimer: Structural and biophysical characterization of a glycoside hydrolase. **Biochim. Biophys. Acta** Vol.1784.p.1924-1934.

Falkoski, D.L. (2007). Purificação e caracterização de α -galactosidases do fungo *Penicillium griseoroseum* para utilização na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em derivados de soja. Universidade federal de Viçosa. Dissertação.

Ferreira, F.A., Demuner, A.M., Pigatto, S. (1999). Murcha-de-Ceratocystis em eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 32 (Supl.):284.

Ferreira, F.A., Maffia, L.A., Barreto, R.W., Demuner, N.L., Pigatto, S. (2006). Sintomatologia de murcha de *Ceratocystis fimbriata* em Eucalipto. **Revista Árvore**. Vol.30.p.155-162.

Goldman, N. (2009). Methods for optimizing enzymatic hydrolysis of xylan to improve xylooligosaccharide yield. *Basic biotechnology*. Vol.5.p.

Guerfali, M., Gargouri, A., Belghith, H. (2008). *Talaromyces thermophilus* β -D-Xylosidase: Purification, Characterization and Xylobiose Synthesis. **Appl Biochem Biotechnol**. Vol.150.p.267–279.

Halsted, B.D. (1980). Some fungous diseases of sweet potato. The black rot. **N.J. Ag. Exp. Sta. Bull**. Vol.76.p.7–14.

Harrington, T.C. (2000). Host specialization and speciation in the American wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. **Fitopath Brasil**. Vol.25.p.262–263.

Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J.P., Davies, G. (1995). Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. **Proc Natl Acad Sci USA**. Vol.92.p.7090–7094.

Henrissat, B., Davies, G.J. (2000). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. **Plant Physiol**. Vol.124.p.1515-1519.

Herrmann, M.C., Vrsanska, M., Jurickova, M., Hirsch, J., Biely, P., Kubicek, C.P. (1997). The b-D-xylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional b-D-xylan Xylohydrolase. **Biochem. J**. Vol.321.p.37-381.

Howard, R.L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E.L., Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African J. Biotechnol**. Vol.12.p.602-619.

Johnson, J.A., Harrington, T.C., Engelbrecht, C.J.B. (2005). Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex. **The Mycological Society of America**. Vol 97. p.1067-1092.

Jordan D.B., Li X.L. (2007). Variation in relative substrate specificity of bifunctional beta-D-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase by single site mutations: roles of substrate distortion and recognition. **Biochim Biophys Acta** Vol.1774. p.1192–1198.

Jordan, D.B., Li, X.L., Dunlap, C.A., Whitehead, T.R., Cotta, M.A. (2007). Structure-function relationships of a catalytically efficient β -D-xylosidase. **Appl. Biochem. Biotechnol.** Vol.141. p.51-76.

Kim, Y.A., Yoon, K-H. (2010). Characterization of a *Paenibacillus woosonggensis* β -xylosidase/ α -arabinofuranosidase produced by recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Microbiology Biotechnology**. Vol.20. p.1711–1716.

Kimura, I., Yoshioka, N., Tajima, S. (1999). Purification and Characterization of a β -Glucosidase with β -Xylosidase Activity from *Aspergillus sojae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Vol.87. p.538-541.

Kosugi A., Murashima K., Doi R.H. (2002). Xylanase and acetyl xylan esterase activities of xynA, a key subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome for xylan degradation. **Appl Environ Microbiol.** Vol.68. p.6399-6402.

La Grange, D.C., Pretorius, I.S., Claeyssens, M., Van Zyl, W.H. (2001). Degradation of Xylan to D-Xylose by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Coexpressing the *Aspergillus niger* β -Xylosidase (xlnD) and the *Trichoderma reesei* Xylanase II (xyn2) Genes. *Applied and environmental microbiology*. Vol.67. p.5512-5519.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**. Vol.227. p.680-683.

Lama, L., Calandrelli, V., Gambacorta, A., Nicolaus, B. (2004). Purification and characterization of thermostable xylanase and β -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. **Res. Microbiol.** Vol.155. p.283-289.

Lee, Y.E., Zeikus, J.G. (1993). Genetic organization, sequence and biochemical characterization of recombinant β -xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* strain B6A-R1. **J. Gen. Microbiol.** Vol.139. p.1235-1243.

Mattéotti, C., Haubruge, E., Thonart, P., Francis, F., Pauw, E.de, Portetelle, D., Vandenbol, M. (2009). Characterization of a new β -glucosidase/ β -xylosidase from the gut microbiota of the termite (*Reticulitermes santoniensis*). **FEMS Microbiology Letters**. Vol.314.p.147-157.

McIlvaine, T.C. (1921). A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Biochemistry**. Vol.49.p.183-186.

Michelin, M., Peixoto-Nogueira, S.C., Betini, J.H.A., da Silva, T.M., Jorge, J. A., Terenzi, H.F., Polizeli, M.L.T.M. (2010). Production and properties of xylanases from *Aspergillus terricola* Marchal and *Aspergillus ochraceus* and their use in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess Biosyst Eng**. Vol.33.p.813-821.

Miller, G.L. (1956). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. Vol.31.p.426-428.

Moure, A. Gullón, P., Domínguez, H., Parajó, J.C. (2006). Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochem**. Vol.41.p.1913-1923.

Mussatto, S.I., Roberto, I.C. (2002). Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Vol 38.nº4 .

Oguni, I., Uritani, I. (1974). Dehydroipomeamarone as an Intermediate in the Biosynthesis of ipomeamarone, a Phytoalexin from Sweet Potato Root Infected with *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Physiol**. Vol.53.p.649-652.

Oliveira, A.L. (2008). Estudos estruturais e dinâmicos da proteína elicitora cerato-platanina. Universidade Estadual de Campinas , SP. Tese

Pan, I-H., Yao, H.J., Li, Y.K. (2001). Effective extraction and purification of β -xylosidase from *Trichoderma koningi* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Enz.Microb.Technol**. Vol.28.p.196-201.

Peyer, C., Bonay, P., Staudacher, E.(2004). Purification and characterization of a β -xylosidase from potatoes (*Solanum tuberosum*). **Biochimica et Biophysica Acta**. Vol.1672.p.27– 35.

Sakka, K., Yoshikawa, K., Kojima, Y., Karita, S., Ohmiya, K., Shimada, K. (1993). Nucleotide sequence of the *Clostridium stercoarum* xylA gene encoding a bifunctional protein with β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase activities, and properties of the translated product. **Biosci.Biotechnol.Biochem**. Vol.57.p.268-272.

Saha, B.C. (2003a). Hemicellulose bioconversion. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**. Vol.30.p.279-291.

Saha, B.C. (2003b). Purification and properties of an extracellular b-xylosidase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Bioresource Technology**. Vol.90.p.33–38.

Segel, I.H. (1979). Bioquímica. Teoria e Problemas. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e científicos, 527p.

Shallom D., Shoham Y. (2003). Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**. p.219-228.

Shao, W., Wiegel, J. (1992). Purification and characterization of a thermostable β -xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. **J. Bacteriol.** Vol.174.p.5848-5853.

Shao, W., Xue, Y., Wu, A., Kataeva, I., Pei, J., Wu, H., Wiegel, J. (2011). Characterization of a Novel β -Xylosidase, XylC, from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. **Applied and environmental microbiology**. Vol.77. p. 719–726.

Shin, H-Y., Ji-Hyun Lee, J-H., Lee, J-Y., Han, Y-O., Han, M.J., Kim, D-H. (2003). Purification and Characterization of Ginsenoside Ra-Hydrolyzing β -D-Xylosidase from *Bifidobacterium breve* K-110, a Human Intestinal Anaerobic Bacterium. **Biol. Pharm. Bull.** Vol.26.p.1170-1173.

Shoham, Y., Lamed, R., Bayer, E.A. (1999). The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. **Trends Microbiol.** Vol.7.p.275-281.

Shulami, S., Gat, O., Sonenshein, A.L., Shoham, Y. (1999). The glucuronic acid utilization gene cluster from *Bacillus stearothermophilus* T-6. **J Bacteriol.** Vol.181.p.3695-3704.

Somera, A.F., Pereira, M.G., Guimarães, L.H.S., Polizeli, M.L.T.M., Terenzi, H.F., Furriel, R.P.M., Jorge, J.A. (2009). Effect of glycosylation on the biochemical properties of β -xylosidases from *Aspergillus versicolor*. **The journal of microbiology**. Vol.47.p.270-276.

St John, F.J., González, J.M., Pozharski, E. (2010). Consolidation of glycosyl hydrolase family 30: a dual domain 4/7 hydrolase family consisting of two structurally distinct groups. **FEBS Lett.** Vol.584.p.4435–4441

Sunna, A., Antranikian, G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.** Vol.17.p.39-67.

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2005). **Microbiologia**, 8ª edição, p.804.

Tsujibo, H., Takada, C., Tsuji, A., Kosaka, M., Miyamoto, K., Inamori, Y. (2001). Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding an intracellular β -D-xylosidase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** Vol.65.p.1824-1831.

Vries, R.P., Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiol Mol Biol Rev.** Vol.65.p.497-522.

Wagschal, K., Heng, C., Lee, C.C., Wong, D.W.S. (2009a). Biochemical characterization of a novel dual-function arabinofuranosidase/xylosidase isolated from a compost starter mixture. **Appl Microbiol Biotechnol.** Vol.81.p.855–863.

Wagschal, K., Heng, C., Lee, C.C., Robertson, G.H., Orts, W.J. Wong, D.W. (2009b). Purification and characterization of a glycoside hydrolase family 43 β -xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08. **Appl. Biochem. Biotechnol.** Vol.155.p.304-313.

Wagschal, K., Franqui-Espiet, D., Lee, C.C., Robertson, G.H., Wong, D.W.S. (2008). Cloning, Expression and Characterization of a Glycoside Hydrolase Family 39 Xylosidase from *Bacillus Halodurans* C-125. **Appl Biochem Biotechnol.** Vol.146.p.69-78

Wakiyama, M., Yoshihara, K., Hayashi, S., Ohta, K. (2008). Purification and Properties of an Extracellular β -Xylosidase from *Aspergillus japonicus* and Sequence Analysis of the Encoding Gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** Vol. 106.p.398-404.

Webster, R.K., Butler, E.E. (1967). A morphological and biological concept of the species *Ceratocystis fimbriata*. **Can J Bot.** Vol.45.p.14

Xue, Y., Shao, W. (2004). Expression and characterization of a thermostable β -xylosidase from the hyperthermophile, *Thermotoga maritima*. **Biotechnol. Lett.** Vol.26.p.1511-1515.

Yan, Q.J., Wang, L., Jiang, Z.Q., Yang, S.Q., Zhu, H.F., Li, L.T. (2008). A xylose-tolerant beta-xylosidase from *Paecilomyces thermophila*: characterization and its co-action with the endogenous xylanase. **Bioresour Technol.** Vol.13.p.5402-10.

Zanoelo, F.F., Polizeli, M.L.T.M., Terenzi, H.F., Jorge, J.A. (2004). Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. **J Ind Microbiol Biotechnol.** Vol.31.p.170–176.

Zhang, J., Lynd, L.R. (2010). Ethanol production from papersludge by simultaneous saccharification and co-fermentation using recombinant xylose-fermenting microorganisms. **Biotechnol. Bioeng.** Vol.107.p. 235-244.

Zhou, J., Bao, L., Chang, L., Zhou, Y., Lu, H. (2011). Biochemical and kinetic characterization of GH43 β -D-xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase and GH30 α -L-arabinofuranosidase/ β -D-xylosidase from rumen metagenome.