

Universidade de São Paulo  
FMRP – Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

*Produção, propriedades bioquímicas e  
funcionais do sistema xilanolítico de Aspergilli  
e aplicação biotecnológica no branqueamento da  
polpa de celulose e em ração animal*

Simone de Carvalho Peixoto-Nogueira

*Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto, como  
parte das exigências para a obtenção do  
título de Doutor em Bioquímica.*

Ribeirão Preto – SP/2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo  
FMRP – Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

*Produção, propriedades bioquímicas e  
funcionais do sistema xilanolítico de Aspergilli  
e aplicação biotecnológica no branqueamento da  
polpa de celulose e em ração animal*

Orientada: Simone de Carvalho Peixoto-Nogueira  
Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

*Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto, como  
parte das exigências para a obtenção do  
título de Doutor em Bioquímica.*

Ribeirão Preto – SP/2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

Peixoto-Nogueira, S.C.

Produção, propriedades bioquímicas e funcionais do sistema xilanolítico de *Aspergilli* e aplicação biotecnológica no branqueamento da polpa de celulose e em ração animal.

218p. il., 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Polizeli, Maria de Lourdes T.M.

1. *Aspergillus*; 2. xilanase; 3. biobranqueamento da polpa kraft; ração animal

**Um pouco de ciência nos afasta de Deus.  
Muita, nos aproxima.**  
Louis Pasteur

**À minha família, carinhosamente dedico este trabalho...**

Ao meu marido **Rodrigo**, um grande presente que Deus me reservou! A você agradeço todo o carinho e companheirismo. Esteve sempre comigo quando precisei, especialmente durante a realização deste trabalho. Obrigada pela compreensão nos momentos de minha ausência (especialmente enquanto estive fora do Brasil) e por toda confiança sempre dedicada a mim. Por tudo isso, a cada dia te amo mais e mais.

Às pessoas mais fortes, honestas e batalhadoras que conheço: meus pais **Waldomiro** e **Siodéria**. Muito, muito obrigada por estarem ao meu lado sempre! Presentes em cada etapa de minha formação contribuindo para meu enriquecimento intelectual, moral e espiritual. A vocês devo absolutamente tudo que sou. Para mim vocês são a referência do que há de melhor no ser humano. A minha amada irmã **Fernanda**, minha boneca, meu presente, minha flor. Obrigada por ter tornado minha vida ainda melhor, mais feliz e mais completa. Sempre sonhei em ter uma irmã e hoje tenho a irmã que sonhei. Minha eterna admiração por você, pela mulher forte em que se transformou.

Aos meus avós **Oswaldo** e **Marlene**, mais um dos grandes amores de minha vida! Sempre presentes e prontos para me ampararem a qualquer momento, vocês com certeza foram os anjos-de-guarda que Deus misericordiosamente colocou em minha vida! Devo muito mais que palavras de agradecimento por tudo que já fizeram a mim...

À minha tia **Silvana**, tio **Mauro** e primo **Renan**. Obrigada pelo companheirismo, por sempre torcerem a meu favor e me apoiarem em qualquer decisão tomada por mim. Amo vocês! Aos meus outros primos que adoro **Wanier** e **Lidiane** também dedico este trabalho com muito carinho.

E, por que não, também agradecer ao meu singelo cachorro **Zeus**? Meu companheiro fiel que NUNCA foi dormir enquanto eu estivesse acordada escrevendo este trabalho ou fazendo qualquer coisa do meu Doutorado! A ele agradeço a fiel e incansável companhia.

# *Agradecimientos*

A vida é feita de pequenos sonhos a que aspiramos. Minha entrada na universidade e o Mestrado foram grandes sonhos concretizados e o Doutorado é mais um que acabo de alcançar. Durante toda essa caminhada sempre contei com o auxílio de Deus e agora, como nos demais instantes de minha vida, não poderia deixar de agradecer-lhe por sempre ter estado presente, seja me auxiliando com bons pensamentos e inspirações, seja afagando meus cabelos em momentos de desânimo e insegurança. Ao Senhor, Pai de todos nós, agradeço a concretização de mais um sonho, mais uma etapa cumprida em minha vida.

Meu carinhoso agradecimento à Profa. Dra. Maria de Lourdes T. M. Polizeli. Sua presença e criteriosa orientação foram muito importantes em cada etapa deste trabalho! A você, que sempre se mostrou disposta a enriquecê-lo, agradeço pelo conhecimento compartilhado, incentivo, carinho e dedicação dispensados. Obrigada também por alguns “puxões de orelha” que fizeram de mim uma profissional melhor.

Ao Prof. Dr. João Atilio Jorge também deixo um agradecimento todo especial! Obrigada pelo conhecimento compartilhado e por sua enorme vontade de ensinar e ajudar. Saiba que suas sugestões foram valiosíssimas. Agradeço também pelo convívio sempre agradável e bem humorado.

Ao Prof. Dr. Héctor Francisco Terenzi, meus carinhosos agradecimentos por sua colaboração. Durante nossa convivência sempre pude contar com suas sugestões que tanto enriqueceram este trabalho e todos os artigos publicados.

Ao Prof. Dr. Luís Henrique Souza Guimarães, meus agradecimentos pelo convívio descontraído.

Ao Prof. Dr. Jayme Eyzaguirre do Laboratório de Bioquímica da Universidad Andrés Bello de Santiago do Chile, agradeço por me receber em seu laboratório onde pude aprender a fundo muitas técnicas de biologia molecular e proteômica. Agradeço também aos alunos Carolina Klages, Mário Navarrete, Cláudia Cortes, Álvaro Gonçalves e Andréa que compartilharam muito conhecimento comigo, me receberam carinhosamente no Chile e fizeram de tudo para que minha viagem fosse incrível.

Ao ex-aluno Jorge Henrique Almeida Betini pelo auxílio na determinação de número kappa, alvura e viscosidade da polpa de celulose.

Ao Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis pelo auxílio durante os testes com ração para ruminantes realizado no Departamento de Forragicultura da Unesp – Campus Jaboticabal. Agradeço também à aluna Liandra Bertipágli pelo auxílio durante os experimentos.

Ao Prof. Dr. Richard Ward do Departamento de Química da FFCLRP/USP por me receber em seu laboratório para as análises de dicroísmo circular. Agradeço também aos Doutores Roberto Ruller e Tatiana Lopes Ferreira por me auxiliarem nessas análises.

Ao Prof. Dr. Gutemberg por permitir a utilização do Laboratório de Microscopia Eletrônica, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, da FMRP/USP para realização dos estudos de microscopia



eletrônica de varredura da polpa de celulose. Obrigada também aos funcionários Maria Dolores Seabra Ferreira e José Augusto Maulim pelo auxílio técnico.

À Profa. Elza Tiemy Sakamoto Hojo do setor de Genética, Departamento de Biologia da FFCLRP por permitir a realização dos testes de citotoxicidade em seu laboratório e à aluna Giovana da Silva Leandro pelo auxílio.

À técnica Izaura Ioshico Irata do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo, por realizar o seqüenciamento dos aminoácidos das xilanases purificadas.

Aos amigos e amigas do laboratório: Michele (amigaaaaaa), Juliana (companheira e amiga pra todas as horas), Maller (amigo paranaense, daí), André (pai do Caio), Vivian, Ana Vicci, Fernanda Facchini e Rose (que me salvaram muitas vezes com seus notebooks), Tatiane (muito engraçada, me diverti demais), Mariele, Allana, Marita, Cynthia, Eloíza, Jean, Bruninha, Felipe (Magal) e Beraba.

Aqueles que deixaram o laboratório, mas que deixaram muita saudade: Valéria (Variolinha), Carol Rizzatti, Jorge, Mônica (Moniquita), Alexandre (violinista) e meus amados e especiais amigos Allan Pádua, Priscila Okanno e Fabiana Zanoelo. Muita saudade! Muita mesmo!

Agradeço muito ao funcionário, colega e amigo Ricardo Fernandes Alarcon por nosso bem humorado convívio e pelo enorme apoio técnico que você incansavelmente dedica aos alunos da Lu. Seu trabalho foi fundamental à realização deste Doutorado.

Agradeço imensamente à Ivone, secretária da Pós-Graduação da Bioquímica, pela inesgotável vontade de ajudar, eficiência e eterno bom humor. Meus agradecimentos também aos funcionários da Pós-Graduação pela atenção e enorme disponibilidade.

Às amigas (de fora do ambiente de trabalho) Doéze e Denise, meu agradecimento e carinho pelos momentos agradáveis que passamos. Adoro vocês! À vocês agradeço em especial por terem sido tão minhas companheiras de MSN enquanto eu estava fora. Vocês ajudaram a diminuir a solidão e a saudade enorme que eu estava de casa!

Ao CNPq e ao projeto Biota-FAPESP pelo apoio financeiro.

À Universidade de São Paulo por minha formação acadêmica e por me possibilitar conviver com verdadeiros artistas. Artistas ou cientistas? Tanto faz! Ciência e arte caminham de mãos dadas. Quem faz ciência faz arte. O poeta traduz a vida em verso; quem faz ciência (principalmente dentro da biologia) também traduz a vida em versos... Quem faz ciência faz poesia!

Agradeço a meu pai (Prof. Waldomiro W. Peixoto) pela criteriosa revisão de texto.

Muito Obrigada!

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Mercado de enzimas.....	2
1.2 Conversão da biomassa.....	4
1.3 Estrutura da madeira .....	7
1.4 Os sistemas enzimáticos em estudo .....	8
1.4.1 Hemiceluloses, hemicelulases e o sistema xilanolítico.....	8
1.4.2 A lignina e o sistema ligninolítico.....	14
1.5 Regulação dos sistemas enzimáticos em estudo .....	18
1.5.1 Regulação do sistema xilanolítico .....	18
1.5.2 Regulação do sistema ligninolítico .....	20
1.6 Aplicação biotecnológica das enzimas em estudo.....	21
1.6.1 Aplicação biotecnológica na indústria de papel e celulose.....	21
1.6.2 Aplicação biotecnológica na indústria de rações.....	27
1.6.3 Outras aplicações biotecnológicas .....	29
1.7 O género <i>Aspergillus</i> e o ciclo de vida .....	30
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>

<b>III. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
3.1 Coleta e isolamento de fungos filamentosos.....	38
3.2 Isolamento e seleção dos microrganismos para produção de xilanase .....	38
3.3 Manutenção da cepa.....	40
3.4 Condições de cultivo .....	41
3.4.1 Fermentação submersa (FSbm) .....	41
3.4.2 Fermentação Submersa e Pré-Cultivo .....	45
3.4.3 Fermentação substrato-sólido (FSS) .....	45
3.5 Obtenção das preparações enzimáticas .....	46
3.5.1 Fermentação Submersa / Fermentação Submersa com Pré-Cultivo.....	46
3.5.2 Fermentação substrato-sólido .....	46
3.6 Dosagens enzimáticas.....	47
3.6.1 Dosagem das enzimas do complexo xilanolítico .....	47
3.6.1.1 Xilanase .....	47
3.6.1.2 $\beta$ -xilosidase, acetil-xilanoesterase e arabinofuranosidase .....	48
3.6.2 Dosagem do complexo ligninolítico.....	49
3.6.2.1 Manganês peroxidase (Mn-P) .....	49
3.6.2.2 Lignina peroxidase (Li-P) .....	49
3.6.2.3 Lacase .....	50
3.7 Dosagem protéica.....	50
3.8 Biomassa úmida .....	50
3.9 Procedimentos de purificação enzimática.....	51
3.10 Caracterização bioquímica .....	51
3.10.1 Influência de complexos na atividade xilanásica.....	52
3.10.2 Determinação dos produtos de hidrólise por análise cromatográfica em camada delgada de sílica (TLC) .....	52
3.10.3 Determinação do conteúdo de carboidratos.....	53

3.10.4 Dicroísmo circular .....	53
3.10.5 Sequenciamento de aminoácidos.....	54
3.11 Estudos eletroforéticos .....	54
3.11.1 Análises em SDS-PAGE .....	55
3.11.2 Análises em PAGE 4,5.....	55
3.11.3 Análises em PAGE 8,9.....	56
3.12 Impregnação e revelação por prata.....	56
3.12.1 Solução de pré-tratamento .....	57
3.12.2 Solução de impregnação.....	57
3.12.3 Solução de revelação.....	57
3.12.4 Solução inibitória do processo de revelação.....	58
3.13 Determinação da massa molecular por FPLC .....	58
3.14 Estudos do potencial de aplicação biotecnológica do complexo xilanolítico .....	58
3.14.1 Biobranqueamento da polpa de celulose .....	58
3.14.1.1 Consistência das polpas (%) .....	59
3.14.1.2 O tratamento enzimático das polpas .....	59
3.14.1.3 Determinação do número kappa.....	60
3.14.1.4 Determinação da viscosidade .....	62
3.14.1.5 Determinação da alvura.....	62
3.14.2 Utilização de xilanases em alimentos para ruminantes.....	63
3.14.2.1 Avaliação da digestibilidade <i>in vitro</i> de diferentes volumosos na presença de xilanase .....	63
3.14.2.2 Avaliação da atividade da xilanase no ambiente ruminal .....	65
3.14.2.3 Avaliação da atividade das xilanases na degradação <i>in vitro</i> da matéria seca e fibra de volumosos através do uso da produção de gás.....	65
3.14.3 Citotoxicidade.....	67
3.15 Estudos de microscopia.....	69

3.15.1 Microscopia óptica de luz .....	69
3.15.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	69
3.16 Reprodutibilidade.....	71

#### **IV. RESULTADOS ..... 72**

##### **Parte I: Reflorestamento USP, Campus Ribeirão Preto: coleta, isolamento, catalogação e prospecção de fungos filamentosos ..... 73**

4.1.1 Coleta, isolamento e catalogação de fungos filamentosos.....	74
4.1.2 <i>Screening</i> de fungos filamentosos produtores de xilanase .....	74

##### **Parte II: Otimização das condições de cultivo para produção de XILANASES por *Aspergillus niveus* e *Aspergillus fumigatus*, LIGNINASES por *Aspergillus niveus* e caracterização dos respectivos extratos brutos ..... 79**

4.2.1 Xilanases.....	80
4.2.1.1 Otimização das condições de cultivo dos fungos <i>Aspergillus niveus</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	80
4.2.1.2 Caracterização dos extratos brutos produzidos pelos fungos <i>Aspergillus niveus</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	87
4.2.2 Ligninases.....	91
4.2.2.1 Otimização das condições de cultivo de <i>Aspergillus niveus</i> .....	91
4.2.2.2 Caracterização do extrato bruto produzido por <i>Aspergillus niveus</i> .....	95

##### **Parte III: Estudo do potencial de aplicação biotecnológico das enzimas produzidas por *Aspergillus niveus* e/ou *Aspergillus fumigatus* ..... 96**

4.3.1 Biobranqueamento da polpa Kraft de celulose para a fabricação de papel.....	97
4.3.3.1 Utilização de xilanases de <i>Aspergillus niveus</i> ou <i>Aspergillus fumigatus</i> no tratamento da polpa de celulose.....	97
4.3.1.2 Utilização de ligninases de <i>Aspergillus niveus</i> e/ou <i>MIX</i> de xilanases e ligninases de <i>Aspergillus niveus</i> .....	100

4.3.1.3	Análise das polpas de celulose em microscopia eletrônica de varredura ....	101
4.3.2	Adição de enzimas xilanolíticas em rações para ruminantes .....	102
4.3.3	Estudo da citotoxicidade dos extratos brutos produzidos por <i>Aspergillus niveus</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	113
<b>Parte IV: Purificação e caracterização bioquímica de duas xilanases produzidas por <i>Aspergillus niveus</i> e caracterização bioquímica das diferentes isoformas .....</b>		<b>119</b>
4.4.1	Purificação enzimática .....	123
4.4.2	Caracterização das isoformas purificadas .....	130
4.4.2.1	Determinação da temperatura e pH ótimos de reação, termoestabilidade e estabilidade ao pH.....	130
4.4.2.2	Influência de compostos sobre as atividades xilanásicas .....	136
4.4.2.3	Determinação do conteúdo de carboidratos.....	136
4.4.2.4	Análise dos produtos de hidrólise em TLC .....	139
4.4.2.5	Seqüenciamento de aminoácidos e determinação da estrutura secundária por dicroísmo circular (DC) .....	139
<b>V. DISCUSSÃO .....</b>		<b>145</b>
<b>VI. CONCLUSÃO .....</b>		<b>171</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>174</b>
<b>VIII. ANEXOS .....</b>		<b>207</b>
ANEXO A	.....	208
ANEXO B	.....	210
<b>VIX. APÊNDICE.....</b>		<b>211</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aplicação de enzimas industriais em diferentes setores .....	3
<b>Figura 2.</b> Exportações e Importações de enzimas industriais.....	5
<b>Figura 3.</b> Diagrama dos processos de conversão energética da biomassa .....	7
<b>Figura 4.</b> Estrutura da parede celular de madeiras moles e madeiras duras .....	9
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática de uma molécula de xilana e das enzimas do sistema xilanolítico.....	11
<b>Figura 6.</b> Precusores da lignina .....	15
<b>Figura 7.</b> Regulação da biossíntese de enzimas xilanolíticas.....	19
<b>Figura 8.</b> Esquema representativo de um processo de produção da polpa de celulose .....	23
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática da parede celular secundária.....	24
<b>Figura 10.</b> Ciclo de vida de <i>Aspergillus nidulans</i> .....	33
<b>Figura 11.</b> Fotografia dos microrganismos em estudo .....	34
<b>Figura 12.</b> Fotos aéreas do reflorestamento do Campus da USP de Ribeirão Preto .....	39
<b>Figura 13.</b> Fotos dos fungos em placa de Petri coletados no reflorestamento.....	76
<b>Figura 14.</b> Tempo e temperatura de cultivo dos fungos <i>Aspergillus fumigatus</i> e <i>Aspergillus niveus</i> para produção de xilanase .....	82
<b>Figura 15.</b> Influência da aeração no cultivo de <i>Aspergillus fumigatus</i> e <i>Aspergillus niveus</i> para a produção de xilanase .....	84
<b>Figura 16.</b> Determinação das atividades acetil-xilanoesterásica e L-arabinofuranosidásica .....	88

- Figura 17.** Efeito da temperatura e do pH na reação enzimática; termoestabilidade e estabilidade ao pH das xilanases extracelulares de *A. fumigatus* e *A. niveus* ..... 90
- Figura 18.** Efeito da temperatura e do pH na reação enzimática; termoestabilidade e estabilidade ao pH das ligninases extracelulares produzidas por *A. niveus* ..... 96
- Figura 19.** Análise através de microscopia de varredura da polpa de celulose antes e após o tratamento enzimático para a retirada de xilana e/ou lignina presente na fibra de celulose ..... 103
- Figura 20.** Desempenho das xilanases em rúmen de caprinos ..... 106
- Figura 21.** Digestibilidade "*in vitro*" dos componentes da fração fibrosa do capim Marandú após diferentes tempos de incubação ..... 109
- Figura 22.** Digestibilidade "*in vitro*" dos componentes da fração fibrosa do capim Jaraguá após diferentes tempos de incubação ..... 110
- Figura 23.** Digestibilidade "*in vitro*" dos componentes da fração fibrosa de silagem de milho após diferentes tempos de incubação ..... 111
- Figura 24.** Digestibilidade "*in vitro*" dos componentes da fração fibrosa da cana-de-açúcar após diferentes tempos de incubação ..... 112
- Figura 25.** Determinação da citotoxicidade dos extratos brutos dos fungos *Aspergillus niveus* e *Aspergillus fumigatus* ..... 118
- Figura 26.** Efeito da adição de cicloheximida na incubação e secreção de xilanase ... 124
- Figura 27.** Perfil de eluição de xilanase de *A. niveus* em DEAE-celulose, CM-celulose e Biogel P-60 ..... 125
- Figura 28.** Perfil eletroforético das xilanases puras produzidas por *Aspergillus niveus* em SDS-PAGE – 11% pH 8,9 ..... 127



<b>Figura 29.</b> Perfil eletroforético das xilanases purificadas a partir do extrato bruto produzido por <i>Aspergillus niveus</i> em condições não-desnaturantes. PAGE - 6%....	128
<b>Figura 30.</b> Determinação por FPLC da massa molecular das xilanases puras produzidas por <i>Aspergillus niveus</i> .....	129
<b>Figura 31.</b> Determinação da temperatura e do pH de reação da xilanase CMC 2 e biogel 2.....	131
<b>Figura 32.</b> Determinação da estabilidade ao pH das xilanases purificadas e produzidas por <i>Aspergillus niveus</i> .....	134
<b>Figura 33.</b> Determinação da termoestabilidade das xilanases produzidas por <i>Aspergillus niveus</i> .....	135
<b>Figura 34.</b> Cromatografia em camada delgada de sílica .....	140
<b>Figura 35.</b> Alinhamentos da sequência de aminoácidos – CMC 2.....	142
<b>Figura 36.</b> Alinhamentos da sequência de aminoácidos - biogel 2 .....	143
<b>Figura 37.</b> Dicroísmo circular (DC) das xilanases purificadas.....	144

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Balança comercial do Brasil referente às exportações e importações.....	5
<b>Tabela 2.</b> Famílias glicosídeo hidrolases .....	14
<b>Tabela 3.</b> Comparação entre os ciclos sexual e parassexual.....	32
<b>Tabela 4.</b> Coleta realizada .....	40
<b>Tabela 5.</b> Fungos filamentosos coletados .....	75
<b>Tabela 6.</b> Seleção do microrganismo para produção de xilanases.....	77
<b>Tabela 7.</b> Seleção do melhor meio de cultura para produção de xilanases pelos fungos <i>Aspergillus niveus</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	81
<b>Tabela 8.</b> Seleção da melhor fonte de carbono para a produção de xilanase e extracelular .....	86
<b>Tabela 9.</b> Determinação da atividade ligninolítica do fungo <i>Aspergillus niveus</i> em meio líquido.....	92
<b>Tabela 10.</b> Determinação do tempo de cultivo para a produção de ligninases pelo fungo <i>Aspergillus niveus</i> em FSS. Atividade (%) de lacase, Mn-P e Li-P .....	93
<b>Tabela 11.</b> Determinação da melhor solução de sais para induzir a produção de enzimas ligninolíticas pelo fungo <i>A. niveus</i> .....	94
<b>Tabela 12.</b> Biobranqueamento da polpa de celulose por xilanases produzidas por <i>Aspergillus fumigatus</i> e <i>Aspergillus niveus</i> .....	99
<b>Tabela 13.</b> Biobranqueamento da polpa de celulose com ligninases ou ligninases + xilanase produzida por <i>Aspergillus niveus</i> .....	101
<b>Tabela 14.</b> Digestibilidade <i>in vitro</i> (%) de diferentes volumosos na presença de xilanases produzidas por <i>Aspergillus niveus</i> .....	104

<b>Tabela 15.</b> Composição bromatológica de diferentes volumosos .....	107
<b>Tabela 16.</b> Produção de gases durante a digestão <i>in vitro</i> do capim marandú em diferentes tempos de fermentação.....	114
<b>Tabela 17.</b> Produção de gases durante a digestão <i>in vitro</i> do capim jaraguá em diferentes tempos de fermentação.....	115
<b>Tabela 18.</b> Produção de gases durante a digestão <i>in vitro</i> da silagem de milho em diferentes tempos de fermentação.....	116
<b>Tabela 19.</b> Produção de gases durante a digestão <i>in vitro</i> da cana-de-açúcar em diferentes tempos de fermentação.....	117
<b>Tabela 20.</b> Determinação do tempo de cultivo para o fungo <i>Aspergillus niveus</i> em sistema de pré-cultivo em meio com glicose .....	121
<b>Tabela 21.</b> Determinação de vários parâmetros de cultivo do fungo <i>A. niveus</i> ....	122
<b>Tabela 22.</b> Purificação das xilanases produzidas por <i>Aspergillus niveus</i> .....	126
<b>Tabela 23.</b> Efeito da adição de íons no ensaio enzimático da xilanase pura (CMC 2) produzida por <i>Aspergillus niveus</i> .....	137
<b>Tabela 24.</b> Efeito da adição de íons no ensaio enzimático da xilanase pura biogel 2 produzida por <i>Aspergillus niveus</i> .....	138

## RESUMO

Por meio de um programa de bioprospecção foram selecionados dois bons produtores de xilanases: *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niveus*, os quais foram cultivados em meio líquido mínimo de Vogel ou Czapeck, suplementados com xilana birchwood 1% para *A. fumigatus* e *A. niveus*, respectivamente, a 40°C, condições estáticas, durante 96 ou 120 horas, respectivamente. A produção xilanásica também foi elevada em resíduos agroindustriais como flocos de arroz, farelo de trigo, sabugo de milho, milho moído e palha de arroz - *A. fumigatus*; farelo de trigo e milho moído - *A. niveus*. Os ótimos de temperatura corresponderam a 70°C ou 60-65°C para *A. fumigatus* e *A. niveus*, respectivamente, enquanto que os ótimos de pH de reação corresponderam a 5,0-5,5 e 4,5-5,0. A termoestabilidade das enzimas brutas foram similares a 60°C durante 30 minutos. Após este período a atividade residual da xilanase de *A. fumigatus* reduziu consideravelmente e, após 120 minutos, restou apenas 10% de sua atividade inicial, enquanto que a xilanase de *A. niveus* ainda manteve 30% de sua atividade. Frente a diferentes pHs as xilanases de ambos os fungos mantiveram 100% da atividade inicial em pHs 6,0-8,0 (*A. fumigatus*) ou em 4,5-6,0 (*A. niveus*).

Para as ligninases (Iacase, Mn-P e Li-P) as condições de cultivo padronizadas foram FSS com farelo de trigo como fonte de carbono durante 14, 21 e 35 dias, respectivamente. A adição de fonte de nitrogênio inorgânica favoreceu a síntese dessas enzimas e as temperaturas de reação corresponderam a 60°C - Iacase e Mn-P ou 70°C - Li-P; a faixa de pH de maior atividade variou de 4,0-7,0. Mn-P e Li-P não perderam nem mesmo 50% de sua atividade após uma hora em temperaturas de 25-80°C, já a Iacase perdeu 50% em temperaturas de 75-80°C.

No biobranqueamento da polpa de celulose os resultados foram promissores: xilanase de *A. niveus* diminuiu 4,6 pontos do número kappa, aumentou 3,4 pontos na alvura e manteve a viscosidade; xilanase de *A. fumigatus* reduziu 0,9 pontos do kappa, aumentou 2 pontos na alvura e reduziu 9,2% na viscosidade. Para o *mix* de xilanases/ligninases de *A. niveus* houve redução de 6,5 pontos do kappa, aumento de 17,2 pontos na alvura e a viscosidade reduziu 1 ponto. Por meio de microscopia eletrônica de varredura confirmou-se a eficiência desses tratamentos.

Nos testes *in vitro* realizados no setor de rações houve um aumento de

6,0-10,8% na digestibilidade *in vitro* e, nos testes *in vivo*, as xilanases de *A. niveus* mantiveram-se estáveis por até 8 horas dentro do rúmen de caprinos. Houve também uma maior liberação de gases na presença das enzimas produzidas por *A. niveus*, um outro indicativo de maior digestibilidade. Os extratos brutos de *A. niveus* e *A. fumigatus* não apresentaram nenhum caráter citotóxico.

Para purificar duas das isoformas de xilanase produzidas por *A. niveus* utilizou-se tratamento com caulin e colunas cromatográficas de troca iônica e de exclusão de massa molecular; *A. niveus* produziu, pelo menos, seis isoformas xilanolíticas, das quais duas foram purificadas. Seus respectivos fatores de purificação foram 4407,0 e 612,1 vezes para as xilanases denominadas de CMC 2 e biogel 2, respectivamente. Já as massas moleculares corresponderam a 52,5 e 21,8 kDa em SDS-PAGE; por FPLC foram 19,5 kDa para ambas as isoformas purificadas. Verificou-se que compostos como trealose, sorbitol e glicerol protegeram as xilanases puras e aumentaram sua termoestabilidade. As xilanases CMC 2 e biogel 2 apresentaram, respectivamente, 33,8% e 11,56% de carboidratos na molécula. A isoforma CMC 2 teve sua atividade aumentada na presença de alguns compostos como  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $\beta$ -mercaptoetanol e cisteína e, análises em TLC confirmaram que ambas as isoformas tratavam-se de endoxilanases. Estudos de dicroísmo circular confirmaram se tratar de duas xilanases, uma vez que os perfis dessas análises indicaram proteínas ricas em cadeias  $\beta$ -folha como deve ser uma xilanase. Já as análises de seqüenciamento de aminoácidos mostraram uma grande identidade entre a seqüência das xilanases de *A. niveus* e xilanases de outros microrganismos.

## ABSTRACT

In a bioprospection program two good xylanase producers were selected: *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niveus*, which were cultivated on Vogel or Czapeck minimum liquid medium, supplemented with 1% birchwood xylan, at 40°C, under static conditions, for 96 or 120 hours, respectively. The xylanase production was high in agro industrial residues such as rice flakes, wheat bran, crushed corncob, powdered corncob or rice straw for *A. fumigatus*; and wheat bran or powdered corncob for *A. niveus*. The temperature optimum corresponded to 70°C or 60-65°C for *A. fumigatus* and *A. niveus* xylanases, respectively, while the pH optimum corresponded to 5.0-5.5 and 4.5-5.0. The thermostability of the crude enzymes was similar at 60°C for 30 minutes. After this period the enzyme residual activity of *A. fumigatus* was considerably reduced and, after 120 minutes there was only 10% of the initial activity, while the xylanases from *A. niveus* still maintained 30% of activity. In different pH it was maintained 100% of initial activity in pH 6.0-8.0 (*A. fumigatus*) and 4.5-6.0 (*A. niveus*).

For ligninases (laccase, Mn-P and Li-P) the culture conditions were optimized in FSS using wheat bran as carbon source, during 14, 21 and 35 days, respectively. The addition of inorganic nitrogen sources was favorable to the synthesis of the ligninolytic system which assay temperature corresponded to 60°C for laccase and Mn-P, or 70°C for Li-P; the pH range of activity varied from 4.0-7.0. Mn-P and Li-P maintained more than 50% of initial activity after one hour at temperatures from 25-80°C, but laccase lost 50% in temperatures from 75-80°C.

The results of cellulose pulp biobleaching were promissory: *A. niveus* xylanase reduced 4.6 points kappa number, increased whiteness 3.4 points, and did not affect the viscosity; xylanase from *A. fumigatus* reduced 0.9 points kappa, increased 2 points whiteness and reduced 9.2% viscosity. With the mix of xylanases/ligninases from *A. niveus* there was a reduction of 6.5 points kappa, increase 17.2 points whiteness and reduced viscosity 1 point. Using scanning electronic microscopy it was confirmed the efficiency of these treatments.

In the tests for the animal feed sector carried out *in vitro*, it was noticed an improvement in digestibility from 6.0-10.8%. In the *in vivo* tests the stability of xylanases from *A. niveus* was maintained into goats rumen conditions up to 8 hours.

There was a higher liberation of gases in the presence of the enzymes produced by *A. niveus*, another indicative of better digestibility. The crude extracts from *A. niveus* and *A. fumigatus* did not present cytotoxic effects.

To purify two of the six xylanases produced by *A. niveus* it was used Kaulin treatment, ion exchange chromatography, and molecular mass exclusion; two isoforms produced by *A. niveus* were purified and named CMC 2 and biogel 2. Their respective purification factors were 4407.0 and 612,1-fold. The molecular mass on SDS-PAGE corresponded to 52.5 and 21.8 kDa, but on FPLC their respective values were both 19.5 kDa. It was verified that compounds as trehalose, sorbitol and glycerol protected the purified xylanases. They presented, respectively, 33.8% and 11.56% of carbohydrate in the molecule. The CMC 2 isoform improved the activity in the presence of some compounds as  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $\beta$ -mercaptoethanol and cistein; TLC analysis confirmed that both isoforms were endoxylanases. Circular dichroism analysis either confirmed that the proteins corresponded to xylanases because the results were similar to a secondary structure of  $\beta$ -sheet as a xylanase should be. The aminoacid sequence analysis of the xylanases from *A. niveus* showed identity with the xylanases from other microorganisms.

# *I. Introdução*



Enzimas com potencial de aplicação biotecnológica podem ser de origem vegetal (papaína, bromelina,  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase), animal (pepsina, pancreatina, lipases e esterases) e microbiana (xilanases, glicose-isomerase, glicose-oxidase, catalase,  $\alpha$ -amilase, glucoamilase, ciclomaltodextrina-D-glucotransferases (CGTases), pectinases, celulases, lipases, proteases (ácidas neutras e alcalinas), pululanase, uricase, fosfatases e ligninases (Mn-peroxidase, lignina-peroxidase e lacase)) – SAID & PIETRO (2002).

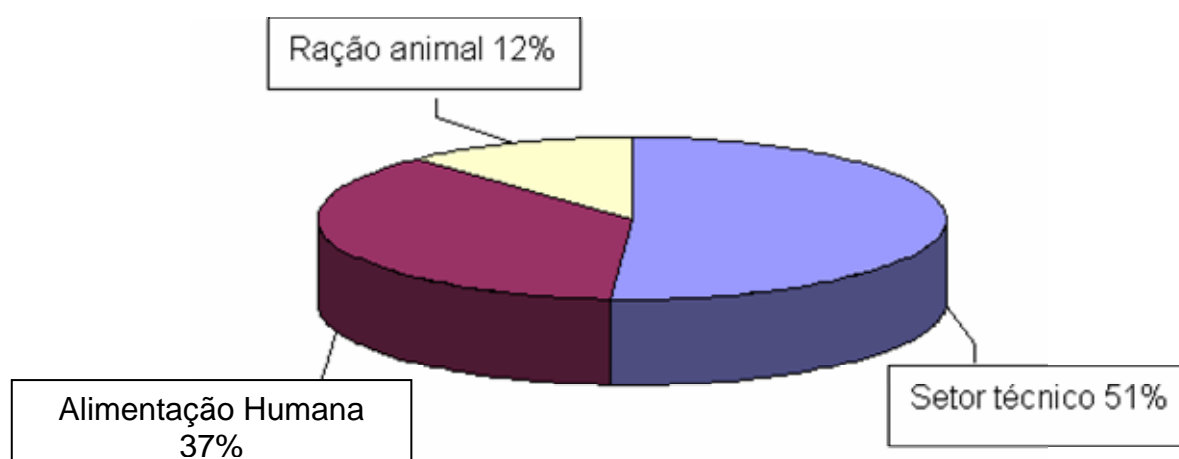
Os microrganismos proporcionam uma produção maior, mais rápida e mais facilmente controlada de seus metabólitos (entre eles as enzimas) e, por este motivo, as enzimas de origem microbiana são preferencialmente utilizadas pela indústria. Além da facilidade de produção, os produtos de origem microbiana são produzidos independente de condições geográficas/sazonais e são menos onerosos, uma vez que se pode utilizar substratos baratos como resíduos agroindustriais.

Os estudos acerca da aplicação de fungos na indústria (chamado de micotecnologia - BENNETT, 1998), são peça fundamental para o desenvolvimento biotecnológico. Além da aplicação dos fungos filamentosos na produção controlada de enzimas, esses microrganismos são também utilizados para a produção de muitos outros metabólitos de interesse para diferentes áreas da indústria biotecnológica. Assim, pesquisadores da área de microbiologia aplicada têm buscado novas cepas capazes de produzir metabólitos e enzimas com potencial biotecnológico.

### **1.1 Mercado de enzimas**

De acordo com o "Business Communications Co", o mercado global para enzimas industriais aumentou de US\$ 2.2 bilhões em 2006 para uma estimativa de US\$ 2.3 bilhões no final de 2007. Os principais setores que consomem enzimas (**figura 1**)

representam, respectivamente, o de alimentos e ração animal de detergentes e produtos de limpeza, produtos químicos, têxteis, couro e pele e polpa e papel. A maior velocidade de crescimento é esperada no setor de ração animal, ajudado em grande parte pelo aumento do uso de fitases em ração de monogástricos. Essas fitases propiciam o aproveitamento do fitato presente na ração animal e reduz o P orgânico liberado como resíduo nas fezes, lembrando que este P representa grande problema ambiental devido a poluição do solo e conseqüente contaminação de lençóis freáticos (Polizeli, 2008a).



**Figura 1.** Aplicação de enzimas industriais em diferentes setores. Valores em porcentagem. ID: BIO030E, publicado em janeiro de 2008 (YATIN & THAKORE, <http://www.bccresearch.com>; Polizeli, 2008a).

Segundo dados recentes do Ministério do desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (<http://www.portaldoexportador.gov.br>) o Brasil apresentou o perfil de comércio indicado em 2007 onde mais importa que exporta na maioria das mercadorias envolvendo preparados enzimáticos (**tabela 1**). Analisando dados obtidos em 1997, 2001, 2004 e 2007, referentes às exportações e importações

(<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>), observa-se que houve aumento da exportação de enzimas produzidas no Brasil, mas o déficit ainda é predominante (**figura 2**). Fica evidente que o mercado de enzimas industriais é pequeno no país, frente à demanda mundial. Portanto, o uso de enzimas como catalisadores de processos industriais é de fundamental importância para a obtenção de produtos de alta qualidade por tecnologias limpas, em sintonia com as necessidades tecnológicas, de mercado e de preservação ambiental.

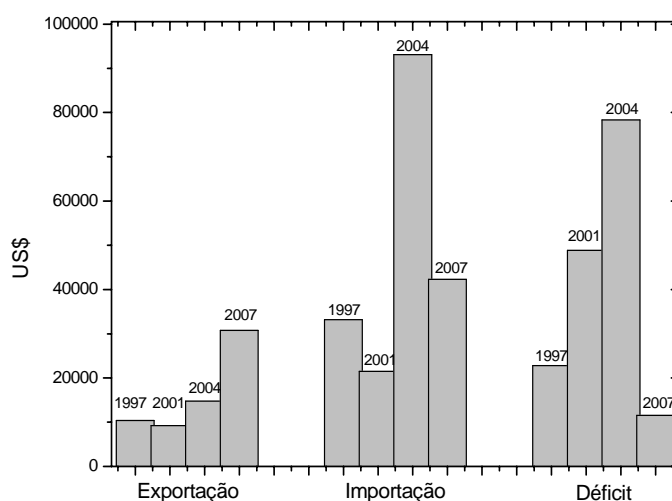
## **1.2 Conversão da biomassa**

A renovação da biomassa na natureza é de suma importância para a manutenção do fluxo de carbono e essencial para o funcionamento dos ecossistemas florestais. A reciclagem dessa matéria orgânica é realizada, principalmente, por microrganismos decompositores - obtém energia a partir de matéria orgânica em decomposição – (ARO *et al.*, 2005). Dentre os carboidratos presentes nesta biomassa, a xilana, é o segundo mais abundante polissacarídeo natural (POLIZELI *et al.*, 2005; KAMBOUROVA *et al.*, 2007), portanto, a importância das xilanases na renovação da biomassa na natureza é enorme, sendo produzida, principalmente, por fungos filamentosos.

A degradação enzimática de polímeros é um processo natural que pode ser utilizado em diferentes setores da indústria e constitui numa alternativa bem mais atraente do que a utilização de substâncias químicas e processos mecânicos. Assim, utilizar fontes renováveis de energia é indispensável para um rápido desenvolvimento da indústria alimentícia, bebidas, têxtil, papel e

**Tabela 1.** Balança comercial do Brasil referente às exportações e importações de 2007.

Preparação enzimática	Valores em US\$ FOB 2007		
	Exportação	Importação	Saldo
Amilases e seus derivados	2.091.200	918.990	1.172.210
Proteases e seus derivados	13.884.417	2.220.012	11.664.405
Celulases e seus derivados	472.404	969.203	-496.799
Enzimas Preparadas à base de Transglutaminase	22.663	118.681	-96.018
Outras enzimas e seus concentrados	5.398.321	9.143.886	-3.745.565
Outras enzimas preparadas	6.685.271	24.285.761	-17.600.490
Medicamento com outras enzimas, não contendo vitaminas e etc., exc. Doses	1.963.863	3.633.956	-1.670.093
Medicamento contendo outras enzimas, em doses	245.440	1.013.373	-767.933
<b>Total</b>	<b>30.763.579</b>	<b>42.303,862</b>	<b>-11.540.283</b>

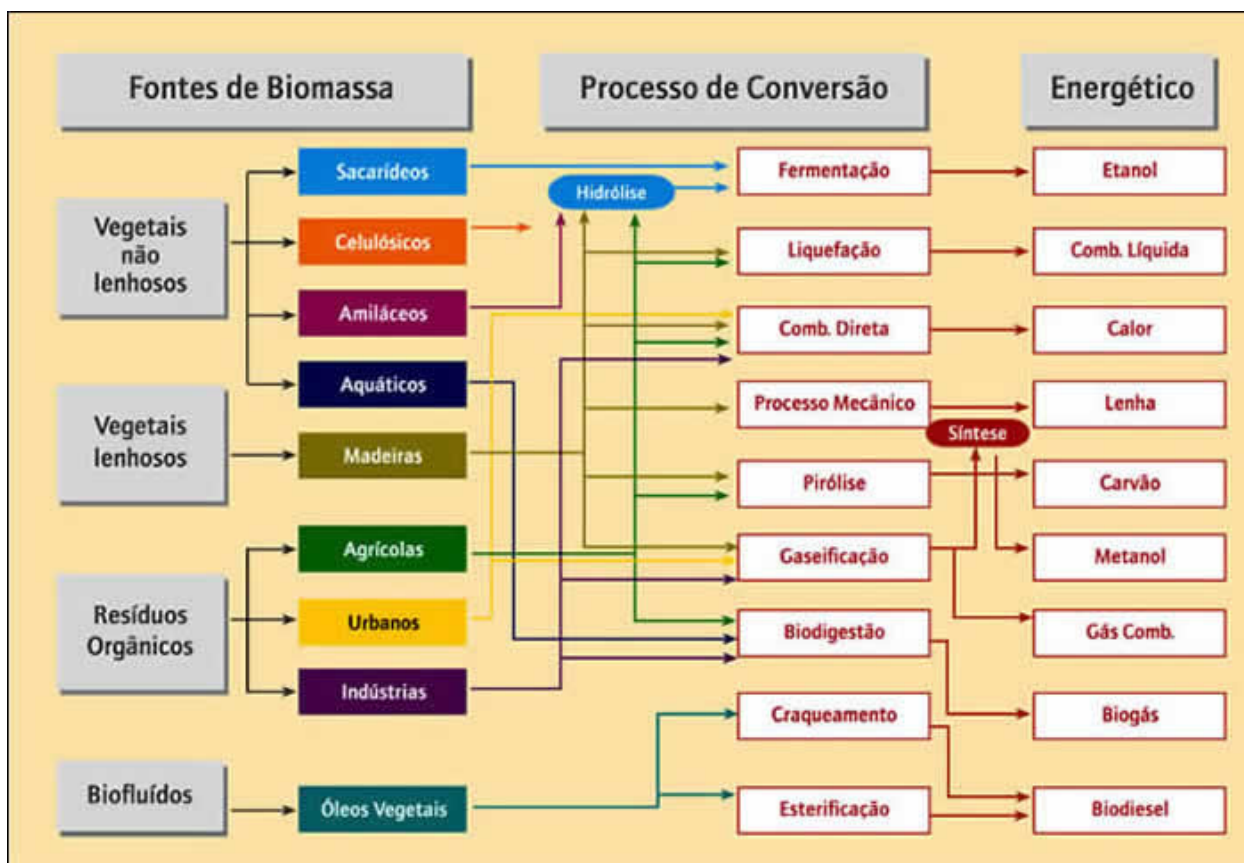


**Figura 2.** Exportações e Importações de enzimas industriais referentes aos anos de 1997, 2001, 2004 e 2007. Valores expressos em dólares. Dados extraídos do site: <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>.

celulose entre outros processos de produção. Para aumentar a eficiência dos processos de conversão da biomassa e reduzir impactos socioambientais, tem-se desenvolvido e aperfeiçoado tecnologias mais eficientes como a gaseificação e a pirólise (**figura 3**), sendo também comum a co-geração de sistemas de conversão enzimática e fermentação (GRAY *et al.*, 2006).

Segundo dados da agência internacional de energia, estima-se que, atualmente a biomassa possa representar até cerca de 14% de todo o consumo mundial de energia primária. Em alguns países em desenvolvimento, essa parcela pode aumentar para 34%, chegando a 60% na África. No Brasil, a imensa superfície territorial, quase toda localizada em regiões tropicais e chuvosas, oferece excelentes condições para a produção e uso energético da biomassa em larga escala, além da produção de álcool, queima em fornos, caldeiras e outros usos.

No caso específico do Estado de São Paulo, é intensa a produção de biomassa energética por meio da cana-de-açúcar, a maior parte destinada à produção do etanol e, por isso, o estado é o grande exportador de álcool para o resto do país. Verifica-se, portanto, que, apesar da produção de biomassa demandar grandes extensões de terras, mesmo em regiões com alta densidade demográfica, ainda é possível encontrar áreas para essa atividade.



**Figura 3.** Diagrama esquemático dos processos de conversão energética da biomassa. Fonte: BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL - BEN. Brasília: MME, 1982.

Durante os últimos 35 anos, muito progresso foi feito no sentido de se determinar as características estruturais dos polissacarídeos que compõem a biomassa e caracterizar as enzimas responsáveis por sua degradação.

### 1.3 Estrutura da madeira

A madeira é um complexo constituído por substâncias naturais como **celulose** (40-50%), **hemicelulose** (20-35%), **lignina** (15-35%), além de **proteínas** e **compostos fenólicos** unidos por ligações intermoleculares formando uma rede complexa. Entretanto, é importante lembrar que a composição química da

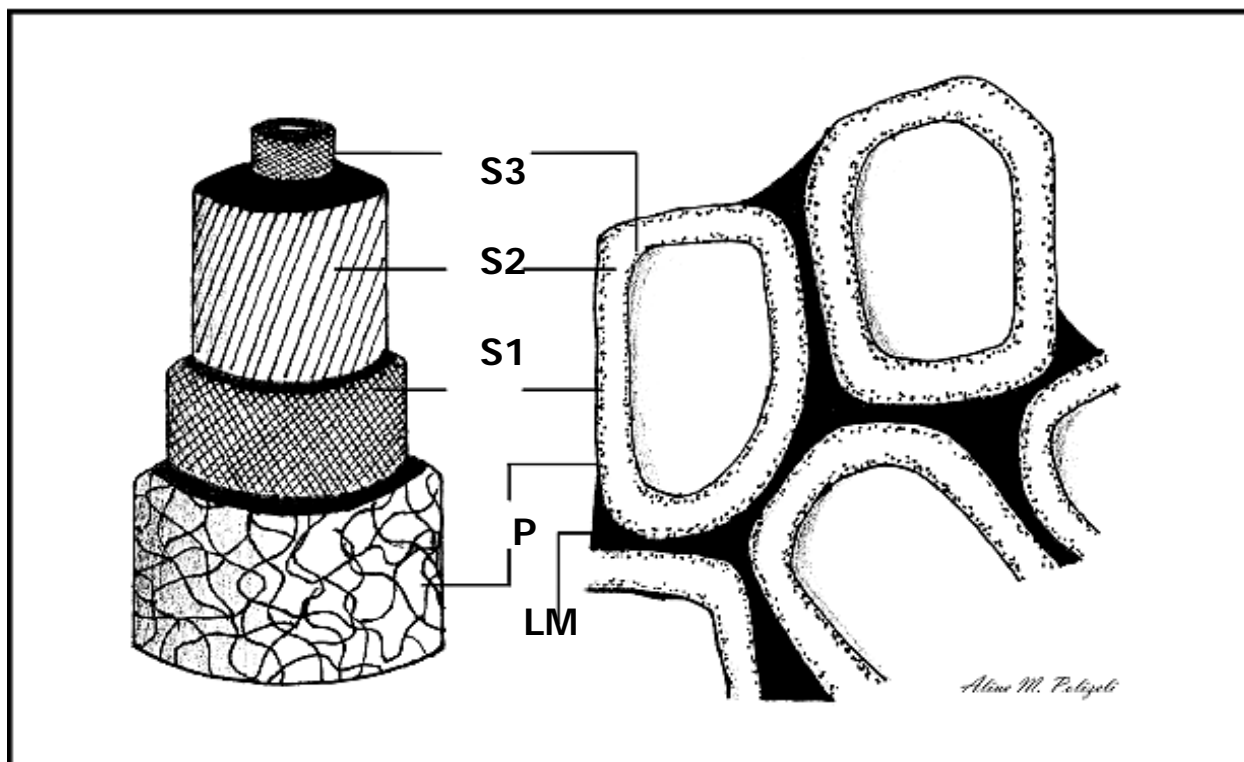
parede também depende da espécie arbórea, das condições do clima e do solo, de características genéticas, altura do tronco, amostragem e do próprio método de análise (TIMELL, 1965; SAKA, 2001; POLIZELI, 2008b).

O esquema abaixo (**figura 4**) mostra de que maneira as substâncias contituíntes da madeira estão organizadas formando a parede celular vegetal. Em cada camada as porcentagens de celulose, hemicelulose e lignina variam em proporção. A parede celular primária (P) possui 10, 20 e 70% de celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente. Já na parede celular secundária, formada por três camadas (S1, S2 e S3), a proporção desses componentes (celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente) correspondem a 35, 25 e 40% em S1, 55, 30, e 15% em S2 e 55, 40, 5% em S3. Na lamela média (LM) a proporção desses componentes corresponde a 0, 10 e 90% (Polizeli, 2008b).

## **1.4 Os sistemas enzimáticos em estudo**

### **1.4.1 Hemiceluloses, hemicelulases e o sistema xilanolítico**

As hemiceluloses são classificadas de acordo com o açúcar presente em sua molécula. Assim, a xilana é um homopolímero linear que contém monômeros de  $\beta$ -D-xilopiranosil unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (SUBRAMANIYAN & PREMA, 2002; POLIZELI *et al.*, 2005) que, na natureza, geralmente está associada a outros açúcares, formando glucuronoxilanas, glucuronoarabinoxilanas, glucomananas, arabinogalactanas e galactoglucomananas.



**Figura 4.** Esquema básico da estrutura da parede celular de madeiras moles e de madeiras duras. LM - lamela média; P - parede celular primária e camadas da parede celular secundária S1, S2 e S3 (modificado de Polizeli, 2008b).

A xilana é a principal hemicelulose de madeiras provenientes de angiospermas (15-30% do peso seco total), sendo menos abundante em madeiras de gimnospermas (7-12%). Em madeiras duras (angiospermas), a xilana é formada por pelo menos 70 resíduos de  $\beta$ -xilopiranosil (**figura 5**). Cada décimo resíduo de xilose carrega um ácido  $\alpha$ -4-*O*-metilglucurônico. Além disso, estas xilanas são altamente acetiladas (70%). A acetilação pode ocorrer tanto no C2, quanto no C3, conferindo à xilana sua parcial solubilidade em água. Por estas razões são denominadas *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilana. Já em madeira mole (gimnospermas) a xilana é composta por arabino-4-*O*-metilglucuronoxilana, apresentando um conteúdo maior em ácido 4-*O*-metilglucurônico do que as madeiras duras (**figura 5**).

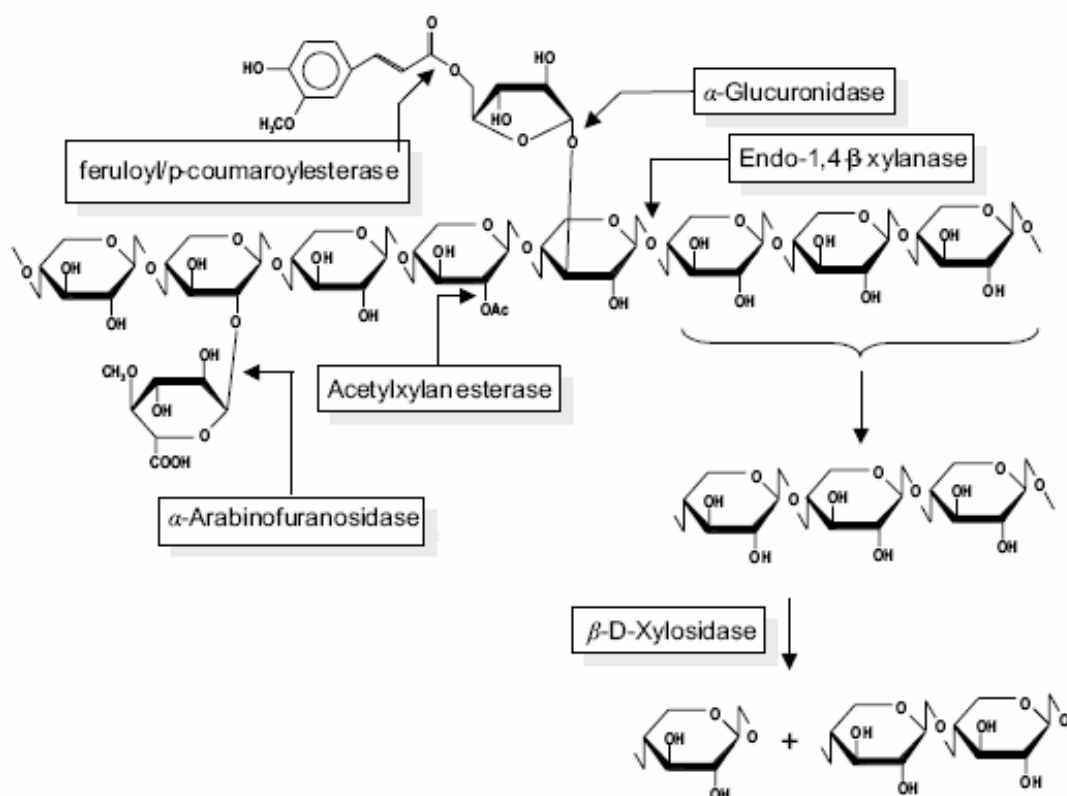


Porém, as xilanas de madeira mole não são acetiladas, e no lugar do grupo acetil apresentam um grupo  $\alpha$ -L-arabinofuranosil unidos ao C3 da xilose por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,3. (FERREIRA-FILHO, 1994; SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997; POLIZELI *et al.*, 2005).

Devido a sua heterogeneidade estrutural, a degradação da xilana requer a ação de várias enzimas, ou seja, de um sistema enzimático que se encontra presente em fungos e bactérias.

As enzimas pertencentes ao sistema xilanolítico são:

- **$\beta$ -1,4-endoxilanase** (1,4- $\beta$ -D-xilana xilohidrolase; EC 3.2.1.8): cliva ligações glicosídicas internas da cadeia principal da xilana, acarretando diminuição do grau de polimerização do substrato. Essa clivagem não ocorre ao acaso, uma vez que as ligações a serem hidrolisadas dependem da natureza do substrato, isto é, do comprimento, do grau de ramificação e da presença de substituintes (LI *et al.*, 2000; POLIZELI *et al.*, 2005; PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2008a). Inicialmente, os principais produtos formados são os xilooligossacarídeos (CHÁVEZ *et al.*, 2006). Várias classificações são atribuídas para as endoxilanases sendo que WONG *et al.* (1988) dividem as endoxilanases em **não desramificadoras**, as quais não catalisam a hidrólise nos pontos de ramificação 1,3- $\alpha$ -1-arabinofuranosil de arabinoxilanas, em adição à hidrólise das ligações da cadeia principal e, portanto, não liberam arabinose; e **desramificadoras**, as quais hidrolisam os pontos de ramificação, liberando arabinose. A presença de cada forma individual foi relatada em diversos fungos. No entanto, há aqueles que são capazes de produzir ambas as formas de xilanas, o que resulta em maior eficiência na hidrólise de xilana.



**Figura 5.** Representação esquemática de uma molécula de xilana e das enzimas do sistema xilanolítico (POLIZELI, 2008b).

- **β-D-xilosidase** (β-D-xilosídeo xilohidrolase; EC 3.2.1.37): tem sido classificada de acordo com sua afinidade relativa junto à xilobiose e xilooligossacarídeos maiores. Xilobiases e exo-β-xilanases podem ser reconhecidas como entidades distintas (Biely, 1985; 1993), mas, aqui serão referidas como β-xilosidasas que hidrolisam xilooligossacarídeos pequenos e xilobiose a partir da extremidade não redutora, liberando xilose. As β-xilosidasas purificadas geralmente não hidrolisam xilana, sendo a xilobiose seu melhor substrato (CHÁVEZ *et al.*, 2006). Já a afinidade por xilooligossacarídeos é inversamente proporcional ao seu grau de polimerização. Essas enzimas são capazes de clivar substratos artificiais, como *p*-

nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo e *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (KURAKABE, 1997).

- **Acetil-xilanaesterase** (EC 3.1.1.6): remove os substituintes *o*-acetil a partir da posição C2 e/ou C3 dos resíduos de xilose na acetilxilana (CAUFRIER *et al.*, 2003; CHÁVEZ *et al.*, 2006). Tem função importante na sacarificação da xilana, uma vez que a retirada de grupos acetil presentes na cadeia principal da xilana facilita a ação de endoxilanasas, a qual pode estar inibida parcialmente devido a impedimentos estéricos.

- **Arabinase**: remove os resíduos de L-arabinose substituídos no C3 das unidades de xilose, podendo ser dividida em exo- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) que degrada *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeos e arabinanas ramificadas, e endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinase (EC 3.2.1.99), que hidrolisa somente arabinanas lineares. A maioria das arabinases estudadas é do tipo exo (DE VRIES *et al.*, 2000).

- **$\alpha$ -Glucuronidase** (EC 3.2.1): hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,2 entre ácido glucurônico e resíduos de xilose na glucuronoxilana (CHÁVEZ *et al.*, 2006). Alguns microrganismos apresentam atividade máxima somente quando substratos glucuronoxilana curtos são utilizados. Entretanto, a especificidade da enzima junto ao substrato varia de acordo com a fonte microbiana (TENKANEN & SIIKA-AHO, 2000).

- **Ácido ferúlico esterase** (EC 3.1.1) e **ácido *p*-coumárico esterase** (EC 3.1.1): clivam ligações éster na xilana, respectivamente, entre as cadeias laterais de arabinose e do ácido ferúlico, e entre arabinose e ácido *p*-coumárico (WILLIAMSON *et al.*, 1998; CREPIN *et al.*, 2004; CHÁVEZ *et al.*, 2006).

A heterogeneidade e complexidade da xilana têm resultado em uma diversidade de xilanasas com seqüência primária, enovelamento e especificidade variada, levando a limitações quanto à classificação dessas enzimas por

especificidade de substrato somente. WONG *et al.* (1988) classificaram xilanases baseado em suas propriedades físico-químicas e propôs dois grupos: aquelas com um baixo peso molecular (< 30kDa) e pI básico, e aquelas com um alto peso molecular (> 30kDa) e pI ácido. Contudo várias exceções para este modelo têm sido encontradas (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997). Assim, um sistema de classificação mais complexo foi introduzido, baseado em comparação da estrutura primária dos domínios catalíticos e em enzimas com famílias de seqüências relacionadas (HENRISSAT *et al.*, 1989; HENRISSAT & COUTINHO, 2001).

Enzimas, dentro de uma família particular, têm estrutura tri-dimensional (HENRISSAT & COUTINHO, 2001) e mecanismo molecular similares (GEBLER *et al.*, 1992). Tem-se sugerido também que elas podem apresentar uma especificidade similar de ação em substratos pequenos, solúveis e sintéticos (CLAEYSSENS & HENRISSAT, 1992). A evolução divergente tem resultado em algumas famílias tendo estrutura tri-dimensional relacionada. Portanto, o grupamento dessas famílias em níveis hierárquicos mais altos, conhecidos como clã, tem sido criados (BOURNE & HENRISSAT, 2001).

Dentro desse sistema de classificação, xilanases são normalmente reportadas como sendo restritas as famílias 10 e 11 (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997; TORRONEN & ROUVINEN, 1997; SUBRAMANIYAN & PREMA, 2002). No entanto, uma busca minuciosa na literatura disponível mostra que as famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43 (**tabela 2**) contêm xilanases com domínios catalíticos distintos com atividade endo-1,4- $\beta$ -xilanase.

Membros dessas famílias diferem em suas propriedades físico-químicas, estrutura, modo de ação e especificidade ao substrato, embora semelhanças

existam. Por exemplo, as famílias 5 e 10 são classificadas em clã GH-A, indicando um enovelamento tri-dimensional similar. As famílias 5, 7, 10 e 11 contêm enzimas que catalisam a hidrólise com retenção da configuração anomérica com dois resíduos de glutamato, estando envolvidas no mecanismo catalítico em todos os casos. Em contraste, enzimas das famílias 8 e 43 tipicamente funcionam com uma inversão do centro anomérico e acredita-se que um resíduo de glutamato e um de aspartato fazem parte do resíduo catalítico (COLLINS *et al.*, 2005).

**Tabela 2.** Famílias glicosídeo hidrolases contendo enzimas com atividade demonstrada em xilana. O enovelamento, mecanismo de ação e resíduos catalíticos característicos para cada família estão mostrados.

Família Glicosídeo Hidrolase	Membros com uma atividade demonstrada em xilana	Enovelamento	Clã	Mecanismo catalítico	Resíduo ácido-base geral	Base geral/nucleofílica
5	8	( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub>	GH-A	Retido	Glutamato	Glutamato
7	1	$\beta$ -jelly roll	GH-B	Retido	Glutamato	Glutamato
8	4	( $\alpha/\alpha$ ) <sub>6</sub>	GH-M	Invertido	Glutamato <sup>a</sup>	Aspartato <sup>a</sup>
10	127	( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub>	GH-A	Retido	Glutamato	Glutamato
11	173	$\beta$ -jelly roll	GH-C	Retido	Glutamato	Glutamato
43	1	5-Blade $\beta$ -propeller	GH-F	Invertido	Glutamato <sup>a</sup>	Aspartato <sup>a</sup>

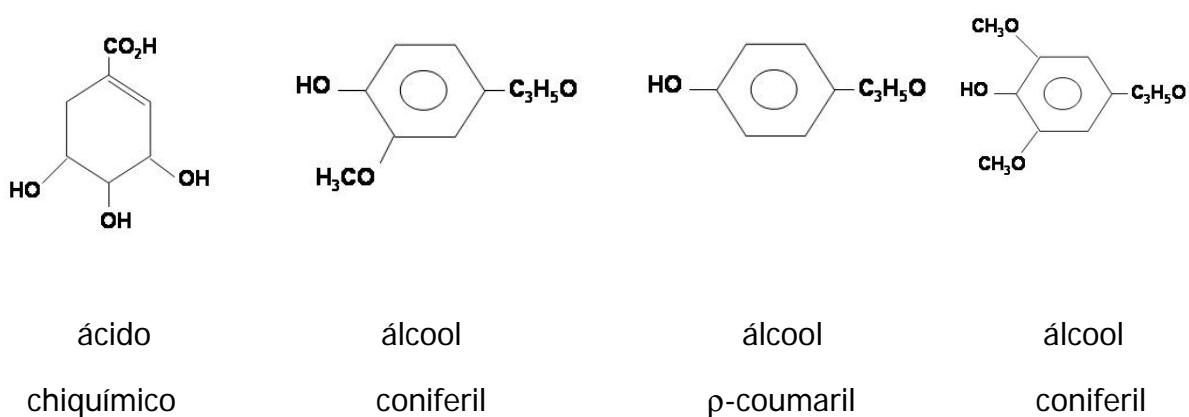
<sup>a</sup> Suposto resíduo catalítico, estes não têm sido confirmados decisivamente.

#### 1.4.2 A lignina e o sistema ligninolítico

A lignina ou lenhina é um polímero tridimensional amorfo encontrado nas plantas terrestres. Trata-se de um polímero amorfo complexo composto de unidades de fenil propano (C9) unidas por diferentes tipos de ligações que se encontra associado à parede celular, cuja função é a de conferir rigidez, impermeabilidade e

resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais (BANOUB *et al.*, 2007).

A lignina é formada pela polimerização dos álcoois cumaril, coniferil e sinapil. É justamente a proporção entre esses três compostos que vai resultar nas ligninas de diferentes tipos. Esses álcoois são, portanto, os precursores da lignina e derivam do ácido chiquímico (**figura 6**).



**Figura 6.** Precursores da lignina.

O ácido chiquímico é formado a partir da glicose durante a fotossíntese. A biossíntese das várias unidades de lignina se dá através de várias etapas da transformação do ácido chiquímico. Há principalmente ação de fenolases e metiltransferases, até resultar nos aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) precursores do lignóis.

As ligninas podem ser divididas em três categorias: lignina de Lgimnospermas (madeira mole), de angiospermas (madeira dura) ou de gramíneas. A lignina de madeira mole é constituída principalmente por álcool coniferil, podendo ter também álcool p-coumaril, mas não possui álcool sinapil. Já a lignina de madeira

dura é composta de porções semelhantes dos álcoois coniferil e sinapil (cerca de 46%) enquanto apenas 8% de  $\rho$ -hidroxifenilpropano (derivado do álcool  $\rho$ -coumaril). Por último, a lignina das gramíneas é composta por unidades de coniferil, sinapil e álcool  $\rho$ -coumaril em maior proporção quando comparada aos demais tipos de lignina (BANOUB *et al.*, 2007).

Assim como na madeira, nas gramíneas a lignina faz parte da parede celular secundária e pode ser dividida em lignina corea e não corea, sendo que a lignina corea possui alta massa molecular, solubiliza em detergentes alcalinos e sua estrutura é bem mais condensada em comparação a lignina não-corea. Todas as forragens possuem lignina, sendo esta encontrada em maior quantidade nas leguminosas, principalmente nos caules, comparado as gramíneas. Vale ressaltar também que o acúmulo de lignina sofre influência de diversos fatores, entre eles a temperatura, portanto, podemos dizer que as forragens de clima tropical possuem um maior teor de lignina, comparado as de clima temperado (JUNG, 1989).

Fazem parte do complexo ligninolítico as três ligninases: lignina-peroxidase (Li-P), manganês-peroxidase (Mn-P) e lacase. Segundo CARVALHO (2004) e Aro *et al.* (2005) essas enzimas são produzidas, principalmente, por basidiomicetos e, segundo ele, os principais agentes de degradação da lignina estão entre os fungos da decomposição branca, que são dotados de um sistema ligninolítico constituído de peroxidases (Li-P; Mn-P) e de lacase. São essas enzimas que proporcionam a esses fungos a capacidade de desestabilizar a estrutura da lignina (CHAGAS & DURRANT, 2001).

- **Lignina-peroxidase (Li-P):** oxida a lignina e outros compostos derivados da mesma, além de compostos não fenólicos por retirada de elétron de um

núcleo aromático, criando radical instável que passa por numerosas transformações levando à decomposição do substrato. A ação dessa enzima resulta em: oxidação de álcoois benzílicos, quebra de cadeias aromáticas, desmetilação, rearranjos intramoleculares e quebra de anéis em compostos não fenólicos relacionados à lignina. O álcool veratrílico é o redutor preferido pela Li-P, sendo produzido pelo fungo de degradação branca após lignólise e, aparentemente, protege a enzima contra inativação pelo excesso de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Na presença de peróxido de hidrogênio, a Li-P oxida o álcool a veratraldeído, reação esta comum em ensaios de atividade da Li-P (CARVALHO, 2004).

- **Manganês-peroxidase (Mn-P):** assemelha-se à Li-P, entretanto, além de  $H_2O_2$  requer íons  $Mn^{+2}$  e oxida Mn(II) a Mn(III) (CRAWFORD & POMETTO, 1988; CARVALHO, 2004) e, em meio de cultivo, a presença de cobre pode influenciar fortemente na sua produção (MOUSO *et al.*, 2003b).

- **Lacase:** são fenoloxidasas pertencentes ao grupo das oxidases, produzidas por fungos e plantas. Possuem um íon  $Cu^{2+}$  em seu sítio ativo que, por processo oxidativo, remove fenil-propano mais externo à cadeia, gerando radicais fenoxila. Esses radicais atuam em reações não catalíticas como acoplamento radical-radical, desprotonação a ataques nucleofílicos pela água, levando as reações de polimerização, quebras alquiarílicas e oxidações nos centros ativos e desmetilações. Alguns intermediários aromáticos de baixa massa molecular acabam também liberados resultando na despolimerização da lignina (TIEN & KIRK, 1988; CARVALHO, 2004). Assim como as Mn-P, a presença de cobre no meio de cultivo também pode influenciar fortemente na sua produção segundo MOUSO *et al.* (2003b).



## 1.5 Regulação dos sistemas enzimáticos em estudo

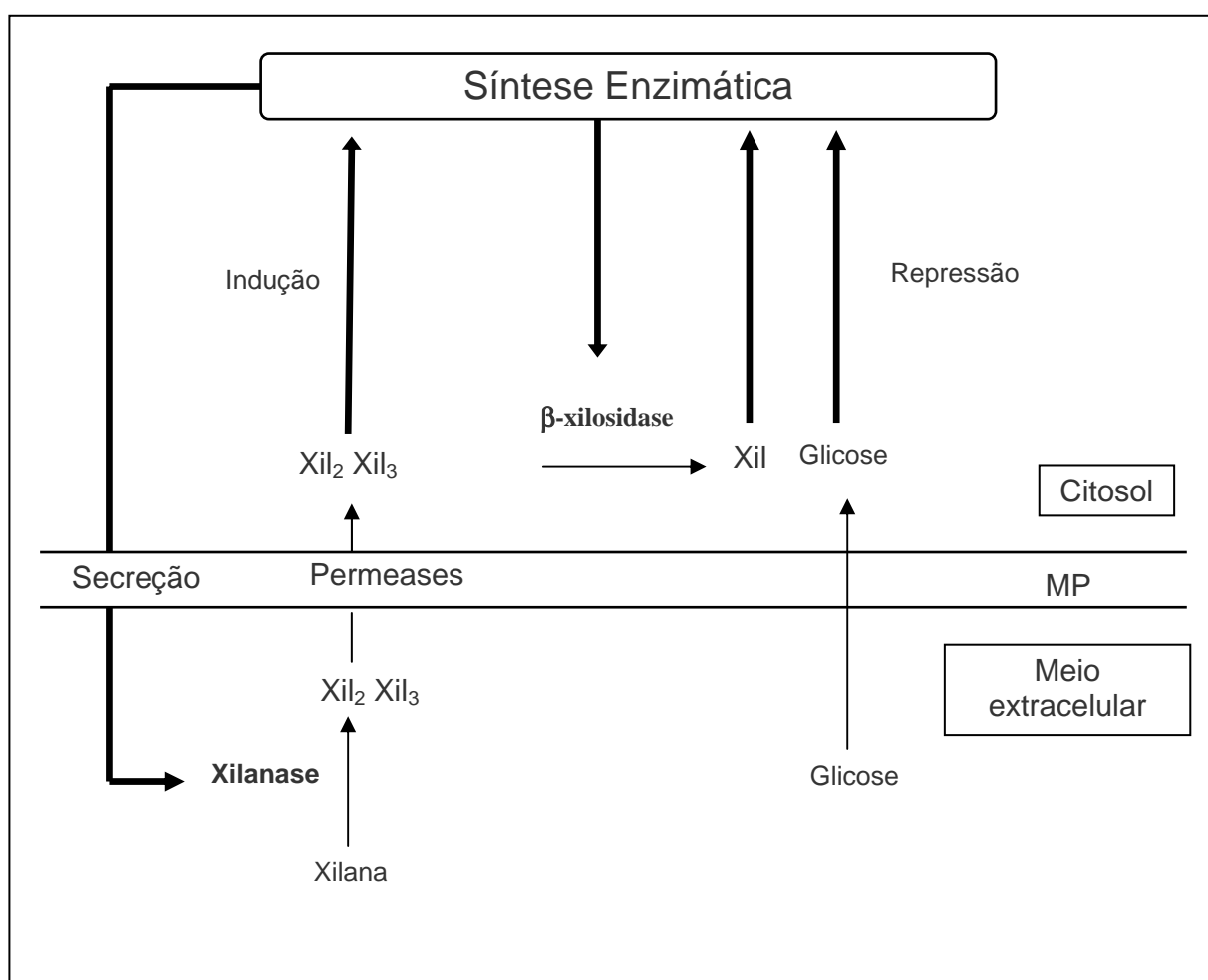
### 1.5.1 Regulação do sistema xilanolítico

Nos últimos anos, as produções científicas a respeito das xilanases produzidas por microrganismos têm aumentado significativamente, assim, estudos sobre a secreção e indução de xilanases são necessários para que se possam desenvolver eficientes produtores do sistema xilanolítico para utilização em aplicações biotecnológicas.

A xilana, sendo estruturalmente um polímero, não pode atingir níveis intracelulares e necessita desencadear um mecanismo de sinalização para a expressão gênica de enzimas xilanolíticas (**figura 7**). Segundo BIELY (1985), ARO *et al.*, (2005) e POLIZELI *et al.* (2005) este mecanismo envolve resíduos menores, tais como xilobiose e xilotriose, entre outros. Xilanases constitutivas, em níveis relativamente baixos, são relatadas como as enzimas responsáveis pela produção destes xilooligossacarídeos a partir da xilana. Através de permeases, estes xilooligossacarídeos são transferidos para o interior da célula desencadeando a transcrição de genes do sistema xilanolítico.

Assim, é necessária a presença de pelo menos três componentes importantes para a completa assimilação da xilana. Inicialmente a presença de uma endo-1,4- $\beta$ -xilanaase extracelular, com a liberação de xilooligossacarídeos maiores, posteriormente a presença de uma  $\beta$ -xilosidase permease para o transporte da xilobiose e outros xilooligossacarídeos para dentro da célula, e logo em seguida a ação de uma  $\beta$ -xilosidase intracelular que terá como produto final à formação de xilose a partir dos xilooligossacarídeos menores (PRADE, 1995; POLIZELI *et al.*, 2005).

Atualmente, para o aprimoramento desses estudos, conta-se com a possibilidade de utilização da biologia molecular para confirmar as análises bioquímicas. Neste contexto, o fungo *Aspergillus phoenicis* foi utilizado em nosso laboratório para se analisar a regulação de seu sistema xilanolítico frente a diferentes indutores de xilanase. Estudos bioquímicos foram confirmados através de análise de RNAm (northern-blot) por RIZZATTI *et al.* (2008).



**Figura 7.** Regulação da biossíntese de enzimas xilanolíticas. Xilanases constitutivas degradam xilana a xilooligossacarídeos que, através de permeases, entram no citoplasma desencadeando a transcrição de outros genes para a produção de

xilanases e  $\beta$ -xilosidases. Abreviações: Xil – xilose; Xil<sub>2</sub> – xilobiose; Xil<sub>3</sub> – xilotriose (adaptado de POLIZELI *et al.*, 2005).

O que se verifica é que para *A. phoenicis* a regulação da síntese de xilanases ocorre principalmente em nível transcricional envolvendo moléculas reguladoras como o AMPc. Sua síntese é induzida na presença de xilana ou xilose e inibida na presença de glicose (RIZZATTI *et al.*, 2008). Na literatura, mecanismos semelhantes de regulação foram verificados para outros fungos do gênero *Aspergillus* (BHELLA, 1988; MOROSOLI *et al.*, 1989; HRMOVÁ *et al.*, 1991; GHOSH & NANADA, 1994; DE GRAFF *et al.*, 1994; OSHIMA *et al.*, 2006). As demais enzimas envolvidas na degradação da parede celular como as celulases e ligninases são, basicamente, reguladas da mesma maneira, ou seja, envolve moléculas reguladoras como o AMPc e são induzidas na presença de seus respectivos polímeros (celulose ou lignina) (ARO *et al.*, 2005).

### 1.5.2 Regulação do sistema ligninolítico

Basidiomicetos como *Stereum hirsutum* (fungos da decomposição branca) são descritos como importantes ligninolíticos (MOUSO *et al.*, 2003a, b e c). Assim, a maior parte dos conhecimentos sobre a regulação da secreção das ligninases provém deste grupo de fungos. Outros basidiomicetos estudados são *Coriolus versicolor* (CLOETE & CELLIERS, 1999), *Phanerochaete chrysosporium* (JEFRIES *et al.*, 1981; BONONI, 1997; MOUSO *et al.*, 2007 e SHARY *et al.*, 2008) e *Pleurotus eryngii* (RUIZ-DUEÑAS *et al.*, 1999; RODRÍGUEZ *et al.*, 2008).

Segundo ARO *et al.* (2005) as ligninases têm um sistema de regulação semelhante ao das demais enzimas (celulases e hemicelulases) envolvidas na degradação da parede celular vegetal. Este controle ocorre em nível da síntese de RNAm onde há expressão dos genes do sistema ligninolítico (lacase, Mn-P e Li-P) na presença de lignina (TIEN & TU, 1987; ARO *et al.*, 2005). O primeiro passo para a degradação da lignina é a sua despolimerização pela Li-P que, em *Phanerochaete chrysosporium*, é secretada concomitantemente ao peróxido de hidrogênio (TIEN & TU, 1987). Para este fungo, FAISON & KIRK (1987) e TIEN & TU (1987) também reportaram que a secreção de Li-P ocorre mais significativamente em meio com limitação de nitrogênio.

## **1.6 Aplicação biotecnológica das enzimas em estudo**

O grande interesse no estudo de enzimas está na sua possibilidade de aplicação em diversos setores da indústria melhorando procedimentos e produtos já existentes, bem como no estabelecimento de novos processos. As principais aplicações de xilanases são para o bi branqueamento da polpa de celulose na indústria de papel e celulose (BHAT, 2000; WHITMIRE & MAITI, 2002; TECHAPUN *et al.*, 2003; SANDRIM *et al.*, 2005; BETINI *et al.*, 2008; PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2008a), bem como na indústria de rações (TRICARICO *et al.*, 2005; JURKOVICH *et al.*, 2006).

### **1.6.1 Aplicação biotecnológica na indústria de papel e celulose**

Nos últimos anos, estudos sobre aplicação biotecnológica de xilanases e xilanases tem aumentado consideravelmente, principalmente aqueles voltados para a

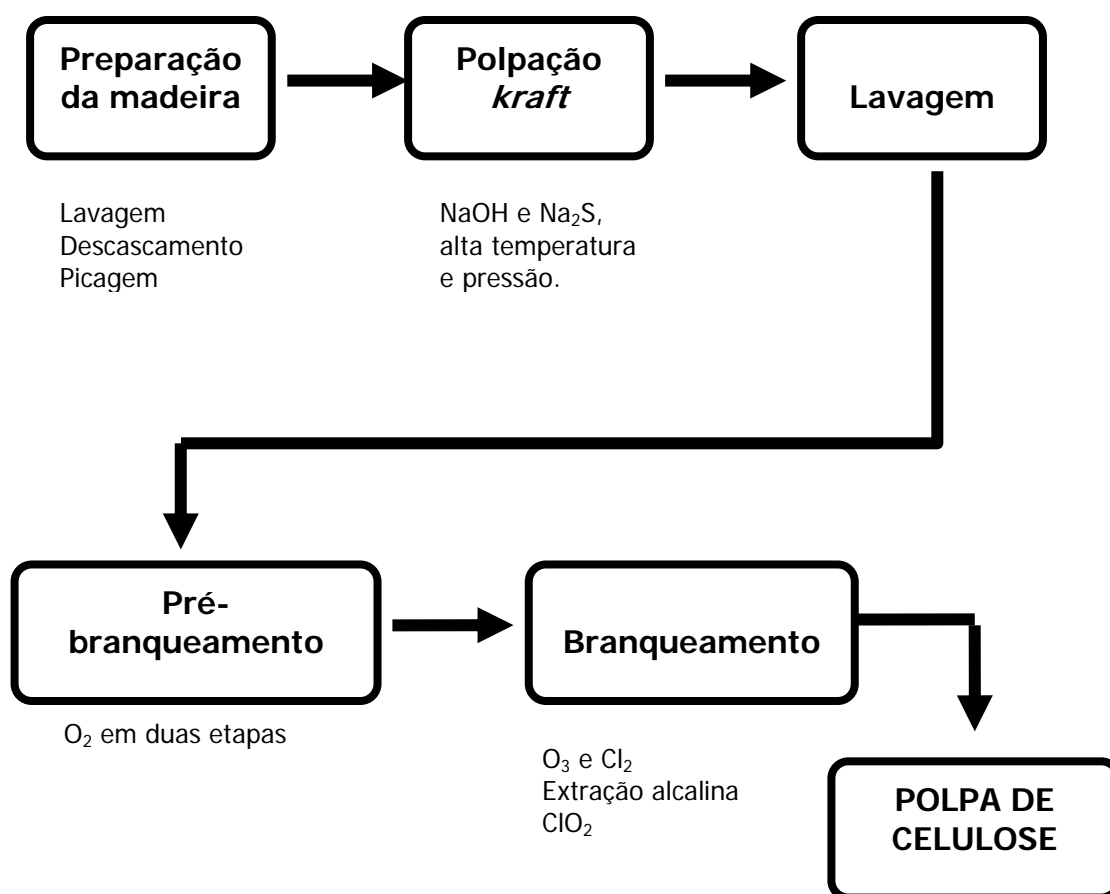
indústria de papel e celulose (POLIZELI *et al.*, 2005, SANDRIM *et al.*, 2005; BETINI *et al.*, 2008; PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2008a; POLIZELI, 2008a e b).

A fabricação do papel inicia-se com a **lavagem** e o **descascamento** das toras de madeira. Segue-se a **picagem** do material em cavacos visando facilitar a difusão dos reagentes utilizados no tratamento da polpa em um processo denominado de **polpação**. Este processo de polpação tem como objetivo facilitar a separação das fibras e melhorar suas propriedades para a fabricação do papel. Esta polpação pode ser realizada por meio de um processo químico no qual a maior parte da lignina é retirada da madeira, mas, com a utilização deste processo, somente 40 – 50% da massa total inicial da madeira é aproveitada. Há outros processos mecânicos de polpação nos quais ocorre mínima remoção dos componentes da madeira, levando ao seu aproveitamento quase que total (<http://www.aracruz.com.br>).

No Brasil, o processo de **polpação** mais utilizado é o processo **kraft** no qual os cavacos de madeira são submetidos a uma reação com uma solução contendo hidróxido (NaOH) de sódio e sulfeto de sódio (Na<sub>2</sub>S) dentro de um digestor em condições elevadas de temperatura e pressão. Esses produtos químicos vão solubilizar a lignina fragmentando-a em substâncias de baixa massa molar que vão solubilizar em pH alcalino e ser removidas por meio de inúmeras lavagens. A polpa ou pasta celulósica resultante do processo **kraft** (polpa marrom) ainda é inadequada para a produção de alguns tipos de papel sendo necessário, ainda, a retirada da lignina residual. Sabe-se que, nesta etapa, a lignina restante encontra-se fortemente ligada às fibras de celulose. Portanto, o processo de **branqueamento** necessita ser realizado em várias etapas para garantir máxima brancura com mínima degradação da celulose. Os reagentes utilizados são cloro (Cl<sub>2</sub>), dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>),

hipoclorito de sódio ( $\text{NaClO}$ ) oxigênio ( $\text{O}_2$ ) e ozônio ( $\text{O}_3$ ). Após a polpa atingir os níveis adequados de brancura passa-se para a formação dos fardos de papel (BUCHERT *et al.*, 1992; POLIZELI *et al.*, 2005). Observa-se na **figura 8** um esquema representativo deste processo.

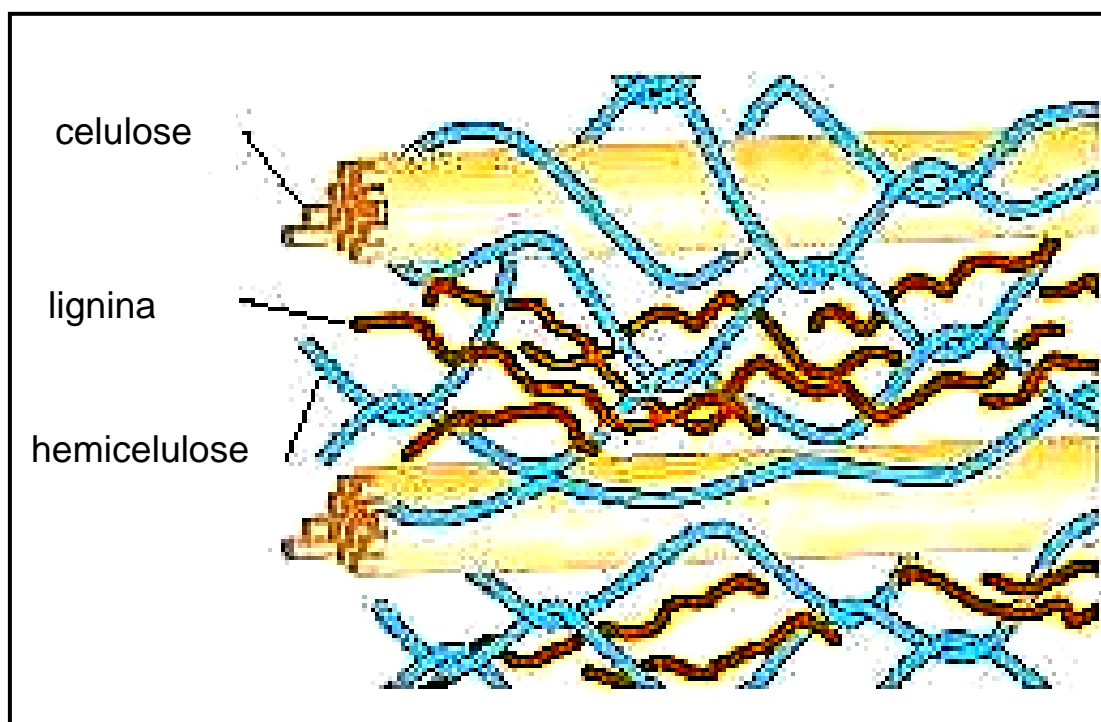
A fibra de celulose é recoberta por polímeros de lignina e de xilana que servem para conferir estabilidade à parede celular da planta (BOUDET *et al.*, 2003 – **figura 9**) e, esses açúcares, principalmente a lignina, são os responsáveis pela coloração escura da polpa de celulose. Os processos acima descritos geram quantidades significativas de poluentes. Atualmente, frente às maiores restrições



**Figura 8.** Esquema representativo de um processo de produção da polpa de celulose (adaptado de <http://www.aracruz.com.br> e de RIZZATTI, 2004).

dos regulamentos ambientais, procuram-se alternativas para a diminuição da utilização desses compostos clorídricos na indústria de papel (VIIKARI *et al.*, 1994; RIZZATI, 2004; SANDRIM *et al.*, 2005; BETINI *et al.*, 2008; PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2008a).

Para haver mais eficiência na retirada da lignina e, conseqüentemente, no branqueamento da polpa celulósica, a xilana, açúcar que interage com a lignina e dificulta a ação dos reagentes químicos sobre ela, necessita ser retirada. Assim, a retirada da xilana pode ser realizada através da sua conversão em xilose e xilooligossacarídeos por meio de hidrólise ácida. A hidrólise ácida é usada frequentemente por ser mais rápida, mas também é acompanhada pela formação de compostos tóxicos poluentes e, além disso, ao longo do tempo, pode levar à corrosão dos equipamentos utilizados durante seu processo (RIZZATTI, 2004).



**Figura 9.** Representação esquemática da parede celular secundária (BOUDET *et al.*, 2003).

Recentemente, algumas indústrias demonstraram interesse no desenvolvimento de processos eficientes (e menos poluentes) de hidrólise enzimática como alternativa para o tratamento do material hemicelulósico. Na literatura, há muitos estudos sobre processos de hidrólise enzimática envolvendo a remoção da xilana utilizando-se **xilanases** (RIZZATI, 2004; SANDRIM *et al.*, 2005; BETINI *et al.*, 2008; PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2008a) bem como estudos envolvendo a hidrólise da lignina utilizando-se **ligninases** (KATAGIRI *et al.*, 1995).

Atualmente, xilanases comerciais são produzidas, por exemplo, no Japão, Finlândia, Alemanha, Irlanda, Dinamarca, Canadá e Estados Unidos. Na indústria, são usados microrganismos produtores de xilanases como *Aspergillus niger* (BETINI *et al.*, 2008), *Trichoderma* sp (BUCHERT *et al.*, 1992; MANTYLA *et al.*, 2007), *Hemicella insolens* (SORENSEN *et al.*, 2007) entre outros. Entretanto, as xilanases comerciais também podem ser produzidas por bacilos (KERSTERS-HILDERSON, *et al.*, 1982; SUBRAMANIYAN & PREMA, 2000; KAMBOUROVA, *et al.*, 2007). Entretanto, no Brasil, o uso dessas enzimas ainda não é adotado pela maioria das indústrias (exceção para a Champion Celulose e Papel Ltda.), uma vez que são extremamente onerosas e, infelizmente, há inúmeras empresas que não só vendem esses produtos químicos ( $\text{Cl}_2$ ,  $\text{NaClO}$ ,  $\text{ClO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para a indústria papelreira ([www.solavayindupa.com](http://www.solavayindupa.com)) como também divulgam estudos a respeito da utilização de produtos químicos como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) - SIQUEIRA & FILHO (2008).

O modo exato de como as xilanases agem nos processos de branqueamento ainda não está totalmente esclarecido. Existem algumas teorias que tentam explicar este mecanismo, uma delas menciona que o tratamento com xilanases tem função de remover a xilana precipitada da superfície da polpa (ocorrida



durante o cozimento). Segundo VIKARI *et al.* (1994) a remoção desta xilana provavelmente aumentaria a permeabilidade da fibra e acessibilidade dos reagentes à lignina (**figura 9**). Há ainda uma segunda teoria que se baseia em estudos estruturais que indicam estar, na madeira, a lignina unida a polissacarídeos, através do complexo lignina-carboidratos (este mesmo tipo de interação é verificado em plantas forrageiras). Algumas das ligações envolvendo tais complexos são alcali-resistentes e não hidrolisam durante o cozimento *kraft* e, conseqüentemente, alguma lignina residual permanece ligada à hemicelulose após o cozimento (BUCHERT *et al.*, 1992). O tratamento enzimático hidrolisa a xilana a pequenos fragmentos permitindo que a lignina associada a essas pequenas cadeias de hemicelulose sejam mais facilmente removidas através de extrações subseqüentes (RIZZATTI, 2004). A hidrólise parcial da fração hemicelulósica por xilanases aumenta a susceptibilidade da lignina a processos de biobranqueamento e, assim, a quantidade de compostos químicos utilizados é menor.

Já as ligninases atuam despolimerizando e hidrolisando a lignina. Esta capacidade do complexo ligninolítico permite que este seja aplicado na indústria papelreira para a extração da ligninase (KATAGIRI *et al.*, 1995), após a extração da xilana (de preferência por meio de hidrólise enzimática). Segundo MIELGO *et al.* (2001), a hidrólise da lignina pode ser importante não apenas para a clarificação de polpas celulósicas como também para o tratamento de efluentes desta indústria (biorremediação).

### 1.6.2 Aplicação biotecnológica na indústria de rações

As enzimas em estudo (xilanasas e ligninasas) podem também ser aplicadas como aditivo em ração para ruminantes, no intuito de aumentar a digestibilidade de alimentos fibrosos e, conseqüentemente, o desempenho do animal. Essas enzimas atuam degradando os carboidratos ingeridos no alimento e fornecem açúcares menores para as bactérias presentes no rúmen bovino. Na presença desses oligossacarídeos rapidamente assimiláveis, há uma maior e mais rápida proliferação das bactérias no rúmen aumentando a eficiência do processo de digestão (MARTINS, 2003; LOURES, 2004).

Enzimas exógenas têm sido aplicadas em ruminantes para melhorar a digestibilidade da forrageira e, conseqüentemente, o consumo voluntário de alimento. Além disso, outros possíveis benefícios incluem a remoção de fatores antinutricionais (taninos, alcalóides, inibidores de amilases), com a melhora na disponibilidade de certos nutrientes da planta.

As respostas obtidas têm sido variadas. Como respostas positivas pode-se destacar o aumento na digestibilidade da forragem e do desempenho animal. A variabilidade das respostas em função da utilização de enzimas fibrolíticas exógenas é dependente da ampla diversidade de produtos comerciais disponíveis, que variam no tipo de enzima contido no produto, na fonte dessa enzima (bactéria ou fungo), no método de aplicação na dieta, na quantidade de inclusão, e na atividade da enzima.

O aditivo à base de enzima é caracterizado pelo extrato enzimático concentrado produzido pela fermentação fúngica (*Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus niger* e *A. oryzae*) e/ou bacteriana (*Bacillus* spp. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* e *Streptococcus faecium*). Este concentrado não deverá

conter células microbianas devido aos processos de filtração para a obtenção do produto final (BEAUCHEMIN *et al.*, 2002). Fungos do gênero *Aspergillus* são considerados bons produtores da enzima exógena fibrolítica xilanase utilizada na indústria de alimentos para animais. Esse gênero é comumente encontrado no ambiente, é cosmopolita, caracterizado pelo seu rápido crescimento e alta capacidade de utilizar diversos substratos. Os fungos apresentam destacada importância na digestão da fibra, já que penetram na cutícula e na parede celular dos tecidos lignificados. No rúmen, os fungos da flora ruminal atuam de modo semelhante (penetram na cutícula e parede das plantas), entretanto, vale lembrar que a população microbiana presente no rumem é anaeróbica (MARTINS, 2003; LOURES, 2004), diferentemente dos *Aspergillus* estudados neste trabalho.

Fisiologicamente, existe uma série de possíveis modos de ação das enzimas exógenas e, conforme descrito, esses efeitos podem ser tão simples como a liberação de carboidratos solúveis ou tão complexos como a remoção de íons de barreiras estruturais. O grau de liberação dependerá do tipo de alimento e do tipo de enzima utilizada.

Neste tipo de aplicação biotecnológica o objetivo é que a enzima adicionada trabalhe em conjunto com os microrganismos presentes no rúmen ajudando na liberação de açúcares e outros componentes dos carboidratos complexos.

A adição de xilanases pode, até mesmo, alterar as atividades fisiológicas da população bacteriana ruminal (COLOMBATTO *et al.*, 2003b). Desta maneira, é comum observar aumento na produção de propionato e butirato e menos acetato e metano, como resultado do emprego de enzima fibrolítica (EUN & BEAUCHEMIN,

2007). Essas mudanças fisiológicas resultam do aumento na digestibilidade do alimento. Outra vantagem na adição de enzimas é a redução na liberação de gás metano pelo rebanho. O metano é um poluente preocupante, pois juntamente com o dióxido de carbono é responsável pelo efeito estufa, uma vez que provoca retenção do calor e aquecimento da superfície da terra.

### **1.6.3 Outras aplicações biotecnológicas**

Produtos da hidrólise de xilana, como a xilose, podem ser convertidos em combustíveis líquidos como etanol (SHAPACK *et al.*, 1987; CHEN *et al.*, 2007), solventes, e adoçantes artificiais de baixa caloria (xilitol) (PARAJÓ *et al.*, 1998; ARISTIDOU & PENTILLÄ, 2000; LIAVOGA *et al.*, 2007). Outra categoria envolve o uso do complexo xilanolítico no processamento de fibras vegetais, como o cânhamo ou o linho na indústria têxtil (CSISZÁR *et al.*, 2006).

Recentemente têm-se realizado muitos estudos sobre tratamento e remoção de compostos tóxicos do meio ambiente - biorremediação (MARIANO, 2006). Neste contexto, as ligninases têm sido consideradas como uma promissora alternativa biotecnológica para a biorremediação de compostos liberados, por exemplo, pela indústria têxtil, a qual utiliza grandes quantidades de água e libera compostos químicos tóxicos durante o processo de tingimento, resultando em efluentes altamente complexos e recalcitrantes (CARVALHO, 2004). Além disso, estudos têm mostrado que alguns desses (em especial os azocorantes e seus subprodutos) podem ser carcinogênicos e ou mutagênicos (KUNZ *et al.*, 2002). Enzimas como a Li-P, Mn-P e lacase podem promover a degradação desses compostos (ARO *et al.*, 2005).

### 1.7 O gênero *Aspergillus* e o ciclo de vida

A reprodução **sexuada** nos Ascomycetes superiores, fase diplóide desenvolve-se de uma única maneira, em células dicarióticas ou micélio. Após a plasmogamia, estágio em que ocorre a fusão sexual das células e mistura do citoplasma, os núcleos que representam dois gametas pareiam-se. Eles persistem e se multiplicam por um período mais curto ou mais longo, em pares ou sincários. À medida que as hifas ou células do micélio que os contêm crescem, estes núcleos pareados dividem-se simultaneamente, produzindo novos pares. Finalmente, os núcleos fundem-se nos ascos jovens, formando um núcleo zigótico que imediatamente sofre meiose, formando-se esporos haplóides. O ciclo de vida do fungo *Aspergillus nidulans* (**figura 10** e **tabela 3**) foi utilizado como modelo para o gênero *Aspergillus* (GOMPertz *et al.*, 1999).

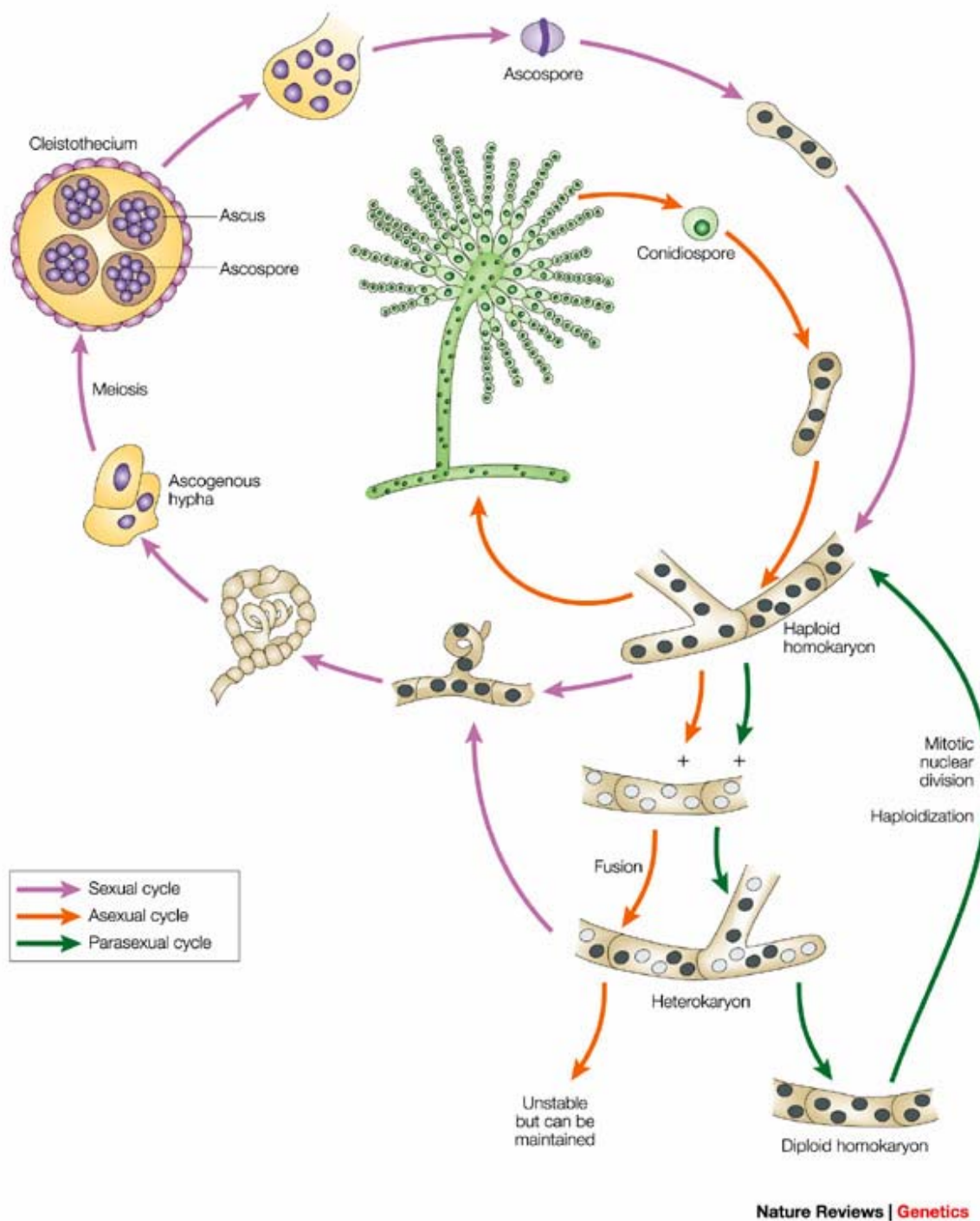
No processo **parassexual** (**figura 10** e **tabela 3**), a fase inicial é chamada de heterocariose, seguida da fusão de núcleos, dando diplóides heterozigotos. Este processo pode ser verificado somente através da análise genética, uma vez que, estudos citológicos em fungos são difíceis de realizar. O passo seguinte é a produção de recombinantes. O mecanismo de recombinação envolve permutas mitóticas recíprocas fazendo com que os núcleos filhos sejam homozigóticos para os marcadores distais em relação ao ponto de permuta, ou continuem heterozigotos como a linhagem diplóide original. Em seguida, ocorre a haploidização, a qual resulta de uma série de não disjunções. Um núcleo que contenha um cromossomo a menos é instável e pode, através de novas não disjunções, perder outros cromossomos até atingir o estado de  $2n-8=8$

cromossomos, que é o estado haplóide estável no caso do *Aspergillus nidulans* (AZEVEDO, 1972). Na **tabela 3**, o ciclo sexual e parassexual são comparados.

Para a realização deste estudo foram utilizados dois fungos do gênero *Aspergillus*: *A. niveus* e *A. fumigatus*. Para melhor ilustrar este trabalho e conhecer a morfologia dos fungos em estudo, fotos de microscopia de luz foram realizadas em nosso laboratório; as fotos de microscopia de varredura foram retiradas da internet (**figura 11**).

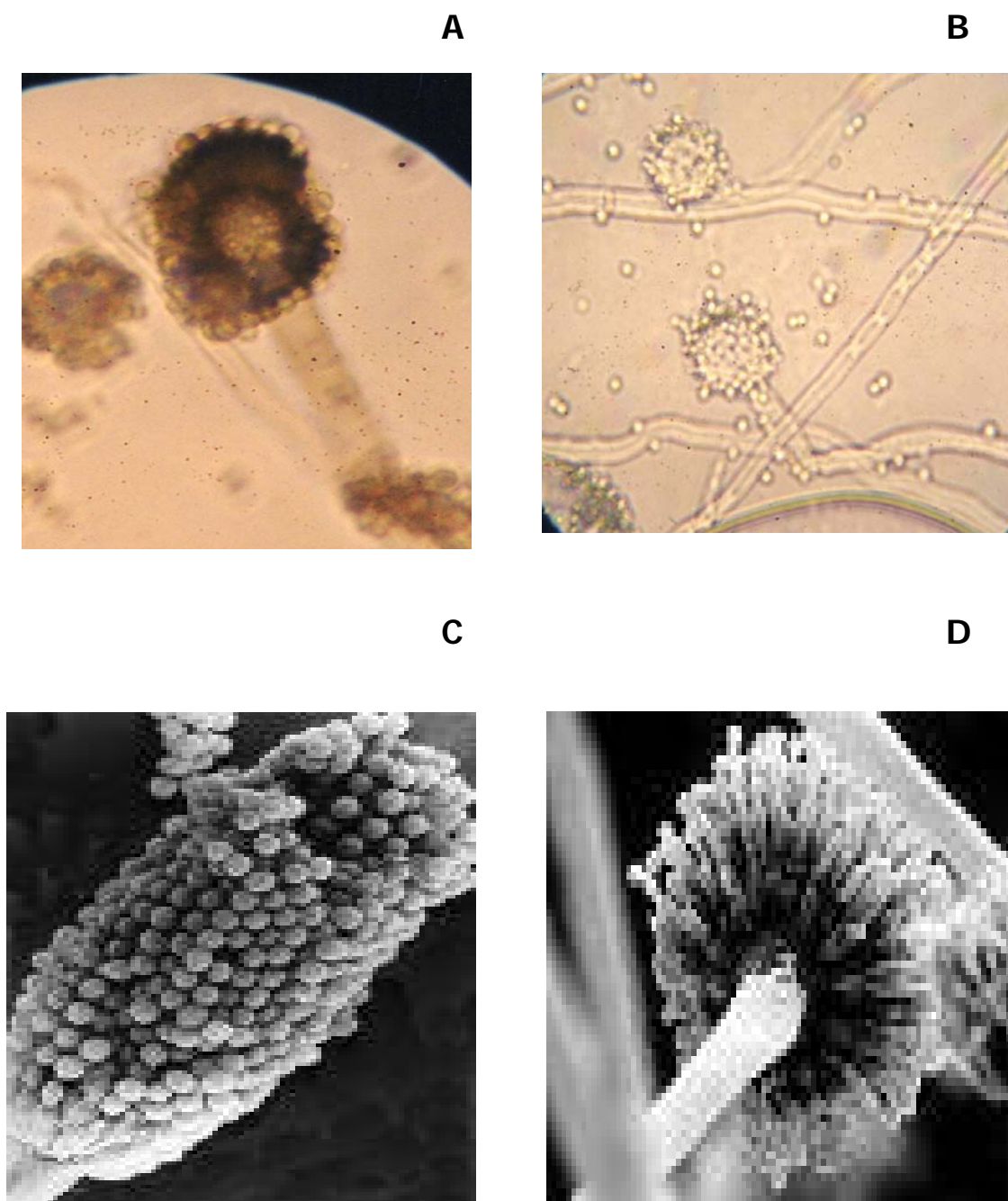
**Tabela 3.** Comparação entre os ciclos sexual e parassexual em *Aspergillus nidulans* (GOMPERTZ *et al.*, 1999).

<b>Ciclo Sexual</b>	<b>Ciclo Parassexual</b>
1- fusão nuclear em estruturas especializadas resultando zigotos híbridos ou não (autofecundação);	1- fusão nuclear rara em células vegetativas dando diplóides;
2- o zigoto persiste por apenas uma geração nuclear;	2- o diplóide pode persistir por muitas divisões mitóticas;
3- os produtos meióticos (ascósporos) são facilmente reconhecidos e isolados.	3- os recombinantes ocorrem em células vegetativas e são isoladas quando se usam marcadores genéticos apropriados.



**Figura 10.** Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans* com as fases sexual (---), assexual (---) e parasexual (---). Fonte: CASSELTON & ZOLAN, 2002.





**Figura 11.** Fotografia dos microrganismos em estudo *Aspergillus fumigatus* (A, C) e *Aspergillus niveus* (B, D). Microscopia óptica em um aumento de 400x (A, B) e microscopia eletrônica de varredura (C, D). As fotos de microscopia eletrônica de varredura foram retiradas do site [www.doctorfungi.com.br](http://www.doctorfungi.com.br).

## *II. Objetivos*

Nosso objetivo inicial foi coletar material em decomposição numa área de reflorestamento e, partindo da prospecção do material coletado, objetivou-se isolar fungos filamentosos para a produção de xilanases. O *screening* de linhagens produtoras de xilanases foi realizado com os fungos coletados e outros microrganismos já presentes em nossa micoteca. Para estudos foram selecionados os fungos *Aspergillus niveus* e *Aspergillus fumigatus*. Objetivou-se também otimizar as condições de cultivo para a produção de **xilanase** e **ligninases** pelos fungos selecionados, além de caracterizar os extratos brutos, realizar estudos de purificação com as xilanases de *A. niveus* e aplicar as enzimas brutas (xilanases e/ou ligninases) em processos biotecnológicos como o biobranqueamento da polpa de celulose e/ou como aditivo em rações para ruminantes.

### *III. Material e Métodos*

### **3.1 Coleta e isolamento de fungos filamentosos**

Este trabalho fez parte de um projeto temático junto à rede BIOTA-Bioprospecta (FAPESP). A coleta foi realizada em 14/12/2004 numa área de reflorestamento do Campus da USP de Ribeirão Preto (**figura 12**). Esta foi realizada em: (A) região com vegetação de grande densidade (mata fechada – primeiro local a ser reflorestado), (B) região com densidade de vegetação intermediária entre a primeira e a última área e, por último, (C) em um local mais recentemente reflorestado onde a vegetação ainda era pouco densa. Os microrganismos foram coletados a partir de substratos em decomposição e incubados em meio de farinha de aveia Quaker® (Emerson, 1941) a 30°C ou a 40°C.

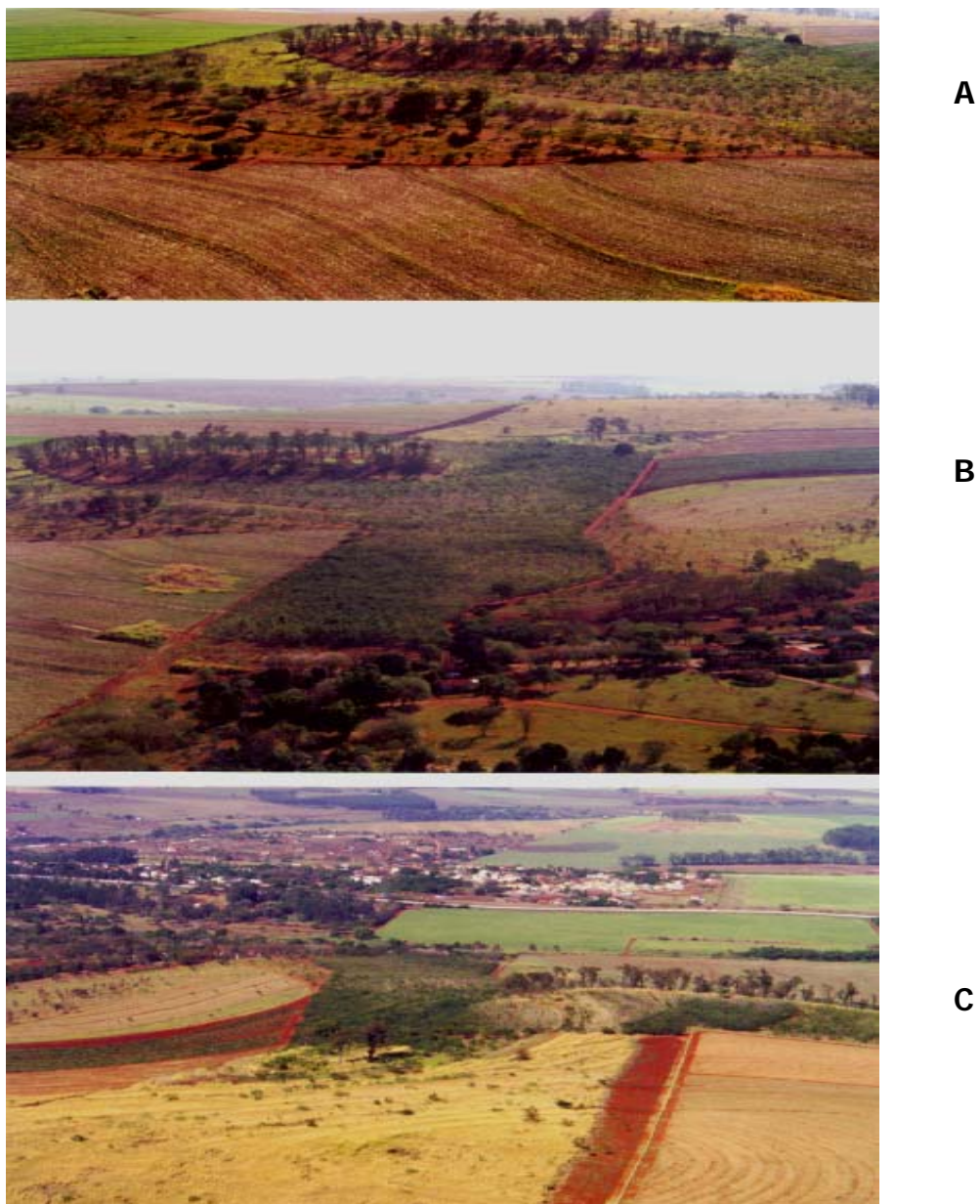
Para um rigoroso controle e identificação do local de coleta utilizou-se georeferenciamento por GPS - "Global Positioning Systems" para determinação da latitude, longitude e altitude (**tabela 4**).

Outros dados como data, hora, temperatura ambiente do momento da coleta foram sempre registrados de acordo com a ficha padrão para coletas e registro BIOTA/FAPESP, disponível no site: <http://sinbiota.cria.org.br>.

### **3.2 Isolamento e seleção dos microrganismos para produção de xilanase**

Para isolar os fungos filamentosos, inicialmente, o material em decomposição foi espalhado sobre placa de Petri contendo meio sólido de aveia. A este inóculo foram adicionados 5mL de pentabiótico veterinário (50 mg/mL) para impedir crescimento bacteriano. Decorridos sete dias de incubação, diferentes fungos se desenvolveram nas placas. Seguiu-se, então, o isolamento dos espécimes através

de inóculo em estrias, utilizando-se alça de platina. Este procedimento foi realizado até se obterem culturas homogêneas.



**Figura 12.** Fotos aéreas do reflorestamento do Campus da USP de Ribeirão Preto – local de coleta das amostras de material em decomposição. Vista aérea em diferentes ângulos (**A**, **B** e **C**).

**Tabela 4.** Coleta realizada no Reflorestamento da USP - Campus de Ribeirão Preto.

Nº	Material	T. (°C)	Precisão GPS (m)	Alt. (m)	Lat. (°)	Long. (°)
1	Terra e húmus	30	15	572	21° 09,190'	45° 52,150'
2	Terra e húmus	28	9	572	21° 09,232'	45° 51,507'
3	Terra e húmus	32	5	572	21° 09,179'	45° 51,397'

**T.** – temperatura do ambiente no momento da coleta; **Alt.** – altitude do local de coleta; **Lat.** – latitude do local de coleta; **Long.** – longitude do local de coleta.

Para selecionar um microrganismo produtor de xilanase utilizaram-se esses fungos isolados do reflorestamento, além de outras espécies pertencentes à micoteca do nosso laboratório (Laboratório de Bioquímica de Microrganismos do Departamento de Biologia da FFCLRP/USP).

Entre 43 fungos (18 coletados e 25 de nossa micoteca), dois foram selecionados para dar início ao nosso trabalho, uma vez que se apresentaram como bons produtores de xilanase. A identificação foi realizada na Faculdade Federal de Pernambuco: um *Aspergillus niveus* e *Aspergillus fumigatus* (verde aveludado reflorestamento – isolado do material coletado).

### 3.3 Manutenção da cepa

As cepas foram mantidas, em laboratório, em meio complexo de aveia, composto por 4% de farinha de aveia Quaker® e 2% de agar bacteriológico (Emerson, 1941). Os meios foram autoclavados (1,5 atm, 120°C, por 15 minutos) em

tubos de ensaio e posteriormente inclinados. Os repiques foram realizados periodicamente, com auxílio de uma alça de platina, e mantidos a 30°C durante 5 a 7 dias. Posteriormente, estes foram vedados e guardados em geladeira, à temperatura de 4°C.

A manutenção de todo o acervo de fungos utilizado foi também realizada em sílica gel, onde uma suspensão de esporos foi preparada em 5mL de solução de leite Molico® desnatado (20g/100mL de água destilada). Desta suspensão, aproximadamente 1,2 mL foram misturados a 6 g de silicagel branca 1-4 mm contida em tubos de ensaio (16 x 100 mm) vedados com rosca. Foram armazenados três tubos para cada espécime. Todos os passos foram conduzidos de forma asséptica.

### **3.4 Condições de cultivo**

#### **3.4.1 Fermentação submersa (FSbm)**

Este tipo de fermentação foi utilizado para determinar o meio de cultivo mais adequado para a produção de xilanase por *A. niveus* e *A. fumigatus*. Os esporos, obtidos a partir de culturas estoques, foram raspados com alça de platina e suspensos em 10 mL de água destilada estéril. Um volume de 1 mL da suspensão de esporos foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido e incubados a 40°C, por 120 horas, em estufa bacteriológica (ou conforme especificado em cada experimento). Os meios testados e suas composições estão descritos a seguir:



**Meio CP** (PEIXOTO *et al.*, 2003)

Extrato de levedura.....	0,8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,3 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,05 g
Xilana Birchwood.....	1,0 g
Água destilada q.s.p. ....	100 mL

**Meio Khanna** (KHANNA *et al.*, 1995)

Solução de sais de Khanna [20x].....	5,0 mL
Extrato de levedura.....	0,1 g
Xilana Birchwood .....	1,0 g
Água destilada q.s.p. ....	100 mL

Solução de sais de Khanna [20X]

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	2,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,3 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,362 g
KCl .....	0,098 g
ZnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O .....	0,007 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O.....	0,0138 g
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O .....	0,0066 g
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O.....	0,0062 g
Água destilada q.s.p. ....	100 mL

**Meio SR** (RIZZATTI *et al.*, 2001)

Solução de sais SR [20x] .....	5,0 mL
Peptona .....	0,02 g
Extrato de levedura.....	0,45 g
Xilana Birchwood .....	1,0 g
Água destilada q.s.p. ....	100 mL

Solução de sais SR [20X]

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,24 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,3 g
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,0 g
Água destilada q.s.p. ....	100 mL

**Meio Vogel** (VOGEL, 1964)

Solução de sais de Vogel [50x] .....	2,0 mL
Solução de biotina .....	20 µL
Xilana Birchwood .....	1,0 g
Água destilada q.s.p. ....	100 mL

Solução de sais de Vogel [50X]

Citrato de sódio pentaidratado.....	15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	25 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	10 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	1,0 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,5 g
Solução de traços de elementos.....	0,5 mL

Clorofórmio .....0,2 mL

Água destilada q.s.p. .... 100 mL

Solução de traços de elementos

Ácido cítrico.H<sub>2</sub>O ..... 5 g

ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ..... 5 g

Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O..... 1 g

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O ..... 0,25 g

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ..... 0,05 g

MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O..... 0,05 g

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ..... 0,05 g

Clorofórmio ..... 1 mL

Água destilada q.s.p. .... 100 mL

Solução de biotina

Biotina .....0,005 g

Etanol 50% ..... 100 mL

**Meio Czapek (WISEMAN, 1975)**

NaNO<sub>3</sub> ..... 0,3 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 0,1 g

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ..... 0,05 g

KCl ..... 0,05 g

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O .....0,001 g

Xilana Birchwood ..... 1,0 g

Água destilada q.s.p. .... 100 mL

**Meio M-5 (PERALTA *et al.*, 1990)**

Extrato de levedura.....	0,6 g
Peptona .....	0,1 g
CaCO <sub>3</sub> .....	0,1 g
NaCl .....	1,0 g
Xilana Birchwood .....	1,0 g
Acetato de amônio.....	0,6 g
Água destilada q.s.p. ....	100 mL

**3.4.2 Fermentação submersa e pré-cultivo**

Este tipo de fermentação foi utilizado para aumentar a indução dos níveis de xilanase para propósitos de purificação das isoformas produzidas por *A. niveus*. O fungo foi pré-cultivado em meio SR (meio de crescimento) utilizando-se glicose 1% como fonte de carbono, e incubados por 72 horas a 30°C, em estufa bacteriológica. A seguir, as culturas foram transferidas para os meios de indução (meio mínimo de Czapek) suplementados com xilana 1% como fonte de carbono, e incubados durante 72 horas em condições estáticas.

Em alguns experimentos de pré-cultivo adicionou-se 50µg/mL de cicloheximida ao meio de indução.

**3.4.3 Fermentação substrato-sólido (FSS)**

Este tipo de fermentação foi utilizado para induzir a produção de ligninases (Li-P, Mn-P e lacase) pelo fungo *A. niveus*. Um volume de 1mL de solução de conídios foi inoculado em Erlenmeyer de 125 mL contendo 2 g de farelo de trigo e

4 mL de água ou farelo de trigo e 4 mL de solução de sais (as quais variaram de acordo com o experimento). O farelo e os componentes líquidos foram autoclavados separadamente e adicionados aos meios imediatamente antes do inóculo. Os frascos foram incubados a 30°C por um período variável, em estufa bacteriológica com aproximadamente 70% de umidade relativa, controlada por higrômetro.

### **3.5 Obtenção das preparações enzimáticas**

#### **3.5.1 Fermentação Submersa / fermentação submersa com pré-cultivo**

As culturas, após crescimento nas condições padronizadas, filtradas à vácuo com auxílio de um funil de Büchner e papel de filtro. Para os ensaios enzimáticos extracelulares foi utilizado o filtrado. O micélio foi lavado e seco em papel de filtro, pesado para a obtenção do peso úmido (g) e macerado com o auxílio de um pistilo em gral de porcelana com areia lavada e pré-tratada com solução sulfocrômica, a 4°C. O macerado foi ressuspenso em 5 mL de tampão McIlvaine pH 5,5 e centrifugado a 10.000g por 10 minutos, na mesma temperatura. O sobrenadante, contendo as enzimas intracelulares, foi utilizado para determinações de proteínas e dosagens enzimáticas.

#### **3.5.2 Fermentação substrato-sólido**

Após o período de incubação, adicionou-se aos frascos 25mL de água destilada fria. A mistura foi agitada por 15 minutos, a 4°C para a extração das enzimas. As culturas foram filtradas a vácuo em funil de Büchner, com auxílio de papel de filtro e gaze para a obtenção de um filtrado do meio livre de células e de

substrato. Este filtrado foi dialisado contra tampão McIlvaine pH 5,5 "overnight" e, posteriormente, utilizado para dosagens enzimática e protéica.

### **3.6 Dosagens enzimáticas**

#### **3.6.1 Dosagem das enzimas do complexo xilanolítico**

##### **3.6.1.1 Xilanase**

A atividade xilanolítica foi detectada pela formação de açúcares redutores (xilooligossacarídeos) a partir da xilana Birchwood (Sigma) pelo método do ácido 3',5'-dinitrosalicílico, DNS (MILLER, 1959). A mistura da reação foi composta de 0,2 mL de solução de substrato 1% (p/v) em tampão McIlvaine, pH 5,5 e 0,2 mL do extrato enzimático. A reação foi realizada a 65°C e alíquotas de 0,1 mL foram retiradas em diferentes tempos e adicionadas a 0,1 mL de DNS. Para cada reação enzimática foi determinado um branco. Posteriormente, os tubos foram fervidos por 5 minutos e depois de resfriados, 1 mL de água destilada foi adicionado. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540nm, utilizando-se uma curva padrão de xilose (0 – 1 mg/mL). A unidade de atividade xilanásica foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de xilooligossacarídeo por minuto. A atividade específica foi expressa em unidade de atividade total por mg de proteínas totais (U/mg prot.).

Para confirmar a ausência de celulases nos extratos enzimáticos aplicados no biobranqueamento da polpa de celulose, utilizou-se esta mesma metodologia para se determinar a atividade celulásica das amostras. Para tanto, o substrato utilizado foi CM-celulose ou avicel 1% (p/v) em tampão McIlvaine, pH 5,5 e a curva padrão foi determinada com glicose (0 – 1 mg/mL).

### 3.6.1.2 $\beta$ -xilosidase, acetil-xilanoesterase e arabinofuranosidase

As atividades das demais enzimas do complexo xilanolítico ( $\beta$ -xilosidase, acetil-xilanoesterase e arabinofuranosidase) também foram determinadas. Para a atividade  $\beta$ -xilosidásica utilizou-se o método descontínuo de KERSTERS-HILDERSON *et al* (1982) sendo o *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (PNP-xil) o substrato desta reação composta de 0,05 mL de substrato 0,25% (p/v) em água destilada, 0,2 mL de tampão McIlvaine pH 4,0 e 0,15 mL do extrato enzimático. A reação foi realizada a 60°C e alíquotas de 0,1 mL foram retiradas em diferentes tempos e adicionadas a 1 mL de solução saturada de tetraborato de sódio. Para cada reação enzimática foi determinado um branco. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 405 nm, utilizando-se uma curva padrão de *p*-nitrofenol de 0 a 0,6  $\mu$ mol/mL. A unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por minuto.

Outras enzimas do complexo xilanolítico também foram determinadas por metodologia semelhante, entretanto, o ensaio foi contínuo, realizado em espectrofotômetro com banho termostaticado. Os substratos sintéticos utilizados também foram diferentes (*p*-nitrofenil-acetato (PNP-acetato) para acetil-xilanoesterase e *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-arabinopiranosídeo (PNP-ara) para arabinofuranosidase). As reações foram compostas de 0,1 mL de substrato 0,25% (p/v) em água destilada, 0,45 mL de tampão McIlvaine pH 4,0 e 0,45 mL do extrato enzimático e incubada a 60°C. Vale ressaltar que à mistura de reação não se adicionou tetraborato de sódio, uma vez que os ensaios eram contínuos.

### **3.6.2 Dosagem do complexo ligninolítico**

#### **3.6.2.1 Manganês peroxidase (Mn-P)**

A atividade manganês peroxidásica foi realizada a 50°C segundo metodologia de AITKEN & IRVINE (1990). A mistura da reação foi composta de 0,8mL de tampão lactato de sódio 0,05 M, pH 4,5, 0,1 mL de solução de MnSO<sub>4</sub>, 0,4 M e 0,1 mL de extrato enzimático. A reação foi iniciada com a adição de 10µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40 µM) e as leituras espectrofotométricas foram realizadas a 270 nm em cubetas de quartzo. O branco foi adicionado de 0,1 mL de água destilada ao invés de substrato.

A unidade de atividade enzimática foi determinada como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de Mn<sup>3+</sup> por minuto. A atividade específica foi expressa em unidade de atividade total por mg de proteínas totais (U/mg prot.) e o coeficiente de extinção molar correspondeu a 8,1.10<sup>3</sup> mol/cm.

#### **3.6.2.2 Lignina peroxidase (Li-P)**

A atividade lignina peroxidásica foi realizada a 55°C segundo metodologia de TIEN & KIRK (1988). A mistura da reação foi composta de 0,8 mL de tampão tartarato de sódio 0,05 M, pH 3,0, 0,1 mL de álcool veratrílico 0,4 M e 0,1 mL de extrato enzimático. A reação foi iniciada com a adição de 20 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40 µM) e as leituras espectrofotométricas foram realizadas a 310 nm em cubeta de quartzo. O branco foi adicionado de 0,1 mL de água destilada ao invés de substrato.

A unidade de atividade enzimática foi determinada como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de veratraldeído por minuto. A atividade específica foi expressa em unidade de atividade total por mg de proteínas totais (U/mg prot.) e o coeficiente de extinção molar correspondeu a 9,3.10<sup>3</sup> mol/cm.



### **3.6.2.3 Lacase**

A atividade lacásica foi realizada a 65°C segundo metodologia de BUSWELL *et al.* (1995). A mistura da reação foi composta de 0,9 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 + ABTS 0,1 M (2,2"-azino-bis-etilbentiazolina) e 0,1 mL de extrato enzimático. A reação foi interrompida com a adição de 10 µL de azida (20 µM) e as leituras espectrofotométricas foram realizadas a 420nm em cubeta de plástico. O branco foi adicionado de 0,9mL de tampão acetato de sódio ao invés de substrato.

A unidade de atividade enzimática foi determinada como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ABTS por minuto. A atividade específica foi expressa em unidade de atividade total por mg de proteínas totais (U/mg prot.) e o coeficiente de extinção molar para ABTS oxidado correspondeu a  $3,6 \cdot 10^4$  mol/cm.

### **3.7 Dosagem protéica**

A quantificação de proteínas foi estimada pelo método de LOWRY *et al.*, (1951) que utiliza albumina de soro bovino (BSA) como padrão na concentração de 200 µg/mL. A unidade foi definida como mg de proteína por mL.

### **3.8 Biomassa úmida**

Após a obtenção do micélio, este foi prensado em folhas de papel de filtro para retirar a maior quantidade possível de água e, posteriormente, este foi pesado para a determinação da massa micelial úmida.

### 3.9 Procedimentos de purificação enzimática

Os experimentos de purificação foram realizados a partir de extrato bruto produzido pelo fungo *Aspergillus niveus* incubado nas condições padronizadas durante o estudo.

O protocolo de purificação utilizado foi todo conduzido a 4°C e correspondeu a: **1)** tratamento do extrato bruto com caulim - Synth® (20 mg/mL de amostra), essa mistura (caulin + extrato) foi mantida em repouso durante 30 minutos e em seguida a 15 minutos de centrifugação a 10000g, 4°C, para posterior aplicação em **2)** DEAE-celulose (5 x 0,5 cm), equilibrada e eluída em tampão fosfato de sódio monobásico 10 mM, pH 7,5 mais gradiente de NaCl 0-0,5M (volume total de 100 mL), **3)** aplicação em CM-celulose (5 x 0,5 cm), equilibrada e eluída em tampão acetato de sódio 10 mM, pH 4,0 mais gradiente de NaCl 0-0,5M (volume total de 100 mL) e **4)** aplicação em Biogel P-60 (64 x 0,8 cm), equilibrada e eluída em tampão acetato de sódio 100mM, pH 4,0. A quantidade de tampão utilizada para equilibrar as colunas correspondeu a 7 vezes o seus respectivos volumes, assim como os lavados. Nas colunas de troca iônica foram coletados 10 mL por tubo enquanto que na coluna de filtração o volume coletado correspondeu a 1 mL por tubo.

### 3.10 Caracterização bioquímica

Para caracterização bioquímica, na primeira etapa do trabalho, foram avaliados alguns parâmetros dos extratos brutos produzidos por *Aspergillus niveus* e *Aspergillus fumigatus*, como: pH e temperatura de reação; estabilidade a temperatura, bem como estabilidade frente a diferentes condições de pH. Os estudos de purificação enzimática foram realizados apenas com o extrato bruto de *Aspergillus*

*niveus* e a caracterização bioquímica também compreendeu a determinação de pH e temperatura de reação; estabilidade a temperatura (com e sem adição de agentes protetores como trealose, glicerol, sorbitol e PEG), bem como estabilidade frente a diferentes condições de pH, influência de íons, determinação dos produtos formados a partir da hidrólise da xilana, determinação do conteúdo de carboidratos, dicroísmo e sequenciamento de aminoácidos.

### **3.10.1 Influência de compostos na atividade xilanásica**

Para analisar quais os íons que influenciam a atividade xilanásica, a amostra contendo a enzima pura foi dialisada durante 2 horas contra água destilada e, posteriormente, determinou-se a atividade xilanásica. Neste experimento a amostra controle foi aquela dosada na ausência dos compostos testados, enquanto que as amostras experimentais foram realizadas na presença de diferentes compostos em concentrações finais de 0,25mM; 0,5mM; 1mM; 2,5mM e 5mM no ensaio enzimático.

### **3.10.2 Determinação dos produtos de hidrólise por análise cromatográfica em camada delgada de sílica (TLC)**

Para verificar se as xilanases purificadas a partir do extrato bruto produzido por *Aspergillus niveus* realmente eram endo-xilanases, os produtos de hidrólise foram analisados em camada delgada de sílica seguindo a metodologia descrita por FONTANA *et al.*, (1988).

Como padrões foram usados 5 µL de xilose e xilobiose 1%. As misturas de reação foram incubadas em banho a 65°C durante períodos que variara de 0 – 24 horas. Após o término das reações, as amostras foram fervidas por 5 minutos e 5 µl foram aplicados na placa de sílica.

A placa foi desenvolvida duas vezes com uma mistura de acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água destilada (9:3:1:4 – v/v/v/v) e a mistura de revelação, composta por orcinol 0,2% (p/v) em ácido sulfúrico-metanol (1:1:9 – v/v/v). Essa mistura foi pulverizada na placa que, depois de seca, foi colocada em estufa a 100°C até o aparecimento das bandas correspondentes aos produtos da hidrólise da xilana.

### 3.10.3 Determinação do conteúdo de carboidratos

O conteúdo de carboidrato das xilanases purificadas a partir do extrato bruto produzido por *Aspergillus niveus* foi determinado através do método do fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). O método foi padronizado através de uma curva de concentração de manose 0 a 1,0 mg/mL.

### 3.10.4 Dicroísmo circular

A análise da estrutura secundária das xilanases purificadas a partir do extrato bruto produzido por *A. niveus* foi realizada através de dicroísmo circular em espectropolarímetro Jasco 810 (JASCO Inc., Tokyo, Japan), num comprimento de onda entre 250 e 180 nm (UV distante), utilizando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,1 mm, com uma concentração protéica de 0,40 mg/mL para a

xilanase CMC 2 e 0,53 mg/mL para a xilanase biogel 2. Todas as medidas foram realizadas com uma média de nove repetições coletadas e subtraídas do branco (tampão acetato de sódio 10mM, pH 5,0).

Em relação às  $\alpha$ -hélices e as folhas  $\beta$ , estas estruturas secundárias apresentam um espectro de DC característico na região do UV distante (250 – 180nm). Assim, em proteínas com suas formas estruturais nativas, a composição dos elementos de estrutura secundária é altamente definida, resultando em espectros de DC com sinais característicos.

### **3.10.5 Seqüenciamento de aminoácidos**

O seqüenciamento N-terminal da xilanases purificadas (CMC 2 e Biogel 1) foram realizados em colaboração com a Dra. Izaura Y. Hirata do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo, em um seqüenciador PPSQ/23 da Shimadzu Corporation (Tokyo-Japan), com sistema de HPLC isocrático, utilizando a metodologia da Degradação de Edman.

As informações obtidas por este método serviram como base para a comparação com outras proteínas. Esse processo foi feito confrontando a seqüência de aminoácidos com informações contidas em bancos de dados, através da utilização de programas encontrados em sites especializados, tal como o BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### **3.11 Estudos eletroforéticos**

Estudos de caracterização enzimática também foram realizados através de análises eletroforéticas.

### **3.11.1 Análises em SDS-PAGE**

As análises em SDS-PAGE foram realizadas para comprovar a pureza das xilanases purificadas a partir de extrato bruto produzidos por *A. niveus*. A eletroforese foi realizada em pH alcalino (8,9) e presença de SDS (dodecil sulfato de sódio), procedimento previamente descrito por LAEMMLI (1970).

Foi utilizado gel de poliacrilamida 11% (p/v) e polimerizado em placas de vidro (8 x 12 cm). A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente, em tampão constituído de 3,025 g de Tris, 14,4 g de glicina, 1 g de SDS dissolvido em água destilada q.s.p. 1000 mL e pH corrigido com HCl para 8,9. A corrente aplicada foi de 20 mA.

Após o término da corrida os géis foram retirados das placas e submersos em solução fixadora composta por metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) e formol 0,5% (v/v), durante 1 hora. Posteriormente, seguiram-se processos de impregnação por prata e revelação, descritos no item 3.12.

### **3.11.2 Análises em PAGE 4,5**

Foi utilizada metodologia previamente descrita por REISFIELD (1962). A eletroforese foi realizada em pH 4,5 num gel de poliacrilamida 6% (p/v), polimerizado em placas de vidro (8 x 12 cm). A corrida eletroforética foi feita à temperatura ambiente, em tampão constituído de 31,2 g de  $\beta$ -alanina, 8 mL de ácido acético glacial, água destilada q.s.p. 1000 mL e pH corrigido com HCl para 4,5. A corrente aplicada foi de 20 mA.

Após o término da corrida, os géis foram retirados das placas e submersos em solução fixadora composta por metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) e

formol 0,5% (v/v), durante 1 hora. Posteriormente, seguiram-se processos de impregnação por prata e revelação, até o aparecimento das bandas correspondentes às proteínas.

### **3.11.3 Análises em PAGE 8,9**

Foi utilizada metodologia previamente descrita por DAVIS (1964). A eletroforese foi realizada em pH 8,9 num gel de poliacrilamida 6% (p/v), polimerizado em placas de vidro (8 x 12 cm). A corrida eletroforética foi feita à temperatura ambiente, em tampão constituído de Tris-HCl 50 mM e glicina 36 mM, sob uma corrente elétrica de 20 mA.

Após o término da corrida, os géis foram retirados das placas e submersos em solução fixadora composta por metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) e formol 0,5% (v/v), durante 1 hora. Posteriormente, seguiram-se processos de impregnação por prata e revelação, até o aparecimento das bandas correspondentes às proteínas.

### **3.12 Impregnação e revelação por prata**

Os processos realizados para a coloração e revelação dos géis de eletroforese realizados em condições desnaturantes (SDS-Page) ou não desnaturantes (PAGE), seguiram as etapas descritas abaixo (BLUM *et al.*, 1987):

Aplicados dois banhos de 20 minutos em etanol 50% (v/v);

Aplicado banho de 20 minutos em etanol 30% (v/v);

Deixá-lo 1 minuto em solução de pré-tratamento (item 3.12.1);

Lavá-lo 3 vezes em água destilada (20 segundos cada lavada);

Deixá-lo 20 minutos em solução de impregnação (item 3.12.2);

Lavá-lo 3 vezes em água destilada (20 segundos cada lavada);

Colocá-lo em solução de revelação até aparecer a banda (item 3.12.3);

Lavá-lo com água destilada;

Deixá-lo 10 minutos em solução de inibição da revelação (item 3.12.4);

Mantido em metanol 50% (v/v) por no mínimo 20 minutos;

Em seguida, o gel foi prensado em papel celofane umedecido com solução dessecante composta de glicerol 0,5% (v/v) e metanol 65% (v/v).

### 3.12.1 Solução de pré-Tratamento

Tiosulfato de sódio.....0,02 g

Água destilada q.s.p..... 100 mL

### 3.12.2 Solução de impregnação

Nitrato de prata.....0,2 g

Formol 37%.....75 µL

Água destilada q.s.p.....100 mL

### 3.12.3 Solução de revelação

Carbonato de sódio.....6,0 g

Tiosulfato de sódio.....0,02 g

Formol 37%.....50 µL

Água destilada q.s.p.....100mL



### 3.12.4 Solução inibitória do processo de revelação

Metanol.....	50 mL
Ácido acético.....	12 mL
Água destilada q.s.p.....	100 mL

### 3.13 Determinação da massa molecular por FPLC

A massa molecular das xilanases puras foi determinada por análise em FPLC ("Fast protein liquid column") utilizando-se a coluna Bio-Sil Sec-400 (300 x 7.8 mm), BIO-RAD, devidamente equilibrada em tampão acetato de sódio 100 mM + NaCl 150 mM + azida sódica 10 mM. pH 6,8. A velocidade da corrida foi de 1,0 mL/minuto a 25°C. Foram coletados 0,5 mL por tubo e a proteína da amostra foi detectada a 280 nm enquanto que a atividade enzimática foi analisada pela liberação de açúcares redutores, segundo o método de MILLER (1959). Para padronizar a coluna, utilizou-se como padrão as proteínas  $\beta$ -amilase (20 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e miglobina eqUina (17 kDa).

### 3.14 Estudos do potencial de aplicação biotecnológica do complexo xilanolítico

#### 3.14.1 Bi branqueamento da polpa de celulose

Para a realização dos testes de bi branqueamento utilizou-se polpa de celulose proveniente da Votorantim Celulose e Papel – VCP e as xilanases testadas foram produzidas por *A. fumigatus* e *A. niveus*. As ligninases foram obtidas apenas de *A. niveus*. Assim, os microrganismos foram cultivados em suas respectivas condições ótimas previamente padronizadas para produção das enzimas a serem testadas.

### 3.14.1.1 Consistência das polpas (%)

A consistência foi determinada pela relação massa seca/massa úmida, sendo expressa em porcentagem. A polpa foi pesada determinando-se a massa úmida (m.u.). Aproximadamente 10 g de massa úmida foram colocados em estufa de secagem de material a 45°C por uma noite e, no dia seguinte, aferiu-se a massa seca do material. Quando o peso da polpa estabilizou, foi determinada a massa seca (m.s.) e a consistência foi calculada.

### 3.14.1.2 O tratamento enzimático das polpas

Utilizaram-se 10 g de polpa seca tipo kraft para o biobranqueamento. Inicialmente, aferiu-se o pH da polpa (que correspondeu a 5,0) e se determinou sua consistência (14%). Para a realização do tratamento enzimático, adicionou-se à polpa 10U/g de polpa seca e uma quantidade adequada de tampão McIlvaine (pH 5,0 a 5,5 - *A. fumigatus*; pH 4,5 a 5,5 - *A. niveus*) até que as polpas atingissem consistência de 10%. Este ajuste foi realizado segundo a equação:

$$\frac{\text{massa seca (g)}}{\text{consistência}} - \text{massa úmida} - \text{vol. de enzima} = \text{vol. máximo de água adicionado}$$

Após a preparação, as misturas foram colocadas em sacos de polietileno, vedados com seladora e incubados durante 1 hora a 70°C para *A. fumigatus* ou a 65°C para *A. niveus*. Aos controles foram adicionados apenas de tampão até atingirem a mesma consistência. Além de testes de biobranqueamento com xilanases, testou-se também um *mix* de xilanase + ligninases produzidas por *A. niveus*.

Após este tratamento as polpas foram filtradas em funil de Büchner e lavadas com 200mL de água destilada. A eficiência do bi branqueamento da polpa de celulose foi determinada através de parâmetros como redução do n° kappa, manutenção da viscosidade e aumento da alvura da polpa.

#### **3.14.1.3 Determinação do número kappa**

O número kappa é uma grandeza empírica que permite avaliar o teor de lignina de uma pasta de madeira. Foi determinado para cada amostra utilizando-se o método do permanganato de potássio baseado no protocolo T236 os – 76 da “Technical Association of the Pulp and Paper Industry” (TAPPI, Atlanta, GA, USA), sendo determinado como o número em  $\text{cm}^3$  de solução de permanganato de potássio 0,1 N consumido por grama de polpa livre de umidade. Os resultados são corrigidos para 50% do permanganato adicionado.

Para cada tratamento, separou-se o equivalente a 2 g de polpa seca de cada amostra que foi desintegrada com a mão em 10 mL de água destilada. Após este processo, as polpas foram transferidas para um Erlenmeyer de 500 mL e a ele adicionou-se 140 mL de água destilada. A temperatura ambiente foi controlada para 25°C e a suspensão foi agitada continuamente com o auxílio de uma barra magnética e um agitador.

Separadamente preparou-se uma solução composta de 25 mL de permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) 0,1 N mais 25mL de ácido sulfúrico 4 N. Esta solução foi adicionada à polpa e o frasco contendo a solução foi lavado com 50 mL de água destilada que também foi adicionado à mistura de reação que prosseguiu por 10 minutos. O permanganato oxida a lignina residual, portanto, fez-se a titulação

para determinar o quanto de permanganato foi consumido.

Decorrido os 10 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 5 mL de iodeto de potássio (KI) 1,0 M. O iodo livre na solução foi titulado com tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 0,1 N até a solução (sempre em agitação) ficar com uma coloração amarelo claro. Adicionou-se 0,5 mL de uma solução de amido 1% e titulou-se até a viragem da cor azul para branco.

Foi realizada uma determinação do branco sem polpa, utilizando-se água destilada e seguindo-se o mesmo procedimento descrito anteriormente. Assim, quanto maior o conteúdo de lignina na polpa, maior o volume de permanganato de potássio consumido e, conseqüentemente, menor o volume de tiosulfato de sódio utilizado para titular o iodo formado. Para calcular o valor de kappa foram utilizadas as seguintes equações:

$$\rightarrow \text{Número kappa} = \frac{P.FP.FT}{2.W} \qquad \rightarrow W = \frac{Wu. \text{Consistência}}{100}$$
$$\rightarrow P = (Vb - Va).2$$

Onde:

$Wu$  = peso da amostra úmida (g);

$W$  = peso da amostra absolutamente seca;

$P$  = volume de permanganato de potássio 0,1 N;

$FP$  = fator de correção para um consumo de 50% de permanganato de potássio (Anexo A);

$FT$  = Fator de correção da temperatura (Anexo B);

$Va$  = volume gasto na titulação da amostra (mL);

Vb = volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL).

#### **3.14.1.4 Determinação da viscosidade**

Utilizou-se o método baseado no protocolo T-230 om-94 da “Technical Association of the Pulp and paper Industry” (TAPPI, Atlanta, Ga, USA). Exatamente 0,125 g da polpa seca foi colocada em um frasco âmbar, com tampa, e, em seguida, adicionaram-se 12,5 mL de etilenodiaminacúprica 1,0 M, acrescentando-se 12,5 mL de água destilada. A mistura foi agitada por 15 minutos com o auxílio barra magnética e agitador e, posteriormente, transferida para o viscosímetro de Fenske-Oswald, previamente com óleo “standard” e utilizada dentro dos limites de viscosidade apropriados. O tempo de escoamento foi cronometrado e o cálculo da viscosidade da celulose em centipoises foi determinado pela equação:

$$V = F.t$$

Onde:

F = fator do viscosímetro;

t = tempo de escoamento (s);

V = viscosidade da celulose (cp);

#### **3.14.1.5 Determinação da alvura**

Utilizou-se um espectrofotômetro para medidas de reflectância a 457 nm segundo metodologia T414-ts da “Technical Association of the Pulp and paper Industry” (TAPPI, Atlanta, Ga, USA). O objetivo deste método é especificar as

condições exigíveis para determinação do fator de reflectância no azul difuso (alvura ISO) da celulose, nos aparelhos Datacolor Elrepho 2000, 3000 e Elrepho SE 070R (Norma ISSO 2469-1980). Esta etapa foi realizada na VCP, unidade Luís Antônio.

Outros cálculos realizados durante este procedimento foram:

$$\rightarrow \text{Eficiência do n}^\circ \text{ kappa (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ kappa inicial} - \text{n}^\circ \text{ kappa final}}{\text{n}^\circ \text{ kappa inicial}} \cdot 100$$
$$\rightarrow \text{Redução viscosidade da polpa (\%)} = \frac{\text{viscosidade inicial} - \text{viscosidade final}}{\text{viscosidade inicial}} \cdot 100$$

### 3.14.2 Utilização de xilanases em alimentos para ruminantes

Para avaliar o efeito de enzimas fibrolíticas na digestibilidade de alimentos volumosos para ruminantes foi testado o extrato bruto contendo xilanases produzidas por *Aspergillus niveus*. Para tanto foram realizados três testes, sendo o primeiro uma avaliação dos efeitos da concentração da enzima na digestibilidade *in vitro* do alimento, enquanto que o segundo correspondeu a uma avaliação do comportamento da enzima no ambiente ruminal de cabras. Já no terceiro teste, realizou-se novamente uma digestibilidade *in vitro*, entretanto avaliou-se também a quantidade de gases liberada durante essa digestão.

#### 3.14.2.1 Avaliação da digestibilidade *in vitro* de diferentes volumosos na presença de xilanase

Para a avaliação da melhor concentração de enzima, empregou-se o método da digestibilidade *in vitro* que simula a digestão dos nutrientes em ruminantes. As quantidades do extrato de xilanases avaliadas foram: 4, 8 e 16 mL.

Este procedimento foi realizado em duas etapas segundo metodologia descrita por TILLEY & TERRY (1963).

O processo de digestão consistiu em duas etapas. Primeiramente, há uma fermentação anaeróbia do líquido ruminal onde se adicionaram 5 mL desse líquido ruminal, as diferentes quantidades de enzima testadas, 40 mL solução tampão (saliva artificial McDougall) e 0,5 g dos volumosos analisados. O volume final de mistura em cada unidade foi o mesmo, portanto, onde se utilizaram 4 mL de enzima adicionaram-se 12 mL de água destilada. Onde se utilizaram 8 mL de enzima, se adicionaram 8 mL de água. As misturas foram incubadas a 39°C, pH 6,9, por 48 horas. Posteriormente, promoveu-se a digestão com 2 mL de HCl 40% e de 5 mL de solução aquosa de pepsina a 4,0% (atividade de 1:10.000), por 24 horas em BOD, simulando a digestão ácida que ocorre no estômago verdadeiro do ruminante. A quantidade de matéria seca ou matéria orgânica dos alimentos foi medida inicialmente, possibilitando a determinação da quantidade de forragem que desapareceu após os dois estágios, que foi considerada como tendo sido digerida.

O líquido ruminal utilizado foi obtido de um bovino da raça Nelore, macho, castrado, de aproximadamente 450 kg, cirurgicamente fistulado no rúmen e mantido em pasto. Assim que coletado, este líquido foi transportado ao laboratório em garrafa térmica e filtrado em quatro camadas de gaze sendo, a fração obtida por esta filtração, usada para os experimentos de digestibilidade.

A solução tampão de McDougall foi preparada em um litro de água destilada contendo 9,8 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 7 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,57 g de KCl, 0,47 g de NaCl, 0,12 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,04 g de  $\text{CaCl}_2$  e 0,2 a 0,8 g de uréia.

Os volumosos testados foram feno de alfafa (*Medicago sativa*), feno de capim-jaraguá (*Hyparrhenia rufa*), capim-Marandu (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) e silagem de milho. As forragens foram previamente secas em estufa de circulação forçada de ar a 55 °C e passadas em moíno Willey dotado de peneira com abertura de malha de 1 mm.

#### **3.14.2.2 Avaliação da atividade da xilanase no ambiente ruminal**

Testes foram realizados em seis cabras, da raça Saanen, fêmeas fistuladas no rúmen e dieta à base de silagem de milho. Adicionou, diretamente no rúmen dos animais, um volume de 15mL de xilanase contendo 5,63  $\mu\text{mols}/\text{min.}/\text{mL}$  de atividade enzimática.

Neste experimento foram colhidas amostras de líquido ruminal, de hora em hora, no período total de 8 horas, para observação dos níveis de atividade xilanásica presentes no líquido ruminal.

#### **3.14.2.3 Avaliação da atividade das xilanases na degradação *in vitro* da matéria seca e fibra de volumosos através do uso da produção de gás**

Os volumosos analisados corresponderam a amostras de feno de capim-jaraguá (*Hyparrhenia rufa*), capim-Marandu (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu), silagem de milho e cana-de-açúcar, empregando a técnica de produção de gás descrita por THEODOROU *et al.* (1994).

Os tratamentos avaliados foram: 4 tipos de amostras de volumosos incubadas sem enzima, amostras adicionadas de enzima no momento da incubação,



amostras tratadas com enzima três horas antes da incubação. O experimento foi conduzido e avaliado segundo o desenho experimental de blocos casualizados, em esquema de parcelas subdivididas, considerando nas parcelas os tratamentos e nas sub parcelas os tempos de incubação, com três repetições.

Para o processo de incubação e determinação da produção de gás foram usados frascos de vidro com capacidade para 115 mL, com 80 mL de solução de incubação com 10% de líquido ruminal e 800 mg de amostra. As amostras de líquido ruminal foram retiradas de bovinos canulados na região do rúmen, mantidos com a dieta a base de silagem de milho, milho e farelo de soja.

Foi preparada solução de incubação como descrito por MENKE & STEINGASS (1988), adicionada de líquido ruminal e adicionada manualmente a cada frasco mediante a utilização de uma seringa graduada. Os frascos foram vedados com rolhas de borracha (14 mm), lacradas com lacre de alumínio e mantidos em banho a 39° C. No dia da incubação foi adicionado o agente redutor ao meio tamponado (solução de cor azul) que foi gazeado com CO<sub>2</sub> até que a solução saturasse (solução de cor rosa). Em seguida, foram adicionados 990 mL de líquido ruminal. Em cada frasco, já contendo amostra, foi adicionado 30 mL de solução completa, ou seja, composta de meio tamponado e líquido ruminal.

O período de incubação foi de 96 horas. As medidas de pressão de gás foram feitas em períodos de 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 28, 32, 36, 40, 48, 52, 56, 60, 72 e 96 horas de incubação, registrando-se a pressão no interior do frasco, com manômetro e, considerando o valor médio de três frascos como unidade experimental. Após 24, 48 e 96 horas de incubação, o conteúdo dos frascos foi

filtrado em cadinho tipo Goosh previamente pesados determinar a degradação da MS.

A transformação dos dados das leituras de pressão (psi) para volume (mL) foi feita através da equação padronizada, obtida com leituras de pressão de diferentes quantidades conhecidas de volume de gás nas garrafas, mantendo as mesmas condições de temperatura da incubação.

### **3.14.3 Citotoxicidade**

Para que um produto de origem fúngica seja de fato aplicado na indústria é necessário que este não cause nenhum tipo de dano ao animal que vai ingeri-lo, nem tampouco ao humano (consumidor final). Assim, para complementar ainda mais este estudo sobre aplicação biotecnológica das enzimas produzidas por essas espécies de *Aspergillus*, determinou-se o potencial citotóxico dos extratos brutos produzidos pelas enzimas de ambos os microrganismos em estudo.

Embora apenas as enzimas de *A. niveus* tenham sido aplicadas em rações para ruminantes, investigou-se também a citotoxicidade do extrato bruto de *A. fumigatus* para, assim, determinar se, futuramente, o extrato enzimático produzido por este microrganismo poderia também ser utilizados em experimentos com rações.

Os estudos de citotoxicidade foram realizados tratando-se linhagens de linfócitos humanos com os extratos brutos produzidos por *A. niveus* e *A. fumigatus*. Esses extratos continham as enzimas utilizadas para o aumento da digestibilidade em ruminantes. A etapa do trabalho foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Elza Tiemy Sakamoto Hojo e a mestrandia Giovana da Silva Leandro no Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Para a realização deste experimento  $\pm 10^6$  células foram semeadas e tratadas com o extrato bruto dos fungos *A. niveus* ou de *A. fumigatus* durante 24 horas. Após o tratamento, as células tratadas foram soltas por tripsinização, contadas em Câmara de Neubauer. 300 dessas células foram semeadas em frasco de cultivo (25cm<sup>2</sup>), sendo que esses cultivos foram realizados em triplicata. Como controle positivo (+) foram semeadas células que não passaram pelo tratamento com os extratos fúngicos e, como controle negativo (-), foram semeadas células previamente tratadas com cisplatina (um quimioterápico). Os experimentos duraram em média 10-15 dias, sendo os frascos observados diariamente com o auxílio de um microscópio de luz com objetiva invertida.

Decorrido o período de cultivo, realizou-se a contagem das colônias formadas nos controles (+), (-) e nas culturas tratadas com os extratos fúngicos. Para a realização das contagens, todas as soluções utilizadas (água destilada, PBS descrito no item 3.15.2 e tampão fosfato monobásico de sódio 0,005%) foram previamente aquecidas a 37°C. O meio de cultura foi desprezado e as células lavadas com 5 mL de tampão PBS que, posteriormente, foi descartado e as células fixadas com metanol/ácido acético/água (1:1:8 – v/v/v), respectivamente, durante 30 minutos. As colônias foram coradas com 5mL de corante Giemsa diluído em tampão fosfato (1:20 – v/v), respectivamente, durante 30 minutos. Após a coloração os frascos foram lavados com água para a retirada do excesso de corante. Foram consideradas na contagem aquelas colônias com mais de 50 células (aumento 16X).

Para o cálculo de determinação das frações de sobrevivência (FS), considerou-se 100% o número de colônias contadas no grupo controle (+). O controle (-) não deveria ter células. Portanto:

$$FS = (\text{n}^\circ \text{ de colônias contadas em cada tratamento} / \text{n}^\circ \text{ de colônias observadas no controle (+)}) \times 100$$

### **3.15 Estudos de microscopia**

#### **3.15.1 Microscopia óptica de luz**

O meio SR suplementado glicose 1% foi inoculado com esporos dos fungos em estudo e, ainda dentro do ambiente estéril do fluxo laminar. O meio recém-inoculado foi colocado sobre lâminas, recoberto com lamínula e guardado em câmara úmida. Esta câmara úmida foi constituída de um par de placas de Petri contendo várias camadas de papel de filtro umedecidos com água destilada. Todo esse material (câmara úmida, lâminas e lamínulas) foi previamente autoclavado e, após o inóculo dos distintos fungos em suas respectivas laminas, o material foi incubado a 35°C durante 16 horas. Após o período de incubação, o material foi fotografado em microscópio óptico.

#### **3.15.2 Microscopia eletrônica de varredura**

Este estudo foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica no Departamento de Biologia Celular e Bioagentes Patogênicos.

As polpas de celulose foram colocadas sobre as lamínulas circulares que foram secas durante uma noite em estufa a 40°C. Decorrido este período as lamínulas foram submetidas às etapas abaixo:

- Duas lavagens (com o auxílio de uma pinça), em tampão PBS (NaCl 8,0g; KCl 0,2g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2g; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,16g e H<sub>2</sub>O Milli-Q q.s.p. 1000ml), adicionado de CaCl<sub>2</sub>

(0,9mM)/MgCl<sub>2</sub> (0,5mM) a 37°C (esta etapa foi realizada utilizando-se dois recipientes pequenos, mantidos a 37°C, onde as lamínulas foram mergulhadas por 10 vezes);

- As lamínulas foram colocadas em uma placa de 24 poços com 500µl da solução P<sub>glu</sub> (glutaraldeído 2% (v/v) em PBS adicionado de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>), a 37°C e incubadas por duas horas;

- O Tampão P<sub>glu</sub> foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e as lamínulas colocadas em outro poço contendo tampão C<sub>cd</sub> (cacodilato 0,1M, pH 7,4), a 4°C;

- Seguiram-se duas lavagens em C<sub>cd</sub> e de fixação em OsO<sub>4</sub> (tetróxido de ósmio) 1,0% feito com cacodilato 0,2M, por aproximadamente duas horas (temperatura ambiente);

- Cinco lavagens, de três minutos cada, em água Milli-Q, pH 7,0;

- A lamínula foi lavada durante 5 minutos em 25ml de TCH (tiocarbohidrazida) 10% (v/v) feito com água Milli-Q pré-aquecida até 60°C. O material foi resfriado em temperatura ambiente por 1 hora até o TCH dessa solução saturada precipitar (em consequência do resfriamento);

- Incubação das lamínulas por 10 minutos em solução de TCH 10% (v/v) previamente filtrada em filtro Millipore® de 0,22µm ou 0,45µm (temperatura ambiente);

- Mais cinco lavagens, de 3 minutos cada, em água Milli-Q, pH 7,0;

- Desidratação do material fixado nas lamínulas, em recipientes contendo etanol P.A. (Merck®):

30% (v/v)	50% (v/v)	70%(v/v)	90%(v/v)	95%(v/v)	100%(v/v)	100%(v/v)
-----------	-----------	----------	----------	----------	-----------	-----------

5min.	5min.	5min.	5min.	5min.	10min.	10min.
-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------

- O etanol foi colocado no reservatório do ponto crítico (BAL-TEC CPD 030), cobrindo o material. O tanque de CO<sub>2</sub> foi aberto e o material resfriado até 4°C (15 minutos);

- Após o fechamento do tanque de CO<sub>2</sub>, a câmara foi aquecida até 39°C e deixada nesta temperatura por 5 minutos para que o sistema atinja o ponto crítico (o que ocorreu a 31°C e pressão de 73,80 bar). Entretanto, para garantir a eficiência do processo, o material foi submetido a 39°C e 95bar de pressão;

Os espécimes foram secos a vácuo em temperatura ambiente durante 4 horas e, posteriormente, cobertos com vapor de ouro em BALTEC® SCD 050 Sputter Coater ( $\pm$  40 minutos). Após o procedimento, o material estava pronto para fotografar.

### **3.16 Reprodutibilidade**

Todos os experimentos foram realizados de duas a três vezes para a confirmação dos resultados obtidos.

## *IV. Resultados*

**Parte I: Reflorestamento USP, Campus Ribeirão**

**Preto: prospecção de fungos filamentosos**



#### **4.1.1 Prospecção de fungos filamentosos**

As amostras de húmus e terra coletadas no Reflorestamento do Campus da USP de Ribeirão Preto foram levadas ao laboratório para que os microrganismos presentes neste material pudessem ser cultivados. Conforme descrito em Material e Métodos, o isolamento foi realizado em duas temperaturas diferentes (30 e 40°C), com o objetivo de selecionar fungos termofílicos e/ou termotolerantes.

Conforme **tabela 5**, do material em decomposição coletado, isolaram-se 18 fungos filamentosos. Os números 1, 2 e 3 referem-se, respectivamente, às três regiões do reflorestamento, onde foi realizada a coleta. Dentre os 18 fungos isolados, alguns apresentaram as mesmas características morfológicas, quando cultivados em placa de Petri ou observados ao microscópio óptico de luz. Portanto, podem ser pertencentes à mesma espécie e, por isso, receberam a mesma “denominação”, mesmo antes de sua identificação. A **figura 13** mostra os microrganismos coletados no reflorestamento e foram submetidos a “screening”, visando a produção de xilanases.

#### **4.1.2 *Screening* de fungos filamentosos produtores de xilanase**

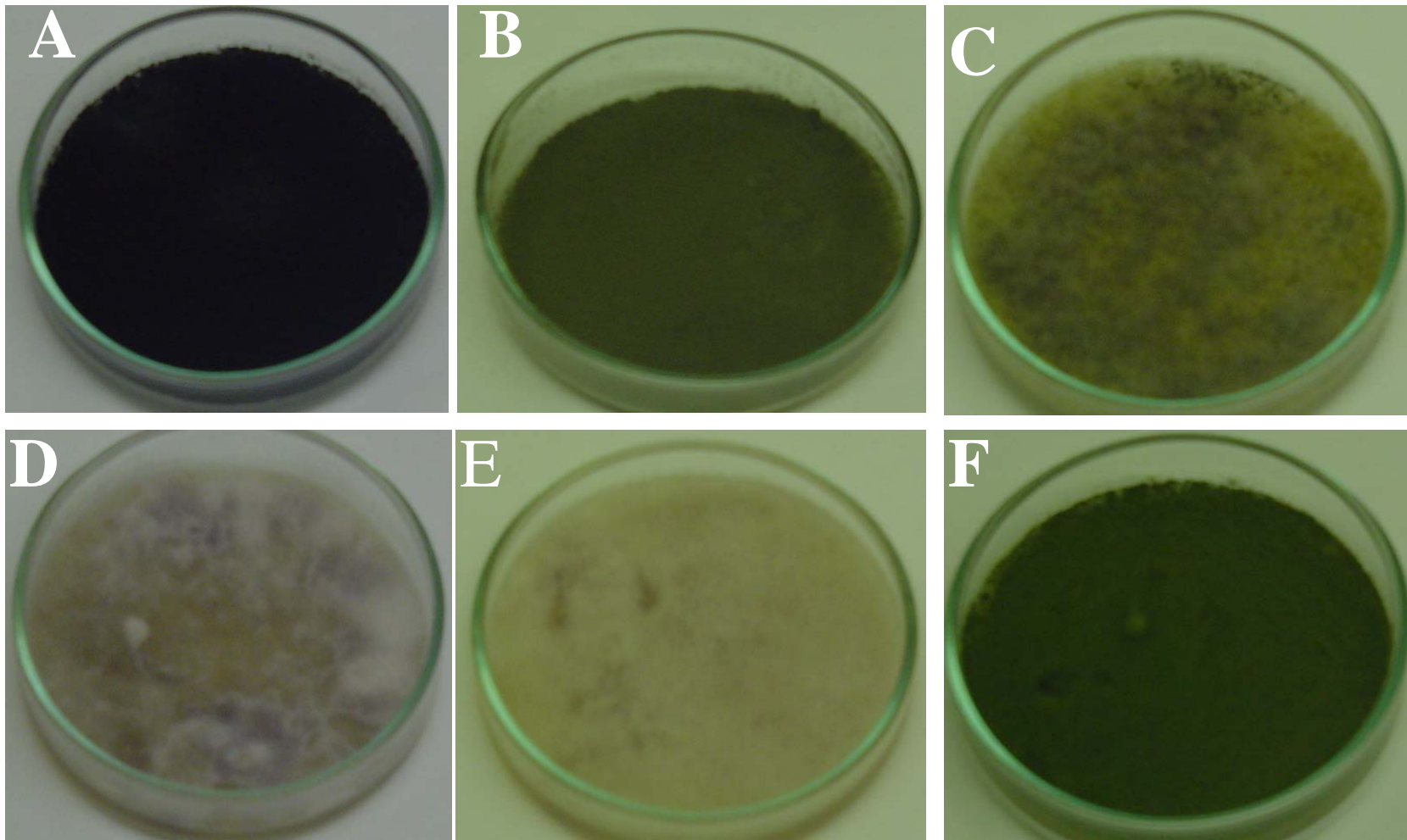
A seleção de microrganismos que produzissem altos níveis de enzimas xilanolíticas constituiu-se uma etapa importante deste trabalho. Foi considerada uma produção de xilanase significativa quando esta correspondeu a 300 U totais ou valores superiores.

**Tabela 5.** Fungos filamentosos coletados em uma área de reflorestamento do Campus da USP de Ribeirão Preto.

Região nº...	Fungos isolados a 30°C	Fungos isolados a 40°C
<b>1</b>	1.1. preto 1.2. branco 1.3. verde aveludado 1.4. amarelinho 1.5. filamentosos	1.1. preto 1.3. verde aveludado 1.5. filamentosos
<b>2</b>	2.1. preto 2.2. verde acobreado 2.3. branco	2.4. verde aveludado
<b>3</b>	3.1. filamentosos 3.2. amarelinho 3.3. verde acobreado 3.4. branco	3.1. filamentosos 3.5. verde aveludado

A seleção de bons produtores de xilanase foi realizada com 43 fungos filamentosos, 18 coletados no reflorestamento, mais outras 25 espécies já presentes em nossa micoteca. Para realização deste experimento, os fungos foram inoculados em meio SR, utilizando xilana birchwood 1% como fonte de carbono. A incubação foi feita a 40°C, durante 72 horas, em estufa bacteriológica.

Os resultados deste experimento estão demonstrados na **tabela 6** onde se observa uma produção xilanolítica (intracelular + extracelular) elevada por várias linhagens testadas. Destacaram-se os fungos *Aspergillus*: *A. niger*, *A. phoenicis*, *A. caespitosus*, preto, verde aveludado (as 3 linhagens testadas) e *A. niveus*. As linhagens até então não identificadas correspondiam às espécies *Aspergillus fumigatus* (verde aveludado) e *Aspergillus niger* (preto).



**Figura 13.** Fungos filamentosos coletados no reflorestamento da USP - Campus de Ribeirão Preto. (A) preto; (B) verde aveludado; (C) amarelinho; (D) filamentosos; (E) branco; (F) verde acobreado.

Tabela 6. Seleção do microrganismo para produção de xilanases.

	Fungos	Massa (g)	Prot. (mg tot)	Ativ. Tot. (U total)		Σ Ativ. Tot. In + Ex	Ativ. Esp. (U/mg prot)	
				Intra	Extra		In	Ex
1	Verde aveludado 3 ( <i>A. fumigatus</i> )	0,4	3,0	16,2	587,0	603,2	5,4	195,6
2	Verde aveludado 4 ( <i>A. fumigatus</i> )	0,3	3,2	16,7	588,1	604,8	5,2	183,8
3	Verde aveludado 5 ( <i>A. fumigatus</i> )	0,5	3,1	16,5	586,3	602,8	5,3	189,2
4	Amarelinho	0,2	1,2	0,5	87,1	87,6	0,4	72,6
5	Preto ( <i>A. niger</i> )	0,3	3,6	166,6	476,7	643,3	46,3	178,7
6	<i>A. niveus</i>	0,4	3,5	24,5	553,2	577,8	7,9	165,1
7	<i>A. caespitosus</i>	0,3	3,1	39,3	645,7	742,0	12,7	208,3
8	<i>A. phoenicis</i>	0,3	4,3	208,8	534,2	743,0	48,5	124,2
9	<i>A. niger</i>	0,3	3,5	29,1	942,2	971,3	8,3	269,2
10	<i>Paecilomyces variotii</i>	0,2	3,9	18,4	125,0	143,4	4,7	32,1
11	<i>Trichoderma reesei</i>	0,1	3,1	5,1	337,1	342,2	1,6	108,7
12	<i>Trichoderma aureovidae</i>	0,1	1,9	10,5	169,0	179,5	5,5	89,0
13	Triparis 2	0,5	2,3	16,9	83,7	90,6	3,0	36,4
14	A1	0,5	2,6	3,9	57,5	61,4	1,5	22,1
15	Bege médio ( <i>A. flavus</i> )	0,1	6,3	10,3	136,4	146,7	1,6	5,7
16	Pão escuro	0,4	4,3	12,3	84,7	97,0	2,8	19,7
17	Batata	0,5	3,9	7,7	296,2	303,9	1,9	76,0
18	C9A	0,2	2,5	5,8	64,0	69,8	2,3	25,6
19	Cinza	0,4	2,3	31,0	263,5	294,5	13,5	128,1
20	J I-2	0,4	3,8	19,1	102,2	121,3	5,0	26,9
21	J II-1	0,3	5,5	28,7	132,5	116,2	5,2	24,1
22	J IV	0,4	3,5	4,7	111,0	125,7	4,2	86,2
23	Ingá ferradura 2	0,2	2,1	7,4	92,5	99,9	3,5	44,1
24	Desconhecido	0,5	4,4	42,6	249,5	292,1	9,6	56,7
25	<i>Chaetomium thermophilum</i> var. <i>coprophilum</i>	0,1	8,7	7,3	167,4	174,7	0,8	19,2
26	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	0,2	2,6	27,8	100,3	128,1	10,7	38,6
27	<i>Neurospora crassa</i> (OS1)	0,3	2,6	1,8	67,2	69,0	0,7	25,8
28	<i>N. crassa</i> (selvagem)	0,2	2,2	15,3	127,2	142,5	7,0	57,8
29	<i>N. crassa</i> (Exo)	0,2	4,8	8,8	36,9	45,7	1,8	7,7

Foram testados mais 14 microrganismos (C9-C, C9-B, brancos 1, 2 e 3, acobreados 1, 2 e 3, filamentosos 1, 2, e 3, *Mucor rouxii*, *Talaromyces flavus* MT 2.5 e *A. versicollor*). Em nenhum se detectou produção significativa de xilanase.

É importante ressaltar que *A. phoenicis* e *A. caespitosus* destacaram-se consideravelmente como bons produtores de xilanase. Entretanto, já foram estudados em nosso laboratório por RIZZATTI *et al.* (2001, 2004 e 2008) e SANDRIM *et al.* (2005), respectivamente. Essas cepas foram incluídas como controles visando comparação dos níveis de xilanase com os demais microrganismos isolados. As linhagens de *A. niger* (uma de nossa micoteca e outra – preto - coletada no reflorestamento) também se destacaram como bons produtores. Entretanto, há uma literatura vasta sobre esta espécie de fungo para a produção de xilanase (XU *et al.*, 2008). Assim, foram selecionados para nosso trabalho, a espécie coletada no reflorestamento denominada de verde aveludado (posteriormente identificada como *A. fumigatus*) e o fungo *A. niveus* (já presente em nossa micoteca).

Seguiram-se os trabalhos de otimização das condições de cultivo de ambos os fungos selecionados, nesta etapa do trabalho, para melhorar a produção de xilanase e, posteriormente, também de enzimas ligninolíticas por *Aspergillus niveus*.

**Parte II: Padronização das condições de cultivo para produção  
enzimática**

Após a seleção dos fungos *A. niveus* e *A. fumigatus* foram iniciados os trabalhos de padronização das condições de cultivo para a produção das enzimas de interesse. Estudaram-se as xilanases produzidas por ambos os fungos, enquanto o estudo das ligninases foi realizado apenas com *A. niveus*.

#### 4.2.1 Xilanases

##### 4.2.1.1 Padronização das condições de cultivo dos fungos

##### *Aspergillus niveus* e *Aspergillus fumigatus*

Para padronizar as condições de cultivo de ambos os fungos, testaram-se diferentes composições de meios líquidos de cultivo: SR, CP, Khanna, Czapeck, Vogel e M-5. Os fungos foram incubados em estufa bacteriológica, a 40°C, por 96 horas em meio suplementado com xilana birchwood 1%.

Segundo a **tabela 7**, a melhor produção enzimática foi obtida nos meios Vogel e Czapeck para *A. fumigatus* e *A. niveus*, respectivamente. Comparando-se os níveis enzimáticos com os demais meios de cultura, estes foram em média 20% maiores em meio Czapeck para *A. niveus* e 26% para *A. fumigatus* quando cultivado em meio Vogel.

Os meios de cultura selecionados apresentam composição mínima (apenas solução de sais e fonte de carbono) minimizando a síntese de outras proteínas contaminantes que poderiam dificultar os estudos de purificação. Vale ressaltar também que, quanto mais simples a composição de um meio de cultivo, menor o custo de produção da xilanase em estudo e, conseqüentemente, menor será o custo do produto final.

**Tabela 7.** Seleção do melhor meio de cultura para produção de xilanases pelos fungos *Aspergillus niveus* e *Aspergillus fumigatus*.

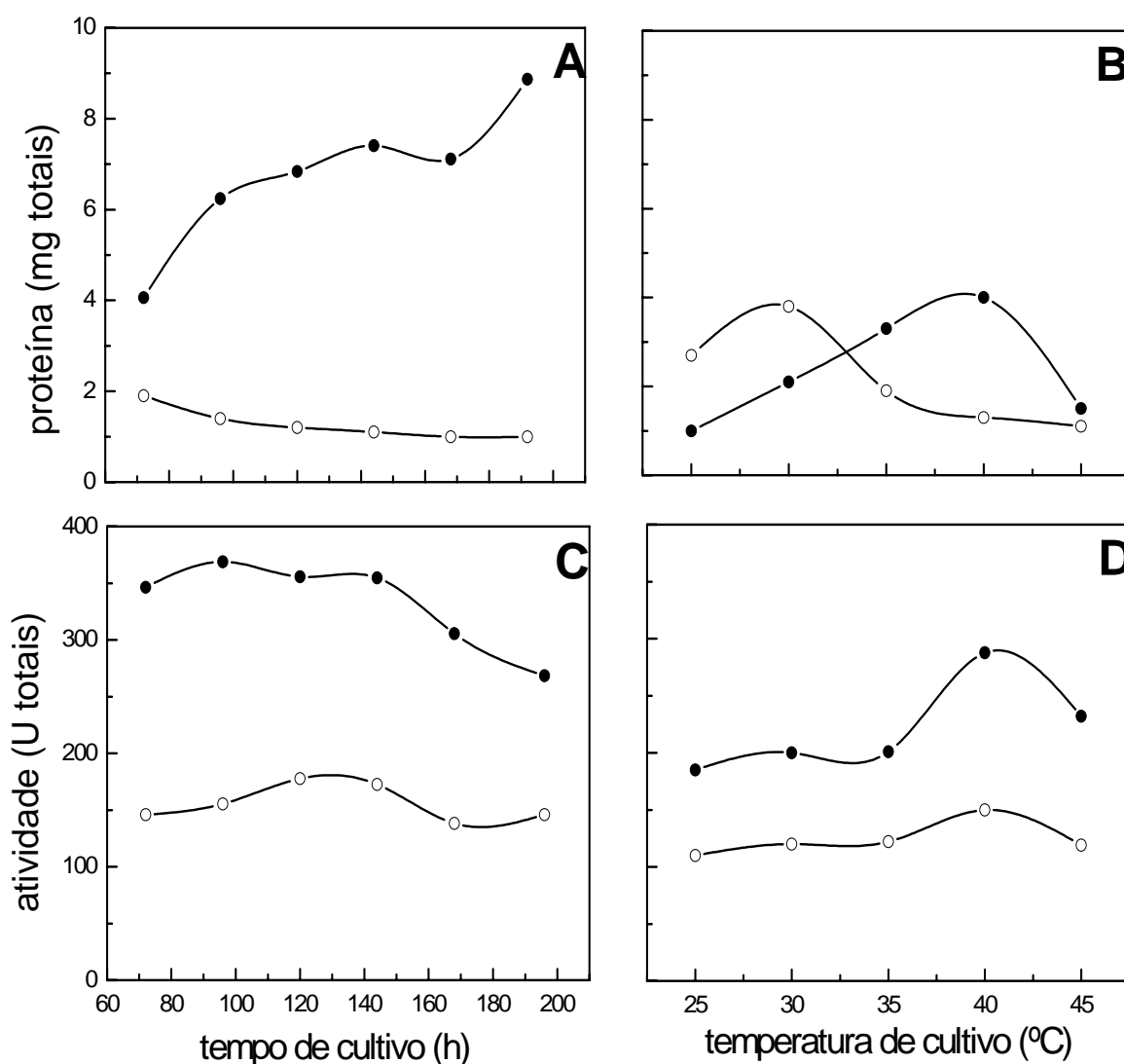
Fungo	Meio	Proteína (mg totais)	Atividade (U totais)	Atividade (U/mg prot)
	SR	3,9	140,7	36,1
	CP	2,2	62,0	28,2
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Khanna	2,7	116,3	43,1
	Czapeck	3,6	93,0	25,8
	Vogel	3,2	348,0	108,7
	M-5	1,3	46,5	35,7
	SR	1,5	24,6	16,4
	CP	1,4	20,8	14,8
<i>Aspergillus niveus</i>	Khanna	1,4	28,7	20,5
	Czapeck	2,5	105,0	42,0
	Vogel	1,4	26,8	19,2
	M-5	1,3	11,8	9,1

*A. fumigatus* e *A. niveus* foram cultivados em condições estáticas, a 40°C durante 96 horas.

Visando aumentar ainda mais a produção xilanásica pelos fungos em estudo, o crescimento e a produção enzimática foram acompanhados durante 196 horas em meio Czapeck e Vogel para *A. niveus* e *A. fumigatus*, respectivamente. Ambos os meios foram suplementados com xilana birchwood 1%.

Durante todo o período experimental, *A. fumigatus* desenvolveu-se consideravelmente (**figura 14A**) e o máximo da produção xilanólítica foi detectada com 96 horas de cultivo (**figura 14C**). Ao final do experimento, observou-se uma redução nos níveis de atividade xilanásica, provavelmente devido a uma inibição das enzimas pelo seu produto final. Para *A. niveus* o pico de crescimento foi observado com 72 horas (**figura 14A**), mas o máximo de produção enzimática ocorreu com 120 horas de cultivo, sugerindo a ocorrência de uma autólise parcial do micélio ao final do período de cultivo.



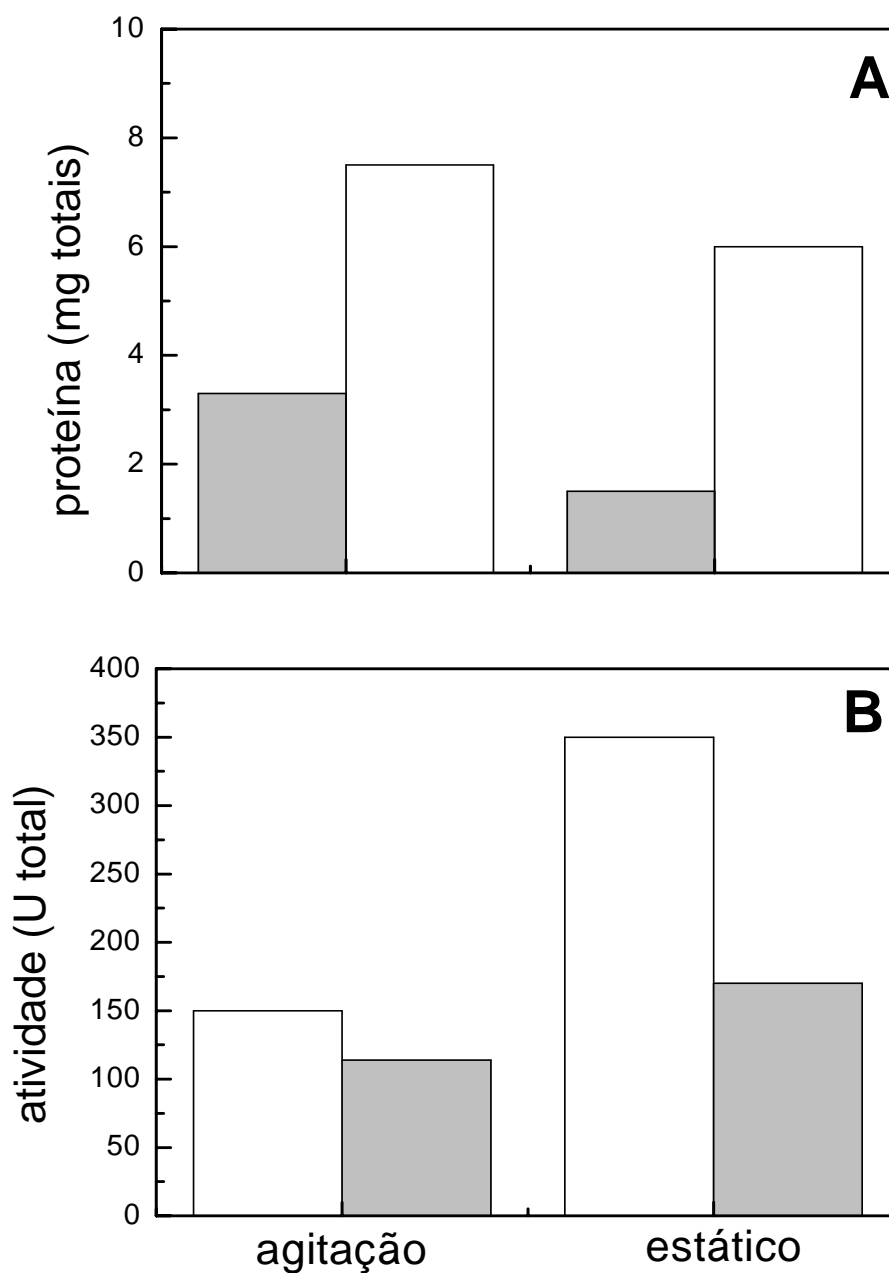


**Figura 14.** Tempo e temperatura de cultivo dos fungos *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niveus* para produção de xilanase. Proteína total (A;B) e atividade total (C; D) durante diferentes tempos de cultivo a 40°C (A; C) e em diferentes temperaturas durante 96h para *A. fumigatus* ou 120h for *A. niveus* (B; D). Os microrganismos foram cultivados em suas respectivas condições de cultivo em meio suplementado com xilana. Símbolos: -●- *Aspergillus fumigatus*; -○- *Aspergillus niveus*.

Comparando-se a produção xilanásica total de ambos os fungos, em seus respectivos tempos ótimos de cultivo (**figura 14C**), observou-se que *A. fumigatus* produziu 2,1 vezes mais xilanase que *A. niveus*. Já em relação aos valores de atividade específica (U/mg proteína) os de *A. niveus* foram 25,5 vezes maiores que de *A. fumigatus* (**figura 14A; 14C**).

Observou-se também a influência da temperatura de cultivo no desenvolvimento e na produção enzimática dos microrganismos em estudo (**figuras 14B; 14D**). Embora a máxima produção de xilanólítica tenha ocorrido a 40°C (**figura 14D**), a temperatura que mais favoreceu o desenvolvimento foi de 30 e 40°C para *A. niveus* e *A. fumigatus*, respectivamente (**figura 14B**). Esses resultados sugerem um caráter termotolerante para os fungos em estudo.

Com o objetivo de analisar o efeito de condições físicas de incubação sobre o crescimento e a produção xilanólítica, ambos os fungos foram cultivados em condições estáticas ou sob agitação (100rpm). Os fungos desenvolveram-se 2,6 vezes mais sob agitação (**figura 15A**), mas, em contraste, quando cultivado em condições estáticas (**figura 15B**), os níveis de produção xilanásica foram 2,3 vezes maiores para *A. fumigatus* e 1,46 vezes maior para *A. niveus*, em comparação com as culturas incubadas sob agitação. *A. fumigatus* produziu aproximadamente 2,3 vezes mais xilanase que *A. niveus* (**figura 15B**).



**Figura 15.** Influência da agitação no cultivo de *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niveus* para a produção de xilanase. Proteína total (A) e atividade total (B) sob agitação (100rpm) ou em condições estáticas. Os microrganismos foram cultivados nas condições padronizadas. Colunas brancas - *Aspergillus fumigatus*; colunas cinzas - *Aspergillus niveus*.

Sabendo da importância da fonte de carbono no meio de cultura, para que um organismo possa se desenvolver e produzir compostos de interesse, várias fontes de carbono foram testadas com o intuito de maximizar a produção xilanólica. Foram testadas: xilanas (birchwood, oat spelt e de eucalipto – *Eucalyptus grandis*), glicose, xilose,  $\beta$ -metilxilosídeo, arabinose, avicel, celobiose, xilitol, flocos de arroz, farelo de trigo, flocos de aveia, flocos de cevada, flocos de soja, flocos de milho, sabugo de milho moído, milho moído (sabugo + palha + grão), palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar (**tabela 8**).

*A. fumigatus* produziu 5 a 7% mais xilanase em milho moído, farelo de trigo e sabugo de milho moído, quando comparado com xilana birchwood. Em palha e flocos de arroz, registraram-se níveis semelhantes de xilanase, assim como a xilana birchwood e, por isso, também podem ser utilizadas como fonte de carbono alternativa para a produção de enzimas xilanólicas. Já a xilanase de *A. niveus* foi produzida preferencialmente em farelo de trigo e milho moído, mas xilana birchwood, xilose, xilana de *Eucalyptus grandis* e xilana oat spelt também foram bons substratos para a produção desta enzima.

Embora alguns resíduos agroindustriais tenham induzido bons níveis de xilanase para ambos microrganismos, nos estudos de purificação optou-se por utilizar xilana, uma vez que esta fonte de carbono não apresentaria composição complexa como os resíduos e, portanto, não levaria à indução de proteínas contaminantes que dificultam os estudos de purificação enzimática. Entretanto, no intuito de melhor conhecer o "potencial xilanólico" dos *Aspergillus* em estudo (**tabela 8**), foi utilizado meio suplementado com farelo de trigo (**tabela 8**) para determinar a atividade de

outras enzimas do sistema xilanolítico como acetil-xilana-esterase (AXE) e L-arabinofuranosidase (ARF).

**Tabela 8.** Seleção da melhor fonte de carbono para a produção de xilanase e extracelular.

Fonte de carbono	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. niveus</i>
	Atividade (U totais)	
Sem fonte de carbono	28,9	6,9
Glicose	78,9	43,9
Xilose	161,4	99,5
Xilana birchwood	347,0	100,3
Xilana oat spelt	223,2	93,5
Xilana <i>Eucalyptus grandis</i>	136,8	97,8
$\beta$ -metilxilosídeo	155,3	9,2
Arabinose	60,3	64,8
Avicel	44,7	0,0
Celobiose	17,2	6,9
Xilitol	91,2	25,4
Flocos de arroz	343,1	60,2
Farelo de trigo	368,8	114,3
Flocos de aveia	103,8	37,1
Flocos de cevada	121,7	69,4
Flocos de soja	170,5	37,1
Flocos de milho	142,8	11,6
Sabugo de milho moído	366,8	55,6
Milho moído (sabugo + palha + grão)	371,1	111,8
Palha de arroz	349,1	32,4
Bagaço de cana-de-açúcar	164,1	20,8

*A. fumigatus* e *A. niveus* foram cultivados em MLV (96h) e Czapeck (120h), respectivamente. Culturas incubadas a 40°C, condições estáticas. Xilanas: Sigma®. Xilana eucalipto: cedia pela Profa. Dra. Marta Regina Teixeira, UNICAMP – extraída por metodologia de TIMELL, 1965.

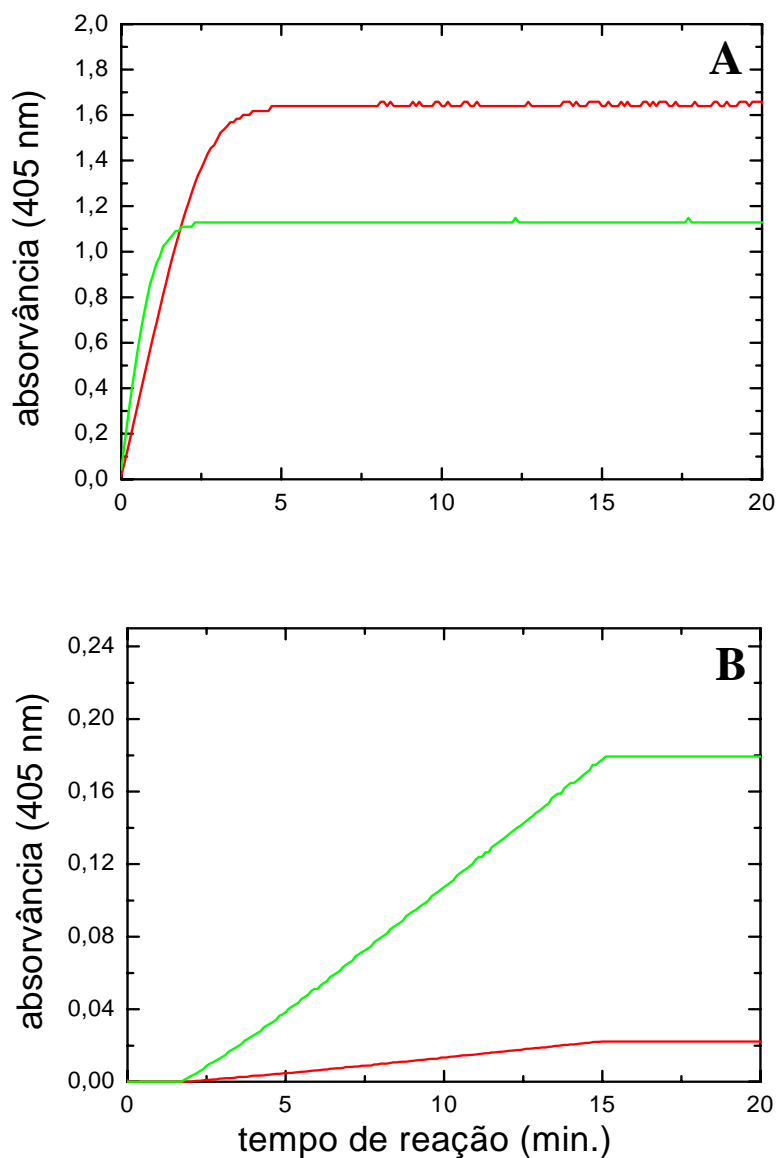
Para a realização deste experimento, foram utilizados meios suplementados com farelo de trigo, pois, por se tratar de uma fonte de carbono

altamente complexa, é possível que induza uma maior variedade de enzimas xilanolíticas.

A determinação das atividades acetil-xilanaesterásica e L-arabinofuranosidásica foram realizadas através de cinética contínua em espectrofotômetro termostatizado. Observando-se os resultados expressos na **figura 16**, vê-se que os microrganismos em estudo realmente produziram outras enzimas do sistema xilanolítico (AXE e ARF - item 3.6.1.2) além das endoxilanasas (item 3.6.1.1). Os maiores níveis de AXE foram detectados no extrato bruto de *A. niveus*, enquanto a ARF foi produzida em maior quantidade por *A. fumigatus*. Nas condições de cultivo até aqui padronizadas para a produção de xilanasas, verificou-se indução de elevados níveis de AXE e AFR. Este dado abriu possibilidades para a realização de futuros estudos em nosso laboratório acerca da padronização das condições de cultivo para indução AXE e AFR, bem como de suas propriedades bioquímicas e funcionais. Além de AXE e da ARF também se determinou a atividade  $\beta$ -xilosidásica, entretanto esta enzima não foi detectada no extrato extracelular.

#### **4.2.1.2 Caracterização dos extratos brutos produzidos pelos fungos *Aspergillus niveus* e *Aspergillus fumigatus***

Foi realizada a caracterização do extrato bruto. Tais conhecimentos foram fundamentais às etapas subsequentes de desenvolvimento desse trabalho. Sabendo-se das condições de temperatura e pH, nas quais as xilanasas em estudo agem melhor, pode-se determinar em qual (ou quais) bioprocessos é possível aplicar essas enzimas. Além disso, os catalisadores utilizados na maioria dos bioprocessos deverão ser resistentes tanto à desnaturação térmica como química.



**Figura 16.** Determinação das atividades acetil-xilanoesterásica (**A**) e L-arabinofuranosidásica (**B**) presentes nos extratos brutos de *A. fumigatus* e *A. niveus* suplementados com farelo de trigo 1% como fonte de carbono. Símbolos: linha vermelha – *Aspergillus niveus*, linha verde – *Aspergillus fumigatus*.

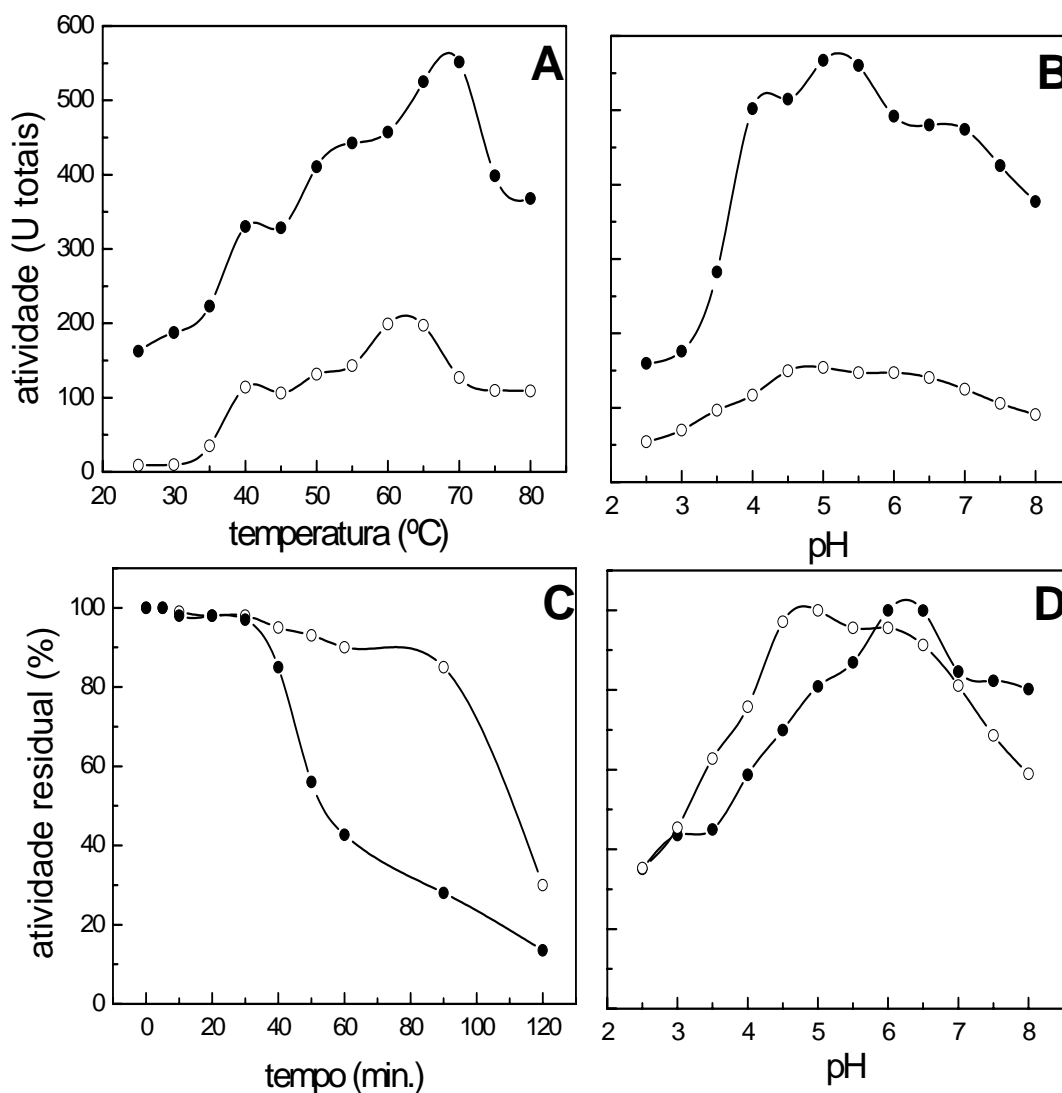
Para determinar a temperatura de reação, as dosagens enzimáticas foram realizadas de 25-80°C e, para as xilanases de *A. niveus*, a maior atividade foi

registrada numa faixa de 60-65°C, enquanto para *A. fumigatus* correspondeu a 70°C (**figura 17A**). Para *A. fumigatus*, o pH ótimo de reação foi de 5 a 5,5 enquanto para *A. niveus* foi de 4,5 a 5 (**figura 17B**).

Mesmo que *A. fumigatus* tenha produzido aproximadamente de 3 a 4 vezes mais xilanase que *A. niveus*, a termoestabilidade das enzimas foi semelhante a 65°C durante 30 minutos. Após este período, a atividade xilanolítica residual de *A. fumigatus* reduziu consideravelmente e, após 120 minutos, apresentava apenas 10% de atividade residual, enquanto a xilanase de *A. niveus* ainda mantinha 30% de sua atividade inicial (**figura 17C**). Embora a xilanase de *A. fumigatus* reaja melhor a 70°C (e de *A. niveus* ao redor de 60°C), sua xilanase foi menos termoestável em comparação com a enzima de *A. niveus* sugerindo que o substrato (xilana) provavelmente protegeu a enzima.

A estabilidade das xilanasas, em diferentes pHs de 2,5-8,0, também foi testada (**figura 17D**) e os resultados foram diferentes para ambos os fungos em estudo. *A. fumigatus* apresentou a xilanase mais estável em pHs de 6,0 a 8,0, enquanto a xilanase de *A. niveus* foi mais estável em pHs de 4,5 a 6,5, embora, os pHs de reação das xilanasas tenham sido próximos a 5,0-5,5 para *A. fumigatus* e 4,5-5,5 para *A. niveus* (**figura 17C**).





**Figura 17.** Efeito da temperatura (A) e do pH (B) na reação enzimática; termoestabilidade a 65°C (C) e estabilidade ao pH (D) da xilanase extracelular produzida por *A. fumigatus* e *A. niveus*. Os microrganismos foram cultivados em suas respectivas condições previamente padronizadas e as reações foram realizadas conforme descrito em Material e Métodos. Símbolos: -●- *Aspergillus fumigatus*; -○- *Aspergillus niveus*.

## 4.2.2 Ligninases

### 4.2.2.1 Otimização das condições de cultivo de *Aspergillus niveus*

Nosso objetivo inicial foi otimizar a produção de xilanase para aplicação biotecnológica na indústria de papel e celulose em processos denominados de biobranqueamento. Outras enzimas importantes para aplicação neste processo são as ligninases (lacase, Mn-peroxidase e lignina-peroxidase).

Assim, resolveu-se investigar se *A. niveus* e *A. fumigatus* eram capazes de expressar, ao menos, alguns níveis dessas enzimas para, então, investir na otimização das condições de cultivo para a produção de ligninases pelos mesmos fungos.

Inicialmente, os fungos foram cultivados nas condições previamente padronizadas para xilanase (40°C, condições estáticas, meio Czapeck/120 horas - *A. niveus* ou meio Vogel/96 horas - *A. fumigatus*). Neste experimento a fonte de carbono utilizada foi o farelo de trigo pois, por ser mais complexa, poderia induzir outras enzimas além da xilanase como, por exemplo, as ligninases.

Nos cultivos com *A. fumigatus*, nenhuma atividade ligninolítica foi detectada. Já em *A. niveus*, os níveis enzimáticos não foram significativos como os níveis de xilanase (todos menores que 300 U totais – **tabela 9**), mas foram maiores que 100U para Mn-P e Li-P e, por isso, estudos sobre a otimização das condições de cultivo para a produção das ligninases foi prosseguido em fermentação substrato sólido (FSS), uma vez que na literatura há uma maior quantidade de artigos que descrevem este tipo de meio como sendo mais adequado à produção de enzimas lignolíticas (CARVALHO, 2004). Vale ressaltar também que os cultivos em FSS são menos onerosos, uma vez que se utilizam de resíduos agroindustriais e, portanto são mais viáveis (PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2008b).

**Tabela 9.** Determinação da atividade ligninolítica do fungo *Aspergillus niveus* em meio líquido.

Ligninases – <i>Aspergillus niveus</i>	Atividade (U totais)
Lacase	67,5
Mn-peroxidase	217,5
Lignina-peroxidase	182,7

*A. niveus* foi cultivado em meio líquido Czapeck (120h). As culturas foram suplementadas com farelo de trigo e incubadas em condições estáticas e a 40°C.

Inicialmente, foram testados tempos de cultivos (72 a 144h) com dosagens a cada 24 horas, conforme vinha sendo feito para xilanase, bem como tempos mais longos (1, 2, 3, 4 e 5 semanas), com dosagens semanais, conforme CARVALHO (2004). Para este cultivo em FSS, foi utilizado farelo de trigo umedecido com meio Czapeck (1:2 – m/v), incubado a 40°C em estufa bacteriológica, com umidade relativa ao redor de 70%.

Observando-se os resultados (**tabela 10**), verificou-se que os maiores níveis enzimáticos foram detectados com 2, 3 e 5 semanas para lacase, Mn-P e Li-P, respectivamente.

No intuito de aumentar ainda mais a produção das enzimas do sistema ligninolítico, o fungo *A. niveus* foi cultivado em diferentes soluções de sais para definir qual era a mais adequada. As soluções foram sais de Khanna, sais de Vogel, sais de SR e em meio Czapeck. A composição dessas soluções está descrita em Material e Métodos. Foram testadas também outras três soluções: solução N1 composta por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,05M; N2 por  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  - 0,5M e solução N3 composta por uma mistura de ambas ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  +  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  - 0,025M cada um). O tempo de cultivo variou entre 2 e 5 semanas, conforme padronizado no experimento anterior (**tabela 10**).

**Tabela 10.** Determinação do tempo de cultivo para a produção de ligninases pelo fungo *Aspergillus niveus* em FSS. Atividade (%) de lacase, Mn-P e Li-P.

Tempo de cultivo (D)	Lacase (%)	Mn-P (%)	Li-P (%)
3	6,4	3,9	9,3
4	7,7	6,3	33,5
5	14,5	36,6	39,1
6	38,7	48,1	40,3
7	55,3	71,0	60,4
14	100,0	1,2	66,9
21	97,7	100,0	72,7
28	92,4	0,6	86,5
35	85,7	0,0	100,0
42	-	-	42,0

*A. niveus* foi cultivado em FSS composto de farelo de trigo e solução de sais de meio Czapeck (1:2 – m/v), a 40°C e com umidade relativa ao redor de 70%. D = dias de incubação.

Os resultados expressos na **tabela 11** mostram que, nas culturas umedecidas com solução de sais de Khanna, o crescimento do fungo foi sempre elevado (mais de 10mg totais de proteína) sendo que, nas culturas para produção de Mn-P e lacase, umedecidas com solução de sais de Khanna, este crescimento foi máximo após 3 e 2 semanas, respectivamente. Já nas culturas para a produção de Li-P, embora tenha havido grande crescimento de massa micelial na presença de solução de sais de Khanna, o máximo desenvolvimento do fungo ocorreu nas culturas umedecidas de solução de sais de Czapeck.

Vale ressaltar que o farelo de trigo é um resíduo agroindustrial que possui um alto teor de proteínas que poderiam interferir nos resultados. Entretanto, em todas as culturas, este valor de proteínas provenientes do resíduo deverão ser muito próximos, uma vez que em todos os meios utilizou-se a mesma quantidade de farelo de trigo e das respectivas soluções salinas (a única variação foi o tempo de cultivo). Assim, a diferença nos valores de proteína foi atribuída ao crescimento microbiano.

**Tabela 11.** Determinação da melhor solução de sais para induzir a produção de enzimas ligninolíticas pelo fungo *A. niveus*.

Mn-P	Atividade (%)	Proteína (mg totais)
N1	41,8	8,0
N2	20,1	8,0
N3	100,0	7,9
Khanna	0,0	18,3
Vogel	0,0	0,0
SR	7,5	8,0
Czapeck	29,9	8,0
<b>Lacase</b>		
N1	0,0	8,7
N2	100,0	9,8
N3	82,0	10,0
Khanna	8,4	23,0
Vogel	0,0	6,3
SR	34,2	9,7
Czapeck	49,7	8,9
<b>Li-P</b>		
N1	47,9	5,8
N2	42,7	15,1
N3	77,7	7,3
Khanna	58,5	12,0
Vogel	51,8	5,0
SR	100,0	6,3
Czapeck	67,4	27,8

*A. niveus* foi cultivado em FSS composto de farelo de trigo e umedecido com diferentes soluções de sais (1:2 – m/v), 30°C e com umidade relativa ao redor de 70%. Cultivo para Mn-P – 3 semanas; lacase – 2 semanas e Li-P – 5 semanas. N1 =  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,05M; N2 -  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,05M e N3 – combinação de N1 e N2 a 0,025M.

Quanto à produção enzimática, esta foi maior em meio umedecido com solução N3 e N2 para Mn-P e lacase, respectivamente. É possível que esta maior produção seja resultado da presença de nitrogênio de origem inorgânica, que é mais rapidamente assimilado, e da presença do íon fosfato na solução N2, que funciona como um importante cofator de uma infinidade de enzimas. Já a produção de Li-P foi em média 1,7 vezes mais

elevada em meio umedecido com solução de sais de SR, também, provavelmente, devido à suplementação com nitrogênio de origem inorgânica, fosfato (presente em quantidade maior na solução SR – item 3.4.1) e magnésio.

#### 4.2.2.2 Caracterização do extrato bruto produzido por

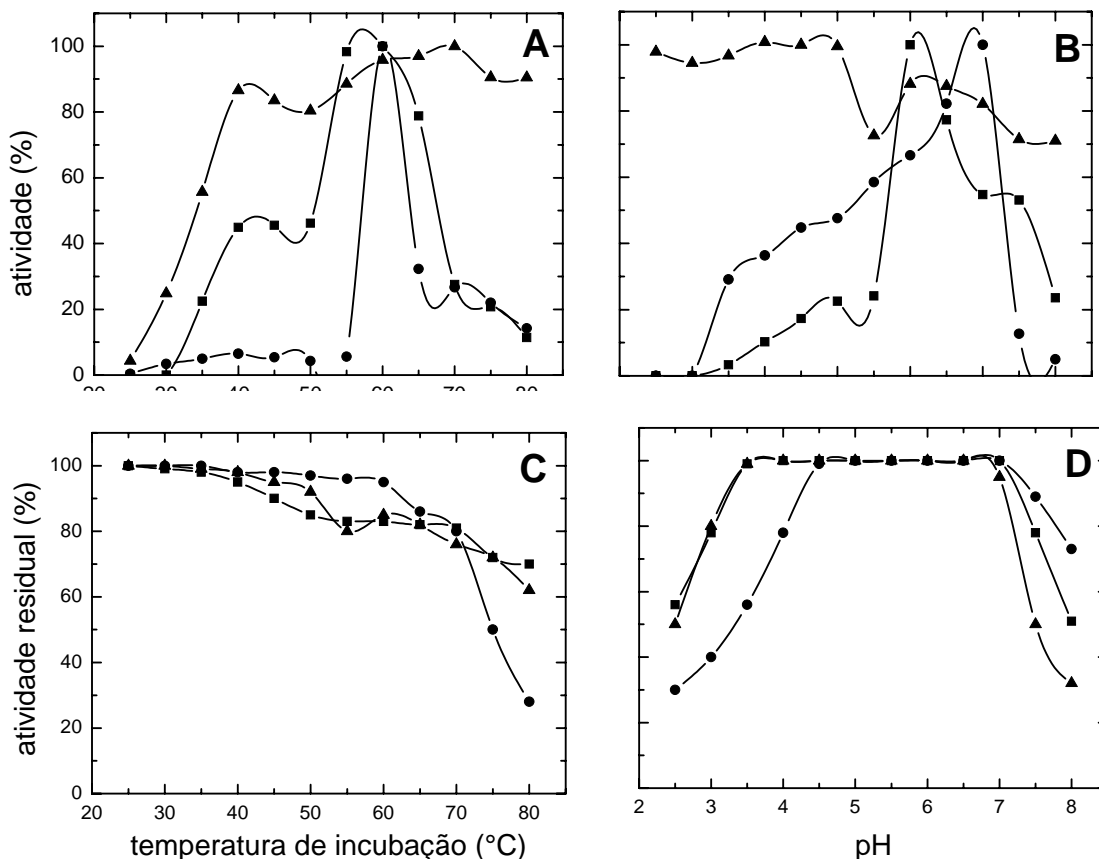
##### *Aspergillus niveus*

Assim como para as xilanases, o extrato bruto, contendo as ligninases de *A. niveus*, foi devidamente caracterizado, determinando-se temperatura e pH das reações enzimáticas e suas respectivas termoestabilidade e estabilidade ao pH.

A temperatura de reação para as ligninases correspondeu a 60°C para lacase e Mn-P e 70°C para Li-P (**figura 18A**). Já os valores de pH de reação corresponderam a 7,0, 6,0 e 4,0-5,0 para lacase, Mn-P e Li-P, respectivamente (**figura 18B**). Esses valores são interessantes, uma vez que não são tão diferentes daqueles obtidos para o extrato bruto contendo xilanase (65°C, pH 4,5 – 5,5) e, portanto, favoreceu a utilização de um *mix* de xilanases com ligninases no biobranqueamento da polpa de celulose de modo que, as xilanases atuariam degradando a xilana e deixando os polímeros de lignina mais expostos à ação das ligninases.

Para determinar a termoestabilidade das enzimas, alíquotas foram incubadas em diferentes temperaturas (25-80°C) por 1 hora e as três enzimas apresentaram considerável termoestabilidade. As enzimas Mn-P e Li-P não chegaram nem mesmo a perder 50% de sua atividade nas temperaturas testadas. Apenas lacase chegou a perder 50% de atividade, mas precisou ficar incubada por uma hora em temperaturas de 75-80°C (**figura 18C**).

A estabilidade das ligninases em diferentes pHs também foi testada (**figura 18D**) e as enzimas Mn-P e Li-P apresentaram-se menos estáveis a extremos de pH ácido ou alcalino e ficaram mais estáveis em pHs 3,0-7,0. Já a lacase manteve quase 100% da atividade inicial em pHs 4,5-8,0.



**Figura 18.** Efeito da temperatura (A) e do pH (B) na reação enzimática; termoestabilidade (C) e estabilidade ao pH (D) das ligninases extracelulares (lacase Mn-P e Li-P) produzidas por *A. niveus*. Os microrganismos foram cultivados em suas respectivas condições padronizadas e as reações foram realizadas conforme descrito em Material e Métodos. Símbolos: -●- lacase, -■- Mn-P e -▲- Li-P.

**Parte III: Estudo do potencial de aplicação biotecnológico das enzimas produzidas por *Aspergillus niveus* e/ou *Aspergillus fumigatus***



As xilanases produzidas por *Aspergillus niveus* e *Aspergillus fumigatus*, bem como as ligninases de *Aspergillus niveus*, apresentaram características como, por exemplo, resistência ao pH e considerável termoestabilidade. Assim, as enzimas presentes neste extrato bruto são, aparentemente, interessantes para aplicação biotecnológica.

Para saber se as enzimas em estudo eram realmente viáveis para uma possível aplicação industrial, elas foram testadas: (1) no biobranqueamento da polpa de celulose (realizado com **xilanases** e/ou **ligninases**); (2) adição em rações para ruminantes (realizado apenas com **xilanases**).

#### **4.3.1 Biobranqueamento da polpa de celulose para a fabricação de papel**

##### **4.3.1.1 Utilização de xilanases de *Aspergillus niveus* ou *Aspergillus fumigatus* no tratamento da polpa de celulose**

O trabalho publicado sobre o estudo de padronização das condições de cultivo dos fungos *A. fumigatus* e *A. niveus*, caracterização dos respectivos extratos brutos e aplicação no biobranqueamento da polpa de celulose encontra-se no apêndice 1.

Para a realização deste trabalho, a quantidade de xilanase utilizada correspondeu a 10U/g de polpa seca, durante uma hora, na temperatura de reação adequada a cada xilanase.

Os melhores resultados foram obtidos com as xilanases de *Aspergillus niveus* (**tabela 12**), que resultou em uma diminuição de 4,6 pontos do número

kappa em comparação ao controle (eficiência de 39,6%). Quando a polpa de celulose foi tratada com xilanases de *A. fumigatus*, observou-se uma redução de apenas 0,9 pontos (eficiência de 11,7%). Com a xilanase de *A. niveus*, a alvura aumentou 3,4 pontos contra apenas 2 pontos, utilizando-se xilanase de *A. fumigatus*. A viscosidade decresceu 9,2%, quando as xilanases de *A. fumigatus* foram utilizadas, entretanto, com as xilanases de *A. niveus*, nenhuma redução de viscosidade da polpa foi detectada, indicando que este extrato bruto encontrava-se livre de celulases. A ausência de celulases no extrato bruto dos fungos *A. niveus* e *A. fumigatus*, foi confirmada por análises segundo o método de MILLER (1959), o qual não detectou a formação de açúcares redutores (dados não mostrados).

**Tabela 12.** Biobranqueamento da polpa de celulose por xilanases produzidas por *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niveus*.

	<i>A. fumigatus</i>		<i>A. niveus</i>	
	Controle	Tratada	Controle	Tratada
<b>Numero kappa</b>	7,7	6,8	11,7	7,1
<b>Eficiência do kappa (%)</b>	-	11,7	-	39,6
<b>Viscosidade (cm<sup>3</sup>/g)</b>	942	855	901	901
<b>Alvura (ISO)</b>	56,7	58,7	54,7	58,1

Os microrganismos foram cultivados nas respectivas condições padronizadas. Os controles corresponderam às amostras não tratadas. Os tratamentos foram realizados com as xilanases extracelulares (10U/g de polpa seca de celulose), durante 1h a 70°C para *A. fumigatus* ou 65°C para *A. niveus*.

Os resultados obtidos com *Aspergillus niveus* foram melhores e, aparentemente, mais promissores em comparação àqueles de *Aspergillus fumigatus*, entretanto as xilanases deste segundo fungo também foram interessantes.

#### 4.3.1.2 Utilização de ligninases de *Aspergillus niveus* e/ou MIX de xilanases e ligninases de *Aspergillus niveus*

Conforme já mostrado, além da otimização das condições de cultivo dos fungos *A. niveus* e *A. fumigatus* para a produção de xilanases, padronizou-se também a produção dos três tipos de ligninases. A quantidade de enzima utilizada foi igual a 5U de Mn-P por grama de polpa seca + 3U de Li-P por grama de polpa seca + 2U de lacase por grama de polpa seca, durante uma hora na temperatura de reação adequada. Outro tratamento realizado foi com um *mix* das enzimas xilanase - 5U/g de polpa seca + ligninases (Mn-P - 2,5U/g de polpa + Li-P - 1,5U/g de polpa seca + lacase - 1U/g de polpa seca).

Comparando-se as **tabelas 12 e 13**, observaram-se os bons resultados obtidos com o biobranqueamento, utilizando-se xilanases de *A. niveus* (**tabela 12**). Esses foram ainda melhores já que o número kappa diminuiu 3 pontos comparação ao controle. Quando a polpa de celulose foi tratada com o *mix*, observou-se uma redução de 6,5 pontos do número kappa. Esses valores corresponderam a uma eficiência do kappa de 26% para ligninases contra 56% para o *mix* enzimático. Utilizando-se apenas ligninases de *A. niveus*, a alvura aumentou 2,1 pontos contra 17,2 pontos utilizando-se o *mix*. A viscosidade decresceu 1% quando somente ligninases de *A. niveus* foram utilizadas, mas com o *mix* praticamente não houve alteração. A manutenção da viscosidade confirmou que o extrato bruto encontrava-se livre de níveis significativos de celulasas, conforme se observou nos resultados das dosagens de atividade celulásica (dados não mostrados); mesmo tendo sido a produção de ligninases realizada em farelo de trigo, um resíduo agroindustrial que apresenta entre seus carboidratos os componentes xilana, lignina e celulose.

**Tabela 13.** Biobranqueamento da polpa de celulose com ligninases ou ligninases + xilanase produzida por *Aspergillus niveus*.

	Ligninases – <i>A. niveus</i>		MIX - <i>A. niveus</i>	
	Controle	Tratada	Controle	Tratada
<b>Número kappa</b>	11,5	8,5	11,5	5,0
<b>Eficiência do kappa (%)</b>	-	26,0	-	56,0
<b>Viscosidade (cm<sup>3</sup>/g)</b>	896	886	890	889
<b>Alvura (ISO)</b>	54,2	56,3	54,2	71,4

Microorganismo cultivado nas respectivas condições padronizadas. Os controles corresponderam a amostras não tratadas. Os tratamentos foram realizados com a xilanase extracelular (10U/g de polpa seca de celulose), durante 1h a 65°C para ambos os tratamentos enzimáticos.

#### 4.3.1.3 Análise das polpas de celulose em microscopia eletrônica

##### de varredura

As polpas de celulose utilizadas nos experimentos de biobranqueamento foram submetidas à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram analisadas as polpas antes do tratamento (controle) e após o tratamento com xilanase de *A. niveus* ou *A. fumigatus*, com apenas as ligninases de *A. niveus* ou ainda com o *mix* enzimático (xilanases + ligninase) de *A. niveus*. Para realização dessas análises em MEV as amostras foram preparadas conforme descrito em Métodos.

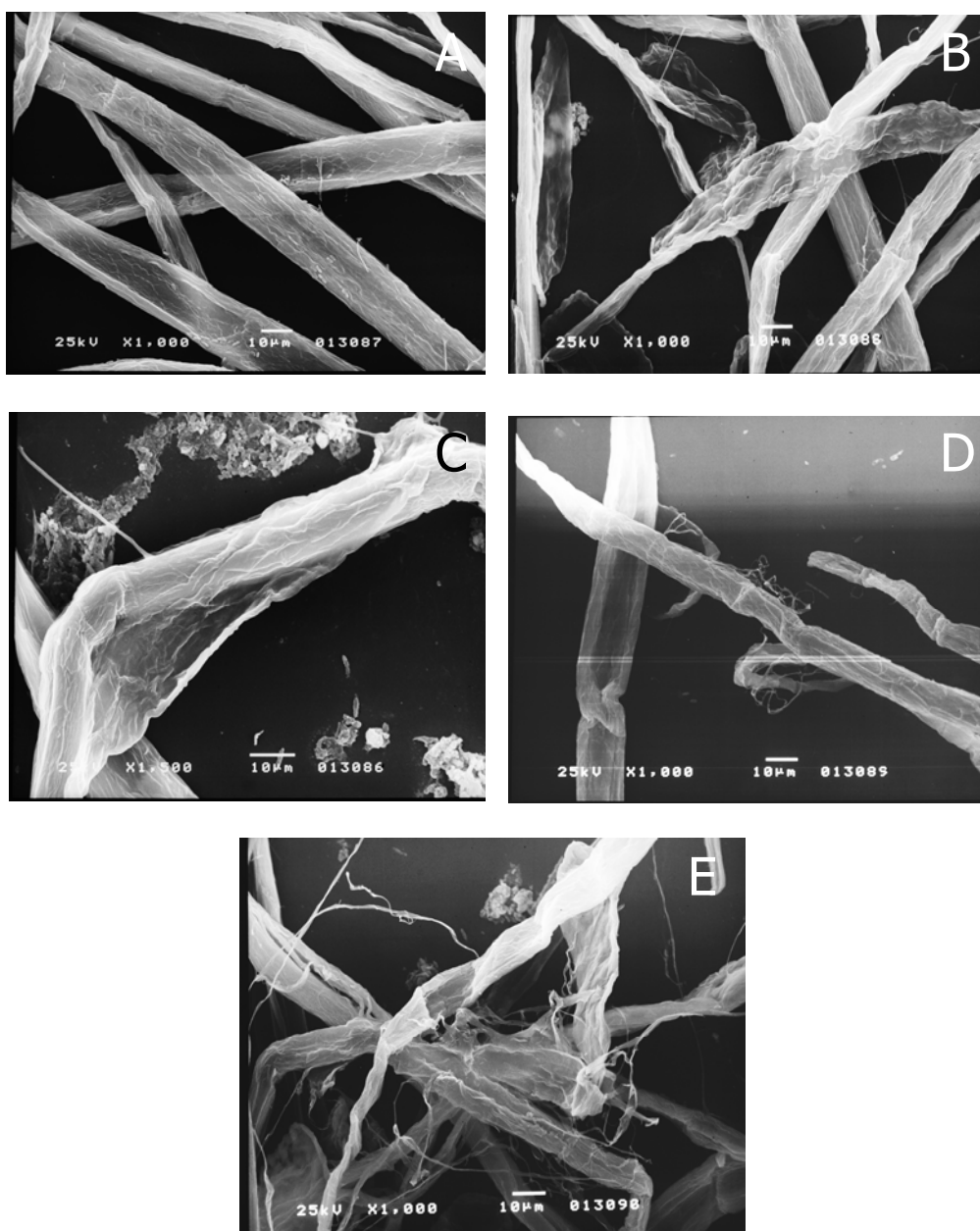
Na **figura 19A** vê-se que, na polpa de celulose controle a fibra encontra-se intacta, com estrutura íntegra, enquanto após o tratamento enzimático há dissociação das fibras e exposição das camadas polissacarídicas mais íntimas (**figuras 19B, C, D e E**). Vale ressaltar que, visualmente, a quantidade de carboidratos extraídos da fibra de celulose deveria ser maior quanto mais eficiente fosse o tratamento enzimático. De fato, os resultados observados através de MEV vão ao encontro daqueles expressos nas **tabelas 12 e 13**.

#### 4.3.2 Adição de enzimas xilanolíticas em rações para ruminantes

O segundo teste de aplicabilidade biotecnológica das enzimas foi realizado em rações para ruminantes. Visto que o tempo de produção das ligninases é bastante elevado (mais de uma semana) e lembrando que a quantidade de enzima requerida para esses experimentos é bastante elevada, este estudo foi realizado apenas com xilanases. Vale ressaltar também que o fungo *A. fumigatus* é conhecido como um potente patógeno causador de algumas importantes e conhecidas aspergiloses e, portanto, apenas *A. niveus* foi utilizado nos testes subsequentes com rações para ruminantes. Assim, as enzimas xilanolíticas produzidas por *Aspergillus niveus* foram utilizadas como aditivos em diferentes volumosos para observar se propiciava (ou não) um aumento na digestibilidade do alimento.

Assim, *A. niveus* foi cultivado nas condições ótimas (Métodos) e a quantidade de xilanase utilizada para os testes de digestibilidade variaram de 4 a 16 mL em diferentes tipos de volumosos (feno alfafa, capim brachiaria, feno jaraguá e silagem de milho). Nesses resultados (**tabela 14**), os valores estão em porcentagem (%) e correspondem à quantidade de matéria orgânica seca que foi consumida durante a digestibilidade *in vitro*.

Observou-se um maior consumo da matéria orgânica, quando os volumosos receberam a xilanase de *A. niveus*, em comparação às amostras não tratadas com xilanase. Em feno alfafa, o melhor resultado foi com a adição de 16mL de enzima onde a digestibilidade foi 10,8% maior em relação ao seu controle. Já para capim brachiaria, o resultado mais satisfatório correspondeu a uma digestibilidade 6,0% maior com a adição de apenas 4mL de xilanase, em comparação



**Figura 19.** Análise através de microscopia de varredura da polpa de celulose antes e após o tratamento enzimático para a retirada de xilana e/ou lignina presente na fibra de celulose. (A) controle; (B) polpa tratada com xilanase de *Aspergillus fumigatus*; (C) polpa tratada com xilanase de *Aspergillus niveus*; (D) polpa tratada com ligninase de *Aspergillus niveus* e (E) polpa tratada com *mix* de xilanase + ligninase de *Aspergillus niveus*.

**Tabela 14.** Digestibilidade *in vitro* (%) de diferentes volumosos na presença de xilanases produzidas por *Aspergillus niveus*.

Volumoso	Sem enzima	4mL	8mL	16mL
Feno alfafa	53,0	61,0	61,8	63,8
Capim brachiaria	51,6	57,3	55,4	54,5
Feno Jaraguá	20,8	27,8	27,8	27,8
Silagem de milho	56,8	60,3	60,3	59,9

O fungo *Aspergillus niveus* foi cultivado em meio Czapeck suplementado com xilana oat spelt 0,75%, a 40°C, durante 96 horas e em condições estacionárias.

ao seu controle. Para feno Jaraguá, o aumento da digestibilidade foi de 33,6% em todos os pontos, independente da quantidade de xilanase adicionada. No último volumoso testado, o aumento na digestibilidade foi de 6,2% com a adição de 4 ou 8 mL de xilanase em comparação ao controle. Assim, observou-se que o tratamento foi satisfatório após a adição de xilanase em todos os volumosos. A diferença entre os resultados obtidos em cada um dos alimentos deveu-se, provavelmente, à diferença na composição entre os diferentes alimentos testados.

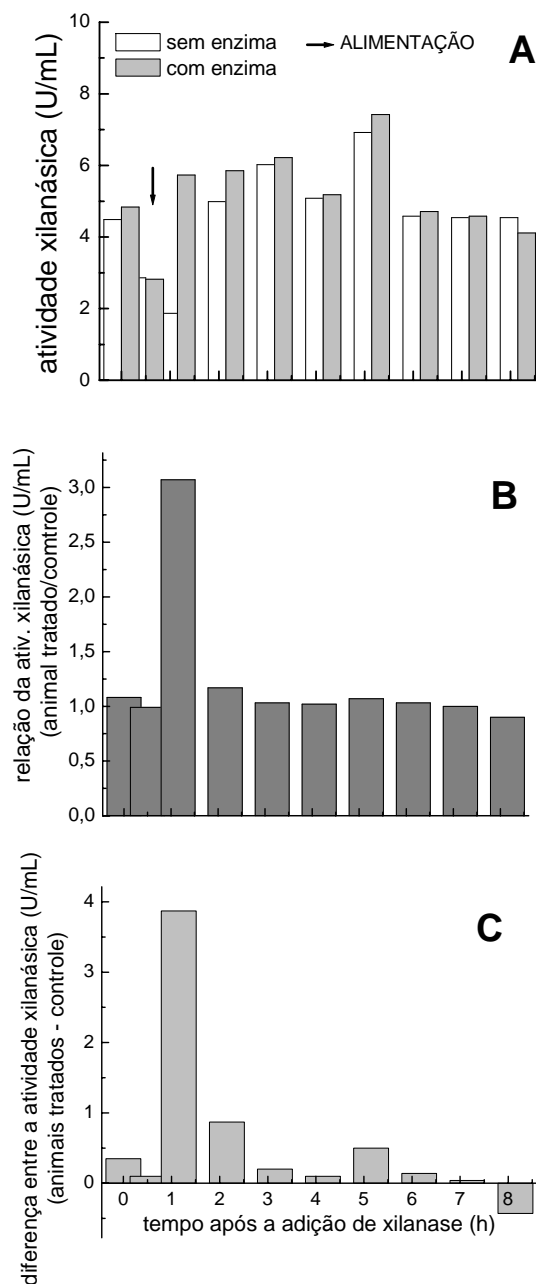
A adição de xilanase no alimento de ruminantes provocou um aumento da digestibilidade dos volumosos porque, ao atuarem na xilana presente na parede das células vegetais, houve a liberação de xilooligossacarídeos, açúcares menores e, portanto, mais facilmente assimiláveis. Esses açúcares foram mais rapidamente assimilados pela microbiota presente no rúmen bovino. Quanto maior a proliferação desses microrganismos, maior a quantidade de enzimas (como as celulases) produzidas por eles e, por isso, ocorreu aumento na velocidade da digestão (melhor digestibilidade).

Os resultados obtidos nos testes *in vitro* foram bastante promissores. Entretanto, no rúmen há um fluxo constante de matéria em trânsito. Assim, foi

verificado se a atividade xilanásica persistia a essas condições “adversas” dentro do animal e, portanto, foi muito importante determinar se a xilanase mantinha (ou não) sua atividade *in vivo*. Para tal, 6 cabras foram tratadas com 15 mL de enzima contendo 5,93 U/mL (ou com 11 mL de água destilada nos controles). Após a adição da xilanase no rúmen os animais foram alimentados e, meia hora após a adição da enzima, uma amostra de líquido ruminal foi retirada para análise. O experimento prosseguiu com a retirada de amostras ruminais a cada uma hora. Este procedimento foi realizado por até 8 horas após o tratamento.

Observando-se a **figura 20A**, vê-se que a quantidade de xilanase nos animais tratados com a enzima foi maior do que nos animais não tratados durante a maior parte do tempo experimental. Somente após sete horas de tratamento, as quantidades de xilanase daqueles que não receberam a enzima atingiram níveis semelhantes aos dos animais tratados. Passadas 8 horas de tratamento, os níveis enzimáticos dos animais tratados começaram a decair, enquanto dos não tratados começaram a aumentar. O mesmo quadro pode ser observado, quando se fez uma relação entre os níveis de xilanase presentes nos animais tratados e não tratados com xilanase (**figura 20B**) ou quando se faz a diferença entre os níveis da enzima presentes nos animais tratados e não tratados (**figura 20C**).





**Figura 20.** Desempenho das xilanases em rúmen de caprinos. Extrato enzimático produzido por *Aspergillus niveus*. **(A)** atividade xilanásica total em rúmen de caprinos tratados e não tratados com a enzima; **(B)** relação entre a atividade xilanásica total em rúmen de caprinos tratados e não tratados; **(C)** diferença entre a atividade xilanásica total em rúmen de caprinos tratados e não tratados.

No início do experimento, a quantidade de xilanase presente nos animais tratados era maior porque eles acabaram de receber o extrato enzimático contendo a xilanase de *Aspergillus niveus*. Após meia hora de experimento, a quantidade de xilanase ainda permaneceu maior nos animais tratados, entretanto se observou uma grande redução da atividade nestes e no controle, uma vez que as cabras receberam a alimentação e a enzima acabou sendo diluída dentro do rúmen.

Visando aprofundar ainda mais os conhecimentos sobre o efeito das xilanases de *Aspergillus niveus* na digestibilidade de alimentos volumosos utilizados na nutrição de ruminantes, novamente foi realizado um experimento de digestibilidade *in vitro*. Neste experimento, diferentes volumosos (capim marandu, feno de jaraguá, silagem de milho e cana-de-açúcar) cuja composição bromatológica havia sido determinada (**tabela 15**) foram avaliados.

**Tabela 15.** Composição bromatológica dos volumosos avaliados nos ensaios de digestibilidade.

Volumosos	MS	FDN (% MS)	FDA (%MS)	Lignina (% MS)	Hemicelulose (% MS)	Celulose (% MS)
Capim mandacaru	90,12	69,50	30,22	3,69	39,28	26,53
Feno de jaraguá	90,38	73,58	49,11	8,41	24,47	40,70
Silagem de milho	89,30	56,22	31,55	4,49	24,67	27,06
Cana-de-açúcar	89,68	39,97	17,57	3,86	22,40	13,71

MS- Matéria seca, FDN- Fibra em detergente neutro, FDA- Fibra em detergente ácido

As condições para a digestão dos volumosos corresponderam às mesmas utilizadas no experimento *in vitro* descrito anteriormente, entretanto a concentração de enzima foi fixa e correspondeu a 16 mL. Foram analisadas a digestão da fibra em detergente ácido e neutro, da celulose e da hemicelulose em três tipos de

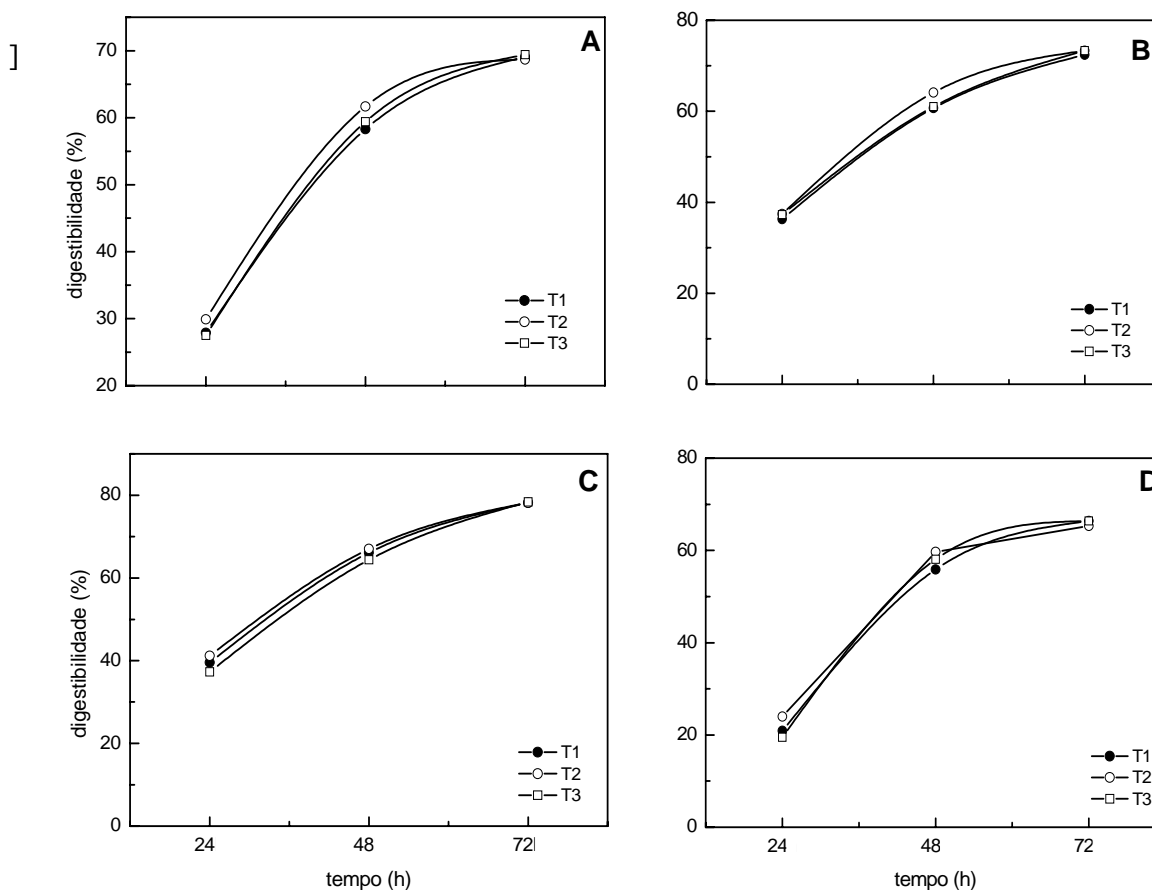
tratamento (T1= tratamento 1 – controle (sem adição de enzima); T2= tratamento 2 – com adição de enzima no início do processo de digestão; T3= tratamento 3 – com adição de enzima 3h antes do início do processo de digestão) durante os tempos de 24, 48 e 72 horas. Analisaram-se também as quantidades totais de gases produzidas em consequência da digestão dos alimentos. Os dados referentes à produção de gases foram determinados com 1, 2, 3, 4, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 48, 52, 56, 60 e 72 horas após a incubação.

No capim marandu a digestibilidade aumentou no decorrer do tempo em resposta a todos os tratamentos, entretanto, os níveis de digestão foram maiores na condição T2 com 24 ou 48 horas de digestão. Contudo, observou-se que após 72 horas os valores foram praticamente os mesmos nos três tratamentos (**figura 21**).

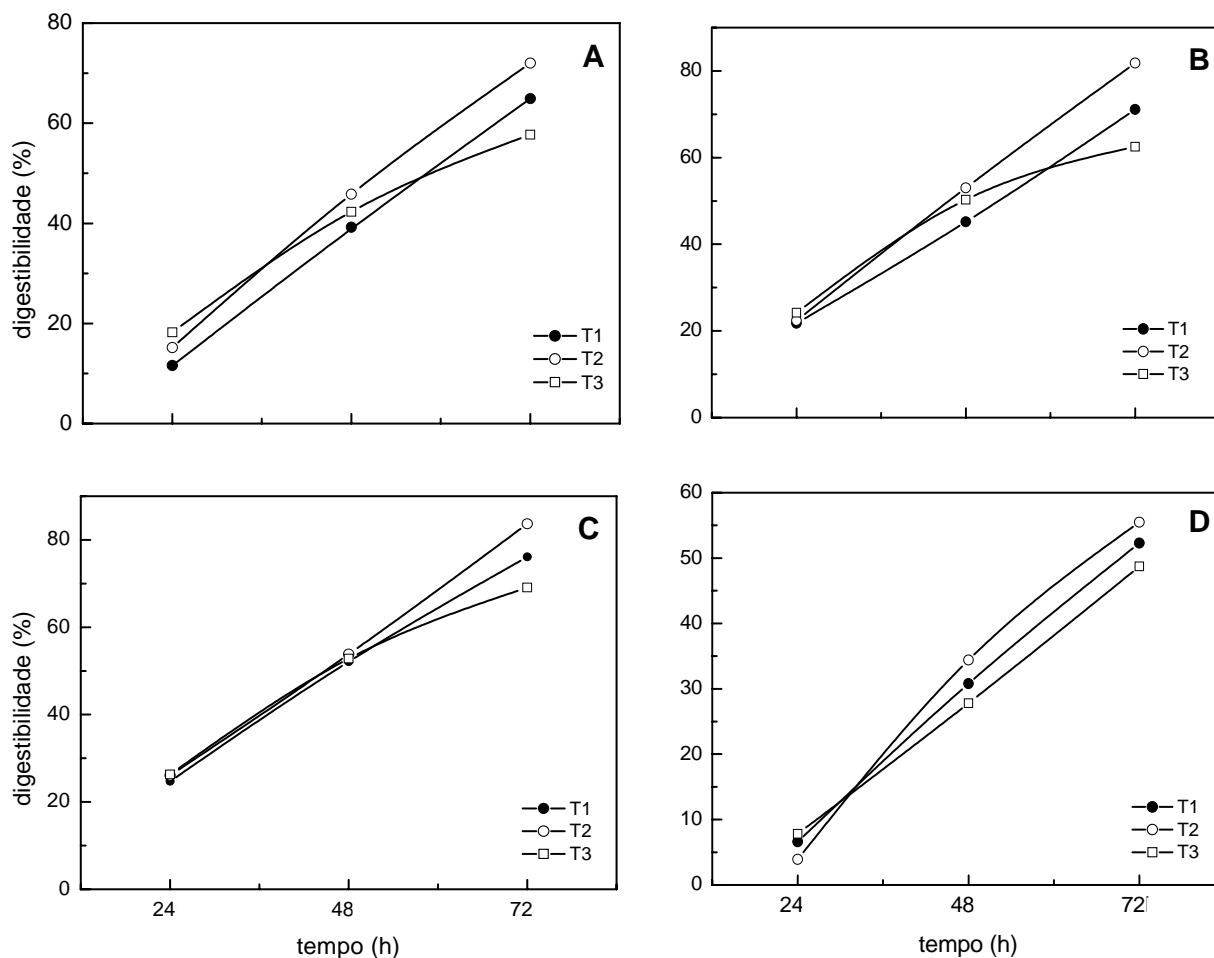
Na **figura 22** observamos que no feno de jaraguá ocorreu um aumento linear em todas as digestibilidades, nos três tratamentos e no decorrer de todo o processo. Os valores máximos de digestibilidade corresponderam ao tempo de 72 horas. Novamente se observou que T2 propiciou maior produção de gas, principalmente nos tempos correspondentes a 72 horas. Embora T3 não tenha sido o melhor tratamento esperava-se que, assim como no marandú, T3 fosse melhor que o controle (T1). Entretanto o que se observou foi justamente o contrário, provavelmente porque durante as 3 horas de tratamento deste volumoso com a enzima ocorreu degradação da porção potencialmente digerível do alimento antes do fornecimento ao animal. Entretanto, para a digestibilidade da FDN e FDA, T3 foi melhor que T1 no tempo de 48 horas.

De acordo com os valores de digestibilidade para silagem de milho, T3 foi o melhor tratamento (**figura 23**), principalmente no tempo de 72 horas. Já para

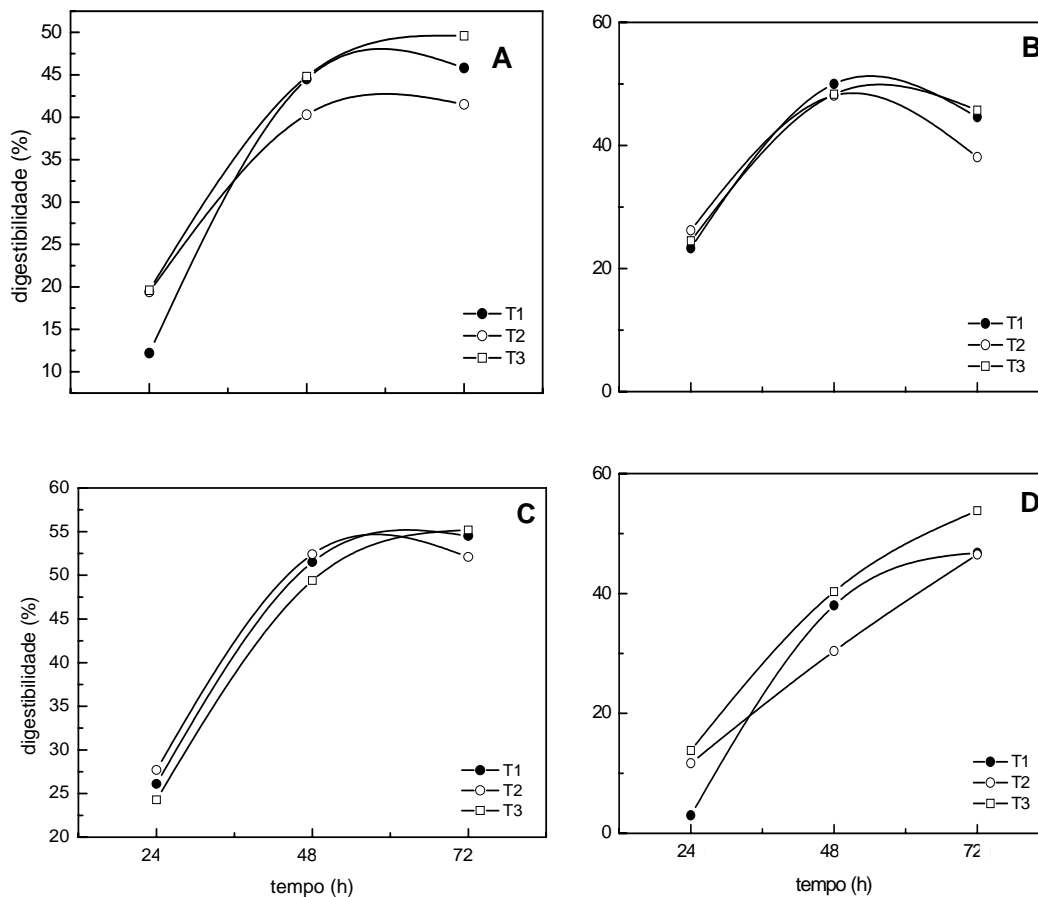
cana-de-açúcar (figura 24) T2 foi o melhor tratamento para a digestibilidade da celulose em todos os tempos (figura 24C), entretanto, as demais digestibilidades foram melhores em T3, com 48 horas de digestão.



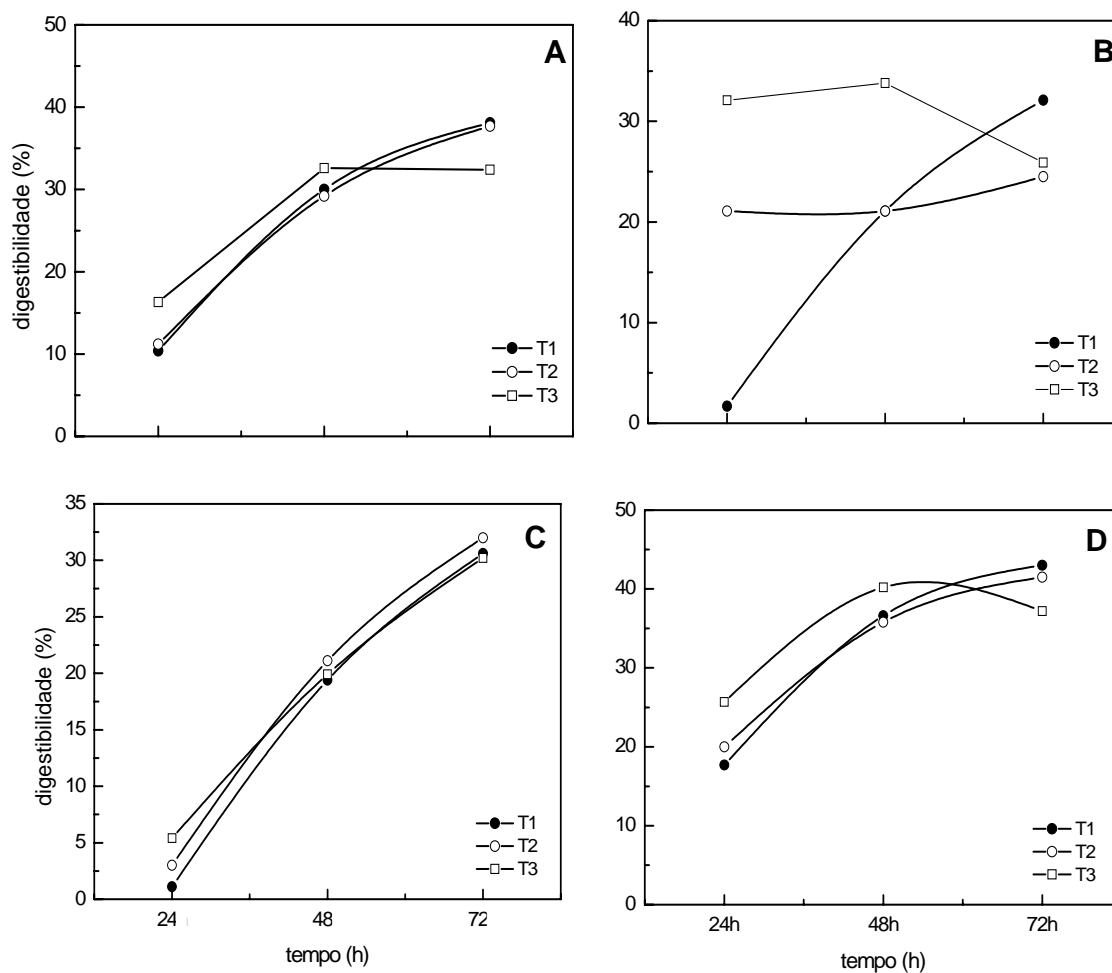
**Figura 21.** Digestibilidade "in vitro" dos componentes da fração fibrosa do capim Marandú após diferentes tempos de incubação. (A) fibra em detergente neutro; (B) fibra em detergente ácido; (C) celulose; (D) hemicelulose. T1= tratamento 1 – controle (sem adição de enzima); T2= tratamento 2 – com adição de enzima no início do processo de digestão; T3= tratamento 3 – com adição de enzima 3 horas antes do início do processo de digestão.



**Figura 22.** Digestibilidade "in vitro" dos componentes da fração fibrosa do feno jaraguá. (A) detergente neutro; (B) detergente ácido; (C) celulose; (D) hemicelulose. T1= tratamento 1 – controle (sem adição de enzima); T2= tratamento 2 – com adição de enzima no início do processo de digestão; T3= tratamento 3 – com adição de enzima 3 horas antes do início do processo de digestão.



**Figura 23.** Digestibilidade "in vitro" dos componentes da fração fibrosa da silagem de milho. (A) detergente neutro; (B) detergente ácido; (C) celulose; (D) hemicelulose. T1= tratamento 1 – controle (sem adição de enzima); T2= tratamento 2 – com adição de enzima no início do processo de digestão; T3= tratamento 3 – com adição de enzima 3 horas antes do início do processo de digestão.



**Figura 24.** Digestibilidade “*in vitro*” dos componentes da fração fibrosa da cana-de-açúcar. (A) detergente neutro; (B) detergente ácido; (C) celulose; (D) hemicelulose. T1= tratamento 1 – controle (sem adição de enzima); T2= tratamento 2 – com adição de enzima no início do processo de digestão; T3= tratamento 3 – com adição de enzima 3 horas antes do início do processo de digestão.

Comparando-se os valores de digestibilidade de todos os parâmetros verificou-se que estes foram maiores em capim marandú e feno jaraguá, sendo menores em silagem de milho e cana-de-açúcar (**figuras 21 - 24**). Este resultado deve-se, provavelmente, à diferença na composição desses volumosos (**tabela 15**). No caso de capim Jaraguá, o qual possui os maiores valores de fração fibrosa, na presença de enzimas exógenas deve ter sofrido uma maior digestão de seus componentes fibrosos, o que propiciou um crescimento microbiano mais significativo da flora ruminal.

A produção de gases também foi avaliada durante a digestão *in vitro* e, o que se verificou foi um aumento na quantidade de gases liberados no decorrer do tempo em todos os tratamentos, nos quatro volumosos testados (**tabelas 16 - 19**). Ao se analisar a média dos tempos verificou-se que em média, T2 foi o melhor tratamento em todos os volumosos testados, uma vez que nesta condição foi registrada a liberação de uma quantidade de gás bem maior, provavelmente, em decorrência da maior digestão dos carboidratos da parede celular.

#### **4.3.3 Estudo da citotoxicidade dos extratos brutos produzidos por *Aspergillus niveus* e *Aspergillus fumigatus***

Os extratos enzimáticos de ambos os fungos foram testados quanto à sua citotoxicidade.

Não houve desenvolvimento de colônias apenas nos controles (-) onde os linfócitos foram previamente tratados com cisplatina (droga quimioterápica). Já no controle (+) onde as células não foram tratadas com nenhuma droga ou extrato fúngico e nas amostras tratadas com 25, 50 e 100µM de extrato bruto dos fungos



**Tabela 16.** Produção de gases (mL/g MS) durante a digestão *in vitro* do capim marandú em diferentes tempos de fermentação.

tempo (h)	Capim marandú			média dos tratamentos
	T1	T2	T3	
1	2,0a	10,2a	12,8a	8,3P
2	3,1a	13,5a	13,7a	10,1P
3	4,9a	18,4a	14,7a	12,7P
4	5,2a	21,1a	16,5a	14,3P
10	10,8a	27,9a	20,2a	19,7P
12	21,4a	36,7a	28,9a	29,00
14	26,3b	45,9a	36,6ab	36,3M
16	35,7b	61,9a	47,4ab	48,3M
20	58,5b	78,9a	69,4ab	68,9L
24	118,3bJ	143,3aJ	124,2bJ	128,6J
28	156,2bI	183,9aI	158,4bI	166,2I
32	201,9bH	232,9aH	201,3bH	212,0H
36	239,5bG	282,2aG	249,5bG	257,1G
40	273,2bF	320,8aF	283,5bF	292,5F
48	328,3bE	379,0aE	342,3bE	349,9E
52	359,8bD	409,9aD	376,5bD	382,1D
56	392,6bC	442,0aC	407,6bC	414,1C
60	421,0bB	469,7aB	428,2bB	439,6B
72	449,2bA	509,7aA	456,8bA	471,9 <sup>a</sup>
<b>média tempos</b>	<b>163,6b</b>	<b>194,1a</b>	<b>173,1b</b>	

Médias seguidas de mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem ( $P > 0,050$  pelo teste de Tukey).

T1 – tratamento 1 – controle, sem enzima; T2 – tratamento 2, com enzima adicionada no início da digestão; T3 – tratamento 3, com enzima adicionada 3h antes do processo de digestão. DMS-a: 15,01; DMS – b: 11,05. Unidade de produção de gases: mL/g de massa seca.

em estudo, o número de colônias formadas foi semelhante (**figura 21**), o que significa que os extratos brutos produzidos não apresentaram um caráter citotóxico para células humanas.

Outro dado importante deste experimento é que o extrato bruto de *Aspergillus fumigatus* também não apresentou citotoxicidade. Este fungo não foi aplicado em testes com ração, justamente por ser causador de importantes aspergiloses. Entretanto seu extrato enzimático não causou nenhum dano

celular aos linfócitos humanos. Assim, testes futuros poderão ser realizados com o extrato enzimático deste fungo também.

**Tabela 17.** Produção de gases (mL/ g MS) durante a digestão *in vitro* do capim Jaraguá em diferentes tempos de fermentação.

tempos (h)	Capim Jaraguá			médias dos tratamentos
	T1	T2	T3	
1	4,3a	7,8a	12,9a	8,4 O
2	4,3a	9,8a	15,4a	9,8 O
3	4,5b	12,34ab	18,7a	11,8 O
4	4,7b	14,1ab	18,8a	12,6 O
10	7,5b	20,0ab	20,8a	16,2 O
12	15,3b	39,0a	30,9a	28,4 N
14	25,0b	46,8a	36,7ab	36,2 N
16	30,2b	59,6a	41,3b	43,7 M
20	44,3b	70,45a	58,1a	57,6 L
24	71,5 bJ	102,5aJ	81,6bJ	85,2 J
28	94,2bI	129,7aI	102,1bI	108,68 I
32	120,9bH	156,2aH	128,8bH	135,3 H
36	150,5bG	188,4aG	161,5bG	166,8 G
40	182,2cF	220,3aF	196,6bF	199,7 F
48	237,0cE	277,1aE	261,2bE	258,4 E
52	266,6bD	316,0aD	312,3aD	298,3 C
56	296,1bC	353,6aC	351,8aC	333,8 C
60	239,37bB	389,1aB	382,8aB	367,1 B
72	377,9bA	439,8aA	437,1aA	418,3 A
<b>média tempos</b>	<b>119,3c</b>	<b>150,2a</b>	<b>140,5b</b>	

Médias seguidas de mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem ( $P > 0,050$  pelo teste de Tukey).

T1 – tratamento 1 – controle, sem enzima; T2 – tratamento 2, com enzima adicionada no início da digestão; T3 – tratamento 3, com enzima adicionada 3h antes do processo de digestão. DMS-a: 9,56; DMS – b: 9,1. Unidade de produção de gases: mL/g de massa seca.

**Tabela 18.** Produção de gases (mL/g MS) durante a digestão *in vitro* da silagem de milhos em diferentes tempos de fermentação.

Tempos (h)	Silagem de milho			médias dos tratamentos
	T1	T2	T3	
1	8,76a	15,3a	21,6a	15,2P
2	15,3a	26,1a	25,5a	22,3P
3	24,2a	38,5a	29,9a	30,9P
4	35,0a	54,0a	40,3a	43,1P
10	50,8b	75,9a	51,4b	59,4P
12	67,8a	99,7a	67,6b	78,4 O
14	89,2b	121,50a	84,1b	98,2 N
16	113,7b	147,6a	107,8b	123,1M
20	151,2bJ	187,3aJ	144,0bJ	160,8L
24	215,9bI	251,4aI	209,9bI	225,7J
28	254,8bH	293,8aH	254,2bH	267,6I
32	292,4aG	325,4aG	290,5bG	302,7H
36	331,1abF	348,9aF	322,4bF	334,2G
40	362,4bE	400,8aE	356,2bE	373,2F
48	400,6bD	441,8aD	391,9bD	411,5E
52	424,12bC	464,6aC	416,3bC	435,0D
56	445,3bB	485,7aB	437,9bB	456,3C
60	461,8bB	501,2aB	454,7bB	472,5B
72	486,6bA	522,2aA	483,5bA	497,4A
<b>média tempos</b>	<b>222,7b</b>	<b>252,7a</b>	<b>220,5b</b>	

Médias seguidas de mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem ( $P > 0,050$ ) pelo teste de Tukey.

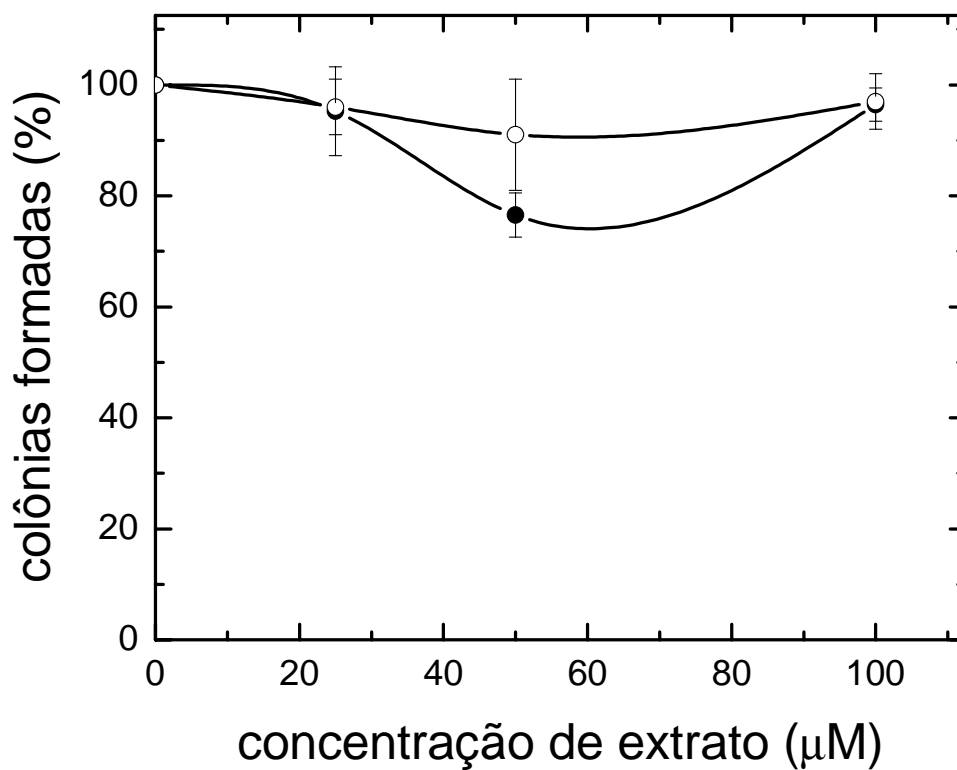
T1 – tratamento 1 – controle, sem enzima; T2 – tratamento 2, com enzima adicionada no início da digestão; T3 – tratamento 3, com enzima adicionada 3h antes do processo de digestão. DMS-a: 16,00; DMS – b: 11,0. Unidade de produção de gases: mL/g de massa seca.

**Tabela 19.** Produção de gases (mL/ g MS) durante a digestão *in vitro* da cana-de-açúcar em diferentes tempos de fermentação.

Tempos (h)	Cana-de- açúcar			médias dos tratamentos
	T1	T2	T3	
1	8,76a	15,3a	21,6a	20,6P
2	15,3a	26,1a	25,5a	35,6P
3	24,2a	38,5a	29,9a	51,2P
4	35,0a	54,0a	40,3a	74,9P
10	50,8b	75,9a	51,4b	126,2 O
12	67,8a	99,7a	67,6b	191,8N
14	89,2b	121,50a	84,1b	231,7M
16	113,7b	147,6a	107,8b	268,6L
20	151,2bJ	187,3aJ	144,0bJ	310,8J
24	215,9bI	251,4aI	209,9bI	363,5I
28	254,8bH	293,8aH	254,2bH	396,0H
32	292,4aG	325,4aG	290,5bG	420,6G
36	331,1abF	348,9aF	322,4bF	449,4F
40	362,4bE	400,8aE	356,2bE	467,3E
48	400,6bD	441,8aD	391,9bD	493,5D
52	424,12bC	464,6aC	416,3bC	507,2C
56	445,3bB	485,7aB	437,9bB	518,5B
60	461,8bB	501,2aB	454,7bB	528,1B
72	486,6bA	522,2aA	483,5bA	542,33A
<b>média tempos</b>	<b>317,6b</b>	<b>357,3a</b>	<b>272,1c</b>	

Médias seguidas de mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem ( $P > 0,050$  pelo teste de Tukey).

T1 – tratamento 1 – controle, sem enzima; T2 – tratamento 2, com enzima adicionada no início da digestão; T3 – tratamento 3, com enzima adicionada 3h antes do processo de digestão. DMS-a: 9,8; DMS – b: 9,78. Unidade de produção de gases: mL/g de massa seca.



**Figura 25.** Determinação da citotoxicidade dos extratos brutos dos fungos *Aspergillus niveus* e *Aspergillus fumigatus*. Símbolos: -○- *Aspergillus niveus*; -●- *Aspergillus fumigatus*.

**Parte IV: Purificação e caracterização bioquímica de  
duas xilanases produzidas por *Aspergillus niveus***

Para os propósitos de purificação das xilanases produzidas por *A. niveus*, foi testado um sistema de cultivo em dois estágios onde, inicialmente, o fungo foi pré-cultivado em meio SR suplementado com glicose, por 72 horas, em condições estáticas e, a seguir, a massa micelial foi transferida para meio Czapeck suplementado com xilana oat spelt, por 96 horas, em condições estáticas. Inicialmente, testaram-se vários tipos de xilana como indutores por diferentes períodos de cultivo (**tabela 20**).

Observando-se os resultados, vê-se que, em sistema de pré-cultivo, xilana oat spelt foi a melhor a ser utilizada, uma vez que os maiores enzimáticos foram detectados com 96 horas de cultivo em condições estáticas. Nestas condições, também se verificou a maior atividade específica. Para entender melhor o comportamento do fungo *A. niveus* durante seu desenvolvimento, um cultivo semelhante foi realizado (**tabela 21**) nas mesmas condições padronizadas na **tabela 20**. Entretanto, foram analisados vários outros parâmetros tais como: biomassa úmida e seca e pH final do meio. Verificou-se que o maior valor de atividade total extracelular ocorreu com 96 horas de cultivo. Neste ponto, também se observou a maior atividade específica extracelular durante todo o período de incubação. Quanto aos valores de atividade total intracelular, observou-se que foram máximos no início do cultivo, demonstrando haver síntese de xilanase já nas primeiras 24 horas de cultivo em meio de indução. Já o pico de secreção xilanásica ocorreu com 96 horas. Os níveis de proteína intracelular também foram máximos com 24 horas de cultivo indicando que o microrganismo atingiu, provavelmente, seu ápice de crescimento nas primeiras 24 horas de indução; os valores de biomassa

úmida e seca confirmam esta hipótese. Quanto aos valores de pH, esses sofreram pouca alteração durante o cultivo (pH inicial era 6,0).

**Tabela 20.** Determinação do tempo de cultivo para o fungo *Aspergillus niveus* em sistema de pré-cultivo em meio com glicose.

Tempo/Substrato/Condição	XILANASE Atividade (U/mL)	<i>Aspergillus</i> Proteína (mg/mL)	<i>niveus</i> Atividade Específica (U/mg de prot.)
24h – xil birchwood - estático	18,9	0,25	77,3
48h – xil birchwood – estático	22,3	0,19	116,5
72h – xil birchwood – estático	17,5	0,53	33,1
96h – xil birchwood – estático	11,0	0,39	28,4
120h – xil birchwood – estático	17,5	0,47	37,3
144h – xil birchwood – estático	10,6	0,54	19,5
24h – xil birchwood – agitação	18,9	0,27	70,5
48h – xil birchwood – agitação	17,7	0,40	44,5
72h – xil birchwood – agitação	15,8	0,46	34,8
96h – xil birchwood – agitação	15,1	0,34	44,3
120h – xil birchwood – agitação	12,3	0,36	34,4
144h – xil birchwood – agitação	8,6	0,45	19,3
24h – xil oat spelt - estático	17,2	0,31	54,8
48h – xil oat spelt – estático	14,9	0,45	33,4
72h – xil oat spelt – estático	21,2	0,45	47,3
96h – xil oat spelt – estático	<b>47,3</b>	<b>0,44</b>	<b>107,5</b>
120h – xil oat spelt – estático	13,5	0,45	30,1
144h – xil oat spelt – estático	9,1	0,52	17,6
24h – xil oat spelt – agitação	15,9	0,28	56,3
48h – xil oat spelt – agitação	19,7	0,58	33,8
72h – xil oat spelt – agitação	17,8	0,54	33,1
96h – xil oat spelt – agitação	14,9	1,45	10,3
120h – xil oat spelt – agitação	14,5	0,49	29,8
144h – xil oat spelt – agitação	9,8	0,58	17,1

*A. niveus* foi pré-cultivado em meio líquido SR (72h) e transferido para meio Czapeck, suplementado com xilana birchwood ou oat spelt, sob agitação ou condições estáticas, a 40°C.



**Tabela 21.** Determinação de parâmetros extra e intracelulares (proteína total, atividades total e específica), determinação da biomassa úmida e seca, além de determinação pH final do meio após o cultivo de *Aspergillus niveus* em sistema de pré-cultivo.

Indução (h)	Proteína (mg totais)		Atividade (U totais)		Atividade (U Específica totais)		Biomassa (g)		pH
	Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Úmida	Seca	
0	1,2	0,2	0,8	7,1	0,7	34,0	0,21	0,033	6,0
24	4,2	4,2	43,3	123,7	10,3	29,4	0,73	0,150	7,0
48	1,7	7,3	19,3	170,2	11,4	23,3	0,37	0,030	6,0
72	1,8	6,1	28,7	173,3	16,0	28,4	0,32	0,060	6,3
96	0,8	5,7	4,0	218,4	5,0	38,3	0,30	0,030	6,3
120	1,6	5,3	18,9	192,1	11,8	36,2	0,05	0,004	7,6

*A. niveus* foi pré-cultivado em meio líquido SR, suplementado com glicose 1% por 72 horas (meio de crescimento) e transferido para meio Czapeck, suplementado com xilana oat spelt 1% por 96 horas (meio de indução). Tanto o meio de crescimento como o meio de indução foram incubados em condições estáticas e a 40°C. Tempo 0: micélio recém retirado do meio de crescimento.

A maior síntese enzimática em sistema de pré-cultivo provavelmente ocorreu porque o fungo já germinado e desenvolvido foi colocado em meio de indução contendo xilana.

Para observar os efeitos da fonte de carbono indutora da xilanase (xilana oat spelt) e diferenciar seu efeito indutor de possíveis efeitos de estabilização enzimática e/ou ativação de pró-enzimas, experimentos utilizando cicloheximida foram realizados. Para tanto, o fungo foi pré-crescido em meio SR suplementado com glicose 1%, durante 72 horas, a 40°C. Após este período os micélios foram transferidos para (1) meio de indução contendo xilana oat spelt 1% como controle; (2) meio de indução contendo xilana na presença de cicloheximida 50 µg/mL; (3) após duas horas de cultivo adicionou-se cicloheximida 50 µg/mL. Após 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72, 96 e 104 horas as culturas foram filtradas e procedimentos convencionais de dosagem enzimática foram realizados.

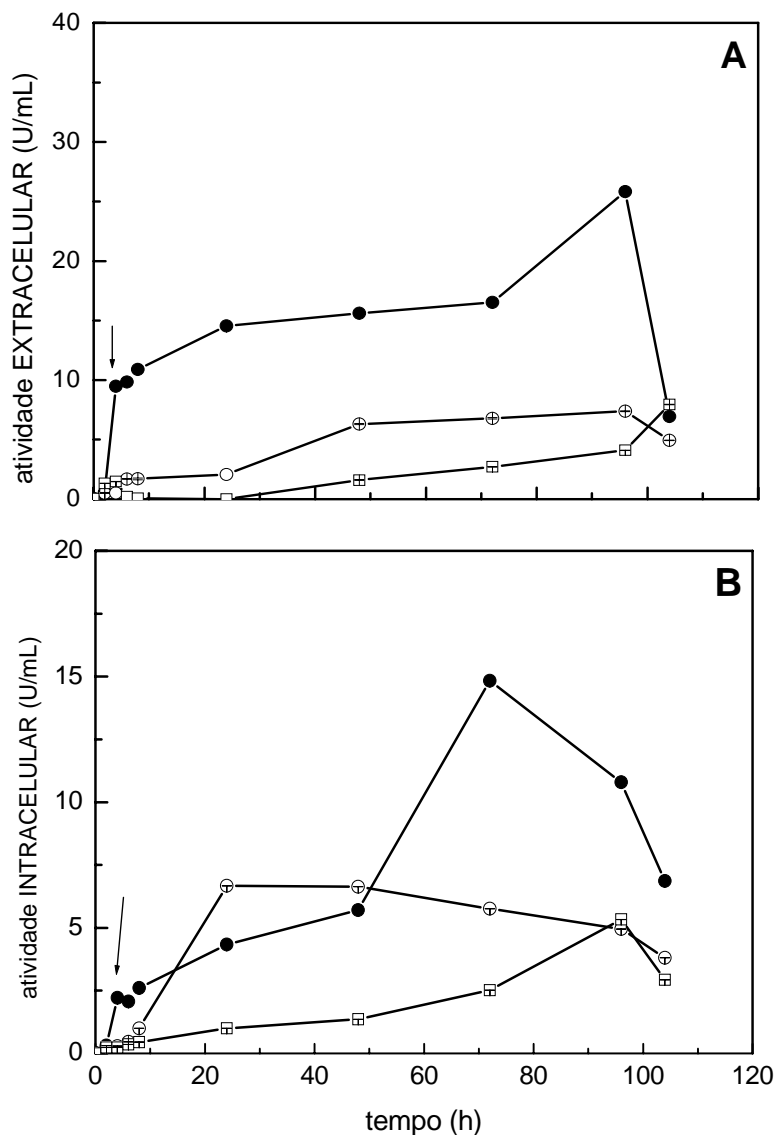
As figuras **26A** e **B** ilustram que a cicloheximida inibiu a síntese de xilanases por *A. niveus*, sendo, inclusive, possível observar a síntese “de novo” dessas enzimas. Assim, podemos dizer que xilana foi um verdadeiro indutor da síntese enzimática.

#### 4.4.1 Purificação enzimática

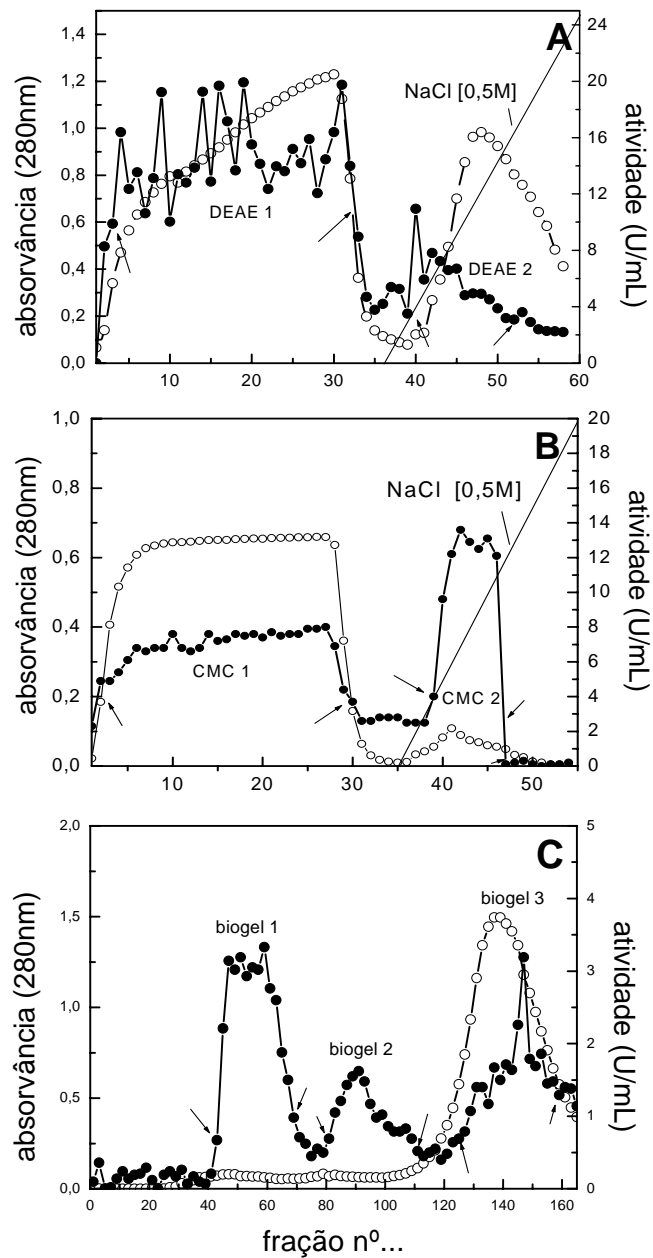
Os resultados de aplicação biotecnológica, desenvolvidos neste trabalho, justificam os procedimentos de purificação, visando estudos estruturais e cinéticos. O extrato bruto produzido por *A. niveus* foi tratado com caulin e aplicado em coluna cromatográfica com DEAE-celulose. Conforme **figura 27A**, dois *pools* de atividade foram obtidos (DEAE 1 e DEAE 2), sendo que o primeiro não interagiu com a resina enquanto o segundo interagiu e foi eluído em uma faixa de 0,06-0,35M de NaCl.

O *pool* DEAE 1 foi reunido e equilibrado em tampão acetato de sódio 10mM, pH 4,0 e eluído em resina CM-celulose equilibrada nas mesmas condições. Dois outros *pools* de xilanase (**figura 27B**) foram obtidos (CMC 1 e CMC 2), sendo

que o primeiro não interagiu com a resina, enquanto o segundo interagiu e foi eluído em uma faixa de 0,1-0,3M de NaCl. Através da leitura de absorvância a 280 nm, não



**Figura 26.** Efeito da adição de cicloheximida (50  $\mu\text{g/mL}$ ) na incubação e secreção de xilanase (A) extracelular e (B). As culturas foram pré-crescidas por 72 horas a 40°C, meio SR, suplementado com glicose 1%. Posteriormente foram transferidas para o meio de indução suplementado com (●) xilana oat spelt 1%; (°) xilana oat spelt 1% + cicloheximida (50  $\mu\text{g/mL}$ ) e (€) xilana oat spelt 1% + cicloheximida (50  $\mu\text{g/mL}$ ) adicionada após duas horas de crescimento.



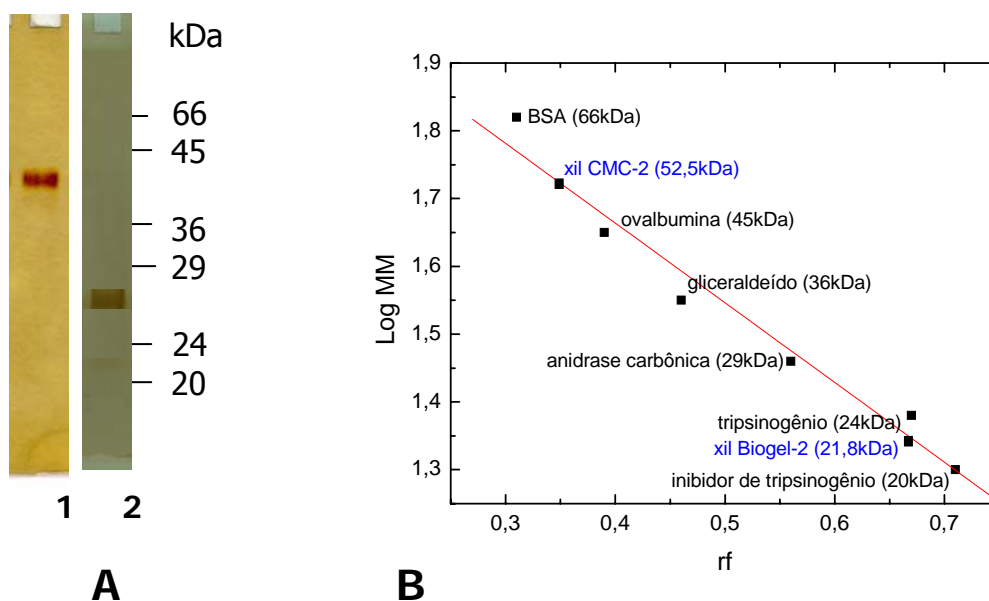
**Figura 27.** Perfil de eluição de xilanase de *A. niveus* em DEAE-celulose (A) equilibrada e eluída em tampão fosfato de sódio monobásico 10mM, pH 7,5; CM-celulose (B) equilibrada e eluída em tampão acetato de sódio 10mM, pH 4,0 e Biogel P-60 (C) equilibrada e eluída em tampão acetato de sódio 100mM, pH 4,0. Símbolos: - ● - xilanase; - ○ - absorvância (280 nm).

se detectaram significativos traços de proteínas no pico CMC 2, indicativo de um possível sucesso neste processo de purificação, fato comprovado pelo fator de purificação de 4407,0 vezes (**tabela 22**) e pela homogeneidade eletroforética em condições desnaturantes (SDS-PAGE – 11%) e não desnaturantes (PAGE – 6%, pH 4,5) - **figuras 28A1 e 29A**. Por SDS-PAGE também foi possível determinar a massa molecular da xilanase CMC 2 que correspondeu a 52,5 kDa.

**Tabela 22.** Purificação das xilanases produzidas por *Aspergillus niveus*.

Amostra	Volume (mL)	Proteína (mg totais)	Atividade (U totais)	Atividade (U/mg prot)	Recuperação (%)	Purificação (x)
<b>Extrato Bruto</b>	375	138	18037,5	130,7	100	1
<b>Tratamento com Caulin</b>	375	127,5	18997,5	149,0	105,3	1,14
<b>DEAE-celulose P1</b>	300	0,12	6600,0	55000	36,6	420,8
<b>P2</b>	70	0,0035	15,4	4400	0,8	33,6
<b>CM-celulose P1</b>	300	0,012	609	50750	3,4	388,3
<b>P2</b>	<b>90</b>	<b>0,002</b>	<b>1152</b>	<b>576000</b>	<b>6,4</b>	<b>4407,0</b>
<b>CM-celulose P1 Liofilizada</b>	1	0,012	600	50000	3,3	382,5
<b>Biogel P-60 P1</b>	30	0,002	250	125000	1,4	956,4
<b>P2</b>	<b>30</b>	<b>0,001</b>	<b>80</b>	<b>80000</b>	<b>0,4</b>	<b>612,1</b>
<b>P3</b>	20	0,007	260	37142	1,4	284,2

O fungo *Aspergillus niveus* foi pré-cultivado em meio SR suplementado com glicose 1%, a 40°C, durante 72 horas e em condições estáticas. Decorrido este período os micélios foram lavados com água destilada estéril e devidamente transferidos para o meio indutor que correspondeu ao meio Czapeck suplementado com xilana oat spelt 0,75%, a 40°C, durante 96 horas e em condições estáticas.

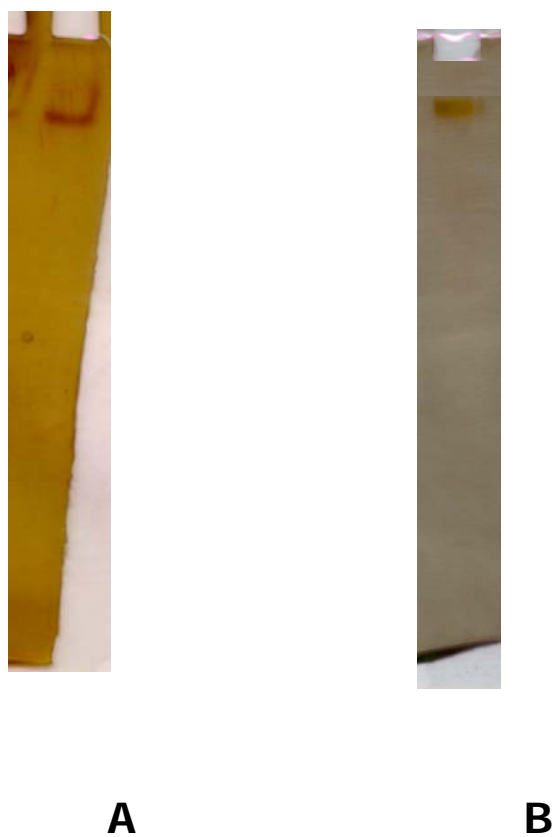


**Figura 28.** Perfil eletroforético das xilanases puras produzidas por *Aspergillus niveus* em SDS-PAGE – 11% pH 8,9 **(A)** e determinação da massa molecular **(B)**. Marcadores: BSA (66kDa), ovalbumina (45kDa), gliceraldeído (36kDa), anidrase carbônica (29kDa) tripsinogênio (24kDa) e inibidor de tripsinogênio (20kDa). Raias 1 e 2 correspondem, respectivamente, a xilanase CMC 2 e Biogel 2.

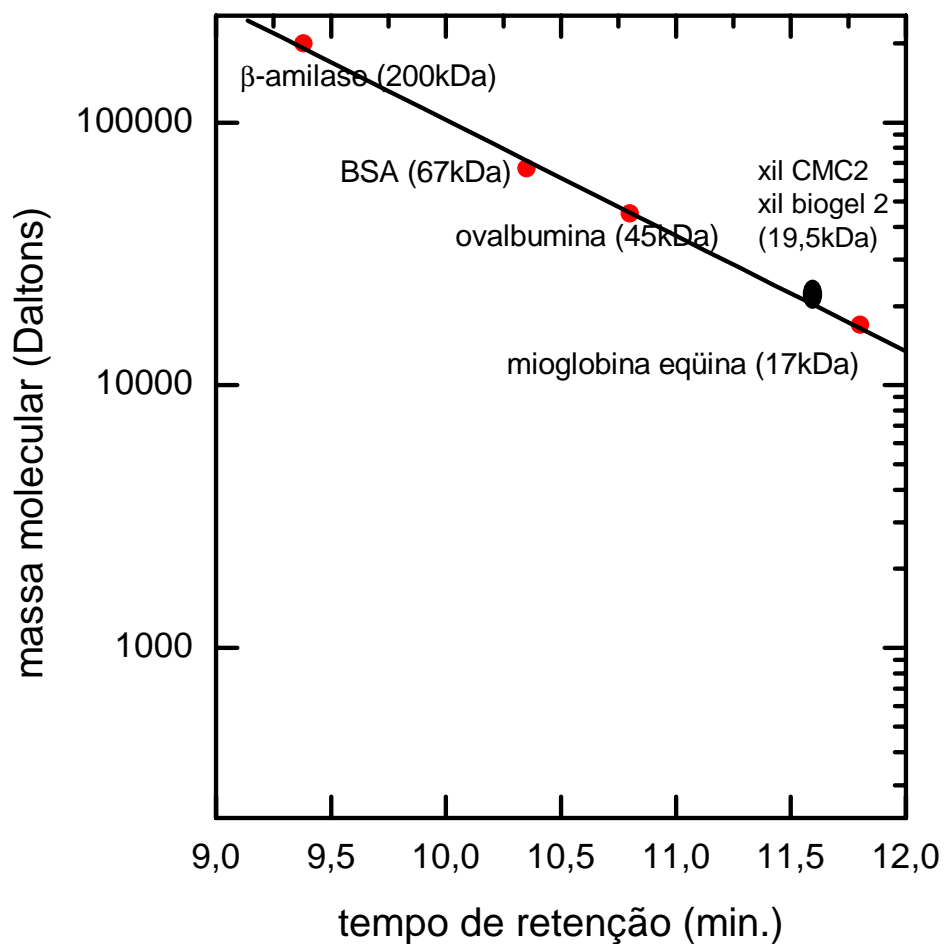
Já o pico CMC 1, embora tenha apresentado um fator de purificação igual a 388,3 vezes, não apresentou homogeneidade eletroforética, sendo posteriormente reunido e eluído em Biogel P-60 (**figura 28C**) onde três outros *pools* de xilanases foram obtidos (biogel 1, biogel 2 e biogel 3) sendo que apenas o segundo (biogel 2) apresentou homogeneidade eletroforética em SDS-PAGE e PAGE (**figuras 29A1 e 30B**), com um fator de purificação igual a 612,1 vezes e uma recuperação de 0,4%. Sua massa molecular também foi calculada e correspondeu a cerca de 21,8 kDa.

A massa molecular das amostras puras também foi determinada por análise em FPLC ("Fast protein liquid column") e, para ambas as xilanases puras, o

tempo de retenção correspondeu a 11,5 minutos (**figura 30**), o que corresponde a uma massa molecular de cerca de 19,5kDa, próximo ao valor calculado para a xilanase biogel 2 em SDS. Já para a xilanase CMC 2, os valores calculados em SDS-PAGE não foram confirmados por FPLC, provavelmente, porque carboidratos presentes nesta proteína comprometeram sua migração em SDS.



**Figura 29.** Perfil eletroforético das xilanases purificadas a partir do extrato bruto produzido por *Aspergillus niveus* em condições não-desnaturantes. PAGE - 6%, pH 4,5 para xilanase CMC 2 (**A**) e PAGE - 6%, pH 8,9 para xilanase biogel 2 (**B**).



**Figura 30.** Determinação por FPLC da massa molecular das xilanases puras produzidas por *Aspergillus niveus*. Coluna Bio-Sil Sec-400, devidamente equilibrada em tampão acetato de sódio 100mM + NaCl 150mM + azida sódica 10mM. pH 6,8.



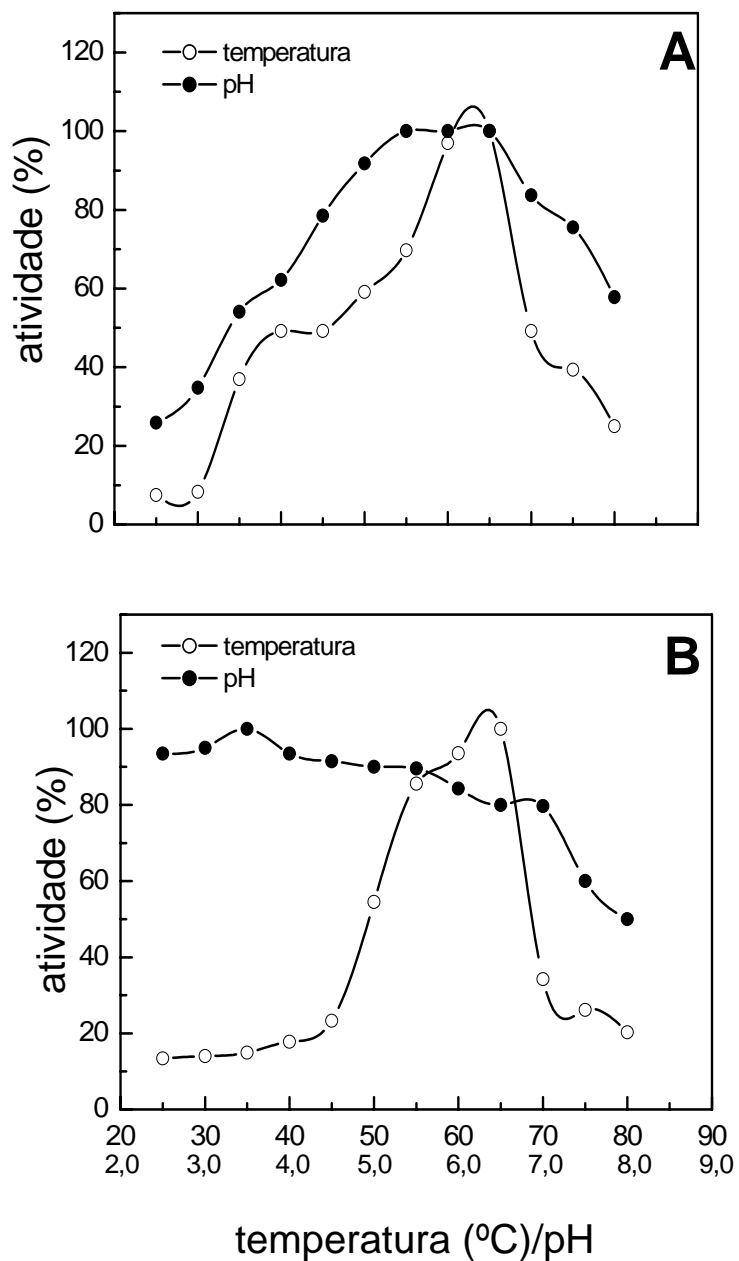
#### 4.4.2 Caracterização das isoformas purificadas

A análise dos perfis cromatográficos das xilanases produzidas por *Aspergillus niveus* (**figura 27**) indicou que o microrganismo produziu diferentes formas de xilanase, das quais duas (CMC 2 e Biogel 2) foram purificadas. Ambas foram caracterizadas tendo sido determinados parâmetros como temperatura e pH de reação, termoestabilidade e estabilidade ao pH, influência de íons, determinação do conteúdo de carboidratos, análise dos produtos de hidrólise em TLC, determinação da estrutura secundária por dicroísmo circular e sequenciamento de aminoácidos e determinação da Km.

##### 4.4.2.1 Determinação da temperatura e pH ótimos de reação, termoestabilidade e estabilidade ao pH

As temperaturas de reação testadas variaram de 25 a 80°C enquanto os pHs de reação foram de 2,0-8,0. A temperatura de reação correspondeu a 65°C para ambas as xilanases puras (**figura 31A e B**), enquanto a faixa de pH em que as xilanases apresentaram maior atividade foi de 5,5-6,5 para CMC 2 (**figura 31A**) ou 3,5-5,0 com valores ligeiramente maiores para biogel 2 (**figura 31B**).

Para a determinação da estabilidade ao pH, as xilanases puras foram incubadas na presença de tampão McIlvaine na proporção de 1:1 em diferentes pHs (2,0-8,0), durante 1 hora. Transcorrido este tempo, alíquotas deste extrato foram retiradas, e, então, foi realizado o ensaio enzimático. Neste experimento, foi feito um controle, que correspondeu a 100% da atividade, onde os extratos enzimáticos, diluídos 1:1 em água destilada, não foram pré-incubados nos pHs testados.



**Figura 31.** Determinação da temperatura e do pH de reação da xilanase CMC 2 (**A**) e da xilanase biogel 2 (**B**) produzidas por *Aspergillus niveus*. Símbolos: -○- temperatura; -●- pH.

Verificou-se que a xilanase pura CMC 2 manteve-se 100% estável em pHs de 2,5-4,5, durante uma hora. Nos demais pHs, a atividade foi mantida elevada (98,5%-83%) durante o mesmo período (**figura 32A**). Já a xilanase pura biogel 2 manteve-se estável em pHs de 3,5-8,0 mantendo ao redor de 100% de sua atividade (**figura 32B**).

Para a determinação da estabilidade térmica, inicialmente, as xilanasas puras foram incubadas em temperaturas de 25 a 80°C, por 1 hora. Transcorrido este período, alíquotas foram retiradas e colocadas em gelo para posterior ensaio enzimático utilizando como substrato xilana birchwood 1% em tampão McIlvaine pH 5,5 para xil CMC 2 ou 3,5 para biogel 2, ambas a 65°C. Neste experimento, foi feito um controle, que correspondeu a 100% da atividade, onde a xilanase em estudo não foi pré-incubada nas temperaturas testadas.

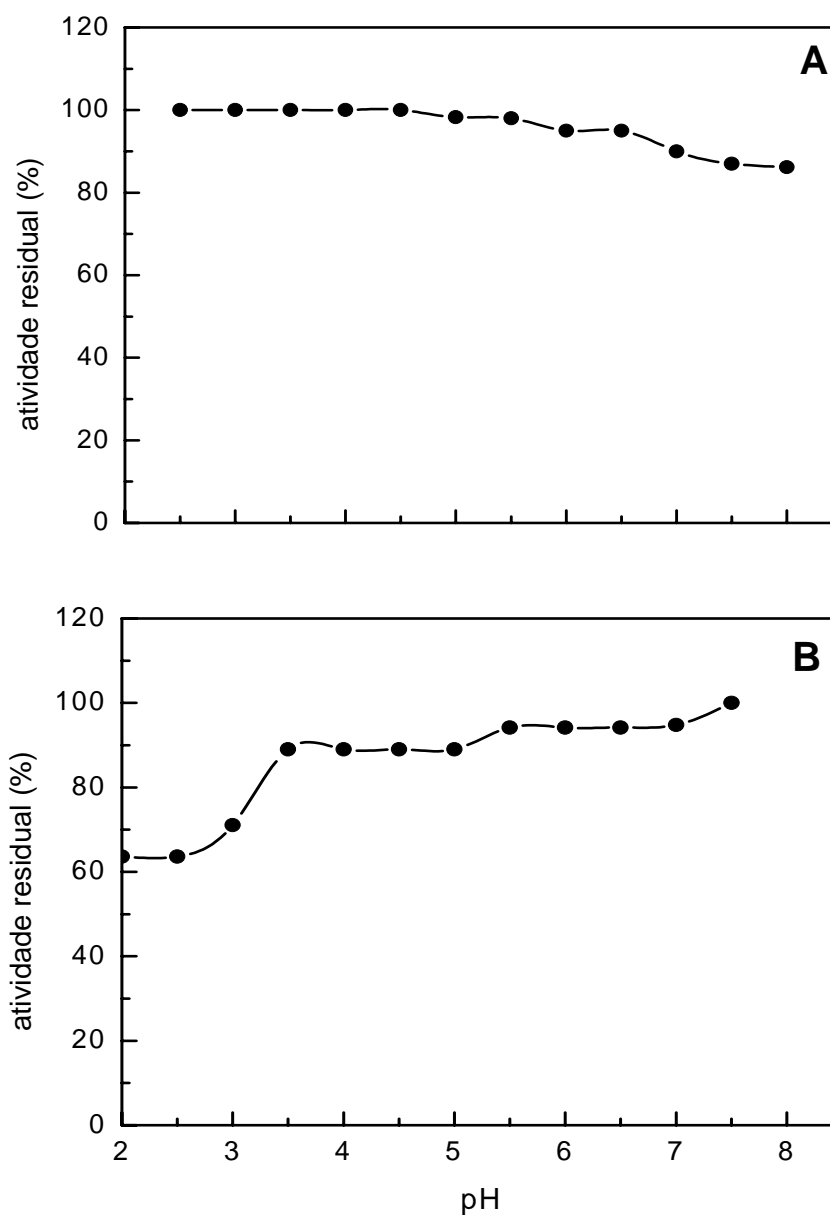
Verificou-se que de 25-45°C, durante uma hora, a xilanase CMC 2 produzida por *A. niveus* foi bastante estável, mantendo quase que 100% de sua atividade inicial. Quando incubada a 50°C durante o mesmo período, ainda manteve em média 88% de sua atividade inicial, mas, em temperaturas maiores (55-80°C), a redução da atividade foi significativa (**figura 33A**). Para determinar o  $t_{50}$  da xilanase em estudo, a mesma foi incubada a 50°C e alíquotas foram sendo retiradas em diferentes tempos (5-120 minutos) e se verificou que a 50°C o  $t_{50}$  desta xilanase correspondeu a cerca de 20 minutos (**figura 33C**).

No intuito de proteger esta enzima e, portanto, aumentar sua estabilidade a 50°C, diferentes substâncias, que poderiam atuar como agentes protetores, foram testadas. Assim, para a realização deste teste, a xilanase em estudo foi incubada a 50°C na presença de 10% de trealose, sorbitol, polietilenoglicol (PEG) ou glicerol e

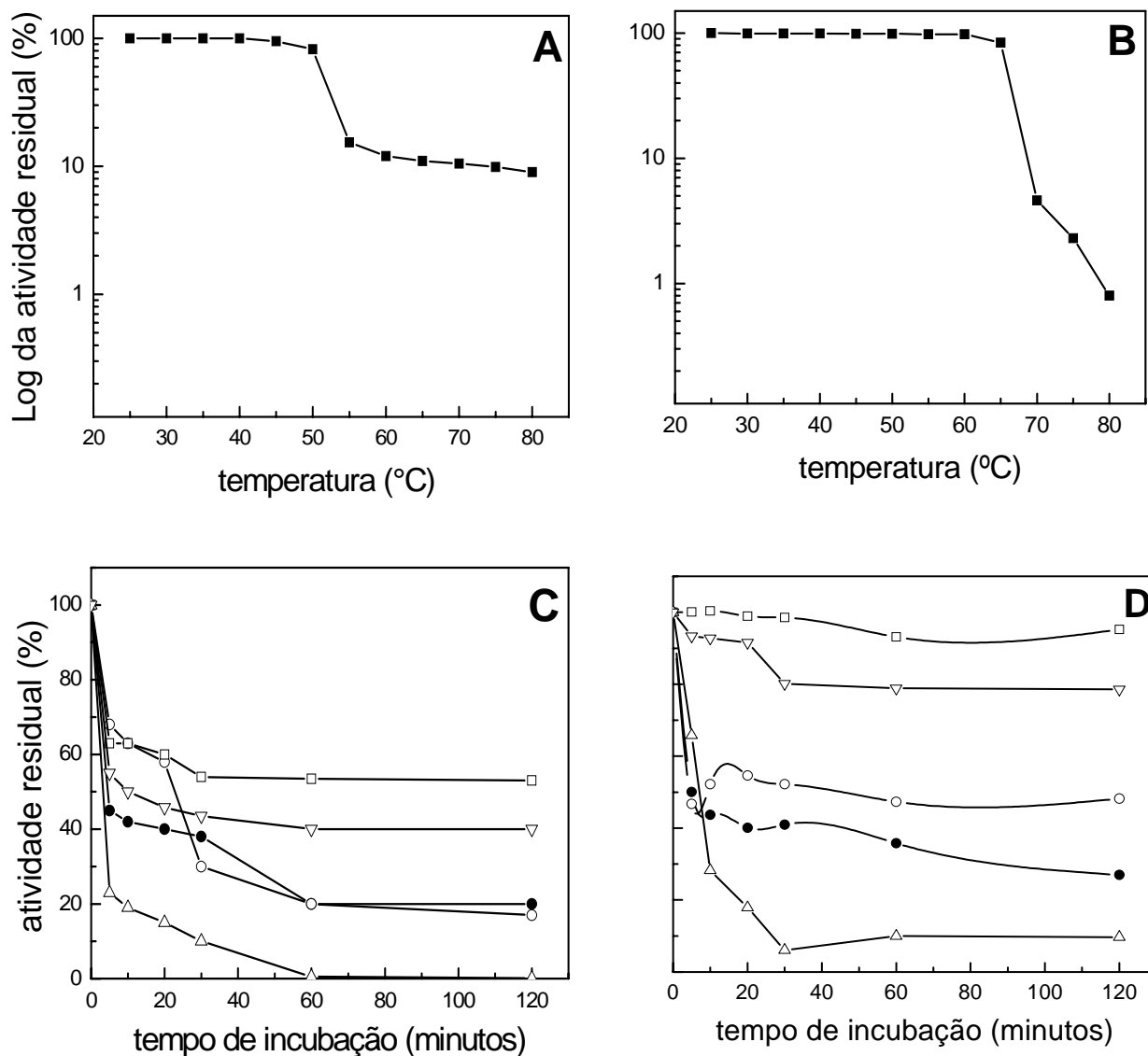
alíquotas foram sendo retiradas em diferentes tempos (5-120 minutos). Quando comparada ao controle (sem agentes protetores), observou-se que a xilanase manteve uma atividade residual maior quando protegida por sorbitol, glicerol e trealose, por até 20 minutos de incubação. Após este período, sob proteção de glicerol e de sorbitol, a atividade residual foi maior em comparação ao controle por até 120 minutos. A adição de PEG não resultou em aumento da estabilidade da xilanase CMC 2 (**figura 33C**).

A xilanase biogel 2, após uma hora de incubação de 25-60°C, manteve 100% de sua atividade inicial. Quando incubada a 65°C, durante o mesmo período, manteve em média 85% de sua atividade inicial, mas, em temperaturas maiores (70-80°C), a redução da atividade foi significativa (**figura 33C**). Para a determinação do  $t_{50}$  da xilanase biogel 2, esta foi incubada a 65°C e alíquotas foram sendo retiradas em diferentes tempos (5-120 minutos) e se verificou que a 65°C o  $t_{50}$  desta xilanase correspondeu a cerca de 15 minutos (**figura 33D**). Também, no intuito de proteger esta enzima, e, portanto, aumentar sua estabilidade a 65°C, testou-se o efeito dos mesmos reagentes utilizados para CMC.

Comparando-se com o controle, a xilanase biogel 2 manteve uma atividade residual maior quando protegida por sorbitol, glicerol e trealose, durante todo o período experimental de 120 minutos (**figura 33D**).



**Figura 32.** Determinação da estabilidade ao pH das xilanases purificadas e produzidas por *Aspergillus niveus*. Xilanase CMC 2 (A) e xilanase Biogel 2 (B). As condições de temperatura e pH utilizadas para as reações foram as condições ótimas de cada enzima.



**Figura 33.** Determinação da termoestabilidade das xilanases produzidas por *Aspergillus niveus*. Termoestabilidade em diferentes temperaturas durante uma hora (A e B) para as xilanases CMC 2 (A) e biogel 2 (B); termoestabilidade em diferentes tempos com e sem a utilização de agentes protetores (C e D). A temperatura de incubação foi de 50°C para xil CMC 2 (C) e 65°C para xil biogel 2 (D). Símbolos (B e D): -●- controle; -○- trealose; -□- sorbitol; -Δ- PEG e -▽- glicerol.

#### 4.4.2.2 Influência de compostos sobre as atividades xilanásicas

No intuito de observar se algum íon poderia atuar como co-fator das xilanases puras (CMC 2 e biogel 2) e, assim, aumentar suas respectivas atividades enzimáticas, diferentes compostos foram testados:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{NaBr}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_4\text{F}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , além dos agentes redutores  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -mercapto), ditioneitol (DTT) e o aminoácido cisteína (**tabelas 23 e 24**). Como controle foi utilizada a xilanase pura sem adição de nenhuma substância ou na presença de EDTA (agente quelante). As concentrações utilizadas no ensaio foram de 0,25 mM, 1 mM, 2,5 mM e 5 mM. Para análise dos resultados, foi considerado um aumento significativo aqueles, no mínimo, 50% maiores que o controle.

Observa-se na **tabela 23** que, dentre os compostos testados, o manganês aumentou em 59% a atividade xilanásica quando utilizado na concentração de 1 mM e mais de 90% quando utilizado na concentração final de 2,5 mM.  $\beta$ -mercaptoetanol e cisteína foram ainda melhores aumentando, respectivamente, 64% e 78%, quando utilizados numa concentração final de 2,5 mM ou 89% e 57% na concentração de 5 mM. O mesmo experimento foi realizado com a outra isoforma pura de xilanase (Biogel 2) e nenhum aumento da atividade enzimática foi observado (**tabela 24**).

#### 4.4.2.3 Determinação do conteúdo de carboidratos

Através do método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), verificou-se a natureza glicoprotéica das xilanases purificadas, a partir do extrato bruto produzido por *Aspergillus niveus*. O conteúdo de carboidratos correspondeu a 33,8% e 11,56%,

respectivamente, para as xilanases CMC 2 e biogel 2.

**Tabela 23.** Efeito da adição de íons no ensaio enzimático da xilanase pura (CMC 2) produzida por *Aspergillus niveus*.

	0,25mM	1mM	2,5mM	5mM
<b>CONTROLES</b>				
Sem íons	100			
<b>COMPOSTOS</b>				
EDTA	124	137	122	105
NH <sub>4</sub> Cl	99	112	128	123
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	110	124	124	107
NaBr	114	117	126	132
KCl	105	110	117	130
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	112	118	123	112
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	131	<b>159</b>	<b>198</b>	6
NH <sub>4</sub> F	103	104	131	117
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	102	108	131	141
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	109	117	127	118
β-mercaptoetanol	100	120	<b>164</b>	<b>189</b>
DTT	116	120	120	138
Cisteína	106	122	<b>178</b>	<b>157</b>

O fungo *Aspergillus niveus* foi pré-cultivado em meio SR suplementado com glicose 1%, a 40°C, durante 72 horas e em condições estacionárias. Decorrido este período os micélios foram lavados com água destilada estéril e devidamente transferidos para o meio indutor que correspondeu ao meio Czapeck suplementado com xilana oat spelt 0,75%, a 40°C, durante 96 horas, em condições estáticas.



**Tabela 24.** Efeito da adição de íons no ensaio enzimático da xilanase pura biogel 2 produzida por *Aspergillus niveus*.

	0,25mM	1mM	2,5mM	5mM
<b>CONTROLES</b>				
Sem íons	100			
<b>COMPOSTOS</b>				
EDTA	114	127	122	105
NH <sub>4</sub> Cl	99	98	88	83
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	90	94	94	87
NaBr	84	77	76	72
KCl	95	90	87	70
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	92	88	73	62
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	71	69	61	6
NH <sub>4</sub> F	83	74	61	57
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	52	48	41	41
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	89	67	47	38
β-mercaptoetanol	90	90	64	59
DTT	56	50	42	38
cisteína	56	52	48	47

O fungo *Aspergillus niveus* foi pré-cultivado em meio SR suplementado com glicose 1%, a 40°C, durante 72 horas e em condições estacionárias. Decorrido este período os micélios foram lavados com água destilada estéril e devidamente transferidos para o meio indutor que correspondeu ao meio Czapeck suplementado com xilana oat spelt 0,75%, a 40°C, durante 96 horas, em condições estáticas.

#### 4.4.2.4 Análise dos produtos de hidrólise em TLC

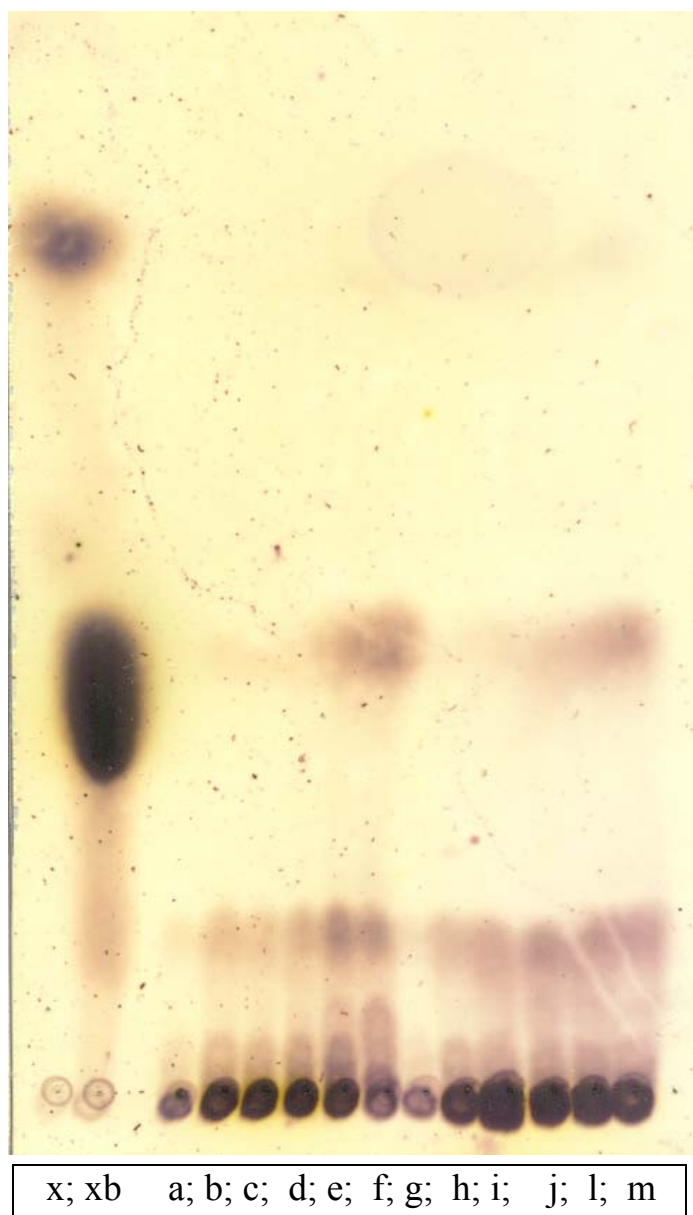
Neste experimento, foram analisados os produtos de hidrólise formados após a degradação da xilana pelas enzimas CMC 2 ou biogel 2 em diferentes tempos de reação (0, 5, 10 e 30 minutos, 1 e 24 horas). Como padrões foram utilizados xilose e xilobiose.

Observou-se a formação de xilobiose e outros xilooligossacarídeos maiores (**figura 34**), sendo que a quantidade de xilobiose formada foi crescente. Não se observou a formação de xilose durante todo o período experimental. Este perfil de produtos (formação de xilooligossacarídeos) foi compatível com a atuação de endoxilanases, conforme se esperava.

#### 4.4.2.5 Sequenciamento de aminoácidos e determinação da estrutura secundária por dicroísmo circular (DC)

Proteínas possuem uma estrutura primária que é definida pela seqüência linear de aminoácidos que as compõem. Esses aminoácidos estão unidos entre si por ligações peptídicas. Cada proteína pode ainda dobrar-se, formando sua estrutura secundária em  $\beta$ -folha ou  $\alpha$ -hélice.

Para aprofundar ainda mais nossos conhecimentos sobre duas das múltiplas xilanases produzidas por *Aspergillus niveus*, sequenciou-se um fragmento das xilanases purificadas (CMC 2 e Biogel 2) e foi analisada sua estrutura secundária por meio da metodologia do dicroísmo circular.



**Figura 34.** Cromatografia em camada delgada de sílica mostrando os produtos de hidrólise da xilana. Padrões: xilose (**x**) e xilobiose (**xb**). Produtos de hidrólise formados por hidrólise de xilana em diferentes tempos: 0, 5, 10 e 30 minutos, 1 e 24 horas. As enzimas utilizadas foram as xilanases puras CMC 1 (**a-f**) e biogel 2 (**g-m**) produzidas por *Aspergillus niveus* e purificadas a partir de seu extrato bruto.

O sequenciamento N-terminal da xilanases purificadas foi realizado e os fragmentos sequenciados corresponderam a **D-P-I-P-V-S(I)-V(Y)** (para CMC 2) e **V(F)-E-T-A-V-X(A)-X(Q)-G-X(Y)** (para biogel 2). Essas sequências foram comparadas com um banco de dados, nos quais se verificou que a xilanase CMC 2 apresentou identidade apenas com proteínas hipotéticas de bactérias e com o fungo *Penicillium chrysogenum* (**figura 35**). Já a sequência da xilanase biogel 2 apresentou identidade com xilanases de bactérias como, por exemplo, *Bacillus subtilis* e *Kineococcus* (**figura 36**).

As análises da estrutura secundária foram realizadas através da metodologia de dicroísmo circular, a qual detecta mudanças conformacionais na molécula. Espectros de DC foram feitos para ambas as xilanases puras de seus respectivos componentes estruturais secundários. Os espectros obtidos para as proteínas puras são comparados ao espectro de DC de uma proteína padrão (**figura 37A**) com estrutura secundária definida. Assim, o perfil obtido para a xilanase CMC 2 (**figura 37B**) foi compatível ao de uma proteína rica em estruturas tipo  $\beta$ -folha, uma vez que há um mínimo em 210 nm. Estrutura tipo  $\beta$ -folha é compatível com xilanase.

Já a xilanase denominada de biogel 2 (**figura 37C**) mostrou-se compatível a uma proteína com estrutura mista em  $\beta$ -folha e  $\alpha$ -hélice, uma vez que há dois mínimos, um em 210 e outro em 220 nm.

## D-P-I-P-V-S(I)-V(Y) – xilanase CMC 2

## A

1 MRRREFLISLAMSASGLRTRSRAEAAGVIRVGVLTNGQESAGRRARAAALRQGIAEQSLASDRQIALDFIW 70  
 71 AGAEPEATRLAARALVEARTEVLVGAGTSATAALMRETRTLPIV FVSVSDPIGEGFAASYSKPGGNATGL 140  
 141 SNFEPSMTAKWLELEEEIAPGTTRPALLFHPKTAAGQGFWRPFSAAAASLNLD**PIPVSV**DRMEDVEEA 210  
 211 TVELARQPGTALAIAPSSFTSLHGLEIASSANRRGLPTVFPFSEFARGGGLISYGAHVLDLFRAGSFVI 280  
 281 RIANGEPADLPVEAPTHFELVVNARTAKMLGLAVPPLLLARADEVIE 328

## B

1 MLENLKPERVFFYYFEELTKIPRESGNEKAVSDYLYSVGKSLGLETIQDESNNIVIRKPAYKGYENHEPIV 70  
 71 IQGHMDMVAEKADGVEHNFLV**DP****IP****VI**VDGDWVKTKGTTLGADDGIAMGLAILEDKEAKHPALELLVT 140  
 141 TDEERTMAGARAVKRELLNGRKLINIDAEHEGVLLSGCSGGHNIVGTLKVYKESDMKNTFVLFVNNMLG 210  
 211 GHSGMEIHQQRGNSLKFALRAMDMIKEIADYRLVSI EGGTKHNAI PRDAKVI FTSDNADEFNIDFSRLISE 280  
 281 YPLDKDMRVSIEKVENVKEVLCCKGCQEKIENVVRNI PHGVYSMMEEYPSIVECSDNFAI I KFDGNFVKFT 351  
 352 VSLRSSNPKTFFEEYTMVKKVYEENGVRYTLEDYYPWEFAKVSQLRDTALEVYKKLTKGEMKVEVVHAA 421  
 422 LEPAVFVDTFPDMEMISIGPTMKDVHSPAERLNILSTQRTFFEFVKELLKSL 472

## C

1 MIEDAGPNGDNGVFPRELDQRNAHHAAEASGSASAGIVGEKEGVCNLKASTYISVPKEPTSSRSRDFND 70  
 71 EMSSEVAAQCHCSIEE..... 2940  
 2941 TF TSGRMIPIPHLDEEVGQFSNMSICRIRLASQLTLDQIALSLQQNYSEVLSYQTFPLADIATAAGVTME 3010  
 3011 DLASTAVNVQYATPTVPSNQDKRPLLNLTPLHGL**DP****IP****VS**YPIPIYIMMYAEFQEDGQIQVAMTYRPSRVS 3080  
 3081 .....AIELFSSCPSSSLAALG 4217

**Figura 35.** Alinhamentos da sequência de aminoácidos de um fragmento da xilanase CMC 2 produzida por *Aspergillus niveus* e purificada a partir de seu extrato bruto. A sequência apresentou identidade com proteínas hipotéticas de *Methylobacterium* sp. (A), *Peptostreptococcus* sp. (B) e com *Penicillium chrysogenum* (C).

## V(F)-E-T-A-V-X(A)-X(Q)-G-X(Y) – xilanase Biogel 2

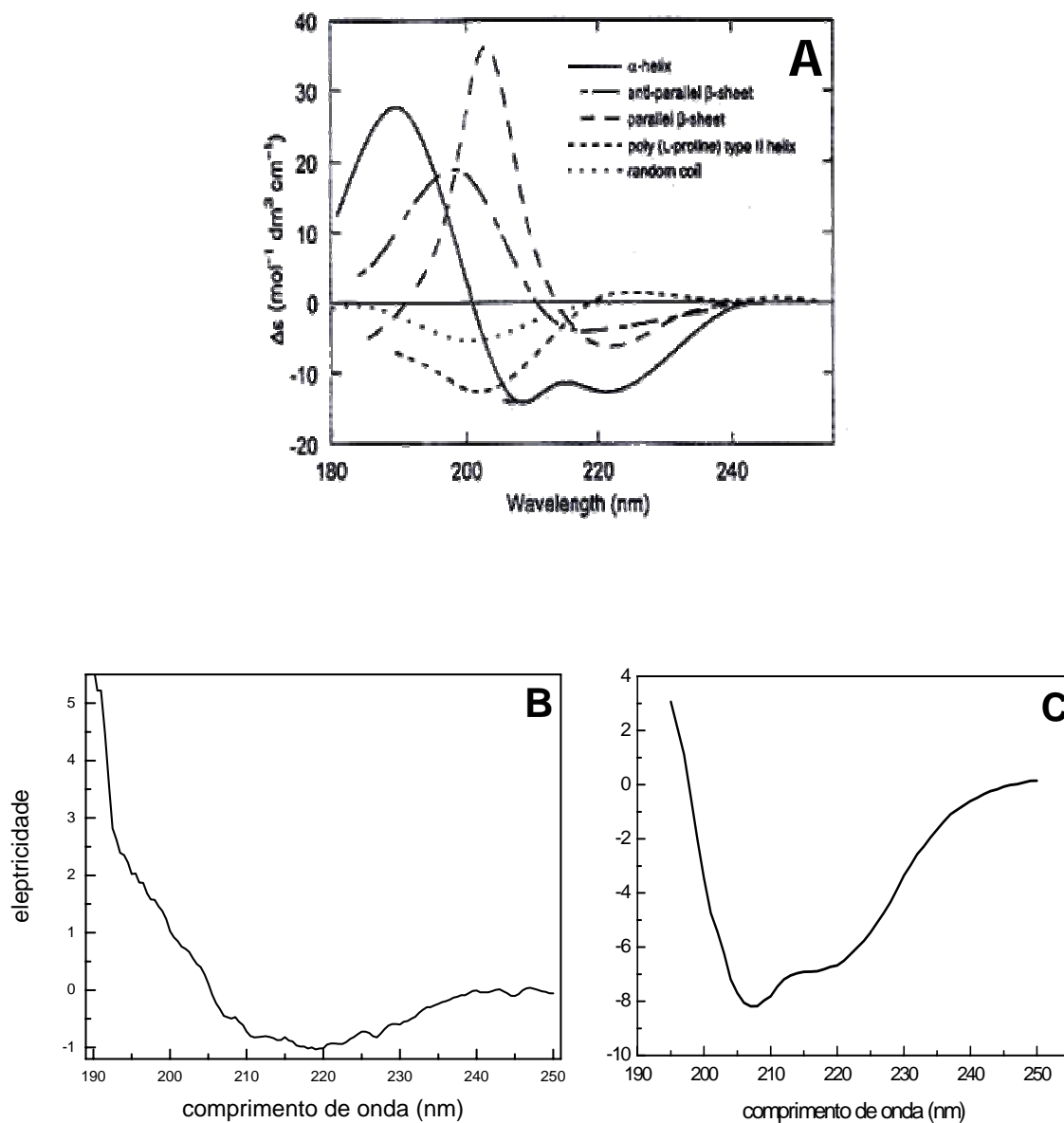
**A**

```
1  mrlhrtpptt  tarrlvglal  aptmlalaaa  apsaaaprad  aqqaqaqaaq  rhggqdtlrr  60
61  aaprldavgt  avagggghae  qdyadpfayd  veyrermaae  fsslspenqa  kweyihprrd  120
121  fynfypmdai  vrfaeenrqv  vrghltfwhs  qnpewleqgd  ftdeelrail  kehiqtvvgr  180
181  yagrvqqwv  aneivrddgs  glrvgptseg  gniwitrlge  giiadafrwa  headpraklf  240
241  fndygvegin  akstyyyelv  qdlkaqgvv  dgfaiqghls  tqygfpgdlq  anlqrfdalq  300
301  letavteldv  rmvlpengip  tsaqqaqqad  yyrrtlqacl  aveecnsfti  wgftdkyswv  360
361  pvffaaegsa  tvmtddyerk  payyalqstl  rdarrggr  398
```

**B**

```
1  tfawngrilt  ekstapggpv  nnqhvtsiqn  gdwiavgnad  fgaggarsfk  anvastlggk  60
61  ievrldsadg  klvgtlnvps  tggagtwrei  etavsgatgv  hkvvfvftgt  gtgnlnfnfdy  120
121  wqftqr  127
```

**Figura 36.** Alinhamentos da sequência de aminoácidos de um fragmento da xilanase biogel 2 produzida por *Aspergillus niveus* e purificada a partir de seu extrato bruto. A sequência apresentou identidade com xilanase de *Kineococcus radiotolerans* (A) e *Bacillus subtilis* (B).



**Figura 37.** Dicroísmo circular (DC) das xilanases purificadas a partir do extrato bruto de *Aspergillus niveus*. Padrões de estrutura secundária para o DC (A); xilanase pura CMC 2 (B); xilanase pura biogel 2 (C).

## *V. Discussão*



Estudos de coleta de organismos vivos e prospecção de metabólitos têm ocupado um papel de destaque dentro da biologia, uma vez que possibilitam conhecer o patrimônio biológico de determinado local, bem como obter retorno econômico através da exploração comercial e sustentável deste mesmo patrimônio (AZEVEDO, 2003).

Dentre os muitos metabólitos de interesse comercial, as enzimas apresentam um papel importante, uma vez que podem ser aplicadas nos mais variados setores da indústria biotecnológica (SAID & PIETRO, 2002; 2004). As enzimas podem ter diferentes origens (vegetal, animal e microbiana), mas, segundo SAID & PIETRO (2002), a grande maioria é obtida a partir de microrganismos, pois são de mais fácil manutenção, além de capazes de utilizar resíduos agroindustriais como fonte de carbono para a produção de enzimas, o que torna o valor final do produto bem menos oneroso e, portanto, mais viável para aplicação industrial (PEIXOTO *et al.*, 2003; BETINI *et al.*, 2008; PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2008a e b).

A coleta e seleção de microrganismos produtores de xilanases constituíram etapas importantes deste trabalho, uma vez que, para se utilizarem as enzimas produzidas por uma determinada linhagem microbiana, esta deverá expressar a proteína de interesse em quantidades elevadas. Daí a importância de um *screening*, utilizando-se de várias espécies. Com o *screening* realizado foi possível selecionar vários organismos bons produtores de xilanases e, para este estudo, foram selecionadas duas espécies de *Aspergillus* (*Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niveus*).

O fato de duas espécies do gênero *Aspergillus* terem sido selecionadas como bons produtores de xilanases, vai ao encontro de resultados prévios publicados

por nosso grupo de pesquisa, uma vez que este gênero tem se destacado como bom produtor de enzimas do complexo xilanolítico (RIZZATTI, 2000, 2004; Rizzatti *et al.*, 2001, 2004; SANDRIM *et al.*, 2005). Há também, na literatura, outros estudos sobre as xilanases do gênero *Aspergillus* como *A. niger* (SARDAR *et al.*, 2000; XU *et al.*, 2008) e *Aspergillus fischeri* (SENTHILKUMAR *et al.*, 2005).

Após a seleção de bons produtores de xilanase, iniciaram-se os estudos de padronização das condições de cultivo visando aumentar os níveis enzimáticos, uma vez que a demanda do mercado exige a obtenção de grandes quantidades de enzima. Além da padronização das condições de cultivo para endoxilanases, determinaram-se parâmetros como temperatura e pH ótimos, conhecimentos prévios fundamentais às etapas subseqÜentes. Nos estudos de padronização das condições de cultivo para produção xilanásica presentes na literatura, variaram parâmetros como: tempo e temperatura de cultivo, composição do meio, fonte de carbono e pH (KADOWAKI *et al.*, 1997; DAMASCO *et al.*, 2000; SENTHILKUMAR *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2008). Há até mesmo trabalhos para o escalonamento da produção xilanolítica (LU *et al.*, 2003).

Os dados resultantes da padronização das condições de cultivo pra produção de xilanases por *A. fumigatus* e *A. niveus* resultaram em publicação no Journal Industrial Microbiology and Biotechnology (PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2008a), na qual se mostrou que, dentre as várias composições de meios de cultura testadas, as melhores corresponderam aos meios mínimos de Vogel e Czapeck para *A. fumigatus* e *A. niveus*, respectivamente. A maior produção enzimática em meios mínimos constituiu num dado importante porque, quanto mais simples o meio, menor o custo para a produção enzimática. Além disso, vale ressaltar que, em meios

mínimos, há uma indução de quantidades menores de outras proteínas, facilitando estudos de purificação. A utilização de meios mínimos para induzir xilanases também foi descrita por outros autores (RIZZATTI *et al.*, 2004; SAVITHA *et al.*, 2007), mas há também estudos que relatam maior eficiência na produção xilanolítica por fungos filamentosos em meios complexos contendo compostos como extrato de levedura e/ou peptona (RIZZATTI *et al.*, 2001 e 2004; ANTHONY *et al.*, 2003; SANDRIM *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2008).

Além da definição de um meio indutor de níveis satisfatórios de xilanase, foi necessário que se determinasse por quanto tempo e em que temperatura havia maior indução. O crescimento de *A. fumigatus* foi aumentando ao longo de todo o período experimental, enquanto a máxima produção xilanásica foi detectada com 96 horas de incubação. Para *A. niveus* o pico de crescimento foi registrado com 72 horas de incubação, enquanto os maiores níveis enzimáticos foram obtidos com 120 horas. Para ambos os fungos, a máxima produção de xilanolítica ocorreu a 40°C, entretanto a temperatura que mais favoreceu o desenvolvimento foi 30 e 40°C para *A. niveus* e *A. fumigatus*, respectivamente. Esses resultados sugeriram um caráter termotolerante para os fungos em estudo, semelhante a *A. phoenicis* (RIZZATTI *et al.*, 2001, 2004 e 2008; RIZZATTI, 2000, 2004) e *A. caespitosus* (SANDRIM *et al.*, 2005). Para outras espécies de *Aspergillus* como *A. awamori*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. oryzae* e *A. tamari*, a melhor produção xilanolítica ocorreu quando o fungo se desenvolveu em temperaturas menores (TECHAPUN *et al.*, 2003).

Comparando-se a produção xilanásica de *A. fumigatus* e *A. niveus* em seus respectivos tempos ótimos de cultivo, observou-se que o primeiro produziu 2,1 vezes mais xilanase, entretanto a atividade específica de *A. niveus* foi 25,5 vezes

maior. O tempo requerido por *A. fumigatus*, para a síntese e secreção de xilanase (96 horas) está de acordo com dados reportados na literatura para *A. awamori* e *A. oryzae* (TECHAPUN *et al.*, 2003), já *A. tamaritii* requereu 120 horas (TECHAPUN *et al.*, 2003), assim como *A. niveus*. Para ambos os fungos, o maior crescimento ocorreu sob 100 rpm de agitação. Em contraposição, a maior produção e secreção enzimática foi observada em condições estáticas, sendo que esses níveis foram 2,3 vezes maiores para *A. fumigatus* e 1,46 vezes para *A. niveus*, comparando suas respectivas culturas mantidas sob agitação.

Verificou-se também que *A. fumigatus* produziu de 3-4 vezes mais xilanases que *A. niveus*. Comparando-se com a literatura, *A. fumigatus* produziu de 16-55% mais xilanase que *A. caespitosus* (SANDRIM *et al.*, 2005), *A. nidulans* e *A. awamori* (TECHAPUN *et al.*, 2003; POLIZELI *et al.*, 2005), enquanto *A. niveus* produziu 25% e 39% mais xilanase que *A. awamori* e *A. nidulans*, respectivamente (TECHAPUN *et al.*, 2003; POLIZELI *et al.*, 2005) e 64% mais xilanase comparado a outras linhagens de *A. niveus* reportadas (ANGAYARKNNI *et al.*, 2006). Vale ressaltar que uma maior produção enzimática, em condições estáticas, resulta em menor custo de produção.

Nos estudos de análise de diferentes fontes de carbono indutoras de xilanase observou-se que *A. fumigatus* produziu de 5-6% mais enzima em resíduos agroindustriais (milho moído, farelo de trigo e sabugo de milho) comparando-se com a produção em meio suplementado com xilana birchwood. Para *A. niveus*, resíduos como palha e flocos de arroz também favoreceram a síntese enzimática e, portanto, podem ser utilizadas como fonte alternativa para a produção dessas enzimas. Entretanto, a maior produção enzimática de *A. niveus* ocorreu preferencialmente em

farelo de trigo e sabugo de milho moído. Observou-se que xilana birchwood, xilose, xilana de *Eucalyptus grandis* e xilana oat spelt também foram bons indutores desta enzima.

A possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais como fonte de carbono para produzir enzimas pode reduzir significativamente o custo de produção, resultando em uma mercadoria menos onerosa. Resíduos são utilizados para a produção de xilanases por outros *Aspergillus* (SANDRIM *et al.*, 2005; AACHARY, 2008), inclusive *Aspergillus niveus* (BETINI, 2006; BETINI *et al.*, 2008). É importante considerar também que esses resíduos são complexos e, quando utilizados como fonte de carbono, podem induzir diferentes tipos de proteínas, entre elas celulasas, dificultando a aplicação deste extrato na indústria de papel e celulose. Assim, foram realizados ensaios para detecção de atividade celulásica nos extratos de *A. fumigatus* e *A. niveus* produzidos em resíduos, mas nada foi registrado.

Segundo BIELY (1985), com poucas exceções, organismos xilanolíticos são invariavelmente celulolíticos e, frequentemente, secretam misturas complexas de celulasas e xilanases simultaneamente. Neste contexto, pode-se destacar que os *Aspergillus* em estudo fazem parte desta exceção - embora bons xilanolíticos não produziram quantidades significativas de celulasas - o que poderia inviabilizar uma futura aplicação biotecnológica em processos de biobranqueamento da polpa de celulose. Entretanto, há outros *Aspergillus* como *A. terreus* M11 que, diferentemente das linhagens em estudo, quando cultivados na presença de resíduos secreta celulasas (GAO *et al.*, 2008). Além dos *Aspergillus*, os fungos filamentosos, mais frequentemente destacados na literatura como bons celulolíticos, pertencem geralmente ao gênero *Trichoderma* e, frequentemente, produzem altos níveis de

enzimas tanto xilanolíticas como celulolíticas, quando cultivados com substratos nativos heterogêneos (COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993).

Desse modo, a maioria dos pesquisadores necessita utilizar xilana como fonte de carbono para a produção de xilanase quando se visa aplicar na indústria papelreira. Portanto, o fato de não se ter detectado produção de celulases, mesmo quando os fungos foram cultivados em meios suplementados com resíduos, conferiu significativa vantagem para futuras aplicações dos extratos de *A. niveus* e *A. fumigatus* no clareamento da polpa de celulose para fabricação de papel.

Vale ressaltar que, embora não tenha sido detectada atividade celulásica, verificou-se a existência de outras enzimas do sistema xilanolítico como alguns traços de ARF e significativa quantidade de AXE. Essas enzimas são comumente produzidas pelo gênero *Penicillium* (CHÁVEZ *et al.*, 2006) e também pelo gênero *Aspergillus*: *A. carbonarius* e *A. focuum* (AXE) (KISS & KISS, 2000; CHUNG *et al.*, 2002), *A. nidulans* (ARF) (FERNÁNDEZ-ESPINAR *et al.*, 2006). Os níveis de AXE foram considerados elevados uma vez que, após 5 minutos de reação, os valores de absorvância atingiram valores maiores que 1,0. A atividade  $\beta$ -xilosidásica também foi determinada, mas nada foi detectado no extrato extracelular tanto de *A. fumigatus* como de *A. niveus*, resultado esperado, uma vez que quantidades significativas desta enzima geralmente encontram-se na porção intracelular (RIZZATTI *et al.*, 2001).

Quanto aos altos níveis de xilanases observados, estes eram esperados quando *A. fumigatus* e *A. niveus* foram cultivados em xilana como fonte de carbono, visto que este carboidrato forma uma matriz insolúvel, muito grande para ser transportada para o interior da célula, necessitando, assim, de um sinal extracelular para desencadear a produção de enzimas xilanolíticas. Inicialmente, endoxilanases

expressas constitutivamente são secretadas para o meio extracelular e degradam a xilana formando xilooligossacarídeos, os quais entram na célula induzindo a síntese de enzimas do sistema xilanolítico.

Segundo GHOSH & NANDA (1994) esta hipótese pode ser confirmada através da observação de níveis relativamente elevados de xilanases, mesmo nos meios contendo fontes de carbono facilmente metabolizáveis como a xilose - quando cultivado em xilose, os níveis enzimáticos produzidos por *A. niveus* foram apenas 0,8% menores comparando-se aos valores obtidos em xilana birchwood. A indução por xilana e xilose foi observada em *Aspergillus sydowii* (GHOSH & NANDA, 1994), *A. terreus* (HRMOVÁ *et al.*, 1989) e *A. tubigiensis* (DE GRAFF *et al.*, 1994). Entretanto, alguns organismos sofrem repressão catabólica na utilização de açúcares facilmente metabolizáveis como xilose e arabinose, fato observado em *Trichosporon cutaneum* (LIN *et al.*, 1999) e *Humicola grisea var thermoidea* (MONTI *et al.*, 1991). Quanto à repressão por glicose, esta parece ser um fenômeno comum observado na biossíntese de xilanase (KULKARNI *et al.*, 1999). Vale ressaltar que em *A. nidulans* a xilose não induziu a secreção de xilanases (PIÑAGA *et al.*, 1994), indicando que, provavelmente, existem mecanismos distintos de regulação da síntese de xilanases no gênero *Aspergillus*.

Parâmetros bioquímicos como temperatura e pH de reação, bem como as estabilidades química e térmica são importantes para a aplicação industrial de qualquer enzima e, por isso, foram determinados neste estudo. Os resultados corresponderam a 70°C e 60-65°C para *A. fumigatus* e *A. niveus*, respectivamente. A temperatura de reação de *A. fumigatus* foi a mesma observada para o fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* (LIN *et al.*, 1999; DAMASCO *et al.*, 2000; LI *et*

*al.*, 2005; JURKOVICH *et al.*, 2006), mas foi diferente do que se reportou para a maioria dos *Aspergillus* (RIZZATTI *et al.*, 2004; POLIZELI *et al.*, 2005; SANDRIM *et al.*, 2005), incluindo outras linhagens de *A. fumigatus* (SAVITHA *et al.*, 2007). Já *A. niveus* exibiu uma temperatura de reação similar a *A. fischeri*, *A. kawachii*, *A. oryzae*, *A. sojae* e *A. sydowii* (BEG *et al.*, 2001; POLIZELI *et al.*, 2005).

Para *A. fumigatus*, o pH de reação correspondeu a 5,0-5,5 e de *A. niveus* a 4,5-5,0. Em comparação a outros fungos, esses valores de pH ficaram próximos aos reportados para *A. niger*, *A. fischeri*, *A. sojae* and *A. nidulans* (BEG *et al.*, 2001, POLIZELI *et al.*, 2005) e para uma das isoformas de xilanase (xyl II) produzidas por *A. caespitosus* (SANDRIM *et al.*, 2005). Há também, na literatura, estudos que descrevem xilanases com caráter alcalofílico expressas por fungos do mesmo gênero como *A. nidulans* KK-99, *A. terreus* (POLIZELI *et al.*, 2005), xyl I de *A. caespitosus* (SANDRIM *et al.*, 2005) ou de outros gêneros como *Thermomyces lanuginosus* (LI *et al.*, 2005).

Mesmo que *A. fumigatus* tenha produzido cerca de 3-4 vezes mais xilanase que *A. niveus*, a termoestabilidade da enzima foi similar a 60°C por 30 minutos. Após este período, a atividade residual da enzima de *A. fumigatus* reduziu consideravelmente e, após 120 minutos, restaram apenas 10% de atividade, enquanto a xilanase de *A. niveus* ainda manteve 30% da atividade inicial. Mesmo a termostabilidade da xilanase de *A. niveus* tendo sido maior, a temperatura de reação para a xilanase de *A. fumigatus* foi 70°C, enquanto a xilanase de *A. niveus* correspondeu a 60-65°C. Isso sugeriu que o substrato xilana provavelmente atuou como protetor da enzima, conforme observado em outros estudos com endoxilanases (GEORGE *et al.*, 2001).



Frente a diferentes pHs, a xilanase de ambos os fungos apresentaram grande estabilidade. A enzima de *A. fumigatus* foi mais estável em pHs 6,0-8,0, enquanto a xilanase de *A. niveus* foi mais estável em pHs de 4,5-6,0. *Aspergillus oryzae* (POLIZELI *et al.*, 2005), *A. fischeri* (TECHAPUN *et al.*, 2003; POLIZELI *et al.*, 2005) e *Termomyces lanuginosus* (LI *et al.*, 2005) também apresentaram considerável estabilidade em uma faixa de pH 5,0-8,0.

Além de se padronizarem as condições de cultivo para a produção de xilanases e caracterizarem os extratos brutos de *A. niveus*, padronizaram-se, também, as condições de cultivo para produção de ligninases, uma vez que ambas podem ser aplicadas no tratamento da madeira para a fabricação de papel (GUTIÉRREZ *et al.*, 2006) e, a utilização de um *mix* dessas enzimas, possivelmente, seria mais eficiente nos processos de clareamento da polpa de celulose.

Embora seja descrito na literatura que os maiores produtores de ligninases sejam os basidiomicetos, (LEVIT & SHKROB, 1992; CARVALHO, 2004; RAGHUKUMAR *et al.*, 2008), *A. niveus* produziu níveis satisfatórios das três ligninases (lacase – 67,5U; Mn-P – 217,5U; Li-P – 182,7U) em meio Czapeck, com farelo de trigo como fonte de carbono, comparando-se aos resultados de CARVALHO (2004) que produziu níveis semelhantes. Este autor também descreveu que a utilização de farelo de trigo ótima para produção dessas ligninases, assim como DONINI *et al.* (2006). Embora haja mais dados sobre produção de ligninases por basidiomicetos, também se encontram alguns estudos sobre produção de ligninases por fungos filamentosos como *Phanerochaete chrysosporium* (DE BOER *et al.*, 1987). Em *A. fumigatus* não se detectou atividade ligninásica.

Segundo alguns autores como TIEN *et al.* (1987) e CARVALHO (2004), a produção de ligninases ocorre após semanas de cultivo. TIEN *et al.* (1987) relata que em geral, quando o microrganismo entra em metabolismo secundário que inicia a expressão das proteínas do sistema ligninolítico. Entretanto, esses dados se referem a basidiomicetos e não a fungos filamentosos como *A. niveus*. No intuito de melhor investigar os mecanismos de expressão dessas enzimas em fungos filamentosos, foram realizados cultivos que variaram de 3-42 dias de crescimento e se verificou que a maior produção dessas enzimas ocorreu após 14, 21 e 35 dias para lacase, Mn-P e Li-P, respectivamente. Portanto, tempos longos de cultivo para produção de ligninases também foram requeridos pelo fungo filamentoso *A. niveus*.

Além do tempo de cultivo, há uma série de fatores nutricionais que influenciam na síntese e secreção de qualquer enzima (OOIJKAAS *et al.*, 2000) e, segundo outros relatos, os níveis de síntese de enzimas ligninolíticas podem variar de acordo com o tipo e a quantidade de suplementação de nitrogênio (TIEN *et al.*, 1987; CARVALHO, 2004). Culturas suplementadas com farelo de trigo já possuem cerca de 2,4% de nitrogênio no meio (CARVALHO, 2004), pois o farelo de trigo é rico em proteínas, mas a produção de lacase e Mn-P por *A. niveus* aumentou na presença de fonte de nitrogênio de origem inorgânica. Uma combinação de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ou apenas  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  elevou a secreção de lacase e Mn-P, respectivamente. O efeito da mistura de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  também foi estudado por CARVALHO (2004), que observou a síntese de Mn-P em farelo de trigo aumentava na presença dessa mistura. Já a síntese de Li-P por *A. niveus* foi favorecida não apenas pela suplementação de nitrogênio de origem inorgânica

presente na solução de sais SR, como provavelmente também pela alta concentração de fosfato presente nesta solução.

Nos estudos de caracterização enzimática do extrato bruto verificou-se novamente que *A. niveus* é um organismo que possui um caráter termotolerante, uma vez que as temperaturas de reação foram elevadas (acima de 40°C) - 60°C para lacase e Mn-P e 70°C para Li-P. Esses dados estão de acordo com a literatura uma vez que as lacases de *Coriolopsis byrsina* e *Lentinus* sp. apresentaram temperatura de reação entre 60-65°C (CARVALHO, 2004), esses valores também foram semelhantes à temperatura de reação de uma lacase comercializada pela NOVO NORDISK produzida através de fermentação submersa de *Aspergillus* geneticamente modificado (SOARES *et al.*, 2001). Quanto à temperatura de reação da Mn-P de *A. niveus* (60°C), esta também foi semelhante à registrada para a enzima de *Lentillus* sp. Entretanto, a temperatura de reação da Li-P de *A. niveus* foi bem mais elevada (70°C) em comparação à temperatura da Li-P de *Lentinus* sp. (35°C - CARVALHO, 2004) ou em comparação a Li-P de *Phanerocheate chrysosporium* (55°C - ALAM *et al.*, 2008).

Os valores de pH de reação das ligninases de *A. niveus* corresponderam a 7,0 para lacase, 6,0 para Mn-P e 4,0-5,0 para Li-P. No caso das lacases este valor de pH foi bastante diferente de alguns dados da literatura para as enzimas de *Lentinus* sp. e *Coriolopsis byrsinia* (3,0-4,0 - CARVALHO, 2004). MAKKAR *et al.* (2001) também descreveram perfil semelhante para a lacase de *Lentinula edodes*. O pH da Mn-P também foi bastante diferente para *Lentinus* sp. (3,0 - CARVALHO, 2004) em comparação ao que se observou para *A. niveus*. Já os dados de Li-P de *A. niveus*

corresponderam aos dados dos fungos *Gloeophyllum striatum* e *Lentinus* sp. (CARVALHO, 2004) e *Phanerochaete chrysosporium* (ALAM *et al.*, 2008).

É importante destacar que os valores de pH e temperatura não foram muito diferentes daqueles obtidos para o extrato bruto contendo xilanase de *A. niveus* (65°C, pH 4,5-5,5), o que favoreceu a utilização de um *mix* de xilanases com ligninases no bi branqueamento da polpa de celulose de modo que as xilanases hidrolisassem a xilana deixando os polímeros de lignina mais expostos à ação das ligninases.

Importantes também foram os dados das estabilidades térmica e química. Verificou-se que Mn-P e Li-P não perderam nem mesmo 50% de sua atividade nas temperaturas testadas. Lacase chegou a perder 50% de atividade, mas precisou ficar incubada por uma hora em temperaturas de 75-80°C. Quanto às análises de estabilidade a diferentes pHs, verificou-se que Mn-P e Li-P mantiveram 100% da atividade inicial em uma faixa de pH de 3,5-7,0, já a lacase manteve 100% de atividade em pH de 4,5-7,0. Esses dados de estabilidade mostraram que as ligninases de *A. niveus* foram mais estáveis tanto à desnaturação térmica como química, comparando-se a outras descritas na literatura (MAKKAR *et al.*, 2001; CARVALHO, 2004; ALAM *et al.*, 2008), apenas Mn-P do basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* apresentou tal estabilidade a diferentes valores de pH (WARIISHI *et al.*, 1989).

Já na terceira etapa deste estudo, a aplicação prática das enzimas em estudo foi realizada nos setores de branqueamento da polpa de celulose (xilanases e ligninases) e em rações para ruminantes (apenas xilanases).

A aplicação de xilanases começou na década de 80, primeiramente em rações animais, seguida pela adição em alimentos para humanos e, posteriormente, em indústria têxtil e de papel. Atualmente, as xilanases e celulasas, juntamente com as pectinases, são responsáveis por 20% do mercado mundial (revisto por BHAT, 2000). A demanda do mercado por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas, tem crescido rapidamente.

Nos processos de clareamento da polpa de celulose para a fabricação do papel, o processo será mais eficiente quanto maior for a diminuição do número kappa (grandeza empírica). Assim, foram testados os extratos brutos contendo as xilanases produzidas por *A. niveus* e *A. fumigatus*. O melhor resultado foi obtido com o extrato bruto de *Aspergillus niveus*, o qual resultou em uma diminuição de 4,6 pontos do número kappa, aumento de 3,4 pontos na alvura e manutenção da viscosidade. Já *A. fumigatus* reduziu apenas 0,9 pontos do kappa, aumentou 2 pontos na alvura e resultou em um decréscimo de 9,2% na viscosidade. A manutenção da viscosidade, utilizando-se extrato bruto de *A. niveus*, bem como a pouca redução com extrato de *A. fumigatus*, confirma a ausência de celulasas nesses extratos, uma constante preocupação de inúmeros pesquisadores (TECHAPUN, *et al.*, 2003; SANDRIM *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005) que estudam a aplicação de enzimas no branqueamento da polpa de celulose.

Comparando-se esses resultados com os dados da literatura e utilizando-se outros microrganismos como *Termomyces lanuginosus* (LI *et al.*, 2005) e *A. caespitosus* (xyl I and II) (SANDRIM *et al.*, 2005), podemos observar que houve uma diminuição do número kappa em apenas 1,0, 0,2 (xyl I) ou 1,5 (xyl II) e 1,1 pontos, respectivamente, em comparação aos seus controles, após pelo menos 1 hora de

tratamento quando utilizando uma quantidade de xilanase equivalente a pelo menos 10U/g de polpa seca. A redução de 3,3 pontos no número kappa (similar ao fungo *A. niveus*) foi observada apenas quando se utilizou uma xilanase produzida por *Arthrobacter* sp. MTCC 5214. Entretanto, para que esta performance fosse alcançada, foi necessária a utilização de uma quantidade de enzima duas vezes maior durante o dobro de tempo (20U/g de polpa seca/2h) e, ainda, o extrato enzimático de *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 reduz em 7,5% a viscosidade da polpa de celulose (KHANDEPARKAR & BHOSLE, 2007).

Embora os resultados obtidos com a aplicação da xilanase de *Aspergillus niveus* tenham sido bastante promissores, ainda foi possível melhorar esses valores utilizando-se um *mix* de xilanases e ligninases de *A. niveus*, o que resultou em uma diminuição de 6,5 pontos do kappa. A eficiência do processo chegou a 56%, a alvura aumentou 17,2 pontos e a viscosidade diminuiu apenas 1 ponto.

A eficiência desses tratamentos enzimáticos também foi observada através de análises de microscopia eletrônica de varredura. Percebeu claramente que a fibra de celulose estava intacta nos controles após o tratamento das xilanases ou ligninases ou o *mix* enzimático. Houve exposição de várias camadas de polissacarídeos. Resultados semelhantes foram relatados por SALLES *et al.* (2005), KAPOOR *et al.* (2007) e MEDEIROS *et al.*, (2007a, b) que também realizaram estudos de microscopia de varredura para observar a eficiência de diferentes tratamentos na polpa de celulose.

A xilanase de *Aspergillus niveus* apresentou melhores resultados quando aplicada ao bibranqueamento da polpa de celulose em comparação aos resultados de *Aspergillus fumigatus*. Entretanto, os resultados obtidos com o segundo fungo

também foram interessantes e, embora seja conhecido por seu caráter patogênico (TAUBITZ *et al.*, 2007), os promissores resultados obtidos com a aplicação da xilanase deste fungo no clareamento da polpa de celulose justificam a realização de futuros estudos de expressão heteróloga desta enzima (LIU *et al.*, 2006).

Outro setor em que se testou o potencial de aplicação das xilanases de *Aspergillus niveus* foi o de rações para ruminantes, no intuito de aumentar a digestibilidade do alimento volumoso avaliado *in vitro*. A utilização de enzimas fibrolíticas em rações de ruminantes já tem sido comercialmente realizada, entretanto, estudos como este, onde se padroniza a produção dessas enzimas a baixo custo (usando-se resíduos agroindustriais), seguindo-se com testes de aplicação biotecnológica, são de suma importância. Ademais, cumpre destacar que as enzimas utilizadas em rações de ruminantes são importadas e de custo elevado.

O uso de enzimas fibrolíticas é uma maneira interessante de se melhorar o aproveitamento nutricional de volumosos como a palha de arroz, bem como o das gramíneas forrageiras de clima tropical. Ademais, com o desenvolvimento de pesquisas nesta área, espera-se que o preço dessas enzimas, em escala industrial, seja acessível devido aos recentes avanços na tecnologia de fermentação e sistemas alternativos de produção da enzima (BEAUCHEMIN *et al.*, 2002).

Neste estudo, foram testados diferentes volumosos (feno de alfafa, capim brachiaria, feno de capim jaraguá e silagem de milho). O que se observou foi um significativo aumento na digestibilidade do alimento e o consumo de matéria seca elevou-se (dependendo do volumoso) de 6-33,6% na presença de enzima. Esses resultados foram considerados muito bons, pois na literatura há estudos semelhantes (MARTINS, 2003) em que esse aumento foi de no máximo 4,0% (QUEIROZ *et al.*,

2004). Há também trabalhos cujos resultados para este tipo de teste *in vitro* foram semelhantes ou até mais promissores (COLLOMBATTO *et al.*, 2003a). Entretanto, a enzima exógena utilizada foi um produto comercial, cujo custo é geralmente elevado em comparação ao nosso produto, genuinamente nacional, e que pode ser obtido a partir do cultivo de *A. niveus* em resíduos agroindustriais.

Além do aumento da digestibilidade *in vitro* (o que já se verificou), para que se utilize uma enzima no setor de rações, esta também deverá resistir às condições adversas do rúmen. Para investigar sua estabilidade enzimática às condições ruminais, caprinos foram tratados com a xilanase de *A. niveus* e alimentadas com silagem de milho. Neste estudo, verificou-se que a enzima estava presente no rúmen mesmo após 7 horas de sua administração. Assim, podemos afirmar que o extrato bruto, contendo as xilanases produzidas por *A. niveus*, foi estável às condições ruminais e, provavelmente, se rotineiramente adicionado à alimentação, ocasionará um aumento na digestibilidade da fração fibrosa dos alimentos, e conseqüentemente no desempenho desses animais em relação ao ganho de peso, produção de leite, conforme observado por QUEIROZ *et al.* (2004).

Outro teste de digestibilidade *in vitro* foi realizado verificando a digestibilidade das fibras em detergente neutro, detergente ácido, lignina, hemicelulose e celulose. Além dos dados de digestibilidade analisou-se também a quantidade de gás produzido durante o processo de digestão.

Nos ensaios de digestibilidade verificou-se que o tratamento 2 (que correspondeu ao fornecimento da enzima no início do processo de digestão) foi a melhor condição para todos os volumosos testados (exceto para silagem de milho). Este tipo de tratamento corresponderia ao fornecimento da enzima para o gado no



momento da alimentação. Já para silagem de milho, o tratamento 3 (que correspondeu ao tratamento dos volumosos com enzima 3 horas antes do início do processo de digestão) foi o mais adequado, provavelmente porque durante este tratamento foram degradadas enzimaticamente, porções fibrosas que impediriam um melhor aproveitamento do alimento.

A adição de enzimas exógenas a alimentação de ruminantes, além de degradar o polímero de xilana e fornecer açúcares menores à flora ruminal, provocando aumento na proliferação desses microrganismos e conseqüente aumento na digestibilidade (Hatfield, 1989), também atua degradando a porção fibrosa do alimento que impede o aproveitamento de sua porção potencialmente digerível. Assim, possivelmente a adição do extrato bruto de *Aspergillus niveus* contendo principalmente xilanase (mas também traços de enzimas ligninolíticas e pectinolíticas) promoveu uma eficiente degradação da porção fibrosa dos volumosos testados levando a um maior aproveitamento dos nutrientes.

Na silagem de milho, a necessidade de um tratamento prévio com o extrato enzimático 3 horas antes do processo de digestão pode ser entendido ao se observar que, entre os volumosos testados, possui o segundo maior teor de lignina em sua composição, ou seja, 4,5% MS e 8,0 % em relação ao FDN (**tabela 15**). Assim, este tratamento realizado 3 horas antes da digestão provavelmente provocou a degradação da porção fibrosa e expôs a porção nutritiva deste volumoso.

É importante frisar que, quanto maior a quantidade de lignina presente em um alimento, menor será o aproveitamento dos seus nutrientes, entretanto não é apenas a quantidade de lignina que influencia na digestibilidade de um alimento, mas também seu arranjo (JUNG, 1989). Assim, nota-se que dentre os volumosos

testados, feno jaraguá, embora apresentasse o maior teor de lignina (8,4% - **tabela 15**), não precisou ser previamente tratado com o extrato enzimático como silagem de milho, provavelmente devido ao arranjo das fibras. Neste contexto, deve-se ter em mente que em função das características anatômicas dos caules das plantas de milho e de cana-de-açúcar, é de se esperar que as mesmas apresentam fibras com maior resistência a degradação comparada as dos capins braquiária e feno de Jaraguá. Da análise dos dados da Tabela 15 se depreende que a FDN da silagem do milho e da cana-de-açúcar apresentam respectivamente, 8,0 e 9,6% de lignina.

Observando-se os resultados sobre a produção de gases nota-se que este aumentou no decorrer do tempo em todos os volumosos e em todos os tratamentos, entretanto foi no tratamento 2 que essa quantidade de gases foi mais elevada (para todos os volumosos, inclusive silagem de milho), provavelmente em virtude de um maior aproveitamento do alimento e maior liberação de propionato e butirato (EUN & BEAUCHEMIN, 2007).

Os resultados obtidos com xilanases de *A. niveus* foram bastante promissores também no setor de rações. Por isso, estes resultados merecem grande atenção e aprofundamento para que esta enzima seja, de fato, aplicada em larga escala no setor de ração animal. Para viabilizar sua aplicação, foram realizados testes de citotoxicidade com o extrato bruto de *A. niveus* e nenhum efeito foi detectado. Isso favoreceu ainda mais a possibilidade de aplicação dessas xilanases em rações.

Durante esses estudos sobre efeito citotóxico, testou-se também o extrato bruto de *A. fumigatus* e, nas condições de cultivo utilizadas neste estudo, também não se detectou nenhum efeito deletério, embora *A. fumigatus* seja comumente conhecido como causador de importantes aspergiloses (TAUBITZ *et al.*, 2007). Logo,

também poderá, em estudos futuros, ser testado como aditivo em rações para ruminantes assim como o extrato enzimático de *A. niveus*.

Estudos semelhantes sobre a utilização de enzimas exógenas, como aditivo em rações de ruminantes para melhorar a digestibilidade do alimento, também vem sendo realizados com enzimas proteolíticas (EUN & BEAUCHEMIN; 2005) ou com *mix* enzimáticos (YU *et al.*, 2005).

Os promissores resultados obtidos, principalmente com xilanase de *Aspergillus niveus*, justificam a realização de estudos mais aprofundados sobre a purificação e caracterização das xilanases deste microrganismo.

Para os propósitos de purificação, utilizou-se um sistema de pré-cultivo onde a quantidade de xilanase sintetizada e secretada foi cerca de 3,6 vezes maior. Para os estudos de purificação, a fonte de carbono utilizada foi xilana oat spelt, pois, em sistema de pré-cultivo, esta induziu mais eficientemente a síntese de xilanases, sendo que a máxima indução e secreção ocorreu após 72 horas de crescimento, em meio SR com glicose 1%, seguido de transferência para o meio de indução Czapeck, suplementado com xilana oat spelt como fonte de carbono, durante 96 horas. Tanto a incubação em meio de crescimento, como de indução, foram realizadas em condições estáticas e a 40°C. Um sistema semelhante de cultivo foi utilizado para outros *Aspergillus* como *A. phoenicis* (RIZZATTI *et al.*, 2004).

A purificação de duas das isoformas de xilanase produzidas por *A. niveus* foi realizada por meio de tratamento com caulin, colunas cromatográficas de troca iônica e de exclusão de massa molecular. Novamente, tratamentos semelhantes também foram reportados para a purificação de xilanases de *A. phoenicis* (RIZZATTI, 2004).

Durante a purificação, verificou-se que o caulim foi bastante eficiente. Além de apresentar uma porcentagem de recuperação elevada, adsorveu proteínas presentes no extrato bruto. Com o caulim houve também uma retirada de compostos provavelmente inibidores das xilanases, já que o *pool* enzimático recuperado estava com a atividade mais elevada. Este aumento da atividade enzimática, após tratamento com caulim, foi também observado no estudo de purificação de enzimas amilolíticas produzidas por *Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis* (PEIXOTO, 2004).

O caulim é um material formado por grupos de silicatos hidratados de alumínio, principalmente caulinita ( $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e haloisita. Esses minerais são os principais responsáveis pela adsorção inespecífica do caulim a certas proteínas (MELCHIADES *et al.*, 2002).

Analisando-se os perfis cromatográficos, vê-se que *A. niveus* possui, pelo menos, seis isoformas xilanolíticas e, muitas vezes, essas isoformas apresentam distintas propriedades bioquímicas (COUGLAN *et al.*, 1993). A produção de um sistema enzimático pelo microrganismo, sendo cada enzima com função especializada, é uma estratégia usada para se obter uma hidrólise superior da xilana (WONG *et al.*, 1988), além de garantir uma vantagem adaptativa do organismo nas condições ambientais, uma vez que na natureza existe grande variedade na composição estrutural da xilana (COUGLAN *et al.*, 1993; RIZZATTI *et al.*, 2004). A multiplicidade das xilanases pode ser atribuída por diversos fatores, entre eles: processamento diferencial do RNAm, proteólise parcial e diferenças nos graus de amidação e glicosilação (FERREIRA-FLHO, 1994; KULKARNI, 1999). Em alguns fungos, a presença de xilanases múltiplas podem ser aloenzimas, ou produtos de

diferentes alelos no mesmo gene. Há evidências sugerindo que, pelo menos algumas xilanases múltiplas de um organismo são produtos de genes distintos, com propriedades distintas (WONG *et al.*, 1988).

A produção de xilanases múltiplas foi relatada em diversos microrganismos (BEG *et al.*, 2001; RIZZATTI, 2004). Dentre eles, algumas espécies de *Aspergillus* são produtoras de 2 a 3 formas de xilanase como, por exemplo, *A. aculeatus* (FUJIMOTO *et al.*, 1995), *A. awamori* (KORMELINK *et al.*, 1993), *A. kawachii* (ITO *et al.*, 1992), *A. nidulans* (FERNANDEZ-SPINAR, 1994), *A. sojae* (KIMURA *et al.*, 1995), *A. versicolor* (CARMONA *et al.*, 2005), *A. fumigatus* (LENARTOVICZ *et al.*, 2002), *A. giganteus* (FIALHO & CARMONA, 2004) e *A. phoenicis* (RIZZATTI, 2004). Neste estudo, o fungo *A. niveus* também produziu uma multiplicidade de isoformas de xilanases (pelo menos 6).

Complexos enzimáticos multifuncionais encontrados na superfície de diversos microrganismos são chamados de xilanossomos (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997; BEG *et al.*, 2001). Um xilanossomo de 669 kDa foi reportado em *Butyvirbio fibrisolvens* H17c, consistindo em um agregado de subunidades protéicas das quais 11 eram xilanases com massa molecular variando de 45-180 kDa (LIN & THOMPSON, 1991).

Das seis possíveis isoformas de *A. niveus*, duas foram purificadas até a observação de homogeneidade eletroforética em PAGE e SDS-PAGE com fatores de purificação iguais a 4407,0 e 612,1 vezes para CMC 2 e biogel 2, respectivamente. As massas moleculares foram determinadas por SDS-PAGE e FPLC e os valores obtidos são condizentes aos dados da literatura para outros *Aspergillus* como *A. phoenicis* (RIZZATTI, 2004) e *A. caespitosus* (SANDRIM *et al.*, 2005). Entretanto, os valores de

massa molecular da xilanase CMC 2 da *A. niveus* calculados em SDS-PAGE e por FPLC não foram condizentes um ao outro porque, provavelmente, o teor de carboidratos e o local de glicosilação dessa proteína provocaram uma migração anômala em SDS-PAGE, resultando em uma massa molecular maior do que realmente é (HANES & RICKWOOD, 1981; SIMPSON, 2003).

Uma incoerência entre as massas moleculares, calculadas em SDS-PAGE e filtração, também foi observada para uma das isoformas de xilanase (xyl II) estudada por SANDRIM *et al.* (2005). Neste caso, o que provavelmente ocorreu foi uma interação inespecífica entre a resina e a proteína retardando sua saída durante a filtração. Essa interação aconteceu, provavelmente, devido ao alto teor de carboidratos presentes nesta molécula (41%) (SANDRIM *et al.*, 2005). Já para a xilanase CMC 2 de *A. niveus* o artefato foi observado em SDS-PAGE e, provavelmente, também resultou da presença de carboidratos (33,8%) que interferiram na migração da molécula no gel. Já para a xilanase biogel 2 o menor teor de carboidratos (11,56%) não interferiu nos cálculos de massa molecular por nenhuma metodologia. Segundo os resultados obtidos por FPLC e SDS-PAGE para a isoforma biogel 2, é possível classificá-la como uma xilanase de baixa massa molecular segundo WONG *et al.* (1988). Entretanto, para colocá-la entre as diferentes famílias descritas por COLLINS *et al.* (2005) outras características teriam que ser consideradas.

Quanto aos parâmetros relativos à temperatura e pH de reação, bem como as estabilidades a altas temperaturas e ao pH, sofreram pouca alteração após a purificação dessas proteínas. No caso da termoestabilidade, verificou-se que compostos como trealose, sorbitol e glicerol podem atuar como agentes protetores

das xilanases puras aumentando, portanto, sua termoestabilidade. O aumento da termoestabilidade de xilanases, devido ao efeito desses compostos, também foi verificado por GEORGE *et al.* (2001).

As enzimas purificadas apresentaram padrões de atividade diferentes na presença de diversos compostos. A atividade da xilanase CMC 2 teve sua atividade aumentada na presença de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $\beta$ -mercaptoetanol e cisteína, enquanto que a isoforma biogel 2 não sofreu influência de nenhum dos compostos testados. Há na literatura outras xilanases que, assim como a biogel 2 de *A. niveus* sofrem inibição por diversos compostos. SPARE *et al.* (2005) verificaram que a xilanase de *Syncephalastrum racemosum* sofreu forte inibição na presença de íons metálicos bivalentes e não requereu nenhum cofator. Já para a isoforma CMC 2, houve aumento na presença do íon bivalente  $Mn^{2+}$  que, provavelmente, atuou como um cofator. Acredita-se que o menor teor de carboidratos presentes na xilanase biogel 2 tenha sido um dos fatores responsáveis pela maior perda de atividade frente a todos os compostos testados, já na CMC 2 os carboidratos presentes na molécula podem ter impedido a combinação dos compostos testados com o sítio ativo ou outras estruturas da enzima essenciais à sua atividade.

A adição de  $\beta$ -mercaptoetanol também resultou na estimulação da xilanase CMC 2, indicativo de uma provável relação entre a forma reduzida dos resíduos de cisteína e o aumento da atividade da enzima. Resultados semelhantes também foram observados para outras xilanases purificadas a partir de *Bacillus* sp (BATAILLON *et al.*, 2000) ou de *A. phoenicis* (SANDRIM *et al.*, 2005).

Já o aumento de atividade verificado na presença do aminoácido cisteína ocorreu, provavelmente, porque este composto tem caráter hidrofóbico e poderia

interagir com outros resíduos que apresentam a mesma característica presente na molécula CMC2. Inclusive, no pequeno fragmento sequenciado de CMC 2, observou-se a presença de aminoácidos hidrofóbicos (isoleucina e valina), os quais, provavelmente interagiram com a cisteína adicionada ao meio reacional, conferindo a CMC 2 uma conformação mais favorável ao encaixe com o substrato. Uma observação que indica a veracidade desta hipótese, é o fato de CMC 2 (mais rica em aminoácidos hidrofóbicos que biogel 2) ter tido sua atividade aumentada na presença de cisteína, enquanto a isoforma biogel 2 não sofreu ativação por este aminoácido. Analisando sua sequência, trata-se de uma molécula realmente menos hidrofóbica que CMC 2.

Estudos de dicroísmo circular confirmaram se tratar de duas xilanases e o perfil dessas análises indicam que a enzima CMC 2 apresentou uma estrutura rica em cadeias  $\beta$ -folha como deve ser uma xilanase (MATSUO *et al.*, 2005). Já o perfil das análises da xilanase biogel 2 indicou tratar-se de uma proteína mista, contendo estruturas em  $\beta$ -folha e  $\alpha$ -hélice. Xilanases, cuja estrutura secundária, é constituída por uma mistura de estruturas  $\beta$ -folha/ $\alpha$ -hélice já foram descritas na literatura e, segundo COLLINS *et al.* (2005) fazem parte das famílias 8 ou 127.

As análises de sequenciamento de aminoácidos mostraram haver identidade entre a sequência da xilanase biogel 2 e xilanases de outros organismos como *Bacillus subtilis*. Já a xilanase CMC 2 apresentou identidade apenas com proteínas hipotéticas.

Não resta dúvida que a xilanase CMC 2, assim como a isoforma biogel 2, constituem duas isoformas de xilanase devido a todas as características apresentadas neste estudo, além de terem hidrolisado apenas o substrato xilana (dados não



mostrados). Sua não identidade com outras xilanases pode indicar que CMC 2 constitui numa nova família de xilanases ou, ainda, que essas proteínas hipotéticas com as quais houve identidade, correspondem a xilanases.

## *VI. Conclusões*

- Para este estudo foram selecionados os fungos *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niveus*;
- Os meios de cultivo padronizados para a produção xilanolítica foram menos onerosos, uma vez que são mínimos e ainda se podem utilizar resíduos agroindustriais como fonte de carbono;
- As condições de temperatura e pH de reação, além das estabilidades química e térmica, favoreceram a aplicação prática dessas proteínas;
- Para as ligninases (lacase, Mn-P e Li-P), as condições de cultivo também foram consideradas pouco onerosas;
- As condições de temperatura e pH de reação, além das estabilidades química e térmica, também favoreceram a aplicação prática dessas proteínas;
- No biobranqueamento com a xilanase se *A. niveus* e de *A. fumigatus*, com as ligninases de *A. niveus* ou com o *mix* de xilanases/ligninases de *A. niveus* registraram-se significativa redução do número kappa, aumento da alvura e pouca ou nenhuma redução na viscosidade;
- Nos testes com rações, a enzima apresentou bom desempenho e estabilidade, tanto *in vitro* como *in vivo*, além de não possuir nenhum efeito citotóxico;
- *A. niveus* produziu múltiplas xilanases, das quais duas foram purificadas;
- Após purificação, ocorreu pouca ou nenhuma alteração na temperatura e pH de reação bem como nas estabilidades térmica e química das isoformas que ainda podem ser estabilizadas por trealose, sorbitol e glicerol;
- As isoformas realmente constituem em xilanases uma vez que ambas (CMC 2 e biogel 2) hidrolisaram a xilana formando xilooligossacarídeos,

apresentaram cadeias  $\beta$ -folha em sua estrutura e identidade com xilanases de outros microrganismos.

## *VII. Referências Bibliográficas*

- AACHARY, A.A. & PRAPULLA, S.G. **Corn-cob-induced endo-1,4-beta-D-xylanase of *Aspergillus oryzae* MTCC 5154: production and characterization of xylobiose from glucuronoxylan.** J Agric Food Chem, 56(11):3981-3988, 2008.
- AITKEN, M.D. & IRVINE R.L. **Characterization of reaction catalysed by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporum*.** Arch Biochem Biophys, 276:405-414, 1990.
- ALAM, M.Z.; MANSOR, M.F.; JALAL, K.C. **Optimization of decolorization of methylene blue by lignin peroxidase enzyme produced from sewage sludge with *Phanerochaete chrysosporium*.** J Hazard Mater, 162 (2-3):708-715, 2009.
- ANGAYARKNNI, J.; PALANISWAMY, M.; PRADEEP, B.V.; SWAMINATHAN, K. **Biochemical substitution of fungal xylanases for prebleaching of hardwood kraft pulp.** African J Biotechnol, 5(10):921-929, 2006.
- ANTHONY, T.; RAJ, K.C.; RAJENDRAM, A.; GUNASEKARAN, P. **Inhibition of proteases during fermentation improves xylanase production by alkali tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1.** J Bios Bioeng, 96(4):394-396, 2003.
- ARISTIDOU, A. & PENTILLÄ, M. **Metabolic engineering applications to renewable resource utilization.** Curr Opin Biotechnol, 11:187-198, 2000.

- ARO, N.; PAKUIA, T.; PENTTILÄ, M. **Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi**. FEMS Microbiol Rev, 29(4):719-739, 2005.
- AZEVEDO, J.L. **O Ciclo Parassexual em Fungos**. Rev Microbiol, 3:157-168, 1972.
- AZEVEDO, M.C.A. **Bioprospecção: coleta de material biológico com finalidade de explorar os recursos genéticos**. Segunda edição, Conselho Nacional da reserva da biosfera da Mata Atlântica, 2003.
- BANOUB, J.H.; BENJELLOUN-MLAYAH, B.; ZIARELLI, F.; JOLY, N.; DELMAS, M. **Elucidation of the complex molecular structure of wheat straw lignin polymer by atmospheric pressure photoionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry**. Rapid Commun Mass Spectrom, 21(17):2867-88, 2007.
- BATAILLON, M.; CARDINALLI, N.A.P.; CASTILLON, N.; DUCHIRON, F. **Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. Strain SPS-0**. Enzyme Microb Technol, 26:187-192, 2000.
- BEAUCHEMIN, K.A., COLOMBATTO, D., MORGAVI, D.P. **Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants**. J Anim Sci, 81:37, 2002.

- BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S. **Microbial xylanases and their industrial applications: a review.** Appl Microbiol Biotechnol, 56:326-338, 2001.
- BENNETT, J.W. **Mycotecnology: the role of fungi in biotecnology.** J Biotechnol, 66: 101–107, 1988.
- BETINI, J.H.A. **Estudos comparativos de xilanases produzidas por três espécies de *Aspergillus* visando a aplicação no biobranqueamento de polpa de celulose para fabricação de papel.** Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada) - FFCLRP-USP, p. 114, 2006.
- BETINI, J.H.A.; MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; JORGE, J.A.; TERENCEI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. **Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced by solid state fermentation and its application on cellulose pulp bleaching.** Submetido para: Bioprocess Biosyst Eng, 2008.
- BHAT, M.K. **Cellulases and related enzymes in biotechnology.** Biotechnol. Advances, 18:355-383, 2000.
- BHELLA, R.S.; ALTOSAAR, I. **Role of cAMP in the mediation of glucose catabolite repression of glucoamylase synthesis in *Aspergillus awamori*.** Curr Genet, 14:247–252, 1988.



BIELY, P. **Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases.**

In: COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. Hemicelluloses and hemicellulases. London, Portland Press, p. 29-52, 1993.

BIELY, P. **Microbial xylanolytic systems.** Trends Biotechnol, 3:286-290, 1985.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. **Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.** Electrophoresis, 8:93-99, 1987.

BONONI, V.L. **Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulósicos.** In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. ed. Microbiologia Ambiental, Embrapa, 243-268, 1997.

BOUDET, A.M.; KAJITA, S.; GRIMA-PETTENATI, J.; GOFFNER, D. **Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses.** Trends Plant Sci, 8(12):576-81, 2003.

BOURNE, Y.; HENRISSAT, B. **Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules.** Curr Opin Struct Biol, 11:593-600, 2001.

BRASIL. **Ministério de Minas e Energia.** Balanço energético nacional - **BEN.** Brasília: MME, 1982.

- BUCHERT, J.; RANUA, M.; KANTELINEM, A.; VIIKARI, L. The role of two *Trichoderma reesei* xylanases in the bleaching of kraft pulp. *Appl Microbiol Biotechnol*, 37:825-829, 1992.
- BUSWELL, J.K.; CAI, Y.J.; CHANG, S.T. **Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *lentinula (Lentinus) edodes***. *FEMS Microbiol Lett*, 128:81-88, 1995.
- CARMONA, E.C.; FIALHO, M.B.; BUCHGNANI, E.B.; COELHO, G.D.; BROCHETO-BRAGA, M.R.; JORGE, J.A. **Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor***. *Process Biochem*, 40:359-364, 2005.
- CARVALHO, C.C. **Produção de ligninases por basidiomicetos através de fermentação em estado sólido e aplicação das enzimas**. Mestrado em Ciências (Área de concentração Microbiologia Aplicada) – Unesp Campus de Rio Claro, pp. 111, 2004.
- CASSELTON, L. & ZOLAN, M. **The art and design of genetic screens: filamentous fungi**. *Nature Rev Genet*, 3(9):683-697, 2002.
- CAUFRIER, F.; MERTINO, A.; DUPONT, C.; BOURIOTIS, V. **Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity**. *Carbohydr Res*, 338(7):687-692, 2003.

- CHAGAS, E. P. & DURRANT, L. R. **Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju***. *Enz Microb Technol*, 29: 473-477, 2001.
- CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. **The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium***. *J Biotechnol*, 123:413-433, 2006.
- CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R.R.; CHEN, C. **Ensiling agricultural residues for bioethanol production**. *Appl Biochem Biotechnol*, 143(1): 80-92, 2007.
- CHUNG, H.J.; PARK, S.M.; KIM, H.R.; YANG, M.S.; KIM, D.H. **Cloning the gene encoding acetyl xylan esterase from *Aspergillus focuum* and its expression in *Pichia pastoris***. *Enz Microbial Technol*, 31(4):384-391, 2002.
- CLAEYSSSENS, M. & HENRISSAT, B. **Specificity mapping of cellulolytic enzymes: classification into families of structurally related proteins confirmed by biochemical analysis**. *Protein Sci*, 1:1293–1297, 1992.
- CLOETE, T.E. & CELLIERS, L. **Removal of Arocolor 1254 by the white rot fungus *Coriolus versicolor* in the presence of different concentrations Mn (IV) oxide**. *Int Biodeter Biodegradation*, 44:243-253.

- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. **Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases.** FEMS Microbiol Rev, 29:3-23, 2005.
- COLOMBATTO, D., MORGAVI, D.P.; FURTADO, A.F.; BEAUCHEMIN, K.A. **Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation.** J Anim Sci, 81:2628-2638, 2003a.
- COLOMBATTO, D., MOULD, F. L.; BHAT, M. K.; MORGAVI, D.P.; BEAUCHEMIN, K.A.; OWEN, E. **Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose and xylan by mixed ruminal microorganisms *in vitro*.** J Anim Sci, 81:1040-1050, 2003b.
- COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P.  **$\beta$ -1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology and applications.** Biotechnol Appl Biochem, 17:259-289, 1993.
- COUGLAN, M.P.; TUOHY, M.G.; FERREIRA-FILHO, E.X.; PULS, J.; CLAEYSSSENS, M.; VRSANSKÁ, M.; HUGHES, M.M. **Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems.** In: Hemicelulase and hemicellulases. COUGLAN, M.P. & HAZLEWOOD, G.P., USA, 1993.
- CRANE, R.K. & SOLS, A. **The association of hexokinase with particulate fractions of brain and other tissue homogenates.** J Biol Chem, 203: 273–292, 1953.

- CRANE, R.K. & SOLS, A. **The association of hexokinase with particulate fractions of brain and other tissue homogenates.** J Biol Chem, 203:273–292, 1953.
- CRAWFORD, D.L. & POMETTO, A.L. **Lignin-depolymerization activity of *Streptomyces*.** Methods Enzymol, 161: 238-249, 1988.
- CREPIN, V.F.; FAULDS, C.B.; CONNERTON, I.F. **Functional classification of the microbial feruloyl esterases.** Appl Microbiol Biotechnol, 63(6):647-652, 2004.
- CSISZÁR, E.; LOSONCZI, A.; KOCZAKA, B.; SZAKÁCS, G.; POMLÉNYI, A. **Degradation of lignin-containing materials by xylanase in biopreparation of cotton.** Biotechnol Lett, 28(10):749-53, 2006.
- DAMASCO, M.C.T.; ANDRADE, C.M.M.; PEREIRA JR, N. **Use of corn cob for endoxylanase production by *Thermomyces lanuginosus* IOC – 4145.** Appl Biochem Biotechnol, 84-86:821-834, 2000.
- DAVIS, B.J. **Disc electroforesis II. Methods and application to human serum proteins.** Ann N Y Sci, 121: 404–427, 1964.

- DE BOER, H.A.; ZHANG, Y.Z.; COLLINS, C.; REDDY, C.A. **Analysis of nucleotide sequences of two ligninase cDNAs from a white-rot filamentous fungus, *Phanerochaete chrysosporium*.** *Gene*, 60(1):93-102, 1987.
- DE GRAAFF, L.H.; BROECK, H.C. van den; OOIJEN, A.J.J. **Regulation of the xylanase-encoding xlnA gene of *Aspergillus tubigensis*.** *Mol Microbiol*, 12:479-490, 1994.
- DE VRIES, R.P.; KESTER, H.C.; POULSEN, C.H.; BENEN, J.A.; VISSER, J. **Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides.** *Carbohydr. Res.*, 327(4):401-410, 2000.
- DONINI, L.P.; BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J.S. **Colonização do substrato capim-elefante suplementado com farelos por *Pleurotus ostreatus*.** *Rev Biol Cienc Terra*, 6(2):185-193, 2006.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K. REBERS, P.A.; SMITH, F. **Colorimetric method for determination of sugars and related substances.** *Anal Chem*, 28:350-356, 1956.
- EMERSON, R. **An experimental study of the life cycles and taxonomy of *Allomyces*.** *Lloydia*, 4: 77-144, 1941.

- EUN, J.S. & BEAUCHEMIN, K.A. Effects of a proteolytic feed enzyme on intake, digestion, ruminal fermentation and milk production. **J Dairy Sci, 88(6):2140-2153, 2005.**
- EUN, J.S. & BEAUCHEMIN, K.A. Enhancing in vitro degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. **J Dairy Sci, 90(6):2839-2851, 2007.**
- FAISON, B.D. & KIRK, T.K. **Factors Involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*.** Appl Environ Microbiol, 49(2):299-304, 1985.
- FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; PEÑA, J.L.; PIÑAGA, F.; VALLÉS, S.  **$\alpha$ -L-arabinofuranosidase production by *Aspergillus nidulans*.** FEMS Microbiol Lett, 115(1):107-112.
- FERNANDEZ-SPINAR, M.; PIÑAGA, F.; DE GRAFF, L.; VISSER, J.; RAMÓN, D.; VALLÉS, S. **Purification, characterization and regulation of the synthesis of *Aspergillus nidulans* acidic xylanase.** Appl Microbiol Biotechnol, 42:55-562, 1994.
- FERREIRA-FILHO, E.X. **The xylan-degrading enzyme system.** Braz. J Med Biol Res, 27:1093-1109, 1994.
- FIALHO, M.B. & CARMONA, E.C. **Purification and characterization of xylanases from *Aspergillus giganteus*.** Folia Microbiol, 49:13-18, 2004.

- FONTANA, J.D.; GEBARA, M.; BLUEL, M.; SCHNEIDER, H.; MACKENZIE, C.R.; JOHSON, K.G.  **$\alpha$ -4-O-methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes.** Methods Enzymol, 160: 560–571, 1988.
- FUJIMOTO, H.; OOI, T.; WANG, S.L.; TAKIZAWA, T.; HIDAKA, H.; MURAO, S.; ARAI, M. **Purification and properties of three xylanases from *Aspergillus aculeatus*.** Biosci Biotech Biochem, 59:538-540, 1995.
- GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y. **Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover.** Bioresour Technol, 99(16):7623-9, 2008.
- GEBLER, J.; GILKES, N.R.; CLAEYSSSENS, M.; WILSON, D.B.; BEGUIN, P.; WAKARCHUK, W.W.; KILBURN, D.G.; MILLER JR, R.C.; WARREN, R.A.; WITHERS, S.G. **Stereoselective hydrolysis catalyzed by related beta-1,4-glucanases and beta-1,4-xylanases.** J. Biol. Chem., 267:12559–12561, 1992.
- GEORGE, S.P.; AHMAD, A.; RAO, M.B. **A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp.: influence of additives on thermostability.** Bioresour Technol, 78(3):221-224, 2001.



- GHOSH, M. & NANDA, G. **Physiological studies on xylose induction and Glucose repression of xylanolytic enzymes in *Aspergillus sydowii* MG49**. FEBS Microbiol Lett, 117:151–156, 1994.
- GOMPERTZ, O.F.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CORRÊA, B. **Biologia dos Fungos**.  
In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM F.; GOMPERTZ, O. F. & CANDEIAS, J. A. N. Microbiologia, 3ª edição, pp.365-397, 1999.
- GRAY K.A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. **Bioethanol**. Curr Opin Chem Biol, 10:141-146, 2006.
- GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO, J.C.; RENCORET, J. IBARRA, D.; MARTÍNEZ, A.T. **Main lipophilic extractives in different paper pulp types can be removed using the laccase-mediator system**. Appl Microbiol Biotechnol, 72(4):845-51, 2006.
- HANES, B.D. & RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. Oxford, 1ª edição, 1981.
- HATIFIELD, R.D. **Structural polysaccharides in forages and their degradability**. Agron J, 81:39-46, 1989.
- HENRISSAT, B.; CLAEYSSENS, P.; TOMME, L.; LEMESLE, L.; MORNON, J.P. **Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis**. Gene, 81:83-95, 1989.

- HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.M. **Classification of glycoside hydrolases and glycosyltransferases from hyperthermophiles.** *Methods Enzymol*, 330:183-201, 2001.
- HRMOVÁ, M.; BIELY, P.; VRSANKÁ, M. **Celulose and xylan – degrading enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger*.** *Enzyme Microb Technol*, 11:610-616, 1989.
- HRMOVÁ, M.; PETRAKOVÁ, E.; BIELY, P. **Induction of cellulose and xylan-degrading enzyme system in *Aspergillus terreus* by homo and heterodisaccharides composed of glucose and xylose.** *J Gen Microbiol*, 137:541–547, 1991.
- ITO, K.; IWASHITA, K.; IWANO, K. **Cloning and sequencing of xyn C gene encoding acid xylanase of *Aspergillus kawachii*.** *Biosc Biotechnol Biochem*, 56:1338-1340, 1992.
- JEFFRIES, T.W.; CHOI, S.; KIRK, T.K. **Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*.** *Appl Environ Microbiol*, 42(2):290-296, 1981.
- JUNG, H.G. **Forage lignins and their effects on fiber digestibility.** *Agron J*, 81:33-38, 1989.

- JURKOVICH, V.; KUTSAI, J.; FÉBEL, H.; REICZIGEL, J.; BRYDL, E.; KÖNYVES, L.; RAFAI, P. **Rumen fermentation response to a direct-fed xylanase enzyme preparation from *Thermomyces lanuginosus* in sheep.** Acta Vet Hung, 54(3):333-42, 2006.
- KADOWAKI, M.K.; SOUZA, C.G.M.; SIMÃO, R.C.G.; PERALTA, R.M. **Xylanase production by *Aspergillus tamari*.** Appl Biochem Biotechnol, 66:97-106, 1997.
- KAMBOUROVA, M.; MANDEVA, R.; FIUME, I.; MAURIELLI, L.; ROSSI, M.; MORANA, A. **Hydrolysis of xylan at high temperature by co-action of the xylanase from *Anoxybacillus flavithermus* BC and the beta-xylosidase/alpha-arabinosidase from *Sulfolobus solfataricus* Oalpha.** J Appl Microbiol, 102(6):1586-93, 2007.
- KAPOOR, M. KAPOOR, R.K.; KUHAD, R.C. **Differential and synergistic effects of xylanase and laccase mediator system (LMS) in bleaching of soda and waste pulps.** J Appl Microbiol Biotechnol, 103:305-317, 2007.
- KATAGIRI, N.; TSUTSUMI, Y.; NISHIDA, T. **Correlation of brightening with cumulative enzyme activity related to lignin biodegradation during biobleaching of kraft pulp by white rot fungi in the solid-state fermentation system.** Appl Environ Microbiol, 61(2):617-22, 1995.

- KERSTERS-HILDERSON, H.; CLAEYSSSENS, M.; DOORSLAER, E.V.; SAMAN, E.; BRUYNE, C.K.  **$\beta$ -D-xylosidase from *Bacillus pumilus***. *Methods Enzymol.*, 83: 631-639, 1982.
- KHANDEPARKAR, R.; BHOSLE, N.B. **Application of thermoalkalophilic xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC5214 in biobleaching of kraft pulp**. *Biores Technol*, 98(4):897-903, 2007.
- KHANNA, P.; SUNDARI, S.S.; KUMAR, N.J. **Production, isolation and partial purification of xylanases from an *Aspergillus* sp.** *World J Microbiol Biotechnol*, 11:242-243, 1995.
- KIMURA, T.; ITO, J.; KAWANO, A.; MAKINO, T.; KONDO, H.; KARITA, S.; SAKKA, K.; OHMIYA, K. **Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae***. *J Ferm Bioeng* 80(4):334-339, 1995.
- KISS, T. & KISS, L. **Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -D-xylosidase from *Aspergillus carbonarius***. *W J Microbiol Biotechnol*, 16:465-470, 2000.
- KORMELINK, F. J.M.; LEEUWEN, M.G.F.S.L.; WOOD, T.M.; VORAGEN, A.G.J. **Purification and characterization of three endo(1,4)- $\beta$ -D-xylanases and one  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus awamori***. *J Biotechnol*, 27:249-253, 1993.

- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; MALA, R. **Molecular and biotechnological aspects of xylanases.** FEMS Microbiol Rev, 23:411-456, 1999.
- KUNG JR., L., COHEN, M.A., RODE, L.M., TREACHER, R.J. **The effect of fibrolytic enzymes sprayed onto forages and fed in a total mixed ratio to lactating dairy cows.** J Dairy Sci, 85:2396-2402, 2002.
- KUNZ, A.; ZAMORA-PERALTA, P.; MORAES, G.A.S.; DURÁN, N. **Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis.** Quim Nova, 25(1): 78-82, 2002.
- KURAKABE, M.; SHINJII, O.; KOMAKI, T. **Transxylosilation of  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus awamori* K4.** Biosci Biotechnol Biochem, 6112:2010-2014, 1997.
- LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, 227: 680-685, (1970).
- LENARTOVICZ, V.; SOUZA, C.G.M.; MOREIRA, F.G.; PERALTA, R.M. **Temperature effect in the production of multiple xylanases by *Aspergillus fumigatus*.** J Basic Microbiol, 42:388-395, 2002.
- LEONE, F.A.; BARANAUSKAS, J.A.; FURRIEL, R.P.M.; BORIN, I.A. **SigrafW: An easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data.** Biochem Mol Biol Educ, 33(6):399-403, 2005.

- LEVIT, M.N. & SHKROB, A.M. **Lignin and ligninase**. Bioorg Khim, 18(3):309-45, 1992.
- LI, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J.S.; ERIKSSON KARL-ERIK, L. **Relationships between activities of xylanases and xylan structures**. Enz Microb Technol, 27:89-94, 2000.
- LI, X.T.; JIANG, Z.Q.; LI, L.T.; YANG, S.Q.; FENG, W.Y.; FAN, J.Y.; KUSAKABE, I. **Characterization of cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp**. Biores Technol 96:1370-1379, 2005.
- LIAVOGA, A.B.; BIAN, Y.; SEIB, P.A. **Release of D-xyllose from wheat straw by acid and xylanase hydrolysis and purification of xylitol**. J Agric Food Chem, 55 (19):7758–7766, 2007.
- LIN, J.; NDLOVU, L.M.; SINGH, S.; BALAKRISHNA, P. **Purification and biochemical characteristics of  $\beta$ -D-xylanase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus* – SSBP**. Biotechnol Appl Biochem, 30:73-79, 1999.
- LIN, L.L. & THOMPSON, J.A. **An analysis of the extracellular xylanases and cellulases of *Butryovibrio fibrisolvens* H17c**. FEMS Microbiology Letters 84:197-203, 1991.

- LIU, M.Q.; WENG, X.Y.; SUN, J.Y. **Expression of recombinant *Aspergillus niger* xylanase A in *Pichia pastoris* and its action on xylan.** Protein Expr Purif, 48(2):292-299, 2006.
- LOURES, D.R.S. **Enzimas fibrolíticas e emurchecimento no controle de perdas da ensilagem na digestão de nutrientes em bovinos alimentados com rações contendo silagem de capim tanzânia.** Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", - USP, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, área de concentração: Ciência Animal e Pastagens. pp. 146, 2004.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** J Biol Chem, 193:265-275, 1951.
- LU, W.; LI, D.; WU, Y. **Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale solid-state fermentation by *Aspergillus sulphureus*.** Enzyme Microb Technol, 32:305-311, 2003.
- MAKKAR, R.S.; TSUNEDA, A.; TOKUYASU, K.; MORI, Y. ***Lentinula edodes* produces a multicomponent protein complex containing manganese (II)-dependent peroxidase, laccase and beta-glucosidase.** FEMS Microbiol Lett, 200(2):175-179, 2001.

- MANTYLA, A.; PALOHEIRO, M.; HAKOLA, S.; LINDEBERG, E.; LESKINEN, S.; KALLIO, J.; VEHMAANPERA, J.; LANTTO, R.; SUOMIEN, P. **Production in *Trichoderma reesei* of three xylanases from *Chaetomium thermophilum*: a recombinant thermoxylanase for biobleaching of kraft pulp.** Appl Microbiol Biotechnol, 76(2):377-86, 2007.
- MARIANO A.P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel.** Tese de Doutorado elaborada junto ao Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente, para obtenção do Título de Doutor em Geociências e Meio Ambiente. pp. 162, 2006.
- MARTINS, A.S. **Enzimas fibrolíticas exógenas.** Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – Unesp, para obtenção do título de Doutor em Zootecnia, área de concentração: Produção Animal. pp. 125, 2003.
- MATSUO, K.; YONEHARA, R.; GEKKO, K. **Improved estimation of the secondary structures of proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy.** J Biochem, 138:79–88, 2005.
- MEDEIROS, R.G.; SILVA Jr., F.G.S.; BÃO, S.N.; HANADA, R.; FERREIRA-FILHO, X. **Application of xylanases from Amazon forest fungal species in bleaching of *Eucalyptus* kraft pulps.** Braz Arch Biol Technol, 2:231-238, 2007a.



- MEDEIROS, R.G.; SILVA, L.P.; AZEVEDO, B.R.; SILVA Jr., F.G.S.; FERREIRA-FILHO, X. **The use of atomic microscopy as a tool to study the effect of a xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in kraft pulp bleaching**. Enzyme Microb Technol, 40:723-731. 2007b.
- MELCHIADES, F.G.; MACHADO, R.; BOSCHI, O. **Caracterização de uma jazida de caulim de Campo Alegre (SC)**. Cerâmica Industrial, 7(6):30-33, 2002.
- MENKE, KH & STEINGASS, H. **Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid**. Anim Res Develop, 28: 7-55, 1988.
- MIELGO, I.; MOREIRA, M.T.; FEIJOO, G.; LEMA, J.M. **A packed-bed fungal bioreactor for the continuous decolourisation of azo-dyes (Orange II)**. J Biotechnol, 89:99-106, 2001.
- MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. Anal. Chem., 31:426-428, 1959.
- MONTI, R.; TERENCEZI, H.F.; JORGE, J.A. **Purification and properties of an extracellular xylanase from thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea***. Can J Microbiol, 37:675-681, 1991.

- MOROSOLI, R.; DURAND, S.; BOUCHER, F. **Stimulation of xylanases synthesis in *Cryptococcus albidus* by cyclic AMP.** FEMS Microbiol. Lett., 57:57-60, 1989.
- MOUSO, N.; DIORIO, L.A.; FORCHIASSIN, F. **Degradation of pine needles by *Stereum hirsutum*.** Rev Argent Microbiol, 35(4):219-23, 2003b.
- MOUSO, N.; DIORIO, L.A.; FORCHIASSIN, F. ***Stereum hirsutum* (Wild) Pers. action in dye degradation.** Rev Iberoam Micol, 31;24(4):294-8, 2007.
- MOUSO, N.; PAPINUTTY, L.; FORCHIASSIN, F. **Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de laccasa y manganeso peroxidasa por *Stereum hirsutum* (Willd) Pers.** Rev Iberoam Micol, 20:176-178, 2003a.
- OOIJKAAS, L.P.; BUITELAAR, R.M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. **Defined media and inert supports: their potential as solid state fermentation production systems.** Trends Biotechnol, 18:356-360, 2000.
- OSHIMA, H.; KIMURA, I.; IZUMORI, K. **Synthesis and structure analysis of novel disaccharides containing D-psicose produced by endo-1,4-beta-D-xylanase from *Aspergillus sojae*.** J Biosci Bioeng, 101(3):280-3, 2006.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUES, H.; DOMÍNGUES, J.M. **Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis.** *Biores. Technol.*, 65:191-201, 1998.

PEIXOTO, S.C. **Estudos comparativos entre as amilases produzidas em cultivo submerso e em substrato sólido pelo fungo termotolerante *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: Purificação e caracterização enzimática.** Dissertação apresentada à FFCLRP, para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Biologia comparada, pp, 137, 2004.

PEIXOTO, S.C.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F. ***Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases.** *Int Microbiol*, 6:269-273, 2003.

PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; MICHELIN, M.; BETINI, J.H.A.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. **Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp Biobleaching.** *J Ind Microbiol Biotechnol*, DOI 10.1007/s10295-008-0482-y, 2008a.

PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; SANDRIM, V.C.; GUIMARÃES, L.H.S.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. **Evidence of thermostable amylolytic activity from *Rhizopus microsporus* var.**

***rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source.** *Bioprocess Biosyst Eng*, 31:329–334, 2008b.

PERALTA, R.M.; TEREZI, H.F.; JORGE, J.A.  **$\beta$ -D-Glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme.** *Biochim Biophys Acta*, 1033:243-249, 1990.

PIÑAGA, F.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T.; VALLES, S.; RAMÓN, D. **Xylanase production in *Aspergillus nidulans*: induction and carbon catabolite repression.** *FEMS Microbiol Lett*, 115:319-324, 1994.

POLIZELI, M.L.T.M. **Estudo sobre enzimas hidrolíticas produzidas por fungos filamentosos: propriedades e aplicações biotecnológicas.** Tese de Livre-Docência apresentada ao Departamento de Biologia da FFCLRP/USP, pg 428, 2008a.

POLIZELI, M.L.T.M. **Properties and commercial applications of xylanases from fungi.** In: *Mycotechnology: current trends and future prospects*, RAI, M.K. (editor), I.K. International Publisher, New Delhi, chapter 4, 82-108, 2008b.

POLIZELI, M.L.T.M.; RIZZATTI, A.C.S.; MONTI, R.; TEREZI, H.F.; JORGE, J.A.; AMORIM, D.S. **Xylanases from fungi: properties and industrial applications - Review.** *Appl Microbiol Biotechnol*, 67:577-591, 2005.

PRADE, R.A. **Xylanases: From Biology to Biotechnology**. Biotech Gen Engin Rev, 13:101-131, 1995.

QUEIROZ, R.C.; BERGAMASCHINE, A.F.; BASTOS, J.F.P.; SANTOS, P.C.; LEMOS, G.C. **Uso de Produto à Base de Enzima na Dieta de Bovinos: Digestibilidade dos Nutrientes e Desempenho em Confinamento**. R Bras Zootec, 33(6): 1548-1556, 2004.

RAGHUKUMAR, C.; D'SOUZA-TICLO, D.; VERMA, A.K. **Treatment of colored effluents with lignin-degrading enzymes: an emerging role of marine-derived fungi**. Crit Rev Microbiol, 34(3-4):189-206, 2008.

REFFATTI, P.F.; AGUIAR, C.M.; BARRETO-RODRIGUES, M. **Estudo da bioconversão de resíduos agroindustriais lignocelulósicos por *Lentinula edodes*: produção e caracterização de proteína extracelular**. Rev Bras Tecnol Agroind, 1(1):1-8, 2007.

REISFIELD, R.A.; LEWIS, U.J.; WILLIAMS, D.E. **Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrilamide gels**. Nature, 195:281-283, 1962.

RIZZATTI, A.C.S. **Estudo das atividades xilanásicas e  $\beta$ -xilosidásica produzida pelo fungo termotolerante *Aspergillus phoenicis***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - FMRP-USP, p. 108, 2000.

- RIZZATTI, A.C.S. **Propriedades regulatórias e funcionais do sistema xilanolítico do fungo *Aspergillus phoenicis***. Doutorado em Biologia Comparada, pp148, 2004
- RIZZATTI, A.C.S.; FREITAS, F.Z.; BERTOLINI, M.C.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; TERENCEI, H.F.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. **Regulation of xylanase in *Aspergillus phoenicis*: a physiological and molecular approach**. J Ind Microbiol Biotechnol, 35:237–244, 2008.
- RIZZATTI, A.C.S.; JORGE, J.A.; TERENCEI, H.F.; RECHIA, C.G.V.; POLIZELI, M.L.T.M. **Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis***. J Ind Microbiol Biotechnol, 26:156-160, 2001.
- RODRÍGUEZ, E.; RUIZ-DUEÑAS, F.J.; KOOISTRA, R.; RAM, A.; MARTÍNEZ, A.T.; MARTÍNEZ, M.J. **Isolation of two laccase genes from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii* and heterologous expression of the *peB* encoded protein**. J Biotechnol, 134:9-19, 2008.
- RUIZ-DUEÑAS, F.J.; GUILLÉN, F.; CAMARERO, S.; PÉREZ-BOADA, M; MARTÍNEZ, M.J.; MARTÍNEZ, A.T. **Regulation of peroxidase transcript levels in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii***. Appl Environ Microbiol, 65(10):4458-63, 1999.

- SAID, S. & PIETRO, R. **Enzimas COMO AGENTES BIOTECNOLÓGICOS**. Primeira edição. Editora Legis Summa, 2004.
- SAID, S. & PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Primeira edição. Editora Eventos, 2002.
- SAKA, S. **Chemical composition and distribution**. In: Wood and Cellulosic Chemistry (David N, -S. Hon & Nobrio Shiraishi, Eds.). New York, Marcel Dekker, p.51-65, 2001.
- SALLES, B.C.; MEDEIROS, R.G.; BÁO, S.N.; SILVA Jr., F.G.S.; FERREIRA-FILHO, E.X. **Effect of cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on eucalyptus kraft pulp**. Process Biochem, 40:343-349, 2005.
- SANDRIM, V.C.; RIZZATTI, A.C.S.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A.; MILAGRES, A.M.F.; POLIZELI, M.L.T.M. **Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching**. Process Biochem, 40:1823-1828, 2005.
- SARDAR, M.; ROY, I.; GUPTA, M.N. **Simultaneous purification and immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on the reversibly soluble polymer Eugragit™ L-100**. Enzyme Microb Technol, 27:672-677, 2000.

- SAVITHA, S.; SADHASIVAM, S.; SWAMINATHAN, K. **Application of *Aspergillus fumigatus* xylanase for quality improvement of waste paper pulp.** Bull Environ Cotam Toxicol, 78:217-221, 2007.
- SENTHILKUMAR, S.R.; ASHOKKUMAR, B; CHANDRA, R.K.; GUNASEKARAN, P. **Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design.** Bioresour Technol, 96(12):1380-6, 2005.
- SHAPACK, G.E.; RUSSEL, I.; STEWART, G.G. **Thermophilic microbes in ethanol production.** Library Congr Card Number, 95-9597, CRC Press, Inc, 1987.
- SHARY, S.; KAPICH, A.N.; PANISKO, E.A.; MAGNUSON, J.K.; CULLEN, D.; HAMMEL, K.E. **Differential expression in *Phanerochaete chrysosporium* of membrane-associated proteins relevant to lignin degradation.** Appl Environ Microbiol, PMID: 18849459, 2008.
- SIMPSON, R.J. **Proteins and proteomics: a laboratoriy manual.** Cold Spring, 1ª edição, 2003.
- SIQUEIRA, J.L.D. & FILHO, L.L.S. **Branqueamento da polpa kraft de Eucalipto – o papel do peróxido de hidrogênio.** Site: [www.solavayindupa.com](http://www.solavayindupa.com) – Bruxelas, Bélgica. Acesso em: 28/10/2008.



Site **www.doctorfungi.com.br**. Acesso em 18/07/2007.

Site: **http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br**. Acesso em 18 de janeiro de 2008.

Site: **http://sinbiota.cria.org.br**. Acesso em 21/11/2004.

Site: **http://www.aracruz.com.br**. Acesso em: 28 de setembro de 2005.

Site: **http://www.in.gov.br**. Acesso em 15 de abril de 2008.

SITE: **http://www.ncbi.ncbi.nih.gov/BLAST**. Acesso em 15 de janeiro de 2008.

Site: **http://www.portaldoexportador.gov.br**. Acesso em janeiro de 2008.

Site: **www.solavayindupa.com**. Acesso em: 28/10/2008.

SOARES, G.M.; AMORIM, M.T.P.; COSTA-FERREIRA, M. **Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue-R**. J Biotechnol, 89:123-129, 2001.

SORENSEN, H.R.; PEDERSEN, S.; JORENSEN, C.T.; MEYER, A.S. **Enzymatic hydrolysis of wheat arabinoxylan by a recombinant "minimal" enzyme cocktail containing beta-xylosidase and novel endo-1,4-beta-xylanase and alpha-l-arabinofuranosidase activities**. Biotechnol Prog, 23(1):100-107, 2007.

- SPARE, M.P.; JHA, H.; PATIL, M.B. **Purification and characterization of thermostable-cellulase free xylanase from *Syncephalastrum racemosum* Cohn.** J Gen Appl Microbiol, 51:327-334, 2005.
- SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. **Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application.** Crit Rev Biotechnol, 22(1):33-64, 2002.
- SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. **Cellulase-free xilanases from *Bacillus* and other microorganisms.** FEMS Microbiol. Lett., 183:1-7, 2000.
- SUNNA, A. & ANTRANIKIAN, G. **Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria.** Crit Rev Biotechnol, 17(1):39-67, 1997.
- TAPPI Test Methods. **Technical association of the pulp and paper industry.** Atlanta, GA, TAPPI Press, 1996.
- TAUBITZ, A.; BAUER, B.; HEERSEMANN, J.; EBEL, F. **Role of respiration in the germination process of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*.** Curr Microbiol, 54(5):354-360, 2007.
- TECHAPUN, C.; POOSARAN, N.; WATANABE, M.; SASAKI, K. **Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulose-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in**

**pulp bleaching bioprocesses: a review.** Process Biochem., 38:1327-1340, 2003.

TENKANEN, M. & SIIKA-AHO, M. **An alpha-glucuronidase of *Schizophyllum commune* acting on polymeric xylan.** J. Biotechnol., 78(2):149-161, 2000.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; McALLAN, A. B.; FRANCE, J. **A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetic of ruminant feeds.** Animal Feed Sci Technol, Amsterdam, 48(2):185-197, 1994.

TIEN, M. & KIRK, K.T. **Lignin peroxidase of *Phanerochaetes chrysosporium*.** Methods Enzymol, 161 b:238-249, 1988.

TIEN, M. & TU, C.P. **Cloning and sequencing of a cDNA for a ligninase from *Phanerochaetes chrysosporium*.** Nature, 326(6112):520-523, 1987.

TIEN, M.; KERSTEN, P.J.; KIRK, T.K. **Selection and improvement of lignin-degrading microorganisms: potential strategy based on lignin model-amino acid adducts.** Appl Environ Microbiol, 53(2):242-245, 1987.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. **A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops.** J British Grassland Soc, 18(2):104-111, 1963.

- TIMELL, T.E. **Wood hemicelluloses.** In: Advances Carbohydrate Chemistry Part II, 20:409, 1965.
- TORRONEN, A.; ROUVINEN, J. **Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4-beta-xylanases.** J Biotechnol, 57:137–149, 1997.
- TRICARICO, J.M.; DAWSON, K.A. **Influence of supplemental endoglucanase or xylanase on volatile fatty acid production from ruminant feed by ruminal in vitro cultures.** Arch Anim Nutr, 59(5):325-34, 2005.
- VIIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. **Xylanases in bleaching: From an idea to the industry.** FEMS Microbiol. Rev., 13:335-350, 1994.
- VOGEL, H.F. **Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications.** Amer Naturalist, 98:435-446, 1964.
- WHITMIRE, D.; MITI, B. **Xylanase effects on pulp delignification.** Chem. Eng. Comm., 189(5):608-622, 2002.
- WILLIAMSON, G.; FAULDS, C.B.; KROON, P.A. **Specificity of ferulic acid (feruloyl) esterases.** Biochem Soc Trans, 26(2):205-209, 1998.
- WISEMAN, A. **Handbook of enzyme biotechnology.** Ellis Horwood Ltd John Wiley & Sons, p.148, 1975.

- WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SADDLER, J.N. **Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in Microorganisms: Functions and Applications.** Microbiol Rev, 52(3):305-317, 1988.
- XU, Y.X.; LI, Y.L.; XU, S.C.; LIU, Y.; WANG, X.; TANG, J.W. **Improvement of xylanase production by *Aspergillus niger* XY-1 using response surface methodology for optimizing the medium composition.** J Zhejiang Univ Sci B, 9(7):558-66, 2008.
- YATIN, B. & THAKORE, E. Site: <http://www.bccresearch.com>. Acesso em: Janeiro de 2008.
- YU, P.; MCKINNON, J.J.; CHRISTENSEN, D.A. **Improving the nutritional value of oat hulls for ruminant animals with pretreatment of multienzyme cocktail: *in vitro* studies.** J Anim Sci, 83:1113-1141, 2005.

## *VIII. Anexos*

**ANEXO A.** Fator de correção para um consumo de 50% de permanganato de potássio (FP).

	<b>0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>	<b>0,7</b>	<b>0,8</b>	<b>0,9</b>
<b>1</b>	0,8971	0,8973	0,8975	0,8977	0,8979	0,8982	0,8984	0,8986	0,8988	0,8990
<b>2</b>	0,8992	0,8994	0,8996	0,8998	0,9000	0,9003	0,9005	0,9007	0,9009	0,9011
<b>3</b>	0,9013	0,9015	0,9017	0,9019	0,9021	0,9024	0,9026	0,9028	0,9030	0,9032
<b>4</b>	0,9034	0,9036	0,9038	0,9040	0,9042	0,9045	0,9047	0,9049	0,9051	0,9053
<b>5</b>	0,9055	0,9057	0,9059	0,9061	0,9063	0,9066	0,9068	0,9070	0,9072	0,9074
<b>6</b>	0,9076	0,9078	0,9080	0,9082	0,9084	0,9087	0,9089	0,9091	0,9093	0,9095
<b>7</b>	0,9097	0,9099	0,9101	0,9103	0,9105	0,9108	0,9110	0,9112	0,9114	0,9116
<b>8</b>	0,9118	0,9120	0,9122	0,9124	0,9126	0,9129	0,9131	0,9133	0,9135	0,9137
<b>9</b>	0,9139	0,9141	0,9143	0,9145	0,9147	0,9150	0,9152	0,9154	0,9156	0,9158
<b>10</b>	0,9160	0,9162	0,9164	0,9166	0,9168	0,9171	0,9173	0,9175	0,9177	0,9179
<b>11</b>	0,9181	0,9183	0,9185	0,9187	0,9189	0,9192	0,9194	0,9196	0,9198	0,9200
<b>12</b>	0,9202	0,9204	0,9206	0,9208	0,9210	0,9213	0,9215	0,9217	0,9219	0,9221
<b>13</b>	0,9223	0,9225	0,9227	0,9229	0,9231	0,9234	0,9236	0,9238	0,9240	0,9242
<b>14</b>	0,9244	0,9246	0,9248	0,9250	0,9252	0,9255	0,9257	0,9259	0,9261	0,9263
<b>15</b>	0,9265	0,9267	0,9269	0,9271	0,9273	0,9276	0,9278	0,9280	0,9282	0,9284
<b>16</b>	0,9286	0,9288	0,9290	0,9292	0,9294	0,9297	0,9299	0,9301	0,9303	0,9305
<b>17</b>	0,9307	0,9309	0,9311	0,9313	0,9315	0,9318	0,9320	0,9322	0,9324	0,9326
<b>18</b>	0,9328	0,9330	0,9332	0,9334	0,9336	0,9339	0,9341	0,9343	0,9345	0,9347
<b>19</b>	0,9349	0,9351	0,9353	0,9355	0,9357	0,9360	0,9362	0,9364	0,9366	0,9368
<b>20</b>	0,9370	0,9372	0,9374	0,9376	0,9378	0,9381	0,9383	0,9385	0,9387	0,9389
<b>21</b>	0,9391	0,9393	0,9395	0,9397	0,9399	0,9402	0,9404	0,9406	0,9408	0,9410
<b>22</b>	0,9412	0,9414	0,9416	0,9418	0,9420	0,9423	0,9425	0,9427	0,9429	0,9431
<b>23</b>	0,9433	0,9435	0,9437	0,9439	0,9441	0,9444	0,9446	0,9448	0,9450	0,9452
<b>24</b>	0,9454	0,9456	0,9458	0,9460	0,9462	0,9465	0,9467	0,9469	0,9471	0,9473
<b>25</b>	0,9475	0,9477	0,9479	0,9481	0,9483	0,9486	0,9488	0,9490	0,9492	0,9494
<b>26</b>	0,9496	0,9498	0,9500	0,9502	0,9504	0,9507	0,9509	0,9511	0,9513	0,9515
<b>27</b>	0,9517	0,9519	0,9521	0,9523	0,9525	0,9528	0,9530	0,9532	0,9534	0,9536
<b>28</b>	0,9538	0,9540	0,9542	0,9544	0,9546	0,9549	0,9551	0,9553	0,9555	0,9557
<b>29</b>	0,9559	0,9561	0,9563	0,9565	0,9567	0,9570	0,9572	0,9574	0,9576	0,9578
<b>30</b>	0,9580	0,9582	0,9584	0,9586	0,9588	0,9591	0,9593	0,9595	0,9597	0,9599
<b>31</b>	0,9601	0,9603	0,9605	0,9607	0,9609	0,9612	0,9614	0,9616	0,9618	0,9620
<b>32</b>	0,9622	0,9624	0,9626	0,9628	0,9630	0,9633	0,9635	0,9637	0,9639	0,9641
<b>33</b>	0,9643	0,9645	0,9647	0,9649	0,9651	0,9654	0,9656	0,9658	0,9660	0,9662
<b>34</b>	0,9664	0,9666	0,9668	0,9670	0,9672	0,9675	0,9677	0,9679	0,9681	0,9683
<b>35</b>	0,9685	0,9687	0,9689	0,9691	0,9693	0,9696	0,9698	0,9700	0,9702	0,9704
<b>36</b>	0,9706	0,9708	0,9710	0,9712	0,9714	0,9717	0,9719	0,9721	0,9723	0,9725
<b>37</b>	0,9727	0,9729	0,9731	0,9733	0,9735	0,9738	0,9740	0,9742	0,9744	0,9746
<b>38</b>	0,9748	0,9750	0,9752	0,9754	0,9756	0,9759	0,9761	0,9763	0,9765	0,9767
<b>39</b>	0,9769	0,9771	0,9773	0,9775	0,9777	0,9780	0,9782	0,9784	0,9786	0,9788
<b>40</b>	0,9790	0,9792	0,9794	0,9796	0,9798	0,9801	0,9803	0,9805	0,9807	0,9809
<b>41</b>	0,9811	0,9813	0,9815	0,9817	0,9819	0,9822	0,9824	0,9826	0,9828	0,9830
<b>42</b>	0,9832	0,9834	0,9836	0,9838	0,9840	0,9843	0,9845	0,9847	0,9849	0,9851
<b>43</b>	0,9853	0,9855	0,9857	0,9859	0,9861	0,9864	0,9866	0,9868	0,9870	0,9872
<b>44</b>	0,9874	0,9876	0,9878	0,9880	0,9882	0,9885	0,9887	0,9889	0,9891	0,9893
<b>45</b>	0,9895	0,9897	0,9899	0,9901	0,9903	0,9906	0,9908	0,9910	0,9912	0,9914

46	0,9916	0,9918	0,9920	0,9922	0,9924	0,9927	0,9929	0,9931	0,9933	0,9935
47	0,9937	0,9939	0,9941	0,9943	0,9945	0,9948	0,9950	0,9952	0,9954	0,9956
48	0,9958	0,9960	0,9962	0,9964	0,9966	0,9969	0,9971	0,9973	0,9975	0,9977
49	0,9979	0,9981	0,9983	0,9985	0,9987	0,9990	0,9992	0,9994	0,9996	0,9998
50	1,0000	1,0002	1,0004	1,0006	1,0008	1,0011	1,0013	1,0015	1,0017	1,0019
51	1,0021	1,0023	1,0025	1,0027	1,0029	1,0032	1,0034	1,0036	1,0038	1,0040
52	1,0042	1,0044	1,0046	1,0048	1,0050	1,0053	1,0055	1,0057	1,0059	1,0061
53	1,0063	1,0065	1,0067	1,0069	1,0071	1,0074	1,0076	1,0078	1,0080	1,0082
54	1,0084	1,0086	1,0088	1,0090	1,0092	1,0095	1,0097	1,0099	1,0101	1,0103
55	1,0105	1,0107	1,0109	1,0111	1,0113	1,0116	1,0118	1,0120	1,0122	1,0124
56	1,0126	1,0128	1,0130	1,0132	1,0134	1,0137	1,0139	1,0141	1,0143	1,0145
57	1,0147	1,0149	1,0151	1,0153	1,0155	1,0158	1,0160	1,0162	1,0164	1,0166
58	1,0168	1,0170	1,0172	1,0174	1,0176	1,0179	1,0181	1,0183	1,0185	1,0187
59	1,0189	1,0191	1,0193	1,0195	1,0197	1,0200	1,0202	1,0204	1,0206	1,0208
60	1,0210	1,0212	1,0214	1,0216	1,0218	1,0221	1,0223	1,0225	1,0227	1,0229
61	1,0231	1,0233	1,0235	1,0237	1,0239	1,0242	1,0244	1,0246	1,0248	1,0250
62	1,0252	1,0254	1,0256	1,0258	1,0260	1,0263	1,0265	1,0267	1,0269	1,0271
63	1,0273	1,0275	1,0277	1,0279	1,0281	1,0284	1,0286	1,0288	1,0290	1,0292
64	1,0294	1,0296	1,0298	1,0300	1,0302	1,0305	1,0307	1,0309	1,0311	1,0313
65	1,0315	1,0317	1,0319	1,0321	1,0323	1,0326	1,0328	1,0330	1,0332	1,0334
66	1,0336	1,0338	1,0340	1,0342	1,0344	1,0347	1,0349	1,0351	1,0353	1,0355
67	1,0357	1,0359	1,0361	1,0363	1,0365	1,0368	1,0370	1,0372	1,0374	1,0376
68	1,0378	1,0380	1,0382	1,0384	1,0386	1,0389	1,0391	1,0393	1,0395	1,0397
69	1,0399	1,0401	1,0403	1,0405	1,0407	1,0410	1,0412	1,0414	1,0416	1,0418
70	1,0420	1,0422	1,0424	1,0426	1,0428	1,0431	1,0433	1,0435	1,0437	1,0439
71	1,0441	1,0443	1,0445	1,0447	1,0449	1,0452	1,0454	1,0456	1,0458	1,0460
72	1,0462	1,0464	1,0466	1,0468	1,0470	1,0473	1,0475	1,0477	1,0479	1,0481
73	1,0483	1,0485	1,0487	1,0489	1,0491	1,0494	1,0496	1,0498	1,0500	1,0502
74	1,0504	1,0506	1,0508	1,0510	1,0512	1,0515	1,0517	1,0519	1,0521	1,0523
75	1,0525	1,0527	1,0529	1,0531	1,0533	1,0536	1,0538	1,0540	1,0542	1,0544
76	1,0546	1,0548	1,0550	1,0552	1,0554	1,0557	1,0559	1,0561	1,0563	1,0565
77	1,0567	1,0569	1,0571	1,0573	1,0575	1,0578	1,0580	1,0582	1,0584	1,0586
78	1,0588	1,0590	1,0592	1,0594	1,0596	1,0599	1,0601	1,0603	1,0605	1,0607
79	1,0609	1,0611	1,0613	1,0615	1,0617	1,0620	1,0622	1,0624	1,0626	1,0628
80	1,0630	1,0632	1,0634	1,0636	1,0638	1,0641	1,0643	1,0645	1,0647	1,0649
81	1,0651	1,0653	1,0655	1,0657	1,0659	1,0662	1,0664	1,0666	1,0668	1,0670
82	1,0672	1,0674	1,0676	1,0678	1,0680	1,0683	1,0685	1,0687	1,0689	1,0691
83	1,0693	1,0695	1,0697	1,0699	1,0701	1,0704	1,0706	1,0708	1,0710	1,0712
84	1,0714	1,0716	1,0718	1,0720	1,0722	1,0725	1,0727	1,0729	1,0731	1,0733
85	1,0735	1,0737	1,0739	1,0741	1,0743	1,0746	1,0748	1,0750	1,0752	1,0754
86	1,0756	1,0758	1,0760	1,0762	1,0764	1,0767	1,0769	1,0771	1,0773	1,0775
87	1,0777	1,0779	1,0781	1,0783	1,0785	1,0788	1,0790	1,0792	1,0794	1,0796
88	1,0798	1,0800	1,0802	1,0804	1,0806	1,0809	1,0811	1,0813	1,0815	1,0817
89	1,0819	1,0821	1,0823	1,0825	1,0827	1,0830	1,0832	1,0834	1,0836	1,0838
90	1,0840	1,0842	1,0844	1,0846	1,0848	1,0851	1,0853	1,0855	1,0857	1,0859

**Exemplo:** Correção de um valor P obtido, sendo  $P = (V_b - V_a) \cdot 2$ , onde  $V_b = 49,2$  mL e  $V_a = 30,9$  mL, então  $P = 36,6$ . Pela tabela  $FP = 0,9719$ .



**ANEXO B.** Fator de correção da temperatura para determinação do número kappa.

<b>T ° C</b>	<b>Fator</b>		<b>T ° C</b>	<b>Fator</b>
<b>10</b>	1,1950		<b>20</b>	1,0650
<b>10,5</b>	1,1885		<b>20,5</b>	1,0585
<b>11</b>	1,1820		<b>21</b>	1,0520
<b>11,5</b>	1,1755		<b>21,5</b>	1,0455
<b>12</b>	1,1690		<b>22</b>	1,0390
<b>12,5</b>	1,1625		<b>22,5</b>	1,0325
<b>13</b>	1,1560		<b>23</b>	1,0260
<b>13,5</b>	1,1495		<b>23,5</b>	1,0195
<b>14</b>	1,1430		<b>24</b>	1,0130
<b>14,5</b>	1,1365		<b>24,5</b>	1,0065
<b>15</b>	1,3000		<b>25</b>	1,0000
<b>15,5</b>	1,1235		<b>25,5</b>	0,9935
<b>16</b>	1,1170		<b>26</b>	0,9870
<b>16,5</b>	1,1170		<b>26,5</b>	0,9740
<b>17</b>	1,1040		<b>27</b>	0,9740
<b>17,5</b>	1,0975		<b>27,5</b>	0,9675
<b>18</b>	1,0910		<b>28</b>	0,9610
<b>18,5</b>	1,0845		<b>28,5</b>	0,9545
<b>19</b>	1,0780		<b>29</b>	0,9480
<b>19,5</b>	1,0715		<b>29,5</b>	0,9415
			<b>30</b>	0,9350

## *VIX. Apêndice*

# Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching

Simone de Carvalho Peixoto-Nogueira · Michele Michelin ·  
Jorge Henrique Almeida Betini · João Atílio Jorge · Héctor Francisco Terenzi ·  
Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

Received: 30 May 2008 / Accepted: 22 September 2008 / Published online: 15 October 2008  
© Society for Industrial Microbiology 2008

**Abstract** The ability of xylanolytic enzymes produced by *Aspergillus fumigatus* RP04 and *Aspergillus niveus* RP05 to promote the biobleaching of cellulose pulp was investigated. Both fungi grew for 4–5 days in liquid medium at 40°C, under static conditions. Xylanase production was tested using different carbon sources, including some types of xylans. *A. fumigatus* produced high levels of xylanase on agricultural residues (corn cob or wheat bran), whereas *A. niveus* produced more xylanase on birchwood xylan. The optimum temperature of the xylanases from *A. fumigatus* and *A. niveus* was around 60–70°C. The enzymes were stable for 30 min at 60°C, maintaining 95–98% of the initial activity. After 1 h at this temperature, the xylanase from *A. niveus* still retained 85% of initial activity, while the xylanase from *A. fumigatus* was only 40% active. The pH optimum of the xylanases was acidic (4.5–5.5). The pH stability for the xylanase from *A. fumigatus* was higher at pH 6.0–8.0, while the enzyme from *A. niveus* was more stable at pH 4.5–6.5. Crude enzymatic extracts were used to clarify cellulose pulp and the best result was obtained with the *A. niveus* preparation, showing kappa efficiency around 39.6% as compared to only 11.7% for that of *A. fumigatus*.

**Keywords** *Aspergillus* · Xylanase · Biobleaching · Cellulose pulp · Filamentous fungi

## Introduction

In the last decades, an increasing number of studies aimed to develop environmentally clean and non-toxic methods for industrial processes. For instance, an enzymatic step in the process of cellulose pulp bleaching would contribute to reduce the use of chlorine-containing reagents. According to Valcheva [1], the utilization of enzymes, particularly xylanases, results in an easier bleaching in subsequent stages and a better pulp brightness. Endo-1,4- $\beta$ -xylanase (1,4- $\beta$ -D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) catalyzes the hydrolysis of glycosidic bonds in the xylan backbone, reducing the degree of polymerization of the substrate [2]. This improves the access of bleaching reagents into the cellulose fibers facilitating the elimination of lignin in subsequent alkaline extraction [3].

The industrial application of xylanases takes place mainly in Scandinavia, North America and China [1, 3]. In the last decades, an increased number of studies were devoted to the biobleaching of cellulose pulp [1–9]. In order to induce xylanase synthesis from microbial sources, agricultural residues, such as rye flakes, wheat bran, oat flakes, corn flakes, crushed corn cob, rice straw, sugar cane bagasse and others can be used [4, 8]. The use of agricultural residues as alternative carbon sources reduces the production costs and the price of the final product. Among the filamentous fungi employed to produce xylanase, the *Aspergillus* genus is one of the most explored. For example, production of xylanase and assays of biobleaching of cellulose pulp have been reported for *Aspergillus caespitosus*

---

S. de Carvalho Peixoto-Nogueira  
Departamento de Bioquímica e Imunologia,  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,  
Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

M. Michelin · J. H. A. Betini · J. A. Jorge · H. F. Terenzi ·  
M. de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli (✉)  
Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,  
Avenida Bandeirantes 3900, Monte Alegre,  
Ribeirão Preto, SP 14.040-901, Brazil  
e-mail: polizeli@ffclrp.usp.br

[8], *A. nidulans* and *A. awamori* [4], *A. niger* An76 and *A. aculeatus* [2].

The aim of the present study was to describe xylanases from two fungi isolated from Brazilian soil, which were identified as *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niveus*, and to test the adequacy of these enzymes for cellulose pulp biobleaching. These fungi produced high levels of xylanases [10] with special characteristics, such as high stability and high optimum temperature, in comparison to others reported in the literature [11–13].

## Materials and methods

### Organisms and culture conditions

The *Aspergillus* strains were isolated from soil and decomposing leaves from a reforestation area of the Campus of São Paulo University at Ribeirão Preto, SP, Brazil. These strains were identified as *A. fumigatus* RP04 and *A. niveus* RP05, and are deposited at the Pernambuco Federal University, PE, Brazil. Stock cultures of both strains were propagated at 35°C on slants of solid oatmeal medium [14]. Both microorganisms were grown in different liquid media, such as SR [15], CP [16], Khanna [17], Czapeck [18], Vogel [19] and M-5 [20], inoculated with  $4 \times 10^5$  spores/ml (final concentration) in 25 ml of medium. Most cultures were supplemented with 1% birchwood xylan, but other carbon sources were also tested. Cultivation was either static or agitated at 100 rpm; the incubation temperatures and times varied according with the experiment.

### Extraction of xylanases and protein determination

Mycelia were harvested by filtration, rinsed with distilled water, blotted on filter paper and stored at –15°C until use. The mycelial mass was homogenized by grinding in a mortar with glass beads at 4°C. After addition of 10 ml of 100 mM McIlvaine buffer (citrate-phosphate buffer) [21] pH 5.0–5.5 for *A. fumigatus* or 4.0–4.5 for *A. niveus*, cell disruption was continued and the slurry was centrifuged at 12,100g, 15 min. The supernatant was used to estimate growth as total protein, according to Lowry et al. [22], using bovine serum albumin as standard.

### Enzymatic assays

Xylanase activity was determined in the crude filtrate by measuring the reducing groups released from birchwood xylan [23]. The reaction mixture consisted of 200 µl of 1% (w/v) xylan in McIlvaine buffer at the ideal pH for each enzyme, and 200 µl of enzymatic extract appropriately diluted. The reaction mixture was incubated at 70°C

for the extract of *A. fumigatus* and 65°C for that of *A. niveus*. One unit was defined as the amount of enzyme that releases 1 µmol of reducing sugar per minute determined according to Miller [23]. Total activity (total U) was defined as units/ml multiplied by the total sample volume. Identical conditions of assay were employed for cellulase, amylase and pectinase determination, using as substrate 1% (w/v) carboxymethyl-cellulose, avicel or filter paper for cellulase, polygalacturonic acid for polygalacturonase and starch for amylase activities. The assay temperature was 60°C for these other enzymes. One unit was defined as the amount of enzyme that releases 1 µmol of reducing sugar per minute, using monogalacturonic acid as standard for polygalacturonase, or glucose for cellulase and amylase.

### Effects of temperature and pH

The effect of temperature on xylanase activity was analyzed using crude filtrate from *A. fumigatus* and *A. niveus* cultures. The assays were performed in McIlvaine buffer at the ideal pH for each enzyme, incubated at 25–80°C, with intervals of 5°C. The effect of pH was assayed using the same buffer in the pH range 2.5–8.0, at the ideal temperature for each enzyme. Thermal inactivation was analyzed with enzymes incubated at 70°C for 1 h and the assays were performed at the optima of temperature and pH for each enzyme. At different time intervals, aliquots were withdrawn and residual activities were measured as described above. The pH stability was analyzed incubating the enzymes at 25°C with McIlvaine buffer in different pH values (range 2.5–8.0) for 1 h, and after that the assays were carried out at the optima of temperature and pH for each enzyme.

### Biobleaching

The amount of enzyme used for this treatment was 10 U/g of dried cellulose pulp extracted from *Eucalyptus grandis*. All calculations and procedures were carried out according to TAPPI, Atlanta GA [24] methodology. The volume of enzyme or distilled water added corresponded to 10% (dry weight) of the pulp mixture. The samples were incubated in polyethylene bags at the adequate temperature for 1 h, after that the cellulose pulp was filtered on a Büchner funnel, rinsed with 200 ml of distilled water and used for determination of kappa, viscosity and brightness parameters.

### Reproducibility of results

All results are the mean of at least three independent experiments.

## Results and discussion

### Optimization of xylanase production

In order to find the best culture conditions, both *Aspergilli* were grown on six different liquid media. The best enzymatic yields were obtained in Vogel or Czapeck media for *A. fumigatus* RP04 and *A. niveus* RP05, respectively, (Table 1).

The time-course of growth and xylanase production for *A. fumigatus* and *A. niveus* was followed in Vogel and Czapeck media, respectively, supplemented with 1% birchwood xylan, for 196 h. *A. fumigatus* grew along all the experimental time (Fig. 1a), reaching the maximum of xylanase production at 96 h (Fig. 1c). By the end of the experiment, a decrease in xylanase activity was observed, probably due to inhibition of the enzyme by end products. For *A. niveus*, the peak of growth was observed at 72 h (Fig. 1a), but the maximal enzyme production occurred at 120 h, suggesting partial autolysis of the mycelium at the end of cultivation. Comparing xylanase production (total units) of both fungi (Fig. 1a, c) it can be seen that *A. fumigatus* produced 2.1-fold more xylanase than *A. niveus*, but in contrast, due to lesser growth, the specific activity (U/mg protein) of *A. niveus* xylanase was 25.5-fold higher than that of *A. fumigatus*. The time required for production of xylanase for *A. fumigatus* was 96 h and it is in agreement with that reported for *A. awamori* and *A. oryzae* [4]. *A. tamarii* required 120 h, similar to *A. niveus* RP05 [4].

An interesting effect of temperature was observed (Fig. 1b, d). Despite of the maximal xylanase levels being attained with incubation at 40°C (Fig. 1d), the optimum temperature for growth was distinct, being 40°C for *A. fumigatus* and 30°C for *A. niveus* (Fig. 1b). This result suggested a thermotolerant character for *A. fumigatus*, as previously reported for *A. phoenicis* [2, 6] and *A. caespitosus* [8]. For

other *Aspergillus* species, such as *A. awamori*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. oryzae* and *A. tamari*, the best xylanase production occurs when the fungi are grown at lower temperatures [4].

Still aiming to improve xylanase production, cultures from both fungi were carried out under the optimized conditions, with agitation (100 rpm), or under static conditions. For both strains, the best growth was obtained with agitated cultures (Fig. 2a), but in contrast, static conditions (Fig. 2b) improved xylanase production and the enzyme levels were 2.3-fold higher for *A. fumigatus* and 1.46-fold for *A. niveus*, as compared to agitated cultures.

*Aspergillus fumigatus* produced approximately 3–4-fold more xylanase than *A. niveus* (Fig. 1c). Comparing with the literature, *A. fumigatus* produced 16–55% more xylanase than other fungi, such as *A. caespitosus* [8], *A. nidulans* and *A. awamori* [2, 4], while *A. niveus* produced 25 and 39% more xylanase than *A. awamori* and *A. nidulans*, respectively [2, 4], and 64% more xylanase in comparison with other strains of *A. niveus* used for prebleaching tests [13]. It is important to emphasize that the best enzymatic production under static conditions may lower the production cost.

### Effect of alternative carbon sources on xylanase production

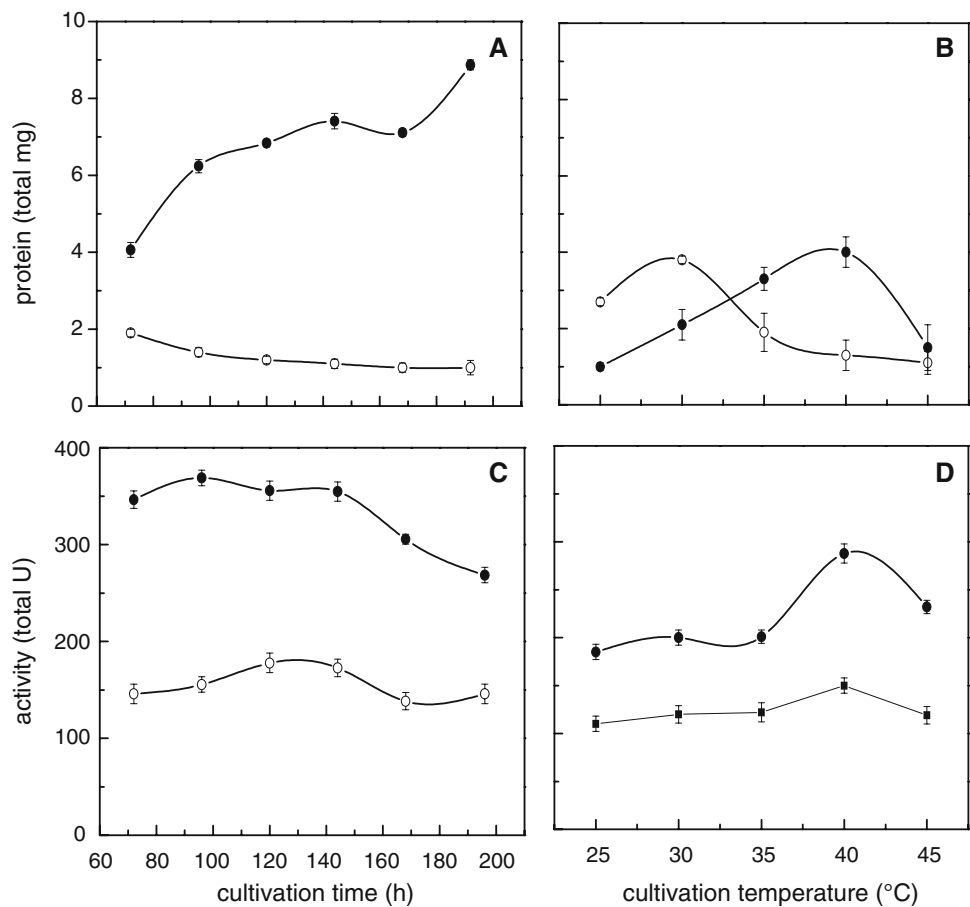
*Aspergillus fumigatus* RP04 and *A. niveus* RP05 were cultured in the optimized media, supplemented with different carbon sources (Table 2). *A. fumigatus* produced 5.0–6.0% more xylanase on powdered corncob, wheat bran and crushed corncob as compared to birchwood xylan. Rice straw and rye flakes were as favorable to production of xylanase as was birchwood xylan, and could be good alternative carbon sources. Xylanase from *A. niveus* was produced preferentially on wheat bran and powdered corncob, but birchwood xylan, xylose, *E. grandis* xylan and oat spelt xylan also were good substrates for the production of this

**Table 1** Production xylanase by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niveus* in different culture media

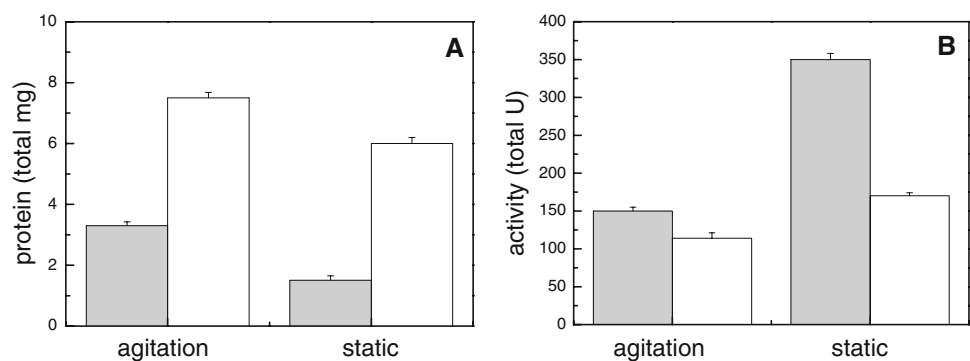
Fungus	Culture medium	Protein (total mg)	Activity (total U)	Activity (U/mg protein)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	SR	3.9 (± 0.3)	140.7 (± 0.1)	36.1 (± 0.2)
	CP	2.2 (± 0.1)	62.0 (± 0.3)	28.2 (± 0.12)
	Khanna	2.7 (± 0.2)	116.3 (± 0.1)	43.1 (± 0.1)
	Czapeck	3.6 (± 0.12)	93.0 (± 0.1)	25.8 (± 0.1)
	Vogel	3.2 (± 0.3)	348.0 (± 0.1)	108.7 (± 0.13)
	M-5	1.3 (± 0.1)	46.5 (± 0.24)	35.7 (± 0.18)
<i>Aspergillus niveus</i>	SR	1.5 (± 0.2)	24.6 (± 0.17)	16.4 (± 0.1)
	CP	1.4 (± 0.1)	20.8 (± 0.3)	14.8 (± 0.3)
	Khanna	1.4 (± 0.1)	28.7 (± 0.1)	20.5 (± 0.1)
	Czapeck	2.5 (± 0.15)	100.0 (± 0.2)	40.0 (± 0.1)
	Vogel	1.4 (± 0.1)	26.8 (± 0.1)	19.2 (± 0.4)
	M-5	1.3 (± 0.32)	11.8 (± 0.1)	9.1 (± 0.24)

*A. fumigatus* and *A. niveus* were grown under static conditions, at 40°C for 96 h, according to Sect. “Materials and methods”

**Fig. 1** Time-course and culture temperature from *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niveus* for xylanase production. Total protein (a, b) and total activity (c, d) during different cultivation periods at 40°C (a, c) and on different temperatures during 96 h for *A. fumigatus* or 120 h for *A. niveus* (b, d). Microorganisms were cultivated in Czapeck (*A. niveus*) or Vogel (*A. fumigatus*) media supplemented with 1% birchwood xylan. Symbols: Filled circle with dash, *Aspergillus fumigatus*; Empty circle with dash, *Aspergillus niveus*



**Fig. 2** Influence of aeration in the cultivation of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niveus* for xylanase production. Total protein (a) and total activity (b) under agitation (100 rpm) or on static conditions. Microorganisms were cultivated in Czapeck (*A. niveus*) or Vogel (*A. fumigatus*) media supplemented with 1% birchwood xylan. White column *Aspergillus fumigatus*, gray column *Aspergillus niveus*



enzyme. The possibility of using agricultural residues to produce enzymes may lower the production costs resulting in a cheaper product [25]. But it is known that agro-industrial residues are complex and when they are used as carbon source may induce the fungi to produce other enzymes in the crude extract. Because of that, it was decided to use xylan as the only carbon source to continue this study. In order to assure that cellulase activities were absent, we assayed the activity of the crude extract with three different substrates (carboxymethyl-cellulose, avicel or filter paper) as described in Sect. “Materials and methods”, and no activity was detected. Other enzyme activities, such as

amylase and pectinase were found in diminished levels, suggesting constitutive activities for both fungi.

#### Characterization of xylanase activity in the crude extract

It is important for practical applications that industrial enzymes display some adequate properties, such as resistance to temperature and pH. The temperature optimum for *A. fumigatus* and *A. niveus* was 70 and 60–65°C, respectively (Fig. 3a). The temperature optimum observed for *A. fumigatus* was the same as that of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* [26], but it was different of those

**Table 2** Effect of the carbon source on the production of xylanase by *A. fumigatus* and *A. niveus*

Carbon Source	Activity (total U)	
	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. niveus</i>
Without addition	28.9 ( $\pm$ 0.2)	6.9 ( $\pm$ 0.12)
Glucose	78.9 ( $\pm$ 0.14)	43.9 ( $\pm$ 0.11)
Xylose	161.4 ( $\pm$ 0.13)	99.5 ( $\pm$ 0.13)
Xylan (birchwood)	347.0 ( $\pm$ 0.11)	100.3 ( $\pm$ 0.12)
Xylan (oat spelt)	223.2 ( $\pm$ 0.1)	93.5 ( $\pm$ 0.2)
Xylan ( <i>Eucalyptus grandis</i> )	136.8 ( $\pm$ 0.2)	97.8 ( $\pm$ 0.1)
$\beta$ -Methylxyloside	155.3 ( $\pm$ 0.21)	9.2 ( $\pm$ 0.1)
Arabinose	60.3 ( $\pm$ 0.3)	64.8 ( $\pm$ 0.1)
Avicel microcrystalline cellulose	44.7 ( $\pm$ 0.14)	0.0 ( $\pm$ 0.3)
Cellobiose	17.2 ( $\pm$ 0.17)	6.9 ( $\pm$ 0.2)
Xylitol	91.2 ( $\pm$ 0.1)	25.4 ( $\pm$ 0.12)
Rye flakes	343.1 ( $\pm$ 0.16)	60.2 ( $\pm$ 0.11)
Wheat bran	368.8 ( $\pm$ 0.19)	114.3 ( $\pm$ 0.11)
Oat flakes	103.8 ( $\pm$ 0.3)	37.1 ( $\pm$ 0.2)
Barley flakes	121.7 ( $\pm$ 0.14)	69.4 ( $\pm$ 0.3)
Soy flakes	170.5 ( $\pm$ 0.2)	37.1 ( $\pm$ 0.11)
Corn flakes	142.8 ( $\pm$ 0.3)	11.6 ( $\pm$ 0.12)
Crushed corncob	366.8 ( $\pm$ 0.2)	55.6 ( $\pm$ 0.13)
Powdered corncob	371.1 ( $\pm$ 0.17)	111.8 ( $\pm$ 0.12)
Rice straw	349.1 ( $\pm$ 0.19)	32.4 ( $\pm$ 0.14)
Sugar cane bagasse	164.1 ( $\pm$ 0.15)	20.8 ( $\pm$ 0.1)

*A. fumigatus* and *A. niveus* were grown on Vogel (96 h) and Czapeck (120 h) liquid media, respectively, at 40°C under static conditions, in according to Sect. “Materials and methods”

reported for most *Aspergilli* [2, 6, 8], including other strains of *A. fumigatus* [12]. *A. niveus* exhibited an optimum temperature similar to those of *A. fischeri*, *A. kawachii*, *A. oryzae*, *A. sojae* and *A. sydowii* [2, 5].

For *A. fumigatus* the pH optimum was 5.0–5.5 and for *A. niveus*, 4.5–5.0 (Fig. 3b). In comparison with other fungi, these values of pH optimum are close to those of *A. niger*, *A. fischeri*, *A. sojae* and *A. nidulans* [2, 5], and to one of the xylanases (xyl II) produced by *A. caespitosus* [8]. Others fungal xylanases are alkalophilic, as those from *Thermomyces lanuginosus* [26], *A. nidulans* KK-99, *A. terreus* [2], and one of the xylanases (xyl I) from *A. caespitosus* [8].

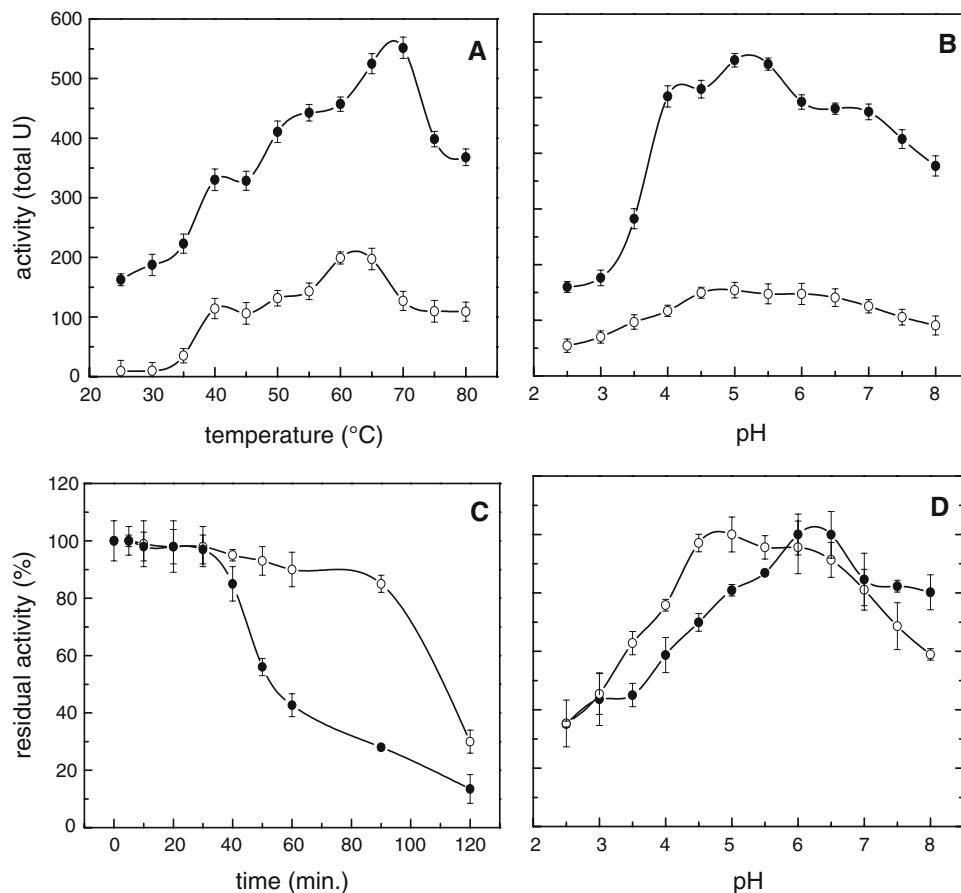
Even though *A. fumigatus* produced approximately 3–4-fold more xylanase than *A. niveus*, the thermostability of both enzymes was similar at 60°C for 30 min. After this period, the residual activity of *A. fumigatus* xylanase diminished considerably and, after 120 min the xylanase from *A. fumigatus* retained only 10% of activity, although the xylanase from *A. niveus* still maintained 30% of the initial activity (Fig. 3c). Although the thermostability of the xylanase from *A. niveus* was higher, the temperature opti-

um of the xylanase from *A. fumigatus* was 70°C, while the xylanase from *A. niveus* corresponded to 60–65°C (Fig. 3a), suggesting that the substrate xylan may protect the enzyme.

The stability of the xylanases at different pH was also tested (Fig. 3d) and the results were different for both fungi. *A. fumigatus* presented a xylanase more stable in pH from 6.0 to 8.0, while the xylanase from *A. niveus* was more stable from 4.5 to 6.0. *A. oryzae* [2], *A. fischeri* [2, 4] and *Thermomyces lanuginosus* [26] also presented a considerable stability on ranges of pH from 5.0 up to 8.0.

#### Assays of cellulose biobleaching using xylanase

The xylanases produced by *A. fumigatus* and *A. niveus* were tested on cellulose pulp biobleaching. The amount of enzyme was 10 U/g of dry pulp, for 1 h, at the temperature optimum of each enzyme. To compare the efficiency of the crude extracts from both fungi in biobleaching, the kappa number was determined. Kappa number is an indication of the lignin content or bleach ability of wood pulp. It estimates the amount of chemicals required to obtain a pulp with a given degree of brightness. Thus, it is expected to lower the kappa number after the enzyme treatment. The best result was obtained with the crude extract from *A. niveus* (Table 3), that decreased 4.6 points the kappa number in comparison with the control. When the cellulose pulp was treated with xylanases from *A. fumigatus*, a decrease of 0.9 points was observed, corresponding to a kappa efficiency of 39.6% for *A. niveus* and 11.7% for *A. fumigatus*. Using xylanase from *A. niveus*, the brightness improved 3.4 points, against 2 points using xylanase from *A. fumigatus*. The viscosity decreased 9.2% when xylanase from *A. fumigatus* was used, but the xylanase from *A. niveus* promoted no decrease of viscosity, confirming that this crude filtrate was free of cellulase. The presence of cellulase in the xylanolytic extract may affect the cellulose pulp properties, and is a constant preoccupation of the users [4, 7, 26]. Comparing these results to those obtained with other microorganisms such as *Thermomyces lanuginosus* [26] and *A. caespitosus* (xyl I and II) [8], we observed that the kappa number was reduced only 1.0, 0.2 (xyl I) or 1.5 (xyl II) and 1.1 points, respectively, comparing to their control after at least 1 h of treatment using a quantity of xylanase equivalent to 10 U/g of dry pulp. A reduction of 3.3 points in kappa number (similar to our *A. niveus* strain) was observed when xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 was used; but to reach this performance in the treatment, it was necessary to double the amount of enzyme and the time of treatment (20 U/g of dry pulp/2 h) and, unfortunately, using *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 xylanase a decrease of 7.5% in the cellulose viscosity was observed [27].



**Fig. 3** Effect of temperature (**a**) and pH (**b**) in the enzyme reaction; thermostability (**c**) and pH stability (**d**) of the extracellular xylanases produced by *A. fumigatus* and *A. niveus*. The microorganisms were grown in Czapeck (*A. niveus*) or Vogel (*A. fumigatus*) supplemented with 1% birchwood xylan and the reactions were carried out as: **a** Xylanases activity were determined using McIlvaine buffer, pH 5.0, at temperatures range from 25 to 80°C; **b** xylanases pH were determined at 65°C for *A. niveus* or 70°C for *A. fumigatus* using McIlvaine

on different pHs (2.5–8.0); **c** thermal stabilities were carried out incubating both enzymes at 70°C and after the residual activities were determined at 65°C, pH 4.5–5.0 for *A. niveus* or at 70°C pH 5.0–5.5 for *A. fumigatus*; **d** pH stability were determined incubating both enzymes at different pH (2.5–8.0) at 25°C, during 1 h and after the residual activities were determined at 65°C, pH 4.5–5.0 for *A. niveus* or at 70°C pH 5.0–5.5 for *A. fumigatus*. Symbols: Filled circle with dash, *Aspergillus fumigatus*; Empty circle with dash *Aspergillus niveus*

**Table 3** Bleaching of cellulose pulp by xylanases produced by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niveus*

	<i>A. fumigatus</i>		<i>A. niveus</i>	
	Control	Treated	Control	Treated
Kappa number	7.7 (± 0.1)	6.8 (± 0.12)	11.7 (± 0.2)	7.1 (± 0.3)
Kappa efficiency (%)	–	11.7 (± 0.11)	–	39.6 (± 0.3)
Viscosity (cm <sup>3</sup> /g)	942 (± 0.16)	855 (± 0.14)	901 (± 0.1)	901 (± 0.2)
Brightness (ISO)	56.7 (± 0.18)	58.7 (± 0.17)	54.7 (± 0.1)	58.1 (± 0.1)

The microorganisms were grown on their respectively standardized conditions. The controls corresponded to untreated samples. Treatments were carried out with extracellular xylanase (10 U/g of cellulose pulp), during 1 h at 70°C for *A. fumigatus* or 65°C for *A. niveus*

*Aspergillus niveus* provided a better result than *A. fumigatus*, but the performance of the xylanase obtained from the second strain was also interesting, and should receive more attention. Even when *A. fumigatus* is commonly described as a pathogenic fungus [28], it is still

used to produce enzymes such as xylanase [11], applied in industry [12]. Other possibility is to carry on studies about this interesting xylanase intending to insert and express the gene in non-pathogenic yeasts, as it was done by Liu et al. [29].



## Conclusions

In this work, *A. niveus* and *A. fumigatus* were described as good xylanase producers, but *A. niveus* xylanase provided the most promising characteristics to be industrially applied in the cellulose pulp biobleaching, and should receive more attention. This fungus should be studied more in order to better understand *A. niveus* xylanase synthesis system, which may enlarge the number of enzymes available in the market to be used in the paper industries.

**Acknowledgments** This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). J. A. J., H.-F. T. and M. L. T. M. P. are Research Fellows of CNPq. S.-C. P.-N. was a recipient of a CNPq fellowship and this study is part of her Doctoral Thesis. M. M. was a recipient of a FAPESP fellowship. The authors thank Ricardo F. Alarcon and Mauricio de Oliveira for technical assistance.

## References

- Valcheva E, Valchev I, Yotova L (2001) Kinetics of enzyme action Cartazyme NS-10 prior to bleaching of kraft pulp. *Biochem Eng J* 7:223–226. doi:10.1016/S1369-703X(00)00127-3
- Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:577–591. doi:10.1007/s00253-005-1904-7
- Zhao J, Li X, Qu Y, Gao P (2002) Xylanase pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat straw. *Enzyme Microb Technol* 30:734–740. doi:10.1016/S0141-0229(02)00050-9
- Techapun C, Poosaran N, Watanabe M, Sasaki K (2003) Thermotolerant and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and properties required for use in pulp bleaching bioprocess: a review. *Process Biochem* 38:1327–1340. doi:10.1016/S0032-9592(02)00331-X
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:326–338. doi:10.1007/s002530100704
- Rizzatti ACS, Sandrim VC, Jorge JA, Terenzi HF, Polizeli MLTM (2004) Influence of temperature on the properties of xylanolytic enzymes of the thermotolerant fungus *Aspergillus phoenicis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31:88–93. doi:10.1007/s10295-004-0120-2
- Salles BC, Medeiros RG, Bao SN, Silva FG Jr, Filho EXF (2005) Effect of cellulase-free xylanases from *Acrophialophora nainiana* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on eucalyptus kraft pulp. *Process Biochem* 40:343–349. doi:10.1016/j.procbio.2004.01.008
- Sandrim VC, Rizzatti ACS, Terenzi HF, Jorge JA, Milagres AMF, Polizeli MLTM (2005) Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. *Process Biochem* 40:1823–1828. doi:10.1016/j.procbio.2004.06.061
- Lu W, Li D, Wu Y (2003) Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale solid-state fermentation by *Aspergillus sulphureus*. *Enzyme Microb Technol* 32:305–311. doi:10.1016/S0141-0229(02)00292-2
- Guimarães LHS, Peixoto-Nogueira SC, Michelin M, Rizzatti ACS, Sandrim VC, Zanoelo FF et al (2006) Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Braz J Microbiol* 37:474–480
- Thiagarajan S, Jeya M, Gunasekaran P (2005) Improvement of xylanase production in solid-state fermentation by alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* MKU1 using a fractional factorial design. *Indian J Exp Biol* 43(10):887–891
- Savitha S, Sadhasivam S, Swaminathan K (2007) Application of *Aspergillus fumigatus* xylanase for quality improvement of waste paper pulp. *Bull Environ Contam Toxicol* 78:217–221. doi:10.1007/s00128-007-9132-8
- Angayarkanni J, Palaniswamy M, Pradeep BV, Swaminathan K (2006) Biochemical substitution of fungal xylanases for prebleaching of hardwood kraft pulp. *Afr J Biotechnol* 5(10):921–929
- Emerson R (1941) An experimental study of the life cycles and taxonomy of Allomyces. *Lloydia* 4:77–144
- Rizzatti ACS, Jorge JA, Terenzi HF, Rechia CGV, Polizeli MLTM (2001) Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 26:156–160. doi:10.1038/sj.jim.7000107
- Peixoto SC, Jorge JA, Terenzi HF, Polizeli MLTM (2003) *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. *Int Microbiol* 6:269–273. doi:10.1007/s10123-003-0140-1
- Khanna P, Sundari SS, Kumar NJ (1995) Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. *World J Microbiol Biotechnol* 11:242–243. doi:10.1007/BF00704661
- Wiseman A (1975) Handbook of enzyme biotechnology. Wiley & Sons, New York, p 148
- Vogel HF (1964) Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *Am Nat* 98:435–446. doi:10.1086/282338
- Peralta RM, Terenzi HF, Jorge JA (1990)  $\alpha$ -D-glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1033:243–249
- McIlvaine TC (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *J Biol Chem* 49:183–186
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:267–275
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–429. doi:10.1021/ac60147a030
- Test methods TAPPI technical association of the pulp and paper industry. TAPPI Press, Atlanta, 1996
- Aachary AA, Prapulla SG (2008) Corn-cob-induced endo-1, 4-beta-D-xylanase of *Aspergillus oryzae* MTCC 5154: production and characterization of xylobiose from glucuronoxylan. *J Agric Food Chem* 56(11):3981–3988. doi:10.1021/jf073430i
- Li XT, Jiang ZQ, Li LT, Yang SQ, Feng WY, Fan JY et al (2005) Characterization of cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. *Bioresour Technol* 96:1370–1379. doi:10.1016/j.biortech.2004.11.006
- Khandeparkar R, Bhosle NB (2007) Application of thermoalkalophilic xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC5214 in biobleaching of kraft pulp. *Bioresour Technol* 98(4):897–903. doi:10.1016/j.biortech.2006.02.037
- Taubitz A, Bauer B, Heesemann J, Ebel F (2007) Role of respiration in the germination process of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Curr Microbiol* 54(5):354–360. doi:10.1007/s00284-006-0413-y
- Liu MQ, Weng XY, Sun JY (2006) Expression of recombinant *Aspergillus niger* xylanase A in *Pichia pastoris* and its action on xylan. *Protein Expr Purif* 48(2):292–299

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)