

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

*Potencial dos fungos
Aspergillus terricola e Aspergillus ochraceus
no desenvolvimento de bioprocessos
e propriedades das enzimas xilanolíticas*

Michele Michelin

**Tese apresentada à
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras
de Ribeirão Preto da USP,
como parte das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Ciências,
Área: Biologia Comparada**

**RIBEIRÃO PRETO – SP
2009
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

*Potencial dos fungos
Aspergillus terricola e Aspergillus ochraceus no
desenvolvimento de bioprocessos
e propriedades das enzimas xilanolíticas*

*Michele Michelin
Profa. Dra. Maria de Lourdes T.M. Polizeli*

Tese apresentada à
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras
de Ribeirão Preto da USP,
como parte das exigências para a obtenção
do título de Doutor em Ciências,
Área: Biologia Comparada

RIBEIRÃO PRETO – SP
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Michelin, M.

Potencial dos fungos *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus* no desenvolvimento de bioprocessos e propriedades das enzimas xilanolíticas.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração: Biologia Comparada.

Orientadora: Polizeli, Maria de Lourdes T.M.

1. *Aspergillus*; 2. xilanase; 3. biobranqueamento

*“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser
da criação, seja animal ou vegetal,
ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante”
Albert Schweitzer
(Nobel da Paz de 1952)*

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

AGRADECIMENTOS

Escolher e recordar a quem agradecer não é tarefa fácil, talvez por que os merecedores são muitos e o risco do esquecimento pode magoar quem de alguma forma me ajudou na concretização deste trabalho. Eu não sei a quem agradecer primeiro, e a ordem aqui, não tem o maior ou menor grau de importância, eu apenas quero agradecer de todo coração e dizer porque agradeço.

Inicialmente eu agradeço aquela força interior que move tudo, ela pode ter vários nomes e significados, para mim, simplesmente Deus.

*Agradeço do fundo do meu coração, o amor, a dedicação e a perseverança dos meus pais,
José e Soeli*

*As minhas queridas irmãs Raquel e Fernanda por serem tão presentes em minha vida.
Amo vocês!*

*A minha querida tia Giselda que sempre foi um anjo em minha vida.
A tia Cida pelas orações e pelo carinho.*

A todos os meus familiares e amigos pessoais que sempre me estimularam.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria de Lourdes Polizeli, por ter confiado no meu trabalho frente a sua linha de pesquisa, pela competência e serenidade na orientação deste trabalho e certamente pela amizade que firmamos nesta caminhada.

Ao Prof. Dr. João Atílio Jorge pelos preciosos ensinamentos que acrescentaram muito à minha carreira acadêmica e científica e por sua prontidão. Agradeço também pelo convívio sempre muito agradável.

Ao Prof. Dr. Héctor Francisco Terenzi pelas contribuições valiosas nos artigos científicos.

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

Ao Prof. Dr. José António Teixeira do Laboratório de Fermentação e Instalação Piloto, da Universidade do Minho (Portugal), agradeço por me receber em seu laboratório onde pude aprender sobre processos em biorreatores.

Aos amigos e professores Dr. Daniel Pereira da Silva e Dra. Denise Santos Ruzene 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. Richard John Ward do Departamento de Química, da FFCLRP - USP pelas análises de Dicroísmo circular.

Ao ex-aluno e colega Jorge Henrique de Almeida Betini pelas análises de biobranqueamento da polpa de celulose.

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 a 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.

A Profa. Dra. Eliane Candiane Arantes do Departamento de Física e Química, da FCFRP - USP pelo sequenciamento das proteínas e ao aluno Fernando Antônio Pino Anjolette pelo auxílio técnico.

A Dra. Izaura Yoshico Hirata do Departamento de Biofísica, da UNIFESP pelo sequenciamento da proteína.

Às amigas e amigos do laboratório: Simone, Marita, Vivian, Beraba, André, Maller, Rose, Juliana, Ana Vicci, Fernanda e Vitor, agradeço pela grande ajuda na realização deste trabalho, pelos momentos de descontração, pela companhia diária e por todas as gargalhadas e aprendizado. Adoro vocês!

Aos demais amigos do laboratório: Taty, Mariele, Allana, Eloíza, Mateus, Telma, Priscila, Jean e Bruna.

Relembro com saudade àqueles que deixaram o laboratório: Allan, Carol, Ana Carla, Priscila Okanno, Valéria, Jorge, Giovana, Fabiana, Altino, Karina e Alexandre por tudo que aprendemos, dividimos, rimos e melhoramos como pessoas.

Aos amigos que fiz em Portugal: Paula, Helô, Dani, Torquato, Guga, Roberto, David, Aline, Bartô e Fábria, por compartilharam comigo momentos especiais. Não sei como teria sido minha passagem por este país sem a companhia de vocês. Muita Saudade!

Aos colegas de laboratório da Uminho, que me receberam carinhosamente.

Ao Ricardo Fernandes Alarcon por seu trabalho como técnico, sua amizade, e pelo convívio bem humorado.

Ao Maurício de Oliveira pelo suporte técnico.

À Renata Andrade, secretária da Pós-Graduação da Biologia Comparada, pela atenção e disponibilidade.

Ao Juliano Marqueti, secretário da FAPESP, pela disposição.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

À Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, local onde foi desenvolvida esta pesquisa.

À todas aquelas pessoas tão especiais que certamente contribuíram comigo e que neste momento falhei em não citá-los. Perdoem minha total falta de recordação, ainda tenho muito a melhorar como pessoa.

Muito Obrigada!

Índice Geral

| | |
|--|------------|
| Lista de Figuras | i |
| Lista de Tabelas | iv |
| Lista de Abreviaturas e Símbolos | vi |
| Resumo | vii |
| Abstract | x |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Filogenia de fungos | 2 |
| 1.2 Xilanases de fungos de origem mesofílica | 6 |
| 1.3 Estrutura da xilana | 8 |
| 1.4 Sistema xilanolítico | 10 |
| 1.5 Regulação do sistema xilanolítico | 13 |
| 1.6 Classificação das xilanases: famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43 | 14 |
| 1.7 Aplicação industrial | 18 |
| 1.7.1 Indústria de papel e celulose | 18 |
| 1.7.2 Outras aplicações biotecnológicas | 21 |
| 1.8 Mercado de enzimas | 22 |
| 1.9 Resíduos agroindustriais | 24 |
| 1.10 Produção de xilanases | 27 |
| | |
| 2. OBJETIVOS..... | 30 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 31 |
| 2.2 Objetivos específicos | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 32 |
| 3.1 Coleta e isolamento de fungos filamentosos | 33 |
| 3.2 Seleção dos microrganismos | 35 |
| 3.3 Manutenção da cepa | 36 |
| 3.4 Condições de cultivo | 36 |
| 3.4.1 Fermentação submersa (FSbm) | 37 |
| 3.4.1.1 FSbm em shaker | 37 |
| 3.4.1.2 FSbm em biorreatores..... | 41 |
| 3.4.2 Fermentação submersa em dois-estágios..... | 43 |
| 3.5 Obtenção do licor: tratamento de autohidrólise..... | 44 |
| 3.6 Obtenção das preparações enzimáticas..... | 44 |
| 3.7 Dosagens enzimáticas..... | 46 |
| 3.7.1 Xilanase e Celulase..... | 46 |
| 3.7.2 β -xilosidase..... | 47 |
| 3.8 Dosagem protéica | 47 |
| 3.9 Biomassa úmida..... | 47 |
| 3.10 Biobranqueamento da polpa de celulose | 48 |
| 3.10.1 Polpa | 48 |
| 3.10.2 Consistência da polpa (%) | 48 |
| 3.10.3 Tratamento enzimático da polpa..... | 48 |
| 3.10.4 Determinação do número kappa | 49 |
| 3.10.5 Determinação da viscosidade | 51 |
| 3.10.6 Determinação da alvura | 51 |
| 3.10.7 Cálculos da eficiência de deslignificação e redução da viscosidade | 52 |
| 3.11 Estudos de microscopia | 52 |
| 3.11.1 Microscopia óptica | 52 |
| 3.11.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... | 52 |

| | |
|---|-----------|
| 3.12 Purificação das xilanases e β -xilosidase de <i>Aspergillus ochraceus</i> | 54 |
| 3.13 Caracterização bioquímica | 56 |
| 3.14 Análises eletroforéticas | 57 |
| 3.14.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes (PAGE) . | |
| | 57 |
| 3.14.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) | |
| | 57 |
| 3.15 Cromatografia em camada delgada de sílica do produto de hidrólise - TLC | 58 |
| 3.16 Conteúdo de carboidrato..... | 59 |
| 3.17 Análise cinética: K_M e $V_{m\acute{a}x}$ | 59 |
| 3.18 Dicroísmo circular (CD)..... | 60 |
| 3.19 Sequenciamento N-terminal | 60 |
| 3.20 Reprodutibilidade | 61 |
| | |
| 4. RESULTADOS | 62 |
| Parte 1: Screening de fungos filamentosos produtores de xilanase | 63 |
| 4.1.1 Prospecção de fungos filamentosos..... | 64 |
| 4.1.2 Seleção dos microrganismos | 65 |
| Parte 2: Produção de enzimas xilanolíticas por <i>Aspergillus terricola</i> e <i>Aspergillus</i> | |
| <i>ochraceus</i> | 68 |
| 4.2.1 Seleção do meio de cultura..... | 69 |
| 4.2.2 Efeito da fonte de carbono..... | 70 |
| 4.2.3 Tempo de cultivo | 73 |
| 4.2.4 Temperatura de cultivo..... | 75 |
| 4.2.5 Cultivos estático e sob agitação..... | 75 |
| 4.2.6 Xilanase | 78 |
| 4.2.6.1 Determinação da temperatura e pH ótimos de reação | 78 |
| 4.2.6.2 Termoestabilidade das xilanases extracelulares | 78 |

| | |
|--|------------|
| 4.2.6.3 Estabilidade ao pH..... | 83 |
| 4.2.7 β -xilosidase..... | 83 |
| 4.2.7.1 Determinação da temperatura e pH ótimos de reação | 83 |
| 4.2.7.2 Estabilidade à temperatura e ao pH | 86 |
| Parte 3: Aplicação das xilanases no biobranqueamento da polpa de celulose..... | 88 |
| 4.3.1 Aplicação das xilanases de <i>A. terricola</i> e <i>A. ochraceus</i> na polpa de celulose | 89 |
| 4.3.2 Análise das polpas de celulose em Microscopia Eletrônica de Varredura..... | 90 |
| Parte 4: Produção de enzimas xilanolíticas usando licor de autohidrólise de resíduos agroindustriais e Biorreatores..... | 92 |
| 4.4.1 Produção de xilanases a partir de resíduos agroindustriais e licores de autohidrólise de resíduos agroindustriais | 94 |
| 4.4.1.1 Farelo de trigo e licor de autohidrólise de palha de trigo | 94 |
| 4.4.1.2 Sabugo de milho e licor de autohidrólise de sabugo de milho | 98 |
| 4.4.2 Biorreatores | 105 |
| 4.4.2.1 <i>Aspergillus terricola</i> | 105 |
| 4.4.2.2 <i>Aspergillus ochraceus</i> | 110 |
| Parte 5: Purificação e caracterização bioquímica das xilanases e β-xilosidase produzidas por <i>Aspergillus ochraceus</i>..... | 112 |
| 4.5.1 Cultivo em dois-estágios | 114 |
| 4.5.2 Concentração de xilana no cultivo..... | 116 |
| 4.5.3 Etapas de purificação das xilanases e β -xilosidase produzidas por <i>Aspergillus ochraceus</i> | 116 |
| 4.5.3.1 Coluna cromatográfica DEAE-celulose | 116 |
| 4.5.3.2 Coluna cromatográfica Biogel P-60 | 118 |
| 4.5.3.3 Coluna cromatográfica Sephadex G-100..... | 118 |
| 4.5.3.4 Coluna cromatográfica Biogel P-60 | 118 |
| 4.5.4 Critério de pureza | 121 |
| 4.5.5 Determinação da massa molecular | 121 |
| 4.5.6 Análise do produto de hidrólise em TLC | 125 |

| | |
|---|------------|
| 4.5.7 Determinação da temperatura e pH ótimos das enzimas purificadas | 128 |
| 4.5.8 Estabilidade à temperatura e ao pH das enzimas purificadas | 128 |
| 4.5.9 Influência de íons, EDTA e 2-mercaptoetanol | 133 |
| 4.5.10 Determinação do conteúdo de carboidratos..... | 138 |
| 4.5.11 Hidrólise de substratos..... | 138 |
| 4.5.12 Análises cinéticas | 139 |
| 4.5.13 Análise estrutural das endoxilanasas e β -xilosidase purificadas através de dicroísmo circular (CD)..... | 144 |
| 4.5.14 Sequenciamento N-terminal | 145 |
| | |
| 5. DISCUSSÃO | 151 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 186 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 189 |
| 8. APÊNDICE | 209 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos de DNA 18S..... | 3 |
| Figura 2. Arvore parcimoniosa obtida a partir da sequência de DNA de genes codificando xilanases da família 11 | 5 |
| Figura 3. Micrografias de <i>Aspergillus terricola</i> e <i>Aspergillus ochraceus</i> | 7 |
| Figura 4. Representação esquemática da parede celular secundária | 9 |
| Figura 5. Representação esquemática da estrutura da xilana e pontos onde as enzimas xilanolíticas atuam..... | 12 |
| Figura 6. Regulação da biossíntese de enzimas xilanolíticas | 14 |
| Figura 7. Estrutura representativa das enzimas de várias famílias glicosídeo hidrolase..... | 17 |
| Figura 8. Esquema do processo de produção da polpa de celulose para fabricação de papel.. | 20 |
| Figura 9. Exportações e importações de enzimas industriais referentes ao ano de 1997, 2001, 2004 e 2007 | 24 |
| Figura 10. Áreas de reflorestamento do <i>Campus</i> da USP de Ribeirão Preto | 34 |
| Figura 11. Biorreatores utilizados nos experimentos de escalonamento da produção enzimática..... | 43 |
| Figura 12. Esquema do processo de produção dos licores de autohidrólise | 45 |
| Figura 13. Materiais utilizados e obtidos no processo de autohidrólise para a produção dos licores de palha de trigo e sabugo de milho..... | 45 |
| Figura 14. Etapas de purificação das enzimas xilanolíticas produzidas por <i>A. ochraceus</i> | 56 |
| Figura 15. Espectro de dicroísmo circular de uma proteína típica para motivos estrutural secundário particular usado em programas de alinhamento da estrutura protéica em dicroísmo circular | 61 |
| Figura 16. Influência do tempo de cultivo na produção de xilanases extracelulares | 74 |
| Figura 17. Influência da temperatura de cultivo na produção de xilanases extracelulares | 76 |
| Figura 18. Influência da aeração na produção de xilanases extracelulares | 77 |
| Figura 19. Influência da temperatura e do pH na reação das xilanases extracelulares | 79 |

| | |
|--|-----|
| Figura 20. Termoestabilidade das xilanases extracelulares em várias temperaturas..... | 81 |
| Figura 21. Termoestabilidade das xilanases extracelulares em vários tempos | 82 |
| Figura 22. Estabilidade ao pH das xilanases extracelulares | 84 |
| Figura 23. Influência da temperatura e do pH na reação da β -xilosidase extracelular | 85 |
| Figura 24. Estabilidade à temperatura e ao pH da β -xilosidásica extracelular | 87 |
| Figura 25. Micrografias da polpa de celulose usando microscopia eletrônica de varredura.... | 91 |
| Figura 26. Produção de xilanases e β -xilosidase por <i>A. terricola</i> e <i>A. ochraceus</i> utilizando licor de palha de trigo com vários tempos de autohidrólise | 96 |
| Figura 27. Produção de xilanases e β -xilosidase por <i>A. terricola</i> e <i>A. ochraceus</i> utilizando várias combinações do licor de palha de trigo com 15 minutos de autohidrólise | 99 |
| Figura 28. Produção de xilanases e β -xilosidase por <i>A. terricola</i> e <i>A. ochraceus</i> utilizando licor de sabugo de milho com vários tempos de autohidrólise..... | 103 |
| Figura 29. Produção de xilanases e β -xilosidase por <i>A. terricola</i> e <i>A. ochraceus</i> utilizando várias combinações do licor de sabugo de milho com 30 minutos de autohidrólise..... | 104 |
| Figura 30. Fermentações no reator STR com <i>A. terricola</i> | 108 |
| Figura 31. Fermentações no reator Air-lift com <i>A. terricola</i> | 109 |
| Figura 32. Fermentações no reator STR com <i>A. ochraceus</i> | 111 |
| Figura 33. Influência do cultivo em dois-estágios na produção de xilanase e β -xilosidase por <i>A. ochraceus</i> | 115 |
| Figura 34. Influência da concentração de xilana oat spelt na produção de xilanase e β -xilosidase por <i>A. ochraceus</i> | 117 |
| Figura 35. Perfis cromatográficos das atividades xilanásicas e β -xilosidásica produzidas por <i>A. ochraceus</i> | 119 |
| Figura 36. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes (PAGE) das xilanases e β -xilosidase de <i>A. ochraceus</i> | 122 |
| Figura 37. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) das xilanases e β -xilosidase de <i>A. ochraceus</i> | 123 |

| | |
|--|-----|
| Figura 38. Determinação das massas moleculares das xilanases e β -xilosidase de <i>A. ochraceus</i> através de SDS-PAGE..... | 124 |
| Figura 39. Cromatografia em camada delgada de sílica do produto de hidrólise da ação das endoxilanases sob xilana birchwood | 126 |
| Figura 40. Cromatografia em camada delgada de sílica do produto de hidrólise da ação da β -xil sob xilana birchwood e sob os produtos de hidrólise da “xil 2” | 127 |
| Figura 41. Influência da temperatura e do pH na reação das endoxilanases e da β -xilosidase de <i>A. ochraceus</i> | 129 |
| Figura 42. Termoestabilidade das endoxilanases e β -xilosidase de <i>A. ochraceus</i> em função do tempo de incubação | 131 |
| Figura 43. Estabilidade ao pH das endoxilanases e β -xilosidase de <i>A. ochraceus</i> | 132 |
| Figura 44. Análise do sítio de hidrólise da β -xilosidase de <i>A. ochraceus</i> para os substratos sintéticos <i>pNF-xil</i> e <i>pNF-glu</i> | 141 |
| Figura 45. Representação gráfica do K_M e da $V_{m\acute{a}x}$ das endoxilanases “xil 1” e “xil 2” frente ao substrato xilana birchwood | 142 |
| Figura 46. Representação gráfica do K_M e da $V_{m\acute{a}x}$ da endoxilanase “xil 3” frente ao substrato xilana birchwood e da β -xilosidase frente ao substrato <i>pNF-xil</i> | 143 |
| Figura 47. Espectro de dicroísmo circular na região de UV distante das endoxilanases “xil 2” e “xil 3”, e da β -xilosidase de <i>A. ochraceus</i> | 146 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Famílias glicosídeo hidrolase contendo enzimas com atividade demonstrada em xilana | 16 |
| Tabela 2. Produção de matéria-prima e seus resíduos no Brasil em 2004 | 26 |
| Tabela 3. Material e georreferenciamento das áreas coletadas..... | 35 |
| Tabela 4. Fungos filamentosos isolados durante a coleta..... | 64 |
| Tabela 5. Seleção dos microrganismos quanto à produção de xilanase | 66 |
| Tabela 6. Seleção do meio de cultura para a produção de xilanase..... | 70 |
| Tabela 7. Seleção da melhor fonte de carbono para a produção de xilanase..... | 72 |
| Tabela 8. Seleção da melhor fonte de carbono para a produção de β -xilosidase | 73 |
| Tabela 9. Branqueamento da polpa de celulose tratada com xilanases produzidas por <i>A. terricola</i> e <i>A. ochraceus</i> | 90 |
| Tabela 10. Etapas de purificação das xilanases e β -xilosidase extracelulares produzidas por <i>A. ochraceus</i> | 120 |
| Tabela 11. Efeito de íons, EDTA, 2-mercaptoetanol na atividade enzimática da “xil 1” de <i>A. ochraceus</i> | 134 |
| Tabela 12. Efeito de íons, EDTA, 2-mercaptoetanol na atividade enzimática da “xil 2” de <i>A. ochraceus</i> | 135 |
| Tabela 13. Efeito de íons, EDTA, 2-mercaptoetanol na atividade enzimática da “xil 3” de <i>A. ochraceus</i> | 136 |
| Tabela 14. Efeito de íons, EDTA, 2-mercaptoetanol na atividade enzimática da “ β -xil” de <i>A. ochraceus</i> | 137 |
| Tabela 15. Hidrólise de substrato pelas endoxilanases produzidas por <i>A. ochraceus</i> | 140 |
| Tabela 16. Hidrólise de substrato pela β -xilosidase produzida por <i>A. ochraceus</i> | 140 |
| Tabela 17. Análises cinéticas das endoxilanases e da β -xilosidase produzidas por <i>A. ochraceus</i> | 141 |
| Tabela 18. Análise de sequência da endoxilanase “xil 2” de <i>A. ochraceus</i> e comparação com outras proteínas fúngicas | 148 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 19. Análise de sequência da endoxilanase “xil 3” de <i>A. ochraceus</i> e comparação com outras proteínas fúngicas | 149 |
| Tabela 20. Análise de sequência da β -xilosidase de <i>A. ochraceus</i> e comparação com outras proteínas fúngicas | 150 |

Lista de Abreviaturas e Símbolos

| | |
|---|--|
| ®: marca registrada | mm: milímetro |
| %: por cento | mM: milimolar |
| °C: grau Celsius | min: minuto |
| µg: micrograma | N: normal |
| µl: microlitro | nm: nanômetro |
| µmol: micromol | P: padrão |
| A_D: absorção da luz circularmente polarizada à direita | PA: “ <i>pro analyse</i> ” |
| A_E: absorção da luz circularmente polarizada à esquerda | PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida |
| BLAST: “Basic Local Alignment Search Tool” | PDA: “potato dextrose agar” |
| BSA: albumina de soro bovino | pI: ponto isoelétrico |
| cm: centímetro | PI: pico um |
| CMC: carboximetilcelulose | PII: pico dois |
| CD: dicroísmo circular | pmol: picomol |
| CPL: “Circularly Polarized Light” | pNF-xil: <i>p</i> -nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo |
| DEAE-celulose: dietilaminoetil-celulose | pNF-glu: <i>p</i> -nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo |
| DNS: ácido 3',5'-dinitrosalicílico | p/v: peso por volume |
| EC: “Enzyme Commission” | q.s.p.: quantidade suficiente para |
| EDTA: ácido etilenodiaminotetracético | Rf: coeficiente de relação de migração |
| FES: fermentação em estado sólido | rpm: rotação por minuto |
| FSbm: fermentação submersa | SDS: duodecil sulfato de sódio |
| g: grama | STR: “Stirred Tank Reactor” |
| g: gravidade | TAPPI: “Technical Association of the Pulp and Paper Industry” |
| GPS: “Global Positioning System” | TCA: ácido tricloroacético |
| h: hora | TCH: tiocarboidrazida |
| HMF: hidroximetilfurfural | TLC: “Thin Layer Chromatography” |
| IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística | Tris: trietanolamina |
| ISO: “International Organization for Standardization” | t₅₀: 50% da atividade inicial |
| kDa: kilo Dalton | UNU: “United Nations University” |
| Kgf: quilograma-força | U: unidade |
| K_M: constante de Michaelis-Menten | UV: ultravioleta |
| kV: kilovolt | V: volt |
| L: litro | VCP: Votorantin Celulose e Papel |
| Log: logaritmo | V₀: velocidade inicial |
| m: metro | V_{máx}: velocidade máxima |
| M: molar | v/v: volume por volume |
| mA: miliampére | vvm: volume de ar por volume de meio por minuto |
| MEV: microscopia eletrônica de varredura | X₁: xilose |
| mg: miligrama | X₂: xilobiose |
| mL: mililitro | ZERI: “Zero Emissions Research Initiative” |
| M.L.C.: material lignocelulósico | |

RESUMO

Aspergillus terricola e *Aspergillus ochraceus* foram selecionados entre 35 fungos filamentosos para estudo de xilanases. Estes apresentaram condições ótimas de cultivo em meios Vogel e Adams, respectivamente, suplementados com xilana birchwood 1%, incubados a 30°C, em condições estáticas, por 144 h para *A. terricola* e 120 h para *A. ochraceus*. Para *A. terricola*, altos níveis xilanolíticos também foram observados em meio adicionado de farelo de trigo. Máxima atividade de xilanase foi obtida a 60°C e pH 6,5 para *A. terricola*, e 65°C e 5,0 para *A. ochraceus*. Xilanase de *A. terricola* foi completamente estável a 55°C por 2 h, apresentando um t_{50} de cerca de 80 min a 60°C e 10 min a 65°C, enquanto a xilanase de *A. ochraceus* foi estável por 2 h a 50°C, exibindo um t_{50} em torno de 65 min a 55°C e 10 min a 60°C. As xilanases produzidas por ambos os microrganismos foram estáveis em toda faixa de pH testada (2,5–8,0), por 1 h. Os maiores níveis de β -xilosidase foram produzidos por *A. ochraceus*. Esta enzima apresentou temperatura e pH ótimos a 75°C e 3,0–5,0, respectivamente, e estabilidade até 60°C (pelo menos 50% da atividade inicial) em todos os pH testados, por 1 h.

Preparações enzimáticas de *A. terricola* e *A. ochraceus* foram utilizadas no branqueamento da polpa de celulose: xilanases de *A. ochraceus* diminuíram 4,3 pontos do número kappa (correspondendo a uma eficiência de deslignificação de 36,4%), aumentaram 2,4% ISO na alvura e mantiveram a viscosidade; xilanases de *A. terricola* reduziram 1,1 pontos do kappa, aumentaram 3,4% ISO na alvura e reduziram 8,6% a viscosidade. Análises das polpas de celulose bibranqueadas em MEV mostrou desfibrilação das microfibrilas.

Licores de palha de trigo e sabugo de milho com 5, 15, 30 e 50 min de autohidrólise foram utilizados em combinação, ou isoladamente, com farelo de trigo e sabugo de milho, respectivamente, como substratos para a indução enzimática. A melhor produção foi obtida com os licores de palha de trigo e sabugo de milho com 15 e 30 min de autohidrólise, respectivamente, em combinação com os seus relativos resíduos. Aumentos em torno de 20–30% para as atividades xilanásica e β -xilosidásica de *A. ochraceus* foram observados quando comparados com xilana birchwood. Para *A. terricola* foram observados aumentos de 50 a 90% para a β -xilosidase utilizando 100% do licor de palha de trigo. Escalonamento da produção enzimática foi realizado em biorreatores STR e do tipo Air-lift para *A. terricola*, utilizando farelo de trigo 0,5% como substrato. Verificou-se que aeração e condição de inóculo influenciaram significativamente na produção enzimática, e que os maiores níveis enzimáticos foram observados no reator Air-lift. Produção das enzimas xilanolíticas foi detectada quando *A. ochraceus* foi cultivado no reator STR utilizando farelo de trigo 1% adicionado de licor de palha de trigo 10% com 15 min de autohidrólise.

Para os propósitos de purificação das endoxilanases e β -xilosidase produzidas por *A. ochraceus* foi utilizado um sistema de cultivo em dois-estágios, sendo inicialmente usado um meio rico para o crescimento do fungo e posteriormente um meio para a indução de xilanases. O extrato bruto obtido foi aplicado em colunas cromatográficas DEAE-celulose e diferentes tipos de filtração (Biogel P-60 e Sephadex G-100) onde se obtiveram: uma endoxilanase parcialmente purificada (xil 1), e duas endoxilanases (xil 2 e xil 3) e uma β -xilosidase (β -xil) purificadas. As massas moleculares corresponderam a 39 kDa ou 28 kDa para a “xil 1”; 25 kDa – “xil 2”; 33 kDa – “xil 3”, e 137 kDa – β -xil por SDS-PAGE. Análises em TLC confirmaram tratar-se de endoxilanases e β -xilosidase. As temperaturas ótimas foram 60°C e 70°C, respectivamente. O pH ótimo da “xil 1” e “xil 2” foi estimado em 6,0; da “xil 3” em 5,5 e da β -xil em 4,5. Em relação à termoestabilidade, a “xil 1” foi estável a 50°C por 30 min, e a 55°C apresentou um t_{50} de 20 min. A “xil 2” foi estável a 50°C e 55°C por 1 h, e a 60°C apresentou um t_{50} de 25 min. A “xil 3” foi completamente estável a 50°C e 55°C por 1 h, e a 60°C manteve mais de 60% da atividade residual. A β -xil foi estável a 60°C e a 70°C por 1 h. Em relação ao pH, a “xil 1” e “xil 3” foram estáveis na faixa de pH 3,0 – 8,0 durante 1 h. A

“xil 2” foi estável em pH 4,0 a 8,0; e a β -xil de pH 3,0 a 6,5. As endoxilanases “xil 1”, “xil 2” e “xil 3”, e a β -xil apresentaram-se como glicoproteínas com cerca de 74%, 67%, 20% e 39% de carboidrato, respectivamente. As atividades de “xil 1” e “xil 2” aumentaram na presença de $MnCl_2$ e $CoCl_2$ – 5 e 10mM. Manganês (1mM) também foi favorável para a atividade da “xil 3”, e para a β -xil nenhum íon ativou-a de forma significativa. As endoxilanases hidrolisaram preferencialmente xilana birchwood à oat spelt, enquanto a β -xilosidase hidrolisou os substratos sintéticos *pNF*-xilopiranosídeo e *pNF*-glucopiranosídeo, respectivamente, no entanto, em sítios ativos diferentes. Os valores de K_M e $V_{máx}$ sugerem que a “xil 1” apresenta maior afinidade e eficiência catalítica por xilana birchwood do que a “xil 2” e a “xil 3”. O valor de K_M e $V_{máx}$ calculado para a β -xil frente ao substrato *pNF*-xilopiranosídeo foi de 0,18 mg/mL e 39,34 U/mg proteína, respectivamente. Análises de dicroísmo circular das endoxilanases mostraram-se característicos de proteínas ricas em folha β , enquanto para a β -xilosidase foi observada uma mistura de α -hélice e folha β . As análises de sequenciamento de aminoácidos mostraram identidade entre as sequências das xilanases e β -xilosidase de *A. ochraceus* e proteínas hipotéticas de outras espécies *Aspergillus*, e de outros fungos; além disso, a “xil 3” mostrou identidade com outras enzimas do sistema xilanolítico.

ABSTRACT

Aspergillus terricola and *Aspergillus ochraceus* were selected among 35 filamentous fungi for xylanase study. These presented optimal culture conditions at 30°C in Vogel and Adams media, respectively, supplemented 1% birchwood xylan, under static conditions, for 144 h for *A. terricola* and 120 h for *A. ochraceus*. For *A. terricola*, high xylanolytic levels were also observed in medium supplemented with wheat bran. Maximum xylanase activity was obtained at 60°C and pH 6.5 for *A. terricola*, and 65°C and pH 5.0 for *A. ochraceus*. *A. terricola* xylanase was fully stable after 2 h at 55°C, presenting a t_{50} of 80 min at 60°C and 10 min at 65°C, while *A. ochraceus* xylanase was stable for 2 h at 50°C, exhibiting a t_{50} of 65 min at 55°C and 10 min at 60°C. The xylanases produced for both microorganisms were stable at all pH in a range of 2.5–8.0, for 1 h. The highest levels of β -xylosidase were produced by *A. ochraceus*. This enzyme presented optima of temperature and pH at 75°C and 3.0–5.0, respectively, and stability up to 60°C (at least 50% initial activity) at all pH tested, for 1 h.

Enzymatic preparations of *A. terricola* and *A. ochraceus* were used in cellulose pulp bleaching assays: *A. ochraceus* xylanase reduced 4.3 points kappa number (corresponding to 36.4% delignification efficiency), increased 2.4% ISO brightness without affecting the viscosity; xylanase from *A. terricola* reduced 1.1 point kappa number, increased 3.4% ISO brightness, and reduced 8.6% viscosity. Biobleached cellulose pulp analysis in SEM showed defibrillation of the microfibrils.

Liquors of wheat straw and corn cob with 5, 15, 30 and 50 min of autohydrolysis were used in combination or individually with wheat bran and corn cob, respectively, as substrate for enzymatic induction. The best production was obtained with wheat straw and corn cob liquors, with 15 and 30 min of autohydrolysis, respectively, in combination with its relative residues. Increase around 20–30% for xylanase and β -xylosidase activities of *A. ochraceus* were observed when compared with birchwood xylan. For *A. terricola* were observed increases of 50 to 90% for β -xylosidase, using 100% wheat straw liquor. A large scale enzymatic production was carried out in a STR bioreactor and of the type Ai-lift for *A. terricola*, using 0.5% wheat bran as substrate. It was verified that aeration and inoculum size influenced significantly the enzymatic production, and the highest enzymatic levels were observed using Airlift reactor. Xylanolytic enzymes production was detected when *A. ochraceus* was cultivated in STR reactor using 1% wheat bran added of 10% wheat straw liquor with 15 min of autohydrolysis.

For purification purposes of the *A. ochraceus* endoxylanase and β -xylosidase was used a two-stage cultivation system, being initially used a rich medium to fungi growth and after a induction medium of xylanase. The crude extract obtained was chromatographed on DEAE-cellulose, and also in different types of gel sieving materials (Biogel P-60 and Sephadex G-100) where was obtained: a partially purified endoxylanase (xil 1), and two endoxylanases (xil 1 e xil 2) and a β -xylosidase (β -xyl). The molecular mass corresponded to 39 kDa or 28 kDa to “xil 1”; 25 kDa – “xil 2”; 33 kDa – “xil 3” and 137 kDa – β -xil by SDS-PAGE. TLC analysis confirmed the endoxylanase and β -xylosidase characters. The optimal temperatures were 60°C and 70°C, respectively. The optimum pH of the “xil 1” and “xil 2” was estimated in 6.0; 5.5 for “xil 3” and 4.5 for β -xil. Regarding thermostability, “xil 1” was stable at 50°C for 30 min, and at 55°C presented a t_{50} of 20 min. “xil 2” was stable at 50°C and 55°C for 1 h, and at 60°C presented a t_{50} of 25 min. “xil 3” was completely stable at 50°C and 55°C for 1 h, and at 60°C maintained more than 60% of residual activity. β -xil was stable at 60°C and 70°C for 1 h. In relation to pH, “xil 1” and “xil 3” were stable in the pH range 3.0–8.0 for 1 h. The “xil 2” was stable in the 4.0 to 8.0 pH; and the β -xil in 3.0 to 6.5 pH range. The endoxylanases “xil 1”, “xil 2” and “xil 3”, and β -xil were glycoproteins with a carbohydrate content around 74%, 67%, 20% and 39%, respectively. “xil 1” and “xil 2” activities increased

in presence of MnCl_2 and CoCl_2 – 5 and 10mM. Manganese (1mM) was also favorable for “xil 3” activity, and for β -xil no ion activated significantly the enzyme. The endoxylanases hydrolyzed preferentially birchwood xylan in relation to oat spelt xylan, while β -xylosidase hydrolyzed the synthetic substrates *p*NP-xyloside and *p*NP-glucoside, respectively, however in different active site. The K_M and V_{\max} values suggested which “xil 1” presented more affinity and catalytic efficiency by birchwood xylan than “xil 2” and “xil 3”. The K_M and V_{\max} value calculated for β -xil using *p*NP-xyloside as substrate was 0.18 mg/mL e 39.34 U/mg protein, respectively. Circular dichroism analysis of endoxylanases showed characteristic of β -sheet rich protein, while for β -xylosidase was observed a mixture of α -helix and β -sheet. The amino acid sequencing analysis showed identity between the *A. ochraceus* xylanases and β -xylosidase sequence and *Aspergillus* hypothetic protein and from other fungi; besides the “xil 3” showed identity with other enzymes of xylanolytic system.

1. Introdução

O solo é constituído por uma enorme diversidade de microrganismos, assim como de compostos orgânicos que são fonte de energia e de carbono para tais organismos. Para a utilização desses compostos, os microrganismos sintetizam e secretam diversas enzimas. A prospecção de espécies do solo produtoras de enzimas é muito utilizada pelas indústrias, para a seleção de linhagens produtoras de enzimas com potencial de aplicação biotecnológica (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

O uso de enzimas em processos industriais é de grande interesse, em especial devido à facilidade de obtenção (por biotecnologia) e às vantagens em relação aos catalisadores químicos, como maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade de reação. Além disso, a catálise enzimática tem outros benefícios, como o aumento da qualidade dos produtos, em relação à catálise química; a redução dos custos de laboratório e de maquinário, graças à melhoria do processo; ou a fabricação controlada de pequenas quantidades (MUSSATTO *et al.*, 2007).

1.1 Filogenia de fungos

Classicamente, estudos sobre a evolução fúngica têm sido baseados em comparações morfológicas, composição da parede celular (BARTNICKI-GARCIA, 1987), ensaios citológicos (TAYLOR, 1978), ultraestrutura (HEATH, 1986), metabolismo celular (VOGEL, 1964; LÉJOHN, 1974) e em registros fósseis (HAWKSWORTH *et al.*, 1995). Entretanto, mais recentemente com avanço na cladística e da biologia molecular, observa-se uma nova visão quanto à evolução do Reino Fungi.

Análises filogenéticas, baseadas na biologia molecular, mostram que o Reino Fungi é uma parte da radiação terminal dos grupos eucarióticos, que ocorreu há um bilhão de anos (SOGIN, 1989; TAYLOR *et al.*, 1994). Durante muito tempo, os fungos foram incluídos no Reino Vegetal e, somente a partir de 1969, passaram a ser classificados em um reino à parte

por apresentarem um conjunto de características próprias que permitem sua diferenciação das plantas, tais como: ausência de pigmento fotossintético e celulose na parede celular (exceto alguns fungos aquáticos), e por não armazenarem amido como substância de reserva. Vale ressaltar que, a presença de substâncias quitinosas na parede da maior parte das espécies fúngicas e a sua capacidade de depositar glicogênio os assemelham às células animais.

Posteriormente, os fungos foram considerados classicamente um ramo filogenético do reino das plantas, entretanto, atualmente, existe evidências de que o Reino Fungi está mais relacionado ao Animalia do que com Plantae (NIKOH *et al.*, 1994) (**Figura 1**). Outra hipótese, já descartada, propunha que os fungos tivessem derivado de algas.

Segundo WHITTAKER (1969), os fungos estão divididos em dois grandes grupos: o grupo *Myxomycota*, constituído de fungos inferiores, sem parede celular e caracterizam-se por não serem patogênicos ao homem nem aos outros animais, e o grupo *Eumycota*, constituídos por fungos verdadeiros, os quais apresentam parede celular e podem ser agentes patogênicos (WHITTAKER, 1969; GUARRO *et al.*, 1999).

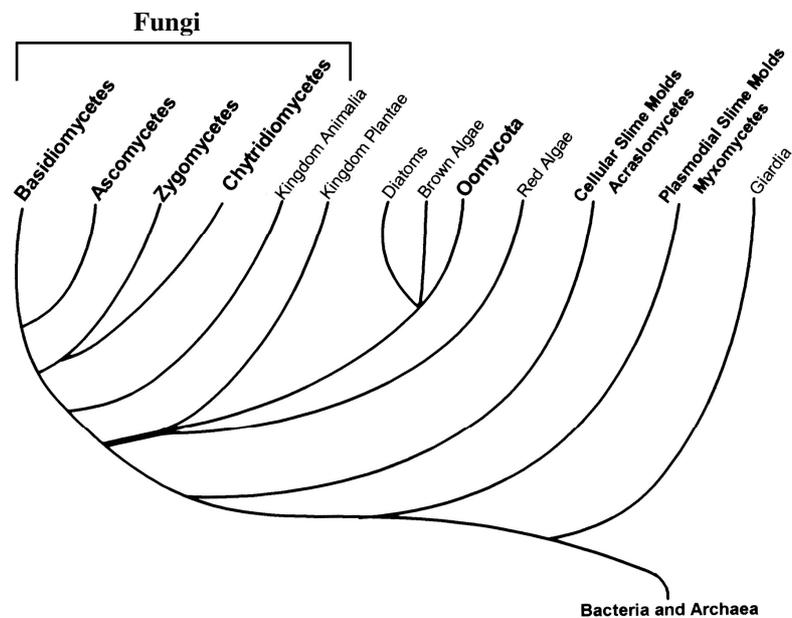


Figura 1. Árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos de DNA 18S (GUARRO *et al.*, 1999).

Em relação à filogenia entre espécies fúngicas, DEGEFU e colaboradores (2004) construíram uma árvore filogenética baseada na seqüência de DNA de xilanases da família 11, de 51 microrganismos entre bactérias e fungos, incluindo algumas espécies de *Aspergillus*. Inicialmente, foram realizadas, separadamente, análises utilizando seqüências de proteínas e DNA. No entanto, embora ambos os tipos de seqüências resultaram em uma topologia similar, os dados de DNA foram escolhidos para o estudo, visto que a árvore de DNA apresentou melhor suporte dos grupos. O alinhamento das regiões conservadas dos 51 genes de xilanases resultou em dados parcimoniosos, recuperando, portanto, uma árvore parcimoniosa (**Figura 2**).

Os *Aspergillus* são fungos filamentosos, cosmopolitas e ubíquos. São encontrados na natureza, e comumente isolados do solo, resíduos vegetais, e do ar. Enquanto um estado teleomórfico (sexual) tem sido descrito apenas para algumas espécies dos *Aspergillus*, outros são aceitos ser mitospórico (assexual), sem qualquer conhecimento de produção de esporo sexual. Este gênero inclui mais de 185 espécies, sendo que cerca de 20 destas têm sido reportadas como agentes causadores de infecções oportunistas no homem. Foi catalogado no ano de 1729, pelo padre italiano e biólogo Pietro Antonio Micheli.

O gênero *Aspergillus* é um modelo biológico clássico e em geral tem grande relevância prática, por existirem espécies produtoras de enzimas industriais importantes, ácidos orgânicos e outros produtos (BENNET, 1985). São versáteis ascomicetos capazes de invadir substratos sólidos para secretar enzimas degradativas transformando rapidamente um largo espectro de compostos aromáticos relacionados à lignina. Na natureza, eles são participantes essenciais do complexo de microrganismos saprófitas, responsáveis pela decomposição da madeira.

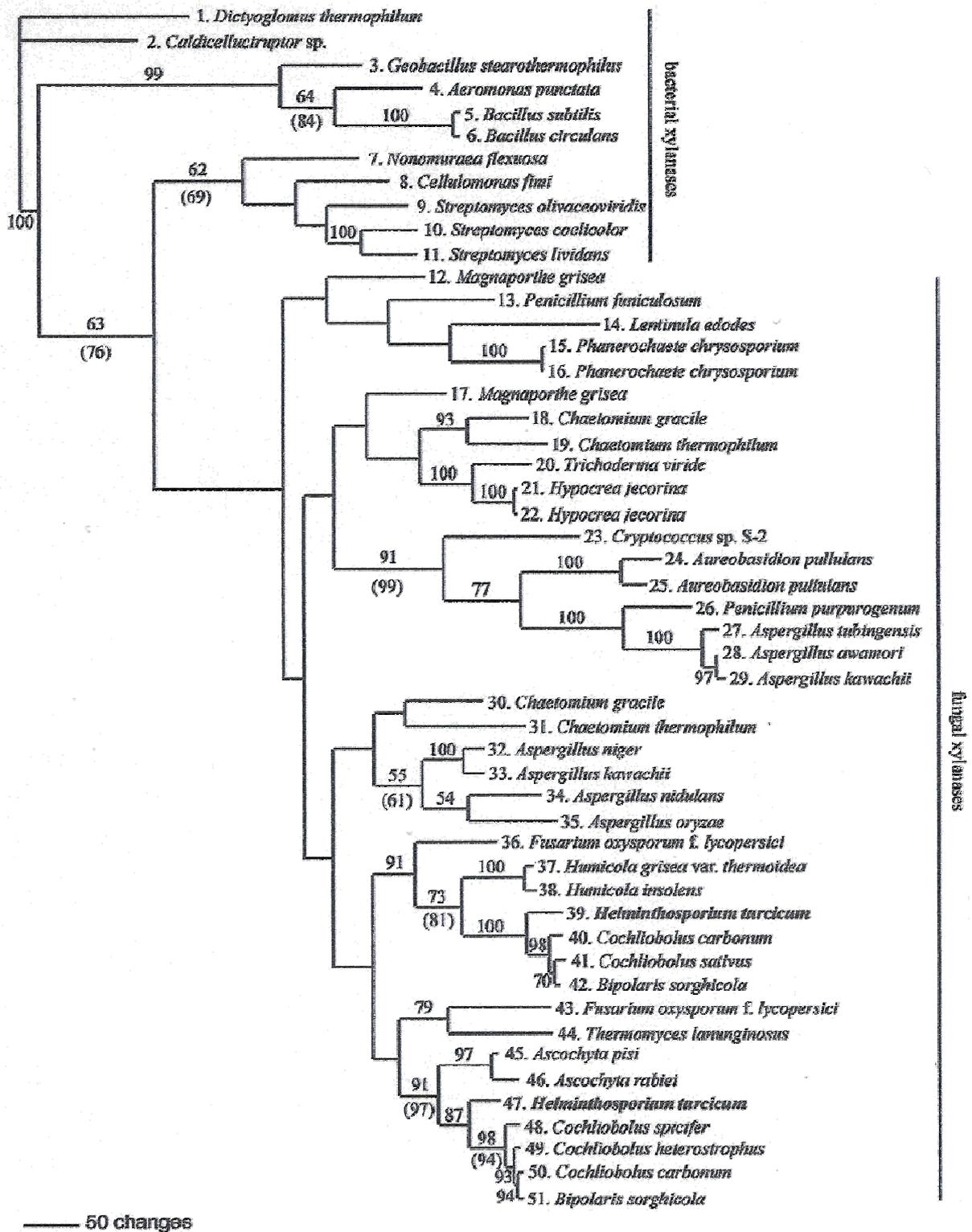


Figura 2. Árvore parcimoniosa obtida a partir da sequência de DNA de genes codificando xilanases da família 11. Os valores de “bootstrap” estão mostrados nos nós da árvore (DEGEFU *et al.*, 2004).

1.2 Xilanases de fungos de origem mesofílica

Os estudos de microrganismos que utilizam a xilana, e de seus sistemas enzimáticos estão se tornando cada vez mais importantes ecológica e economicamente. Estas enzimas são produzidas por microrganismos mesofílicos e termofílicos (SMITH, 1991), e têm sido amplamente detectadas e estudadas em fungos e bactérias (SHAO & WIEGEL, 1992; KHASIN *et al.*, 1993; BRECCIA *et al.*, 1998; MAHESHWARI *et al.*, 2000; LAMA *et al.*, 2004; DUTTA *et al.*, 2007), sendo que fungos filamentosos têm sido amplamente usados como produtores de enzimas e são geralmente considerados produtores de xilanases mais potentes que bactérias e leveduras (HALTRICH *et al.*, 1996; POLIZELI *et al.*, 2005; PEDERSEN *et al.*, 2007).

Entre os fungos mesofílicos, a produção comercial de xilanases é destacada nos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*, devido ao seu potencial de termotolerância e produção de enzimas termoestáveis (CASTRO *et al.*, 1997; PEDERSEN *et al.*, 2007). Estas enzimas são de interesse porque a elevação da temperatura de reação (até um certo limite), geralmente, aumenta a taxa de reação e reduz os riscos de contaminação microbiana (COLLINS *et al.*, 2005; PEDERSEN *et al.*, 2007). Além disso, a produção por cepas fúngicas mostra-se mais vantajosa pela facilidade de extração da enzima do ponto de vista industrial, já que os fungos sintetizam enzimas extracelulares que são lançadas em um substrato externo e, portanto, elimina-se a etapa de rompimento celular (HALTRICH, 1996).

A produção de xilanases já foi descrita em diferentes espécies de *Aspergillus*: *A. aculeatus* (FUJIMOTO *et al.*, 1995), *A. awamori* (KORMELINK *et al.*, 1993; VERBRUGGEN *et al.*, 1998); *A. brasiliensis* (PEDERSEN *et al.*, 2007), *A. caespitosus* (SANDRIM *et al.*, 2005), *A. carbonarius* (PEDERSEN *et al.*, 2007), *A. fischeri* (RAJ & CHANDRA, 1996), *A. foetidus* (PEDERSEN *et al.*, 2007), *A. fumigatus* (PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2009), *A. japonicus* (KITAOKA *et al.*, 1993), *A. kawachii* (TENKANEN

et al., 1997), *A. nidulans* (TANEJA *et al.*, 2002), *A. niveus* (PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2009; BETINI *et al.*, 2009) *A. niger* (ZHAO *et al.*, 2002; BETINI *et al.*, 2009), *A. oryzae* (PUCHART & BIELY 2007), *A. phoenicis* (RIZZATTI *et al.*, 2001), *A. sojae* (KIMURA *et al.*, 1995), *A. sydowii* (GHOSH & NANDA, 1994), *A. tamarii* (KADOWAKI *et al.*, 1997), *A. terreus* (GHANEN *et al.*, 2000), *A. versicolor* (CARMONA *et al.*, 1997), entre outros.

Este trabalho foi realizado com os fungos *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus* (**Figura 3**), isolados em nosso laboratório a partir do caule da árvore *Hovenia dulcis*, e solo e materiais em decomposição, respectivamente, na região de Ribeirão Preto – SP. As linhagens foram classificadas e depositadas como *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus* na Universidade Federal de Pernambuco.

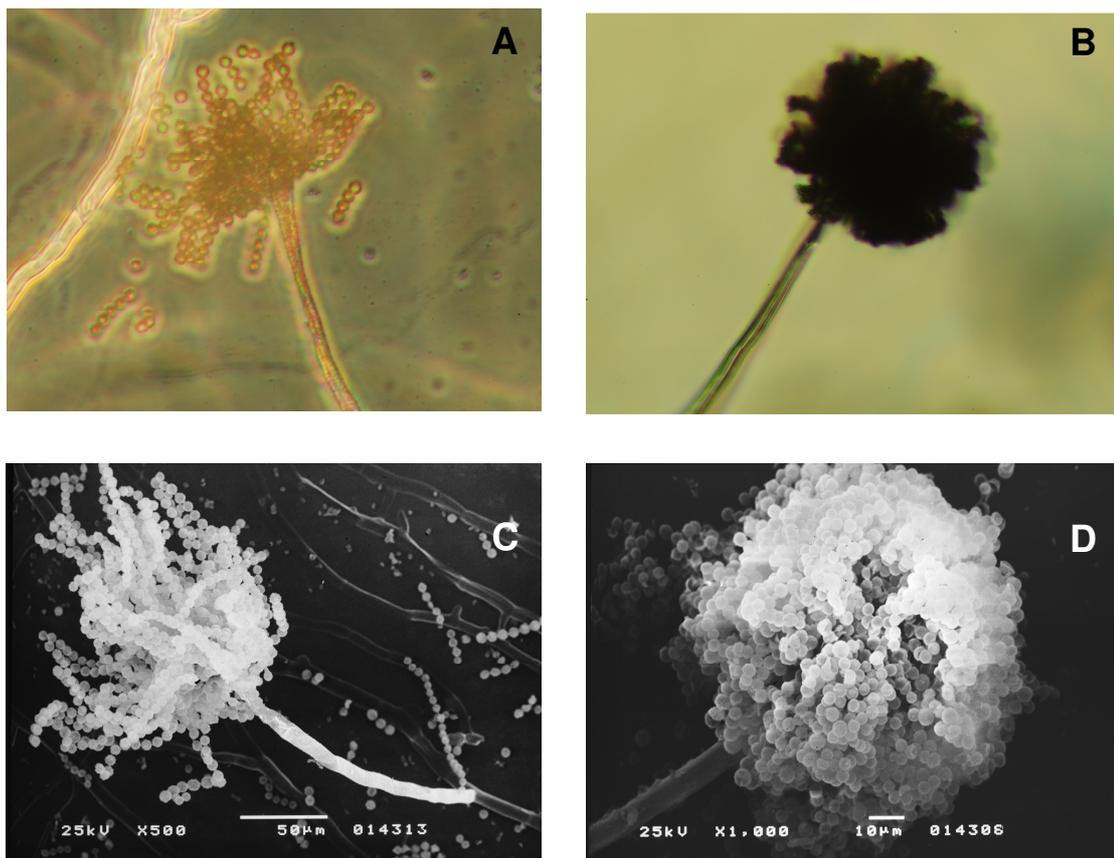


Figura 3. Micrografia de *Aspergillus terricola* (A, C) e *Aspergillus ochraceus* (B, D). Microscopia óptica de luz em um aumento de 400 vezes (A, B) e microscopia eletrônica de varredura (C, D).

1.3 Estrutura da xilana

A madeira é um complexo constituído por substâncias naturais como celulose (40 – 50%), hemicelulose (20 – 35%), lignina (15 – 35%), extrativos (3 – 10%) e compostos minerais (0,5%); mas é importante lembrar que a composição química da parede também é dependente 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; D'ALMEIDA, 1981; LEPAGE, 1986; SAKA, 2001; POLIZELI, 2009).

As hemiceluloses incluem um grande grupo de heteropolissacarídeos ramificados de alto peso molecular, insolúveis em água, mas solúveis em soluções alcalinas. Estes polissacarídeos estão associados à celulose e lignina (**Figura 4**) e tem um importante papel estruturalmente sustentador na formação da parede celular de plantas (BIDLACK *et al.*, 1992; NAKAMURA, 2003; POLIZELI *et al.*, 2005).

Elas são classificadas de acordo com o açúcar presente em sua molécula. Assim, a xilana é um homopolímero linear que contém monômeros de β -D-xilopiranosil unidos por ligações glicosídicas β -1,4 com um grau de polimerização na faixa de 70 a 200 (KULKARNI *et al.*, 1999; SUBRAMANIYAN & PREMA, 2002; SAHA, 2003; YANG *et al.*, 2007; PEDERSEN *et al.*, 2007), mas que na natureza, geralmente está associada com outros açúcares formando glucuronoxilanas, glucuronoarabinoxilanas, glucomananas, arabinogalactanas e galactoglucomananas. A ocorrência de múltiplas formas de xilanases é o reflexo desta heterogeneidade da xilana de diversas origens (POLIZELI *et al.*, 2005; PUCHART & BIELY, 2007).

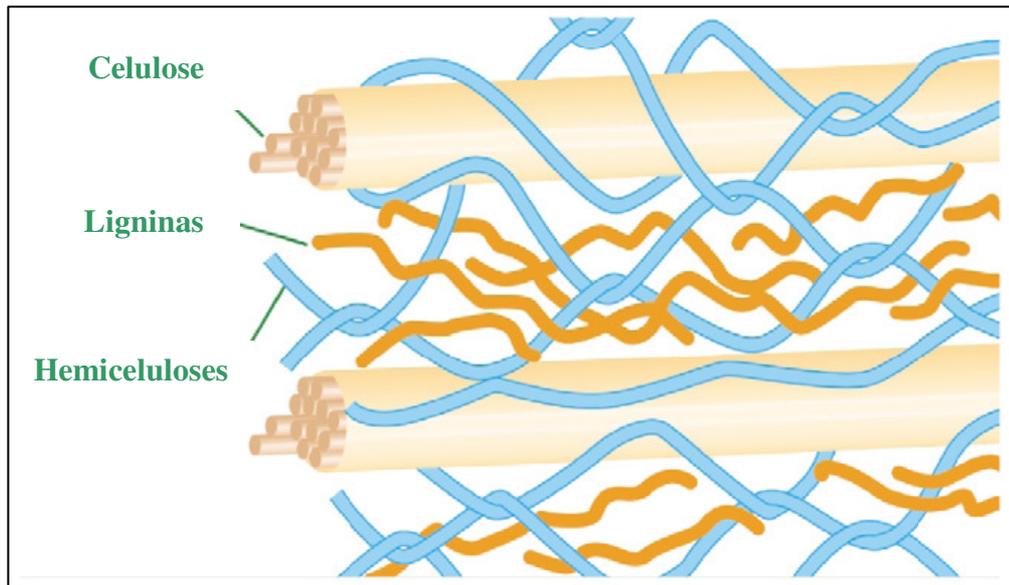


Figura 4. Representação esquemática da parede celular secundária (BOUDET *et al.*, 2003).

A xilana é o segundo mais abundante polissacarídeo natural (COLLINS *et al.*, 2005), e a principal hemicelulose de madeiras provenientes de angiospermas (15 – 30% do peso seco total), mas é menos abundante em madeiras de gimnospermas (7 – 12%) (HALTRICH *et al.*, 1996; POLIZELI *et al.*, 2005). A xilana de angiospermas, por exemplo, é formada por pelo menos 70 resíduos de β -xilopiranosil. Cada décimo resíduo de xilose carrega um ácido α -4-*O*-metilglucurônico. Além disso, estas xilanas são altamente acetiladas (70%). A acetilação pode ocorrer tanto no C2, quanto no C3, conferindo a xilana sua parcial solubilidade em água. Por estas razões são denominadas *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilana (COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993; POLIZELI *et al.*, 2005). A xilana de gimnospermas é composta por arabino-4-*O*-metilglucuronoxilana, apresentando um conteúdo maior em ácido 4-*O*-metilglucurônico do que as madeiras de angiospermas. Porém, as xilanas de gimnospermas não são acetiladas, e no lugar do grupo acetil apresentam um grupo α -L-arabinofuranosil unidos ao C3 da xilose por ligações glicosídicas α -1,3. (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997; POLIZELI *et al.*, 2005).

1.4 Sistema Xilanolítico

A degradação da xilana, devido a sua heterogeneidade estrutural, requer a ação de um sistema enzimático (**Figura 5**), o qual está presente em fungos e bactérias. Uma descrição dessas enzimas é feita a seguir:

→ **β -1,4-Endoxilanase:** (1,4- β -D-xilana xilohidrolase; EC 3.2.1.8) cliva ligações glicosídicas internas da cadeia principal da xilana, acarretando na 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 (REILLY, 1981; PULS & SCHUSEIL, 1993; LI *et al.*, 2000). Inicialmente, os principais produtos formados são os xilooligossacarídeos, mas, posteriormente, outros podem ser liberados como xilotriose, xilobiose e xilose. Várias classificações são atribuídas para as endoxilanases sendo que WONG e colaboradores (1988) dividem as endoxilanases em não-desramificadoras, as quais não catalisam a hidrólise nos pontos de ramificação 1,3- α -L-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 xilanases, o que resulta em maior eficiência na hidrólise de xilana.

→ **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. Xilobioses e exo- β -xilanasas podem ser reconhecidas como entidades distintas (BIELY, 1985; 1993), mas, aqui serão referidas como 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. Já a afinidade por

xilooligossacarídeos é inversamente proporcional ao seu grau de polimerização. Essas enzimas são capazes de clivar substratos artificiais, como *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo e *o*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (KURAKABE, 1997).

→ **Acetil xilana esterase**: (EC 3.1.1.6) remove os substituintes *O*-acetil a partir da posição C2 e/ou C3 dos resíduos de xilose na acetil xilana (SHAO & WIEGEL, 1992; BLUM *et al.*, 1999; CAUFRIER *et al.*, 2003). 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 endoxilanases, 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- α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) que degrada *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeos e arabinanas ramificadas, e endo-1,5- α -L-arabinase (EC 3.2.1.99), que hidrolisa somente arabinanas lineares. A maioria das arabinases estudadas é do tipo exo (KANEKO *et al.*, 1993; DE VRIES *et al.*, 2000).

→ **α -Glucuronidase**: (EC 3.2.1.-) hidrolisa as ligações α -1,2 entre ácido glucurônico e resíduos de xilose na glucuronoxilana. 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 (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997; TENKANEM & SIIKA-AHO, 2000).

→ **Ácido ferúlico esterase** (EC 3.1.1.-) e **ácido *p*-coumárico esterase** (EC 3.1.1.): clivam ligações éster da xilana, respectivamente, entre as cadeias laterais de arabinose e do ácido ferúlico, e entre arabinose e ácido *p*-coumárico (CHRISTOV & PRIOR, 1993; WILLIAMSON *et al.*, 1998; CREPIN *et al.*, 2004).

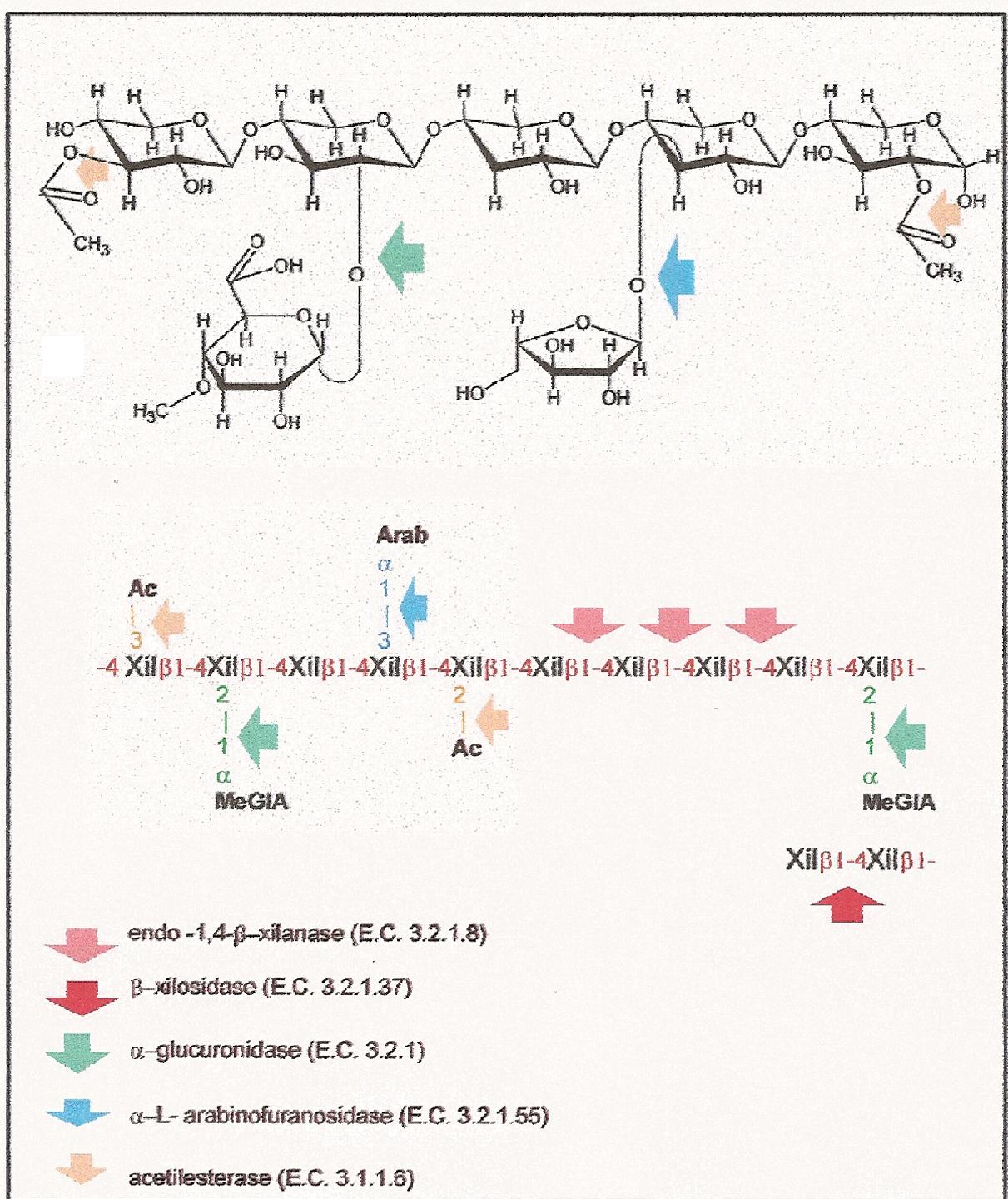


Figura 5. Representação esquemática da estrutura da xilana e pontos onde as enzimas xilanolíticas atuam. AC: grupo acetil; Arab: L-arabinofuranose; MeGIA: ácido 4-O-metilglucurônico; Xil: D-xilose (BIELY, 1985).

1.5 Regulação do Sistema Xilanolítico

Nos últimos anos, a produção científica a respeito das xilanases produzidas por microrganismos vem aumentando. Assim estudos sobre a secreção e indução de xilanases são necessários para que possam desenvolver eficientes produtores do sistema xilanolítico com relevantes 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 6**). 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 (BIELY, 1985).

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- β -xilanase extracelular, a qual libera xilooligossacarídeos maiores; posteriormente, a presença de uma β -xilosidase permease para o transporte da xilobiose e outros xilooligossacarídeos para dentro da célula, e logo em seguida, a ação de uma β -xilosidase intracelular que dará como produto final a formação de xilose a partir dos xilooligossacarídeos menores (revisto por PRADE, 1995).

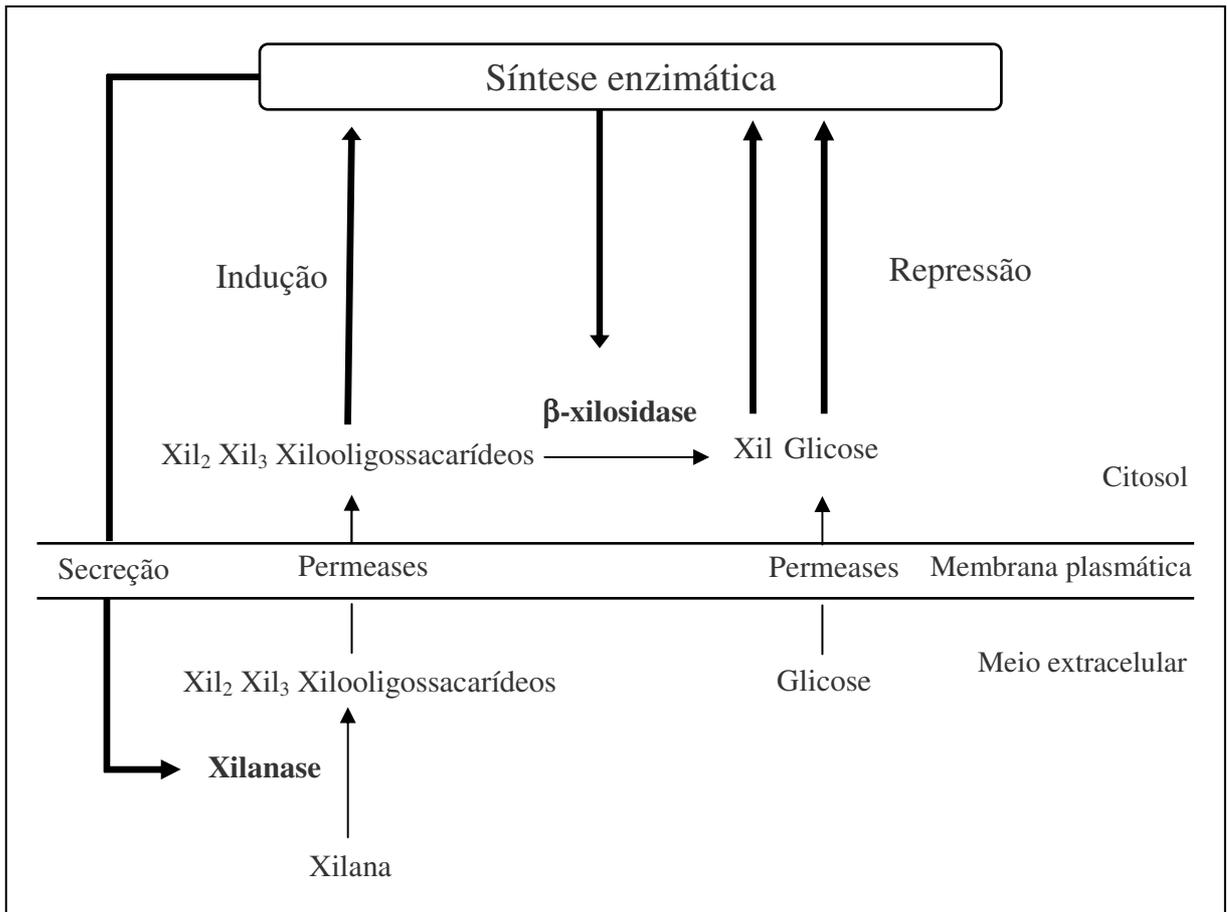


Figura 6. Regulação da biossíntese de enzimas xilanolíticas. Xilanases constitutivas degradam xilana a xilooligossacarídeos que através de permeases entram no citosol desencadeando a transcrição de outros genes para a produção de xilanases e β-xilosidasas. Abreviações: Xil – xilose; Xil₂ – xilobiose; Xil₃ – xilotriose (adaptado de POLIZELI *et al.*, 2005).

1.6 Classificação das xilanases: famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43

A heterogeneidade e complexidade da xilana têm resultado em uma diversidade de xilanases com sequência primária, enovelamento e especificidade variada, levando a limitações quanto à classificação dessas enzimas por especificidade de substrato somente. WONG e colaboradores (1988) classificaram as 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), e

aproximadamente 30% das xilanases identificadas até o momento, em particular xilanases fúngicas, não podem ser classificadas por esse sistema (COLLINS *et al.*, 2005).

Assim, um sistema de classificação mais complexo foi introduzido, o qual admite a classificação não somente de xilanases, mas de glicosidases em geral (EC 3.2.1.x). Este sistema é baseado em comparações da estrutura primária dos domínios catalíticos, e em grupos de enzimas em famílias de seqüências relacionadas (HENRISSAT *et al.*, 1989; HENRISSAT & COUTINHO, 2001). Como a estrutura e o mecanismo molecular de uma enzima estão relacionados à sua estrutura primária, este sistema de classificação reflete ambas as características – estrutural e mecanística.

Portanto, enzimas dentro de uma família particular têm estrutura tridimensional (HENRISSAT & COUTINHO, 2001) e mecanismo molecular (GEBLER *et al.*, 1992) similares, e tem sido sugerido que as mesmas podem ter uma especificidade similar de ação em substratos pequenos, solúveis e sintéticos (CLAEYSSSENS & HENRISSAT, 1992). Além disso, evolução divergente tem resultado em algumas famílias com estrutura tridimensional relacionada e assim o grupamento dessas famílias em níveis hierárquicos mais altos, conhecidos como clã, tem sido introduzido (BOURNE & HENRISSAT, 2001).

Dentro desse sistema de classificação, xilanases são normalmente reportadas como sendo restritas as famílias 10 e 11 (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997; SUBRAMANIYAN & PREMA, 2002; TORRONEN & ROUVINEN, 1997). No entanto, uma busca minuciosa na literatura disponível mostra que as seqüências classificadas em famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43 (**Tabela 1**) contêm domínios catalíticos distintos com atividade endo-1,4- β -xilanase. Vale ressaltar que, algumas destas enzimas não são xilanases verdadeiras. A enzima da família 7 – EGI de *Trichoderma reesei* – é uma endo- β -1,4-glucanase (EC 3.2.1.4) não-específica, visto que a mesma apresenta atividade em celulose apenas ligeiramente maior que em xilana; e a XYND de *Paenibacillus polymyxa* tem ambas as atividades – xilanásica e α -L-

arabinofuranosidásica (COLLINS *et al.*, 2005). A estrutura tridimensional de cada uma destas famílias pode ser observada na **Figura 7**.

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, assim indicando um enovelamento tridimensional similar. Além disso, as famílias 5, 7, 10 e 11 contêm enzimas que catalisam a hidrólise com retenção da configuração anomérica com dois resíduos de glutamato estando envolvido 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 (COUTINHO & HENRISSAT, 1999; COLLINS *et al.*, 2005).

Tabela 1. Famílias glicosídeo hidrolase contendo enzimas com atividade demonstrada em xilana. O enovelamento, mecanismo de ação e resíduos catalíticos característicos para cada família estão mostrados (Collins *et al.*, 2005).

| Famílias glicosídeo hidrolase | Registro de atividade em xilana | Enovelamento | Clã | Mecanismo catalítico | Resíduo ácido/base usual | Base usual/nucleofílica |
|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|------|----------------------|--------------------------|-------------------------|
| 5 | 8 | (β/α) ₈ | GH-A | Retido | Glutamato | Glutamato |
| 7 | 1 | “ β -jelly roll” | GH-B | Retido | Glutamato | Glutamato |
| 8 | 4 | (α/α) ₆ | GH-M | Invertido | Glutamato ^a | Aspartato ^a |
| 10 | 127 | (β/α) ₈ | GH-A | Retido | Glutamato | Glutamato |
| 11 | 173 | “ β -jelly roll” | GH-C | Retido | Glutamato | Glutamato |
| 43 | 1 | “5-Blade β -propeller” | GH-F | Invertido | Glutamato ^a | Aspartato ^a |

^a Suposto resíduo catalítico, estes não tem sido confirmados decisivamente.

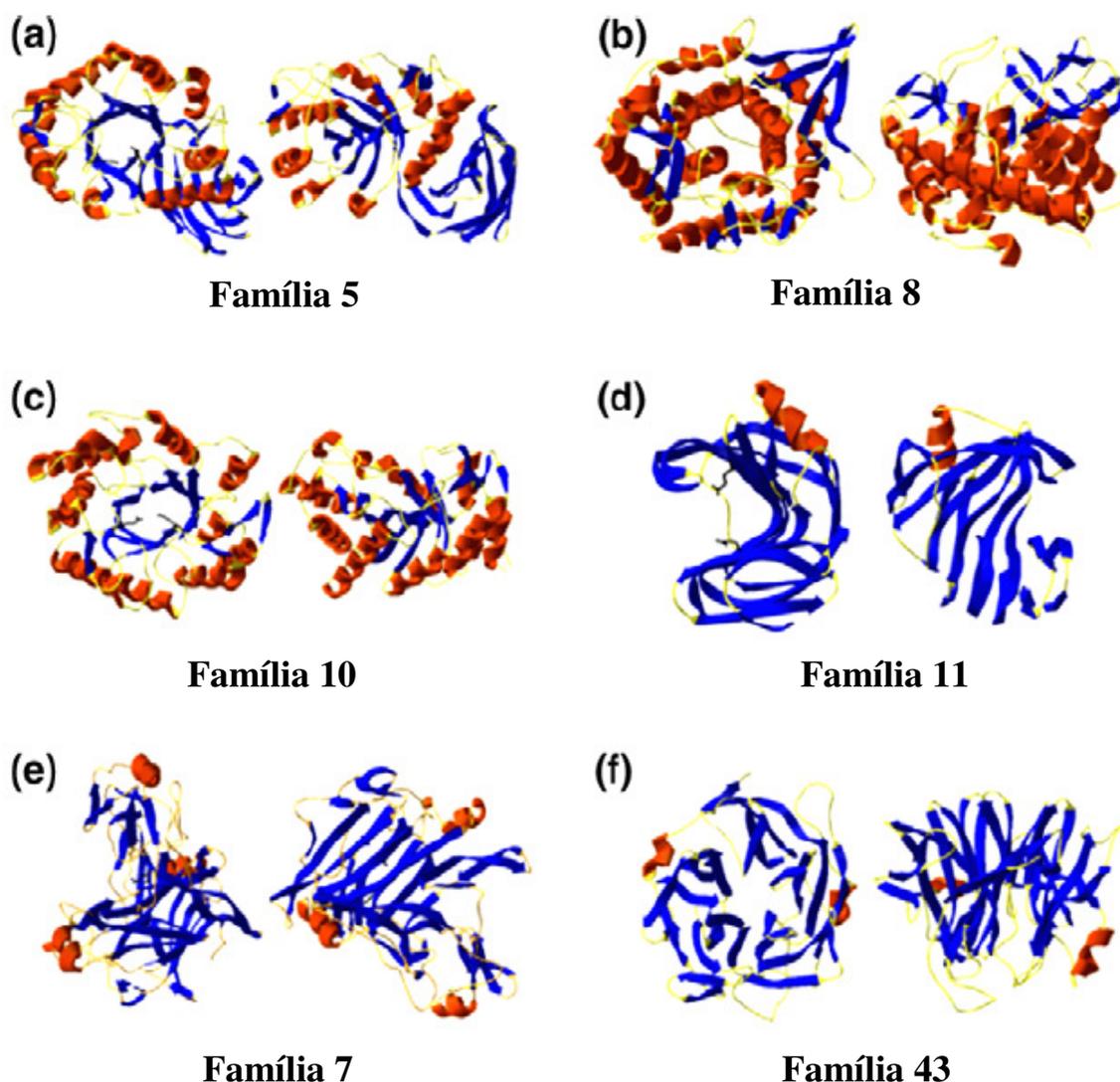


Figura 7. Estrutura representativa das enzimas de várias famílias glicosídeo hidrolase (COLLINS *et al.*, 2005). **(a)** Estrutura de uma enzima da família 5, XynA, de *Erwinia chrysanthemi* (LARSON *et al.*, 2003). **(b)** Estrutura da xilanase da família 8, pXyl, de *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAH3a (VAN PETEGEM *et al.*, 2002). **(c)** Estrutura da xilanase de *Streptomyces lividans* mostrando o típico enovelamento da família 10 (DEREWENDA *et al.*, 1994). **(d)** Estrutura da xilanase de *Trichoderma reesei* mostrando o típico enovelamento da família 11 (TORRONEN *et al.*, 1994). **(e)** Estrutura da endoglucanase I (EGI) não-específica da família 7, de *Trichoderma reesei* (KLEYWEGT *et al.*, 1997). **(f)** Estrutura da α -L-arabinanase da família 43, de *Cellvibrio japonicus* (NURIZZO *et al.*, 2002).

1.7 Aplicação Industrial

Nos últimos anos, a aplicação biotecnológica de xilanas e xilanases tem aumentado consideravelmente (CHEN *et al.*, 1997; BHAT, 2000; VÁZQUEZ *et al.*, 2000; SUBRAMANIYAN & PREMA, 2000, 2002; YUAN *et al.*, 2004; POLIZELI *et al.*, 2005). A conversão da xilana em xilose e xilooligossacarídeos pode ser realizada através de dois processos: hidrólise ácida e enzimática. A hidrólise ácida é usada frequentemente por ser mais rápida, mas é acompanhada pela formação de compostos tóxicos que podem impedir a fermentação microbiana subsequente. Além disso, ao longo do tempo, pode levar à corrosão dos equipamentos utilizados durante seu processo. Recentemente, algumas indústrias demonstraram interesse no desenvolvimento de processos eficientes de hidrólise enzimática como alternativa para o tratamento de materiais hemicelulósicos.

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*, *Trichoderma sp* e *Humicola insolens*. Entretanto, as xilanases comerciais também podem ser produzidas por bacilos.

1.7.1 Indústria de papel e celulose

A principal aplicação das xilanases é no branqueamento da polpa de celulose, visto que a hidrólise da xilana facilita a liberação de lignina na polpa de papel e reduz o uso de cloro como agente branqueador (VIIKARI *et al.*, 1994; SUBRAMANIYAN & PREMA, 2000; GUPTA *et al.*, 2000; BEG *et al.*, 2001; LAMA *et al.*, 2004; SANDRIM *et al.*, 2005; POLIZELI *et al.*, 2009).

Mundialmente, o processo mais utilizado de transformação da madeira em papel é o processo Kraft, no qual pequenos pedaços de madeira são submetidos a uma mistura de Na₂S, NaOH e água, em um digestor, a 170°C (SALLES *et al.*, 2005). Cerca de 90 a 95% da lignina

é solubilizada e o conteúdo das fibras se separa. A xilana é dissolvida no licor de cozimento devido à alta temperatura e pH. No entanto, à medida que o processo se desenvolve, a alcalinidade diminui e a xilana degradada precipita-se de forma mais ou menos cristalina sobre a celulose (BUCHERT *et al.*, 1992). São realizadas algumas lavagens a fim de separar os rejeitos (nós de madeira e cavacos não cozidos), visando a limpeza da polpa e retirada do licor remanescente. Neste estágio as fibras são escuras, pois ainda contém lignina residual do cozimento.

O branqueamento da polpa divide-se em dois estágios: o pré-branqueamento e o branqueamento propriamente dito. O pré-branqueamento remove mais uma parte desta lignina residual do cozimento e pode ser realizado por diversos processos, tais como: hidrólise enzimática, reações de substituição ou adição de oxigênio dependendo da indústria. Porém, o verdadeiro branqueamento ocorre durante a segunda etapa da sequência onde são aplicados oxidantes (dióxido de cloro, hipoclorito e peróxido de hidrogênio) e estágio de extração da polpa. A **Figura 8** apresenta um esquema das etapas do processo de produção da polpa de celulose.

A fibra de celulose é recoberta por polímeros de lignina e de xilana que servem para conferir estabilidade à parede celular da planta e, esses açúcares, principalmente a lignina, são os responsáveis pela coloração escura da polpa de celulose. Os bioprodutos organoclorados formados durante os processos acima descritos são tóxicos e, em consequência, processos alternativos têm sido estudados para reduzir e/ou eliminar o uso de cloro e dióxido de cloro (GEORIS *et al.*, 2000; TECHAPUN *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2003; SALLES *et al.*, 2005; SANDRIM *et al.*, 2005; PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2009; BETINI *et al.*, 2009). Além disso, pressões ambientais e legislativas têm forçado as indústrias de polpa e papel modificar suas tecnologias de tratamento da polpa para reduzir os impactos ambientais (BAJPAI *et al.*, 1994; POLIZELI *et al.*, 2005; SALLES *et al.*, 2005).

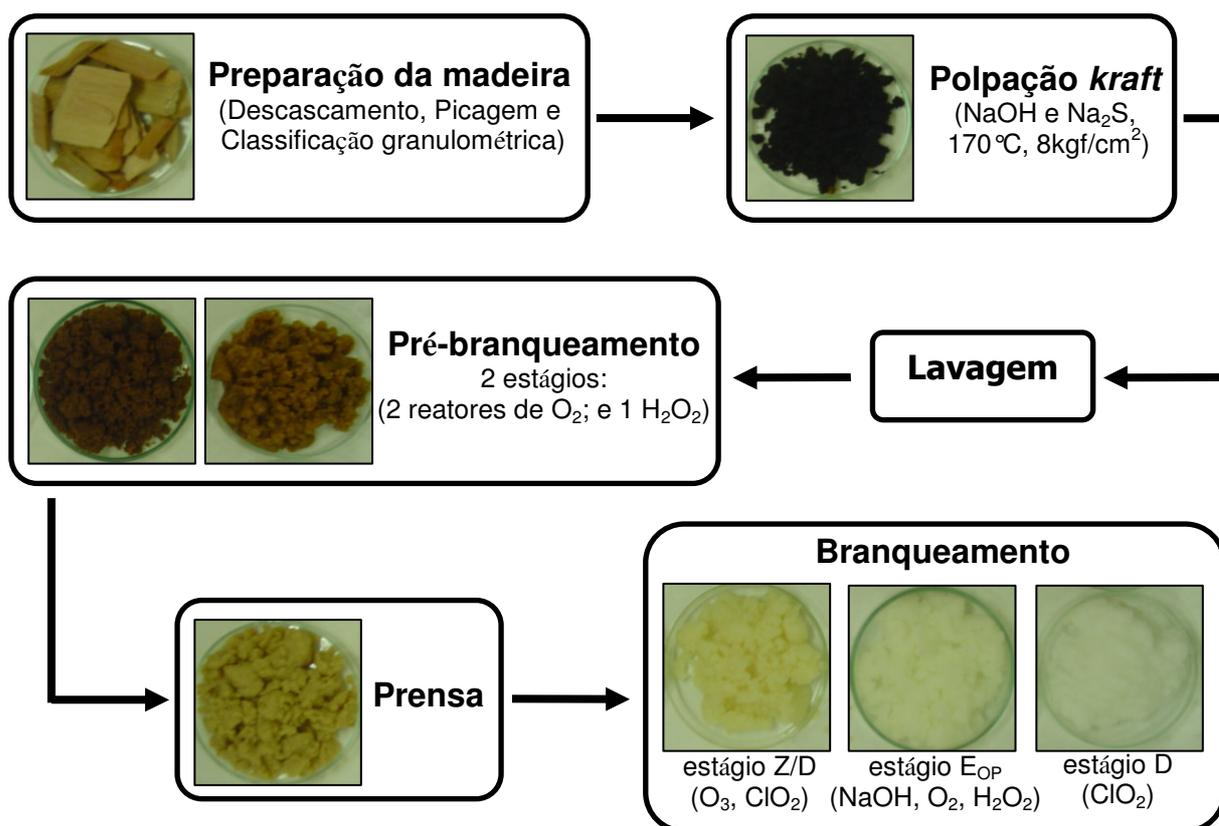


Figura 8. Esquema do processo de produção da polpa de celulose para fabricação de papel.

Portanto, biobranqueamento e bioprocesso das polpas usando xilanases é uma das aplicações mais adequadas para ser usada na indústria de polpa e papel (GARG *et al.*, 1998; SALLES *et al.*, 2005), visto que é aceito que xilanases aumentam o branqueamento da polpa através da hidrólise de ligações covalentes entre a hemicelulose e lignina, liberando cromóforos e lignina da polpa de celulose matriz (WONG *et al.*, 1996; SALLES *et al.*, 2005). Pré-tratamento da polpa Kraft com xilanases tem facilitado as etapas subseqüentes no biobranqueamento, diminuindo assim, a quantidade de reagentes poluentes usados (PAICE *et al.*, 1988; SALLES *et al.*, 2005). Segundo SUNNA & ANTRANIKIAN (1997) estes processos de branqueamento reduziram o uso de compostos clorídricos em até 30%. Como resultado houve uma diminuição de 15 – 20% na liberação de organoclorados nos efluentes

das indústrias de papel (KULKARNI *et al.*, 1999). No entanto, é essencial que preparações enzimáticas usadas no biobranqueamento não mostrem atividade celulásica, visto que causaria mudanças morfológicas nas fibras de celulose, o que reduziria a qualidade final do papel (POLIZELI *et al.*, 2005; SALLES *et al.*, 2005).

Na literatura, há muitos trabalhos sobre o uso de enzimas do complexo xilanolítico no processo de branqueamento da polpa de celulose para fabricação do papel (VIAKARI *et al.*, 1991, 1994; PRADE *et al.*, 1995; GARG *et al.*, 1996; SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997; KULKARNI *et al.*, 1999; ARAÚJO *et al.*, 1999; BAJPAI, 1999; BHAT, 2000; BEG *et al.*, 2001; WHITMIRE & MITI, 2002; TECHAPUN *et al.*, 2003; SANDRIM *et al.*, 2005; BETINI *et al.*, 2009; PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2009).

1.7.2 Outras aplicações biotecnológicas

Produtos da hidrólise de xilana, como a xilose, podem ser convertidos em combustíveis líquidos (etanol), solventes, e adoçantes artificiais de baixa caloria (xilitol) (PARAJÓ *et al.*, 1998; ARISTIDOU & PENTILLÄ, 2000; POLIZELI *et al.*, 2005). Outra categoria envolve o uso do complexo xilanolítico no processamento de fibras vegetais, como o cânhamo ou o linho na indústria têxtil (PRADE, 1995; POLIZELI *et al.*, 2005).

A utilização de enzimas na produção de rações é um setor importante do agronegócio, com uma produção anual superior a 600 milhões de toneladas e envolvem mais de 50 bilhões de dólares (TWOMEY *et al.*, 2003). Aplicação de xilanases em ração animal (BAJPAI, 1999; TWOMEY *et al.*, 2003; POLIZELI *et al.*, 2005; PEDERSEN *et al.*, 2007); aumenta a digestibilidade e o valor nutricional em alimentos. Estas enzimas têm sido usadas como aditivos em aves domésticas (BEDFORD & CLASSEN, 1992; LAMA *et al.*, 2004); na melhoria das propriedades nutricionais da silagem e cereais na agricultura (KUHAD & SINGH, 1993; LAMA *et al.*, 2004);

Outras aplicações biotecnológicas das xilanases incluem: clarificação de sucos de frutas, em combinação com pectinase e celulase (BIELY, 1985; LAMA *et al.*, 2004; PUCHART & BIELY, 2007); em farinha de trigo para melhorar a massa e a qualidade de produtos assados (MAAT *et al.*, 1992; LAMA *et al.*, 2004); para extração do café, óleos de plantas, e amido (WONG & SADDLER, 1992; LAMA *et al.*, 2004); na recuperação de açúcares fermentáveis a partir de hemiceluloses (LAMA *et al.*, 2004); e na produção de xilooligossacarídeos que são benéficos à saúde humana devido ao seu efeito pré-biótico (KULKARNI *et al.*, 1999; BEG *et al.*, 2001; POLIZELI *et al.*, 2005; PUCHART & BIELY, 2007).

Estudos ainda mostram que uma dieta contendo xilooligossacarídeos pode aumentar a saúde gastrointestinal de ratos e pode aumentar a resistência de camundongos contra infecção por *Clostridium difficile* (MAY *et al.*, 1995; CAMPBELL *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 2007). Dieta baseada em xilooligossacarídeos também reduziu a concentração de açúcares e lipídeos no sangue de ratos diabéticos (IMAZUMI *et al.*, 1991; YANG *et al.*, 2007). Em relação a saúde humana, xilooligossacarídeos seletivamente aumentam o crescimento de bifidobacterium, promovendo assim um ambiente intestinal favorável (OKAZAKI *et al.*, 1991; YANG *et al.*, 2007).

1.8 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. Este possui três segmentos: enzimas técnicas – 51% (destinadas a indústrias de tecidos e de produtos de limpeza), enzimas para alimentos e bebidas – 37% e enzimas para ração animal – 12% (MUSSATTO *et al.*, 2007; POLIZELI, 2009). As principais enzimas de aplicação industrial são proteases, amilases, lipases, celulases, xilanases e fitases, e as maiores

empresas produtoras são européias: Gist-Brocades (Holanda), Genencor International (Finlândia) e Novo Nordisk (Dinamarca). A última detém sozinha, cerca de metade do mercado mundial de enzimas industriais. No Brasil, em 2005, as importações de enzimas chegaram a US\$ 31 milhões e as exportações a US\$ 3 milhões. As mais importadas foram amilases (US\$ 4 milhões), seguidas de proteases (US\$ 2,5 milhões). O mercado brasileiro de enzimas, embora ainda pouco representativo (cerca de 2% do total mundial), revela grande potencial, devido à enorme geração de resíduos agroindustriais e ao dinamismo das indústrias de alimentos, medicamentos, tecidos e celulose/papel. A redução do custo de produção de enzimas é favorecida, no país, pela possibilidade de bioconversão de subprodutos agrícolas como farelo de trigo, farelo de algodão, casca de soja e outros. Acredita-se, por isso, em um aumento rápido do uso de enzimas, de forma geral, e em particular em processos industriais, no país (MUSSATTO *et al.*, 2007).

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 houve maior importação que exportação para a maioria das mercadorias envolvendo preparados enzimáticos. Analisando os 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 9**). 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.

Espera-se que, a demanda mundial por enzimas atinja um crescimento de 6,5% até aproximadamente 5,1 bilhões de dólares em 2009. Tal montante justifica-se pelo interesse

gerado por processos que envolvem tecnologias de baixo custo energético, com baixo impacto ambiental e que utilizam matérias-primas renováveis, adequando-se ao reaproveitamento de subprodutos da agroindústria (FREEDONIA, 2005).

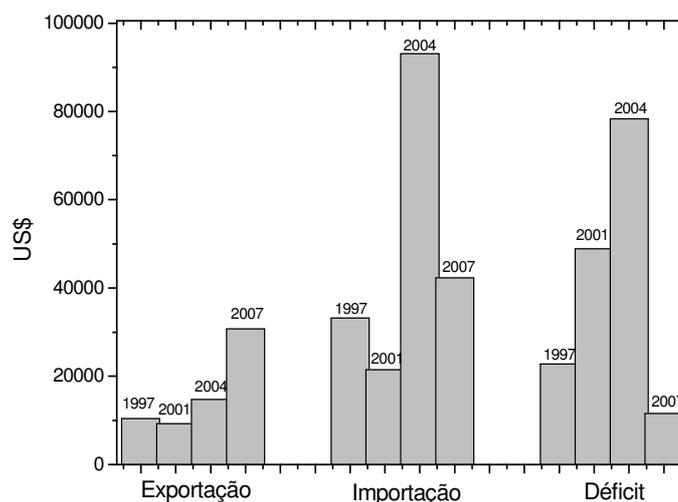


Figura 9. Exportações e importações de enzimas industriais referentes aos anos de 1997, 2001, 2004 e 2007. Valores expressos em dólares. Dados extraídos do site: <http://alicesweb.desenvolvimento.gov.br>

1.9 Resíduos Agroindustriais

O aprofundamento na utilização dos recursos potencialmente aproveitáveis, mas que, no momento, são tratados como resíduos, numa nítida indicação de desperdício, merece mais que uma simples reflexão passageira, pois no setor agroindustrial não há o reconhecimento pela sociedade como sendo um setor que polui o meio ambiente (SENHORAS, 2005). Por outro lado, com as medidas de proteção e recuperação ambiental que vem se expandindo em todos os setores está conduzindo a sociedade para uma reflexão mais profunda quanto às práticas adotadas pelo setor agroindustrial. A partir dessa problemática de oportunidades, justifica-se cada vez mais, a necessidade de se falar de meio ambiente a partir de novas

formas de atuação no que se refere aos aspectos econômicos e empresariais por meio de propostas do aproveitamento dos resíduos que resultem em inúmeros novos produtos.

Os resíduos provenientes da indústria e comércio de alimentos geram quantidades apreciáveis de casca, caroço e outros elementos. Esses materiais, além de fonte de matéria orgânica, servem como fonte de proteínas, enzimas e óleos essenciais, passíveis de recuperação e aproveitamento (SENHORAS, 2005).

Estima-se que a produção anual de resíduos agroindustriais esteja na ordem de 1,5 bilhões de toneladas. A América Latina produz mais de 500 milhões de toneladas de subprodutos e resíduos agroindustriais (SOUZA, 2008). O Brasil é um grande produtor agrícola (**Tabela 2**), e nos últimos anos a área plantada e a produção agrícola tiveram um crescimento importante. Essa produção agrícola gera uma grande quantidade de resíduos que são aproveitados energeticamente em virtude das tecnologias existentes. No entanto, o Brasil não aproveita mais de 200 milhões de toneladas de resíduos agroindustriais¹. Parte dos resíduos não aproveitados energeticamente encontra usos na ração animal, e nas áreas de medicina e fertilizantes. Assim, a inclusão de resíduos, como sabugo de milho e farelo de trigo (alto conteúdo de xilana) na composição do meio nutriente é a principal estratégia em biossíntese de xilanase microbiana (MARINOVA *et al.*, 1993; DAVIDOV & ATEV, 1996).

Segundo PANDEY e colaboradores (2000), a partir da década de 90, houve um crescente interesse na biotransformação desses resíduos, tendo em vista, ser um material de baixo custo e altamente renovável. Deste modo, a utilização desses resíduos, além de diminuir o impacto sobre o meio ambiente, devido à disposição inadequada, pode ser um fator importante para a produção de subprodutos e diminuição nos custos de produção. Vários autores reportaram a produção de enzimas xilanolíticas utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono (MARQUES DE SOUZA *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 1999; DAMASO *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2004; DOBREV *et al.*, 2007; BETINI *et al.*, 2009).

Tabela 2. Produção de matéria-prima e seus resíduos no Brasil em 2004.

| Matéria-prima | Produção agrícola (tons)* | Produção de resíduos (t/ha)** | Matéria seca (%)** | Produção total de resíduos (tons)*** |
|--------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------------------------|
| Cana (bagaço) | 396.012.158 | 7,0 – 13,0 | 23,4 | 59.401.824 |
| Arroz (casca) | 10.334.603 | 4,0 – 6,0 | 89,0 | 2.937.094 |
| Café (casca) em coco | 2.454.470 | – | – | 1.662.658 |
| Mandioca (rama) | 21.961.082 | 6,0 – 10,0 | 90,4 | 6.542.206 |
| Milho (palha e sabugo) | 48.327.323 | 5,0 – 8,0 | 90,5 | 64.028.870 |
| Soja (restos de cultura) | 51.919.440 | 3,0 – 4,0 | 88,5 | 80.746.839 |
| Mamona | 111.100 | – | – | – |
| Algodão | 2.199.268 | – | – | – |

* IBGE, 2004.

** NOGUEIRA *et al.*, 2000.

*** Calculado em base seca.

A proposta ZERI - Zero Emissions Research Initiative, é um programa criado por Günter Pauli em 1994 na United Nations University (UNU) com sede no Japão, e representado no Brasil pela Fundação ZERI Brasil, que preconiza uma abordagem ambientalmente sustentável para a satisfação das necessidades humanas por água, alimentação, energia, empregos, habitação, entre outras, utilizando-se a aplicação da ciência e da tecnologia e envolvendo o governo, os empresários e a academia (ZERI, 2005).

De acordo com PAULI (1998) o ZERI busca criar um novo paradigma para uma indústria sustentável através do objetivo “*emissões zero*” de gases, líquidos e sólidos. A “emissão zero” atenta para o uso de materiais brutos, não trabalhados, de forma que estes possam ser convertidos num produto de valor agregado, fazendo, dessa forma, a utilização

desses recursos existentes antes de adicionar insumos caros para eliminar impactos ambientais.

Em termos de Brasil, o ZERI tem um ótimo potencial de aplicação, visto a magnitude dos recursos naturais, florestas, água, biodiversidade e biomassa, a crescente industrialização, com alto consumo e, conseqüentemente, expansão da agricultura que tem gerado impacto negativo sobre os ecossistemas naturais, no que se refere à produção de resíduos agroindustriais (BELLO, 1998).

Resíduos ricos em materiais lignocelulósicos são amplamente produzidos pela atividade agrícola e industrial. Dentre os resíduos lignocelulósicos produzidos em grande quantidade pela atividade agroindustrial brasileira, pode-se citar: cascas, bagaço de cana, palha e farelo de arroz, palha e farelo de trigo, palha de bananeira e resíduo de algodão. A maioria destes materiais é parcialmente ou não aproveitada, sendo transformados em poluentes do meio ambiente (PAULI, 1998).

Dentre as várias possibilidades para utilização destes resíduos, a fermentação em estado sólido (FES) é uma tecnologia amplamente estudada para a produção de enzimas de interesse industrial, no entanto, aplicação desses resíduos após tratamentos químicos, físicos ou enzimáticos, ou mesmo em sua forma natural tem sido realizada em cultivos submersos.

1.10 Produção de xilanases

O uso da fermentação submersa (FSbm) geralmente leva a uma comparação com a fermentação no estado sólido (FES), para uma melhor compreensão do processo e é comparada por diversos autores (RAMANA MURTHY *et al.*, 1993; RAIMBAULT, 1998).

Segundo GERVAIS & MOLIN (2003) a principal diferença entre FSbm e FES está na capacidade de mistura dos sistemas. As fermentações submersas são reações de mistura perfeita, onde, cada parte do reator contém, ao mesmo tempo, a mesma quantidade de

microrganismos, nutrientes e metabólitos, enquanto os cultivos em meio sólido, encontram-se sistemas com alta viscosidade, sendo que, para se chegar a uma homogeneidade, seria necessária uma excessiva agitação, o que levaria a ruptura celular. Assim, os autores concluem que os sistemas de cultivo em meio sólido caracterizam-se por serem meios heterogêneos, em termos de população microbiana e concentração de soluto.

Os processos de fermentação submersa podem ser realizados em frascos agitados ou não (Erlenmeyers, por exemplo), fermentadores de bancada e fermentadores em escala industrial. Os fermentadores são amplamente conhecidos, estudados e aplicados e apresentam variáveis na forma de condução que os classifica em processos contínuo, semicontínuo e descontínuo.

No regime contínuo há uma constância na entrada de substrato conforme as necessidades do microrganismo e na saída do meio fermentado. Já os processos descontínuos tradicionais, também designado como processo em batelada, quantidades únicas de substrato são fornecidas ao microrganismo no início do cultivo. É o processo mais seguro em relação a manutenção das condições de assepsia, porém, necessita de uma maior vigilância operacional para assegurar a reprodutibilidade e constância das propriedades do produto. A batelada alimentada (“fed-batch”) consiste em realimentar o processo durante sua execução (sem ocorrer retirada do líquido fermentado), visando aumentar a produção, permitindo a exploração de aspectos cinéticos do processo. O sistema semicontínuo, diferencia-se do descontínuo alimentado, pelo fato de se retirar parte do líquido fermentado e se proceder ao preenchimento do reator empregando-se uma vazão muito elevada (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

A técnica de fermentação submersa possui relativa facilidade de cultivo em grande escala, já que garante homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros do processo, principalmente se monitorados por sensores adequados (COUTO & SANROMÁN,

2006). No entanto, a maior probabilidade de contaminação, pela maior quantidade de água, é um inconveniente deste processo.

A grande maioria das enzimas utilizadas industrialmente são produzidas fazendo uso da FSbm, geralmente utilizando-se microrganismos geneticamente modificados. No entanto, o custo da produção destas enzimas por FSbm é alto e o processo torna-se, muitas vezes, economicamente inviável (PANDEY *et al.*, 2000).

Diversos autores, em suas revisões sobre FES, apresentam vantagens e desvantagens do processo em meio sólido. No entanto, é uma tarefa difícil generalizar vantagens relacionadas aos processos submersos, ou em estado sólido, sabendo-se que cada microrganismo pode melhor se adequar a um ou outro processo, bem como produzir complexos enzimáticos diferentes, o que justifica pesquisas com estes processos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral:

Desenvolver um bioprocesso para obtenção de um concentrado rico em enzimas xilanolíticas de origem fúngica em fermentação submersa, e estudar as propriedades funcionais das mesmas.

2.2 Objetivos específicos:

- Coleta e isolamento de fungos filamentosos;
- Screening de fungos filamentosos produtores de altos níveis de xilanases;
- “Otimização” das condições de cultivo dos fungos *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus*, visando à produção enzimática máxima;
- Aplicação das xilanases brutas de *A. terricola* e *A. ochraceus* na polpa de celulose para análise de biobranqueamento;
- Produção de xilanases por *A. terricola* e *A. ochraceus* utilizando licores de autohidrólise de resíduos agroindustriais (palha de trigo e sabugo de milho) como fonte de carbono;
- Escalonamento da produção de xilanases dos fungos *A. terricola* e *A. ochraceus* em reatores STR (Stirred Tank Reactor”) e Air-lift;
- Purificação e caracterização bioquímica de endoxilanases e β -xilosidase extracelulares produzidas por *Aspergillus ochraceus*;
- Sequenciamento de aminoácidos das enzimas purificadas.

3. Material e Métodos

3.1 Coleta e isolamento de fungos filamentosos

Este trabalho fez parte do projeto temático nº 04/07935-6 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 10**). Esta coleta foi realizada a partir de substratos em decomposição de três regiões: (1) região com vegetação de grande densidade (mata fechada – primeiro local reflorestado), (2) região com densidade de vegetação intermediária entre a primeira e a última área, e (3) região com vegetação pouco densa, devido ao reflorestamento mais recentemente. Outra coleta foi realizada a partir do caule da árvore *Hovenia dulcis*, popularmente conhecida como Uva japonesa, próxima ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia – FFCLRP/USP (região 4).

Para controle e identificação do local de coleta utilizou-se georreferenciamento por GPS - “Global Positioning Systems” para determinação da latitude, longitude e altitude (**Tabela 3**). 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>.

Para isolar os fungos filamentosos, inicialmente o material foi espalhado sobre placa de Petri contendo meio sólido de aveia, composto por 4% (p/v) de farinha de aveia Quaker® e 2% (p/v) de ágar bacteriológico (EMERSON, 1941). A este inóculo foi adicionado 1 mL de pentabiótico veterinário (1 mg/mL) para impedir crescimento bacteriano. Decorridos sete dias de incubação a 30°C e 40°C, diferentes fungos se desenvolveram nas placas, seguiu-se então, o processo de isolamento dos espécimes por meio da realização de estrias, utilizando-se alça de platina, em meio sólido de aveia. Este procedimento foi realizado até obterem-se culturas homogêneas.



Figura 10. Áreas de reflorestamento do *Campus* da USP de Ribeirão Preto. Visão aérea, em diferentes ângulos, dos locais da coleta dos microrganismos.

Tabela 3. Material e georreferenciamento das áreas de coleta.

| Nº | Material | Temperatura (°C) | Precisão GPS (m) | Altitude (m) | Latitude (°) | Longitude (°) |
|----|------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| 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' |
| 4 | Caule de <i>H. dulcis</i> | 30 | 16 | 583 | 21° 09,775' | 47° 51,563' |

3.2 Seleção dos microrganismos

A seleção de linhagens produtoras de altos níveis de xilanases foi realizada entre 35 fungos filamentosos, sendo 7 destes obtidos em nossa coleta, e 28 pertencentes à Micoteca do nosso laboratório (Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia – FFCLRP/USP), dos quais muitos ainda não haviam sido estudados e/ou identificados. Para a realização deste “screening”, os fungos foram inoculados em meio SR (descrito no item 3.4.1.1 desta seção), utilizando xilana birchwood 1% (p/v) como fonte de carbono, e incubados a 40°C, durante 72 horas, em estufa bacteriológica.

Entre os 35 fungos analisados, 5 foram inicialmente selecionados para o estudo: ISA-1, Uva japonesa, *Aspergillus ochraceus*, Pão escuro e Verde aveludado. Em seguida, os fungos selecionados não-identificados foram enviados para a Coleção de Culturas – Micoteca URM do Departamento de Micologia – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para a realização da mesma. Após a identificação – ISA-1 (*Aspergillus niger* van Tieghem), Uva japonesa (*Aspergillus terricola* Marchal), Pão escuro e

Verde aveludado (*Aspergillus flavus* Link) – dois destes fungos foram selecionados para dar continuidade ao trabalho: *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus terricola* Marchal.

3.3 Manutenção da cepa

As cepas foram mantidas, em laboratório, em 4% (p/v) de meio PDA Biolife[®], e/ou meio sólido de aveia. Os meios foram autoclavados (1,5 atm por 20 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.

As cepas também foram mantidas em sílica gel, onde uma suspensão de esporos foi preparada em 5 mL de solução de leite Molico[®] desnatado (200 g/L de água destilada). Desta suspensão, aproximadamente 1 mL foi adicionado em tubos de ensaio (16 x 100 mm) contendo 6 g de sílica gel branca de 1 – 4 mm e agitados posteriormente. Estes tubos foram lacrados e armazenados a 4°C.

3.4 Condições de cultivo

Dois tipos de processos fermentativos foram avaliados durante este projeto, objetivando melhorar os níveis enzimáticos de xilanases: fermentação submersa tradicional (realizada em shaker e/ou biorreator) e fermentação submersa em dois-estágios (realizada somente em shaker), sendo que, os cultivos conduzidos em fermentação submersa tradicional foram realizados diretamente com fontes de carbono obtidas comercialmente, como xilana Sigma[®], com resíduos agroindustriais, ou com licores de resíduos agroindustriais (palha de trigo e sabugo de milho) obtidos a partir de processos de autohidrólise. A parte referente a produção de licores de autohidrólise, e aplicação dos mesmos para a produção de xilanases, assim como as fermentações em biorreatores, foram realizadas durante o estágio doutoral no

Laboratório de Instalação Piloto e no Laboratório de Fermentação, no Departamento de Engenharia Biológica, da Universidade do Minho - UMINHO, em Braga - Portugal, sob responsabilidade do Prof. Dr. José António Teixeira, e supervisão do Dr. Daniel Pereira da Silva e da Dra. Denise Santos Ruzene.

3.4.1 Fermentação submersa (FSbm)

3.4.1.1 FSbm em shaker

Os conídios, obtidos a partir de culturas estoques, foram raspados com alça de platina e suspensos em 10 mL de água destilada esterilizada; um volume de aproximadamente 1 mL da suspensão de esporos (2×10^7 conídios/mL) foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido e incubados a 40°C, por 72 horas, em estufa bacteriológica (ou conforme especificado em cada experimento). Os meios testados e suas composições estão descritos a seguir:

Meio Adams (ADAMS, 1990)

| | |
|---|--------|
| extrato de levedura..... | 0,2 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,1 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O..... | 0,05 g |
| xilana birchwood..... | 1 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 ₄ NO ₃ | 2,0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1,3 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O..... | 0,362 g |
| KCl | 0,098 g |
| ZnSO ₄ .H ₂ O..... | 0,007 g |
| MnSO ₄ .H ₂ O..... | 0,0138 g |
| Fe ₂ (SO ₄) ₃ .6H ₂ O..... | 0,0066 g |
| CuSO ₄ .5H ₂ 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 ₄ .7H ₂ O..... | 0,24 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,3 g |
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | 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_2PO_4 | 25 g |
| NH_4NO_3 | 10 g |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1,0 g |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 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_2O | 5 g |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 5 g |
| $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 1 g |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,25 g |
| H_3BO_3 | 0,05 g |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 0,05 g |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 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 Czapeck (WISEMAN, 1975)

| | |
|--|---------|
| NaNO ₃ | 0,3 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,1 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,05 g |
| KCl | 0,05 g |
| FeSO ₄ .7H ₂ 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 ₃ | 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 |

Para os processos de obtenção de enzimas xilanolíticas brutas utilizando licores de autohidrólise de resíduos agroindustriais (item 3.5 desta seção), os fungos *A. ochraceus* e *A. terricola* foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL dos meios líquidos Vogel – *A. terricola*, e Adams – *A. ochraceus*, em pH 6,0, suplementado com as seguintes fontes de carbono:

♦ mistura de farelo de trigo 1% (p/v) e licor de palha de trigo 10% (v/v) proveniente de tratamentos com 5, 15, 30 ou 50 minutos de autohidrólise;

◆ licor de palha de trigo 100% (v/v), proveniente de tratamentos com 5, 15, 30 ou 50 minutos de autohidrólise;

Após a determinação do melhor tempo de autohidrólise para o licor de palha de trigo na produção de xilanases, um segundo conjunto de experimentos foi realizado, variando as concentrações da mistura, de acordo com o planejamento abaixo:

- ◆ farelo de trigo 0,5% (p/v) adicionado de licor 2% (v/v);
- ◆ farelo de trigo 0,5% (p/v) adicionado de licor 10% (v/v);
- ◆ farelo de trigo 1% (p/v) adicionado de licor 2% (v/v);
- ◆ farelo de trigo 1% (p/v) adicionado de licor 10% (v/v);
- ◆ farelo de trigo 0,75% (p/v) adicionado de licor 6% (v/v);
- ◆ xilana birchwood 1 % (p/v), farelo de trigo nas concentrações de 0,5 e/ou 1% (p/v) e licor 100% (v/v) foram utilizados como controle.

As culturas foram incubadas, nos dois casos, a 30°C, em shaker a 100 rpm, por até 7 dias. Os mesmos experimentos foram novamente realizados utilizando no lugar do farelo de trigo e licor de palha de trigo o sabugo de milho e licor de sabugo de milho, respectivamente, como fontes de carbono.

3.4.1.2 FSbm em biorreatores

Cinco fermentações foram realizadas em um reator STR (Stirred Tank Reactor – Bioengineering AG CH-8636 Wald), com volume útil de 1 L (**Figura 11A**). A concentração de substrato por litro de água presente no meio de cultivo no caso do fungo *A. terricola* foi de 5 g de farelo de trigo, juntamente com constituintes adicionais conforme descrito por VOGEL (1964); e para o fungo *A. ochraceus* o meio foi constituído por 10 g de farelo de trigo, 100 mL de licor de palha de trigo com 15 minutos de autohidrólise juntamente com constituintes

adicionais descrito por ADAMS *et. al.* (1990), em ambas as condições com valores iniciais de pH 6,0. Anti-espumante e solução ácido-base para controle do pH não foram utilizados. O meio foi esterilizado, em autoclave, a 121°C por 30 minutos.

O modo de inoculação foi avaliado de duas maneiras, sendo inicialmente proveniente de uma suspensão de esporos com 3×10^8 conídios/mL adicionado de modo asséptico e diretamente no biorreator. Outro modo de inoculação foi proveniente de um sistema de pré-cultivo, onde dois frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo cada um 50 mL de meio de cultura (descrito acima), e inoculados com aproximadamente $1,5 \times 10^7$ conídios/mL, foram agitados continuamente em shaker a 150 rpm, por 24 horas, a 30°C. Posteriormente, o caldo de cultura de cada frasco foi inoculado assepticamente no biorreator. As condições físicas do processo no biorreator incluíram agitação de 300 rpm, injeção de 1vvm de ar ou ausência de injeção de ar, e temperatura de 30°C. Amostras foram coletadas em intervalos de tempo regulares, filtradas à vácuo com auxílio de um funil de Büchner e papel de filtro, e o sobrenadante analisado quanto à produção de enzimas xilanolíticas.

O reator Air-lift empregado para a fermentação do fungo *A. terricola* foi construído no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho (Portugal), e feito de Perspex (polimetilmetacrilato) (**Figura 11B**). O volume útil foi 6,2 L, possuindo em seu interior um tubo concêntrico. A descrição completa do biorreator Air-lift juntamente com um diagrama pode ser consultada em DOMINGUES e colaboradores (1999). Quando neste tipo de processo, o meio de cultura descrito por VOGEL (1964), suplementado com farelo de trigo 0,5% como fonte de carbono, foi autoclavado separadamente a 121°C por 30 minutos e colocado assepticamente no biorreator. O reator Air-lift foi previamente esterilizado com uma solução de hipoclorito de sódio (2% cloro ativo) durante 3 a 5 dias, e posteriormente, lavado pela circulação de água esterilizada (50 L). A temperatura foi mantida a 30°C, através da circulação de água pela camisa (revestimento) do fermentador. Ar filtrado com vazão

correspondente a 0,4 ou 1 L/min foi fornecido pela base do equipamento através de um dispersor promovendo uma eficiente difusão do ar por todo o reator. As amostras foram coletadas periodicamente, filtradas à vácuo, e analisadas quanto à produção de xilanases.

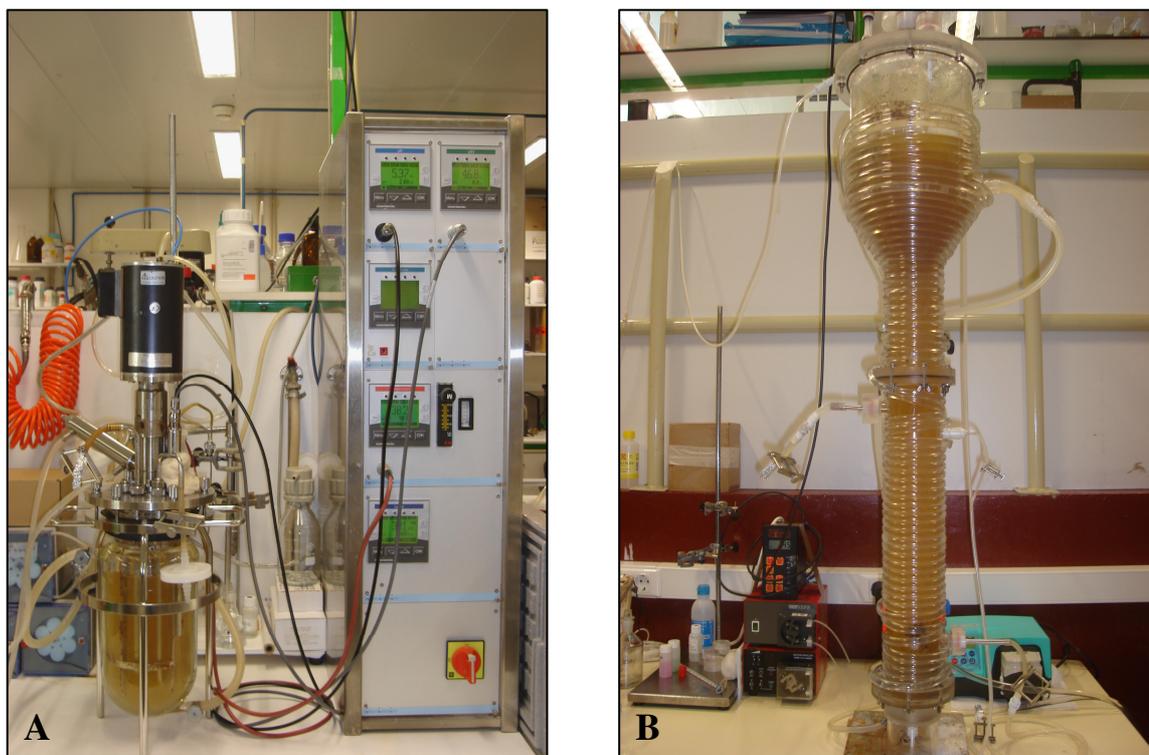


Figura 11. Biorreatores utilizados nos experimentos de escalonamento da produção enzimática. Reator STR (Stirred Tank Reactor – Bioengineering AG CH-8636 Wald) (A); e o reator tipo Air-lift (Departamento de Engenharia Biológica / Universidade do Minho) (B).

3.4.2 Fermentação submersa em dois-estágios

Neste experimento, os fungos foram pré-cultivados 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. Após este período, as culturas foram transferidas para os meios de indução (meio mínimo de Vogel – *A. terricola* e Czapeck – *A. ochraceus*), suplementado com xilana birchwood ou oat spelt 1% (p/v) como fonte de carbono, e incubados a 30°C, em agitação (100 rpm) ou modo estático, por até 144 horas.

3.5 Obtenção do licor: tratamento de autohidrólise

A palha de trigo e o sabugo de milho (material para o tratamento de autohidrólise), depois de secos a 40°C em estufa por 12 h, foram cortados em pequenos pedaços de 1 – 3 cm, moídos (granulometria de 1,0 mm) e submetidos ao pré-tratamento hidrotérmico.

Amostras de palha de trigo e sabugo de milho foram separadamente misturadas com água em um recipiente fechado e pressurizado (reator de autohidrólise), na proporção sólido/líquido de 1:10 (p/v). O sistema foi aquecido a 200°C em banho termostaticado (óleo de silicone) durante 5, 15, 30 ou 50 minutos. A fase líquida, também denominada de licor de autohidrólise (fração rica em hemiceluloses), foi separada dos sólidos por filtração sendo utilizada diretamente como substrato em experimentos de produção enzimática. As **Figuras 12 e 13** demonstram a sequência do processo para a produção do licor de autohidrólise de palha de trigo e sabugo de milho, ou seja, etapas de extração das hemiceluloses da palha de trigo e sabugo de milho moídos.

3.6 Obtenção das preparações enzimáticas

As culturas, após crescimento nas condições determinadas, foram filtradas à vácuo com auxílio de um funil de Büchner e papel de filtro, onde um filtrado de meio de cultivo livre de células e um micélio foram obtidos. Para os ensaios enzimáticos extracelulares foi utilizado o filtrado dialisado durante uma noite a 4°C, contra água destilada. O micélio foi lavado e seco em papel de filtro, este foi então pesado e posteriormente macerado com o auxílio de um pistilo em gral de porcelana com areia lavada e pré-tratada com solução alcoólica de hidróxido de potássio 5%, a 4°C. O macerado foi ressuspensão em 5 mL de água destilada e centrifugado a 10.000 g por 10 minutos, na mesma temperatura. O sobrenadante, contendo as enzimas intracelulares, foi utilizado para determinações de proteínas e atividade enzimática.

No caso da fermentação submersa utilizando licores de autohidrólise, amostras foram coletadas em intervalos de 24 horas. A massa micelial e os resíduos agroindustriais restantes foram removidos por centrifugação a 10.000 g por 15 minutos, e descartados. Os filtrados foram utilizados e analisados como fonte de xilanase e β -xilosidase brutas extracelulares.

3.7 Dosagens enzimáticas

3.7.1 Xilanase e Celulase

As atividades xilanásica e celulásica foram detectadas pela formação de açúcares redutores a partir dos substratos xilana birchwood e carboximetilcelulose, respectivamente, 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, composto por ácido cítrico 0,1M e Na_2HPO_4 0,2M, (VILELA *et al.*, 1973), pH 5,5 e 0,2 mL do extrato enzimático. A reação foi realizada a 60°C para as xilanases e 50°C para as celulases, 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, onde imediatamente após a preparação da mistura da reação, 0,1 mL desta foi adicionada a 0,1 mL de DNS.

Posteriormente, os tubos foram fervidos por 5 minutos, resfriados, e acrescentado 1 mL de água destilada. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540 nm, utilizando-se como padrão xilose ou glicose (0 – 1 mg/mL) para as dosagens de xilanase e celulase, respectivamente. A unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto. A atividade específica foi expressa em unidade de atividade total por mg de proteína total (U/mg proteína).

3.7.2 β -xilosidase

A atividade β -xilosidásica foi detectada através do método descontínuo (KERSTERS-HILDERSON *et al.*, 1982) usando o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*NF-xil). A mistura da reação foi composta de 0,05 mL de solução de substrato 0,25% (p/v) em água destilada, 0,2 mL de tampão McIlvaine, pH 4,5 e 0,15 mL do extrato enzimático. A reação foi realizada a 70°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 onde imediatamente após a preparação da mistura da reação, 0,1 mL desta foi adicionada a 1 mL de solução saturada de tetraborato de sódio. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 405 nm, utilizando-se como padrão *p*-nitrofenol de 0 a 0,6 μ mol/mL. A unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μ mol de *p*-nitrofenol por minuto. Esta metodologia também foi utilizada para análise dos substratos sintéticos: *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo, *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo, *p*-nitrofenil- β -D-arabinopiranosídeo, *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo, *p*-nitrofenil- β -D-celobipiranosídeo, 4-*O*-metil-D-glucurono-D-xilana e 4-nitrofenil-acetato.

3.8 Dosagem protéica

A quantificação de proteínas foi estimada pelo método de LOWRY e colaboradores (1951) que utiliza albumina de soro bovino (BSA) como padrão na concentração de 200 μ g/mL. A unidade foi definida como mg de proteína intracelular por mL.

3.9 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.

3.10 Biobranqueamento da polpa de celulose

As análises de biobranqueamento foram realizadas em colaboração com o Me. Jorge Henrique Almeida Betini.

3.10.1 Polpa

A polpa de celulose utilizada foi obtida na “Votorantin Celulose e Papel - VCP”, localizada em Luis Antônio - SP.

3.10.2 Consistência da polpa (%)

A consistência da polpa foi determinada pela relação massa seca/massa úmida, sendo expressa em porcentagem. Aproximadamente 10 g de massa úmida da polpa de celulose foram secas a 45°C por cerca de 15 horas e, posteriormente, a sua massa seca foi aferida. A partir desses valores, a consistência da polpa foi determinada:

$$C(\%) = \frac{Ms}{Mu} \times 100$$

Onde:

C: Consistência da polpa de celulose (%);

Ms: Massa absolutamente seca (g);

Mu: Massa úmida (g).

3.10.3 Tratamento enzimático da polpa

Para o tratamento enzimático utilizou-se 10 g de polpa de celulose seca. O pH da polpa foi determinado e ajustado quando necessário. Dez unidades por grama de massa seca das xilanases brutas extracelulares produzidas por *A. ochraceus* e *A. terricola* foram adicionadas às polpas, sendo acrescentado uma quantidade de tampão McIlvaine pH 5,5

adequada para se atingir a consistência de 10%. Este ajuste foi realizado de acordo com a equação:

$$\frac{\text{Massa seca}}{\text{Consistência}} - \text{Massa úmida} - \text{Volume da enzima} = \text{Volume máximo de água adicionada}$$

A mistura foi colocada em sacos de polietileno eficientemente vedados e incubados a 60°C, por 1 hora. Posteriormente, a polpa de celulose foi filtrada em funil de Büchner, lavada com água destilada e utilizada para determinar parâmetros como kappa, viscosidade e alvura. Os resultados obtidos foram comparados com a amostra controle, onde foram adicionados apenas tampão até atingir a mesma consistência.

3.10.4 Determinação do número kappa

O número kappa é uma grandeza empírica que permite avaliar o teor de lignina em uma pasta química de madeira. Este foi determinado de acordo com a metodologia T236 os-76 da "Technical Association of the Pulp and Paper Industry" - TAPPI, Atlanta GA (TAPPI, 1996), sendo considerado o número em cm³ de solução de permanganato de potássio 0,1 N consumido por um grama de polpa livre de umidade. Os resultados foram corrigidos para 50% de permanganato adicionado.

Para cada tratamento utilizou-se o equivalente a 2,0 g de polpa seca, que foi desintegrada com as mãos, em 10 mL de água destilada. Após este processo, as polpas foram transferidas para um Erlenmeyer de 500 mL e adicionou-se 140 mL de água destilada. A suspensão foi agitada continuamente com auxílio de uma barra magnética e um agitador, em temperatura ambiente.

Posteriormente, preparou-se uma solução composta por 25 mL de permanganato de potássio (KMnO₄) 0,1 N ± 0,0005 e 25 mL de ácido sulfúrico 4,0 N. Esta solução foi

adicionada às polpas, sendo que 50 mL de água destilada utilizada para lavar o frasco foi também adicionada a mistura de reação que prosseguiu por 10 minutos. A titulação foi realizada para determinar a quantidade de permanganato consumido, visto que esse oxida a lignina residual.

Decorridos os 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 5 mL de iodeto de potássio (KI) 1,0 M. O iodo livre na suspensão foi titulado com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1 N \pm 0,0005 até a solução (sempre sob agitação) ficar de coloração amarelo clara. Posteriormente, adicionou-se 0,5 mL de uma solução de amido 1% (p/v) e realizou a titulação até a mudança da cor azul para branca.

Foi realizada uma determinação do branco sem polpa, utilizando-se água destilada, e seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente. Portanto, quanto maior o conteúdo de lignina da polpa, maior o volume de permanganato de potássio consumido por esta, 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:

$$\text{Número kappa} = \frac{P \times FP \times FT}{2 \times Ms}$$

$$Ms = \frac{Mu \times \text{consistência}}{100}$$

$$P = (Vb - Va) \times 2$$

Onde:

Mu = massa úmida (g);

Ms = massa absolutamente seca (g);

P = volume de permanganato de potássio 0,1 N (mL),

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

FT = fator de correção da temperatura (Apêndice B);

Va = volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL);

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

3.10.5 Determinação da Viscosidade

A viscosidade foi determinada baseada na metodologia T-230 om-94 da “Technical Association of the Pulp and Paper Industry” - TAPPI, Atlanta GA (TAPPI, 1996). Uma amostra de 0,125 g da polpa seca foi colocada em um frasco âmbar com tampa e em seguida adicionou-se 12,5 mL de etilenodiamina cúprica 1,0 M, acrescentando-se 12,5 mL de água destilada. A mistura foi agitada por 15 minutos com auxílio de barra magnética e agitador, e, posteriormente, transferida para uma pipeta de viscosidade Fenske-Oswald, previamente aferida 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:

$$V = F \times t$$

Onde:

V = viscosidade da celulose (cP);

F = fator da pipeta;

t = tempo de escoamento (s).

3.10.6 Determinação da alvura

A alvura foi determinada através da medida da reflectância a 457 nm, em espectrofotômetro, segundo metodologia T414-ts da “Technical Association of the Pulp and Paper Industry” - TAPPI, Atlanta GA (TAPPI, 1996). 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 ISO 2469-1980).

3.10.7 Cálculos da eficiência de deslignificação e redução da viscosidade

Para análise dos resultados obtidos no branqueamento da polpa, outros cálculos foram realizados:

$$\% \text{ Eficiência de deslignificação} = \frac{\text{N}^\circ \text{ kappa inicial} - \text{N}^\circ \text{ kappa final} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ kappa inicial}}$$

$$\% \text{ Redução da viscosidade} = \frac{\text{viscosidade inicial} - \text{viscosidade final} \times 100}{\text{viscosidade inicial}}$$

3.11 Estudos de microscopia

3.11.1 Microscopia óptica

Os esporos dos fungos *A. terricola* e *A. ochraceus* foram inoculados em meio sólido SR suplementado com glicose 1% e, ainda em ambiente estéril (fluxo laminar), o meio recém-inoculado foi recortado com auxílio de bisturi estéril e 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 umedecido com água destilada. Todo esse material (câmara úmida, lâminas e lamínulas) foi previamente autoclavado e, após o inóculo dos microrganismos em estudo em suas respectivas lâminas, o material foi incubado a 30°C durante 24 a 48 horas. Após o período de incubação, o material foi fotografado em microscópio óptico.

3.11.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Este estudo foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Bioagentes Patogênicos – FMRP/USP.

Os microrganismos foram cultivado durante 5 dias sob lamínulas circulares que, por sua vez, estavam sobre meio PDA Biolife[®] depositado em placas de Petri. Decorrido o período de incubação, as lamínulas encobertas pelo fungo foram retiradas da placa de cultura e submetidas às etapas abaixo:

- Duas lavagens (com o auxílio de uma pinça), em tampão PBS (NaCl 8,0 g; KCl 0,2 g; KH₂PO₄ 0,2 g; Na₂PO₄ 2,16 g, e H₂O Milli-Q q.s.p. 1000 mL), adicionado de CaCl₂ (0,9 mM) e MgCl₂ (0,5 mM) a 37°C (esta etapa foi realizada utilizando-se dois recipientes pequenos, mantidos a 37°C, onde as lamínulas foram mergulhadas 10 vezes);

- As lamínulas foram colocadas em uma placa de 24 poços com 500 µl da solução P_{glu} (glutaraldeído 2% (v/v) em PBS adicionado de Ca²⁺ e Mg²⁺), a 37°C e incubadas por duas horas;

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

- Seguiram-se duas lavagens em C_{cd} e de fixação em OsO₄ (tetróxido de ósmio) 1% feito com cacodilato 0,2 M, por aproximadamente duas horas (temperatura ambiente);

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

- As lamínulas foram lavadas durante 5 minutos em 25 mL 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 0,22 µm ou 0,45 µm (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) – 5min; 50% (v/v) – 5min; 70% (v/v) – 5min; 90% (v/v) – 5 min; 95% (v/v) – 5min; 100% (v/v) – 10min; e 100% (v/v) – 10min.

- O etanol foi colocado no reservatório do ponto crítico (BALTEC CPD 030), cobrindo o material. O tanque de CO₂ foi aberto e o material resfriado até 4°C (15 minutos);

- Após o fechamento do tanque de CO₂, a câmara foi aquecida até 39°C e deixada nesta temperatura por 5 minutos para que o sistema atingisse 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 95 bar de pressão;

Os espécimes foram secos à vácuo em temperatura ambiente durante 4 horas e, posteriormente, cobertos com vapor de ouro em BALTEC[®] SCD 050 Sputter Coater (± 40 minutos). Posteriormente, as amostras foram analisadas em Microscopia Eletrônica de Varredura a 25 kV.

Este mesmo procedimento foi realizado com as polpas de celulose antes e após os tratamentos enzimáticos para análise do biobranqueamento, entretanto, para a fixação das amostras de polpa não se utilizou glutaraldeído, mas sim incubação a 40°C.

3.12 Purificação das xilanases e β -xilosidase de *Aspergillus ochraceus*

O extrato bruto (160 mL) de *A. ochraceus*, dialisado durante uma noite a 4°C contra água destilada, foi aplicado em coluna cromatográfica de troca iônica, DEAE-celulose (1,9 x 9,0 cm) equilibrada e eluída em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. Em seguida, foi aplicado um volume de 130 mL deste mesmo tampão ("lavado") e um gradiente contínuo de 200 mL de cloreto de sódio (0 – 1,5 M) dissolvido no mesmo tampão, que foi aplicado para a retirada das proteínas que adsorveram à coluna. Foram coletados 2,5 mL por tubo e frações contendo

atividades xilanásica e β -xilosidásica foram reunidas, e os dois “pools” obtidos foram dialisados contra água destilada.

A amostra protéica contendo somente atividade xilanásica (PI da coluna cromatográfica DEAE-celulose) foi liofilizada, ressuspensa em 2 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 e aplicada em coluna cromatográfica de filtração Biogel P-60 (1,2 x 45,0 cm), equilibrada e eluída no mesmo tampão usado para ressuspender a amostra. Foram coletados 1 mL por tubo, e as frações contendo a atividade xilanólítica (PI e PII de Biogel P-60) foram reunidas, dialisadas contra água destilada e utilizadas para os processos de caracterização bioquímica.

A amostra protéica contendo atividade xilanásica e β -xilosidásica (PII da coluna cromatográfica DEAE-celulose) foi liofilizada, ressuspensa em 2 mL de tampão acetato de sódio 100mM, pH 5,5, acrescido de cloreto de sódio 150 mM e aplicada em coluna cromatográfica de filtração Sephadex G-100 (1,5 x 57 cm), equilibrada e eluída com o mesmo tampão usado para ressuspender a amostra. Foram coletados 1,2 mL por tubo, e as frações contendo somente atividade xilanásica (PII da coluna cromatográfica Sephadex G-100) foram reunidas, dialisadas contra água destilada e utilizadas para os processos de caracterização bioquímica.

O “pool” contendo atividades xilanásica e β -xilosidásica (PI da coluna cromatográfica Sephadex G-100) também foi dialisado contra água destilada, liofilizado, ressuspenso em 1 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 e aplicado em coluna cromatográfica de filtração Biogel P-60 (1,2 x 45,0 cm), equilibrada e eluída no mesmo tampão usado para ressuspender a amostra. Foram coletados 1 mL por tubo, e as frações contendo a atividade β -xilosidásica foram reunidos, dialisadas contra água destilada e utilizadas para os processos de caracterização bioquímica. As etapas de purificação podem ser visualizadas na **Figura 14**.

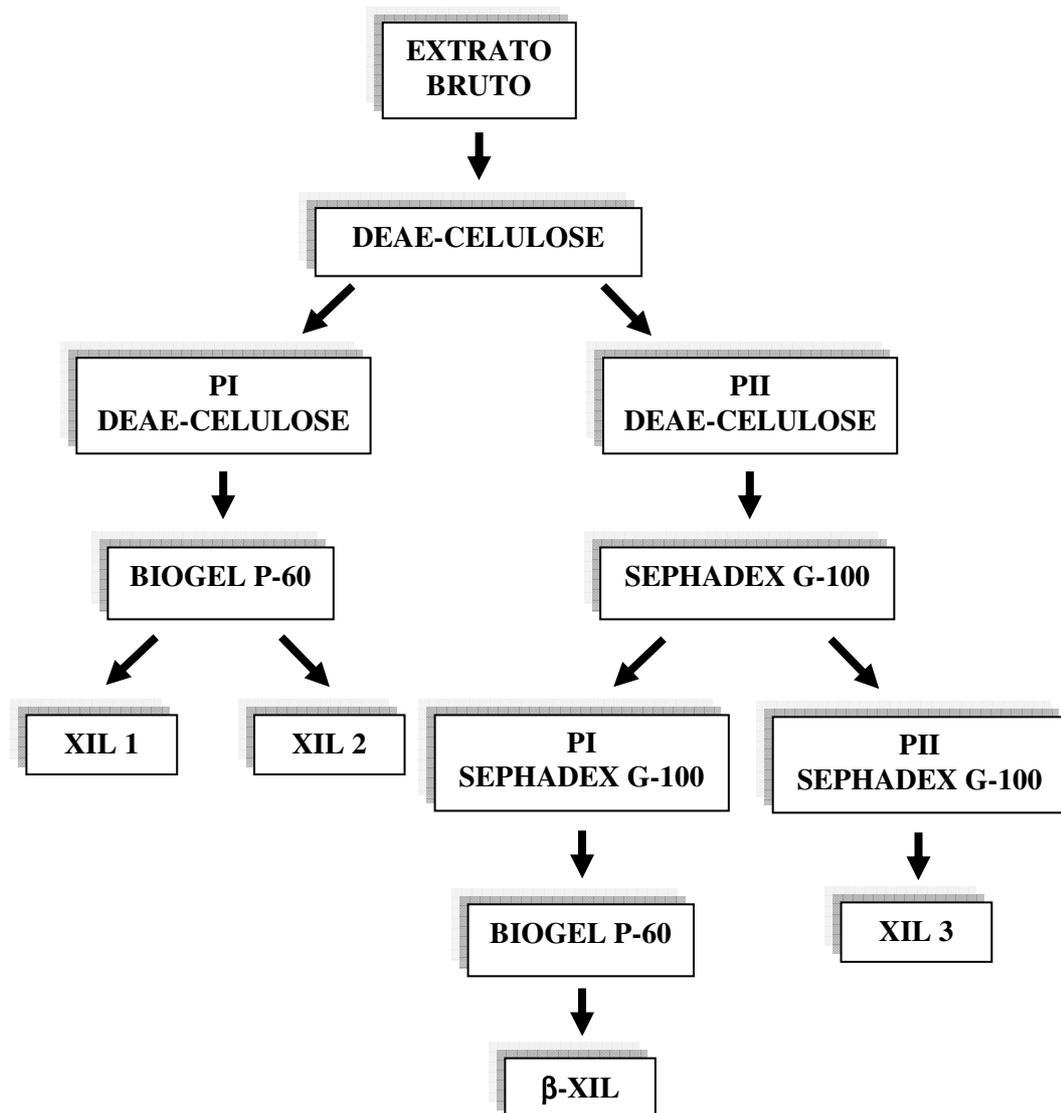


Figura 14. Etapas de purificação das enzimas xilanolíticas produzidas por *A. ochraceus*.

3.13 Caracterização bioquímica

Para caracterização bioquímica, na primeira etapa do trabalho, foram avaliados alguns parâmetros dos extratos brutos extracelulares de *A. terricola* e *A. ochraceus*, como: temperatura e pH de reação; termoestabilidade e estabilidade ao pH. Os estudos de purificação enzimática foram realizados somente com o extrato bruto de *A. ochraceus*, e a caracterização bioquímica das enzimas purificadas compreenderam também a determinação da temperatura e o pH de reação; estabilidade à temperatura e ao pH, influência de íons, determinação dos produtos de hidrólise e conteúdo de carboidratos, K_M e $V_{máx}$, etc.

3.14 Análises Eletroforéticas

3.14.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes (PAGE)

Géis de poliacrilamida em condições não desnaturantes foram preparados nas concentrações de 8% e 10% para as endoxilanasas, e 6% para a β -xilosidase, em placas de vidro (7,8 x 9,2 cm), conforme metodologia proposta por REISFELD e colaboradores (1962), para proteínas básicas (PAGE 4,5) e DAVIS (1964) para proteínas ácidas. As amostras a serem analisadas foram preparadas contendo 30 μ L da amostra enzimática, 10 μ L de tampão de corrida, 2 μ L de glicerol, e 8 μ L de verde de metila – para PAGE pH 4,5, e no caso de PAGE pH 8,9 – 8 μ L de azul de bromofenol. As eletroforeses foram realizadas, em temperatura ambiente, com tampão de corrida constituído de 3,12 g β -alanina e 0,8 mL de ácido acético glacial, pH 4,5 – PAGE 4,5, e tampão de corrida constituído de Tris-HCl 50 mM e glicina 36 mM, pH 8,9 – PAGE 8,9. A corrente aplicada foi mantida em 30 mA e 120 V.

Após o término da corrida, os géis foram imersos 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 os processos de revelação com Comassie Brilliant Blue R-250.

3.14.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As xilanasas e β -xilosidase produzidas por *Aspergillus ochraceus* tiveram suas massas moleculares determinadas por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Para isto, foram utilizados géis de poliacrilamida em placas de vidro (7,8 x 9,2 cm) nas concentrações de 10% e 7%, respectivamente.

As amostras analisadas foram diluídas na proporção de 1:1 em tampão de amostra (glicerol 20,0% (v/v), SDS 4,0% (p/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v), β -mercaptoetanol 10,0% (v/v) e Tris-HCl 0,12 M, pH 6,75) e aquecidas por 3 minutos em água fervente. A eletroforese ocorreu em temperatura ambiente, na presença de tampão Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS 0,1% (p/v), pH 8,3. Foi aplicada uma corrente de 30 mA e 120 V.

Após o término da corrida, os géis foram imersos em solução fixadora durante 1 hora. Posteriormente, seguiram-se os processos de revelação com Comassie Brilliant Blue R-250. Como marcadores de massa molecular das endoxilanasas foram utilizadas as seguintes proteínas: ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), inibidor de tripsina (24kDa) e α -lactoalbumina (15 kDa). Para a β -xilosidase os seguintes marcadores de massa molecular foram utilizados: miosina (205 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa).

As massas moleculares das enzimas foram estimadas através da confecção de um gráfico contendo na ordenada o log da massa molecular dos padrões e na abscissa o coeficiente de relação de migração (Rf) de cada proteína. O Rf foi obtido pela relação de migração entre a proteína e o fronte azul de bromofenol.

3.15 Cromatografia em camada delgada de sílica do produto de hidrólise - TLC

A análise dos produtos de hidrólise formados a partir da ação das endoxilanasas: “xil 1”, “xil 2” e “xil 3”, e da β -xilosidase – “ β -xil” sobre a xilana 1% (p/v), foi obtida por cromatografia ascendente em camada delgada de sílica de 20 x 10 cm (DC-Alufolien Kieselgel 60 sem indicador fluorescente, Merck®), segundo a metodologia descrita por FONTANA e colaboradores (1988). Os produtos da ação da “xil 2” formados após 30 minutos de reação também foram utilizados como substratos para análise da ação da β -xilosidase.

A reação ocorreu pela mistura de 50 μL da amostra enzimática com 50 μL de substrato. A incubação da mistura foi realizada a 60°C para as xilanases e a 70°C para a β -xilosidase. Alíquotas foram retiradas nos tempos desejados e fervidas durante 3 minutos, em seguida, um volume de 5 μL foi aplicado na placa de sílica. O mesmo volume de padrões de xilose e xilobiose 1% (p/v), também foram aplicados. No caso das xilanases “xil 1”, “xil 2” e “xil 3”, após a reação, as amostras foram tratadas com TCA 10% (v/v) na proporção de 1:1, e um volume de 10 μL foi aplicado nas placas, neste caso. A placa foi desenvolvida duas vezes com uma mistura de n-butanol, etanol e água destilada na proporção de 5:3:2. A revelação dos produtos de hidrólise foi realizada utilizando uma solução de 0,2% de orcinol (p/v) em metanol e ácido sulfúrico na proporção de 9:1, posteriormente, as placas foram colocadas em estufa bacteriológica a 100°C até o aparecimento das bandas correspondentes aos produtos da degradação da xilana.

3.16 Conteúdo de carboidrato

A quantificação do conteúdo de carboidratos das endoxilanases “xil 1”, “xil 2” e “xil 3” e da β -xilosidase foi realizada através do método do fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). As leituras das absorbâncias foram feitas em 490 nm. O método foi padronizado por uma curva padrão de manose na concentração de 0 a 1,0 mg/mL.

3.17 Análise cinética: K_M e $V_{m\acute{a}x}$

Os parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$ foram analisados para os substratos xilana birchwood (endoxilanases) nas concentrações de 0,5 a 30 mg/mL; e pNF-xilopiranosídeo (β -xilosidase) nas concentrações de 0,025 a 2,25 mg/mL. Os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ foram calculados segundo LINEWEAVER & BURK (1934) e HANES (1932), e a representação

gráfica foi obtida através do programa Enzyplot. A eficiência catalítica das xilanases frente aos substratos foi determinada pela razão $V_{\text{máx}}/K_M$ (CRANE & SOLS, 1953).

3.18 Dicroísmo circular (CD)

A análise da estrutura secundária das xilanases e β -xilosidase purificadas foi observada através de Dicroísmo circular, utilizando-se o espectropolarímetro Jasco 810 (JASCO Inc., Tokyo, Japan), em comprimento de onda de 250 a 180 nm (UV distante), utilizando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,1 mm, sendo todas as medidas feitas com uma média de nove repetições coletadas e subtraídas do branco (água Milli Q). Este estudo foi realizado em colaboração com o Dr. Richard John Ward, do Departamento de Química – FFCLRP/USP.

Em relação às α -hélices e as folhas β , estas estruturas secundárias apresentam um espectro de CD característico na região do UV distante (250 – 180 nm). Assim, em proteínas com suas formas estruturais nativas, a composição dos elementos de estrutura secundária é altamente definida, resultando em espectros de CD com sinais característicos (**Figura 15**).

3.19 Sequenciamento N-terminal

A análise da sequência N-terminal direta dos resíduos da endoxilanase “xil 2” foi realizada em colaboração com a Dra. Izaura Yoshico Hirata, do Departamento de Biofísica da UNIFESP, utilizando sequenciador automático PPSQ-23 Shimadzu Corporation (Tokyo-Japan), com sistema isocrático HPLC. Enquanto o sequenciamento da endoxilanase “xil 3” e da β -xilosidase purificadas foi realizada em colaboração com a Dra. Eliane Candiani Arantes, do Departamento de Física e Química – FCFRP/USP, em sequenciador automático de proteínas Shimadzu (Sistema PPSQ-33A). O sequenciamento foi obtido através do método de degradação de Edman (EDMAN e BEGG, 1967), que consiste em três etapas: acoplamento,

clivagem e conversão. O aminoácido derivado da reação com o PITC é convertido a PTH-aminoácido que é então cromatograficamente separado em RP-HPLC. A quantificação e identificação das amostras foram realizadas através da comparação com padrão de 25 pmol analisado no início de cada sequenciamento.

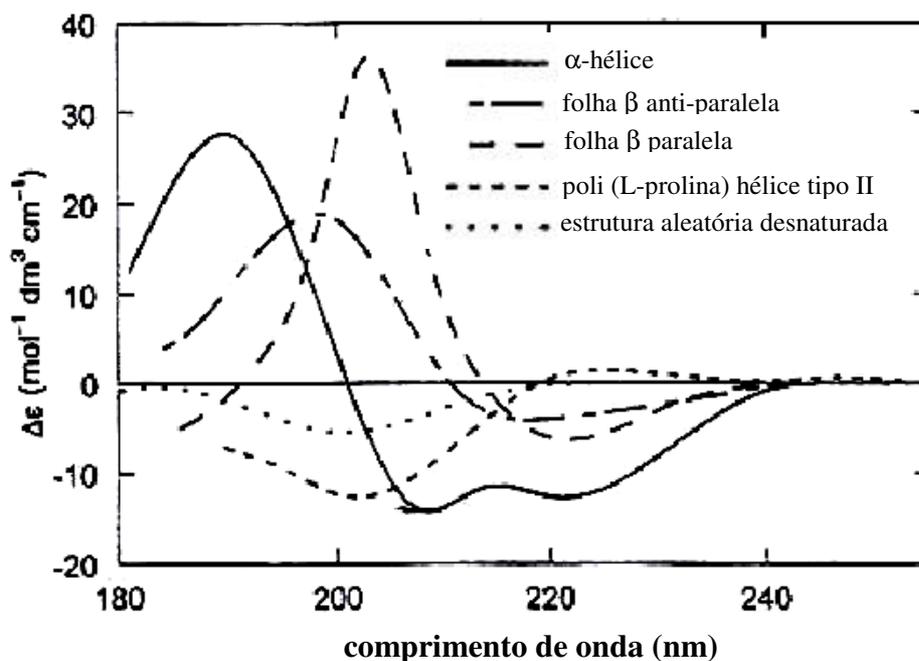


Figura 15. Espectro de dicroísmo circular de uma proteína típica para motivos estrutural secundário particular usado em programas de alinhamento da estrutura protéica em dicroísmo circular.

3.20 Reprodutibilidade

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

4. Resultados

**Parte 1: Screening de fungos filamentosos
produtores de xilanases**

4.1.1 Prospecção de fungos filamentosos

Amostras de húmus e terra foram coletadas em diversos pontos da área de reflorestamento do *Campus* da USP de Ribeirão Preto e, a partir do caule de *Hovenia dulcis* (Uva japonesa), localizada próxima ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular - FFCLRP/USP. Posteriormente, estas amostras foram levadas para o laboratório onde foram cultivadas e isoladas, nas temperaturas de 30°C e 40°C, conforme descrito no item 3.1 de Material e Métodos, com o objetivo de selecionar fungos termofílicos e/ou termotolerantes.

Conforme **Tabela 4**, sete fungos filamentosos diferentes foram isolados dos materiais coletados. Os números 1, 2, 3 e 4 referem-se as regiões onde foram realizadas as coletas, conforme descrito no item 3.1 de Material e Métodos. Dentre os fungos isolados, alguns apresentaram as mesmas características morfológicas quando observados em meio sólido de aveia e ao microscópio óptico de luz, e, portanto, receberam a mesma denominação mesmo antes de sua classificação taxonômica.

Tabela 4. Fungos filamentosos isolados durante a coleta.

| Região | Fungos isolados a 30°C | Fungos isolados a 40°C |
|--------|--|---|
| 1 | Preto Branco Verde reflorestamento Amarelo Filamentoso | Preto Verde reflorestamento Filamentoso |
| 2 | Preto Verde acobreado Branco | Verde reflorestamento |
| 3 | Filamentoso Amarelo Verde acobreado Branco | Filamentoso Verde reflorestamento |
| 4 | Uva japonesa | Uva japonesa |

Nd = não detectado

Vale ressaltar que todos os microrganismos isolados (**Tabela 4**) foram submetidos ao “screening”, ou seja, todos os fungos isolados a 30°C e 40°C nas diferentes regiões, sendo apresentado como resultado uma média entre estes, visto que os resultados foram muito próximos.

4.1.2 Seleção dos microrganismos

A seleção de microrganismos produtores de altos níveis de xilanases constituiu uma etapa importante deste trabalho. Foi considerada uma produção de xilanase significativa quando esta correspondeu a 500 U totais ou valores superiores.

A seleção dos microrganismos para o estudo foi realizada entre 35 fungos filamentosos, conforme descrito no item 3.2 de Material e Métodos. Os resultados deste experimento estão demonstrados na **Tabela 5**. Observa-se um favorecimento na produção xilanolítica (extracelular + intracelular) pelos fungos denominados ISA-1, Ingá ferradura 1, *Aspergillus phoenicis*, JII-1, *Aspergillus niger*, Uva japonesa, *Aspergillus ochraceus*, Pão escuro e Verde aveludado, respectivamente.

Os critérios para a seleção foram baseados em análises morfológicas e na produção de xilanases. Assim os fungos ISA-1, Ingá ferradura-1 e JII-1 assemelhavam-se morfológicamente em meio sólido e em microscopia óptica de luz com o fungo *Aspergillus niger*, além disso, os mesmos produziram níveis de xilanases muito próximos. Dessa forma foi selecionado o melhor produtor de xilanase, dentre eles o denominado ISA-1; quanto ao *Aspergillus phoenicis*, este já havia sido estudado em nosso laboratório quanto a produção de xilanase e β -xilosidase (RIZZATTI *et al.*, 2001; 2004), sendo que este, assim como o *Aspergillus niger*, somente foi incluído no “screening” como parâmetro para comparações, já que é sabido que estes são excelentes produtores de xilanases.

Tabela 5. Seleção dos microrganismos quanto à produção de xilanase.

| Fungos | Massa úmida (g) | Proteína (mg totais) | Atividade total (U totais) | |
|--|-----------------|----------------------|----------------------------|------------------|
| | | | Intracelular | Extracelular |
| <i>Aspergillus ochraceus</i> | 0,457 | 3,61 (± 0,23) | 231,50 (± 0,67) | 738,25 (± 0,48) |
| <i>Aspergillus niveus</i> | 0,420 | 3,55 (± 0,44) | 24,55 (± 0,40) | 553,25 (± 0,55) |
| <i>Aspergillus caespitosus</i> | 0,349 | 3,16 (± 0,35) | 39,35 (± 0,37) | 645,75 (± 0,27) |
| <i>Aspergillus phoenicis</i> | 0,294 | 4,37 (± 0,57) | 208,80 (± 0,55) | 1034,25 (± 0,75) |
| <i>Aspergillus niger</i> | 0,320 | 3,51 (± 0,35) | 129,15 (± 0,78) | 942,25 (± 0,30) |
| <i>Paecilomyces variotii</i> | 0,200 | 3,98 (± 0,33) | 38,45 (± 0,23) | 125,00 (± 0,30) |
| <i>Trichoderma reesei</i> | 0,084 | 3,10 (± 0,60) | 5,10 (± 0,12) | 143,50 (± 0,45) |
| <i>T. aureovidae</i> | 0,079 | 1,99 (± 0,48) | 30,55 (± 0,37) | 169,00 (± 0,88) |
| Uva japonesa | 0,598 | 5,90 (± 0,70) | 76,40 (± 0,88) | 918,88 (± 0,37) |
| Triparis 2 | 0,547 | 2,32 (± 0,45) | 56,95 (± 0,60) | 483,75 (± 0,55) |
| A1 | 0,525 | 2,65 (± 0,45) | 63,90 (± 0,70) | 657,50 (± 0,60) |
| ISA-1 | 0,224 | 3,06 (± 0,50) | 108,80 (± 0,65) | 1551,75 (± 0,89) |
| Pão escuro | 0,435 | 4,35 (± 0,43) | 120,35 (± 0,54) | 784,75 (± 0,66) |
| Batata | 0,502 | 3,92 (± 0,46) | 97,70 (± 0,47) | 296,25 (± 0,12) |
| Cinza | 0,433 | 2,35 (± 0,39) | 31,00 (± 0,33) | 363,50 (± 0,22) |
| J I-2 | 0,454 | 3,87 (± 0,49) | 49,05 (± 0,35) | 502,25 (± 0,89) |
| J II-1 | 0,287 | 5,48 (± 0,63) | 128,70 (± 0,45) | 1012,50 (± 0,45) |
| Ingá ferradura 1 | 0,328 | 4,34 (± 0,58) | 143,50 (± 0,54) | 1369,50 (± 0,45) |
| Ingá ferradura 2 | 0,207 | 2,06 (± 0,48) | 7,40 (± 0,15) | 92,50 (± 0,70) |
| J IV | 0,386 | 3,49 (± 0,62) | 34,70 (± 0,22) | 301,00 (± 0,35) |
| Desconhecido | 0,550 | 4,41 (± 0,73) | 42,60 (± 0,55) | 349,50 (± 0,57) |
| Preto | 0,308 | 3,62 (± 0,54) | 166,65 (± 0,98) | 643,30 (± 0,72) |
| Verde reflorestamento | 0,404 | 3,02 (± 0,23) | 16,20 (± 0,45) | 487,07 (± 0,49) |
| Amarelo | 0,210 | 1,22 (± 0,20) | 0,520 (± 0,12) | 87,14 (± 0,63) |
| Verde aveludado | 0,428 | 4,90 (± 0,59) | 68,05 (± 0,44) | 752,25 (± 0,58) |
| <i>Neurospora crassa OS-1</i> | 0,295 | 2,67 (± 0,55) | 1,85 (± 0,11) | 67,25 (± 0,80) |
| <i>N. crassa selvagem</i> | 0,197 | 2,24 (± 0,19) | 15,30 (± 0,33) | 127,25 (± 0,60) |
| <i>N. crassa Exo-mutante</i> | 0,187 | 4,87 (± 0,20) | 8,80 (± 0,42) | 36,96 (± 0,56) |
| <i>Rhizopus microsporus</i> <i>var. rhizopodiformis</i> | 0,215 | 2,6 (± 0,20) | 27,8 (± 0,55) | 100,3 (± 0,63) |
| <i>Penicillium herquei</i> | 0,625 | 8,30 (± 0,65) | 85,42 (± 0,78) | 212,64 (± 0,75) |

Os fungos *A. versicolor*, *Mucor rouxii*, e os denominados Branco, Filamentoso e Verde acobreado também foram submetidos ao “screening”, no entanto, em nenhum deles foi detectada a produção significativa de xilanases. Os microrganismos foram cultivados em meio SR, a 40°C, por 72 horas em estufa bacteriológica.

Assim, ISA-1, Uva japonesa, Pão escuro, Verde aveludado e *Aspergillus ochraceus* foram selecionados, e em seguida, as cepas não-identificadas foram enviadas para a realização da classificação taxonômica (item 3.2 de Material e Métodos). Após a identificação dos microrganismos em estudo, selecionaram-se somente os fungos *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus* para dar continuidade ao trabalho, uma vez que na literatura podem ser encontrados muitos trabalhos com o fungo *Aspergillus niger* (ISA-1) quanto à produção e purificação de xilanases e β -xilosidases, e descartou-se também a possibilidade de se trabalhar com as duas linhagens do fungo *Aspergillus flavus* (Pão escuro e Verde aveludado) por se tratar de um fungo patogênico. Além disso, *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus* mostraram-se bons produtores de xilanases, e frente aos objetivos do nosso trabalho, foi possível a realização de um trabalho inédito.

Posteriormente, seguiram-se as etapas de padronização das condições de cultivo para os fungos selecionados visando à obtenção de altos níveis de xilanases.

Parte 2: Produção de enzimas xilanolíticas por

Aspergillus terricola e *Aspergillus ochraceus*

4.2.1 Seleção do meio de cultura

Foram testados vários meios de cultura, a fim de determinar a melhor composição para a produção de xilanases pelos microrganismos selecionados. Os meios de cultura testados foram: Adams, Khanna, SR, Vogel, Czapeck e M-5, utilizando xilana birchwood 1% (p/v) como fonte de carbono (segundo item 3.4.1.1 de Material e Métodos). Os fungos foram incubados a 40°C, por 72 horas em estufa bacteriológica, sendo que os meios selecionados foram Vogel para *Aspergillus terricola* e Adams para *Aspergillus ochraceus* (**Tabela 6**).

Embora a atividade total tenha sido maior no meio SR para *A. terricola*, sua atividade específica foi relativamente baixa quando comparada com as demais, e o meio Vogel apresentou uma boa atividade total (a segunda melhor) e atividade específica, sendo esta última quase o dobro daquela obtida em meio SR. Em relação ao *Aspergillus ochraceus*, o meio Adams apresentou a melhor composição para a produção enzimática em termos de atividade total, sendo que este também apresentou uma boa atividade específica. No meio M-5 foi verificada a melhor atividade específica, no entanto este meio não foi selecionado para dar continuidade ao estudo, uma vez que a atividade xilanásica total e crescimento do microrganismo foram muito baixos.

Dentre os meios de cultura selecionados para os microrganismos em estudo, pode-se observar que a maior parte das xilanases produzidas (90-99%) foi secretada para o meio de cultura, dados bastante relevantes para propósitos de purificação.

Tabela 6. Seleção do meio de cultura para produção de xilanase.

| Fungos | Meios de Cultura | Massa úmida (g) | Proteína (mg totais) | Atividade total (U total) | |
|------------------------------|------------------|-----------------|----------------------|---------------------------|-----------------|
| | | | | Intracelular | Extracelular |
| <i>Aspergillus terricola</i> | SR | 0,564 | 3.55 (± 0,10) | 80.30 (± 0,14) | 659.75 (± 0,16) |
| | Adams | 0,249 | 1.90 (± 0,08) | 19.45 (± 0,12) | 465.25 (± 0,10) |
| | Khanna | 0,254 | 2.15 (± 0,15) | 35.65 (± 0,10) | 350.75 (± 0,15) |
| | Czapeck | 0,075 | 0.90 (± 0,11) | 14.10 (± 0,10) | 375.00 (± 0,20) |
| | Vogel | 0,152 | 1.60 (± 0,10) | 40.75 (± 0,13) | 548.50 (± 0,30) |
| | M-5 | 0,073 | 0.85 (± 0,20) | 7.85 (± 0,22) | 116.25 (± 0,12) |
| <i>Aspergillus ochraceus</i> | SR | 0,126 | 1.65 (± 0,15) | 6.00 (± 0,13) | 324.75 (± 0,11) |
| | Adams | 0,272 | 2.00 (± 0,12) | 34.25 (± 0,14) | 541.75 (± 0,28) |
| | Khanna | 0,251 | 2.15 (± 0,10) | 42.80 (± 0,05) | 442.75 (± 0,10) |
| | Czapeck | 0,172 | 1.75 (± 0,11) | 65.00 (± 0,20) | 514.00 (± 0,28) |
| | Vogel | 0,200 | 2.25 (± 0,10) | 19.70 (± 0,10) | 402.75 (± 0,30) |
| | M-5 | 0,020 | 0.40 (± 0,14) | 3.45 (± 0,16) | 112.75 (± 0,20) |

Os microrganismos foram cultivados em vários meios de cultura, a 40°C, por 72 horas em estufa bacteriológica.

4.2.2 Efeito da fonte de carbono

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 xilanolítica (**Tabela 7**). Os microrganismos foram cultivados em meios Vogel (*Aspergillus terricola*) e Adams (*Aspergillus ochraceus*) suplementado com várias fontes de carbono 1%, a 40°C, por 72 horas, em estufa bacteriológica.

Entre as fontes testadas, as que apresentaram maior atividade xilanolítica extracelular total e específica foram xilana birchwood e xilana oat spelt, respectivamente. Para *Aspergillus terricola*, a atividade total obtida com xilana birchwood foi 17,4% maior do que a obtida com xilana oat spelt e 28,2% maior do que a obtida com farelo de trigo, substrato que se mostrou um excelente indutor de xilanases. Além dessas fontes de carbono, outras também se

mostraram adequadas para a produção de xilanases, como centeio em flocos e xilose. Para *Aspergillus ochraceus*, a atividade total obtida com xilana birchwood foi apenas 1,3% maior do que a obtida com xilana oat spelt e 52,6% maior do que a obtida com β -metil-xilosídeo, terceiro melhor indutor da produção de xilanases, entre os substratos testados. Farelo de trigo também foi favorável para a síntese de xilanases.

A produção de xilanases usando xilana birchwood como fonte de carbono foi 86,4% maior quando comparada com glicose para *A. terricola*, e 96,2% maior para *A. ochraceus*. Estes resultados já eram esperados, visto que uma fonte de carbono é essencial para uma boa produção de xilanases e a glicose é um substrato pronto para ser metabolizado, não havendo a necessidade da produção de xilanases.

Analisou-se também, a produção de β -xilosidase secretada por *A. terricola* e *A. ochraceus* para o meio de cultivo, quando estas diferentes fontes de carbono foram utilizadas como indutoras. Altos níveis de β -xilosidase foram observados no meio de cultivo de *A. ochraceus* (**Tabela 8**), principalmente quando xilose, xilana birchwood (melhor fonte de carbono para a produção de xilanase), xilana oat spelt, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, farelo de trigo, xilitol e celobiose foram utilizados como fonte de carbono para o cultivo. *Aspergillus terricola* também secretou β -xilosidase para o meio extracelular, no entanto, esta secreção foi muito menor quando comparada com *A. ochraceus*. Os principais substratos indutores da atividade β -xilosidásica extracelular de *A. terricola* foram: xilana birchwood, farelo de trigo, e em menor proporção xilose, xilana ot spelt, flocos de milho e celobiose.

Tabela 7. Seleção da melhor fonte de carbono para a produção de xilanase.

| Fontes de Carbono | <i>Aspergillus terricola</i> | | | | <i>Aspergillus ochraceus</i> | | | |
|-----------------------|------------------------------|----------------------|---------------------------|-----------------|------------------------------|----------------------|---------------------------|-----------------|
| | Massa úmida (g) | Proteína (mg totais) | Atividade total (U total) | | Massa úmida (g) | Proteína (mg totais) | Atividade total (U total) | |
| | | | Intracelular | Extracelular | | | Intracelular | Extracelular |
| arabinose | 0,49 | 4,33 (± 0,10) | 3,47 (± 0,20) | 9,26 (± 0,13) | 0,20 | 2,86 (± 0,11) | Nd | 13,89 (± 0,18) |
| avicel | Nd | Nd | Nd | Nd | 0,35 | 0,94 (± 0,18) | Nd | 6,94 (± 0,13) |
| bagaço de cana | 0,15 | 1,01 (± 0,15) | Nd | 3,47 (± 0,12) | Nd | Nd | Nd | 24,31 (± 0,20) |
| β-metil-xilosídeo | 0,02 | 1,00 (± 0,10) | Nd | Nd | 0,11 | 1,71 (± 0,12) | Nd | 85,65 (± 0,32) |
| celobiose | 0,60 | 5,84 (± 0,10) | 1,16 (± 0,22) | 4,63 (± 0,10) | 0,46 | 5,72 (± 0,15) | 9,26 (± 0,14) | 3,47 (± 0,10) |
| centeio em flocos | 0,43 | 7,64 (± 0,11) | 19,68 (± 0,18) | 65,97 (± 0,15) | 0,06 | 1,37 (± 0,10) | Nd | 26,62 (± 0,22) |
| farelo de trigo | 0,30 | 5,40 (± 0,13) | 8,10 (± 0,15) | 115,74 (± 0,30) | Nd | Nd | Nd | 68,29 (± 0,27) |
| flocos de aveia | 0,25 | 4,81 (± 0,10) | 2,31 (± 0,13) | 2,31 (± 0,18) | 0,05 | 1,21 (± 0,11) | Nd | 21,99 (± 0,13) |
| flocos de cevada | 0,36 | 4,52 (± 0,18) | Nd | 25,46 (± 0,23) | 0,19 | 3,57 (± 0,13) | 1,16 (± 0,10) | 39,35 (± 0,28) |
| flocos de milho | 0,39 | 4,25 (± 0,16) | Nd | Nd | 0,10 | 1,18 (± 0,10) | Nd | 4,63 (± 0,11) |
| flocos de soja | 0,18 | 4,44 (± 0,20) | Nd | Nd | 0,03 | 0,51 (± 0,10) | 1,16 (± 0,10) | 10,42 (± 0,15) |
| glicose | 0,48 | 3,77 (± 0,11) | 3,47 (± 0,14) | 21,99 (± 0,14) | 0,41 | 2,57 (± 0,14) | 4,63 (± 0,12) | 6,94 (± 0,10) |
| milho moído | 0,21 | 3,45 (± 0,11) | Nd | 11,57 (± 0,16) | 0,19 | 2,23 (± 0,16) | Nd | Nd |
| palha de arroz | 0,07 | 0,78 (± 0,10) | 2,31 (± 0,26) | 1,16 (± 0,10) | Nd | Nd | Nd | 21,99 (± 0,14) |
| sabugo de milho | 0,09 | 1,42 (± 0,15) | 1,16 (± 0,22) | 12,73 (± 0,13) | Nd | Nd | Nd | Nd |
| sem fonte | 0,04 | 1,47 (± 0,16) | Nd | Nd | 0,01 | 0,49 (± 0,10) | Nd | Nd |
| serragem de eucalipto | Nd | Nd | Nd | Nd | Nd | Nd | Nd | 5,79 (± 0,10) |
| xilana birchwood | 0,28 | 3,73 (± 0,10) | 14,63 (± 0,15) | 161,12 (± 0,26) | 0,24 | 2,71 (± 0,13) | 10,42 (± 0,16) | 180,56 (± 0,30) |
| xilana oat spelt | 0,35 | 4,88 (± 0,14) | 11,57 (± 0,16) | 133,10 (± 0,25) | 0,28 | 2,82 (± 0,15) | 31,25 (± 0,23) | 178,24 (± 0,29) |
| xilitol | 0,62 | 4,71 (± 0,10) | Nd | Nd | 0,26 | 3,56 (± 0,11) | 4,63 (± 0,12) | 15,05 (± 0,11) |
| xilose | 0,45 | 5,42 (± 0,11) | 8,10 (± 0,11) | 61,34 (± 0,22) | 0,45 | 3,66 (± 0,11) | 1,16 (± 0,10) | 32,41 (± 0,20) |

Nd = não detectado. Microrganismos cultivados nos seus meios ótimos de cultivo, a 40°C, por 72 horas em estufa bacteriológica.

Tabela 8. Seleção da melhor fonte de carbono para a produção de β -xilosidase.

| Fontes de Carbono | Atividade β -xilosidásica extracelular (U total) | |
|--------------------------|--|------------------------------|
| | <i>Aspergillus terricola</i> | <i>Aspergillus ochraceus</i> |
| arabinose | 0,75 (\pm 0,15) | 7,50 (\pm 0,13) |
| avicel | Nd | 4,00 (\pm 0,18) |
| bagaço de cana | 0,75 (\pm 0,10) | 35,75 (\pm 0,11) |
| β -metil-xilosídeo | Nd | 15,50 (\pm 0,13) |
| celobiose | 1,25 (\pm 0,13) | 27,75 (\pm 0,12) |
| centeio em flocos | 1,00 (\pm 0,23) | 2,00 (\pm 0,15) |
| farelo de trigo | 3,00 (\pm 0,11) | 34,25 (\pm 0,05) |
| flocos de aveia | 1,00 (\pm 0,20) | 7,00 (\pm 0,21) |
| flocos de cevada | Nd | 14,25 (\pm 0,21) |
| flocos de milho | 1,25 (\pm 0,13) | 2,75 (\pm 0,19) |
| flocos de soja | 0,25 (\pm 0,22) | 1,75 (\pm 0,12) |
| glicose | Nd | 1,50 (\pm 0,10) |
| milho moído | 0,75 (\pm 0,14) | 6,75 (\pm 0,07) |
| palha de arroz | 0,25 (\pm 0,18) | 8,25 (\pm 0,13) |
| sabugo de milho | 0,25 (\pm 0,13) | 35,00 (\pm 0,10) |
| sem fonte | Nd | 1,00 (\pm 0,25) |
| serragem de eucalipto | 1,25 (\pm 0,16) | 1,00 (\pm 0,27) |
| xilana birchwood | 3,25 (\pm 0,10) | 37,50 (\pm 0,12) |
| xilana oat spelt | 1,25 (\pm 0,08) | 36,50 (\pm 0,15) |
| xilitol | 0,75 (\pm 0,11) | 28,75 (\pm 0,15) |
| xilose | 2,00 (\pm 0,11) | 38,00 (\pm 0,10) |

Nd = não detectado. Microrganismos cultivados nos seus meios ótimos de cultivo, a 40°C, por 72 horas em estufa bacteriológica.

4.2.3 Tempo de cultivo

Neste experimento, os microrganismos foram inoculados nos seus meios ótimos de cultivo, utilizando xilana birchwood 1% como fonte de carbono, e incubados em estufa bacteriológica, à 40°C, durante vários dias, para determinação do período ótimo de incubação para a produção de xilanases. Em termos de crescimento (proteína intracelular) o tempo ótimo de cultivo ocorreu nos períodos iniciais, 96 e 72 horas, respectivamente (**Figura 16A**). Em relação à produção enzimática, o período ótimo de cultivo, no qual verificou-se os maiores níveis de produção extracelular foram 144 horas para *Aspergillus terricola* e 120 horas para *Aspergillus ochraceus* (**Figura 16B**).

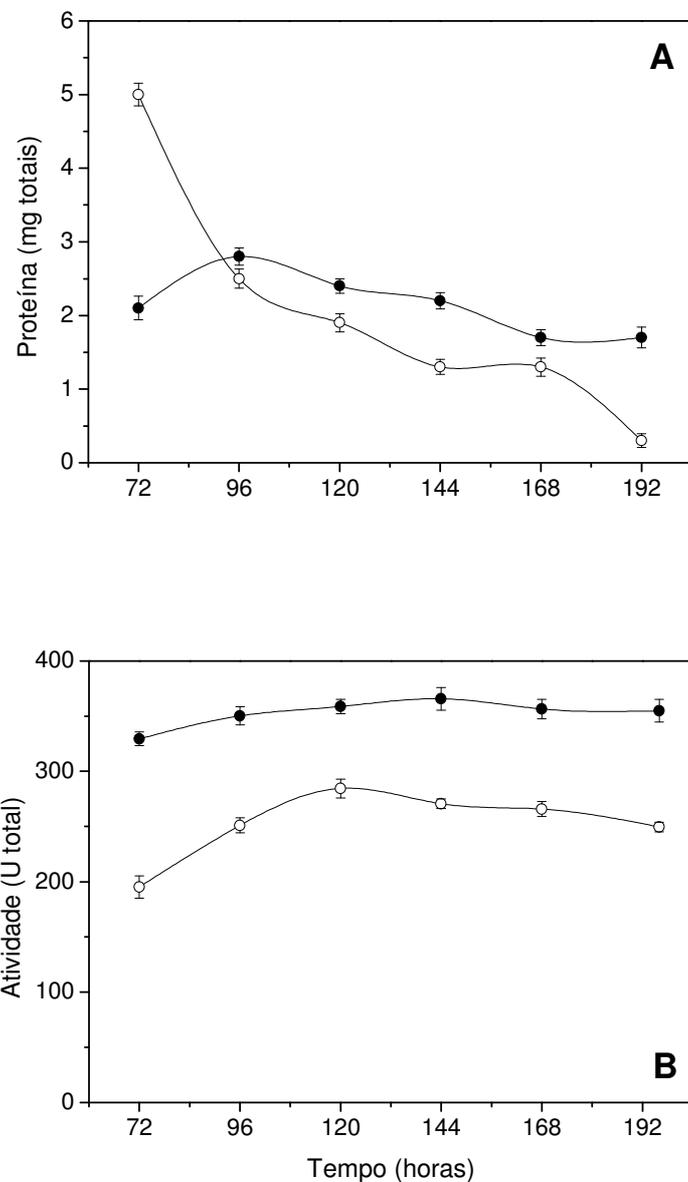


Figura 16. Influência do tempo de cultivo na produção de xilanases extracelulares. Proteína total (A) e atividade xilanásica total (B) de *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus* em função do tempo de cultivo. Microrganismos cultivados em seus meios ótimos de cultivo, em estufa bacteriológica a 40°C, por várias horas. Símbolos: -●- *Aspergillus terricola*; -○- *Aspergillus ochraceus*.

4.2.4 Temperatura cultivo

Para determinar a temperatura ótima de cultivo de *A. terricola* e *A. ochraceus* para a produção de xilanases, os microrganismos foram incubados entre 25 a 45°C, com intervalos de 5°C, entre estas. Na **Figura 17A** observou-se que os microrganismos apresentaram temperatura ótima de crescimento bastante distinta – 25°C para *A. terricola*, e 45°C para *A. ochraceus*, no entanto, a melhor temperatura para a produção de xilanases extracelulares foi a 30°C para os dois fungos em estudo (**Figura 17B**), sendo que a atividade secretada para o meio extracelular foi mais que o dobro da observada no interior das células nos dois microrganismos (dados não mostrados). Portanto, *A. terricola* e *A. ochraceus* foram classificados como organismos mesófilos, segundo COONEY & EMERSON (1964), sendo também considerados organismos termotolerantes, já que eles cresceram em todas as temperaturas testadas, até 45°C.

4.2.5 Cultivos estático e sob agitação

As condições estática e de agitação foram testadas para a produção de xilanases. Os microrganismos foram inoculados nos seus meios ótimos de cultivo, utilizando as fontes de carbono pré-padronizadas, e incubados à 30°C, por 120 (*A. ochraceus*) e 144 horas (*A. terricola*), em estufa bacteriológica ou agitação a 100rpm.

Os resultados estão demonstrados na **Figura 18** e observa-se, em termos de crescimento, um maior nível protéico no cultivo estático (**Figura 18A**), embora para o fungo *A. terricola* esta diferença tenha sido mínima. Em relação à produção enzimática, verificou-se que a condição estática, que já vinha sendo usada, foi a mais favorável para a secreção das xilanases para o meio de cultura (**Figura 18B**).

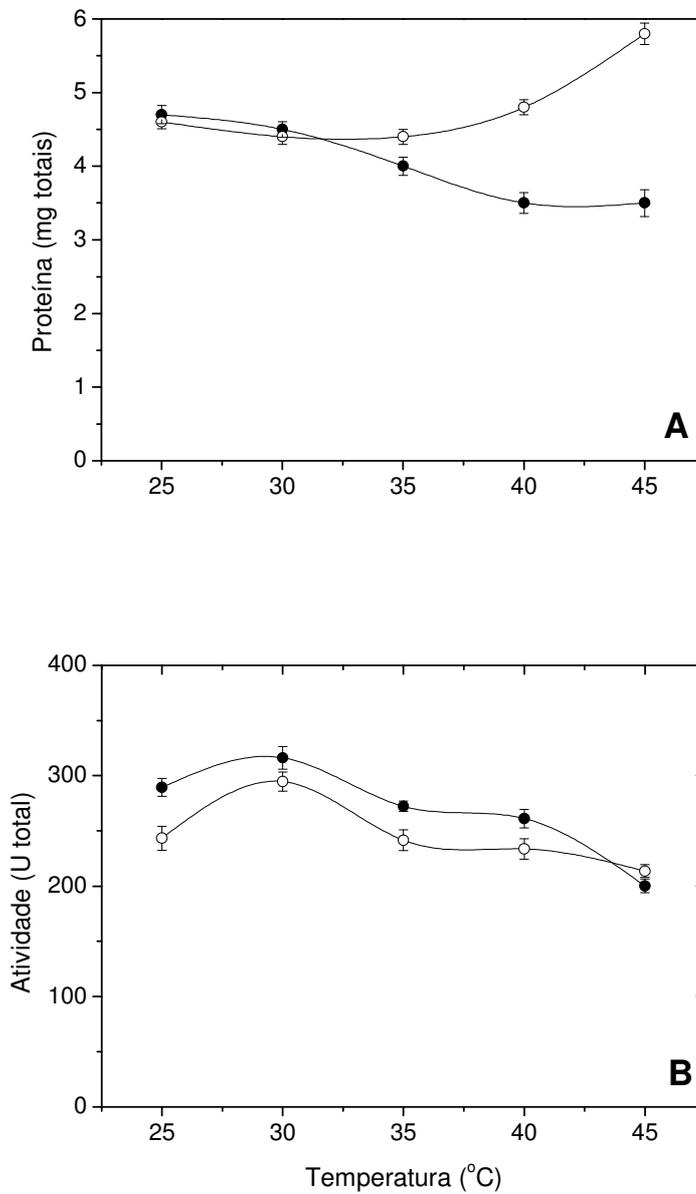


Figura 17. Influência da temperatura de cultivo na produção de xilanases extracelulares. Proteína total (A) e atividade xilanásica total (B) de *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus* em função da temperatura de cultivo. Microrganismos cultivados em seus meios ótimos de cultivo, em estufa bacteriológica em várias temperaturas, por 144 e 120 horas, respectivamente. Símbolos: -●- *Aspergillus terricola*; -○- *Aspergillus ochraceus*.

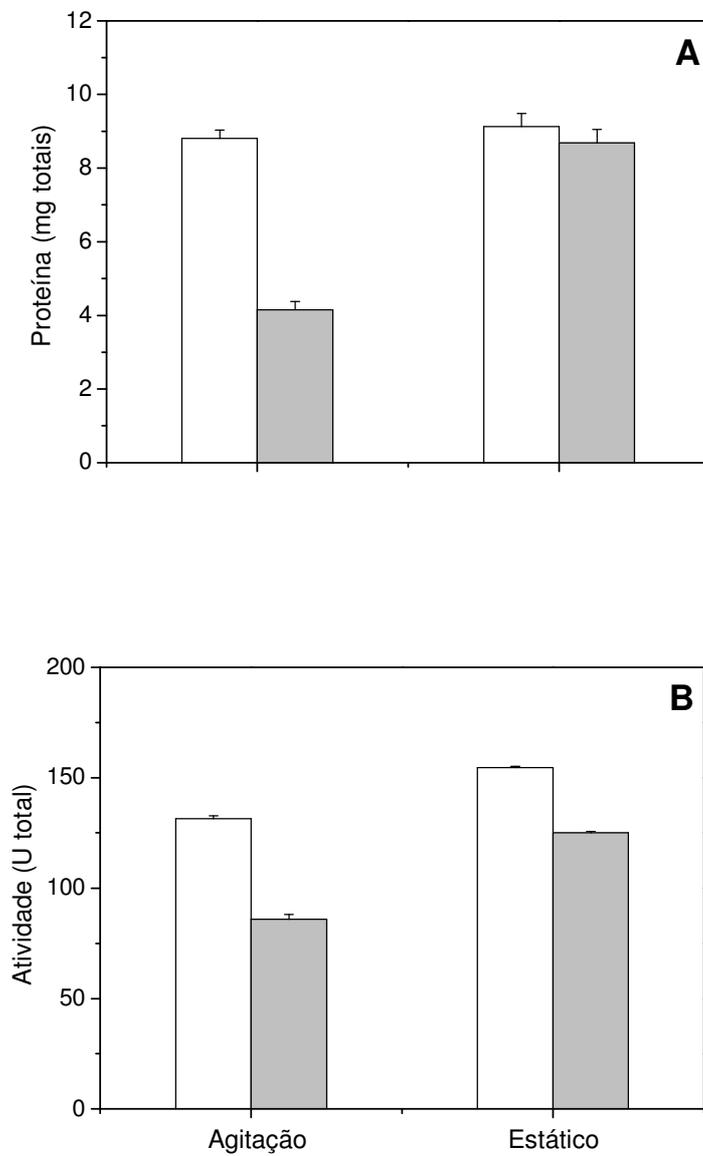


Figura 18. Influência da aeração na produção de xilanases extracelulares. Proteína total (A) e atividade xilanásica total (B) de *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus*. Microrganismos cultivados em seus meios ótimos de cultivo, em estufa bacteriológica ou shaker (100 rpm) a 30°C, por 144 e 120 horas, respectivamente. Coluna branca: *Aspergillus terricola*; coluna cinza: *Aspergillus ochraceus*.

4.2.6 Xilanase

4.2.6.1 Determinação da temperatura e pH ótimos de reação

A determinação das temperaturas e pHs de reação, em que as xilanases produzidas por estes microrganismos apresentam maior atividade, foi realizada somente para as amostras extracelulares, onde os níveis de xilanases foram maiores.

As temperaturas de reação testadas variaram entre 25 e 80°C; e os pHs de reação entre 2,5 e 8,0, utilizando-se tampão McIlvaine. As temperaturas ótimas de reação foram observadas a 60°C para a xilanase extracelular produzida por *A. terricola* e 65°C para a xilanase de *A. ochraceus* (**Figura 19A**). Enquanto os pHs em que as xilanases extracelulares apresentaram maior atividade enzimática foram 6,5 para *A. terricola* e 5,0 para *A. ochraceus* (**Figura 19B**).

4.2.6.2 Termoestabilidade das xilanases extracelulares

Para a determinação da estabilidade térmica, inicialmente, o extrato enzimático extracelular foi incubado em várias temperaturas, de 25 a 80°C com intervalo de 5°C entre estas, por 1 hora. Transcorrido estes tempos, alíquotas destes extratos foram retiradas e colocadas em gelo, e posteriormente foi realizado o ensaio enzimático, descrito no item 3.7.1 de Material e Métodos. O substrato utilizado neste ensaio foi xilana birchwood 1% em tampão McIlvaine pH 5,5. Neste experimento, foi feito um controle que correspondeu a 100% da atividade, onde o extrato enzimático não foi pré-incubado nas temperaturas testadas.

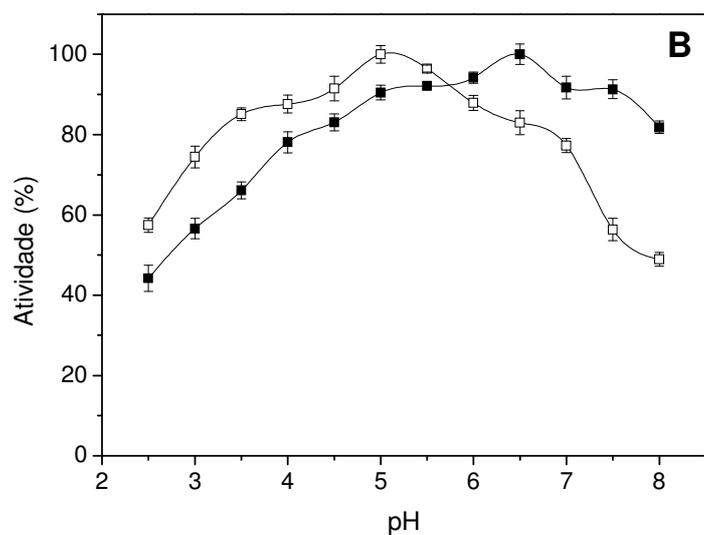
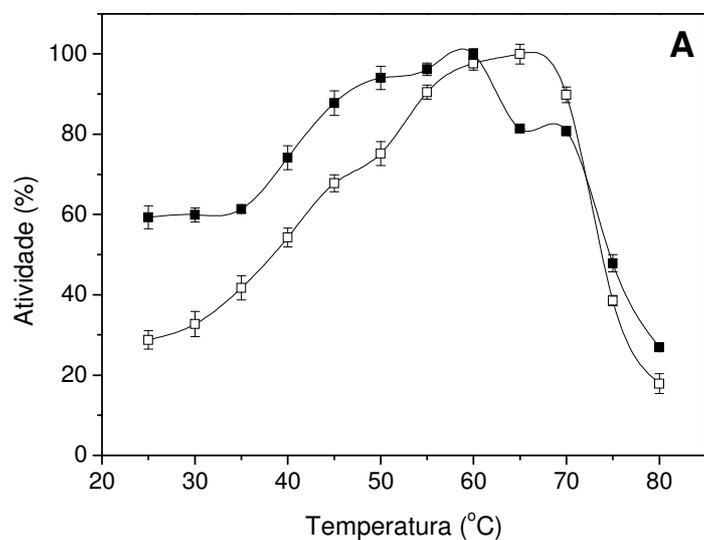


Figura 19. Influência da temperatura e do pH na reação das xilanases extracelulares. Porcentagem da atividade xilanásica produzidas por *A. terricola* e *A. ochraceus* em função da temperatura (A); e do pH de reação (B). Microrganismos cultivados nas suas condições ótimas de cultivo de fermentação submersa. Símbolos: -■- *A. terricola*; -□- *A. ochraceus*.

Neste experimento, foi verificado que as xilanases produzidas por *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus* foram completamente estáveis, por 1 hora, a 55°C e 50°C, respectivamente, sendo que a 60°C, a xilanase de *A. terricola* manteve mais de 60% da sua atividade inicial e a partir desta temperatura a atividade diminuiu gradualmente. A xilanase de *A. ochraceus* manteve aproximadamente 60% da sua atividade inicial até 55°C, e em temperaturas superiores a enzima não foi estável (**Figura 20**).

Posteriormente, foi realizado um experimento a fim de determinar o t_{50} dos extratos extracelulares de *A. terricola* e *A. ochraceus*, no qual o extrato enzimático extracelular foi incubado durante vários tempos (5 a 120 minutos) entre as temperaturas de 50 a 65°C, de acordo com o resultado do experimento anterior para cada microrganismo. Transcorrido estes tempos, alíquotas destes extratos foram retiradas e colocadas em gelo, e posteriormente foi realizado o ensaio enzimático. Neste experimento, também foi feito um controle, que correspondeu a 100% da atividade, onde o extrato enzimático não foi pré-incubado nas temperaturas testadas.

Em relação à termoestabilidade do *A. terricola*, verificou-se que o extrato bruto manteve-se completamente estável a 55°C por 2 horas, apresentando um t_{50} de aproximadamente 80 minutos a 60°C e 10 minutos a 65°C (**Figura 21A**). A xilanase extracelular produzida por *A. ochraceus* foi estável a 50°C por 2 horas, e exibiu um t_{50} de cerca de 65 e 10 minutos a 55°C e 60°C, respectivamente (**Figura 21B**). Portanto, verifica-se que a xilanase extracelular produzida por *A. terricola* foi mais termoestável que aquela produzida por *A. ochraceus*.

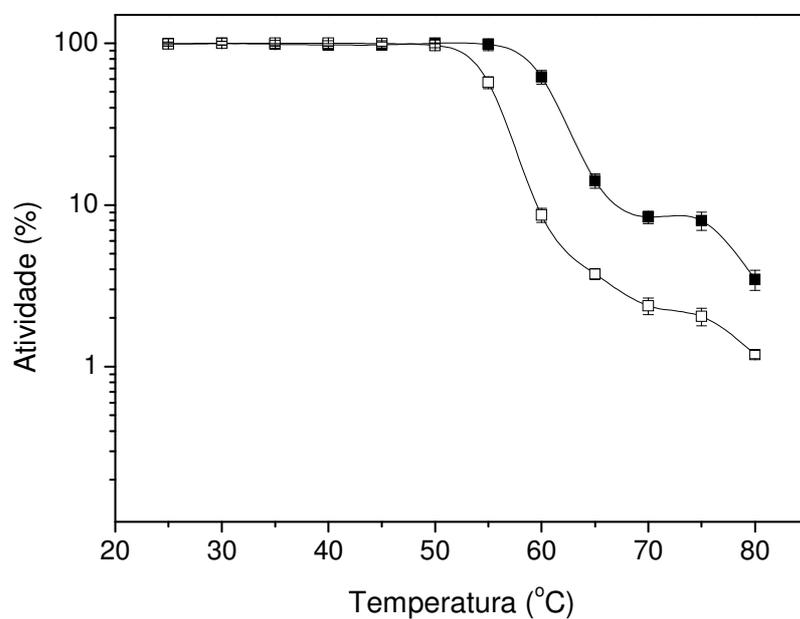


Figura 20. Termoestabilidade das xilanases extracelulares em várias temperaturas. Porcentagem da atividade xilanásica residual produzidas por *A. terricola* e *A. ochraceus* em função das temperaturas de incubação. Microrganismos cultivados nas suas condições ótimas de cultivo de fermentação submersa. Símbolos: -■- *A. terricola*; -□- *A. ochraceus*.

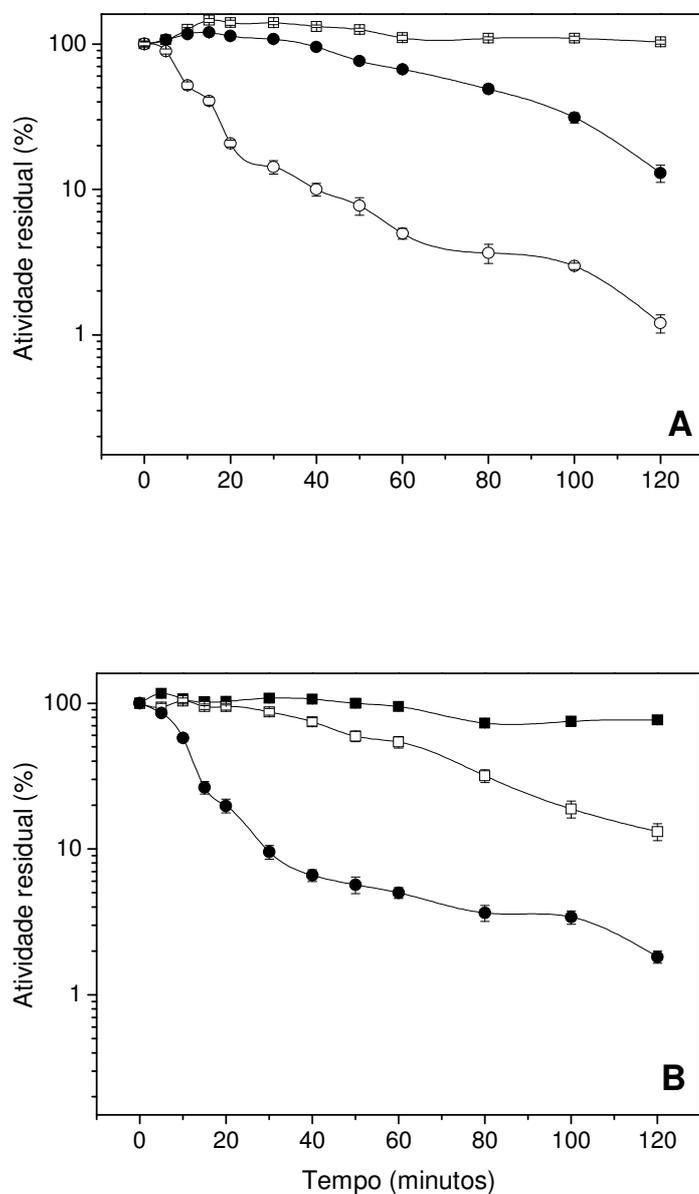


Figura 21. Termoestabilidade das xilanases extracelulares em vários tempos. Porcentagem da atividade xilanásica residual produzidas por *A. terricola* (A) e *A. ochraceus* (B) em função dos tempos de incubação. Microrganismos cultivados nas suas condições ótimas de cultivo de fermentação submersa. Símbolos: -■- 50°C; -□- 55°C; -●- 60°C; -○- 65°C.

4.2.6.3 Estabilidade ao pH

Para a determinação da estabilidade ao pH, incubou-se em gelo os extratos enzimáticos extracelulares acrescidos de tampão McIlvaine, nos pHs de 2,5 a 8,0, com intervalos de 0,5, entre estes, na proporção de 1:1, durante 1 hora. Transcorrido este tempo, alíquotas destes extratos foram coletadas e então foi realizado o ensaio enzimático. Neste experimento, foi feito um controle que correspondeu a 100% da atividade, no qual o extrato enzimático, diluído 1:1, não foi pré-incubado nos pHs testados.

Verificou-se que as xilanases extracelulares produzidas pelos microrganismos em estudo foram bastante estáveis em toda a faixa de pH testada (2,5-8,0) durante 1 hora, sendo esta estabilidade pelo menos igual ou maior que 70% (**Figura 22**).

4.2.7 β -xilosidase

Alguns parâmetros físicos da β -xilosidase extracelular do fungo *Aspergillus ochraceus* foram determinados, devido aos altos níveis enzimáticos observados por este microrganismo.

4.2.7.1 Determinação da temperatura e pH ótimos de reação

A temperatura e o pH ótimos de reação da β -xilosidase extracelular produzida por *A. ochraceus* também foram determinados, devido a alta produção de β -xilosidase extracelular sintetizada e secretada pelo microrganismo. Para a realização deste experimento, as temperaturas de reação testadas variaram entre 25°C e 80°C; e os pHs de reação entre 2,5 e 8,0. A temperatura ótima de reação foi a 75°C (**Figura 23A**) e o pH em que a β -xilosidase extracelular apresentou maior atividade enzimática ficou na faixa de 3,0 a 5,0 (**Figura 23B**).

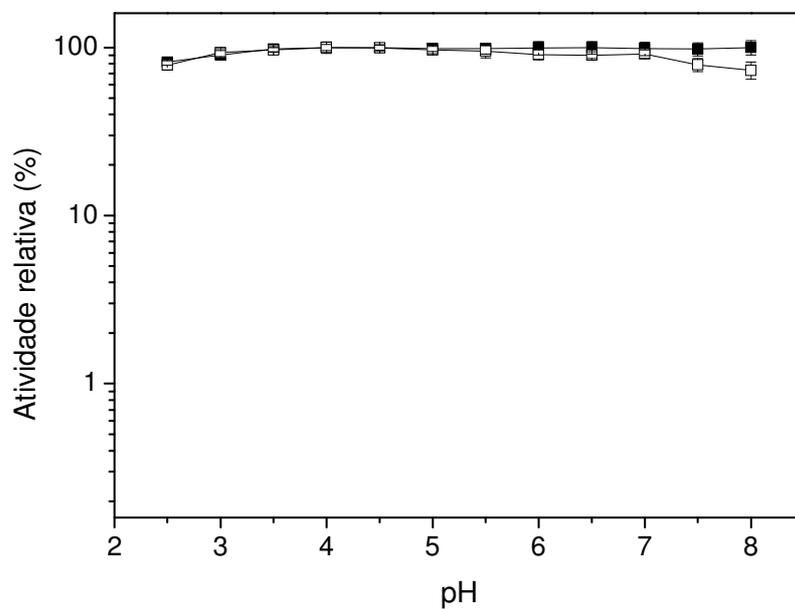


Figura 22. Estabilidade ao pH das xilanases extracelulares. Porcentagem da atividade xilanásica residual produzidas por *A. terricola* e *A. ochraceus* em função dos pHs de incubação. Microrganismos cultivados nas suas condições ótimas de cultivo de fermentação submersa. Símbolos: -■- *Aspergillus terricola*; -□- *Aspergillus ochraceus*.

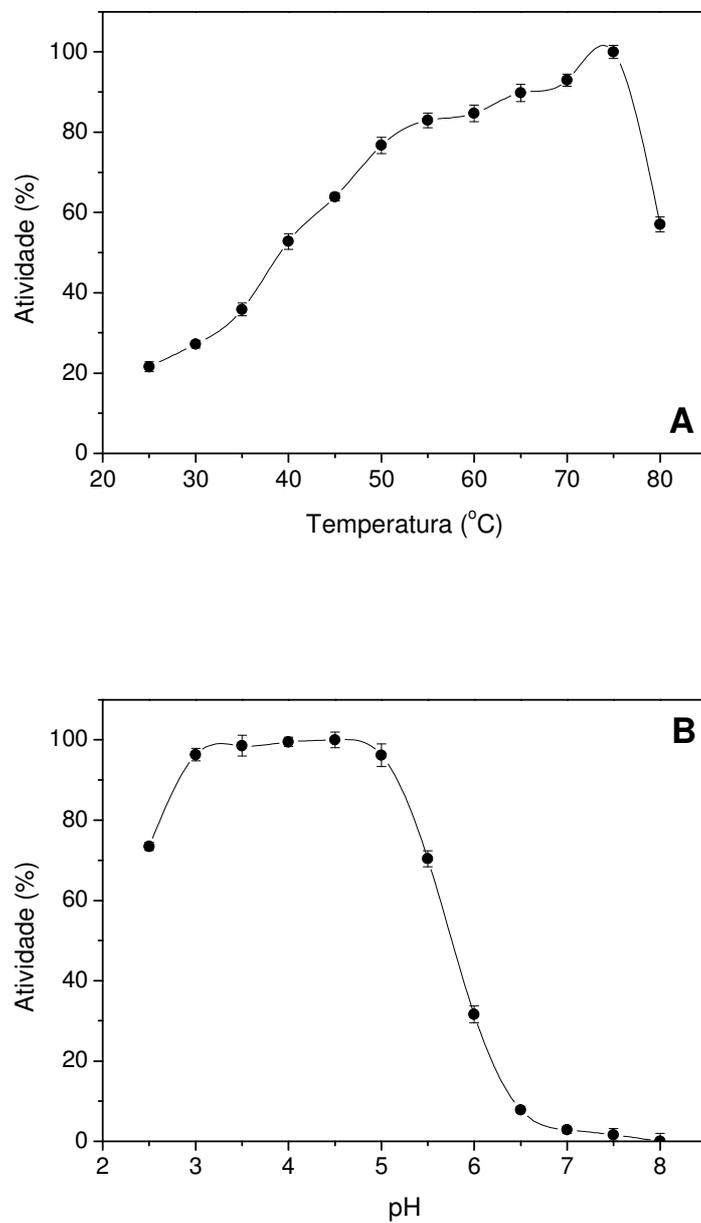


Figura 23. Influência da temperatura e do pH na reação da β -xilosidase extracelular. Porcentagem da atividade β -xilosidásica produzida por *A. ochraceus* em função da temperatura (A); e do pH de reação (B). Microrganismo cultivado nas suas condições ótimas de fermentação submersa.

4.2.7.2 Estabilidade à temperatura e ao pH

Para a determinação da estabilidade térmica da β -xilosidase extracelular produzida por *A. ochraceus*, inicialmente, o extrato enzimático extracelular de *Aspergillus ochraceus* foi incubado em várias temperaturas, de 25°C a 80°C com intervalo de 5°C entre estas, por 1 hora. Transcorrido estes tempos, alíquotas destes extratos foram retiradas e colocadas em gelo, e posteriormente foi realizado o ensaio enzimático (item 3.7.2 de Material e Métodos). Neste experimento, foi feito um controle, que correspondeu a 100% da atividade, onde o extrato enzimático não foi pré-incubado nas temperaturas testadas.

Para a determinação da estabilidade ao pH, incubou-se, em gelo, o extrato enzimático extracelular produzido por *A. ochraceus* em tampão McIlvaine, nos pHs de 2,5 a 8,0, com intervalos de 0,5, entre estes, na proporção de 1:1, 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 o extrato enzimático, diluído 1:1, não foi pré-incubado nos pHs testados.

Em relação à termoestabilidade, foi verificado que a β -xilosidase produzida por *A. ochraceus* foi estável até 60°C (mantendo pelo menos 50% da sua atividade inicial), por 1 hora (**Figura 24A**). Quanto à estabilidade ao pH, verificou-se que a β -xilosidase extracelular foi estável em todos os pHs testados por 1 hora, sendo esta estabilidade pelo menos igual ou maior que 60% (**Figura 24B**).

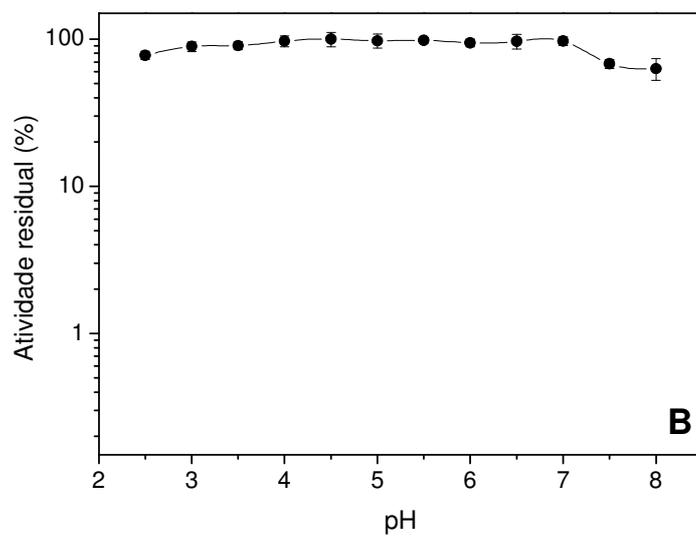
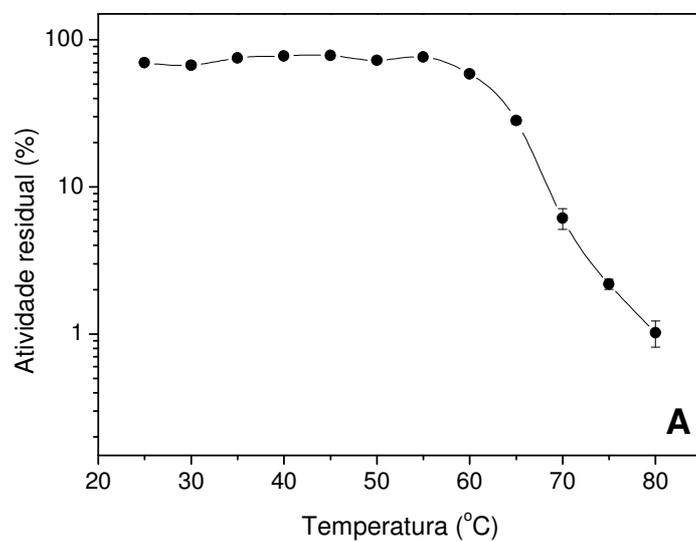


Figura 24. Estabilidade à temperatura e ao pH da β -xilosidásica extracelular. Porcentagem da atividade residual produzida por *A. ochraceus* em função das temperaturas (A); e dos pHs de incubação (B). Microrganismo cultivado nas suas condições ótimas de fermentação submersa.

Parte 3: Aplicação das xilanases no biobranqueamento da polpa de celulose

Os altos níveis enzimáticos das xilanases brutas produzidas por *A. terricola* e *A. ochraceus* em fermentação submersa, assim como algumas propriedades bioquímicas dessas enzimas, tornaram-as bastantes atrativas para aplicação biotecnológica, como no biobranqueamento da polpa de celulose para a fabricação do papel.

4.3.1 Aplicação das xilanases de *A. terricola* e *A. ochraceus* na polpa de celulose

Preparações enzimáticas brutas de *A. terricola* e *A. ochraceus* foram utilizadas no tratamento da polpa de celulose na concentração de 10 unidades por grama de polpa de celulose seca, e incubadas por 1 hora na temperatura ótima de cada enzima (segundo item 3.10.3 de Material e Métodos).

O melhor resultado foi obtido com o extrato de *A. ochraceus*, que causou uma diminuição de 4,3 pontos no número Kappa em comparação com o controle (**Tabela 9**), o que correspondeu a uma eficiência de deslignificação de 36,4%. Enquanto que, quando a polpa de celulose foi tratada com xilanases de *A. terricola* foi observado uma diminuição de 1,1 pontos no número Kappa (eficiência de deslignificação de 14,3%).

Em relação a alvura, houve um ganho de 3,4 pontos para as xilanases de *A. terricola* contra 2,4 utilizando as xilanases de *A. ochraceus*. A viscosidade da polpa diminuiu 8,6% quando as xilanases de *A. terricola* foram utilizadas, entretanto, com as xilanases de *A. ochraceus* nenhuma redução da viscosidade foi detectada, indicando a ausência de celulases neste extrato bruto. A ausência de celulases nos extratos brutos dos fungos *A. terricola* e *A. ochraceus* foi confirmada por análises segundo o método de MILLER (1959), o qual não detectou a formação de açúcares redutores (dados não mostrados).

Tabela 9. Branqueamento da polpa de celulose tratada com xilanases produzidas por *A. terricola* e *A. ochraceus*.

| | <i>A. terricola</i> | | <i>A. ochraceus</i> | |
|--|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | Controle | Tratada | Controle | Tratada |
| Número Kappa | 7,7 (\pm 0.10) | 6,6 (\pm 0.12) | 11,8 (\pm 0.20) | 7,5 (\pm 0.25) |
| Eficiência de deslignificação (%) | - | 14,3 (\pm 0.11) | - | 36,4 (\pm 0.25) |
| Viscosidade (cP) | 952 (\pm 0.15) | 870 (\pm 0.18) | 901 (\pm 0.12) | 902 (\pm 0.20) |
| Redução da viscosidade da polpa (%) | - | 8,6% (\pm 0.17) | - | 0 |
| Alvura (% ISO) | 56,9 (\pm 0.20) | 60,3 (\pm 0.22) | 54,7 (\pm 0.10) | 57,1 (\pm 0.10) |

A. terricola e *A. ochraceus* foram cultivados em meio Vogel e Adams (xilana birchwood 1%), a 30°C, em estufa bacteriológica, durante 144 e 120 horas, respectivamente. Os controles corresponderam às amostras não tratadas com as xilanases. Os tratamentos foram realizados com as xilanases extracelulares (10 U/g de polpa de celulose seca), durante 1 h nas temperaturas ótimas de cada enzima.

4.3.2 Análise das polpas de celulose em Microscopia Eletrônica de Varredura

As polpas de celulose utilizadas no biobranqueamento foram submetidas à análise em microscopia eletrônica de varredura (M.E.V), conforme descrito no item 3.11.2 de Material e Métodos. As polpas foram analisadas antes (controle) e após o tratamento enzimático com as xilanases dos fungos *A. terricola* e *A. ochraceus*.

Na **Figura 25A**, observou-se que na polpa de celulose controle a fibra de celulose encontra-se íntegra. No entanto, nas polpas incubadas com o extrato enzimático de *A. terricola* (**Figura 25B**) e *A. ochraceus* (**Figura 25C**) algumas mudanças morfológicas foram observadas, sendo a principal delas “peeling”.

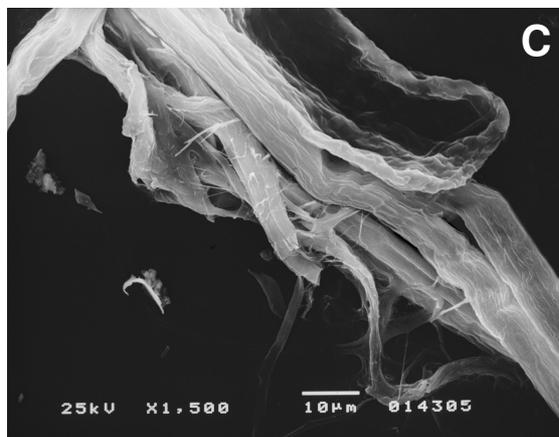
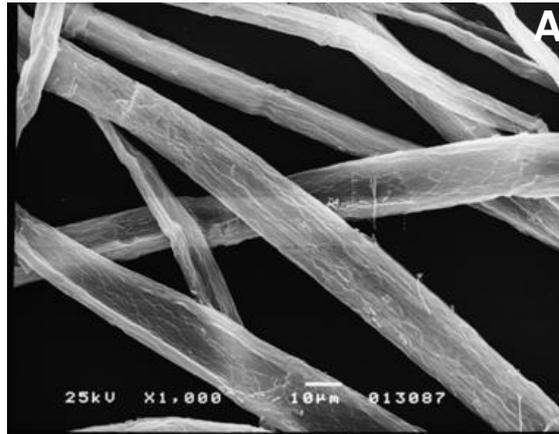


Figura 25. Micrografias da polpa de celulose usando microscopia eletrônica de varredura. Polpa de celulose controle, ou seja, não tratada com xilanase (A); polpa de celulose tratada com xilanase bruta de *A. terricola* (B); e *A. ochraceus* (C). Os microrganismos foram cultivados nas suas condições ótimas de fermentação submersa pré-padronizadas.

**Parte 4: Produção de enzimas xilanolíticas usando
licor de autohidrólise de resíduos agroindustriais
e Biorreatores**

Esta etapa do projeto foi desenvolvida no Laboratório de Fermentação e no Laboratório de Instalação Piloto, do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho (Braga/Portugal), sob responsabilidade do Prof. Dr. José António Teixeira, e supervisão do Dr. Daniel Pereira da Silva e da Dra. Denise Santos Ruzene.

Inicialmente, foram realizadas algumas fermentações, em shaker, utilizando resíduos agroindustriais e licores de resíduos agroindustriais obtidos por processo de autohidrólise. Alguns resíduos agroindustriais já haviam sido testados no início deste projeto quanto à produção de xilanases (**Tabela 7**) e β -xilosidase (**Tabela 8**), e verificou-se que alguns deles foram bons indutores desta enzima, principalmente o farelo de trigo, o qual foi observado em *A. terreicola* níveis xilanolíticos bastante próximos àqueles obtidos com xilana. Assim, esses resultados prévios serviram como base para a seleção dos resíduos que foram utilizados na produção do licor de autohidrólise.

Produção de licores de autohidrólise vem continuamente sendo estudado (GARROTE *et al.*, 2002; 2007; PARAJÓ *et al.*, 2004; VÁZQUEZ *et al.*, 2005; MOURE *et al.*, 2006; NABARLATZ *et al.*, 2007; VILA *et al.*, 2008), no entanto, a aplicação desses licores na produção de enzimas ainda não tem sido muito descrita. Assim, alguns resíduos agroindustriais em combinação com licores produzidos a partir da autohidrólise desses resíduos foram testados, visando a posterior aplicação em biorreatores, já que o baixo custo do processo torna viável este tipo de processamento.

4.4.1 Produção de xilanases a partir de resíduos agroindustriais e licores de autohidrólise de resíduos agroindustriais

4.4.1.1 Farelo de trigo e licor de autohidrólise de palha de trigo

Inicialmente foram testados licores de palha de trigo – associados ou não com farelo de trigo – obtidos em diferentes tempos de autohidrólise (5, 15, 30 ou 50 minutos), visando escolher a melhor condição para a produção do licor, e por consequência à obtenção de altos níveis de enzimas xilanolíticas pelos fungos *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus* (item 3.4.1.1 de Material e Métodos).

Verificou-se que para ambos os microrganismos, a combinação dos substratos farelo de trigo 1% com licor de palha de trigo 10%, este último obtido em 15 minutos de autohidrólise, foi a melhor fonte indutora da produção de xilanase (**Figura 26A, B**). Com a combinação farelo de trigo 1% e licor de palha de trigo 10% obtido com 30 minutos de autohidrólise também foi observada uma boa síntese de xilanase pelo fungo *A. terricola*, sendo esta produção apenas 5–10% menor que a primeira, no período de 120 e 144 h (**Figura 26A**). Para o fungo *A. ochraceus*, a segunda melhor fonte indutora foi a combinação de farelo de trigo 1% e licor de palha de trigo 10% com 5 minutos de autohidrólise; esta foi aproximadamente 20% menor que a primeira, nos períodos de cultivo finais, correspondendo a uma diferença de mais de 100 unidades totais (**Figura 26B**). Os licores quando utilizados isoladamente, em 100%, não apresentaram resultados satisfatórios para a produção de xilanase, mesmo no tempo de cultivo de 168 h, onde observou-se os maiores níveis xilanolíticos com os licores obtidos com 30 e 50 minutos de autohidrólise, sendo que a produção com a mistura farelo de trigo 1% com licor de palha de trigo 10% obtido com 15 minutos de autohidrólise (melhor opção) foi mais que o dobro daquelas observada com somente os licores (**Figura 26A, B**).

Para a indução de β -xilosidase pelo fungo *A. terricola*, visualizou-se que os licores de palha de trigo obtidos com 15 e 30 minutos de autohidrólise foram a melhor opção, sendo que a produção β -xilosidásica observada com o licor de 15 minutos de autohidrólise foi cerca de 15% maior que àquela observada com o licor com 30 minutos de autohidrólise, no período de cultivo de 120–168 h. Estas produções (em termos de unidades totais) foram cerca de 3 a 9 vezes maior que as demais, com 168 h de cultivo (**Figura 26C**). Os níveis de β -xilosidase produzidos pelo fungo *A. ochraceus* foram maiores com as combinações de farelo de trigo com licor de palha de trigo obtidos com 30, 15 e 50 minutos de autohidrólise, respectivamente, estas foram cerca de 10% maiores que a combinação farelo de trigo com licor de palha de trigo obtido com 5 minutos de autohidrólise, no período de 120 h de cultivo. Os licores, quando utilizados em 100%, não foram favoráveis à produção de β -xilosidase por *A. ochraceus*, apresentando uma produção enzimática cerca de 90% menor que a primeira opção, no período de 48 a 168 h de cultivo (**Figura 26D**).

Dessa forma, o licor de palha de trigo obtido após 15 minutos de autohidrólise foi considerado como o melhor licor para a produção de xilanase e β -xilosidase pelos fungos *A. terricola* e *A. ochraceus*, e, portanto foi selecionado como condição para a realização dos próximos experimentos, no qual várias concentrações da combinação de farelo de trigo e licor de palha de trigo foram testadas, além de xilana birchwood (1%) e farelo de trigo (0,5% e/ou 1%) que foram utilizados como controle (item 3.4.1.1 de Material e Métodos).

Verificou-se que as melhores fontes de carbono para a indução de xilanase pelo fungo *A. terricola* foram farelo de trigo 0,5% e xilana birchwood 1%, respectivamente, sendo que a produção com xilana foi apenas 5% menor que com farelo de trigo 0,5%, no período de cultivo de 96 e 120 h, sendo que com 144 h de cultivo a produção xilanolítica observada com os dois substratos foi praticamente a mesma.

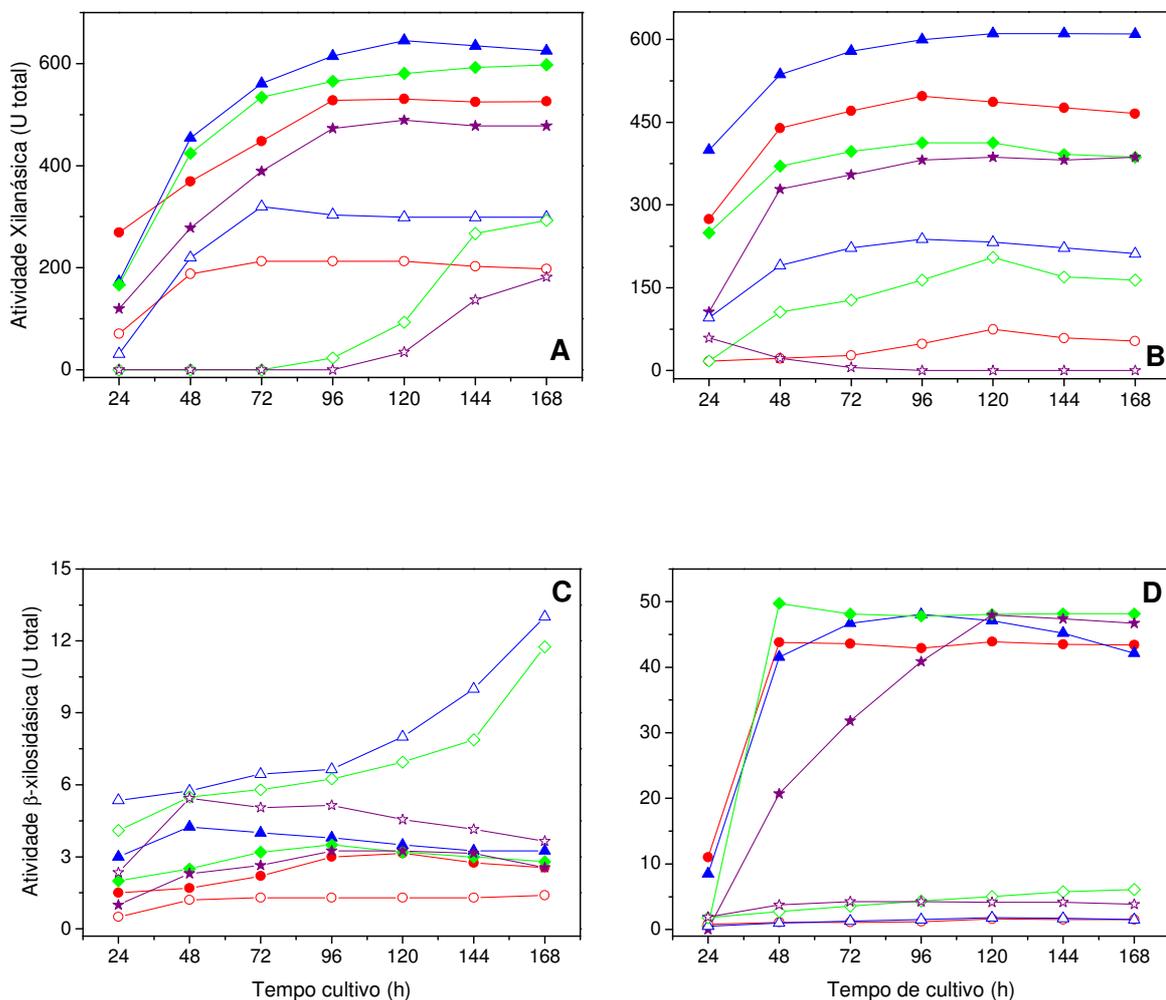


Figura 26. Produção de xilanases e β -xilosidase por *A. terricola* (A, C) e *A. ochraceus* (B, D) utilizando licor de palha de trigo com vários tempos de autohidrólise. Símbolos: farelo de trigo 1% em combinação com licor de palha de trigo 10% obtidos nos tempos de autohidrólise de 5 min (-●-), 15 min (-▲-), 30 min (-◆-) e 50 min (-★-); e licor de palha de trigo 100% obtidos nos tempos de autohidrólise de 5 min (-○-), 15 min (-△-), 30 min (-◇-) e 50 min (-☆-). Microrganismos cultivados em meio de cultura Vogel (*A. terricola*) e Adams (*A. ochraceus*), a 30°C, em shaker a 100 rpm, por até 7 dias.

As combinações de farelo de trigo 1% com licor de palha de trigo 2%, e farelo de trigo 1% com licor 10% foram a terceira melhor fonte indutora da produção xilanólica, sendo esta produção cerca de 15–20% menor que farelo de trigo 0,5%, no período de 96 a 144 h. Quando no uso de farelo de trigo 1%, a atividade correspondeu a cerca de 70–75% daquela obtida com farelo de trigo 0,5%, no período de cultivo de 96 a 144 h (**Figura 27A**).

Em relação à atividade xilanásica produzida por *A. ochraceus*, observou-se que a combinação de farelo de trigo 1% com licor de palha de trigo 10% foi realmente a mais favorável para a indução da síntese de xilanases, com uma produção aproximadamente 20% maior que xilana birchwood, e 45% maior que farelo de trigo 1%, no período de cultivo de 120 e 144 h. As combinações de farelo de trigo 1% com licor de palha de trigo 2%, farelo de trigo 0,75% com licor 6%, e farelo de trigo 0,5% com licor 2% também foram bons indutores de xilanases, sendo observadas produções superiores quando no uso de xilana e farelo de trigo (**Figura 27B**). O uso do licor em 100% não foi favorável para a síntese de xilanases por ambos os microrganismos (**Figuras 27A, B**), como constatou-se no experimento anterior (**Figuras 26A, B**).

Entretanto, em relação à atividade β -xilosidásica para o fungo *A. terricola*, o uso do licor em 100% continuou sendo a melhor fonte indutora da produção enzimática, sendo observado no período de cultivo de 144 e 168 h, uma produção de 2 a 3 vezes superior àquela obtida com a combinação farelo de trigo 0,5% com licor de palha de trigo 10% (segunda melhor opção), com 72 h de cultivo. A atividade observada com xilana birchwood (1%) correspondeu a cerca de 60% no período de cultivo de 120 e 144h, e 40% no tempo de cultivo de 168 h quando comparado àquela observada com o licor de palha de trigo (**Figura 27C**). Para o fungo *A. ochraceus* a melhor combinação para a produção de β -xilosidase foi farelo de trigo 1% adicionado de licor de palha de trigo 10%, sendo esta cerca de 25–30% maior que aquela obtida com xilana birchwood, no período de 96 a 168 h. A combinação de farelo de

trigo 1% com licor 2% também foi uma boa fonte indutora de β -xilosidase, com uma produção enzimática cerca de 15% maior que àquela observada em xilana, no período de 96 a 168 h. Enquanto que no uso de farelo de trigo 1%, a indução de β -xilosidase por *A. ochraceus* foi cerca de 80% menor que a melhor fonte, e 70% menor que xilana, no período de 96 a 168 h, não sendo uma boa opção (**Figura 27D**).

4.4.1.2 Sabugo de milho e licor de autohidrólise de sabugo de milho

Sabugo de milho é um resíduo agroindustrial que vem continuamente sendo utilizado na produção de enzimas de interesse industrial, dentre elas as xilanases (SOUZA *et al.*, 2001; BETINI *et al.*, 2009). No entanto, quando este resíduo foi utilizado como fonte de carbono para a indução de xilanase nos fungos *A. terricola* e *A. ochraceus*, os resultados obtidos não foram satisfatórios (**Tabela 7**). Vale ressaltar que fatores ambientais como o clima e o solo interferem na composição química desses materiais lignocelulósicos, e, portanto, a utilização de resíduos de procedência diferente daqueles testados no início do projeto (região de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), poderia acarretar em resultados diferentes.

Assim, o sabugo de milho da região onde o projeto estava sendo desenvolvido (Braga, Portugal) e o seu respectivo licor também foram analisados como uma possível fonte indutora de enzimas xilanolíticas. Como realizado para o licor de palha de trigo, inicialmente vários tempos de autohidrólise para produção do licor de sabugo de milho foram analisados, e, posteriormente, as combinações das várias concentrações do resíduo (sabugo de milho) com o respectivo licor, no tempo de autohidrólise pré-determinado, visando sempre à produção de altos níveis de xilanases.

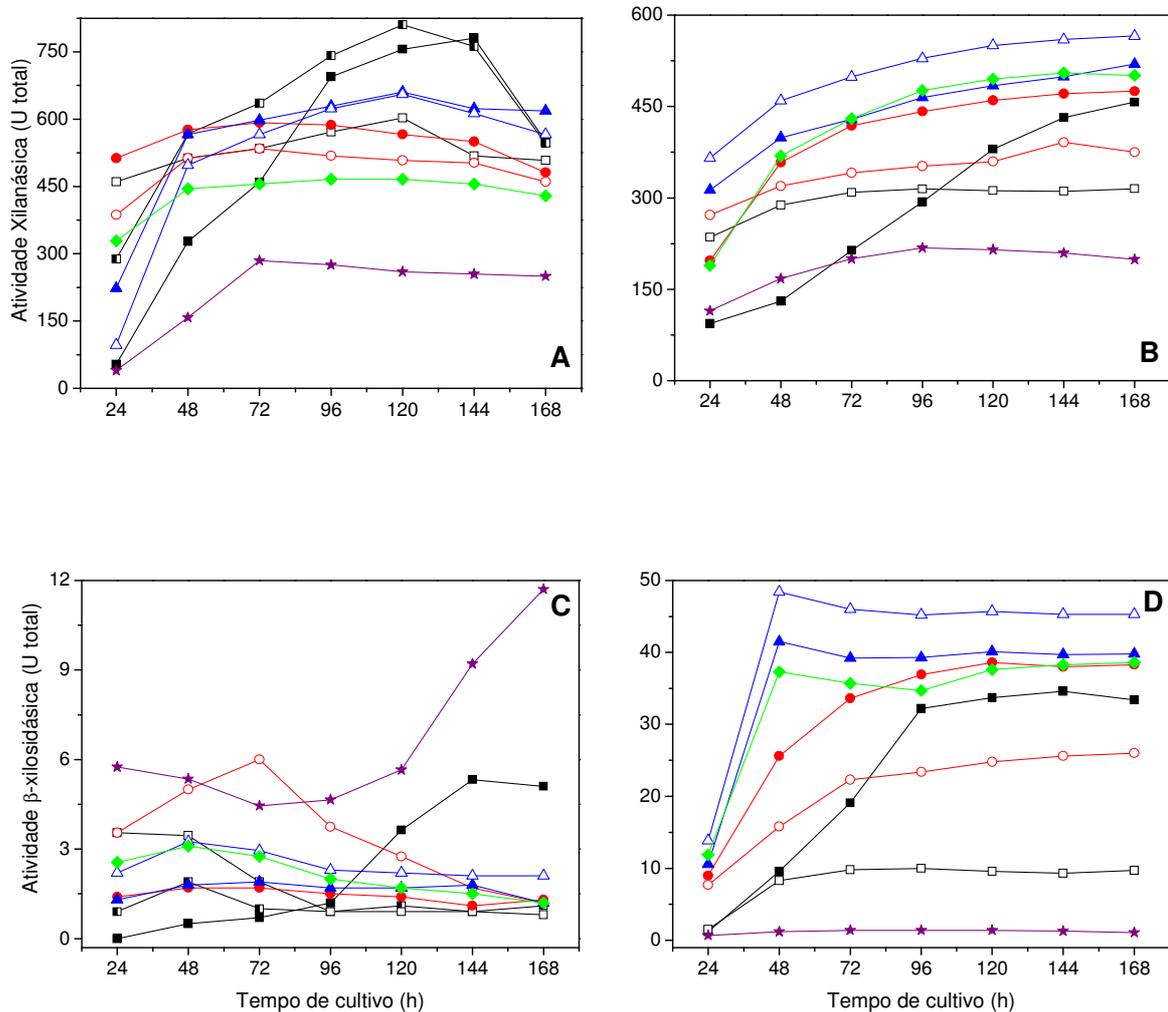


Figura 27. Produção de xilanas e β -xilosidase por *A. terricola* (A, C) e *A. ochraceus* (B, D) utilizando várias combinações do licor de palha de trigo com 15 minutos de autohidrólise. Símbolos: ●- farelo de trigo 0,5% + licor de palha de trigo 2%; ○- farelo de trigo 0,5% + licor de palha de trigo 10%; ▲- farelo de trigo 1% + licor de palha de trigo 2%; △- farelo de trigo 1% + licor de palha de trigo 10%; ◆- farelo de trigo 0,75% + licor de palha de trigo 6%; ★- licor de palha de trigo 100%; ■- xilana birchwood 1%; ◼- farelo de trigo 0,5%; □- farelo de trigo 1%. Microrganismos cultivados em meio de cultura Vogel (*A. terricola*) e Adams (*A. ochraceus*), a 30 °C, em shaker a 100 rpm, por até 7 dias.

A produção de xilanases com a combinação de sabugo de milho 1% com licor de sabugo de milho 10% obtido com 30 minutos de autohidrólise foi a mais eficiente para *A. terricola* e *A. ochraceus* (**Figura 28A, B**). A mesma combinação, mas com licores obtidos com 15 e 50 minutos de autohidrólise também foram excelentes fontes para a produção de xilanases para ambos os microrganismos, com aumentos de cerca de 7 a 9% (quando comparado com a primeira opção) para *A. terricola*, no período de cultivo de 120 e 144 h (**Figura 28A**), e de 7 e 20% para *A. ochraceus*, no período de 120 a 168 h (**Figura 28B**). Dentre os licores (quando utilizados isoladamente como única fonte de hemicelulose), aquele obtido com 15 minutos de autohidrólise foi o mais favorável quanto à produção xilanólica por ambos os microrganismos, apresentando em torno de 70% da produção enzimática observada com a combinação sabugo de milho 1% e licor de sabugo de milho 10% com 30 minutos de autohidrólise, no período de cultivo de 120 a 168 h (**Figura 28A, B**). Em relação aos licores com 30 e 50 minutos de autohidrólise observou-se o não favorecimento da produção xilanólica para os dois microrganismos (**Figura 28A, B**).

Em relação à atividade β -xilosidásica para *A. terricola*, a combinação de sabugo milho 1% com licor de sabugo de milho 10% obtido com 30 minutos de autohidrólise, e o uso em 100% do respectivo licor (30 minutos de autohidrólise) foram excelentes indutores. A combinação de sabugo milho com o seu respectivo licor obtido com 50 minutos de autohidrólise também foi uma excelente fonte indutora de β -xilosidase, e comparando a atividade obtida com 168 h de cultivo, nesta fonte de carbono, com as fontes citadas anteriores, observa-se uma produção de apenas 10% menor que a primeira opção, no período de cultivo de 144h; e 5% menor que a segunda opção, no período de cultivo de 72 h (**Figura 28C**).

Para *A. ochraceus*, as combinações de sabugo de milho com os licores obtidos com 30 e 50 minutos de autohidrólise foram, nesta ordem, as melhores fontes indutoras da síntese de

β -xilosidase, sendo que a combinação de sabugo de milho com o licor de 15 minutos de autohidrólise (a terceira melhor opção) e o licor com 15 minutos de autohidrólise utilizado isoladamente como a única fonte indutora (quarta melhor opção) corresponderam a cerca de 70% e 45%, respectivamente, da atividade observada anteriormente, no período de 144–168 h (**Figura 28D**). Portanto, o licor de sabugo de milho obtido com 30 minutos de autohidrólise foi considerado o melhor licor, dentro das condições avaliadas, para a produção de xilanase e β -xilosidase por *A. terricola* e *A. ochraceus*, e, portanto foi selecionado para a realização do próximo experimento, conforme item 3.4.1.1 de Material e Métodos.

Analisando a segunda série de experimentos realizados com sabugo de milho, nos quais várias concentrações da mistura de sabugo de milho com o seu respectivo licor obtido com 30 minutos de autohidrólise (melhor licor para a produção de xilanase e β -xilosidase), verificou-se que os melhores indutores da produção xilanolítica para *A. terricola* foram as combinações de sabugo de milho com o licor de sabugo de milho, nas concentrações de 0,75% + 6%, 1% + 10% e 0,5% + 10%, respectivamente, com uma produção em cerca de 10 a 15% maior que xilana birchwood, com 144 h de cultivo. A produção com sabugo de milho como única fonte de carbono, nas concentrações de 0,5 e 1%, foi em torno de 85 e 90%, respectivamente, daquela observada com xilana birchwood, no período de cultivo de 72 a 144h; enquanto que o licor de sabugo de milho (100%) não induziu a produção de xilanases (**Figura 29A**). Quanto ao fungo *A. ochraceus*, sabugo de milho 1% em combinação com o seu respectivo licor na concentração de 10% aumentaram em mais de 35% a produção de xilanase quando comparado com xilana birchwood, no período de cultivo de 120 a 144 h. As combinações de 0,5% do resíduo adicionado de 10% do licor, e 0,75% do resíduo com 6% do licor, também foram boas fontes indutoras da atividade xilanásica, correspondendo a 10% da atividade observada com o melhor indutor (sabugo de milho 1% com licor de sabugo de milho 10%), no tempo de 144 h de cultivo, e 15 a 25% da atividade detectada com 168 h de cultivo.

A utilização de somente sabugo de milho (1%) como fonte de carbono não foi eficiente quanto à síntese de xilanase, correspondendo a 60–75% da produção com xilana e 40–45% da produção com a melhor fonte indutora, no período de cultivo de 96 a 168 h. O uso do licor como única fonte de hemicelulose também não serviu como substrato para a produção de xilanase (**Figura 29B**).

Assim como observado para a atividade xilanásica, o melhor substrato para a produção de β -xilosidase por *A. terricola* foi a mistura de sabugo de milho 0,75% com licor de sabugo de milho 6%, com uma produção enzimática aproximadamente 15 vezes maior que xilana birchwood, no período de cultivo de 96 a 168 h. A combinação de sabugo de milho 1% com licor 10%, o uso de 100% do licor, e a mistura de 0,5% do resíduo com 10% do licor, corresponderam a cerca de 35 a 40% da atividade obtida com a melhor fonte de carbono (sabugo de milho 0,75% adicionado de seu respectivo licor 6%) e cerca de 5 a 6 vezes a atividade obtida com xilana, no período de 96 a 168 h. Vale ressaltar que, em todas as concentrações das combinações de sabugo de milho com o seu respectivo licor, a produção de β -xilosidase foi superior à xilana birchwood, inclusive quando o licor foi utilizado em 100%. Entretanto, o uso do sabugo de milho como única fonte indutora não foi favorável à produção β -xilosidásica (**Figura 29C**). Em relação à β -xilosidase produzida por *A. ochraceus*, verificou-se que a melhor produção foi obtida com as misturas: sabugo de milho 0,5% com licor de sabugo de milho 10%, sabugo de milho 0,75% com seu respectivo licor 6%, e sabugo de milho 1% com o licor 10%, com uma produção de 30–35% maior que xilana birchwood, com 168 h de cultivo. Sabugo de milho 1% também não foi favorável para a síntese de β -xilosidase por *A. ochraceus* (**Figura 29D**).

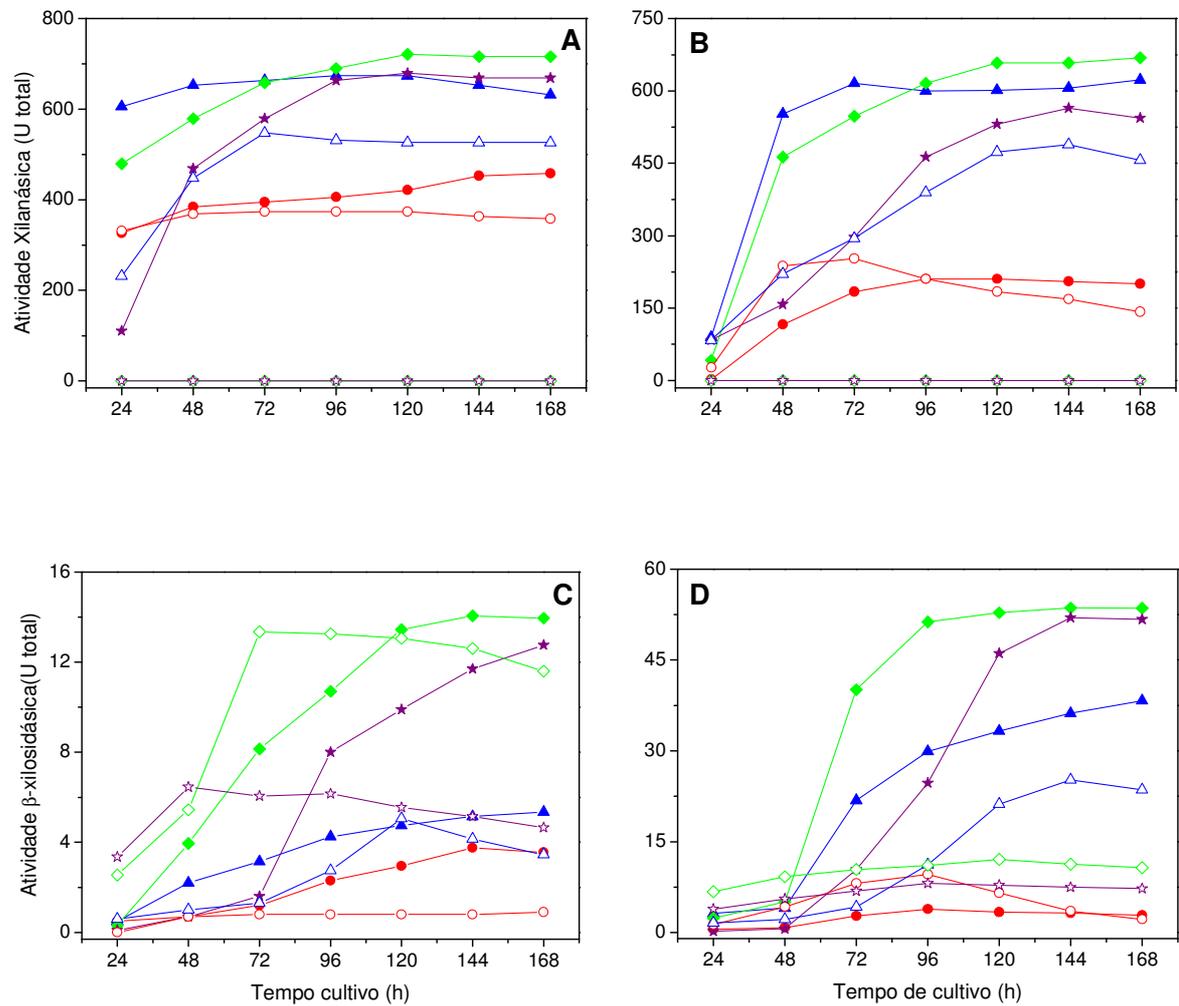


Figura 28. Produção de xilanases e β -xiliosidase por *A. terricola* (A, C) e *A. ochraceus* (B, D) utilizando licor de sabugo de milho com vários tempos de autohidrólise. Símbolos: sabugo de milho 1% em combinação com licor de sabugo de milho 10% obtidos nos tempos de autohidrólise de 5 min (-●-), 15 min (-▲-), 30 min (-◆-) e 50 min (-★-); e licor de sabugo de milho 100% obtidos nos tempos de autohidrólise de 5 min (-○-), 15 min (-△-), 30 min (-◇-) e 50 min (-☆-). Microrganismos cultivados em meio de cultura Vogel (*A. terricola*) e Adams (*A. ochraceus*), a 30°C, em shaker a 100 rpm, por até 7 dias.

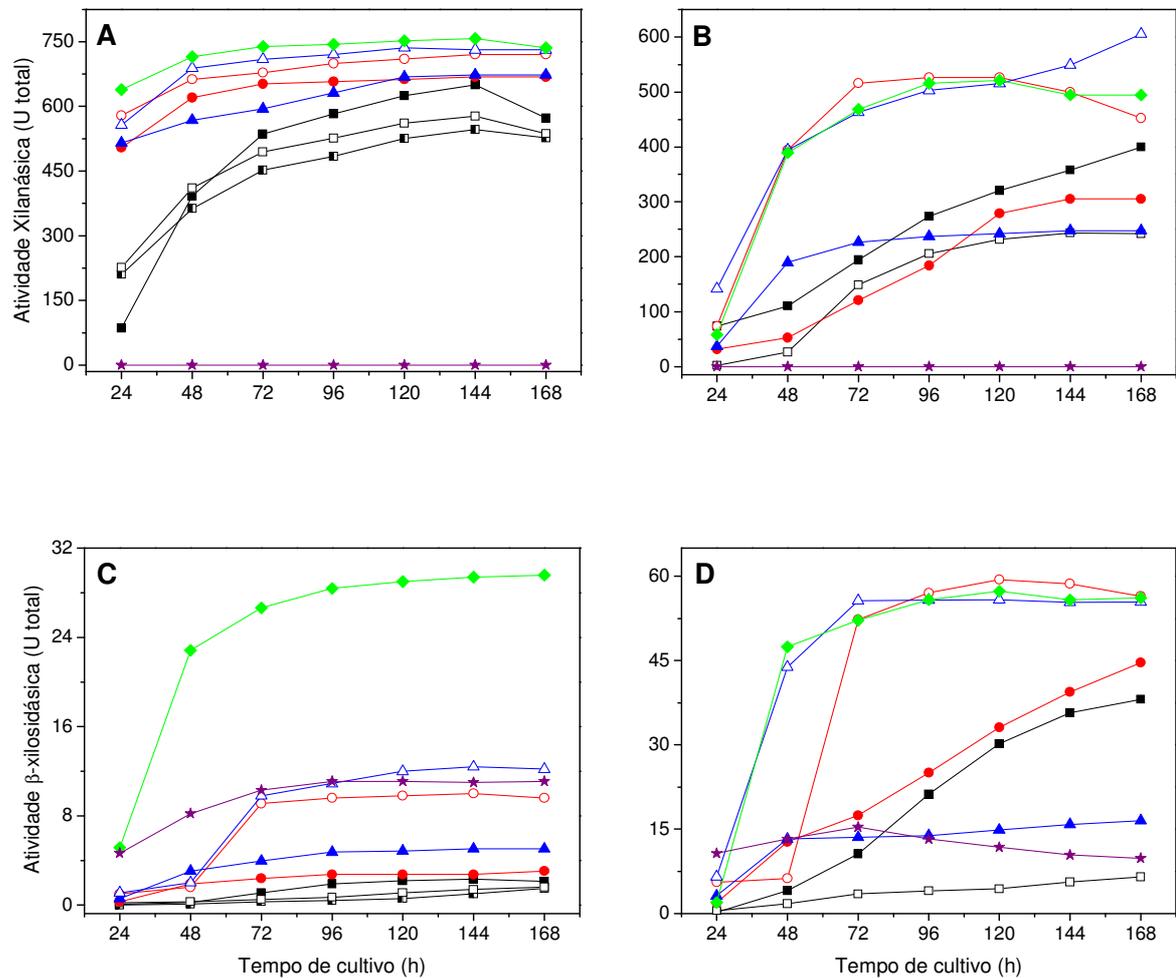


Figura 29. Produção de xilanases e β -xilosidase por *A. terricola* (A, C) e *A. ochraceus* (B, D) utilizando várias combinações do licor de sabugo de milho com 30 minutos de autohidrólise. Símbolos: -●- sabugo de milho 0,5% + licor de sabugo de milho 2%; -○- sabugo de milho 0,5% + licor de sabugo de milho 10%; -▲- sabugo de milho 1% + licor de sabugo de milho 2%; -△- sabugo de milho 1% + licor de sabugo de milho 10%; -◆- sabugo de milho 0,75% + licor de sabugo de milho 6%; -★- licor de sabugo de milho 100%, -■- xilana birchwood 1%; -■- sabugo de milho 0,5%; -□- sabugo de milho 1%. Microrganismos cultivados em meio de cultura Vogel (*A. terricola*) e Adams (*A. ochraceus*), a 30°C, em shaker a 100 rpm, por até 7 dias.

4.4.2 Biorreatores

Para os experimentos realizados no reator STR (Stirred Tank Reactor – Bioengineering AG CH-8636 Wald), e no reator tipo Air-lift o fungo *Aspergillus terricola* foi cultivado em meio contendo farelo de trigo 0,5% como fonte de carbono, visto que esta foi a melhor condição para a produção de xilanases, além da mais acessível em termos de praticidade e economia, quando comparado com os licores de autohidrólise. A concentração de farelo de trigo 1% havia sido testada no início do projeto (**Tabela 7**), no entanto, quando a concentração de 0,5% deste mesmo resíduo foi avaliada como fonte de carbono verificou-se que esta foi ainda mais eficiente, mesmo quando comparada com xilana.

Para *A. ochraceus* utilizou-se a mistura de farelo de trigo 1% com licor de palha de trigo 10% obtidos com 15 minutos de autohidrólise para a realização das fermentações no reator STR (1 litro de volume útil), visto que esta foi a melhor condição padronizada nesta etapa do projeto. Vale ressaltar que devido ao número excessivo de experimentos realizados, isso dentro de um curto intervalo de tempo e no decorrer do estágio no exterior, não foi possível a realização das fermentações em biorreatores utilizando sabugo de milho e o seu respectivo licor de autohidrólise.

4.4.2.1 *Aspergillus terricola*

A primeira fermentação em biorreator foi realizada com *A. terricola*, visto que este produziu excelentes níveis de xilanases em um substrato bastante viável economicamente (farelo de trigo). Esta fermentação foi realizada no Laboratório de Fermentação, do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho (Portugal). Inicialmente foi utilizado o biorreator de 2 L (Bioengineering AG CH-8636 Wald), com volume útil de 1 L, e utilizou-se meio de cultura descrito por VOGEL (1964) suplementado com farelo de trigo 0,5% como fonte de carbono. Os esporos do microrganismo foram inoculados diretamente (sem pré-cultivo) no biorreator, sendo mantidas as condições de 30°C, 300 rpm, sem injeção

de oxigênio, e sem controle de pH. Alíquotas foram retiradas periodicamente durante todo o experimento de fermentação (7 dias) resultando, entretanto, em nenhuma atividade xilanásica (**Figura 30A**).

Uma outra abordagem foi realizada com inóculo direto dos conídios com o microrganismo cultivado nas condições de 30°C, 300 rpm, com aeração de 1 vvm de ar, sem controle de pH. Síntese de xilanases foi detectada com a presença de injeção de ar, sendo os níveis máximos obtidos no período de 36 a 60 horas. Em relação à β -xilosidase, os níveis enzimáticos continuaram baixos, no entanto, outros experimentos já haviam comprovado que *A. terricola* não era um bom produtor de β -xilosidase (**Figura 30B**).

Visando verificar se somente a aeração estava limitando a produção dessas enzimas, um novo experimento foi realizado, no qual o microrganismo foi previamente inoculado em dois frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do mesmo meio de cultivo Vogel (farelo de trigo 0,5%) e incubados a 30°C, por 24 horas, a 150 rpm. Em seguida, estes 100 mL (pré-inóculo) de meio fermentado foram inoculados no biorreator e mantidos a 30°C, 300 rpm, sem injeção de ar e sem controle de pH. A **Figura 30C** demonstra que a produção xilanásica não foi muito satisfatória, mesmo assim, esta ainda foi melhor que àquela observada com o inóculo direto na ausência de injeção de ar (**Figura 30A**).

Portanto, verificou-se que a aeração foi muito importante para a produção de xilanases por *A. terricola*. Entretanto, outros fatores podem também influenciar na indução enzimática, como foi observado com os experimentos de inóculo direto (sem pré-cultivo) e com pré-cultivo, ambos na ausência de injeção de ar. Em relação ao pH dos meios fermentecíveis, verificou-se que as fermentações realizadas sem a injeção de ar (**Figura 30A, C**) o pH praticamente não foi alterado, ficando em torno de 5,5 a 6,0 durante todo o processo fermentativo (7 dias). No entanto, quando foi injetado 1 vvm de ar (**Figura 30B**) o pH sofreu pequenas oscilações (5,5 a 7,0).

Em paralelo, também foram realizadas fermentações com o fungo *A. terricola* no biorreator Air-lift, estas fermentações foram realizadas no Laboratório de Instalação Piloto, do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, utilizando a capacidade de 6,2 L do biorreator. Este tipo de fermentador pode proporcionar processos de produção de microrganismos em grande escala, sem limitação de oxigênio local, além de apresentar forças de cisalhamento muito baixas, preservando os tecidos, principalmente os micelianos que se apresentam mais frágeis (MERCHUK, 1990).

Dessa forma, os esporos do microrganismo foram inoculados diretamente no meio de cultivo descrito por VOGEL (1964), contendo como fonte de carbono farelo de trigo 0,5%. Este reator foi mantido a 30 °C, com um fluxo de ar de 0,4 L/min. O pH não foi ajustado com adição de ácido/base, mas este foi monitorado durante todo o processo.

Verificou-se que a produção máxima de xilanases (9,3 U/mL) foi obtida com 6 dias de fermentação (**Figura 31A**). No entanto, uma segunda fermentação foi realizada neste reator nas mesmas condições, exceto pelo aumento da aeração, que foi ajustado para 1 L/min. Com o aumento da aeração no meio de cultivo foi observado um acréscimo de aproximadamente 38% na atividade xilanolítica (**Figura 31B**). Em relação ao pH do meio durante a fermentação, verificou-se que com o aumento da aeração a oscilação do pH foi maior (5,5 a 8,0).

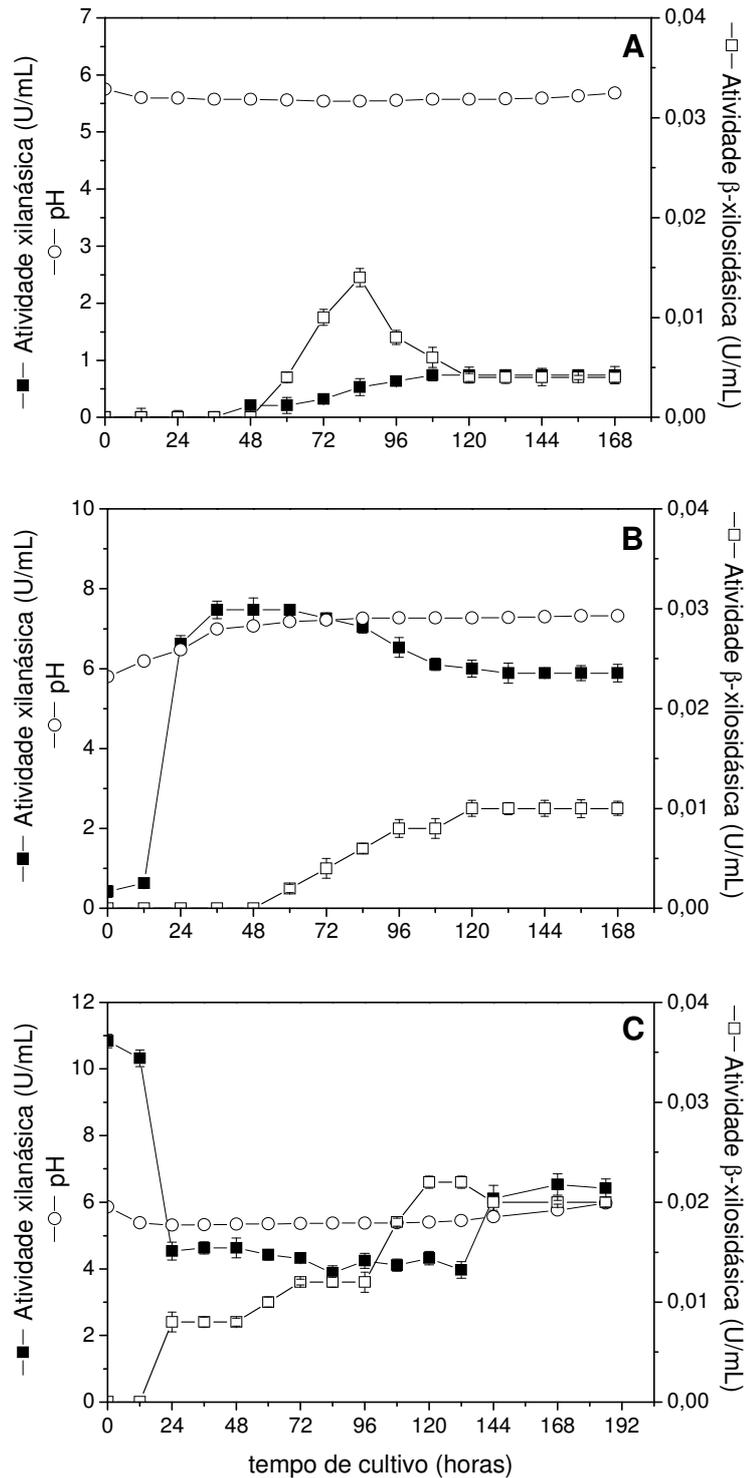


Figura 30. Fermentações no reator STR (Stirred Tank Reactor) com *A. terricola*. As fermentações foram realizadas com inóculo direto e sem injeção de ar (A); com inóculo direto e 1 vvm de ar (B); ou com pré-cultivo e sem injeção de ar (C). O biorreator foi mantido a 30°C e 300 rpm. Símbolos: -■- xilanase; -□- β -xilosidase; -○- pH.

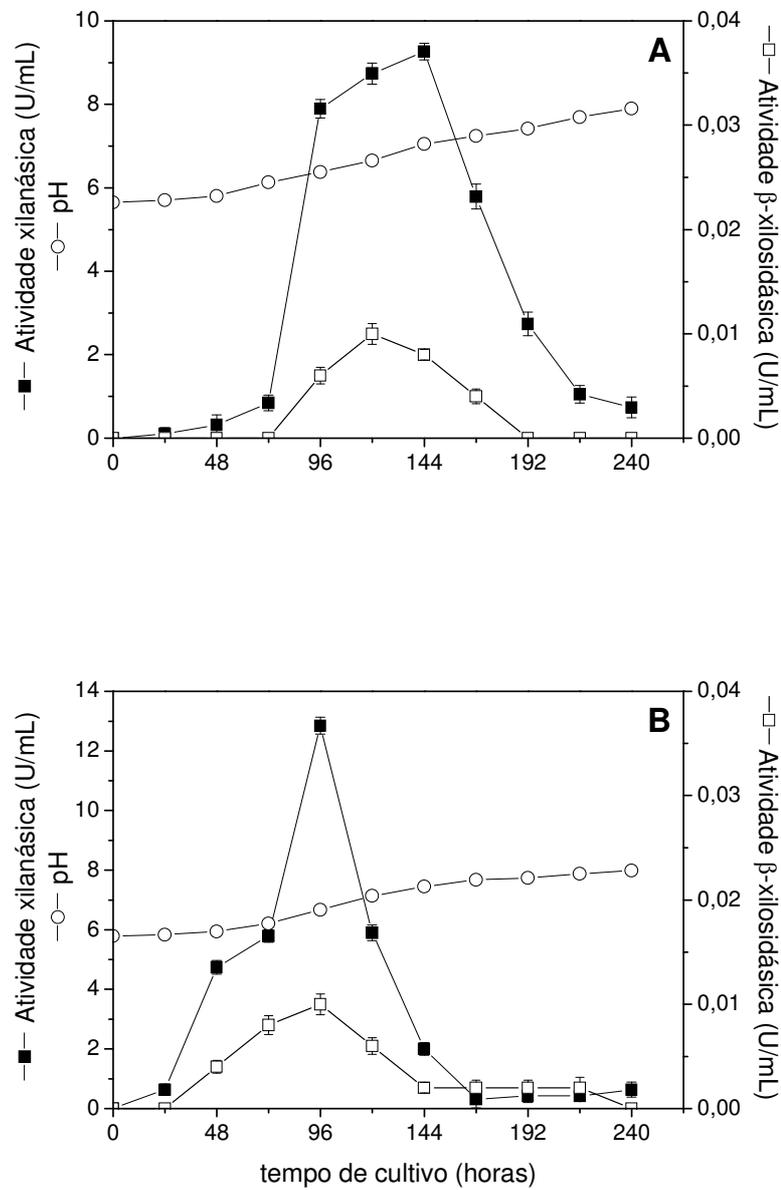


Figura 31. Fermentações no reator Air-lift com *A. terricola*. As fermentações foram realizadas a 30°C, com o inóculo direto dos conídios, e com aeração de 0,4 L/min (A); ou 1 L/min (B). Símbolos: -■- xilanase; -□- β -xilosidase; -○- pH.

4.4.2.2 *Aspergillus ochraceus*

O fungo *A. ochraceus* também foi inoculado no biorreator de 2 L (Bioengineering AG CH-8636 Wald) utilizando a capacidade de 1 L. Os esporos do microrganismo foram inoculados diretamente no meio de cultivo descrito por ADAMS e colaboradores (1990), suplementado com farelo de trigo 1% e licor de palha de trigo 10% com 15 minutos de autohidrólise. O biorreator foi mantido a 30°C, 300 rpm, sem injeção de ar. O pH foi mantido livre, sendo somente monitorado.

Nenhuma atividade xilanásica foi observada nestas condições (**Figura 32A**). Assim, uma nova fermentação foi realizada nas mesmas condições, mas com a adição de 1 vvm de ar e verificou-se que com 7 dias de fermentação a atividade xilanásica (4,5U/mL) ainda estava aumentando. Em relação à atividade β -xilosidásica, verificou-se um aumento de mais de 5 vezes (**Figura 32B**). O pH do meio na primeira fermentação praticamente não sofreu alterações; enquanto na segunda fermentação este oscilou de 5,4 a 7,2.

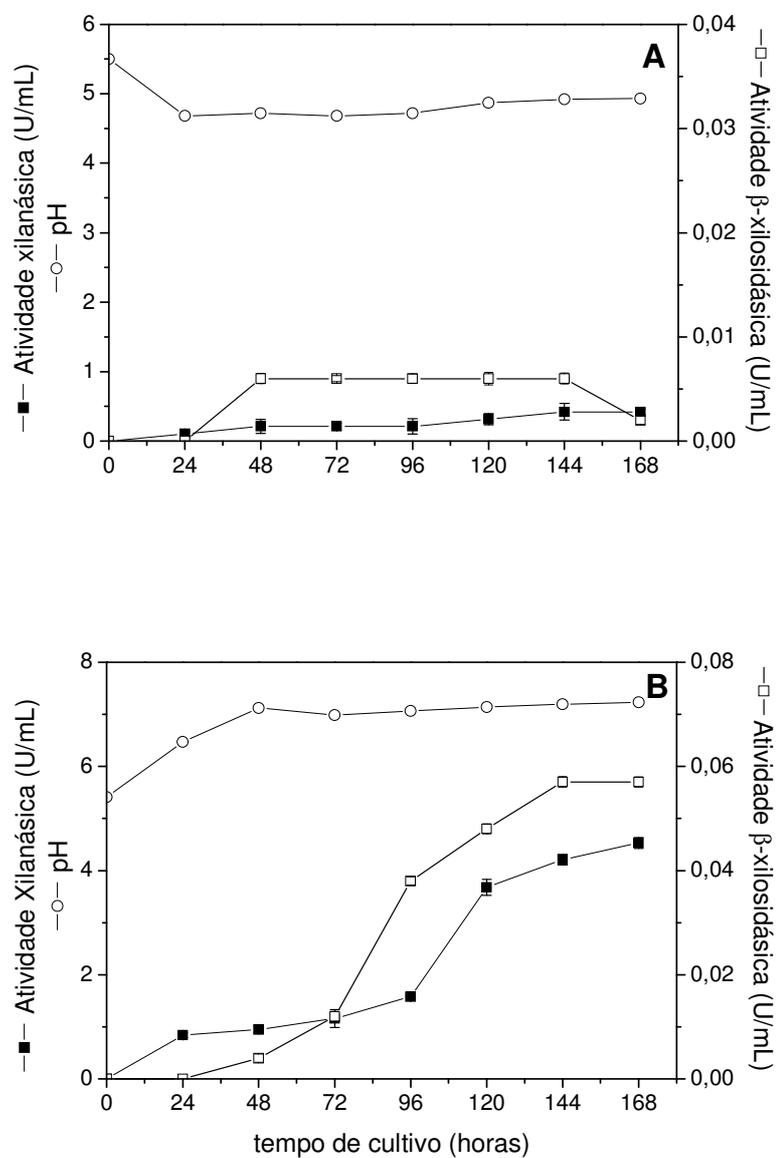


Figura 32. Fermentações no reator STR (Stirred Tank Reactor) com *A. ochraceus*. As fermentações foram realizadas a 30°C, 300 rpm, com inóculo direto, e ausência de injeção de ar (A); ou com 1 vvm de ar (B). Símbolos: -■- xilanase; -□- β -xilosidase; -○- pH.

**Parte 5: Purificação e caracterização bioquímica das
xilanases e β -xilosidase produzidas por
*Aspergillus ochraceus***

Para estudar uma enzima, é preciso inicialmente separá-la das outras proteínas presentes no meio de produção, visto que, uma preparação pura é essencial para a determinação de suas propriedades bioquímicas. Além disso, aplicações enzimáticas em alguns setores industriais requerem enzimas com alto grau de pureza. Portanto, é importante que se desenvolvam processos viáveis, do ponto de vista econômico, para o processo de purificação, a fim de se obter enzimas quimicamente puras e com atividade específica máxima.

Para os propósitos de purificação das enzimas xilanolíticas em estudo foi selecionado o fungo *Aspergillus ochraceus*, uma vez que este microrganismo produziu altos níveis de β -xilosidase extracelular, além dos ótimos níveis de endoxilanase. Para isso utilizou-se um sistema de cultivo em dois-estágios, descrito a seguir.

4.5.1 Cultivo em dois-estágios

O cultivo em dois-estágios foi realizado visando obter maiores níveis enzimáticos, principalmente em termos de atividade específica, para os propósitos de purificação. Dessa forma o fungo *Aspergillus ochraceus* foi inoculado em um meio complexo (SR) utilizando glicose 1% como fonte de carbono e incubados a 30°C por 72 horas. Após este período, a massa micelial obtida neste meio foi lavada com água destilada e transferida para um meio mínimo (Czapeck) contendo xilana birchwood ou xilana oat spelt, e incubadas nas condições de agitação a 100 rpm ou estática, por 24, 48, 72, 96, 120 e 168 horas, a 30°C.

O meio mínimo Czapeck foi utilizado para o fungo *A. ochraceus* visto que este é um meio menos complexo quando comparado com o Adams (melhor meio de cultivo pré-padronizado – **Tabela 6**), o que facilita os processos de purificação devido a menor quantidade de proteínas. Além disso, o microrganismo também apresentou uma boa produção de xilanases neste meio (segunda melhor produção).

Após a transferência dos micélios, ensaios para detectar a presença de glicose residual, atividades xilanásica e β -xilosidásica foram realizados no meio de pré-cultivo contendo glicose e detectou-se somente traços de glicose nestes meios, assim como, uma baixa atividade xilanásica e β -xilosidásica (dados não mostrados). Dosagens das atividades xilanásica e β -xilosidásica também foram realizadas nos meios de indução (Czapeck).

Os resultados obtidos nos meios de indução para o fungo *A. ochraceus* quanto à produção de xilanase e β -xilosidase estão demonstrados na **Figura 33**, no qual verificou-se que os melhores níveis de atividade xilanásica foram obtidos quando transferiu-se o microrganismo para os meios contendo xilana oat spelt como fonte de carbono, na condição de agitação por 72 horas (**Figura 33A**). Nesta condição, também foi detectada a melhor atividade específica para o microrganismo (dado não mostrado). Em relação à atividade β -

xilosidásica, os níveis enzimáticos produzidos foram semelhantes nas quatro condições analisadas (**Figura 33B**).

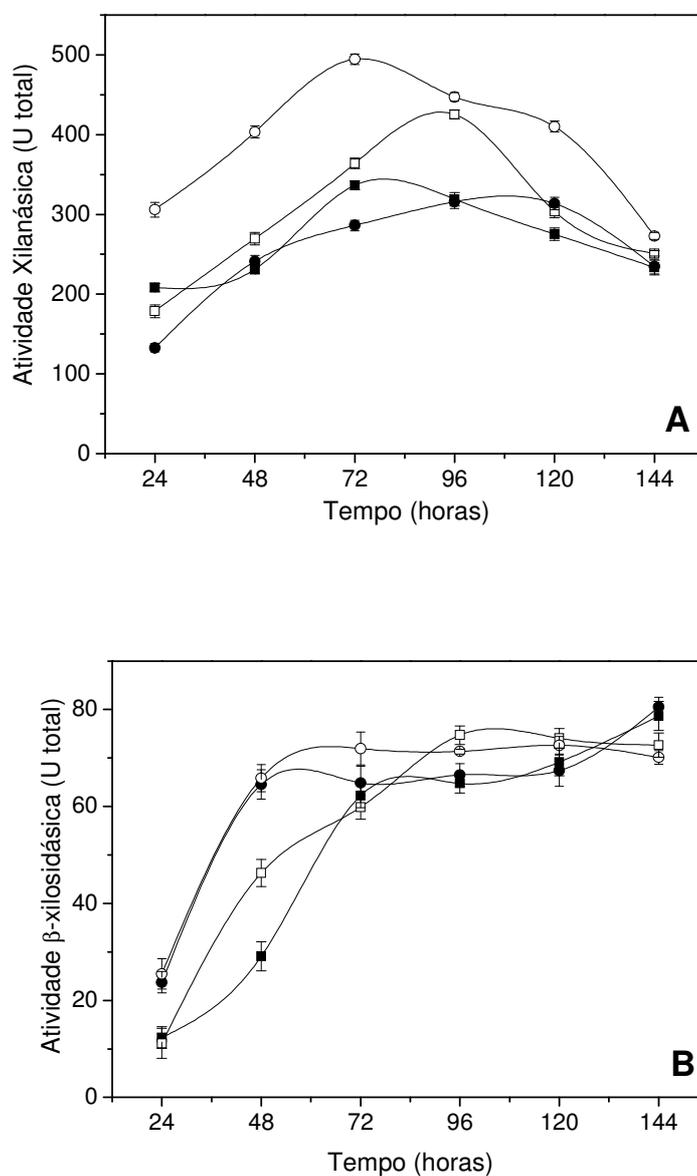


Figura 33. Influência do cultivo em dois-estágios na produção de xilanase (**A**) e β -xilosidase (**B**) por *A. ochraceus*. Microrganismo cultivado em meio SR (glicose 1%) em estufa bacteriológica a 30°C por 72 horas e transferidos para seu meio mínimo (Czapeck), e incubado em estufa bacteriológica ou shaker (100 rpm) a 30°C, por várias horas. Símbolos: -■- xilana birchwood, estático; -□- xilana oat spelt, estático; -●- xilana birchwood, agitação; -○- xilana oat spelt, agitação.

4.5.2 Concentração de xilana no cultivo

A concentração de xilana no cultivo do fungo *A. ochraceus* foi analisada quanto à produção de xilanases e β -xilosidases. O microrganismo foi inoculado na condição ótima de cultivo em dois-estágios pré-padronizados (xilana oat spelt, agitação, 72 horas), utilizando varias concentrações de xilana oat spelt como fonte de carbono.

Os resultados estão demonstrados na **Figura 34** e verificou-se que a adição de 0,75% de xilana oat spelt no cultivo foi a mais favorável para a produção e secreção de xilanases e β -xilosidases extracelulares, sendo esta produção cerca de 15% maior que a concentração de 1,0% (**Figura 34A**) utilizada nos experimentos anteriores, e aproximadamente 8% maior no caso da produção de β -xilosidase (**Figura 34B**).

4.5.3 Etapas de purificação das xilanases e β -xilosidase produzidas por

Aspergillus ochraceus

4.5.3.1 Coluna cromatográfica DEAE-celulose

O extrato bruto extracelular produzido por *Aspergillus ochraceus* foi dialisado contra água destilada durante uma noite a 4°C. Posteriormente, o volume recuperado na diálise foi aplicado em coluna cromatográfica DEAE-celulose conforme descrito no item 3.12 de Material e Métodos. Dois picos de atividade xilanólítica foram eluídos em DEAE-celulose. Um pico que apresentou somente atividade xilanásica e que não interagiu com a resina, denominado PI de DEAE-celulose, e outro pico que apresentou atividade xilanásica e β -xilosidásica e que foi eluído com aproximadamente 0,7 M de um gradiente linear (0 – 1,5 M) de NaCl, denominado PII de DEAE-celulose (**Figura 35A**).

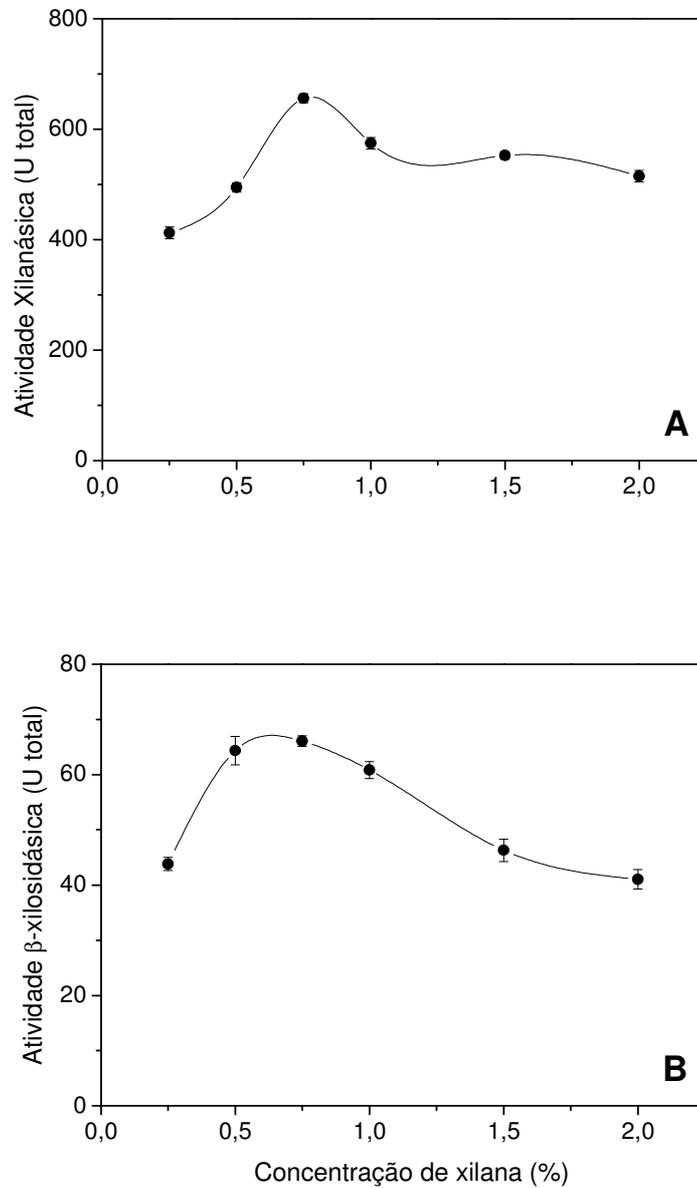


Figura 34. Influência da concentração de xilana oat spelt na produção de xilanase e β -xilósídase por *A. ochraceus*. Atividade xilanásica total (A); atividade β -xilósídásica total (B) em função da concentração de xilana. Microrganismo cultivado em sua condição ótima de cultivo em dois-estágios, a 30°C.

4.5.3.2 Coluna cromatográfica Biogel P-60

O PI de DEAE-celulose, com atividade xilanásica, foi dialisado em água destilada, concentrado e aplicado em coluna cromatográfica Biogel P-60 conforme descrito no item 3.12 de Material e Métodos. Dois “pools” de atividade xilanásica foram obtidos, denominados “xil 1” e “xil 2” (**Figura 35B**) que apresentaram 5,36% e 10,37% de recuperação e um fator de purificação de 10,69 e 9,07 vezes, respectivamente (**Tabela 10**). Estes processos resultaram em uma xilanase parcialmente purificada (xil 1) e uma xilanase (xil 2) com alto grau de pureza, que foram utilizadas em experimentos de caracterização bioquímica.

4.5.3.3 Coluna cromatográfica Sephadex G-100

O PII obtido em DEAE-celulose, contendo atividade xilanásica e β -xilosidásica, foi dialisado em água destilada, concentrado e aplicado em coluna cromatográfica de filtração Sephadex G-100 conforme descrito no item 3.12 de Material e Métodos. Dois “pools” de atividade foram eluídos, um com atividade xilanásica e β -xilosidásica, denominado PI da Sephadex G-100 e outro com somente atividade xilanásica – PII da Sephadex G-100 (**Figura 35C**), sendo que este último, denominado “xil 3”, apresentou um alto grau de pureza, e a amostra foi utilizada em experimentos de caracterização bioquímica.

4.5.3.4 Coluna Cromatográfica Biogel P-60

O PI da Sephadex G-100, com atividade β -xilosidásica, foi dialisado, concentrado e aplicado em coluna cromatográfica de filtração Biogel P-60 conforme descrito no item 3.12 de Material e Métodos. Estes processos resultaram em um único pico de atividade β -xilosidase (**Figura 35D**), denominado “ β -xil”, que foi utilizado em experimentos de caracterização bioquímica. A **Tabela 10** resume as etapas de purificação das xilanases e β -xilosidase purificadas.

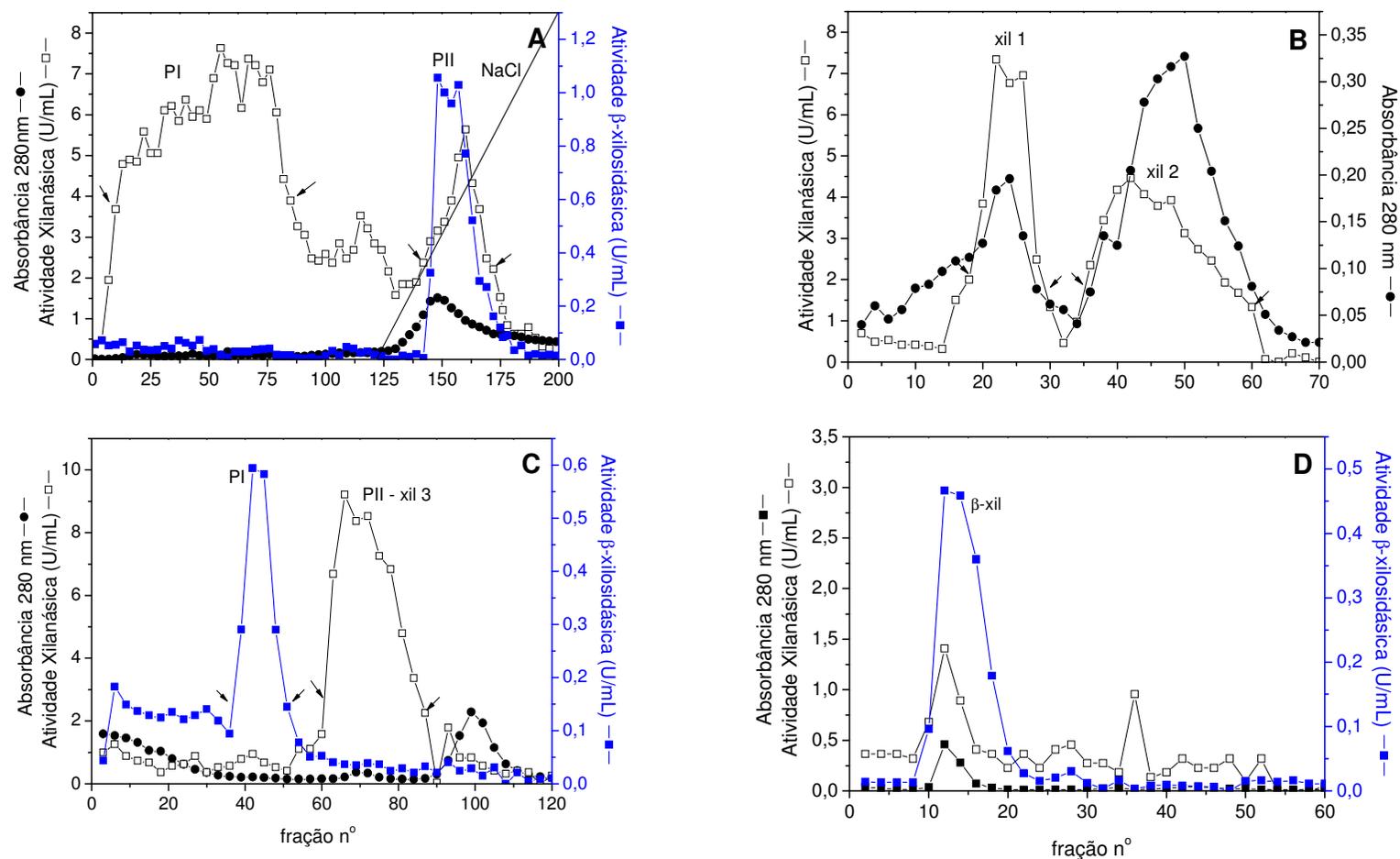


Figura 35. Perfis cromatográficos das atividades xilanásicas e β -xilosidásica produzidas por *A. ochraceus*. Colunas cromatográficas: DEAE-celulose (A); Biogel P-60 (B); Sephadex G-100 (C) e Biogel P-60 (D). Símbolos: (-●-) absorvância a 280 nm; (-□-) atividade xilanásica; (-■-) atividade β -xilosidásica; (/) gradiente de NaCl (0 – 1,5 M); (PI) pico um; (PII) pico dois; (xil 1) xilanase 1 parcialmente purificada; (xil 2) xilanase 2 purificada; (xil 3) xilanase 3 purificada; e (β -xil) β -xilosidase purificada.

Tabela 10. Etapas de purificação das xilanases e β -xilosidase extracelulares produzidas por *A. ochraceus*.

| Etapas | Volume total (mL) | Proteína total (mg) | Atividade total (U) | | Atividade específica (U/mg prot.) | | Recuperação (%) | | Fator de purificação (vezes) | |
|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------|--------------|--------------------------------------|--------------|--------------------|--------------|---------------------------------|--------------|
| | | | xil | β -xil | xil | β -xil | xil | β -xil | xil | β -xil |
| | | | Extrato bruto | 160 | 107,60 | 1755,95 | 201,40 | 16,32 | 1,87 | 100,00 |
| Diálise | 160 | 73,20 | 1795,10 | 222,80 | 24,52 | 3,04 | 102,23 | 110,63 | 1,50 | 1,63 |
| PI DEAE- celulose | 172 | 10,70 | 1320,30 | Nd | 123,40 | Nd | 75,20 | Nd | 7,56 | Nd |
| Biogel P-60 | | | | | | | | | | |
| PI (xil 1) | 8 | 0,45 | 94,20 | Nd | 209,33 | Nd | 5,36 | Nd | 12,83 | Nd |
| PII (xil 2) | 20 | 1,23 | 182,10 | Nd | 148,05 | Nd | 10,37 | Nd | 9,07 | Nd |
| PII DEAE- celulose | 75 | 26,25 | 415,50 | 99,75 | 15,83 | 3,80 | 23,66 | 49,53 | 0,97 | 2,03 |
| Sephadex G-100 | | | | | | | | | | |
| PI | 18 | 3,24 | 22,14 | 17,10 | 6,83 | 5,28 | 1,26 | 8,49 | 0,42 | 2,82 |
| PII (xil 3) | 16 | 0,52 | 111,20 | Nd | 213,85 | Nd | 6,33 | Nd | 13,10 | Nd |
| Biogel P-60 (β -xil) | 10 | 0,35 | 9,45 | 9,30 | 27,00 | 26,57 | 0,54 | 4,62 | 1,65 | 14,21 |

Nd = não detectado

U = Unidades

U/mg prot. = Unidades / miligrama de proteína

4.5.4 Critério de pureza

Análises dos dois picos obtidos na primeira coluna Biogel P-60 foram realizadas em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE 4,5 - 10%), e demonstraram que o pico um de Biogel P-60 foi parcialmente purificado (xil 1), apresentando duas bandas protéicas (**Figura 36A**), e o pico dois foi totalmente purificado (xil 2) (**Figura 36B**). No pico dois de Sephadex G-100 foi detectado uma outra forma xilanolítica (xil 3) que apresentou homogeneidade eletroforética em PAGE 8,9 – 8% (**Figura 36C**). Análise da atividade β -xilosidásica obtida na segunda Biogel P-60, em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE 8,9 - 6%), revelou um alto grau de pureza presente na amostra (**Figura 36D**).

4.5.5 Determinação da massa molecular

As massas moleculares das xilanases e β -xilosidase purificadas, ou parcialmente purificadas, foram determinadas em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme descrito no item 3.14.2 de Material e Métodos. O pico um (xil 1) obtido em Biogel P-60, com atividade xilanásica, apresentou duas bandas protéicas, podendo tratar-se de duas xilanases, ou uma forma xilanolítica e uma proteína contaminante, com massas moleculares calculadas em 39 kDa e 28 kDa (**Figura 37A**). A xilanase purificada presente no pico dois (xil 2) da coluna cromatográfica Biogel P-60 apresentou massa molecular de 25 kDa (**Figura 37B**), e a “xil 3” presente no pico dois de Sephadex G-100 apresentou massa molecular de 33 kDa (**Figura 37C**). Enquanto, a massa molecular da β -xilosidase de *A. ochraceus* foi calculada em 137 kDa (**Figura 37D**). Estes dados foram obtidos quando extrapolados na apresentação gráfica ilustrada na **Figura 38**.

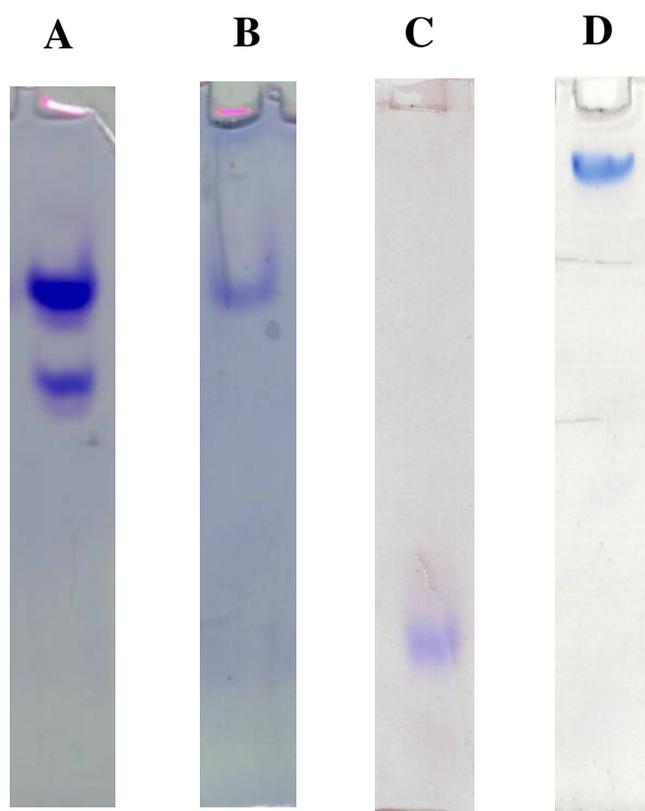


Figura 36. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes (PAGE) das xilanases e β -xilosidase de *A. ochraceus*. Xilanases – “xil 1” (A); “xil 2” (B) e “xil 3” (C); e β -xilosidase – “ β -xil” (D), coradas com Comassie Brilliant Blue.

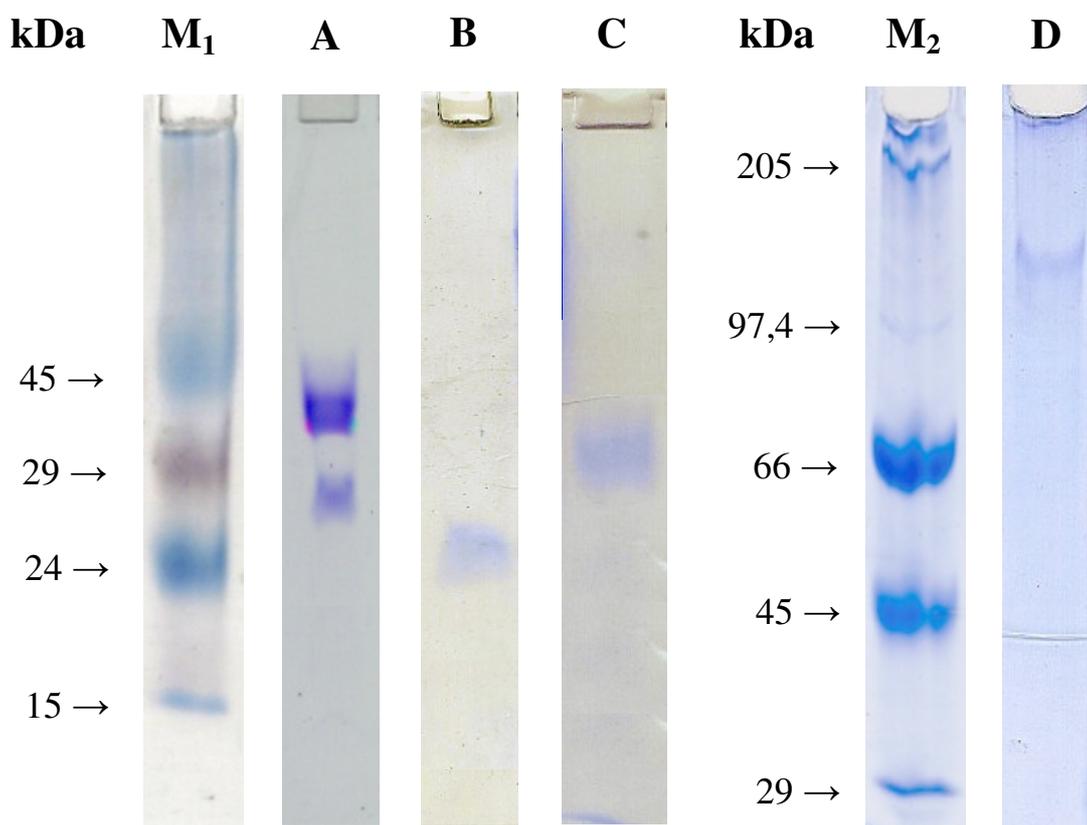


Figura 37. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) das xilanases e β -xilosidase de *A. ochraceus*. Xilanases (**A**, **B**, **C**) e da β -xilosidase (**D**) corado com Comassie Brilliant Blue. Marcadores de massa molecular: ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), inibidor de tripsina (24 kDa) e α -lactoalbumina (15 kDa) (**M**₁); “xil 1” (**A**); “xil 2” (**B**); “xil 3” (**C**); marcadores de massa molecular: miosina (205 kDa); fosforilase b (97,4 kDa), BSA (66 kDa); ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa) (**M**₂); e “ β -xil” (**D**).

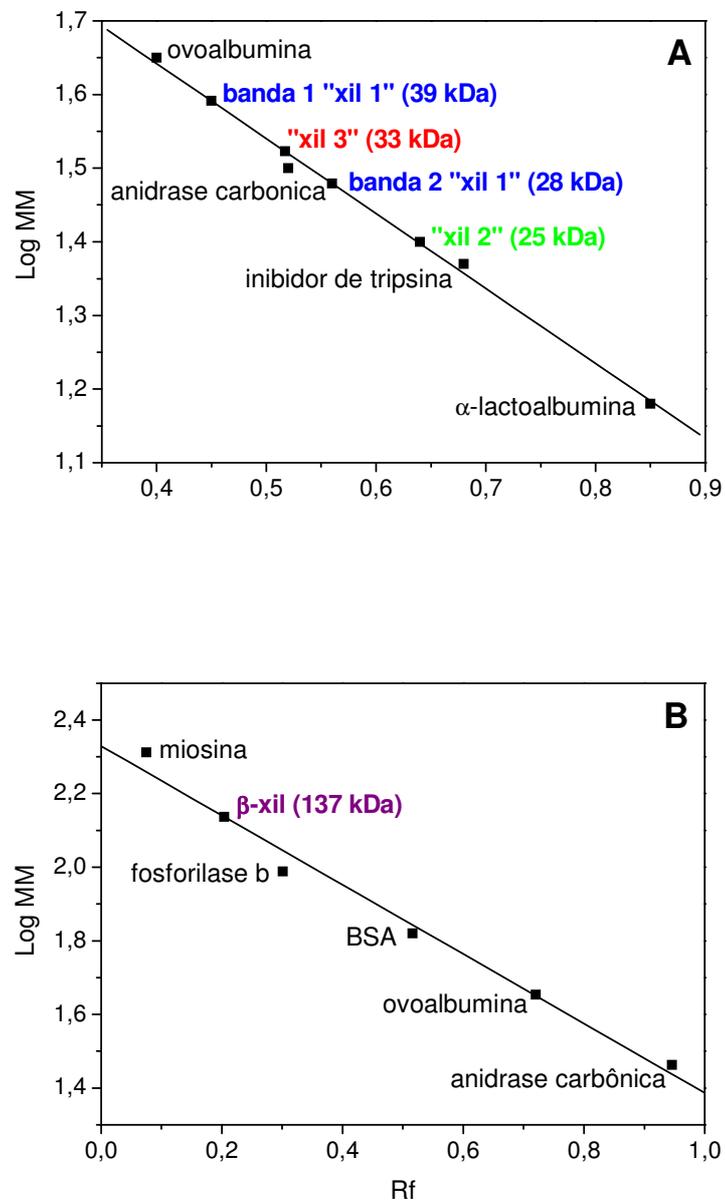


Figura 38. Determinação das massas moleculares das xilanase (A) e β -xilosidase (B) de *A. ochraceus* através SDS-PAGE. Os marcadores de massas moleculares utilizados estão demonstrados no gráfico.

4.5.6 Análise do produto de hidrólise em TLC

A cromatografia do produto de hidrólise além de fornecer maiores informações a respeito da especificidade constitui-se em um importante critério de classificação das enzimas através da determinação de seu modo de ação sobre o substrato.

O produto de hidrólise das xilanases “xil 1”, “xil 2” e “xil 3”, e da β -xilosidase foi detectado em cromatografia em camada delgada de sílica, conforme descrito no item 3.15 de Material e Métodos. Pode-se visualizar na **Figura 39A, B e C** correspondente a “xil 1”, “xil 2” e “xil 3”, respectivamente, que tanto em tempos curtos (15 minutos) quanto em tempos longos (6 horas), os produtos formados foram xilooligossacarídeos de diversos comprimentos e traços de xilobiose pela “xil 2”. A “xil 3” formou principalmente xilotriose e xilotetraose, sendo que traços de xilobiose aparecem nos períodos de hidrólise mais longos. Estes resultados confirmaram o caráter endo das enzimas.

Em relação à β -xilosidase, somente xilose foi detectado como produto de hidrólise da xilana em todo tempo de reação testado (**Figura 40A**), confirmando, neste caso, o caráter exo da enzima. No entanto, quando analisou-se os produtos de hidrólise da β -xilosidase, utilizando como substrato os xilooligossacarídeos formados pela ação da “xil 2”, ou seja, os produtos da “xil 2”, verificou-se que esta β -xilosidase apresenta uma maior afinidade por sacarídeos maiores, uma vez que a concentração de xilooligossacarídeos maiores diminuiu, enquanto a concentração de xilooligossacarídeos menores e xilose aumentaram (**Figura 40B**).

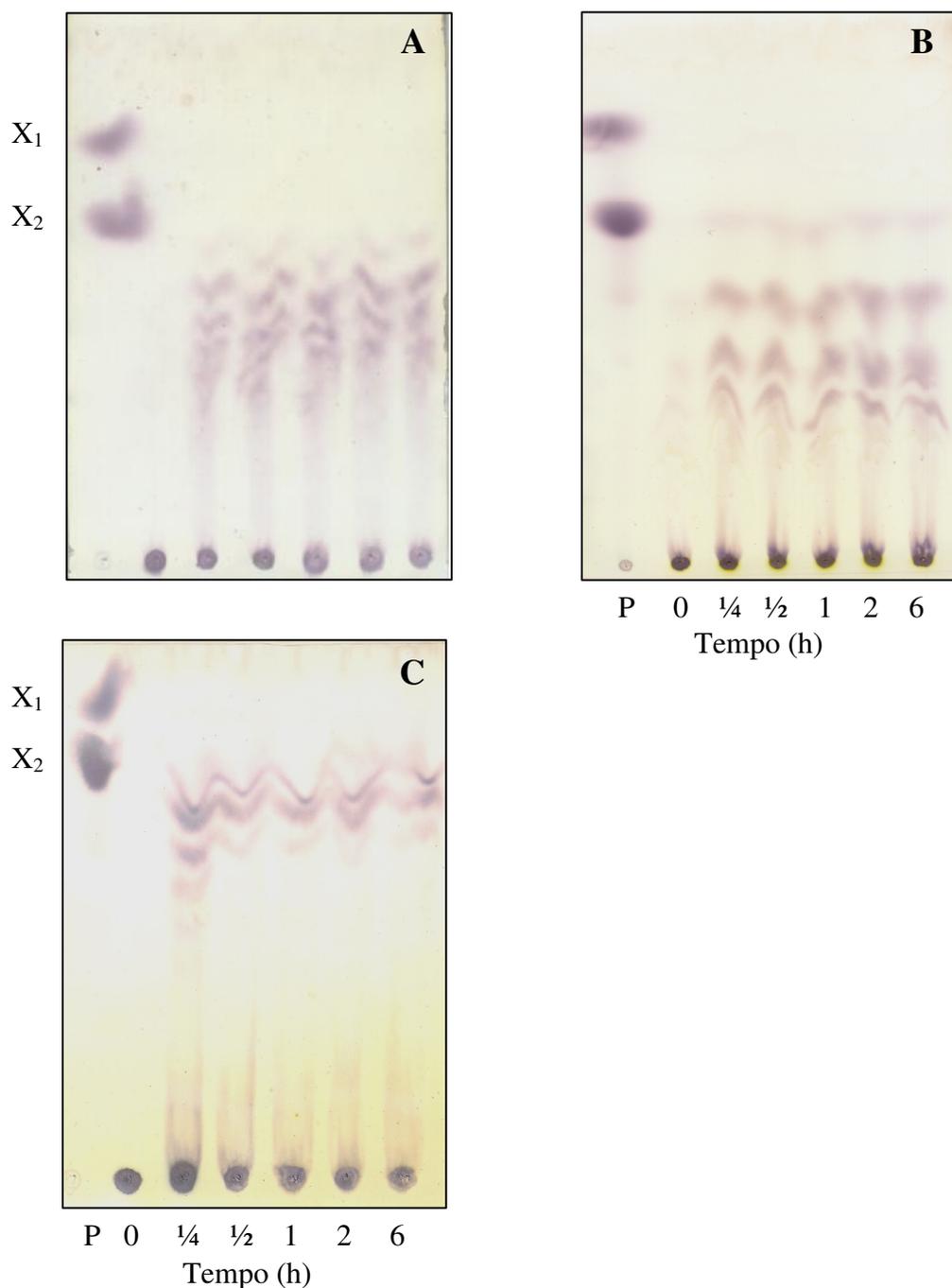


Figura 39. Cromatografia em camada delgada de sílica do produto de hidrólise da ação das endoxilanases “xil 1” (A), “xil 2” (B) e “xil 3” (C) sob xilana birchwood. Símbolos: P = padrão; X₁ = padrão de xilose 1% (p/v); X₂ = padrão de xilobiose 1% (p/v); 0 = produto de hidrólise no tempo zero; ¼ = produto de hidrólise após ¼ de hora (ou 15 minutos) de reação; ½ = produto de hidrólise após ½ hora (ou 30 minutos) de reação; 1 = produto de hidrólise após 1 hora de reação; 2 = produto de hidrólise após 2 horas de reação; 6 = produto de hidrólise após 6 horas de reação.

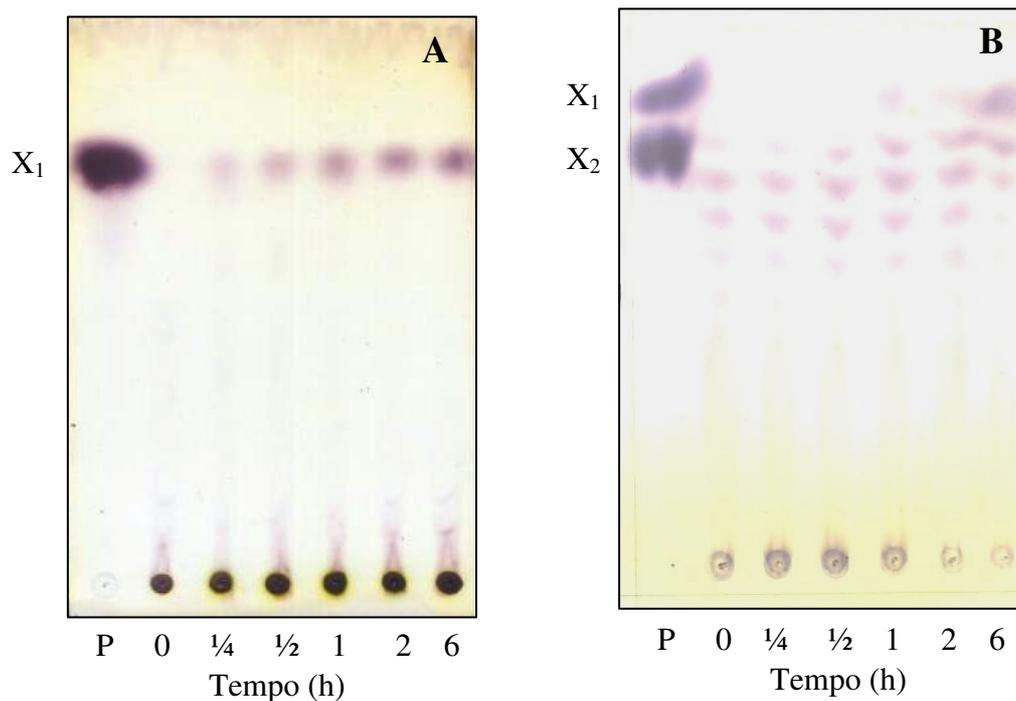


Figura 40. Cromatografia em camada delgada de sílica do produto de hidrólise da ação da “ β -xil” sob xilana birchwood (**A**), e sob os produtos de hidrólise da “xil 2” (**B**). Símbolos: P = padrão; X₁ = padrão de xilose 1% (p/v); X₂ = padrão de xilobiose 1% (p/v); 0 = produto de hidrólise no tempo zero; 1/4 = produto de hidrólise após 1/4 de hora (ou 15 minutos) de reação; 1/2 = produto de hidrólise após 1/2 hora (ou 30 minutos) de reação; 1 = produto de hidrólise após 1 hora de reação; 2 = produto de hidrólise após 2 horas de reação; 6 = produto de hidrólise após 6 horas de reação.

4.5.7 Determinação da temperatura e pH ótimos das enzimas purificadas

As temperaturas ótimas das endoxilanases e da β -xilosidase purificadas, ou parcialmente purificadas foram determinadas através de experimentos nos quais as dosagens das atividades enzimáticas variaram entre 30°C e 80°C. As três endoxilanases (xil 1, xil 2 e xil 3) apresentaram temperatura ótima de reação a 60°C, utilizando xilana birchwood 1% como substrato, enquanto a temperatura ótima de reação da β -xilosidase sobre o *p*NF-xilopiranosídeo correspondeu a 70°C (**Figura 41A**).

Todas as enzimas apresentam uma faixa de pH ótimo no qual apresentam atividade máxima, dessa forma, determinou-se também o pH ótimo dessas enzimas. Para tanto, foi utilizado tampão McIlvaine (formado por diferentes quantidades de ácido cítrico 0,1 M e Na₂HPO₄ 0,2 M, conforme o pH desejado), os quais variaram de 3,0 a 8,0. O pH ótimo para hidrólise da xilana das endoxilanases “xil 1” e “xil 2” foi estimado em 6,0, e o da “xil 3” em 5,5; enquanto o pH em que a β -xilosidase apresentou maior atividade de hidrólise foi 4,5 (**Figura 41B**).

4.5.8 Estabilidade à temperatura e ao pH das enzimas purificadas

Enzimas termoestáveis são de grande interesse industrial. Portanto, para a determinação da estabilidade térmica das endoxilanases “xil 1”, “xil 2” e “xil 3” e da β -xilosidase produzidas por *A. ochraceus*, as enzimas foram incubadas em temperaturas elevadas, durante vários tempos, na ausência do substrato. Transcorridos estes tempos, alíquotas foram retiradas e colocadas em gelo, e posteriormente realizou-se o ensaio pelo método de DNS, descrito no item 3.6.1 de Material e Métodos, na temperatura ótima de cada enzima. Neste experimento, foi feito um controle que corresponde a 100% da atividade, no qual a enzima não foi pré-incubada nas temperaturas testadas.

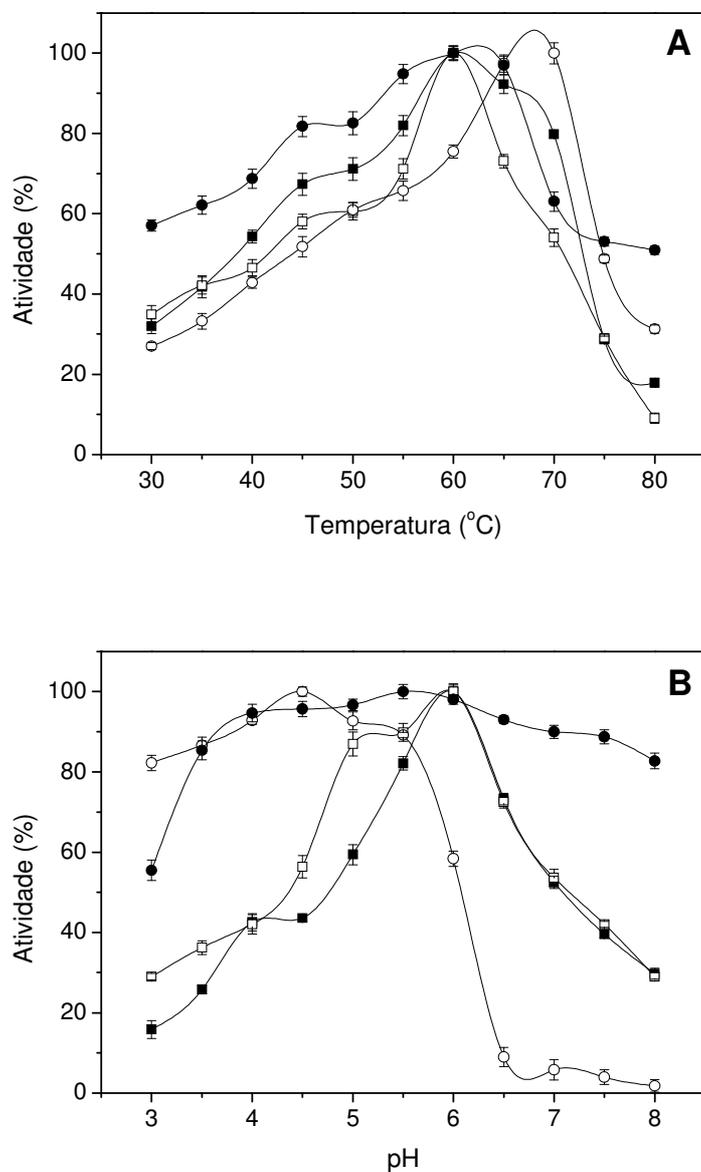


Figura 41. Influência da temperatura (A) e do pH (B) na reação das endoxilanases “xil 1”, “xil 2” e “xil 3” e da β -xilosidase de *A. ochraceus*. A atividade xilanásica foi estimada pelo método de DNS, tendo xilana birchwood 1% (p/v) como substrato; e a atividade β -xilosidásica através do método descontínuo usando o substrato sintético *p*NF-xilopiranosídeo 0,25% (p/v). Símbolos: -■- “xil 1”; -□- “xil 2”; -●- “xil 3”; -○- “β-xil”.

Para a determinação da estabilidade ao pH, as enzimas foram incubadas em tampão McIlvaine, em gelo, nos pHs de 3,0 – 8,0, na proporção de 1:1, durante 1 hora. Transcorrido este tempo, alíquotas deste extrato foram retiradas, e então foi realizado o ensaio enzimático pelo método de DNS, na temperatura e pH ótimos das enzimas.

Em relação à termoestabilidade, verificou-se que as xilanases “xil 1” e “xil 2” foram relativamente estáveis a 50°C e 55°C, sendo que a “xil 1” foi estável a 50°C por 30 minutos, e a 55°C apresentou um t_{50} de 20 minutos. A 60°C a enzima não foi estável (**Figura 42A**). A “xil 2” foi estável a 50°C e 55°C por 1 hora, e a 60°C a enzima apresentou um t_{50} de aproximadamente 25 minutos (**Figura 42B**), demonstrando ser uma enzima mais estável que a primeira. Enquanto a endoxilanase “xil 3” foi completamente estável a 50°C e 55°C por 1 hora, sendo que a 60°C a enzima manteve ainda, mais de 60% de sua atividade residual, no entanto, a 65°C a enzima não foi estável (**Figura 42C**). Em relação à termoestabilidade da β -xilosidase, verificou-se que a enzima foi completamente estável no intervalo de 60°C a 70°C durante uma hora, sendo que a 75°C a redução da atividade residual foi bastante significativa, mantendo-se estável somente nos cinco primeiros minutos (**Figura 42D**).

Analisando os resultados de estabilidade ao pH, verificou-se que a “xil 1” e a “xil 3” foram estáveis em toda a faixa de pH testada (3,0 – 8,0) durante 1 hora, sendo que a “xil 1” apresentou pelo menos 50% da sua atividade residual, enquanto a “xil 3” manteve mais de 65% da sua atividade residual. A “xil 2” foi estável na faixa de pH de 4,0 a 8,0; e a β -xilosidase purificada foi estável, durante uma hora, nos pHs 3,0 a 6,5 (mais de 50% da atividade residual), em pH 7,0 observou-se 45% da atividade residual, enquanto que nos pHs 7,5 e 8,0 a enzima não se manteve estável (**Figura 43**).

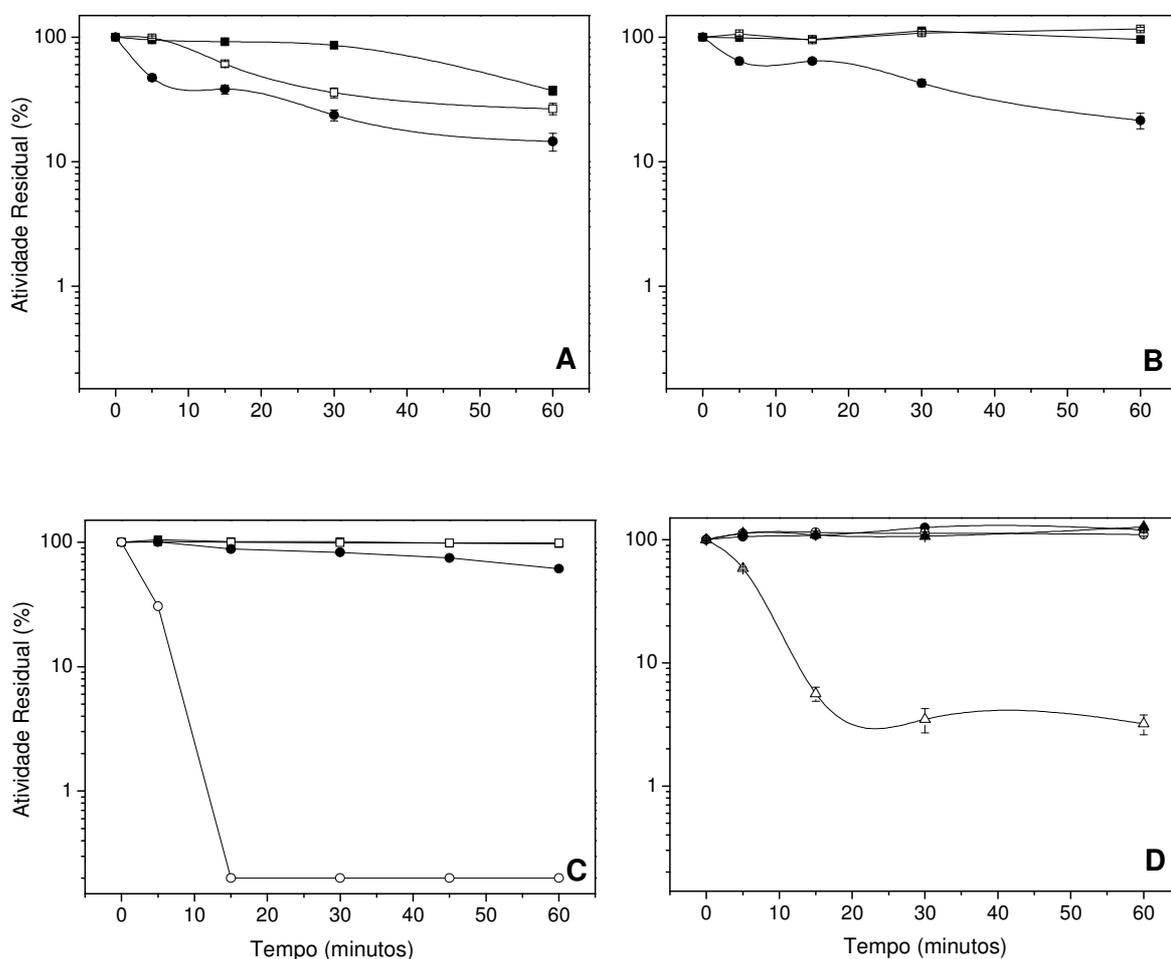


Figura 42. Termoestabilidade das endoxilanases “xil 1” (A), “xil 2” (B) e “xil 3” (C) e da β -xilosidase (D) de *A. ochraceus* em função do tempo de incubação. A atividade xilanásica foi estimada pelo método de DNS, tendo xilana birchwood 1% (p/v) como substrato, e a atividade β -xilosidásica através do método descontínuo usando o substrato sintético *p*NF-xilopiranosídeo 0,25% (p/v). Símbolos: -■- 50°C; -□- 55°C; -●- 60°C; -○- 65°C; -▲- 70°C; e -△- 75°C.

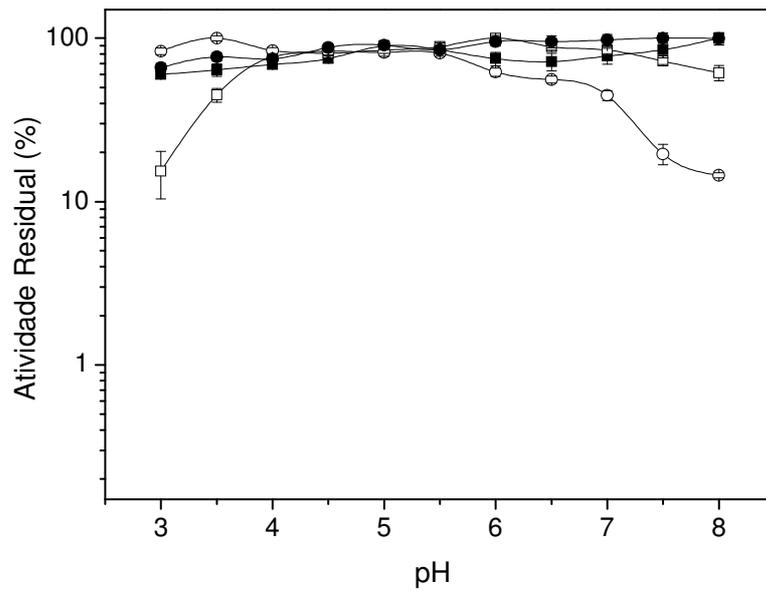


Figura 43. Estabilidade ao pH das endoxilanases “xil 1” (-■-), “xil 2” (-□-) e “xil 3” (-●-) e da β-xilosidase (-○-) de *A. ochraceus*. A atividade xilanásica foi estimada pelo método de DNS, tendo xilana birchwood 1% (p/v) como substrato, e a atividade β-xilosidásica através do método descontínuo usando o substrato sintético pNF-xilopiranosídeo 0,25% (p/v).

4.5.9 Influência de íons, EDTA e 2-mercaptoetanol

Analisou-se a influência de alguns íons na atividade das xilanases “xil 1”, “xil 2” e “xil 3” e da β -xilosidase. Os íons testados foram: NH_4Cl , HgCl_2 , NaCl , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 e KCl , além do quelante EDTA e do agente redutor 2-mercaptoetanol. Como controle foram utilizadas as xilanases e a β -xilosidase puras sem a adição de nenhuma substância. As concentrações utilizadas no ensaio foram de 1, 5 e 10 mM.

Considerou-se um aumento significativo de atividade quando esta foi maior que 50%. Assim, observando as **Tabelas 11 e 12** verificou-se que os compostos MnCl_2 e CoCl_2 nas concentrações de 5 e 10 mM influenciaram de forma bastante significativa as atividades das endoxilanases “xil 1” e “xil 2”. O manganês aumentou a atividade em torno de 61% para a “xil 1” e 78% para a “xil 2” na concentração de 5 mM, sendo que, quando o cobalto foi utilizado como cofator, este aumento foi em torno de 54% e 70%, respectivamente, na mesma concentração. Manganês também foi favorável para a atividade da “xil 3” na concentração de 1 mM, apresentando 56% de ativação, no entanto em concentrações superiores, um efeito inibitório foi observado (**Tabela 13**). Esse efeito – ativação em baixas concentrações (1 mM) e inibição em concentrações mais altas (5 mM e 10 mM) – também foi observado quando a “xil 3” foi incubada com outros íons, como cobalto, magnésio e cálcio. A inibição observada com o uso de EDTA em torno de 10 a 20% na atividade da “xil 2” e de até 40% na atividade da “xil 3” sugere uma possível retirada de íons ativadores da atividade endoxilanásica presentes no extrato. O aumento da concentração de cloreto de mercúrio inibiu fortemente a atividade da endoxilanase “xil 1” e “xil 3”, enquanto que a “xil 2” praticamente não foi afetada. O uso do agente redutor 2-mercaptoetanol não causou transformações na estrutura enzimática de forma que prejudicasse sua atividade catalítica.

Tabela 11. Efeito de íons, EDTA e 2-mercaptoetanol na atividade enzimática da “xil 1” de *A. ochraceus*.

| | | Atividade (%) | | |
|--------------------------------------|----------------|----------------------|-----------------|--|
| Controles | 1 mM | 5 mM | 10 mM | |
| Sem íons | 100,00 | | | |
| Íons | | | | |
| NH ₄ Cl | 90,18 (± 0,15) | 102,48 (± 0,30) | 113,55 (± 0,17) | |
| HgCl ₂ | 90,18 (± 0,22) | 53,27 (± 0,24) | 0,00 | |
| NaCl | 82,21 (± 0,18) | 98,55 (± 0,12) | 109,30 (± 0,25) | |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 80,98 (± 0,11) | 153,96 (± 0,18) | 151,08 (± 0,21) | |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 88,34 (± 0,10) | 160,84 (± 0,19) | 155,33 (± 0,23) | |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 87,12 (± 0,27) | 118,10 (± 0,22) | 121,57 (± 0,31) | |
| CaCl ₂ | 85,89 (± 0,33) | 94,15 (± 0,35) | 100,08 (± 0,19) | |
| KCl | 82,82 (± 0,25) | 124,98 (± 0,21) | 115,24 (± 0,20) | |
| EDTA | 72,39 (± 0,25) | 109,02 (± 0,36) | 92,86 (± 0,18) | |
| 2-mercaptoetanol | 90,80 (± 0,15) | 133,65 (± 0,16) | 141,38 (± 0,31) | |

Tabela 12. Efeito de íons, EDTA e 2-mercaptoetanol na atividade enzimática da “xil 2” de *A. ochraceus*.

| Controles | Atividade (%) | | |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 1 mM | 5 mM | 10 mM |
| Sem íons | 100,00 | | |
| Íons | | | |
| NH ₄ Cl | 103,70 (± 0,20) | 116,55 (± 0,15) | 117,83 (± 0,15) |
| HgCl ₂ | 102,12 (± 0,20) | 103,61 (± 0,20) | 87,06 (± 0,11) |
| NaCl | 93,65 (± 0,19) | 106,76 (± 0,19) | 96,97 (± 0,16) |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 87,83 (± 0,15) | 169,93 (± 0,40) | 146,62 (± 0,25) |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 113,23 (± 0,25) | 177,86 (± 0,42) | 168,07 (± 0,35) |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 81,48 (± 0,17) | 137,41 (± 0,27) | 112,24 (± 0,29) |
| CaCl ₂ | 92,59 (± 0,22) | 95,69 (± 0,17) | 96,27 (± 0,21) |
| KCl | 102,12 (± 0,21) | 112,82 (± 0,37) | 101,86 (± 0,20) |
| EDTA | 80,95 (± 0,16) | 86,48 (± 0,10) | 87,06 (± 0,13) |
| 2-mercaptoetanol | 100,53 (± 0,18) | 134,97 (± 0,30) | 119,00 (± 0,28) |

Tabela 13. Efeito de íons, EDTA e 2-mercaptoetanol na atividade enzimática da “xil 3” de *A. ochraceus*.

| | | Atividade (%) | | |
|--------------------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|--|
| Controles | 1 mM | 5 mM | 10 mM | |
| Sem íons | 100,00 | | | |
| Íons | | | | |
| NH ₄ Cl | 120,24 (± 0,22) | 109,18 (± 0,14) | 99,36 (± 0,15) | |
| HgCl ₂ | 44,16 (± 0,10) | 6,75 (± 0,10) | 4,89 (± 0,10) | |
| NaCl | 79,76 (± 0,12) | 112,85 (± 0,15) | 94,47 (± 0,16) | |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 129,42 (± 0,26) | 57,66 (± 0,10) | 20,85 (± 0,11) | |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 156,41 (± 0,30) | 80,36 (± 0,13) | 19,03 (± 0,10) | |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 117,78 (± 0,18) | 78,51 (± 0,14) | 39,27 (± 0,15) | |
| CaCl ₂ | 109,82 (± 0,11) | 103,07 (± 0,18) | 53,98 (± 0,15) | |
| KCl | 115,32 (± 0,14) | 101,82 (± 0,20) | 85,8 (± 0,19) | |
| EDTA | 103,68 (± 0,15) | 92,00 (± 0,17) | 57,05 (± 0,12) | |
| 2-mercaptoetanol | 133,74 (± 0,22) | 134,95 (± 0,27) | 145,99 (± 0,28) | |

Em relação a β -xilosidase, verificou-se que nenhum íon ativou de forma significativa a atividade enzimática, sendo observado uma pequena ativação pelos compostos MnCl_2 (28%) e MgCl_2 (20%) na concentração de 5 mM (**Tabela 14**). No entanto, uma forte inibição (mais de 90%) por mercúrio foi observada, e em uma proporção menor pelos compostos cloreto de sódio e cloreto de amônio. Cloreto de cobalto e cloreto de manganês também apresentaram efeito inibitório na concentração de 10 mM.

Tabela 14. Efeito de íons, EDTA e 2-mercaptoetanol na atividade enzimática da α -xilosidase de *A. ochraceus*.

| Controles | Atividade (%) | | |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 1 mM | 5 mM | 10 mM |
| Sem íons | 100,00 | | |
| Íons | | | |
| NH_4Cl | 84,06 ($\pm 0,15$) | 88,18 ($\pm 0,15$) | 37,24 ($\pm 0,11$) |
| HgCl_2 | 1,42 ($\pm 0,10$) | 1,80 ($\pm 0,13$) | 10,70 ($\pm 0,10$) |
| NaCl | 77,21 ($\pm 0,11$) | 40,08 ($\pm 0,19$) | 35,19 ($\pm 0,17$) |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 93,74 ($\pm 0,19$) | 105,01 ($\pm 0,20$) | 24,07 ($\pm 0,22$) |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 102,81 ($\pm 0,20$) | 128,46 ($\pm 0,28$) | 62,76 ($\pm 0,25$) |
| $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 102,24 ($\pm 0,21$) | 120,04 ($\pm 0,25$) | 83,54 ($\pm 0,19$) |
| CaCl_2 | 98,54 ($\pm 0,16$) | 94,16 ($\pm 0,17$) | 91,97 ($\pm 0,23$) |
| KCl | 98,54 ($\pm 0,22$) | 100,00 ($\pm 0,14$) | 97,08 ($\pm 0,15$) |
| EDTA | 104,38 ($\pm 0,12$) | 97,81 ($\pm 0,19$) | 99,27 ($\pm 0,18$) |
| 2-mercaptoetanol | 86,54 ($\pm 0,25$) | 114,23 ($\pm 0,13$) | 104,12 ($\pm 0,15$) |

4.5.10 Determinação do conteúdo de carboidratos

A natureza glicoprotéica das enzimas em estudo foi analisada pelo método fenossulfúrico (item 3.16 de Material e Métodos). O conteúdo de carboidratos das endoxilanases “xil 1”, “xil 2”, “xil 3” e da β -xilosidase produzidas por *A. ochraceus* foi estimado em 74%, 67%, 20% e 39%, respectivamente.

4.5.11 Hidrólise de substratos

Analisou-se a capacidade das endoxilanases “xil 1”, “xil 2” e “xil 3” e da β -xilosidase (β -xil) de *A. ochraceus*, em hidrolisar xilanas de diferentes procedências e alguns substratos sintéticos na concentração de 1 mg/mL. As xilanas analisadas foram: birchwood, oat-spelt, larchwood e eucalipto; enquanto que os substratos sintéticos testados foram: *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo, *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo, *p*-nitrofenil- β -D-arabinopiranosídeo, *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo, *p*-nitrofenil- β -D-celobiopiranosídeo, 4-*O*-metil-D-glucurono-D-xilana e 4-nitrofenil-acetato. Além disso, carboximetilcelulose (CMC) e xilobiose foram utilizadas como substratos para as xilanases e β -xilosidase, respectivamente.

A “xil 1” hidrolisou preferencialmente a xilana birchwood, no entanto a hidrólise das demais xilanas foi bastante eficiente. Enquanto que a “xil 2” hidrolisou preferencialmente a xilana larchwood, sendo esta taxa de hidrólise também bastante próxima àquelas observadas para as xilanas birchwood e oat spelt, exceto para a xilana de eucalipto, no qual a hidrólise observada foi relativamente menor, em torno de 67%. No entanto, mesmo sendo pequena a diferença percentual de hidrólise das xilanas de diferentes procedências, verificou-se que tanto “xil 1” quanto “xil 2” hidrolisaram preferencialmente xilana birchwood à xilana oat spelt. Em relação a “xil 3”, verificou-se que a hidrólise foi preferencial pelas xilanas birchwood, larchwood e eucalipto, respectivamente, sendo que a hidrólise da xilana oat spelt

ocorreu em uma proporção (45%) muito menor (**Tabela 15**). CMC não foi hidrolisada pela endoxilanases em estudo, assim como os substratos sintéticos.

Em relação à β -xilosidase verificou-se que a enzima foi capaz de hidrolisar xilanas de diferentes procedências, embora em uma menor extensão (2 – 12%), quando comparado com xilobiose. Em relação aos substratos sintéticos, verificou-se que a enzima hidrolisou além do *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNF-xil), o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (pNF-glu), onde foi observada uma eficiência de hidrólise em mais de 50% (**Tabela 16**). Assim, foi realizado um experimento onde o pNF-xil e o pNF-glu foram ensaiados com a “ β -xil” separadamente e misturados (1:1), para verificar se o sítio de hidrólise desses substratos era o mesmo, ou se haviam dois sítios ativos.

Pode-se confirmar na **Figura 44**, que a β -xilosidase hidrolisou com uma menor eficácia o substrato pNF-glu comparado ao pNF-xil, uma vez que a V_0 da cinética ao se utilizar o substrato pNF-xil foi de 0,027, enquanto que para o pNF-glu foi 0,025. Por outro lado, constatou-se que ao se utilizar como substrato a combinação do pNF-xil e pNF-glu, a V_0 de hidrólise enzimática foi 0,033. Portanto a β -xilosidase possui, provavelmente, dois sítios ativos, um para a hidrólise do pNF-xil e outro para a hidrólise do pNF-glu, visto que com a mistura dos dois substratos foi observado um aumento da velocidade inicial.

4.5.12 Análises cinéticas

Os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$, assim com as eficiências catalíticas das endoxilanases – “xil 1”, “xil 2” e “xil 3” – e da β -xilosidase frente aos substratos xilana birchwood e *p*NF-xil, respectivamente, estão presentes na **Tabela 17**, enquanto as representações gráficas das endoxilanases “xil 1” e “xil 2” podem ser visualizadas na **Figura 45**, e da “xil 3” e da “ β -xil” na **Figura 46**. Os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ sugerem que a “xil 1” apresenta maior afinidade e eficiência catalítica por xilana birchwood do que a “xil 2” e a “xil 3”.

Tabela 15. Hidrólise de substrato pelas endoxilanasas “xil 1”, “xil 2” e “xil 3” produzidas por *A. ochraceus*.

| Substratos | Xil 1 | | Xil 2 | | Xil 3 | |
|---------------------|------------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|
| | Atividade (U/mL) | % | Atividade (U/mL) | % | Atividade (U/mL) | % |
| xilana birchwood | 16,00 | 100,00 | 16,00 | 93,84 | 14,41 | 100,00 |
| xilana oat spelt | 14,11 | 88,19 | 15,26 | 89,50 | 6,45 | 44,76 |
| xilana de eucalipto | 13,89 | 86,81 | 11,37 | 66,68 | 13,23 | 91,81 |
| xilana larchwood | 14,95 | 93,44 | 17,05 | 100,00 | 13,32 | 92,44 |

Tabela 16. Hidrólise de substrato pela β -xilosidase produzida por *A. ochraceus*.

| | Atividade (U/mL) | % |
|---|------------------|--------|
| Substratos sintéticos | | |
| <i>p</i> -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo | 0,76 | 100,00 |
| <i>p</i> -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo | 0,41 | 53,95 |
| <i>p</i> -nitrofenil- β -D-arabinopiranosídeo | 0,08 | 10,53 |
| <i>p</i> -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo | 0,06 | 7,89 |
| <i>p</i> -nitrofenil- β -D-celobiopiranosídeo | Nd | Nd |
| 4- <i>O</i> -metil-D-glucurono-D-xilana | 0,01 | 1,32 |
| 4-nitrofenil-acetato | Nd | Nd |
| Substratos naturais | | |
| xilobiase | 31,72 | 100,00 |
| xilana birchwood | 3,93 | 12,40 |
| xilana larchwood | 2,11 | 6,65 |
| xilana oat spelt | 1,68 | 5,30 |
| xilana eucalipto | 0,70 | 2,21 |

Nd: Não detectado

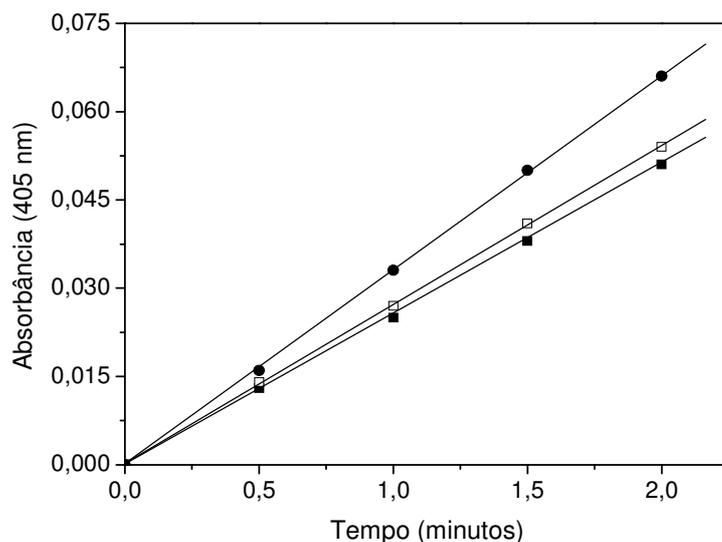


Figura 44. Análise do sítio de hidrólise da β -xilosidase de *A. ochraceus* para os substratos sintéticos pNF-xil e pNF-glu. Símbolos: -■- pNF-glu; -□- pNF-xil; -●- pNF-glu + pNF-xil (1:1).

Tabela 17. Análises cinéticas das endoxilanases “xil 1”, “xil 2” e “xil 3” e da β -xilosidase produzidas por *A. ochraceus*.

| Enzimas | Procedimento | K_M | $V_{m\acute{a}x}$ | $V_{m\acute{a}x}/K_M$ |
|--------------|-------------------|---------|-------------------|-----------------------|
| | | (mg/mL) | (U/mg prot.) | |
| Xil 1 | Lineweaver & Burk | 2,67 | 285,80 | 107,04 |
| | Hanes | 2,39 | 274,40 | 114,81 |
| Xil 2 | Lineweaver & Burk | 3,75 | 107,30 | 28,61 |
| | Hanes | 3,64 | 108,00 | 29,67 |
| Xil 3 | Lineweaver & Burk | 7,62 | 227,30 | 29,83 |
| | Hanes | 12,78 | 337,00 | 26,37 |
| β -xil | Lineweaver & Burk | 0,18 | 39,34 | 59,61 |
| | Hanes | 0,26 | 46,90 | 48,85 |

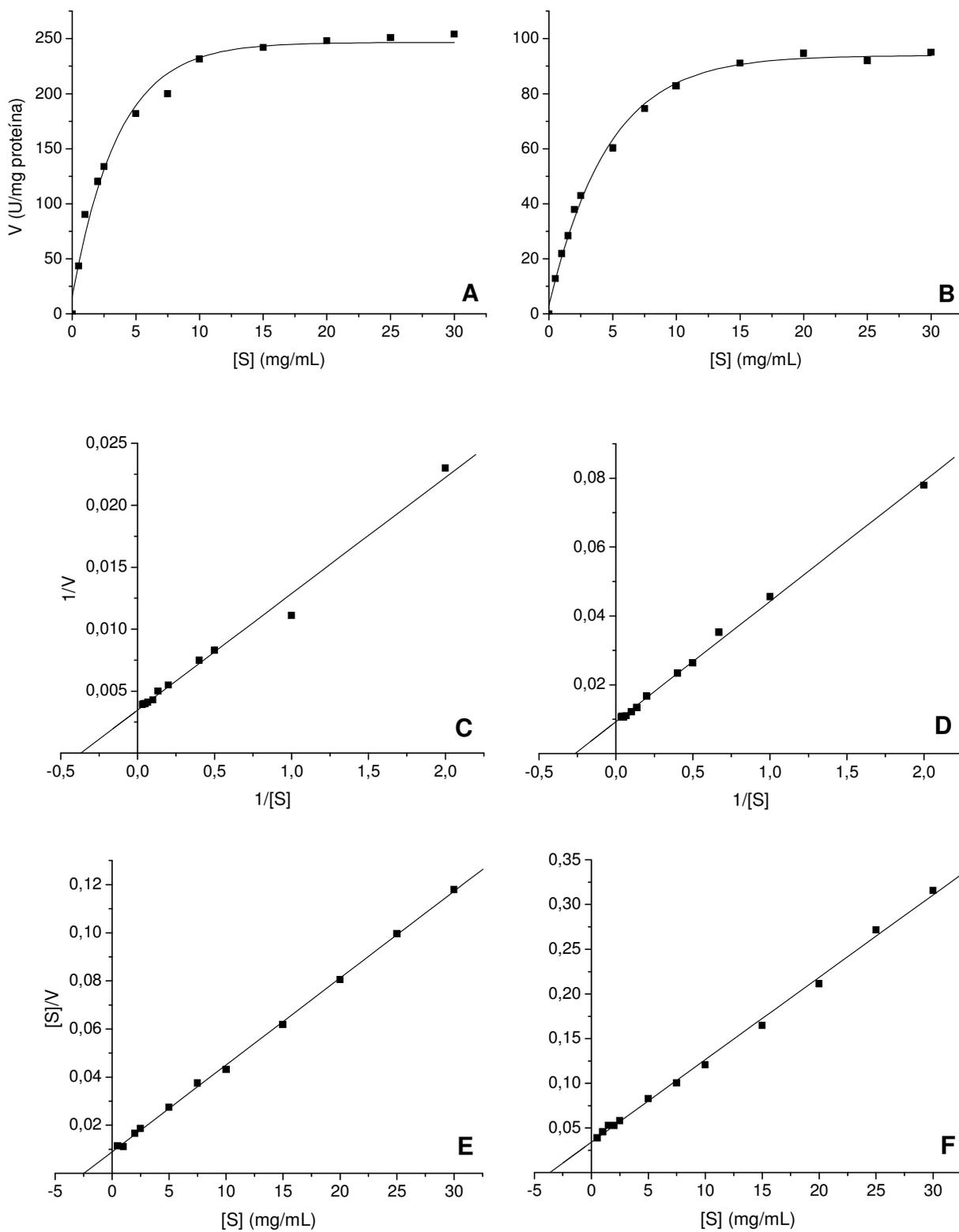


Figura 45. Representação gráfica do K_M (mg/mL) e da $V_{m\acute{a}x}$ (U/mg proteína) das endoxilanasés “xil 1” (A, C, E) e “xil 2” (B, D, F) frente ao substrato xilana birchwood. Michaelis-Menten (A; B), Lineweaver & Burk (C; D), e Hanes (E, F).

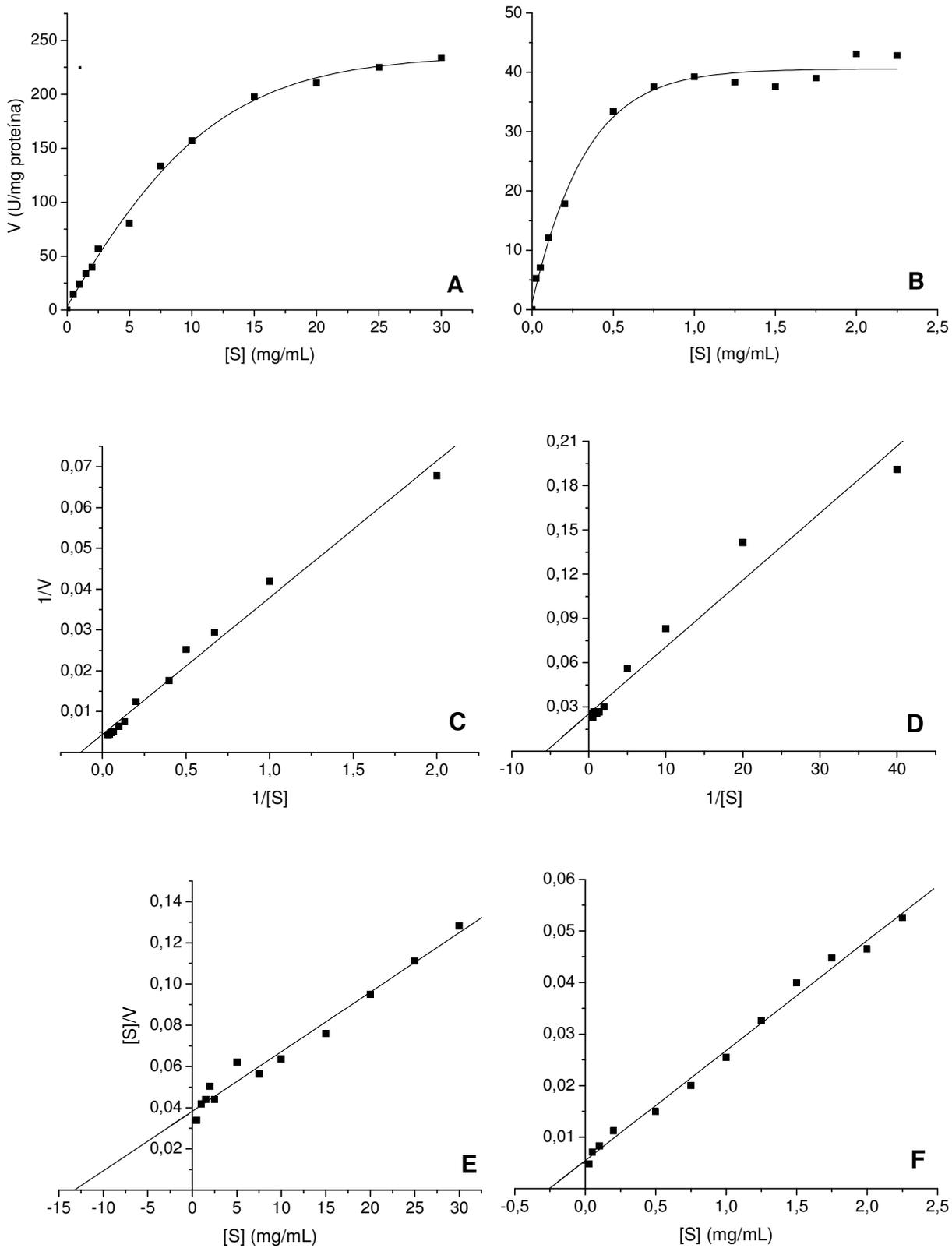
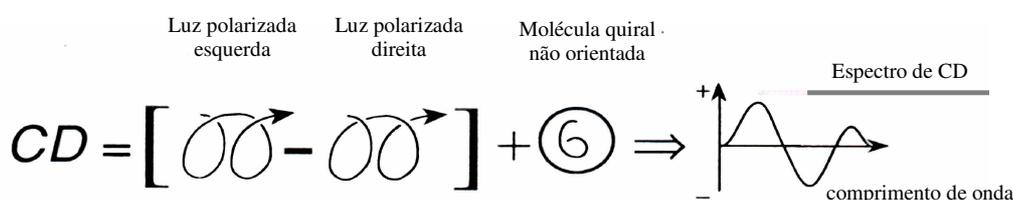


Figura 46. Representação gráfica do K_M (mg/mL) e da $V_{m\acute{a}x}$ (U/mg proteína) da endoxilanase “xil 3” frente o substrato xilana birchwood e da β -xilosidase frente ao substrato *p*NF-xil. Michaelis-Menten (A;B), Lineweaver & Burk (C;D), e Hanes (E;F).

4.5.13 Análise estrutural das endoxilanasas e β -xilosidase purificadas através de dicroísmo circular (CD)

Dicroísmo circular é por definição, a diferença de absorção da luz circularmente polarizada (CPL) à esquerda (A_E) e à direita (A_D). A técnica de CD detecta exatamente a alteração através desta medida de diferença, após a luz passar pela amostra (**Equação 1**). Assim, a espectrometria de Dicroísmo circular permite determinar empiricamente a estrutura protéica e sua conformação através da indução de CD ao esqueleto de amida entre 250 e 180 nm (o UV distante, ou região peptídica do espectro). O sinal de CD é observado em comprimento de onda, onde a amostra absorve radiação, e o sinal pode ser positivo ou negativo de acordo com a quiralidade da molécula na amostra (D ou L) e da transição estudada. Em princípio, o espectro de CD de uma proteína na sua forma nativa de conformação é a soma das porcentagens apropriadas de cada componente do espectro (MICHAEL, 1999).

$$\text{CD} = A_E - A_D \quad (1)$$



Equação 1. Equação e ilustração esquemática do dicroísmo circular. CD: dicroísmo circular; A_E : absorção da luz circularmente polarizada à esquerda; A_D : absorção da luz circularmente polarizada à direita.

As moléculas protéicas apresentam uma estrutura primária que se refere à sequência linear de aminoácidos ligados por suas ligações peptídicas. Esta pode ser dobrada em diversas formas, sendo que as estruturas secundárias e terciárias finais são determinantes da função da proteína. A metodologia de dicroísmo circular é muito utilizada para avaliar a estrutura secundária de macromoléculas biológicas. Com esta técnica é possível detectar mudanças conformacionais na molécula e avaliar as interações com moléculas menores, especialmente àquelas quirais.

Espectros de dicroísmo circular foram realizados para as endoxilanasas purificadas “xil 2” e “xil 3” e para a “ β -xil” de *A. ochraceus*, permitindo a caracterização dos componentes estruturais secundários dessa proteína através da indução de CD. O espectro obtido para a enzima purificada em estudo foi comparado com um espectro de CD de uma proteína padrão com estrutura secundária definida (**Figura 15**). Assim, o perfil obtido para as duas endoxilanasas (**Figura 47 A, B**) mostrou-se característico de proteínas ricas em folha β . Para a β -xilosidase foi observado uma mistura de α -hélice e folha β , devido ao mínimo mais largo (**Figura 47C**).

4.5.14 Sequenciamento N-terminal

O sequenciamento aminoterminal das endoxilanasas purificadas “xil 2” e “xil 3” e da β -xilosidase foi obtido pelo sequenciador de proteínas automatizado da marca Shimadzu (Sistema PPSQ), conforme descrito no item 3.19 de Material e Métodos. A identificação de cada aminoácido da sequência da proteína foi realizada através da comparação do pico obtido para cada ciclo, com padrão de aminoácidos analisado no início de cada sequenciamento. Assim, os fragmentos sequenciados corresponderam a **SPPAX(F)VPVKX(K)** (“xil 2”), **APSLVKVTFFGDNPPPL** (“xil 3”) e **SELFYV** (β -xil).

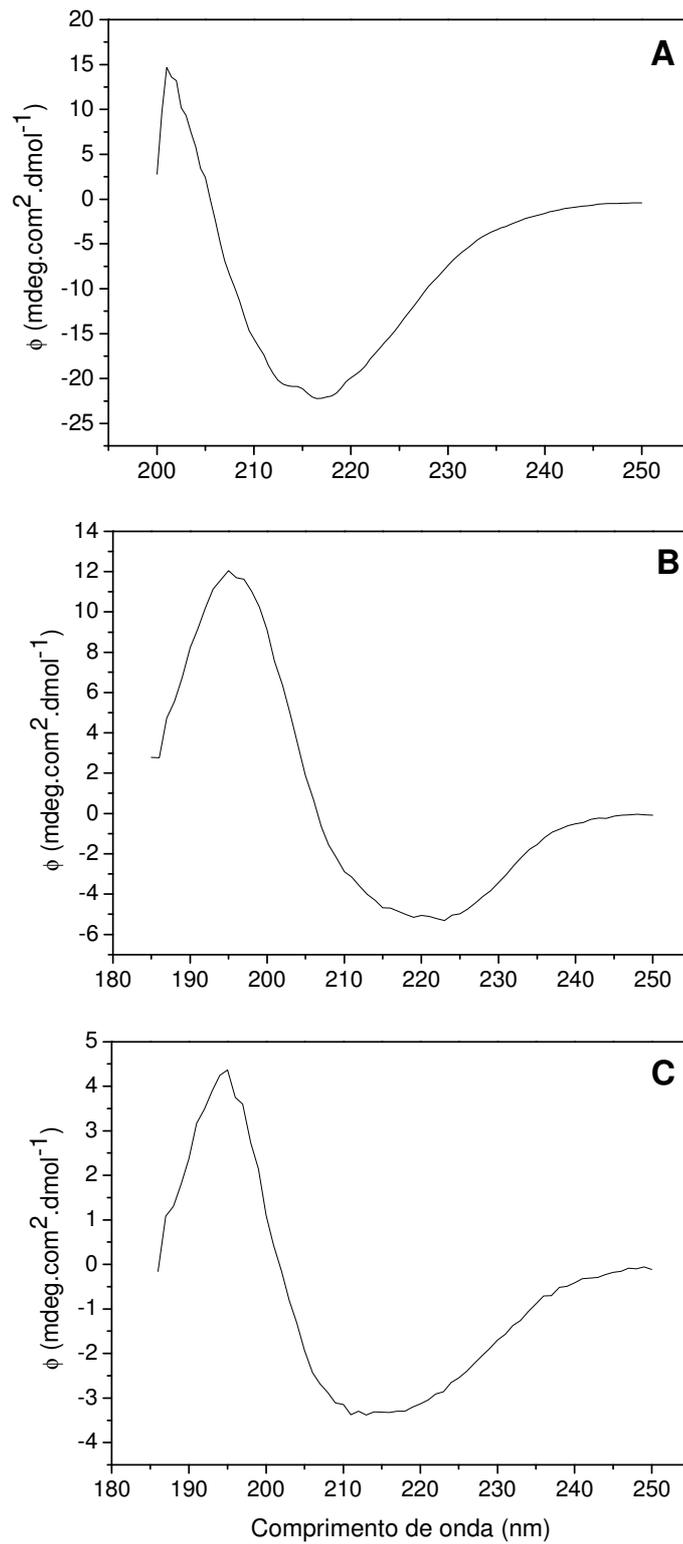


Figura 47. Espectro de dicroísmo circular na região de UV distante das endoxilanases “xil 2” (A) e “xil 3” (B), e da β -xilosidase (C) de *A. ochraceus*.

Essas sequências foram comparadas com informações contidas em bancos de dados, através da utilização de programas encontrados em sites especializados, tal como o BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>), nos quais se verificou que a xilanase “xil 2” apresentou identidade com proteínas hipotéticas de *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus*, *A. clavatus*, e outras espécies fúngicas, como *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium marneffei*, *Talaromyces stipitatus* e *Chaetomium globosum* (**Tabela 18**). Enquanto a “xil 3” apresentou identidade com proteínas hipotéticas de *Aspergillus niger*, *A. nidulans*, *A. terreus* e outras espécies fúngicas. Além disso, a mesma apresentou identidade com acetil xilana esterase de *Aspergillus clavatus* e *Penicillium marneffei*, e precursor de feruloil esterase de *Talaromyces stipitatus* (**Tabela 19**). Em relação ao sequenciamento da β -xilosidase, verificou-se que esta enzima apresentou identidade com proteínas hipotéticas de *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus* e outras espécies fúngicas (**Tabela 20**).

Tabela 18. Análise da sequência (SPPAXFVPVKXXK) da endoxilanase “xil 2” de *A. ochraceus* e comparação com outras proteínas fúngicas.

| Fungos | Proteína | Sequência e posição | Homologia |
|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|------------------|
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | Proteína hipotética conservada | 141 FVPVKAK 147 | 6/7 (85%) |
| <i>Aspergillus terreus</i> | Proteína hipotética conservada | 402 SPPALFV 408 | 6/7 (85%) |
| <i>Aspergillus clavatus</i> | Proteína hipotética conservada | 696 PPASFVP 702 | 6/7 (85%) |
| <i>Aspergillus clavatus</i> | Proteína hipotética conservada | 18 PPPFVPV 25 | 6/8 (75%) |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | Proteína hipotética | 58 PPGIFPVQLK 68 | 6/11 (54%) |
| <i>Penicillium marneffeii</i> | Proteína hipotética conservada | 262 PPAQFVP 268 | 6/7 (85%) |
| <i>Talaromyces stipitatus</i> | Proteína hipotética conservada | 94 PPAEFVP 100 | 6/7 (85%) |
| <i>Talaromyces stipitatus</i> | Proteína hipotética conservada | 233 PPAAFVP 239 | 6/7 (85%) |
| <i>Chaetomium globosum</i> | Proteína hipotética | 681 PPATFAPV 688 | 6/8 (75%) |
| <i>Chaetomium globosum</i> | Proteína hipotética | 1779 PSAFVPVK 1786 | 6/8 (75%) |
| | | 1371 AAFVPV 1376 | 5/6 (83%) |
| <i>Chaetomium globosum</i> | Proteína hipotética | 138 ASFVPVRRK 146 | 6/9 (66%) |

Tabela 19. Análise da sequência (APSLVKVTFFGDNPPL) da endoxilanase “xil 3” de *A. ochraceus* e comparação com outras proteínas fúngicas.

| Fungos | Proteína | Sequência e posição | Homologia |
|-------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> | Proteína hipotética | 77 SLSSVTFF--SPPL 88 | 9/14 (64%) |
| <i>Aspergillus niger</i> | Proteína hipotética | 245 APRLVLATYFGD 256 | 8/12 (66%) |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | Proteína hipotética | 234 APRLVLATYFGD 245 | 8/12 (66%) |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | Proteína hipotética | 516 PSLVSVTF 523 344 YFGGNP 349 | 7/8 (87%) 4/6 (66%) |
| <i>Aspergillus terreus</i> | Proteína hipotética | 454 PTLV-VPFFGDQP 465 | 9/13 (69%) |
| <i>Aspergillus clavatus</i> | Acetil xilana esterase | 35 SLQQVTNFGDNP 46 | 9/12 (75%) |
| <i>Penicillium marneffeii</i> | Acetil xilana esterase | 18 AASLTQVNSFGDNP 31 | 9/14 (64%) |
| <i>Penicillium marneffeii</i> | Proteína hipotética conservada | 513 PTLV-VPFFGD 522 | 8/11 (72%) |
| <i>Talaromyces stipitatus</i> | Precursor feruloil esterase | 18 AASLTQVSNFGDNP 31 | 9/14 (64%) |
| <i>Talaromyces stipitatus</i> | Proteína hipotética | 318 APSLI-VTFF 326 | 8/10 (80%) |
| <i>Chaetomium globosum</i> | Proteína hipotética | 116 APSLTK--FFGLDN 127 | 10/14 (71%) |

Tabela 20. Análise de sequência (SELFYV) da β -xilosidase de *Aspergillus ochraceus* e comparação com outras proteínas fúngicas.

| Fungos | Proteína | Sequência e posição | Homologia |
|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------|
| <i>Aspergillus oryzae</i> | Proteína hipotética | 1067 SELFYV 1072 | 6/6 (100%) |
| | | 652 SELF 655 | 4/4 (100%) |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | Proteína hipotética | 301 ELFYV 305 | 5/5 (100%) |
| | | 449 SELF 452 | 4/4 (100%) |
| <i>Aspergillus niger</i> | Proteína hipotética | 1304 ELFYV 1308 | 5/5 (100%) |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | Proteína hipotética | 1290 ELFYV 1294 | 5/5 (100%) |
| <i>Aspergillus terreus</i> | Proteína hipotética | 92 ELFYV 96 | 5/5 (100%) |
| <i>Penicillium marneffei</i> | Proteína hipotética conservada | 563 S D LFYV 568 | 5/6 (83%) |
| <i>Penicillium marneffei</i> | Proteína hipotética | 129 ELFYV 133 | 5/5 (100%) |
| <i>Talaromyces stipitatus</i> | Proteína hipotética conservada | 404 S Q LFYV 409 | 5/6 (83%) |
| <i>Chaetomium globosum</i> | Proteína hipotética | 112 ELFYV 116 | 5/5 (100%) |
| <i>Chaetomium globosum</i> | Proteína hipotética | 228 ELFYV 232 | 5/5 (100%) |

5. Discussão

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

A seleção de microrganismos produtores de enzimas de interesse comercial constitui uma etapa importante em processos biotecnológicos no qual estas enzimas deverão ser empregadas. Desse modo, há um processo considerável em isolar microrganismos com potencial para a produção dessas enzimas, e conseqüentemente cultivá-los em laboratório. Sabe-se que, cada linhagem de um microrganismo produz um grande número de enzimas, contudo, a quantidade absoluta e relativa dessas enzimas varia bastante de uma espécie para outra bem como entre linhagens de uma mesma espécie.

Portanto, a realização de um “screening” foi de extrema importância para a busca de novos microrganismos que produzissem xilanases com características bioquímicas vantajosas do ponto de vista industrial, sendo possível selecionar vários organismos bons produtores destas enzimas. Alguns dos microrganismos submetidos ao “screening” já haviam sido estudado em nosso laboratório quanto à produção de xilanase, como *A. phoenicis* (RIZZATTI *et al.*, 2001; 2004); *A. caespitosus* (SANDRIM *et al.*, 2005); *A. niveus* (PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2009) e *A. niger* (BETINI *et al.*, 2009), sendo que estes foram incluídos no “screening” apenas como controle, uma vez que eram conhecidos como bons produtores de xilanases. Outros microrganismos apresentaram excelentes atividades xilanolíticas, no entanto, por se tratar de microrganismos bastante descritos na literatura, e/ou patogênicos, descartou-se a possibilidade de trabalhar com estes fungos.

Assim, dois fungos filamentosos foram selecionados – *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus*. Vale ressaltar que *A. ochraceus* já havia sido estudado em nosso

laboratório (BETINI *et al.*, 2009), no entanto, este estudo envolveu a produção de xilanases em fermentação em estado sólido, e como nossos objetivos envolviam a produção e purificação de xilanase e β -xilosidase em fermentação submersa, isto não impediu a seleção deste microrganismo para o estudo, principalmente por ele ser um grande produtor de β -xilosidase extracelular.

A “otimização” das condições de cultivo dos fungos em estudo, considerando a produção de xilanase e β -xilosidase, bem como a determinação da temperatura e pH ótimos de atividade enzimática produzidas por esses fungos, constituíram conhecimentos prévios fundamentais às etapas subsequentes de desenvolvimento desse trabalho. Vários estudos de “otimização” da produção de xilanase têm sido realizados. Nestes, variam-se parâmetros como: tempo e temperatura de cultivo, composição do meio, fonte de carbono e pH (KADOWAKI *et al.*, 1997; DAMASO *et al.*, 2000).

Portanto, inicialmente foi realizado um estudo para a determinação das condições de cultivo a fim de se aperfeiçoar a produção das enzimas do complexo xilanolítico dos microrganismos em estudo. A seleção do meio de cultivo para a produção enzimática constitui uma etapa importante do processo, visto que as exigências nutricionais para o crescimento e desenvolvimento variam de microrganismo para microrganismo.

Em nossos resultados foram verificados que os microrganismos em estudo apresentaram exigências nutricionais diferentes, visto que para *A. terricola* uma maior produção de xilanases foi observada em um meio mais complexo – SR. No entanto, ambos microrganismos apresentaram uma boa síntese enzimática em meios mínimos, como Vogel e Czapeck, o que é muito importante em termos de aplicação industrial devido ao seu menor custo. Além disso, em meios mínimos a quantidade de proteínas induzidas é menor, o que facilita os processos de purificação. A utilização de meios mínimos para a indução de xilanase

também foi descrita por outros autores (COELHO & CARMONA, 2003; RIZZATTI *et al.*, 2004).

Uma análise dos substratos indutores da atividade xilanolítica produzida pelos fungos *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus* também foi realizada, além de uma comparação entre os níveis das atividades xilanásicas e β -xilosidásica. Dentre os carboidratos utilizados como possíveis indutores da atividade do sistema xilanolítico, xilana birchwood e xilana oat spelt foram os substratos mais favoráveis para a produção de xilanase por estes fungos, sendo observados também excelentes níveis de atividade β -xilosidase extracelular, principalmente por *A. ochraceus*. Xilana também foi a melhor fonte indutora de atividade xilanásica produzida por *A. flavus* (MARQUES DE SOUZA *et al.*, 1999), *A. giganteus* (COELHO & CARMONA, 2003) e *A. foetidus* (SHAH & MADAMWAR, 2005).

O fato de a xilana ter sido o melhor substrato indutor, quando comparado com outras fontes celulolíticas foi bastante favorável, uma vez que, substratos ricos em celulose poderiam induzir a síntese de celulasas dificultando a aplicação deste extrato na indústria de papel e celulose. Além disso, com poucas exceções, organismos xilanolíticos são invariavelmente celulolíticos e frequentemente secretam misturas complexas de celulasas e xilanases simultaneamente (BIELY, 1985). Desse modo, celulose, xilana e vários de seus metabólitos são capazes de induzir a síntese de ambas as classes de enzimas em organismos celulolíticos. Fungos celulolíticos, principalmente *Trichoderma sp.*, produzem frequentemente altos níveis de enzimas degradadoras da xilana e celulasas quando cultivados com substratos nativos heterogêneos, contendo celulose e xilana ou somente celulose, mas produzem apenas enzimas xilanolíticas quando crescidos em xilana (COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993). Desse modo, a maioria dos pesquisadores utiliza a xilana como fonte de carbono para a produção de enzimas do complexo xilanolítico.

Tem sido proposto ainda, que os sistemas xilanolíticos e celulolíticos possuem controles regulatórios distintos em alguns fungos filamentosos. Xilanases específicas são produzidas quando os microrganismos são cultivados em xilana, mas celulasas são sintetizadas associadas às xilanases quando o crescimento ocorre em celulose. Isso é possível porque partes do gene da xilanase podem exercer controle na expressão do gene da celulose (FILHO, 1994). No entanto, nenhuma ou pouca atividade xilanásica foi observada no cultivo dos fungos *A. ochraceus* e *A. terricola* com avicel como fonte de carbono.

Os altos níveis de xilanases observados quando xilana foi utilizada como fonte de carbono eram esperados, visto que a xilana forma uma matriz insolúvel que é estruturalmente muito grande para ser transportada para o interior da célula, necessitando de um sinal extracelular para desencadear a produção de enzimas xilanolíticas. Portanto, endoxilanases no meio extracelular degradariam a xilana em xilooligossacarídeos e estes entrariam na célula induzindo a síntese de enzimas do complexo xilanolítico.

Além disso, podem-se observar níveis constitutivos da enzima mesmo nos meios contendo fontes de carbono facilmente metabolizáveis, como glicose e xilose. A repressão por glicose parece ser um fenômeno comum observado na biossíntese de xilanase (KULKARNI *et al.*, 1999). Em *Trichosporon cutaneum* (LIN *et al.*, 1999) e *Humicola grisea* var *thermoidea* (MONTI *et al.*, 1991) foram observados repressão catabólica na utilização de glicose, xilose e arabionose como substrato. No entanto, para os fungos *A. terricola* e *A. ochraceus*, consideráveis níveis xilanolíticos foram observados quando xilose foi utilizada como fonte indutora, sendo que para a produção de β -xilosidase, xilose foi uma das melhores fontes indutoras da produção enzimática, resultado semelhante foi observado por RIZZATTI e colaboradores (2001).

A indução por xilana e xilose foi observada em *Aspergillus sydowii* (GHOSH & NANDA, 1994), *A. terreus* (HRMOVÁ *et al.*, 1989), *A. tubigiensis* (DE GRAAFF *et al.*,

1992) *A. giganteus* (COELHO & CARMONA, 2003) e *A. foetidus* (SHAH & MADAMWAR, 2005). Porém, em *A. nidulans* a xilose não induziu a secreção de xilanases (PIÑAGA *et al.*, 1994), indicando provavelmente que existem mecanismos distintos de produção enzimática no gênero *Aspergillus*. Como revisado por BAJPAI (1997), xilanase fúngica parece ser induzível ou estar sob controle de desrepressão, que inclui produção enzimática em fontes de carbono que são lentamente utilizadas. A indução de xilanase por xilana e xilose também foi observada em outras espécies de microrganismos, como em *Streptomyces sp* (FLORES *et al.*, 1996), *Clostridium absonum* (RANI & NAND, 2000), e *Thermomyces lanuginosus* (DAMASO *et al.*, 2000).

O β -metil-xilosídeo, um análogo da xilobiose, tem se mostrado um bom indutor das enzimas xilanolíticas em vários microrganismos como em *Cryptococcus albidus* (MOROSOLI *et al.*, 1989), *Thermoascus aurantiacus* (GOMES *et al.*, 1994) e *Aspergillus tamarisii* (SIMÃO *et al.*, 1997), sendo que este também foi bastante favorável para a produção de xilanase por *Aspergillus ochraceus*.

Por outro lado, a indução da síntese de xilanase e β -xilosidase em fungos filamentosos também tem sido frequentemente realizada utilizando-se de substratos naturais, como bagaço de cana (PANDEY *et al.*, 2000), sabugo de milho (DAMASO *et al.*, 2000), farelo de trigo (CARMONA *et al.*, 1998), entre outros. A possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais para a produção de enzimas pode reduzir significativamente o custo de produção, no entanto, é importante considerar também que esses resíduos são complexos e, portanto, podem induzir diferentes tipos de proteínas, entre elas celulasas, dificultando a aplicação deste extrato na indústria de papel e celulose, como dito anteriormente, e também nos processos de purificação.

Em *Aspergillus terricola*, verificou-se que o farelo de trigo foi um excelente indutor da atividade xilanásica, produzindo níveis enzimáticos muito próximos àqueles obtidos com

xilana (72% e 87% dos níveis obtidos com xilana birchwood e oat spelt, respectivamente). Farelo de trigo também induziu a produção de altos níveis de xilanases (CARMONA *et al.*, 1997) e β -xilosidase (ANDRADE *et al.*, 2004) em culturas líquidas de *A. versicolor*. Nas culturas de *Aspergillus ochraceus*, microrganismo produtor de altos níveis de atividade β -xilosidase extracelular, esses resíduos agrícolas também foram bastante favoráveis na produção de β -xilosidase, principalmente bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho e farelo de trigo, respectivamente.

No extrato bruto de *A. giganteus* nenhuma atividade desramificadora e β -xilosidásica foram observadas (COELHO & CARMONA, 2003), isto se deve ao fato de as β -xilosidases serem usualmente intracelulares. Comparando a concentração de β -xilosidase presente no extrato de *Talaromyces thermophilus* (GUERFALI *et al.*, 2008) com o de *A. ochraceus*, verificou-se que o microrganismo em estudo produz quantidade muito maior de β -xilosidase, mesmo o fungo *A. terricola* produziu níveis maiores de atividade β -xilosidásica quando comparado com este microrganismo.

Estes resíduos agroindustriais são frequentemente utilizados como excelentes indutores de atividade xilanásica em fermentação em estado sólido (FES), sendo que alguns trabalhos descrevem a produção de xilanases utilizando resíduos lignocelulósicos (FERREIRA *et al.*, 1999; GAWANDE & KAMAT, 1999; SOUZA *et al.*, 2001; KANG *et al.*, 2004; BETINI *et al.*, 2009). Fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais (farelo de trigo e sabugo de milho) também foi testada quanto à produção de xilanase para os fungos *A. terricola* e *A. ochraceus* (dados não mostrados). Embora os níveis enzimáticos obtidos neste tipo de fermentação tenham sido superiores àqueles obtidos em fermentação submersa, a quantidade de proteínas contaminantes em FES foi muito maior, resultando em uma atividade específica inferior àquela observada em fermentação submersa. Além disso, os

altos níveis protéicos dificultam o processo de purificação, e *A. ochraceus* também já havia sido estudado em FES quanto à produção de xilanase (BETINI *et al.*, 2009)

Os tipos de cultivo de microrganismos mais comuns são a fermentação em estado sólido e a submersa, sendo esta última a mais utilizada, fato este ocorrido a partir da Segunda Guerra Mundial onde era necessário agilizar a produção de compostos, principalmente a penicilina (HESSELTINE, 1977). Dessa forma, a partir desse período, as pesquisas se voltaram quase que exclusivamente para esse tipo de fermentação. Entretanto, segundo PANDEY e colaboradores (2000), o uso de fermentação em estado sólido cresceu bastante.

O meio em estado sólido geralmente utiliza resíduos agroindustriais como: farelo de trigo, palha de arroz, sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar (LONSANE & RAMESH, 1990; PANDEY, 1992; BABU & SATYANARAYANA, 1995; FERREIRA *et al.*, 1999) e caracteriza-se pelo crescimento e metabolismo do microrganismo sobre sólidos, na ausência ou quase de água livre flutuante. Fungos filamentosos são, na maioria das vezes, os microrganismos usados neste tipo de fermentação, pois são capazes de crescer sobre materiais sólidos com baixo conteúdo de água (LONSANE & RAMESH, 1990).

Esse sistema possui algumas vantagens, como economia de espaço necessário à fermentação; simplicidade do meio de fermentação; não há necessidade de maquinarias complexas, equipamentos e sistemas de controle; alta produtividade; baixo custo e gasto energético; fácil controle de contaminação devido ao baixo conteúdo de água no sistema. Entretanto, esse sistema possui algumas limitações, tais como: limite de escolha de microrganismos, visto que nem todos são capazes de crescer nessas condições; exaustiva demanda no monitoramento e controle de parâmetros como temperatura, pH, umidade, fluxo de ar, transferência de oxigênio livre, remoção de CO₂ gerado durante a fermentação; e a necessidade de pré-tratamento de certos substratos (RAIMBAULT & ALAZARD, 1980; PANDEY, 1992; BABU & SATYANARAYANA, 1995).

O perfil cinético da atividade xilanásica de *A. terricola* e *A. ochraceus* foi analisado e observou-se que a atividade máxima das xilanases extracelulares foi atingida em culturas com 120 horas (*A. ochraceus*) e 144 horas (*A. terricola*) de incubação, a 30°C, em estufa bacteriológica. COELHO & CARMONA (2003) obtiveram um máximo de atividade para a xilanase de *A. giganteus* em uma cultura com 120 horas de incubação. Xilanases são usualmente expressas no final da fase exponencial e o tempo de cultivo está correlacionado com o meio em consideração (KULKARNI *et al.*, 1999; SHAH & MADAMWAR, 2005). Embora a produção ótima de xilanase tenha ocorrido em uma temperatura baixa, os microrganismos cresceram em temperaturas elevadas (45°C), sugerindo um caráter termotolerante para os microrganismos em estudo.

A adaptação do metabolismo microbiano para funcionar eficientemente em diferentes temperaturas é fascinante. A adaptação térmica não pode ser atribuída a uma única característica e sim a diversas modificações que contribuem de maneira aditiva nesse processo. As bases fisiológicas para os organismos crescerem a altas temperaturas ainda são os aspectos mais intrigantes da termotolerância e da termofilia (SHAPACK *et al.*, 1987). Muitos trabalhos têm sido realizados a fim de se esclarecer os efeitos da temperatura nos componentes celulares de microrganismos, incluindo DNA, RNAm, proteínas, membranas e lipídeos.

A temperatura ótima para produção de xilanases pelo fungo *A. foetidus* também ocorreu a 30°C (SHAH & MADAMWAR, 2005). Enquanto que para *A. niger*, esta foi de 28°C, sendo que a 30°C também foi observado uma boa produção de xilanases, no entanto, nas temperaturas de 25°C e 33°C a atividade diminuiu consideravelmente (YUAN *et al.*, 2005). Crescimento e produção enzimática máximos foram observados a 30°C para *A. flavus* (MARQUES DE SOUZA *et al.*, 1999) e *A. carneus* M34 (FANG *et al.*, 2007).

Vale ressaltar que, embora não tenha sido detectada atividade celulásica, verificou-se a existência de outras enzimas do sistema xilanolítico, como acetil xilana esterásica e L-arabinofuranosidase no extrato extracelular de *A. ochraceus*, sendo que esta última não foi observada em *A. terricola* (dados não-mostrados). Uma explicação para a presença destas enzimas nestes extratos seria a heterogeneidade estrutural da xilana. Essas enzimas são comumente produzidas pelo gênero *Penicilium* (CHÁVEZ *et al.*, 2006) e também pelo gênero *Aspergillus* (FERNÁNDEZ-ESPINAR *et al.*, 1994; CHUNG *et al.*, 2002).

No geral, parâmetros como temperatura, pH, estabilidades química e enzimática são importantes para a aplicação industrial dessas enzimas, por isso o estudo de microrganismos produtores dessas enzimas tem se tornado alvo para muitos pesquisadores. A temperatura e o pH ótimos de reação para as xilanases produzidas pelos fungos *A. terricola* e *A. ochraceus* foram a 60°C e pH 6,5 e 65°C e pH 5,0, respectivamente.

A temperatura e pH ótimos da maioria das xilanases produzidas por fungos e bactérias estão dentro da faixa de 40°C a 60°C e pH 4,0 a 7,0, respectivamente (KULKARNI *et al.*, 1999). Temperatura e pH ótimos da xilanase de *A. flavus* (MARQUES DE SOUZA *et al.*, 1999) corresponderam a 45°C e pH entre 5,0 a 7,0. Xilanase bruta de *A. giganteus* (COELHO & CARMONA, 2003) e *A. versicolor* (CARMONA *et al.*, 1998) foram mais ativas nas temperaturas de 50°C e 55°C, respectivamente, e em pH 6,0; enquanto a xilanase de *A. carneus* M34 apresentou temperatura ótima a 60°C e pH ótimo ácido, em torno de 5,0 (FANG *et al.*, 2007).

Em relação à termoestabilidade, *A. terricola* e *A. ochraceus* produziram xilanases completamente estáveis a 55 e 50°C, respectivamente, por 2 horas, apresentando pelo menos 50% da atividade inicial durante 80 minutos a 60°C – *A. terricola*, e 65 minutos a 55°C – *A. ochraceus*. Vale ressaltar ainda que as xilanases produzidas pelos microrganismos em estudo foram bastante estáveis em toda a faixa de pH (2,5 – 8,0) analisada. Este resultado confirma o

achado de que a maioria das xilanases de origem fúngica é estável sob uma ampla faixa de pH (KULKARNI *et al.*, 1999).

O sistema xilanolítico de *A. flavus* (MARQUES DE SOUZA *et al.*, 1999) foi estável a 45°C por mais de 4 horas, e apresentou uma meia vida a 50 e 60°C de 60 e 18 minutos, respectivamente. A termoestabilidade do complexo enzimático de *A. giganteus* foi relativamente baixa, apresentando um t_{50} de 2 horas a 40°C, 13 minutos a 50°C, e 1 minuto a 60°C (COELHO & CARMONA, 2003). Enquanto a xilanase produzida por *A. carneus* M34 apresentou um t_{50} de 1 hora e 40 minutos a 50°C; 5,7 minutos a 60°C; e 1,5 minuto a 70°C (FANG *et al.*, 2007). Em relação à estabilidade ao pH, da xilanase de *A. carneus* M34, esta foi estável na faixa de pH 3 – 10, apresentando mais de 70% da atividade residual. FANG e colaboradores (2007) sugerem que esta observação é atribuída a outras proteínas extracelulares que estão associadas com a xilanase e que protegem a mesma da desnaturação pelo efeito do pH.

Em relação à atividade β -xilosidásica, verificou-se a presença de altos níveis enzimáticos na cultura de *Aspergillus ochraceus*, assim alguns parâmetros físicos foram determinados. A temperatura e pH ótimos de reação foram observados a 75°C e pH 3,0 - 5,0. A temperatura ótima da atividade β -xilosidásica de *A. ochraceus* foi a mesma das β -xilosidases produzidas pelas linhagens de *A. niger* e *A. brasiliensis* (75°C), enquanto que para *A. japonicus*, a temperatura ótima de reação foi inferior (60°C). β -xilosidases dessas três linhagens fúngicas tiveram a maior atividade enzimática em pH 5,0, sendo que para a linhagem de *A. niger*, a atividade β -xilosidásica em pH 3,0 e 4,0 foi a mesma daquela em pH 5,0. Verificou-se ainda, que para as linhagens de *A. niger* e *A. brasiliensis* a menor atividade foi em pH 6,0, enquanto que a atividade β -xilosidásica produzida por *A. japonicus* em pH 6,0 foi quase tão alta quanto aquela em pH 5,0 (PEDERSEN *et al.*, 2007). Para *A. ochraceus*, em pH 6,0 observa-se um residual de atividade correspondente a 30% da atividade inicial.

Em relação à termoestabilidade, a β -xilosidase extracelular bruta de *A. ochraceus* foi estável até 60°C, por 1 hora (com pelo menos 50% da sua atividade inicial). Em relação à estabilidade ao pH, a mesma foi estável em todos os pHs testados por 1 hora, sendo esta estabilidade igual ou maior que 60%. A termoestabilidade da β -xilosidase de *A. ochraceus* foi maior que àquela observada para *A. japonicus*, onde a atividade residual diminuiu rapidamente acima de 40°C, retendo 61% da atividade original após 1 hora a 50°C, e somente 16% a 60°C.

Em contraste, 99% da atividade β -xilosidásica original foi retida após 1 hora de incubação da cultura de *A. niger* a 60°C; sendo que após 1 hora a 75°C a atividade tinha diminuído para 44% da atividade original. A atividade β -xilosidásica produzida por *A. brasiliensis* reteve 62% da atividade após 1 hora a 60°C, e 38% da atividade após 1 hora a 75°C (PEDERSEN *et al.*, 2007). KISS & KISS (2000) têm reportado que a atividade β -xilosidásica produzida por *A. carbonarius* é completamente perdida após 30 minutos de incubação a 70°C. Portanto, a estabilidade da atividade β -xilosidásica produzidas por *A. ochraceus* foi melhor que a estabilidade das β -xilosidases previamente estudada por algumas linhagens do gênero *Aspergillus* (*A. japonicus* e *A. carbonarius*).

Neste trabalho deu-se maior ênfase à atividade extracelular, visto que em processos industriais a necessidade de lise celular para a obtenção do produto encarece muito o preço final, além disso, os nossos maiores níveis de atividade foram observados no meio extracelular.

A aplicação de celulasas e xilanases começou na década de 80, primeiro em rações animais, seguida pela adição em alimentos e posteriormente em indústria têxtil e de papel. Essas enzimas juntamente com as pectinases, são responsáveis por 20% do mercado mundial (revisto por BHAT, 2000). Atualmente as enzimas são utilizadas em várias aplicações

industriais e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas, tem crescido rapidamente.

A indústria de papel e celulose vem utilizando enzimas do complexo xilanolítico como uma alternativa nos processos de branqueamento, principalmente porque regulamentos ambientais têm restringido o uso de compostos clorídricos neste processo (TECHAPUN *et al.*, 2003). O branqueamento da polpa nada mais é do que a eliminação da lignina residual, responsável pela coloração marrom da polpa. Tratamentos com xilanase tornam a polpa mais permeável e a lignina mais acessível aos produtos químicos, por esta razão, utilizando xilanase no tratamento de pré-branqueamento é possível reduzir até 20% dos químicos (BIM & FRANCO, 2000).

A eficiência do branqueamento da polpa pode ser medida através da determinação de alguns parâmetros, como número kappa, viscosidade e alvura. O número kappa indica a quantidade de lignina residual que permanece na fibra de celulose (DUARTE *et al.*, 2003), e a diminuição no número kappa depois do biobranqueamento indica redução na quantidade de cloro necessária para promover o branqueamento da polpa (RAGHUKUMAR *et al.*, 2004), assim um tratamento eficaz deve diminuir o número kappa determinado. Por outro lado, a viscosidade da polpa refere-se à integridade da fibra de celulose, assim qualquer tratamento realizado, não deve diminuir muito a viscosidade da polpa de celulose.

Xilanase bruta produzida por *A. ochraceus* e *A. terricola* foi utilizada no pré-tratamento da polpa de celulose, e o melhor resultado foi obtido com o extrato de *A. ochraceus*, que causou uma diminuição de 4,3 pontos no número kappa em comparação com o controle. Quando a polpa de celulose foi tratada com xilanase de *A. terricola* foi observada uma diminuição de 1,1 pontos, correspondendo a uma eficiência de deslignificação de 36,4% para *A. ochraceus* e 14,3% para *A. terricola*. Comparando esses resultados com àqueles obtidos com outros microrganismos, podemos observar que o número kappa reduziu somente

0,2 (xil I) ou 1,5 (xil II) pontos para *A. caespitosus* (SANDRIM *et al.*, 2005), contra nenhuma redução para xilanase de *A. oryzae* (CHRISTOV *et al.*, 1999).

Em relação à alvura, houve um ganho de até 3,4 pontos, no caso da xilanase de *A. terricola*, contra 2,4 pontos usando a xilanase de *A. ochraceus*. A viscosidade diminuiu 8,6% quando xilanase de *A. terricola* foi usada, indicando, possivelmente, uma redução da massa molar da hemicelulose, a qual exerce um efeito benéfico nas propriedades do papel (DUARTE *et al.*, 2003), mas com a xilanase de *A. ochraceus* nenhuma diminuição da viscosidade foi detectada confirmando a ausência de celulase. A presença desta enzima no extrato xilanolítico pode interferir com as propriedades da polpa de celulose, o que é uma constante preocupação dos usuários (TECHAPUN *et al.*, 2003; DUARTE *et al.*, 2003; SALLES *et al.*, 2005).

CHRISTOV e colaboradores (1999) descreveram xilanases de *A. oryzae* e *A. viride*, que apresentou um ganho de somente 1,4 pontos na alvura, e não houve redução no número kappa. Em relação à viscosidade, a integridade da fibra de celulose parece que não foi alterada. Quando comparou-se os resultados de *A. ochraceus* com os de *Streptomyces sp.* QG-11-3 verificou-se que a eficiência de deslignificação foi maior nas polpas tratadas com as xilanases de *A. ochraceus*, porém a alvura dessas polpas tratadas com extratos de *A. ochraceus* foi praticamente metade. Em relação à viscosidade, houve uma redução de quase 20%, nas polpas tratadas com extratos de *Streptomyces sp.* QG-11-3 (BEG *et al.*, 2000) indicando que houve hidrólise da fibra.

Em geral, tratamento com xilanase tem mostrado reduzir o requerimento de compostos clorados para branqueamento, enquanto ainda alcança um alto grau de alvura e boas propriedades da polpa. A redução no uso de químicos pode ser traduzida em significativa economia quando altos níveis de dióxido de cloro e peróxido de hidrogênio são usados.

Diminuindo o uso de químicos clorados reduz a formação e liberação de compostos orgânicos clorados nos efluentes e na polpa (BAJPAI, 1999).

A polpa incubada com ambas as preparações enzimáticas brutas mostraram mudanças morfológicas na superfície das fibras de celulose em comparação com o controle. Mudanças morfológicas incluem orifícios (furos), fendas (rachaduras), filamentos e “peeling” (cascas) atribuídas ao tratamento enzimático (PATEL *et al.*, 1993; SALLES *et al.*, 2005). Segundo VIKARI e colaboradores (1996) xilanase poderia agir de duas maneiras: ela pode degradar a xilana nos poros das fibras, aumentando o acesso dos químicos branqueadores na fibra, ou ela pode quebrar as ligações carboidrato-lignina, facilitando a remoção da lignina. Esses resultados poderiam relacionar para uma redução no número kappa, o que indica o conteúdo de lignina residual na polpa (MEDEIROS *et al.*, 2002; SALLES *et al.*, 2005).

Na polpa oxigênio-branqueada de *A. terricola* e *A. ochraceus* visualizou-se uma maior fibrilação quando comparada com o controle, no entanto, a principal mudança morfológica visualizada foi “peeling”. Esta mudança morfológica peculiar da polpa oxigênio-branqueada pode estar correlacionada com parâmetros de branqueamento analisados durante tratamento da polpa com xilanase, assim com eficiência de deslignificação.

Os resultados obtidos com o biobranqueamento da polpa de celulose são de importância industrial se levar em conta que madeiras de angiospermas como *E. grandis* são economicamente importante para vários países que tem uma efetiva participação no mercado mundial de papel.

A utilização de xilana pura, ou de seus derivados de baixa massa molecular, é uma excelente opção para a produção de xilanases, o que vem sendo feito, frequentemente, em pequena escala (HALTRICH *et al.*, 1996). Entretanto, para a produção em escalas maiores, a utilização destes materiais, de elevado custo, torna o processo inviável economicamente. Para solucionar esta questão, a utilização de resíduos agroindustriais e de exploração florestal

como, por exemplo, bagaço de cana-de-açúcar (PALMA *et al.*, 1996 ; SOUZA *et al.*, 1999), sabugo de milho (DAMASO *et al.*, 2000; BAKIR *et al.*, 2001) e farelo de trigo (GOMES *et al.*, 1994 ; RIDDER *et al.*, 1999 ; BAKIR *et al.*, 2001), dentre outros, tem sido a solução mais empregada.

Resíduos agroindustriais são materiais ricos em celulose e hemicelulose, e o alto uso destes substratos para a produção de enzimas de interesse industrial se deve, principalmente, a sua alta disponibilidade associado ao baixo custo, visto que grande parte desses resíduos gerados pelas indústrias não são aproveitados. No entanto, enquanto alguns materiais lignocelulósicos são excelentes indutores da produção enzimática em alguns microrganismos, em outros, esses substratos podem não ser tão viáveis. Geralmente, os substratos lignocelulósicos necessitam de tratamentos prévios para que se tornem mais suscetíveis à ação de microrganismos (ROBERTO *et al.*, 1991; WINKELHAUSEN & KUZMANOVA, 1998).

Portanto, estes resíduos são fontes de xilana e xilooligômeros, podendo ser utilizados, na forma natural, como é o caso dos processos em estado sólido, ou após pré-tratamentos (químicos, físicos ou enzimáticos), que se fazem necessários para sua utilização nos cultivos submersos e, em alguns casos, também nos cultivos em estado sólido (KULKARNI *et al.*, 1999).

Tratamentos de material lignocelulósico (MLC) em meio aquoso (autohidrólise ou tratamento hidrotérmico) sob condições adequadas leva a solubilização de hemiceluloses, recuperando produtos solúveis (principalmente oligossacarídeos) e restando uma fase sólida enriquecida em celulose e lignina (GARROTE *et al.*, 1999; 2007; MOURE *et al.*, 2006). Os sólidos resultantes da autohidrólise podem ser processados para obter uma variedade de produtos comerciais, por exemplo, hidrólise enzimática e posterior fermentação dos hidrolisados (LASSER *et al.*, 2001; RIVAS *et al.*, 2004; MOURE *et al.*, 2006; GARROTE *et al.*, 2007).

Os xilooligossacarídeos contidos no licor (fase líquida) têm aplicações no setor de alimentos e farmacêutico (VÁZQUEZ *et al.*, 2000). Considerado como aditivos alimentares, xilooligossacarídeos tem propriedades pré-bióticas relacionados a modulação do intestino (FOOKS & GIBSON, 2002; RYCROFY *et al.*, 2001; MOURE *et al.*, 2006; TAN *et al.*, 2008).

No entanto, a utilização dessas hemiceluloses (resultantes da autohidrólise de material lignocelulósico) como fonte indutora de enzimas xilanolíticas tem sido pouco descrita. Assim, os resultados obtidos com as fermentações dos fungos *A. terricola* e *A. ochraceus* sugerem uma possível aplicação prática dessas hemiceluloses como substratos indutores da síntese de xilanases, visto que níveis enzimáticos superiores a xilana birchwood foram obtidos com esses licores. O aumento da atividade xilanásica observado foi de cerca de 20%, enquanto que para a β -xilosidase o aumento observado foi de 30% para a β -xilosidase produzida por *A. ochraceus*, e de 50% a 90% para a β -xilosidase *A. terricola* – microrganismo que secreta baixos níveis de β -xilosidase para o meio de cultura quando cultivado em xilana ou farelo de trigo.

Farelo de trigo e sabugo de milho são resíduos agrícolas que são frequentemente incluídos no meio de cultura dos microrganismos para a produção de xilanases, sendo caracterizados dependendo das condições climáticas e agrotécnicas (TECHAPUN *et al.*, 2003). Neste sentido, farelo de trigo é um subproduto do processamento da farinha de trigo constituído por 15 – 20% do peso do grão, contendo de 20 – 30% de arabinoxilana; enquanto o sabugo de milho não varia muito em composição química, exceto para o conteúdo de amido (HESPELL, 1998).

GAWANDE & KAMAT (1999) determinaram os constituintes químicos presentes em vários substratos lignocelulósicos, incluindo o farelo de trigo, utilizados para a produção de xilanases pelos fungos *A. niger* e *A. terreus*. O farelo de trigo foi composto por cerca de 30%

de celulose, 27,2% de hemicelulose, 20,8% de lignina, e 7,5% de extrativos. No entanto, como já comentado, alguns fatores ambientais, como clima e solo, podem influenciar na composição química desses resíduos, o que, por exemplo, justifica os baixos níveis xilanolíticos observados quando no uso de sabugo de milho da região de Ribeirão Preto – SP (Brasil), comparado aos altos níveis observados com o sabugo de milho da região de Braga (Portugal).

NABARLATZ e colaboradores (2007) também determinaram o conteúdo de xilana em vários resíduos lignocelulósicos, entre eles palha de trigo e sabugo de milho, coletados no nordeste da Espanha. Este conteúdo foi estimado a partir da quantidade de xilose, arabinose e grupos acetil, e foram de 36,8% para sabugo de milho e 25,2% para palha de trigo, mostrando que a sua ocorrência também depende da planta fonte.

A xilana é constituída de frações que se decompõem a xilooligossacarídeos de alto peso molecular com diferentes velocidades (“fast-reacting xylan” e “slow-reacting xylan”). Quando a degradação hidrolítica procede, os xilooligossacarídeos de alto peso molecular são convertidos em oligômeros de baixo peso molecular, xilose e furfural em reações subsequentes. Para alguns materiais brutos, furfural pode ser diretamente produzido a partir de xilooligossacarídeos de baixo peso molecular, e furfural pode dar produtos de degradação (GARROTE *et al.*, 2002; PARAJÓ *et al.*, 2004). Similarmente, 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) é formado a partir da degradação de hexoses (ULBRICHT *et al.*, 1984).

Portanto, a bioconversão dos hidrolisados oriundos da fração hemicelulósica dos materiais lignocelulósicos em xilanase e β -xilosidase é dependente, não apenas da capacidade produtiva do microrganismo, mas também de sua tolerância a efeitos inibitórios causados por diversos compostos tóxicos presentes nestes hidrolisados. Tais compostos tóxicos podem ser divididos em quatro grupos: (a) produtos de degradação dos açúcares incluindo o furfural e o hidroxiacetilfurfural (HMF); (b) produtos de degradação da lignina, incluindo uma variedade

de compostos aromáticos; (c) substâncias liberadas da estrutura lignocelulósica durante o processo hidrolítico, como ácido acético e extrativos da madeira (resinas ácidas, ácidos tanínicos e terpenos); (d) metais provenientes da corrosão dos equipamentos de hidrólise, em particular os íons ferro, cromo, níquel e cobre (OLSSON & HAHN-HAGERDAL, 1996).

De acordo com vários autores, concentrações acima de 1 g/L de HMF, são reportadas como sendo inibitórias ao metabolismo microbiano (SANCHEZ & BAUTISTA, 1988; FELIPE *et al.*, 1993). TAHERZADEH e colaboradores (2000) reportaram que o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em meio sintético foi inibido em 70% quando em presença de HMF 4 g/L, e em 89% quando em presença de furfural 4 g/L. Porém, em presença de furfural (2 g/L) e HMF (2 g/L), o crescimento deste microrganismo foi inibido completamente. Estes resultados sugerem efeito sinérgico de inibição destes dois compostos.

Neste contexto, vale ressaltar que as β -xilosidase produzidas por *A. terricola* e *A. ochraceus* apresentaram características muito diferentes, principalmente quando os microrganismos foram cultivados com farelo de trigo e licor de palha de trigo, visto que a maior produção enzimática de *A. terricola* ocorreu utilizando 100% dos licores de 10 e 30 minutos de autohidrólise, sendo esta produção observada em períodos mais tardios. A produção da β -xilosidase de *A. ochraceus* ocorreu em períodos de cultivo iniciais, sendo que praticamente não houve produção enzimática quando o microrganismo foi cultivado utilizando somente o licor como fonte de carbono. Este fato pode ser explicado pela provável presença de furfural, formado durante o processo de autohidrólise, visto que o mesmo é tóxico para os microrganismos afetando significativamente o seu crescimento, reduzindo o metabolismo de açúcares e a concentração final de enzimas. Portanto, *A. ochraceus* apresentou uma maior sensibilidade a esses compostos.

Em relação às endoxilanasas de ambos os microrganismos, estas foram sintetizadas principalmente quando os microrganismos foram cultivados com a mistura de farelo de trigo e

licor de palha de trigo, ou sabugo de milho e o seu respectivo licor, nos períodos de cultivo iniciais, principalmente para o fungo *A. ochraceus*. Estes resultados eram esperados, visto que farelo de trigo e sabugo de milho são substratos complexos (polissacarídeos), o que induz a síntese de endoxilanas. Já as β -xilosidases, estas apresentam maior afinidade por dissacarídeos, os quais são formados pela ação das endoxilanas e pelo processo de autohidrólise. Assim, quanto maior o tempo de autohidrólise, maior a quantidade de sacarídeos curtos disponíveis, podendo levar a formação de furfural.

Portanto, a baixa produção enzimática, ou até mesmo a ausência desta produção observada em *A. ochraceus* e *A. terricola* quando os licores com 50 minutos de autohidrólise foram utilizados como substrato pode ser devida a formação de furfural. Portanto, controlando a temperatura e o tempo de reação é possível influenciar as características dos xilooligossacarídeos, tal como o conteúdo acetil e a distribuição da massa molar (NABARLATZ *et al.*, 2007).

Um estudo inicial em relação ao escalonamento da produção enzimática, utilizando biorreatores STR (Stirred Tank Reactor) e do tipo Air-lift foi realizado na Universidade do Minho (Portugal). Estes foram de extrema importância para um melhor entendimento do processo de produção em larga escala e o tempo de demanda do mesmo.

Na literatura, existem poucos trabalhos quanto à produção de xilanas em biorreatores, no entanto, o trabalho proposto por SIEDENBERG e colaboradores (1997), o qual descreve a produção de xilanas em biorreatores por *A. awamori* utilizando farelo de trigo como substrato, serviu como base para iniciar esta parte do projeto, principalmente em relação ao reator STR (Stirred Tank Reactor), no que diz respeito a parâmetros como velocidade de agitação, taxa de aeração e pré-cultivo. Este trabalho (SIEDENBERG *et al.*, 1997) foi muito importante, visto que descreve a produção da mesma enzima em estudo –

xilanases, e utiliza a mesma fonte de carbono – farelo de trigo, e por se tratar do estudo com um microrganismo do mesmo gênero – *Aspergillus*.

Assim, a velocidade de 300 rpm e a taxa de aeração de 1vvm foram fixadas como proposto por SIEDENBERG e colaboradores (1997). Além disso, observou-se que velocidades de agitação inferiores a 300 rpm não foram suficientes para homogeneizar o meio, ficando uma fração do farelo de trigo precipitada no fundo do biorreator. Vale ressaltar que, em velocidade de agitação baixa as bolhas de ar não são quebradas, tendendo a subir direto para a superfície. Além disso, essas bolhas acumulam-se no eixo do agitador, coalescendo e diminuindo a transferência de oxigênio. Por outro lado, em altas velocidades observa-se um aumento das forças de cisalhamento.

A ausência de aeração foi limitante para a produção de xilanases por ambos os microrganismos. No entanto, na presença de aeração em STR, carregaram as partículas de farelo de trigo para a superfície da parede do reator juntamente com as bolhas de ar, ficando a partir deste momento sem contato com o meio de fermentação e por consequência sem contato com o microrganismo, ressaltando a necessidade de um pré-tratamento desses materiais lignocelulósicos para solubilização do substrato.

Supondo que outros fatores poderiam estar influenciando na produção xilanolítica do fungo *A. terricola*, foi realizada uma fermentação na ausência de aeração, porém com a realização de um pré-cultivo. Verificou-se que este tipo de cultivo foi mais favorável em relação à fermentação com o inóculo direto dos esporos. Sistemas de pré-cultivo têm sido descrito por vários autores quando objetiva-se a produção enzimática em biorreatores (KIM *et al.*, 1997; SIEDENBERG *et al.*, 1997; REDDY *et al.*, 2002; COUTO *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2006; CHIPETA *et al.*, 2008).

Comparando ainda as fermentações do fungo *A. terricola* no STR e no Air-lift, verificou-se que a produção xilanolítica no biorreator Air-lift foi maior. A principal diferença

entre esses dois reatores está no sistema de hélices presentes no reator STR, o que aumentam as forças de cisalhamento, e conseqüentemente o stress fúngico. Enquanto no reator Air-lift a única agitação do meio fermentável ocorre pela circulação do ar que é injetado, dividindo-se em duas regiões de escoamento, sendo uma direcionada para cima e outra para baixo. Estes canais ou regiões possibilitam a circulação de líquido em grande escala ao redor do corpo do reator deixando-o homogêneo.

Como relatado, fica claro que um conjunto de fatores influencia a produção dessas enzimas e que estudos mais detalhados devem ser realizados, visando não somente a “otimização” do escalonamento enzimático como também um melhor conhecimento das exigências e limitações dos microrganismos em estudo.

Durante as últimas décadas, xilanases têm atraído considerável interesse em diferentes pesquisas devido sua potencial aplicação industrial. Portanto, o baixo custo do processo para a obtenção desses substratos e a alta produção de enzimas xilanolíticas, torna este estudo, envolvendo produção de xilanases com substratos viáveis economicamente bastante atrativo no setor biotecnológico.

Para os propósitos de purificação foi selecionado o fungo *Aspergillus ochraceus*, principalmente devido aos altos níveis de β -xilosidase secretada por este microrganismo. Vale ressaltar que as β -xilosidases são frequentemente intracelulares, mas podem estar associadas à membrana em alguns casos (KULKARNI, 1999). Para tal propósito foi realizada uma fermentação submersa em dois-estágios visando obter maiores níveis enzimáticos, principalmente em termos de atividade específica. Verificou-se que, as melhores condições para a indução e secreção de xilanases e β -xilosidases ocorreram após os microrganismos terem sido cultivados no meio de crescimento (SR – com glicose 1% como fonte de carbono) e transferidos para o meio de indução Czapeck para o fungo *A. ochraceus*, com xilana oat spelt 0,75% como fonte de carbono, na condição de agitação a 100 rpm por 72 horas, a 30°C.

Alguns microrganismos são capazes de produzir mais de um tipo de xilanase. A produção de um sistema enzimático pelo microrganismo, apresentando cada enzima uma função especializada é uma estratégia usada pelo organismo para se obter uma hidrólise superior da xilana (WONG *et al.*, 1988).

No entanto, para que as indústrias possam utilizar as enzimas isoladas de microrganismos, em alguns casos, elas devem antes passar por processos de purificação. Além disso, o processo de purificação das enzimas é um pré-requisito necessário para um completo entendimento de sua natureza e mecanismo de ação (JAMES & LEE, 1997). As técnicas mais comuns utilizadas para o processo de purificação são cromatografias de troca-iônica e filtração em gel, as quais são normalmente combinadas (AMIRUL *et al.*, 1996; BOLTON *et al.*, 1997; SILVA & PERALTA, 1998; MAMO & GESSESSE, 1999). Essas técnicas têm sido utilizadas para separar múltiplas formas de xilanases em *Trichoderma koningii* G-39 (HUANG *et al.*, 1991).

Para os processos de purificação das endoxilanase e β -xilosidase produzidas por *A. ochraceus*, essas técnicas foram muito eficientes, uma vez que se obteve êxito na purificação das endoxilanases “xil 2” e “xil 3” e da β -xilosidase, com as colunas cromatográficas DEAE-celulose (troca-iônica), Biogel P-60 e Sephadex G-100 (filtração em gel). No entanto, vale ressaltar que outras colunas cromatográficas foram utilizadas até que obtivesse sucesso com a purificação dessas enzimas, tais como CM-celulose (troca-iônica) e Concanavalina A-Sepharose (afinidade). No caso desta última, embora a sua utilização tenha resultado em uma β -xilosidase pura, a alta concentração do gradiente de metil- α -D-manopiranosídeo (1,5 M) necessária para eluir a enzima (que interagiu com a resina), assim como o alto custo deste gradiente e a dificuldade de retirar esse açúcar da amostra tornou inviável este processo de purificação.

Os processos de purificação das xilanases extracelulares de *Aspergillus ochraceus* resultaram na detecção de três formas endoxilanásicas e uma β -xilosidásica, sendo que as endoxilanases purificadas apresentaram em torno de 5 a 10% de recuperação e um fator de purificação de 9 a 13 vezes, enquanto a β -xilosidase purificada apresentou aproximadamente 5% de recuperação e um fator de purificação de 14 vezes.

Os baixos valores de recuperação, obtidos para as formas xilanolíticas de *A. ochraceus*, provavelmente foram devido a presença de outras atividades degradando xilana determinadas durante as etapas de purificação. Visto que essas enzimas agem sinergicamente para a completa hidrólise da xilana, esses valores foram provavelmente subestimados. Este fenômeno é freqüentemente descrito durante a purificação de enzimas produzidas por fungos que degradam a xilana (GÓMEZ DE SEGURA & FEVRE, 1993; FILHO *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 1999; LUCENA-NETO & FILHO, 2004).

A ocorrência de múltiplas xilanases em um microrganismo nos induz imediatamente a elaborar questões envolvendo a função e a origem de cada isoenzima. Diferenças nas propriedades bioquímicas, como por exemplo, especificidade ao substrato, pH e temperatura ótimos, são requeridas para uma ampla degradação do substrato, uma vez que na natureza existe uma variedade estrutural na composição das xilanas (COUGHLAN *et al.*, 1993). Assim, a produção de um sistema xilanolítico multienzimático pode ser uma estratégia do microrganismo, o que lhe confere vantagem adaptativa (BEG *et al.*, 2001).

A multiplicidade das xilanases pode ser atribuída por diversos fatores, como diferenças no processamento de RNAm, proteólise parcial ou ainda diferenças no grau de amidação e glicosilação, auto-agregação, ou agregados com polissacarídeos (WONG *et al.*, 1988; COUGHLAN *et al.*, 1993; WONG & SADDLER, 1993). 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, 1988).

Produção de xilanases múltiplas tem sido relatada em diversos microrganismos (WONG *et al.*, 1988; COUGHLAN *et al.*, 1993; BEG *et al.*, 2001). Dentre eles, algumas espécies de *Aspergillus* são produtoras de duas a três formas de xilanases, como por exemplo, *A. kawachii* (ITO *et al.*, 1992), *A. awamori* (KORMELINK *et al.*, 1993), *A. nidulans* (FERNÁNDEZ-ESPINAR *et al.*, 1994), *A. aculeatus* (FUGIMOTO *et al.*, 1995), *A. sojae* (KIMURA *et al.*, 1995), *A. fumigatus* (SILVA *et al.*, 1999; LENARTOVICZ *et al.*, 2002), *A. giganteus* (FIALHO & CARMONA, 2004) e *A. versicolor* (CARMONA *et al.*, 2005). Outras espécies de microrganismos possuem mais de dez formas de xilanases (BIELY, 1985; COUGHLAN *et al.*, 1993; BADHAN *et al.*, 2004).

As multiformas encontradas nos organismos em estudo poderiam ser exportadas individualmente ou se comportariam como um complexo glicoprotéico exportado como uma única entidade com atividade xilanásica. Complexos multienzimáticos e multifuncionais encontrados na superfície de diversos microrganismos são denominados de xilanossomos (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997; BEG *et al.*, 2001). Estes complexos muitas vezes apresentam atividade celulásica e têm um importante papel na degradação de hemicelulose.

Estimativa da massa molecular das endoxilanase “xil 2” e “xil 3”, através SDS-PAGE, foram calculadas em 25 e 33 kDa, respectivamente, sendo que a endoxilanase – “xil 1”, parcialmente purificada, apresentou massa molecular calculada em 28 kDa ou 39 kDa, visto que as duas bandas protéicas observadas neste pico podem ser duas endoxilanases ou uma endoxilanase e uma proteína contaminante. Xilanases de baixa massa molecular podem ser úteis no branqueamento da polpa, visto que enzimas menores podem penetrar mais facilmente na estrutura da parede da fibra e alterar mais eficientemente as propriedades da polpa (PATEL *et al.*, 1993; FILHO, 1998; SALLES *et al.*, 2000).

Massas moleculares próximas foram calculadas para as xilanases de *A. ficuum* AF-98 – 35kDa (FENGXIA *et al.*, 2008), *Aspergillus cf. niger* BCC14405 – 21kDa (KRISANA *et al.*, 2005), *Thermomyces lanuginosus*-SSBP – 23,6 kDa (LIN *et al.*, 1999); *Acrophialophora nainiana* – 22,165 kDa (SALLES *et al.*, 2000); *H. grisea* var. *thermoidea* – 29 kDa (LUCENA-NETO & FILHO, 2004) e *Penicillium citrinum* – 25 kDa (DUTTA *et al.*, 2007).

As xilanases podem ser classificadas em duas famílias maiores de glicosil hidrolases: F/10 e G/11. As xilanases da família G/11 não mostram atividade celulásica e são enzimas de massa molecular baixa (TORRONEN & ROUVINEN, 1997; SALLES *et al.*, 2000). Assim, a baixa massa molecular encontrada para as xilanases de *A. ochraceus* e a ausência de celulases nos extratos enzimáticos deste fungo sugerem que as xilanases de *A. ochraceus* pertencem à família G/11. Além disso, os estudos de dicroísmo circular da “xil 2” e “xil 3” confirmaram tratar-se de duas proteínas ricas em folha β , confirmando a hipótese acima descrita, como proposto por COLLINS e colaboradores (2005).

A massa molecular (SDS-PAGE) da β -xilosidase de *A. ochraceus* foi calculada em 137 kDa. A maioria das β -xilosidases purificadas exibem massa molecular acima de 100 kDa (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997), embora algumas apresentam massas moleculares menores (ALMEIDA *et al.*, 1995; ZANOELO *et al.*, 2004). β -xilosidases I e II de *Aspergillus pulverulentus* apresentaram massas moleculares de 180 e 190 kDa, respectivamente (SULISTYO *et al.*, 1995); β -xilosidase de *A. nidulans* também apresentou massa molecular de 180 kDa (KUMAR & RAMÓN, 1996). Enquanto as β -xilosidases de *A. phoenicis* (RIZZATTI *et al.*, 2001) e *A. awamori* (KORMELINK *et al.*, 1993) as massas moleculares foram calculadas em 132 e 110 kDa, respectivamente.

O carácter endo da “xil 1”, “xil 2” e “xil 3”, assim como o carácter exo da β -xilosidase de *A. ochraceus* foi confirmado por cromatografia dos produtos de hidrólise (TLC), no qual as endoxilanases liberaram, principalmente, xilooligossacarídeos de diversos comprimentos e

xilobiose, no caso da xil 2, a partir da xilana. Traços de xilobiose parecem ser formados pela “xil 3” nos períodos de hidrólise mais longos, no entanto os principais produtos formados por esta enzima são xilotriose e xilotetraose.

A β -xilosidase liberou somente xilose a partir da xilana, no entanto, foi possível analisar mais detalhadamente o modo de hidrólise desta β -xilosidase quando se utilizou como substrato, os xilooligossacarídeos formados pela ação da “xil 2”, e verificou-se que esta β -xilosidase apresenta uma maior afinidade por sacarídeos maiores, uma vez que a concentração de xilooligossacarídeos maiores diminuiu, enquanto a concentração de xilooligossacarídeos menores e xilose aumentaram, além disso, observou-se que a concentração dos açúcares maiores que não migram na TLC diminuiu com o tempo de hidrólise, confirmando a afinidade desta β -xilosidase por moléculas maiores.

Para a xilanase purificada de *T. lanuginosus*-SSBP, nenhum nível de xilose detectável pôde ser medido durante as primeiras 6 horas, no entanto, após 24 horas de incubação quantidades significantes de compostos de baixa massa molecular, xilobiose e traços de xilose foram liberados a partir de xilana birchwood (LIN *et al.*, 1999). Os produtos de hidrólise predominantes da xilana birchwood pela xilanase II de *A. fumigatus* Fresenius foram na faixa de xilobiose a xilohexaose, sendo que a enzima também não foi capaz de liberar xilose da molécula de xilana (SILVA *et al.*, 1999). ZANOELO e colaboradores (2004) observaram que a β -xilosidase de *Scytalium thermophilum* hidrolisou xilobiose, xilotriose e xilotetraose.

O efeito da temperatura numa reação enzimática é observado, inicialmente, através do aumento da velocidade de formação do produto, decorrente da interação enzima-substrato. Entretanto, há uma temperatura limite para cada enzima em particular e acima da qual se observa, gradativamente, a desnaturação protéica pelo calor. A temperatura em que os níveis enzimáticos são máximos, muitas vezes é denominada “temperatura ótima”. No entanto, o “ótimo” aparente de temperatura é o resultado de dois processos: o aumento usual na

velocidade de reação com a temperatura, e o aumento da desnaturação térmica da enzima acima de uma temperatura crítica (LEHNINGER *et al.*, 1995).

A temperatura ótima das xilanases “xil 1”, “xil 2” e “xil 3” de *Aspergillus ochraceus* foram semelhante às aquelas de muitos fungos mesofílicos e termofílicos, o qual são reportados na faixa de 40°C a 60°C (MONTI *et al.*, 1991; SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997; CARMONA *et al.*, 1998). Temperatura ótima (60°C) semelhante às aquelas reportada para as xilanases de *A. ochraceus* foi encontrada para a endoxilanase de *Trichoderma koingii* G-39 (HUANG *et al.*, 1991). Outros microrganismos apresentaram temperaturas ótimas de reação inferiores, como a forma I da endoxilanase de *A. versicolor* (CARMONA *et al.*, 1998), a endoxilanase II de *A. fumigatus* (SILVA *et al.*, 1999) e a Xyn II de *A. nainiana* (SALLES *et al.*, 2000) que foram mais ativas a 55°C, e a endoxilanase purificada de *A. terreus* (GHANEM *et al.*, 2000) e *Penicillium citrinum* (DUTTA *et al.*, 2007) que apresentaram temperatura ótima à 50°C.

Em relação à temperatura ótima de reação da β -xilosidase de *A. ochraceus*, esta correspondeu a 70°C. β -xilosidase de *Scytalidium thermophilum* apresentou temperatura ótima inferior, 60°C (ZANOELO *et al.*, 2004). O mesmo foi observado para as β -xilosidases I e II de *Aspergillus pulverulentus* (SULISTYO *et al.*, 1995). β -xilosidase de *A. nidulans* (KUMAR & RAMÓN, 1996) e *Talaromyces thermophilus* (GUERFALI *et al.*, 2008) também apresentaram temperatura ótima inferiores – 50°C. A β -xilosidase de *A. awamori* (KORMELINK *et al.*, 1993) e *A. phoenicis* (RIZZATTI *et al.*, 2001) apresentaram a mesma temperatura ótima da β -xilosidase de *A. ochraceus*.

O pH ótimo das endoxilanases “xil 1” e “xil 2” de *A. ochraceus* foi 6,0. O mesmo pH ótimo foi descrito para a endoxilanase de *A. versicolor* (CARMONA *et al.*, 1998). A endoxilanases de *A. fumigatus* Fresenius (SILVA *et al.*, 1999) e *Trichoderma koingii* G-39 (HUANG *et al.*, 1991) apresentaram pH ótimos ao redor de 5,5, este pH ótimo foi observado

para a “xil 3” de *A. ochraceus*; enquanto as três endoxilanasas purificadas de *Chaetomium cellulolyticum* tiveram pH ótimos na faixa de pH de 6,0 – 7,0 (BARAZNENOK *et al.*, 1999), e *A. terreus* em pH 7,0 (GHANEM *et al.*, 2000). A endoxilanasase de *Penicillium citrinum* apresentou um pH ótimo alcalino em 8,5 (DUTTA *et al.*, 2007). O pH ótimo de reação da β -xilosidase foi 4,5. Em *Scytalidium thermophilum* foi observado um pH ótimo na faixa de 5,0-6,0 para a β -xilosidase (ZANOELO *et al.*, 2004) e para *A. nidulans* em pH 5,0 (KUMAR & RAMÓN, 1996). β -xilosidasas I e II de *Aspergillus pulverulentus* apresentaram pHs ótimos na faixa ácida 2,5 – 3,5 e 4,0 – 5,0, respectivamente (SULISTYO *et al.*, 1995). Enquanto a β -xilosidase de *A. phoenicis* apresentou pH ótimo na faixa de 4,0-4,5 (RIZZATTI *et al.*, 2001).

As enzimas, em geral, apresentam um pH ótimo ou uma região de pH ótimo e de temperatura na qual sua atividade é máxima. Cadeias laterais de alguns aminoácidos agem como ácidos ou bases fracas, realizando funções críticas no sítio ativo da enzima, assim, mudanças de ionização destas cadeias causam mudanças na atividade enzimática. Da mesma maneira, a temperatura pode modificar a estrutura protéica para uma conformação na qual seu sítio ativo permaneça mais exposto, melhorando sua atividade enzimática.

Muitos processos industriais ocorrem em temperaturas elevadas, portanto, o uso de enzimas termoestáveis é de grande interesse para aplicação industrial. Estudo da estabilidade térmica das endoxilanasas de *A. ochraceus* revelou que a “xil 1” foi estável a 50°C por 30 minutos, sendo que a 55°C, a enzima apresentou um t_{50} de 20 minutos. A “xil 2” foi estável a 50°C e 55°C por 1 hora, sendo que a 60°C, esta apresentou um t_{50} de aproximadamente 25 minutos, demonstrando ser uma enzima mais termoestável que a “xil 1”. No entanto, a “xil 3” foi a enzima purificada de *A. ochraceus* com maior estabilidade térmica, esta foi estável até 60°C por 1 hora. Verificou-se que a “xil 3” de *A. ochraceus* apresentou um elevado nível de estabilidade térmica quando comparada com a xilanasase purificada de *A. versicolor*, o qual demonstrou uma boa estabilidade até 60 minutos a 50°C, sendo que a 60°C sua meia-vida foi

cerca de 17 minutos (CARMONA *et al.*, 1998). A xilanase de *A. terreus* foi estável até 50°C, retendo 48% da sua atividade a 60°C por 30 minutos (GHANEM *et al.*, 2000).

A β -xilosidase de *A. ochraceus* foi completamente estável até 70°C por 1 hora. Estes resultados foram favoráveis quando comparados com a β -xilosidase de *A. pulverulentus* que foi estável somente até 50°C (SULISTYO *et al.*, 1995) e a β -xilosidase de *A. phoenicis* que foi estável até 60°C, sendo que 65°C apresentou um t_{50} de 20 minutos (RIZZATTI *et al.*, 2001). A β -xilosidase de *Talaromyces thermophilus* apresentou um t_{50} de 2 horas a 55°C (GUERFALI *et al.*, 2008).

Em relação à estabilidade ao pH dessas enzimas, observou-se que a “xil 1” e a “xil 3” apresentaram estabilidade em toda a faixa de pH analisada (3,0 – 8,0) mantendo pelo menos 50% da sua atividade inicial, enquanto a “xil 2” foi estável na faixa de pH 4,0 a 8,0. Em relação a β -xilosidase de *A. ochraceus* verificou-se que, esta foi estável principalmente em pHs ácidos mantendo mais de 80% de sua atividade residual na faixa de pH 3,0 a 5,5, durante uma hora. A endoxilanase purificada de *A. versicolor* também foi estável até 1 hora na faixa de pH de 4,0 a 8,0 (CARMONA *et al.*, 1998), e as β -xilosidases I e II de *A. pulverulentus* foram estáveis na faixa de pH de 1,5 – 6,5 e 2,5 – 7,0, respectivamente (SULISTYO *et al.*, 1995).

Quanto ao efeito de íons metálicos, Mn^{2+} e Co^{2+} (5 e 10 mM) atuaram como cofatores das atividades endoxilanásicas “xil 1” e “xil 2”, com ativação máxima de 61% e 54%, respectivamente, para a “xil 1”; e 78% e 70%, respectivamente, para a “xil 2”. Manganês também ativou a “xil 3” em 56% na concentração de 1 mM. Portanto a ativação da “xil 2” foi maior quando comparada com a “xil 1” e “xil 3”. Observou-se ainda, que cloreto de mercúrio inibiu completamente a atividade “xil 1” na concentração de 10 mM e afetou drasticamente a “xil 3” nas concentrações de 5 e 10 mM, sugerindo a existência de grupos tiol no sítio ativo das enzimas. A “xil 2” praticamente não foi afetada por mercúrio.

A atividade xilanásica de *A. versicolor*, *T. lanuginosus*-SSBP e *A. caespitosus* também foi completamente inibida na presença de mercúrio (CARMONA *et al.*, 1998; LIN *et al.*, 1999; SANDRIM *et al.*, 2005, respectivamente). Enquanto a xilanase de *A. terreus* foi fortemente inibida por Hg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} e EDTA, apresentando um nível de inibição intermediária com Zn^{2+} , Ba^{2+} , Na^+ Mn^{2+} e K^{2+} . No entanto, íons Ca^{2+} estimulou fortemente a atividade xilanásica, indicando seu possível papel como um cofator na reação enzima-substrato (GHANEM *et al.*, 2000). Em relação ao agente redutor 2-mercaptoetanol, uma ativação de 30 a 45% foi observada para as endoxilanasas de *A. ochraceus*, indicando uma relação entre a forma reduzida do resíduo cisteína e a atividade enzimática. Resultado semelhante foi reportado por SANDRIM e colaboradores (2005).

A β -xilosidase de *A. ochraceus* também foi fortemente inibida por mercúrio (mais de 90% de inibição). Resultado semelhante foi observado com as β -xilosidases I e II de *A. pulverulentus* (SULISTYO *et al.*, 1995), e as β -xilosidases de *A. nidulans* (KUMAR & RAMÓN, 1996), *A. awamori* (KORMELINK *et al.*, 1993), *A. phoenicis* (RIZZATTI *et al.*, 2001) e *Scytalidium thermophilum* (ZANOELO *et al.*, 2004). No entanto, nenhum íon ativou de forma significativa a atividade enzimática da β -xilosidase de *A. ochraceus*, sendo observada uma ligeira ativação por manganês (28%) e magnésio (20%). Manganês (54%) e magnésio (58%) também ativaram a β -xilosidase de *A. sydowi* MG49, sendo também observada uma ativação pelos íons Co^{2+} , Zn^{2+} e Ca^{2+} (GHOSH & NANDA, 1993). A influência do Mn^{2+} e Mg^{2+} em *A. phoenicis* foi menor, ativando em torno de 8 e 22%, respectivamente (RIZZATTI *et al.*, 2001), enquanto em *S. thermophilum*, esses íons não afetaram a atividade enzimática (ZANOELO *et al.*, 2004). Manganês também ativou ligeiramente (30%) a atividade β -xilosidásica em *Talaromyces thermophilus* (GUERFALI *et al.*, 2008).

O conteúdo de carboidratos das endoxilanasas “xil 1” e “xil 2” produzidas por *A.*

ochraceus foi estimado em 74% e 67%, respectivamente. Estes conteúdos são considerados relativamente altos quando comparado com as xilanases xyl I e xyl II de *Aspergillus caespitosus*, que foi calculado em 28% e 41%, respectivamente (SANDRIM *et al.*, 2005); e com a xilanase II (14,1%) de *A. versicolor* (CARMONA *et al.*, 2005). No entanto a “xil 3” de *A. ochraceus* apresentou 20% de carboidrato. Verificou-se para a xilanase I de *A. versicolor* (CARMONA *et al.*, 1998) conteúdo de carboidrato (71%) mais próximo àqueles observados para as endoxilanases “xil 1” e “xil 2” de *A. ochraceus*. O conteúdo de carboidratos da β -xilosidase produzidas por *A. ochraceus* foi estimado em 39%. Conteúdo de carboidrato semelhante (43,5%) foi observado para a β -xilosidase de *A. phoenicis* (RIZZATTI *et al.*, 2001). β -xilosidases I e II de *A. pulverulentus* apresentaram um conteúdo de açúcar bem menor, em torno de 4,2 e 3,6%, respectivamente (SULISTYO *et al.*, 1995). Em *Scytalidium thermophilum* o conteúdo de carboidrato foi estimado em 12% (ZANOELO *et al.*, 2004).

Os carboidratos são de grande importância na manutenção da estrutura tridimensional de várias proteínas, variando muito a sua quantidade dentre as diferentes classes de proteínas, sendo que a remoção dos carboidratos reduz a estabilidade e a atividade da enzima. Outro composto que pode influenciar a atividade e/ou estabilidade da enzima, é a presença de íons, que podem agir como cofatores, mas também podem ser fortes inibidores da atividade enzimática.

“Xil 1”, “xil 2” e “xil 3” de *A. ochraceus* hidrolisaram xilanas de diferentes procedências, sendo que “xil 1” e “xil 3” hidrolisaram preferencialmente xilana birchwood, e a “xil 2” – xilana larchwood. Xilana de eucalipto apresentou menor taxa de hidrólise por “xil 1” e “xil 2”, sendo que para a “xil 3”, o mesmo ocorreu para a xilana oat spelt. As endoxilanases de *A. ochraceus* não hidrolisaram carboximetilcelulose (CMC), e os substratos sintéticos: *p*NF-xilopiranosídeo, *p*NF-glucopiranosídeo, *p*NF-arabinopiranosídeo, *p*NF-

galactopiranosídeo, *p*NF-celobiopiranosídeo, 4-*O*-metil-D-glucurono-D-xilana e 4-nitrofenil-acetato.

Comparando estas endoxilanases de *A. ochraceus* com a xilanase II de *A. versicolor*, verificou-se que, embora esta enzima também hidrolise preferencialmente xilana birchwood à xilana oat spelt, a afinidade pela primeira é duas vezes maior que àquela observada por xilana oat spelt (CARMONA *et al.*, 2005). No entanto, a xilanase I de *A. versicolor* apresenta maior afinidade por xilana oat spelt, sendo que a mesma não hidrolisa avicel, carboximetilcelulose, xilobiose *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo, *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo e *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (CARMONA *et al.*, 1998). As duas xilanases de *A. caespitosus* hidrolisaram somente xilana birchwood e oat spelt, sendo que as mesmas não hidrolisaram carboximetilcelulose e os substratos sintéticos que foram analisados para as xilanases purificadas de *A. ochraceus* (SANDRIM *et al.*, 2005).

As proporções de xilose, glicose, galactose e arabinose presentes nas moléculas de xilanas solúveis em água são: 52,5%, 15,7%, 9,5% e 22,3% em xilana oat spelt e 94,1%, 1,4%, 4,5% e 0,0% em xilana birchwood, respectivamente (LI *et al.*, 2000). Assim, as endoxilanases de *A. ochraceus* e principalmente a xilanase II de *A. versicolor*, exibem maior afinidade para substratos mais homogêneos com menor grau de ramificação.

A capacidade da β -xilosidase de *A. ochraceus* em hidrolisar diferentes substratos pôde ser observada pela hidrólise do *p*NF-xilopiranosídeo e o *p*NF-glucopiranosídeo, com mais de 50% de especificidade. Resultado semelhante foi observado para a β -xilosidase de *S. thermophilum* (ZANOELO *et al.*, 2004). No entanto, foi observado que o sítio de hidrólise dos substratos *p*NF-xil e *p*NF-glu não é o mesmo. A β -xilosidase hidrolisou ainda em uma menor extensão xilanas de diferentes procedências.

A endoxilanase “xil 1” apresentou maior afinidade e eficiência catalítica por xilana birchwood que a “xil 2”. A afinidade da xilanase “xil 1” de *A. ochraceus* por xilana

birchwood também foi maior que àquela produzida por *Aspergillus ficuum* AF-98 (FENGXIA *et al.*, 2008), sendo que este microrganismo produziu uma xilanase que apresentou o mesmo nível de afinidade observada pela “xil 2” de *A. ochraceus*. Comparando ainda a afinidade das xilanases “xil 1” e “xil 2” de *A. ochraceus* com as respectivas xilanases xyl I (2,5 mg/mL) e xyl II (3,9 mg/mL) de *A. caespitosus* (SANDRIM *et al.*, 2005) sobre o substrato xilana birchwood, verificou-se que estas enzimas apresentaram afinidade muito próximas. A afinidade da “xil 3” de *A. ochraceus* por xilana birchwood foi menor quando comparada com a “xil 1” e “xil 2”. No entanto, os valores de K_M calculados para as xilanases purificadas de *A. terreus* (16,7 mg/mL) e *H. grisea* var. *thermoidea* (11 mg/mL) foram muito altos (GHANEM *et al.*, 2000; LUCENA-NETO & FERREIRA-FILHO, 2004), mostrando a baixa afinidade da enzima. Os valores de K_M das xilanases estão dentro da faixa de 0,5 e 19,6 mg/mL (BANSOD *et al.*, 1994). A β -xilosidase purificada exibiu uma típica cinética de Michaelis-Menten, com valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ para o *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo de 0,18 mg/mL e 39,34 U/mg de proteína, respectivamente. β -xilosidases de *A. phoenicis* (RIZZATTI *et al.*, 2001) e *Talaromyces thermophilus* (GUERFALI *et al.*, 2008) apresentaram menor afinidade que àquela de *A. ochraceus*.

As análises de sequenciamento de aminoácidos das xilanases e β -xilosidase purificadas de *A. ochraceus* mostraram identidade com proteínas hipotéticas de algumas espécies de *Aspergillus*, e outras espécies fúngicas como *Penicillium*, *Talaromyces* e *Chaetomium*. A falta de identidade com outras xilanases pode indicar que estas proteínas hipotéticas com as quais houve identidade, correspondem a xilanases e β -xilosidases, respectivamente, ou mesmo que a quantidade de sequências depositadas nestes bancos ainda é insuficiente. As xilanases de *A. ochraceus* também apresentaram homologia com outras enzimas do complexo xilanolítico, que não xilanase, como acetil xilana esterase e feruloil esterase, sugerindo que estes fragmentos de aminoácidos sequenciados podem tratar-se de

sequências conservadas. Vale ressaltar ainda que uma quantidade maior de aminoácidos sequenciados seria necessária para a realização de maiores inferências, no entanto, o alto grau de glicosilação destas enzimas, dificultam tais procedimentos.

6. Referências Bibliográficas

- ADAMS, P.R. **Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora***. Mycopathologia, 112:35-37, 1990.
- ALMEIDA, E.M.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENCEZI, H.F.; JORGE, J.A. **Purification and biochemical characterization of β -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea***. FEMS Microbiol. Lett., 130:171-176, 1995.
- AMIRUL, A.A.; KHOO, S.L.; NASALAN, M.N.; RAZIP, M.S.; AZIZAN, M.N. **Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger***. Folia Microbiol., 41(2):165-172, 1996.
- ANDRADE, S. V.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENCEZI, H.F.; JORGE, J.A. **Effect of carbon source on the biochemical properties of β -xylosidase produced by *Aspergillus versicolor***. Process Biochem., 39(12):1931-1938, 2004.
- ARAÚJO, J.H.B.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. **Bleaching of kraft pulp with commercial xylanases**. Appl. Biochem. Biotechnol., 77-79:713-722, 1999.
- ARISTIDOU, A.; PENTILLÄ, M. **Metabolic engineering applications to renewable resource utilization**. Curr. Opin. Biotechnol., 11:187-198, 2000.
- AZEVEDO, M.C.A. **Bioprospecção: coleta de material biológico com finalidade de explorar os recursos genéticos**. Conselho Nacional da reserva da biosfera da Mata Atlântica, 2ª Ed., 2003.
- BABU, K.R.; SATYANARAYANA, T. **α -Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid-state fermentation**. Process Biochem., 30:305-309, 1995.
- BADHAN, A.K.; CHADHA, B.S.; SONIA, K.G.; SAINI, H.S.; BHAT, M.K. **Functionally diverse multiple xylanases of thermophilic fungus *Myceliophthora sp.* IMI 387099**. Enz. Microbial Technol., 35:456-466, 2004.
- BAJPAI, P.; BHARDWAJ, N.; BAJPAI, P.K.; JAUHARI, M.B. **The impact of xylanases on bleaching of eucalyptus kraft pulp**. J. Biotechnol., 38:1-6, 1994.
- BAJPAI, P. **Microbial xylanolytic enzyme system: properties and application**. Adv. Appl. Microbiol., 43:141-194, 1997.
- BAJPAI, P. **Application of enzymes in the pulp and paper industry**. Biotechnol. Prog., 15:147-157, 1999.
- BAKIR, U.; YAVASCAOGLU, S.; GUVENC, F.; ERSAYIN, A. **An endo- β -1,4- xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization**. Enz. Microb. Technol. 29(6):328-334, 2001.
- BANSOD, S.M.; DUTTA CHOUDHARY, M.; DESHPANDA, V.V. **Enhanced stability of cellulase-free xylanase from *Chainia sp.* (NCL. 82.5.1)**. Biotechnol. Lett., 16:179-182, 1994.
- BARAZNENOK, V.A.; BECKER, E.G.; ANKUDIMOVA, N.V.; OKUNEV, N.N. **Characterization of neutral xylanases from *Chaetomium cellulolyticum* and their biobleaching effect on eucalyptus pulp**. Enz. Microbial Technol., 25:651-659, 1999.

- BARTNICKI-GARCIA, S. **The cell wall in fungal evolution.** In: Rayner, A.D.M.; Brasier, C.M.; Moore D. (Eds) *Evolutionary biology of the fungi.* Cambridge University Press, New York, p. 389-403, 1987.
- BEDFORD, M.R.; CLASSEN, H.L. **Xylans and xylanases.** In: VISSER, J.; BELDMAN, G.; VAN SOMEREN, M.A.K.; VORAGEN, A.G.J. (Eds). Elsevier, Amsterdam, pp. 361-370, 1992.
- BEG, Q.K.; BHUSHAN, B.; KAPOOR, M.; HOONDAL, G.S. **Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces sp.* QG-11-3 and its applications in biobleaching of eucalyptus kraft pulp.** *Enz. Microbial Technol.*, 27:459-466, 2000.
- 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.
- BELLO, C.V.V. **ZERI: Uma proposta para o desenvolvimento sustentável, com enfoque na qualidade ambiental voltada para o setor industrial.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Produção - UFSC, Florianópolis-SC, 1998. Site: <http://www.eps.ufsc.br/disserta98/bello/cap4.html> Acesso em 15/06/09.
- BENNET, J.W. **Taxonomy of fungi and biology of the *Aspergilli*.** In: DAVIES, J.E. (Ed.), *Biology of Industrial Microorganisms, Biotechnology Series, Cap 12.*, pp. 359-406, 1985.
- BETINI, J.H.A.; MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, 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.** *Bioprocess Biosystem Eng.*, 32(6):819-824, 2009.
- BHAT, M.K. **Cellulases and related enzymes in biotechnology.** *Biotechnol. Adv.*, 18:355-383, 2000.
- BIDLACK, J., MALONE, M., BENSON, R. **Molecular structure and component integration of secondary cell walls plant.** *Proceedings. Oklahoma Academy of Science* 72:51-56, 1992.
- BIELY, P. **Microbial xylanolytic systems.** *Trends Biotechnol.*, 3:286-290, 1985.
- BIELY, P. **Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases.** In: COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. *Hemicelluloses and hemicellulases.* London, Portland Press, pp. 29-52, 1993.
- BIM, M.A.; FRANCO, T.T. **Extraction in aqueous two-phase systems of alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* and its application in kraft pulp bleaching.** *J. Chromatogr. B*, 743:349-356, 2000.
- BLUM, D.L.; LI, X-L.; CHEN, H.; LJUNGDAHL, L.G. **Characterization of an acetyl xylan esterase from the anaerobic fungus *Orpinomyces sp.* strain PC-2.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:3990-3995, 1999.
- BOLTON, D.J.; KELLY, C.T.; FOGARTY, W.M. **Purification and characterization of the α -amylase of *Bacillus flavothermus*.** *Enz. Microbial Technol.*, 20:340-343, 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):576-581, 2003.
- BOURNE, Y.; HENRISSAT, B. **Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules.** Curr. Opin. Struct. Biol., 11:593-600, 2001.
- BRECIA, J.D.; SINERIZ, F.; BAIGORI, M.D.; CASTRO, G.R.; HATTI, K.R. **Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*.** Enz. Microbial Technol., 22:42-49, 1998.
- BUCHERT, J.; RANUA, M.; KANTELINEM, A.; VIKARI, L. **The role of two *Trichoderma reesei* xylanases in the bleaching of kraft pulp.** Appl. Microbiol. Biotechnol., 37:825-829, 1992.
- CAMPBELL, J.M.; FAHEY, J.C.; WOLF, B.W. **Selected indigestible oligosaccharides after large bowel mass, cereal in fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats.** J. Nutr., 127:130-136, 1997.
- CARMONA, E.C.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; MONTEIRO, R.T.R.; JORGE, J.A. **Xylanase production by *Aspergillus versicolor*.** J. Basic Microbiol., 37:387-394, 1997.
- CARMONA, E.C.; BROCHETO-BRAGA, M.R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; JORGE, J.A. **Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*.** FEMS Microbiol. Lett., 166:311-315, 1998.
- 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.
- CASTRO, L.P.M.; TREJO-AGUILAR, B.A.; OSORIO, G.A. **Thermostable xylanases produced at 37°C and 45°C by thermotolerant *Aspergillus* strain.** FEMS Microbiol. Lett., 146:97-102, 1997.
- CAUFRIER, F.; MERTINO, A.; DUPONT, C.; BOURIOTIS, V. **Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity.** Carbohydr. Res., 338(7):687-692, 2003.
- CHAVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. **The xylanolytic enzyme from the genus *Penicillium*.** J. Biotechnol., 123:413-433, 2006.
- CHEN, C., CHEN, J.L., LIN, T.Y. **Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production.** Enz. Microbial Technol., 21:91-96, 1997.
- CHIPETA, Z.A.; DU PREEZ, J.C.; CHRISTOPHER, L. **Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spend sulphite liquor.** J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 35(6):587-594, 2008.
- CHRISTOV, L.P.; PRIOR, B.A. **Esterases of xylan-degrading microorganisms: production, properties and significance.** Enz. Microbial Technol., 15:460-475, 1993.

- CHRISTOV, L.P.; SZAKAES, G.; BALAKRISHMAN, H. **Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching.** *Process Biochem.*, 34:511-517, 1999.
- 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.
- COELHO, G.D.; CARMONA, E.C. **Xylanolytic complex from *Aspergillus giganteus*: production and characterization.** *J. Basic Microbiol.*, 43(4):269-277, 2003.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. **Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases.** *FEMS Microbiol Rev.*, 29:3-23, 2005.
- COONEY, D.G.; EMERSON, R. **Thermophilic fungi: An account of their biology, activities and classification.** FREEMAN, W.H. (Ed.), San Francisco, Califórnia, 1964.
- COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. **β -1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology and applications.** *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 17:259-289, 1993.
- COUGHLAN, M.P.; TUOHY, M.G.; FILHO, E.X.F.; PULS, J.; CLAYESSENS, M.; VRSANSKÁ, M.; HUGHES, M.M. **Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems. In: Hemicelluloses and hemicellulases.** COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. (Eds), Portland Press Research Monograph, USA, 1993.
- COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B. (1999) **Carbohydrate-active enzyme server (CAZY) at URL:**<http://www.sciencedirect.com/science?ob=RedirectURL&method=externObjLink&locator=url&cdi=4939&plusSign=%2B&targetURL=http%253A52F%252Fafmb.cnrs-mrs.fr%252F%2520cazy%252FCAZY%252F>.
- COUTO, R.S.; SANROMÁN, M.A. **Application of solid state fermentation to food industry – A review.** *J. Food Engineer.*, 76(3):291-302, 2006.
- COUTO, S.R.; RODRÍGUEZ, A.; PATERSON, R.R.M.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J.A. **Laccase activity from the fungus *Trametes hirsute* using an air-lift bioreactor.** *Lett. Appl. Biotechnol.*, 42:612-616, 2006.
- CRANE, R.K.; SOLS, A. **The association of hexoquinase with particulate fractions of brain and other tissue homogenates.** *J. Biol. Chem.*, 203:273-292, 1953.
- CREPIN, V.F.; FAULDS, C.B.; CONNERTON, I.F. **Functional classification of the microbial feruloyl esterases.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63(6):647-652, 2004.
- D'ALMEIDA, M.L.O. **Composição química dos materiais.** In: *Celulose e Papel. Tecnologia de fabricação da pasta celulósica.* Centro Técnico de Celulose e Papel, 1:43-98, 1981.

- DAMASO, 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.
- DAVIDOV, E.R., ATEV, A. **Method for production of enzyme preparation.** Patent number Ru 2057179 C1, 1996.
- DAVIS, B.J. **Disc eletroforesis II. Methods and application to human serum proteins.** Ann. N. Y. Acad. Sci., 121:404-427, 1964.
- DEGEFU, Y.; LOHTANDER, K.; PULIN L. **Expression patterns and phylogenetic analysis of two xylanase genes (*htxyl1* and *htxyl2*) from *Helminthosporium turcicum*, the cause of northern leaf blight of maize.** Biochimie, 86:83-90, 2004.
- DE GRAAFF, L.H.; BROECK, H.C. van den; OOIJEN, A.J.J. **Regulation of the xylanase-encoding *xlnA* gene of *Aspergillus tubigenis*.** Mol. Microbiol., 12:479-490, 1994.
- DEREWENDA, U.; SWENSON, L.; GREEN, R.; WEI, Y.; MOROSOLI, R.; SHARECK, F.; KLUEPFEL, D.; DEREWENDA, Z.S. **Crystal structure, at 2.6-Å resolution, of the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the F family of beta-1,4-D-glycanases.** J. Biol. Chem., 269:20811-20814, 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.
- DOBREV, G.T.; PISHTIYSKI, I.G.; STANCHEV, V.S.; MIRCHEVA, R. **Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design.** Bioresour. Technol., 98:2671-2678, 2007.
- DOMINGUES, L.; DANTAS, M.M.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J.A. **Continuous ethanol fermentation of lactose by a recombinant flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain.** Biotechnol. Bioeng., 64:692–697, 1999.
- DUARTE MCT, SILVA EC, GOMES IMB, PONEZI AN, PORTUGAL EP, VICENTE JR, DAVANZO E. **Xylan-hydrolyzing enzyme system from *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 and its effects on *Eucalyptus grandis* kraft pulp for pulp bleaching improvement.** Bioresour. Technol., 88:9-15, 2003.
- 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.
- DUTTA, T.; SENGUPTA, R.; SAHOO, R.; SINHA RAY, S.; BHATTACHARJEE, A.; GHOSH, S. **A novel cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citrinum*: production, purification and characterization.** Lett. Appl. Microbiol., 44:206-211, 2007.
- EDMAN, P.; BEGG, G. **A protein sequenator.** Eur. J. Biochem., 1(1):80-91, 1967.
- EMERSON, R. **An experimental study of the life cycles and taxonomy of *Allomyces*.** Lloydia, 4:

77-144, 1941.

- FANG, H.Y.; CHANG, S.M.; HSIEH, M.C.; FANG, T.J. **Production, optimization growth conditions and properties of the xylanase from *Aspergillus carneus* M34.** J. Mol. Catalysis B: Enzymatic, 49:36-42, 2007.
- FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; VITOLO, M.; ROBERTO, I.C.; SILVA, S.S.; ROSA, S.A.M **Preparation of xylitol by fermentation of a hydrolysate of hemicellulose obtained from sugarcane bagasse.** Arquivos de Biologia e Tecnologia, 36:103-114, 1993.
- FENGXIA, L.; MEI, L.; ZHAOXIN, L.; XIAOMEI, B.; HAIZHEN, Z.; WANG, Y. **Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98.** Bioresour. Technol., 99:5938-5941, 2008.
- FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T.; PEÑA, J.L.; PIÑAGA, F.; VALLÉS, S. **α -L-arabionofuranosidase production by *Aspergillus nidulans*.** FEMS Microbiol. Lett., 115(1):107-112, 1994.
- FERREIRA, G.; BOER, C.G.; PERALTA, R.M. **Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamari* in solid-state fermentation.** FEMS Microbiol. Lett., 173:335-339, 1999.
- FIALHO, M.B.; CARMONA, E.C. **Purification and characterization of xylanases from *Aspergillus giganteus*.** Folia Microbiol., 49:13-18, 2004.
- FILHO, E.X.F. **The xylan-degrading enzyme system.** Braz. J. Med. Biol. Res., 27:1093-1109, 1994.
- FILHO, E.X.F.; PULS, J.; COUGHLAN, M.P. **Purification and characterization of two arabinofuranosidases from solid-state cultures of *Penicillium capsulatum*.** Appl. Environ. Microbiol., 62:168-173, 1996.
- FILHO, E.X.F. **Hemicellulases and biotechnology.** In: PANDALAI, S.G. (Ed), Recent Research Developments in Microbiology. Research Signpost. Trivandrum, India, pp. 165-176, 1998.
- FLORES, M.E.; PEREA, M.; RODRÍGUEZ, O.; MALVÁEZ, A.; HUITRÓN, C. **Physiological studies on induction and catabolite repression of β -xylosidase and endoxylanase in *Streptomyces* sp. CH-M-1035.** J. Biotechnol., 49:179-187, 1996.
- FONTANA, J.D.; GEBARA, M.; BLUMEL, M.; SCHNEIDER, H; MACKENZIE, C.R.; JOHNSON, K.G. **α -4-O-methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes.** Methods Enzymol., 160:560-571, 1988.
- FOOKS, L.J.; GIBSON, G.R. **In vitro investigation of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens.** FEMS Microbiol. Ecol., 39:67-75, 2002.
- FREEDONIA. The Freedonia Group Incorporated (2005). **World Enzymes to 2009.** Endereço eletrônico: <http://www.freedoniagroup.com/pdf/1949smwe.pdf> Acessado em: 02/07/2009.
- 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. Biotechnol. Biochem., 59:538-540, 1995.
- GARG, A.P.; MCCARTHY, A.J.; ROBERTS, J.C. **Biobleaching effect of *Streptomyces thermoviolaceus* xylanase preparations on birchwood kraft pulp.** Enz. Microbial Technol.,

18:261-267, 1996.

- GARG, A.P.; ROBERTS, J.C.; MCCARTHY, A.J. **Bleachboosting effect of cellulase-free xylanase of *Streptomyces thermoviolaceus* and its comparison with two commercial enzyme preparation on birchwood kraft pulp.** *Enz. Microbial Technol.*, 22:594-598, 1998.
- GARROTE, G., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J.C. **Hydrothermal processing of lignocellulosic materials.** *Holz Roh Werk.*, 57:191–202, 1999.
- GARROTE, G., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J.C. **Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharides production.** *J. Food Engineer.*, 52:211-218, 2002.
- GARROTE, G., FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J.C. **Autohydrolysis of agricultural residues: Study of reaction byproducts.** *Bioresour. Technol.*, 98:1951-1957, 2007.
- GAWANDE, P.V.; KAMAT, M.Y. **Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and application.** *J. Appl. Microbiol.*, 87:511-519, 1999.
- 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.
- GEORIS, J.; GIANNOTTA, F.; BUYL, E.D.; GRANIER, B.; FRERE, J.M. **Purification and properties of three endo- β -1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. Strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps.** *Enz. Microbial Technol.*, 26:178-186, 2000.
- GERVAIS, P., MOLIN, P. **The role of water in solid-state fermentation.** *Biochem. Engineer. J.*, 13(2-3): 85-101, 2003.
- GHANEN, N.B.; YUSEF, H.H.; MAHROUSE, H.K. **Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements.** *Bioresour. Technol.*, 73:113-121, 2000.
- GHOSH, M.; NANDA, G. **Physiological studies on xylose induction and glucose repression of xylanolytic enzymes in *Aspergillus sydowii* MG49.** *FEMS Microbiol. Lett.*, 117:151-156, 1994.
- GOMES, D.J.; GOMES, J.; STEINER, W. **Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*.** *J. Biotechnol.*, 33:87-94, 1994.
- GOMEZ DE SEGURA, B.; FEVRE, M. **Purification and characterization of two 1,4- β -xylan endohydrolases from the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:3654-3660, 1993.
- GOMES, D.J.; GOMES, J.; STEINER, W. **Factors influencing the induction of the endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*.** *J. Biotechnol.*, 33:87-94, 1994.

- GUARRO, J.; GENÉ, J. & STCHIGEL, A.M. **Developments in fungal taxonomy.** Clin. Microbiol. Rev., 12(3):454-500, 1999.
- GUERFALI, M.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. **Talaromyces thermophilus β -D-xylosidase: Purification, characterization and xylobiose synthesis.** Appl. Biochem. Biotechnol., 150:267-279, 2008.
- GUPTA, S., BHUSHAN, B., HOONDAI, G.S. **Isolation and characterization of xylanase from *Staphylococcus sp.* SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp.** J. Appl. Microbiol., 88:325–334, 2000.
- HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K.D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. **Production of fungal xylanases.** Bioresour. Technol., 58:137-161, 1996.
- HANES, C.S. **The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley.** Biochem. J., 26:1406-1421, 1932.
- HAWKSWORTH, D. L. **Steps along the road to a harmonized bionomenclature.** Taxon 44:447-456, 1995.
- HEATH, I.B. **Nuclear division: a marker for protist phylogeny.** Prog. Protistol., 1:115-162, 1986.
- HENRISSAT, B.; CLAEYSSSENS, 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.
- HESPELL, R. **Extraction and characterization of hemicellulose from the corn cob fiber produced by corn wet-milling processes.** J. Agr. Food Chem., 46:2615-2619, 1998.
- HESSELTINE, C.W. **Solid state fermentation – part 1.** Process Biochem., 12:24-27, 1977.
- HRMOVÁ, M.; BIELY, P.; VRSANKÁ, M. **Celulose and xylan – degrading enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger*.** Enz. Microbial Technol., 11:610-616, 1989.
- HUANG, L.; HSEU, T.; WEY, T. **Purification and characterization of an endoxylanase from *Trichoderma koningii* G-39.** Biochem. J., 278:329-333, 1991.
- IMAIZUMI, K.; NAKATSU, Y.; SATO, M.; SEDARNAWATI, Y.; SUGANO, M. **Effect of xylooligosaccharides on blood glucose, serum and liver lipids and cecum short-chain fatty acids in diabetic rats.** Agric. Biol. Chem., 55:195-205, 1991.
- ITO, K.; IWASHITA, K.; IWANO, K. **Cloning and sequencing of the xyn C gene encoding acid xylanase of *Aspergillus kawachii*.** Biosci. Biotechnol. Biochem., 56:1338-1340, 1992.
- JAMES, J. A.; LEE, B. H. **Glucosylases: microbial sources, industrial applications and molecular biology – a review.** J. Food Biochem., 21:1-52, 1997.
- 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.

- KANEKO, S.; SHIMASAKI, T.; KUSAKABLE, I. **Purification and some properties of intracellular α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* 5-16.** Biosci. Biotechnol. Biochem., 57:1161-1165, 1993.
- KANG, S.W.; PARK, Y.S.; LEE, J.S.; HONG, S.I.; KIM, S.W. **Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass.** Bioresour. Technol., 91:153-156, 2004.
- KERSTERS-HILDERSON, H.; CLAEYSSSENS, M.; DOORSLAER, E.V.; SAMAN, E.; BRUYNE, C.K. **β -D-xylosidase from *Bacillus pumilus*.** Methods Enzymol., 83: 631-639, 1982.
- 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.
- KHASIN, A.; ALCHNATI, Y.; SHOAM, Y. **Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6.** Appl. Environ. Microbiol., 59:1725-1730, 1993.
- KIM, S.W.; KANG, S.W.; LEE, J.S. **Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors.** Bioresour. Technol., 59:63-67, 1997.
- KIMURA, I.; SASAHARA, H.; TAJIMA, S. **Purification and characterization of two xylanase and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*.** J. Ferment. Bioeng., 80:334-339, 1995.
- KISS, T., KISS, L. **Purification and characterization of an extracellular β -D-xylosidase from *Aspergillus carbonarius*.** World J. Microbiol. Biotechnol., 16:465-470, 2000.
- KITAOKA, M.; HAGA, K.; KASHIWAGI, Y.; SASAKI, T.; TANIGUCHI, H.; KUSAKABE, I. **Kinetic studies on *p*-nitrophenyl-cellobioside hydrolyzing xylanase from *Cellvibrio gilvus*.** Biosci. Biotechnol. Biochem., 57:1987-1989, 1993.
- KLEYWEGT, G.J.; ZOU, J.Y.; DIVNE, C.; DAVIES, G.J.; SINNING, I.; STAHLBERG, J.; REINIKAINEN, T.; SRISODSUK, M.; TEERI, T.T.; JONES, T.A. **The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes.** J. Mol. Biol., 272:383-397, 1997.
- 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)- β -D-xylanases and one β -xylosidase from *Aspergillus awamori*.** J. Biotechnol., 27:249-253, 1993.
- KRISANA, A.; RUTCHADAPORN, S.; JARUPAN, G.; LILY, E.; SUTIPA, T.; KANYAWIM, K. **Endo-1,4- β -xylanase B from *Aspergillus* cf. *niger* BCC14405 Isolated in Thailand: Purification, Characterization and Gene Isolation.** J Biochem Mol Biol, 38(1):17-23, 2005.
- KUHAD, R.C.; SINGH, A. **Lignocellulosic biotechnology: Current and future prospects.** Crit. Rev. Biotechnol., 13:151-172, 1993.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; MALA, R. **Molecular and biotechnological aspects of xylanases.** FEMS Microbiol. Rev., 23:411-456, 1999.

- KUMAR, S.; RAMÓN, D. **Purification and regulation of the synthesis of a β -xylosidase from *Aspergillus nidulans*.** FEMS Microbiol. Lett., 135(2-3):287-293, 1996.
- KURAKABE, M.; SHINJII, O.; KOMAKI, T. **Transxylosilation of β -xylosidase from *Aspergillus awamori* K4.** Biosci. Biotechnol. Biochem., 6112:2010-2014, 1997.
- LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4.** Nature, 227:680-685, 1970.
- LAMA, L.; CALANDRELLI, V.; GAMBACORTA, A.; NICOLAUS, B. **Purification and characterization of thermostable xylanase and β -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*.** Res. Microbiol., 155:283-289, 2004.
- LARSON, S.B.; DAY, J.; BARBA DE LA ROSA, A.P.; KEEN, N.T.; MCPHERSON, A. **First crystallographic structure of a xylanase from glycoside hydrolase family 5: implications for catalysis.** Biochemistry, 42:8411-8422, 2003.
- LASSER, M., SCHULMAN, D., ALLEN, S.G., LICHWA, J., ANTAL, M.J., LYND, L.R. **A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol.** Bioresour. Technol., 81:33-44, 2001.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica.** 2^a ed. Worth Publishers, 1995.
- LÉJOHN, H.B. **Biochemical parameters of fungal phylogenetics.** Evol. Biol., 7:79-125, 1974.
- 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.
- LEPAGE, E. S. **Química da madeira.** In: Manual de preservação de madeiras. Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo. Divisão de madeiras, 1:72-97, 1986.
- LI, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J.S.; ERIKSSON KARL-ERIK, L. **Relationships between activities of xylanases and xylan structures.** Enz. Microbial Technol., 27:89-94, 2000.
- LIN, J.; NDLOVU, L.M.; SINGH, S.; PILLAY, B. **Purification and biochemical characteristics of β -D-xylanase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP.** Biotechnol. Appl. Biochem., 30:73-79, 1999.
- LINEWEAVER, H.; BURK, D. **The determination of the enzyme dissociation.** J. Amer. Chem. Soc., 56: 658-666, 1934.
- LONSANE, B.K.; RAMESH, M.V. **Production of bacterial thermostable alfa-amylase by solid-state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolyses.** Adv. Appl. Microbiol., 35:1-56, 1990.
- 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.
- LUCENA-NETO, S.A.; FILHO, E.X.F. **Purification and characterization of a new xylanase from**

- Humicola grisea* var. *thermoidea***. Braz. J. Microbiol., 35:86-90, 2004.
- MAAT, J.; ROZA, M.; VERBAKEL, J.; STAM, H.; da SILRA, M.J.S.; EGMOND, M.R.; HAGEMANS, van GARCOM, R.F.M.; HESSING, J.G.M.; van DERHONDEL, C.A.M.J.J.; van ROTERDAM, C. **Xylans and xylanases**. In VISSER, J.; BELDMAN, G.; VAN SOMEREN, M.A.K.; VORAGEN, A.G.J. (Eds). Elsevier, Amsterdam, pp. 349-360, 1992.
- MAGNUSON, T.S.; GAWFORD, D.L. **Purification and characterization of an alkaline xylanase from *Streptomyces viridosporus* T7A**. Enz. Microbial Technol., 21:160-164, 1997.
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M.K. **Thermophilic fungi: their physiology and enzymes**. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64:461-468, 2000.
- MAMO, G.; GESSESSE, A. **Purification and characterization of a two raw-starch-digesting thermostable α -amylase from a thermophilic *Bacillus***. Enz. Microbial Technol., 25:433-438, 1999.
- MARINOVA, D.N., ATEV, A.P., POLIZOEV, J.V. **Method for production of enzyme preparation with predominant xylanase activity**. Patent number BG51306 A, 1993.
- MARQUES DE SOUZA, C.G.; GIRARDO, N.S.; COSTA, M.A.F.; PERALTA, R.M. **Influence of growth conditions on the production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus flavus***. J. Basic Microbiol., 39(3):155-160, 1999.
- MAY, T.; MACKIE, R.I.; GARLEB, K.A. **Effect of dietary oligosaccharides in the intestinal growth and tissue damage by *Clostridium difficile***. Mikrooekol Ther., 23:158-170, 1995.
- MEDEIROS, R.G.; SILVA JR, F.G.; SALLES, B.C.; ESTELLES, R.S.; FILHO, E.X.F. **The performance of fungal xylan-degrading enzyme preparations in elemental chlorine-free bleaching for Eucalyptus pulp**. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 28:204-206, 2002.
- MERCHUK, J. C. **Why use air-lift reactors**. Trends in Biotechnol., v. 8, p. 66, 1990.
- MICHAEL, G. Gore **Spectrophotometry and Spectrofluorimetry – A Pratical Approach**. Oxford, University Press, 1999.
- 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 a thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea***. Can. J. Microbiol., 37:675-681, 1991.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006.
- MOROSOLI, R.; DURAND, S.; BOUCHER, F. **Stimulation of xylanases synthesis in *Cryptococcus albidus* by cyclic AMP**. FEMS Microbiol. Lett., 57:57-60, 1989.
- MOURE, A.; GULLÓN, P.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. **Advances in the manufacture,**

- purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals.** *Process Biochem.*, 41:1913-1923, 2006.
- MUSSATTO, S.I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A.M.F. **Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria.** *Ciência Hoje*, 41(242):28-33, 2007.
- NABARLATZ, D.; EBRINGEROVÁ, A.; MONTANÉ, D. **Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides.** *Carbohydr. Polymers*, 69:20-28, 2007.
- NAKAMURA, S. **Structure and function of a multiplidomain alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus sp.* strain 41M-1.** *Catalysis Surveys Asia*, 7:157-164, 2003.
- NIKOH, N.; HAYASE, N.; IWABE, N.; KUMA, K.; MIYATA, T. **Phylogenetic relationships of the kingdoms Animalia, Plantae and Fungi, inferred from 23 different protein species.** *Mol. Biol. Evol.*, 11:762-768, 1994.
- NOGUEIRA, L.U.H.; SILVA LORA, E.E.; TROSSERO, M.A. **Dendroenergia: fundamentos e aplicações.** Brasília: ANEEL, pp. 31-54, 2000.
- NURIZZO, D.; TURKENBURG, J.P.; CHARNOCK, S.J.; ROBERTS, S.M.; DODSON, E.J.; MCKIE, V.A.; TAYLOR, E.J.; GILBERT, H.J.; DAVIES, G.J. ***Cellvibrio japonicus* alpha-L-arabinanase 43A has a novel five-blade beta-propeller fold.** *Nat. Struct. Biol.* 9:665-668, 2002.
- OKAZAKI, M.; KODA, H.; IZUMI, R.; FUJIKAWA, S.; MATSUMOTO, N. **In vitro digestibility and in vitro utilization of xylobiose.** *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 44:41-44, 1991.
- OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production.** *Enz. Microbial Technol.*, 18:312-331, 1996.
- PAICE, M.G.; BERNIER JR, R.; JURASEK, L. **Viscosity-enhancing bleaching of hardwood kraft pulp with xylanase from a cloned gene.** *Biotechnol. Bioeng.*, 32:235-239, 1988.
- PALMA, M.B.; MILAGRES, A.M.F.; PRATA, A.M.R.; MANCILHA, I.M. **Influence of aeration and agitation rate on the xylanase activity from *Penicillium janthinellum*.** *Process Biochem.*, 31(2):141-145, 1996.
- PANDEY, A. **Recent process development in solid-state fermentation.** *Process Biochem.*, 27:109-117, 1992.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. **New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products.** *Process Biochem.*, 35:1153-1169, 2000.
- PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUES, H.; DOMÍNGUES, J.M. **Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis.** *Bioresour. Technol.*, 65:191-201, 1998.
- PARAJÓ, J.C.; GARROTE, G.; CRUZ, J.M.; DOMÍNGUEZ, H. **Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials.** *Trends Food Sci. Technol.*, 15:115-120, 2004.
- PATEL, R.N.; GRABSKI, A.C.; JEFFRIES, T.W. **Chromophore release from kraft pulp by purified *Streptomyces roseiscleroticus* xylanases.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39:405-412,

1993.

- PAULI, G. **Upzing**. Porto Alegre: L&PM, 1998.
- PEDERSEN, M.; LAURITZEN, H.K.; FRISVAD, J.C.; MEYER, A.S. **Identification of thermostable β -xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger***. Biotechnol. Lett., 29:743-748, 2007.
- 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., 36(1):149-155, 2009.
- PERALTA, R.M.; TERENCEZI, H.F.; JORGE, J.A. **β -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.; RIZZATTI, A.C.S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H.F.; JORGE, J.A.; AMORIM, D.S. **Xylanases from fungi: properties and industrial applications - Review**. Appl. Microbiol. Biotechnol., 67:577-591, 2005.
- POLIZELI, M.L.T.M. **Properties and commercial applications of xylanases from fungi**. In: RAI, M. (Ed). Advances in Fungal Biotechnology, IK International Publisher, New Delhi, Bangalore, chapter 4, pP. 82-108, 2009.
- PRADE, R.A. **Xylanases: From Biology to Biotechnology**. Biotechnol. Gen. Engineer. Rev., 13:101-131, 1995.
- PUCHART, V.; BIELY, P. **A simple enzymatic synthesis of 4-nitrophenyl β -1,4-D-xylobioside, a chromogenic substrate for assay and differentiation of endoxylanases**. J. Biotechnol., 128:576-586, 2007.
- PULS, J.; SCHUSEIL, J. **Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzyme required for hydrolysis**. In: COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. Hemicelluloses and hemicellulases. London, Portland Press, pp.1-27, 1993.
- RAGHUKUMAR, C.; MURALEEDHARAN, U.; GAUD, V.R.; MISHRA, R. **Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp**. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 31:433-441, 2004.
- RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. **Culture method to study fungal growth in solid fermentation**. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 60:199-209, 1980.
- RAIMBAULT, M. **General and Microbiological Aspects of Solid Substrate Fermentations**. Eletron. J. Biotechnol. 1(3):26-27, 1998.

- RAJ, K.C.; CHANDRA, T.S. **Purification and characterization of xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1.** FEMS Microbiol. Lett., 145:457-461, 1996.
- RAMANA MURTHY, M.V., KARANTH, N.G., RAO, K.S.M.S.R. **Biochemical Engineering Aspects of Solid-State Fermentation.** Adv. Appl. Microbiol., 38:99-149, 1993.
- RANI, D.S.; NAND, K. **Production of thermostable cellulase-free xylanase by *Clostridium absonum* CFR-702.** Process Biochem., 36:355-362, 2000.
- REDDY, V.; REDDY, P.; PILLAY, B.; SINGH, S. **Effect of aeration on the production of hemicellulases by *T. lanuginosus* SSBP in a 30 l bioreactor.** Process Biochem., 37:1221-1228, 2002.
- REILLY, P.J. **Xylanases: structure and function.** In: HOLLAENDER, A. Trends in the Biology of Fermentation for Fuels and Chemicals. New York, Plenum Press, pp.111-129, 1981.
- REISFELD, R.A.; LEWIS, U.J.; WILLIAMS, D.E. **Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels.** Nature, 195:281-283, 1962.
- RIDDER, E.R.; NOKES, S.E.; KNUTSON, B.L. **Optimization of solid-state fermentation parameters for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran in a forced aeration system.** Amer. Soc. Agric. Engineers, 42(6):1785-1790, 1999.
- RIVAS, B., MOLDES, A.B., DOMÍNGUEZ, J.M., PARAJÓ, J.C. **Lactic acid production from corn cobs by simultaneous saccharification and fermentation: a mathematical interpretation.** Enz. Microbial Technol., 34:627-634, 2004.
- RIZZATTI, A.C.S.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; RECHIA, C.G.V.; POLIZELI, M.L.T.M. **Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*.** J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 26:156-160, 2001.
- RIZZATTI, A.C.S.; SANDRIM, V.C.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. **Influence of temperature on the properties of the xylanolytic enzymes of the thermotolerant fungus *Aspergillus phoenicis*.** J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 31:88-93, 2004.
- ROBERTO, I.C.; FELIPE, M.G.A.; LACIS, L.C.; SILVA, S.S.; MANCILHA, I.M. **Utilization of sugarcane bagasse hemicelulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* for xylitol production.** Bioresour. Technol., 36:271-275, 1991.
- RYCROFT, C.E.; JONES, M.R.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R.A.A. **Comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides.** J. Appl. Microbiol., 91: 878-887, 2001
- SAHA, B.C. **Hemicellulose bioconversion.** J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 30:279-291, 2003.
- SAKA, S. **Chemical composition and distribution.** In: DAVID, N.; HON, S.; SHIRAISHI, N. (Eds.). Wood and Cellulosic Chemistry. New York, Marcel Dekker, pp.51-65, 2001.
- SALLES, B.C.; CUNHA, R.B.; FONTES, W.; SOUSA, M.V.; FILHO, E.X.F. **Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*.** J. Biotechnol., 81:199-204, 2000.

- SALLES, B.C.; MEDEIROS, R.G.; BAO, S.N.; SILVA JR, F.G.; FILHO, E.X.F. **Effect of cellulase-free xylanases from *Acrophialophora nainiana* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on eucalyptus kraft pulp.** Process Biochem., 40:343-349, 2005.
- SANCHEZ, Z.B.; BAUTISTA, J. **Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*.** Enz. Microbial Technol., 10:315-318, 1988.
- 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.
- SCHMIDEL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. **Biorreatores e processos fermentativos.** In: SCHMIDEL, W.; LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. (Eds.) Biotecnologia Industrial, Edgard Blücher Ltda., v.2, p.179-190, 2001.
- SENHORAS, E.M. (2005) **Oportunidades da Cadeia Agroindustrial do Coco Verde - Do coco verde nada se perde, tudo se desfruta.** Revista Urutágua – revista acadêmica multidisciplinar (CESIN-MT/DCS/UEM), n° 05, ISSN 1519.6178, Maringá - PR. Site: http://www.uem.br/~urutagua/005/22eco_senhoras.htm Acesso em 15/06/09.
- SHAH, A.R.; MADAMWAR, D. **Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization.** Process Biochem., 40:1763-1771, 2005.
- SHAO, W.; WIEGEL, J. **Purification and characterization of two thermostable β -xylosidases from *Thermoanaerobacter ethanolicus*.** J. Bacteriol., 174:5848-5853, 1992.
- SHAPACK, G.E.; RUSSEL, I.; STEWART, G.G. **Thermophilic microbes in Ethanol production.** Library of Congress Card Number 95-9597, CRC Press, Inc., 1987.
- SIEDENBERG, D.; GERLACH, S.R.; CZWALINNA, A.; SCHUGERL, K.; GIUSEPPIN, M.L.F.; HUNIK, J. **Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on complex medium in stirred tank and airlift tower loop reactors.** J. Biotechnol., 56:205-216, 1997.
- SILVA, C.H.C.; PULS, J.; SOUSA, M.V.; FERREIRA-FILHO, E.X. **Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius.** Rev. Microbiol., 30:114-119, 1999.
- SILVA, W.B.; PERALTA, R.M. **Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from *Aspergillus fumigatus*.** Can. J. Microbiol., 44:493-497, 1998.
- SIMÃO, R.C.G.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. **Induction of xylanase in *Aspergillus tamari* by methyl- β -D-xyloside.** Appl. Microbiol. Biotechnol., 47:267-271, 1997.
- SINGH, S.; MADLALA, A.M.; PRIOR, B.A. ***Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases.** FEMS Microbiol. Rev., 27:3-16, 2003.
- SMITH, D.C.; BHAT, K.M.; WOOD, T.M. **Xylan-hydrolysing enzymes from the thermophilic and mesophilic fungi.** World J. Microbiol. Biotechnol., 7:475-484, 1991.

- SOGIN, M.L. **Evolution of eukaryotic microorganisms and their small subunit ribosomal RNAs.** Am. Zool., 29:487-499, 1989.
- SOUZA, D.F.; MARQUES DE SOUZA, C.G.; PERALTA, R.M. **Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamarii* in solid state fermentation.** Process Biochem., 36:835-838, 2001.
- SOUZA, M.C.O.; ROBERTO, I.C.; MILAGRES, A.M.F. **Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology.** Appl. Microbiol. Biotechnol., 52:768-772, 1999.
- SOUZA, O. (2008) **Aproveitamento de resíduos e subprodutos agropecuários pelos ruminantes.** Site: <http://www.cpatc.embrapa.br/index.php?idpagina=artigos&artigo =914> Acesso em 30/06/09.
- SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. **Cellulase-free xilanases from *Bacillus* and other microorganisms.** FEMS Microbiol. Lett., 183:1-7, 2000.
- SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. **Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application.** Crit. Rev. Biotechnol., 22(1):33-64, 2002.
- SULISTYO, J.; KAMIYAMA, Y.; YASUF, T. **Purification and some properties of *Aspergillus pulverulentus* β -xylosidase with transxylosylation capacity.** J. Ferment. Bioeng., 79(1):17-22, 1995.
- SUN, H; GE, X.; ZHANG, W. **Improved production of an enzyme that hydrolyses raw yam starch by *Penicillium sp.* S-22 using fed-batch fermentation.** Biotechnol. Lett., 28:1719-1723, 2006.
- SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. **Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria.** Crit. Rev. Biotechnol., 17(1):39-67, 1997.
- TAHERZADEH, M.J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. **Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*.** Appl. Microbiol. Biotechnol., 53:701-708, 2000.
- TAN, S.S.; LI, D.Y.; JIANG, Z.Q.; ZHU, Y.P.; SHI, B.; LI, L.T. **Production of xilobiose from the autohydrolysis explosion liquor of corncob using *Thermotoga maritime* xylanase B (Xyn B) immobilized on nickel-chelated Eupergit C.** Bioresour. Technol., 99:200-204, 2008.
- TANEJA, K.; GUPTA, S.; KUHAD, R.C. **Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99.** Bioresour. Technol., 85(1):39-42, 2002.
- TAPPI, Test Methods. **Technical association of the pulp and paper industry.** Atlanta, GA, Tappi Press, 1996.
- TAYLOR, F.J.R. **Problems in the development of an explicit hypothetical phylogeny of the lower eukaryotes.** BioSystems, 10:67-89, 1978.

- TAYLOR, J.W.; SWANN, F.C.; BERBEE, M.L. **Molecular evolution of ascomycete fungi: phylogeny and conflict.** In: Hawksworth, D.L. (Ed.) *Ascomycete systematics: problems and perspectives in the nineties.* Plenum Press, New York, p. 201-212, 1994.
- 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.; VIIKARI, L.; BUCHERT, J. **Use of acid-tolerant xylanase for bleaching of kraft pulps.** *Biotechnol. Tech.*, 1112:935-938, 1997.
- TENKANEN, M.; SIIKA-AHO, M. **An alpha-glucuronidase of *Schizophyllum commune* acting on polymeric xylan.** *J. Biotechnol.*, 78(2):149-161, 2000.
- TIMELL, T.E. **Wood hemicelluloses.** In: *Advances Carbohydrate Chemistry Part II*, 20:409, 1965.
- TORRONEN, A.; HARKKI, A.; ROUVINEN, J. **Threedimensional structure of endo-1,4-beta-xylanase II from *Trichoderma reesei*: two conformational states in the active site.** *EMBO J.*, 13:2493-2501, 1994.
- TORRONEN, A.; ROUVINEN, J. **Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4-beta-xylanases.** *J. Biotechnol.*, 57:137-149, 1997.
- TWOMEY, L.N.; PLUSKE, J.R.; ROWE, J.B.; CHOCT, M.; BROWN, W.; McCONNELL, M.F.; PETHICK, D.W. **The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility.** *Animal Feed Sci. Technol.*, 108(1-4):71-82, 2003.
- ULBRICHT, R.J.; SHARON, J.; THOMAS, J. **A review of 5-hydroxymethylfurfural HMF in parental solutions.** *Fundamental and Applied Toxicology*, 4:843-853, 1984.
- VAN PETEGEM, F.; COLLINS, T.; MEUWIS, M.A.; GERDAY, C.; FELLER, G.; VAN BEEUMEN, J. **Crystallization and preliminary X-ray analysis of a xylanase from the psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*.** *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.*, 58:1494-1496, 2002.
- VÁZQUEZ, M.J., ALONSO, J.L., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J.C. **Xylooligosaccharides: manufacture and applications.** *Trends Food Sci. Technol.*, 11:387-393, 2000.
- VÁZQUEZ, M.J., GARROTE, G.; ALONSO, J.L., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J.C. **Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: evaluation of operational strategies.** *Bioresour. Technol.*, 96:889-896, 2005.
- VERBRUGGEN, M.A.; SPRONK, B.A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.; THOMAS, J.R.; KAMERLING, J.P.; SCHOLS, H.A.; Vliegenthart, J.F. **Structures of enzymically derived oligosaccharides from sorghum glucuronoarabinoxylan.** *Carbohydr. Res.*, 306:265-274, 1998.
- VIIKARI, L.; SUNDQUIST, J.; KETTUNEN, J. **Xylanases enzymes promote pulp bleaching.** Paper

- Timber, 73:384-389, 1991.
- VIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. **Xylanases in bleaching: From an idea to the industry.** FEMS Microbiol. Rev., 13:335-350, 1994.
- VIKARI, L.; SUURNAKI, A.; BUCHERT, J. **Enzyme-aided bleaching of kraft pulp: fundamental mechanisms and practical applications.** In: JEFFRIES, T.W.; VIKARI, L. (Eds). Enzyme pulp and paper processing. ACS Symposium Series 655, Washington, pp. 15-24, 1996.
- VILA, C.; CAMPOS, A.R.; CRISTOVÃO, C.; CUNHA, A.M.; SANTOS, V.; PARAJÓ, J.C. **Sustainable biocomposites based on autohydrolysis of lignocellulosic substrates.** Comp. Sci. Technol., 68:944-952, 2008.
- VILLELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnica e experimentos de bioquímica.** Ed. Guanabara Koogan, p.523, 1973.
- VOGEL, H.F. **Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications.** Amer. Naturalist, 98:435-446, 1964.
- WHITTAKER, R. H. **New concepts of kingdoms of organisms.** Science, 163:150-160, 1969.
- 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.
- WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. **Microbial conversion of D-xylose to xylitol.** J. Ferment. Bioeng., 86:1-14, 1998.
- WISEMAN, A. **Handbook of enzyme biotechnology.** Ellis Horwood Ltd John Wiley & Sons, pp.148, 1975.
- WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SADDLER, J.N. **Multiplicity of β -1,4-xylanase in Microorganisms: Functions and Applications.** Microbiol. Rev., 52(3):305-317, 1988.
- WONG, K.K.Y.; SADDLER, J.N. **Trichoderma xylanases, their properties and purification.** Crit. Rev. Biotechnol., 12:413-435, 1992.
- WONG, K.K.Y.; SADDLER, J.N. **Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries.** In: COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. (Eds), Hemicelluloses and hemicellulases. Portland Press, London, pp. 127-143, 1993.
- WONG, K.K.Y.; YOKOTA, S.; SADDLER, J.N.; DE JONG, E. **Enzymatic hydrolysis of lignin-carbohydrate complexes isolated from kraft pulp.** J. Wood Chem. Technol., 16:121-138, 1996.
- YANG, C-H.; YANG, S-F.; LIU, W-H. **Production of xylooligosaccharides from xylans by extracellular xylanases from *Thermobifida fusca*.** J. Agric. Food Chem., 55:3955-3959, 2007.
- YUAN, Q.P., ZHANG, H., QIAN, Z.M., YANG, X.J. **Pilot-plant production of xylo-oligosaccharides from corncob by steaming, enzymatic hydrolysis and nonfiltration.** J. Chem. Technol. Biot., 79:1073-1079, 2004.

- YUAN, Q.P., WANG, J.D.; ZHANG, H., QIAN, Z.M. **Effect of temperature shift on production of xylanase by *Aspergillus niger***. *Process Biochem.*, 40:3255–3257, 2005.
- ZANOELO, F.F.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENZI, H.F.; JORGE, J.A. **Purification and biochemical properties of a thermostable xilose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum***. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 31:170-176, 2004.
- ZERI – Zeri Emissions Research Initiative. Site: <http://www.zeri.org.br> Acesso em 20/08/08.
- ZHAO, J.; LI, X.; QU, Y.; GAO, P. **Xylanase pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat straw**. *Enz. Microbial Technol.*, 30:734-740, 2002.

(<http://www.portaldoexportador.gov.br>)

(<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>)

7. Conclusões

Considerando os resultados obtidos durante a condução deste trabalho, pode-se concluir que:

Os fungos *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus* apresentaram grande potencial quanto à produção de enzimas xilanolíticas quando comparado com outros fungos filamentosos. Estes microrganismos produziram altos níveis xilanolíticos em fermentação submersa utilizando xilana como fonte de carbono. Farelo de trigo apresentou-se um excelente indutor de xilanases e β -xilosidases, o que representa um diferencial econômico considerando o custo deste produto. Além disso, essas enzimas apresentaram algumas propriedades físicas, em relação à temperatura e ao pH, bastante interessantes do ponto de vista biotecnológico.

No biobranqueamento com as xilanases de *A. terricola* e *A. ochraceus* registraram-se significativa redução do número kappa, aumento da alvura e pouca ou nenhuma redução na viscosidade, mostrando uma possível aplicação prática destas enzimas no setor industrial.

A utilização de licores de autohidrólise de resíduos agroindustriais, como o farelo de trigo e sabugo de milho, na produção de enzimas xilanolíticas foi promissora, visto que os níveis enzimáticos foram superiores àqueles obtidos utilizando somente o resíduo, ou até mesmo xilana. A disponibilidade regional desses resíduos é uma alternativa promissora para a produção de enzimas do sistema xilanolítico, contribuindo assim para a valorização destes resíduos agroindustriais, e conseqüentemente a diminuição do impacto ambiental causado pelo setor agroindustrial.

A fermentação submersa em dois-estágios foi o tipo de cultivo escolhido para a purificação das xilanases e β -xilosidases produzidas pelo fungo *A. ochraceus*, visto que neste tipo de fermentação os níveis protéicos foram menores, o que facilita tal processo. *A. ochraceus* produziu múltiplas xilanases, com diferenças em algumas propriedades bioquímicas, tais como, especificidade ao substrato e estabilidade térmica, isto provavelmente

devido à heterogeneidade da xilana. Além disso, este microrganismo produziu altos níveis de β -xilosidase extracelular que também foi purificada por processos cromatográficos. A produção de β -xilosidase extracelular faz de *A. ochraceus*, um microrganismo com potencial para a aplicação industrial, visto que esta enzima é frequentemente intracelular, mas pode estar associada à membrana, e a necessidade de lise celular para a obtenção de um produto é inviável no setor industrial.

As isoformas xilanolíticas provavelmente pertencem à família G/11, visto que as mesmas apresentaram baixas massas moleculares, ausência de atividade celulásica e são proteínas ricas em folha β em sua estrutura. Proteínas de baixa massa molecular são úteis no branqueamento da polpa de celulose, visto que elas podem penetrar mais facilmente na estrutura da parede da fibra de celulose, o que pode explicar os bons resultados obtidos no biobranqueamento da polpa de celulose utilizando xilanases brutas de *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus*.

8. Apêndice

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

| | 0 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,6 | 0,7 | 0,8 | 0,9 |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 0,8971 | 0,8973 | 0,8975 | 0,8977 | 0,8979 | 0,8982 | 0,8984 | 0,8986 | 0,8988 | 0,8990 |
| 2 | 0,8992 | 0,8994 | 0,8996 | 0,8998 | 0,9000 | 0,9003 | 0,9005 | 0,9007 | 0,9009 | 0,9011 |
| 3 | 0,9013 | 0,9015 | 0,9017 | 0,9019 | 0,9021 | 0,9024 | 0,9026 | 0,9028 | 0,9030 | 0,9032 |
| 4 | 0,9034 | 0,9036 | 0,9038 | 0,9040 | 0,9042 | 0,9045 | 0,9047 | 0,9049 | 0,9051 | 0,9053 |
| 5 | 0,9055 | 0,9057 | 0,9059 | 0,9061 | 0,9063 | 0,9066 | 0,9068 | 0,9070 | 0,9072 | 0,9074 |
| 6 | 0,9076 | 0,9078 | 0,9080 | 0,9082 | 0,9084 | 0,9087 | 0,9089 | 0,9091 | 0,9093 | 0,9095 |
| 7 | 0,9097 | 0,9099 | 0,9101 | 0,9103 | 0,9105 | 0,9108 | 0,9110 | 0,9112 | 0,9114 | 0,9116 |
| 8 | 0,9118 | 0,9120 | 0,9122 | 0,9124 | 0,9126 | 0,9129 | 0,9131 | 0,9133 | 0,9135 | 0,9137 |
| 9 | 0,9139 | 0,9141 | 0,9143 | 0,9145 | 0,9147 | 0,9150 | 0,9152 | 0,9154 | 0,9156 | 0,9158 |
| 10 | 0,9160 | 0,9162 | 0,9164 | 0,9166 | 0,9168 | 0,9171 | 0,9173 | 0,9175 | 0,9177 | 0,9179 |
| 11 | 0,9181 | 0,9183 | 0,9185 | 0,9187 | 0,9189 | 0,9192 | 0,9194 | 0,9196 | 0,9198 | 0,9200 |
| 12 | 0,9202 | 0,9204 | 0,9206 | 0,9208 | 0,9210 | 0,9213 | 0,9215 | 0,9217 | 0,9219 | 0,9221 |
| 13 | 0,9223 | 0,9225 | 0,9227 | 0,9229 | 0,9231 | 0,9234 | 0,9236 | 0,9238 | 0,9240 | 0,9242 |
| 14 | 0,9244 | 0,9246 | 0,9248 | 0,9250 | 0,9252 | 0,9255 | 0,9257 | 0,9259 | 0,9261 | 0,9263 |
| 15 | 0,9265 | 0,9267 | 0,9269 | 0,9271 | 0,9273 | 0,9276 | 0,9278 | 0,9280 | 0,9282 | 0,9284 |
| 16 | 0,9286 | 0,9288 | 0,9290 | 0,9292 | 0,9294 | 0,9297 | 0,9299 | 0,9301 | 0,9303 | 0,9305 |
| 17 | 0,9307 | 0,9309 | 0,9311 | 0,9313 | 0,9315 | 0,9318 | 0,9320 | 0,9322 | 0,9324 | 0,9326 |
| 18 | 0,9328 | 0,9330 | 0,9332 | 0,9334 | 0,9336 | 0,9339 | 0,9341 | 0,9343 | 0,9345 | 0,9347 |
| 19 | 0,9349 | 0,9351 | 0,9353 | 0,9355 | 0,9357 | 0,9360 | 0,9362 | 0,9364 | 0,9366 | 0,9368 |
| 20 | 0,9370 | 0,9372 | 0,9374 | 0,9376 | 0,9378 | 0,9381 | 0,9383 | 0,9385 | 0,9387 | 0,9389 |
| 21 | 0,9391 | 0,9393 | 0,9395 | 0,9397 | 0,9399 | 0,9402 | 0,9404 | 0,9406 | 0,9408 | 0,9410 |
| 22 | 0,9412 | 0,9414 | 0,9416 | 0,9418 | 0,9420 | 0,9423 | 0,9425 | 0,9427 | 0,9429 | 0,9431 |
| 23 | 0,9433 | 0,9435 | 0,9437 | 0,9439 | 0,9441 | 0,9444 | 0,9446 | 0,9448 | 0,9450 | 0,9452 |
| 24 | 0,9454 | 0,9456 | 0,9458 | 0,9460 | 0,9462 | 0,9465 | 0,9467 | 0,9469 | 0,9471 | 0,9473 |
| 25 | 0,9475 | 0,9477 | 0,9479 | 0,9481 | 0,9483 | 0,9486 | 0,9488 | 0,9490 | 0,9492 | 0,9494 |
| 26 | 0,9496 | 0,9498 | 0,9500 | 0,9502 | 0,9504 | 0,9507 | 0,9509 | 0,9511 | 0,9513 | 0,9515 |
| 27 | 0,9517 | 0,9519 | 0,9521 | 0,9523 | 0,9525 | 0,9528 | 0,9530 | 0,9532 | 0,9534 | 0,9536 |
| 28 | 0,9538 | 0,9540 | 0,9542 | 0,9544 | 0,9546 | 0,9549 | 0,9551 | 0,9553 | 0,9555 | 0,9557 |
| 29 | 0,9559 | 0,9561 | 0,9563 | 0,9565 | 0,9567 | 0,9570 | 0,9572 | 0,9574 | 0,9576 | 0,9578 |
| 30 | 0,9580 | 0,9582 | 0,9584 | 0,9586 | 0,9588 | 0,9591 | 0,9593 | 0,9595 | 0,9597 | 0,9599 |
| 31 | 0,9601 | 0,9603 | 0,9605 | 0,9607 | 0,9609 | 0,9612 | 0,9614 | 0,9616 | 0,9618 | 0,9620 |
| 32 | 0,9622 | 0,9624 | 0,9626 | 0,9628 | 0,9630 | 0,9633 | 0,9635 | 0,9637 | 0,9639 | 0,9641 |
| 33 | 0,9643 | 0,9645 | 0,9647 | 0,9649 | 0,9651 | 0,9654 | 0,9656 | 0,9658 | 0,9660 | 0,9662 |
| 34 | 0,9664 | 0,9666 | 0,9668 | 0,9670 | 0,9672 | 0,9675 | 0,9677 | 0,9679 | 0,9681 | 0,9683 |
| 35 | 0,9685 | 0,9687 | 0,9689 | 0,9691 | 0,9693 | 0,9696 | 0,9698 | 0,9700 | 0,9702 | 0,9704 |
| 36 | 0,9706 | 0,9708 | 0,9710 | 0,9712 | 0,9714 | 0,9717 | 0,9719 | 0,9721 | 0,9723 | 0,9725 |
| 37 | 0,9727 | 0,9729 | 0,9731 | 0,9733 | 0,9735 | 0,9738 | 0,9740 | 0,9742 | 0,9744 | 0,9746 |
| 38 | 0,9748 | 0,9750 | 0,9752 | 0,9754 | 0,9756 | 0,9759 | 0,9761 | 0,9763 | 0,9765 | 0,9767 |
| 39 | 0,9769 | 0,9771 | 0,9773 | 0,9775 | 0,9777 | 0,9780 | 0,9782 | 0,9784 | 0,9786 | 0,9788 |
| 40 | 0,9790 | 0,9792 | 0,9794 | 0,9796 | 0,9798 | 0,9801 | 0,9803 | 0,9805 | 0,9807 | 0,9809 |
| 41 | 0,9811 | 0,9813 | 0,9815 | 0,9817 | 0,9819 | 0,9822 | 0,9824 | 0,9826 | 0,9828 | 0,9830 |
| 42 | 0,9832 | 0,9834 | 0,9836 | 0,9838 | 0,9840 | 0,9843 | 0,9845 | 0,9847 | 0,9849 | 0,9851 |
| 43 | 0,9853 | 0,9855 | 0,9857 | 0,9859 | 0,9861 | 0,9864 | 0,9866 | 0,9868 | 0,9870 | 0,9872 |
| 44 | 0,9874 | 0,9876 | 0,9878 | 0,9880 | 0,9882 | 0,9885 | 0,9887 | 0,9889 | 0,9891 | 0,9893 |
| 45 | 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 $P = (V_b - V_a) \times 2$, onde $V_b = 49,2$ mL e $V_a = 30,9$ mL, então $P = 36,6$. Pela tabela $FP = 0,9719$.

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

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

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](#)