



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Câmpus de São José do Rio Preto

Erica Aparecida Santos Bistratini

Enzimas degradadoras de parede celular de plantas produzidas por  
*Rhizoctonia solani* AG-1 IA: estudo da produção extracelular,  
purificação e caracterização.

São Jose do Rio Preto  
2016

Erica Aparecida Santos Bistratini

Enzimas degradadoras de parede celular de plantas produzidas por  
*Rhizoctonia solani* AG-1 IA: estudo da produção extracelular,  
purificação e caracterização.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Processo:  
2013/03692-0

Orientador: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Heloiza Ferreira  
Alves do Prado

São José do Rio Preto - SP  
2016

Bistratini, Erica Aparecida Santos.

Enzimas degradadoras de parede celular de plantas produzidas por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA : estudo da produção extracelular, purificação e caracterização / Erica Aparecida Santos Bistratini. -- São José do Rio Preto, 2016

213 f. : il., tabs.

Orientador: Heloiza Ferreira Alves do Prado

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Enzimas de fungos. 3. Fungos fitopatogênicos. 4. Enzimas microbianas. 5. Xilanases. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 663.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Erica Aparecida Santos Bistratini

Enzimas degradadoras de parede celular de plantas produzidas por  
*Rhizoctonia solani* AG-1 IA: estudo da produção extracelular,  
purificação e caracterização.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Processo:  
2013/03692-0

### Comissão Examinadora

Prof.<sup>a</sup>. Dra. Heloiza Ferreira Alves do Prado  
UNESP – Ilha Solteira  
Orientador

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Fabiana da Fonseca Zanoelo  
UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof.<sup>a</sup>. Dra. Ana Maria Cassiolato  
UNESP – Ilha Solteira

Prof. Dr. Paulo César Ceresini  
UNESP – Ilha Solteira

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
18 de novembro de 2016

## DEDICATÓRIA

*A Deus.*

*O Senhor é a minha luz e a minha salvação: a quem temerei?*

*O Senhor é a força da minha vida: de quem me recearei?*

*Quando os malvados, meus adversários e meus inimigos, se chegaram contra mim,  
para comerem as minhas carnes, tropeçaram e caíram.*

*Ainda que um exército me cercasse, o meu coração não temeria: ainda que a guerra se  
levantasse contra mim, nisso confiaria.*

*Uma coisa pedi ao Senhor, e a buscarei: que possa morar na casa do Senhor todos os  
dias da minha vida, para contemplar a formosura do Senhor, e inquirir no seu templo.*

*Porque no dia da adversidade me esconderá no seu pavilhão: no cealto do seu  
tabernáculo me esconderá: pôr-me-á sobre uma rocha.*

*Salmos 27: 1-5*

## AGRADECIMENTOS

*É chega ao fim mais uma etapa. Muitas lutas, muitas incertezas e questionamentos surgiram durante esse tempo, afinal foram 4 anos, e em meio a tudo isso muitas pessoas fizeram parte desses momentos, compartilhando emoções e ensinamentos e eu não poderia deixar de agradecer por todo apoio, paciência e por todas as contribuições a este trabalho. Muito obrigada por todo carinho e pelas orações.*

*Primeiramente agradeço a Deus, nada teria sido possível sem o agir de Dele em minha vida, me dando sabedoria, entendimento, me consolando nos momentos de desespero e me fortalecendo para o futuro.*

*Aos meus pais, Dalmir Luz dos Santos e Maria Margarida de Oliveira Santos e as minhas irmãs, Fernanda Cristina dos Santos e Layla Gabriella dos Santos pelo amor incondicional e por todo apoio.*

*Aos meus sogros Mateus Antônio Bistratini e Denize Prado Bistratini, as minhas cunhadas Aline Prado Bistratini e Alessandra Bistratini Simarelli, ao meu cunhado Sérgio Eduardo Simarelli e aos meus sobrinhos João Fernando Simarelli, André Simarelli, Samuel Simarelli e Jose Eduardo Simarelli, por sempre se preocuparem comigo, por todo carinho e por sempre me colocarem em suas orações.*

*Ao meu Pastor Nelson Leomar Gewehr, e a todos os irmãos da Igreja Batista Central de Ilha Solteira, pelo apoio e pelas orações.*

*Aqueles amigos que participaram até colocando a mão na massa, Heidi de Oliveira Batista, Samanta Cristiene de Oliveira, Aline Aparecida Reis e Cintia Lionela, muito obrigada pelas horas que dispensaram do seu tempo para me ajudar no desenvolvimento desse projeto.*

*Aos meus amigos queridos do Canadá, Pastor Willian Horne e sua esposa Julie Horne, Carter e Chris Leshuk, muito obrigada por sempre me apoiarem, me incentivarem e pelas orações.*

*A minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Heloiza Ferreira Alves do Prado, por ter me aceitado nesse desafio, pela orientação, confiança, amizade, pelas nossas conversas descontraídas e por todo conhecimento transmitido.*

*Agradeço a FAPESP pela concessão da bolsa de pesquisa e a todo suporte financeiro ao projeto, sem o qual, este projeto não teria se tornado realidade. Agradeço também a concessão da bolsa de estágio e pesquisa no exterior, a qual me proporcionou grande aprendizado e crescimento profissional.*

*Ao professor Bernard Robert Glick, por ter me aceitado durante em seu laboratório na University of Waterloo e por todo ensinamento passado durante meu estágio de pesquisa no Canadá e ao Professor David Rose por todo apoio prestado ao projeto. Agradeço também a todos do laboratório de biologia da University of Waterloo, Daiana Duca, Maria Carmem Orozco Mosqueda, Hayfa Gharsa e em especial a Jin Duan por ter me auxiliado e me ensinado muitas técnicas importantes para o desenvolvimento do projeto.*

*Ao professor Hamilton Cabral, por ter me aceitado e me orientado durante a realização das atividades finais do projeto. Muito obrigada a toda equipe do laboratório de Tecnologia Enzimática, Luciana Coitinho, Youssef Neto, Ana Cláudia Siquiera, Sandra Lazari Gentil, Juliana Abigail Leite, Rafael Peduzzi e principalmente a técnica Nathalia Gonsales da Rosa, a qual esteve ao meu lado todo momento, me auxiliando, me ensinando, me apoiando, me aconselhando e ate aguentado meus choros quando as análises não saiam como esperado, muito obrigada.*

*E por fim, a aquele que esteve do meu lado o tempo todo, me viu rir por uma análise bem-sucedida e me viu chorar por uma, ou melhor, muitas análises que não deram certo. Que me consolou, que comemorou comigo, que colocou a mão na massa e aprendeu a pipetar e a fazer muitas planilhas para me ajudar, passou madrugadas comigo no laboratório ou apenas esteve do meu lado, em casa, enquanto escrevia relatórios. Aquele que no meio dessa jornada deixou de ser meu namorado, passou a ser noivo e hoje é meu esposo. Mateus Prado Bistratini, meu amor, muito obrigada por todo seu apoio, por toda sua ajuda e incentivo. Essa luta não foi fácil, mas tenho certeza que teria sido muito mais difícil se eu não tivesse você do meu lado.*

*Há todos muito obrigada, pois cada um teve uma contribuição para que esse trabalho fosse concluído.*

## RESUMO

O presente trabalho configura-se no estudo da produção de enzimas degradadoras de parede celular de plantas (EDPCP), produzida por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA obtido de culturas de arroz, braquiária e soja. As enzimas inicialmente estudadas foram celulases,  $\beta$ -glucosidase, xilanase, pectinases, amilase, lípases e proteases excretadas extracelularmente para o meio de cultivo. Foram avaliados 87 isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, e adotado o cultivo em estado sólido utilizando farelo de trigo como fonte de carbono inicial para indução da produção extracelular das enzimas e avaliar o potencial dos isolados. O estudo do efeito da fonte de carbono foi realizado com cinco isolados de cada tipo de cultura, os quais foram cultivados em farelo de trigo, braquiária triturada, palha de soja, palha de milho, sabugo de milho e palha de arroz. Os melhores resultados para atividade xilanase foi do isolado PA\_B1F6 obtido de culturas de braquiária quando cultivado em farelo de trigo ( $15,82 \text{ U mL}^{-1}$ ), para CMCCase e Avicelase os melhores resultados foram obtidos com os isolados MA\_217 e TO\_064 obtidos de culturas de soja quando cultivado em palha de milho ( $3,24 \text{ U mL}^{-1}$ ) e palha de soja ( $2,91 \text{ U mL}^{-1}$ ), respectivamente, e para  $\beta$ -glucosidase os melhores resultados foram obtidos com o isolado TO\_022 ( $2,75 \text{ U mL}^{-1}$ ) obtido de cultura de soja cultivado em braquiária. A atividade de amilase foi superior no cultivo em farelo de trigo para o isolado ROB4D7 ( $142,88 \text{ U mL}^{-1}$ ) obtido da cultura de braquiária e a pectinase do isolado PA\_B1F6 ( $17,69 \text{ U mL}^{-1}$ ) obtido da cultura de braquiária quando cultivado em substrato braquiária. O isolado MT\_S085 obtido da cultura de soja apresentou melhor atividade de protease ( $1154,52 \text{ UAP mL}^{-1}$ ) no cultivo com farelo de trigo e melhor atividade lípase ( $30,57 \text{ U mL}^{-1}$ ) quando cultivado em substrato de braquiária. Os cinco isolados de cada tipo de cultura foram cultivados nos substratos que indicaram melhor atividade xilanase com avaliação do perfil de atividade ao longo do tempo. Os isolados obtidos de cultura de braquiária foram os que exibiram maiores produções de atividade da enzima xilanase. Os cultivos utilizando braquiária triturada e farelo de trigo como substrato foram os que proporcionaram maior atividade xilanolítica, a qual, em geral,

ocorreu com 120h. A xilanase bruta produzida pelos isolados obtidos de cultura de arroz (RR\_A23), braquiária (PA\_B1F6) e soja (MT\_S085) mostrou temperatura ótima em 55 °C. O pH ótimo dessas xilanases foi pH 6,0 para o isolado RR\_A23, pH 6,5 para PA\_B1F6 e pH 7,5 para MT\_S085. O pH de estabilidade ficou na faixa de pH 4,0 a 7,5. Foi possível verificar que as xilanases produzidas por esses isolados diferem com o tipo de substrato utilizado no cultivo verificado eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Foram identificadas 35 sequências gênicas para a xilanase em *Rhizoctonia solani*, porém, não há até momento, sequência gênica descrita para xilanase produzida por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. Foram encontradas 4 sequências gênicas de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA que apresentaram maior similaridade quando comparadas a sequências de xilanases descrita para outros grupos da mesma espécie. Desta forma foi realizada a purificação de uma xilanase produzida por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA isolado da cultura de braquiária PA\_B1F6. O cultivo em estado sólido foi realizado utilizando 5g de farelo de trigo com 0,5g de xilana e a purificação dessa xilanase necessitou de concentração por ultra filtração, precipitação com etanol e troca iônica em Hitrap SP Sepharose FF, para recuperar 4% da atividade inicial. A massa molecular foi estimada em 33,11 kDa. A xilanase purificada apresentou atividade ótima a 55 °C e maior atividade em pH 6,5. A enzima sofreu inibição por íons e agentes químicos e os parâmetros cinéticos para  $K_m$ ,  $V_{max}$ , utilizando xilana de bétula (birchwood), como substrato foram 1,42 mg mL<sup>-1</sup>, 1415 μmol L<sup>-1</sup> mim<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Palavras chaves:** Fungo fitopatogênico, Enzimas microbianas, Xilanase, sequências gênicas.

## ABSTRACT

The Present work covers the study of the production of degradative enzymes from plant cell wall (EDPCP) produced by *Rhizoctonia solani* AG-1 IA isolated from rice, signalgrass and soybean. The enzymes studied initially were cellulases,  $\beta$ -glucosidase, xylanase, pectinase, amylase, lipase and proteases extracellularly secreted into the culture medium. It was evaluated 87 isolates of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA and adopted cultivation in the solid state using wheat bran as the initial carbon source for inducing the production of extracellular enzymes and assess the potential isolates. The study of the effect of carbon source was performed with five isolates of each type of culture which were cultured on wheat bran, comminuted signalgrass, soybean straw, corn stover, corn cobs and rice straw. The best result results for xylanase activity was the isolated PA\_B1F6 from cultures of signalgrass grown in wheat bran ( $15.82 \text{ U mL}^{-1}$ ) to Avicelase and CMCase and the best results were obtained for the isolated of soybean MA\_217 and TO\_064 when grown corn straw ( $3.24 \text{ U mL}^{-1}$ ) and soybean straw ( $2.91 \text{ U mL}^{-1}$ ), respectively. For  $\beta$ -glucosidase the best results were obtained for the isolated of soybean TO\_022 ( $2.75 \text{ U mL}^{-1}$ ) grown in signalgrass. The amylase activity was higher in culture with wheat bran for isolated ROB4D7 from the signalgrass culture ( $142.88 \text{ U mL}^{-1}$ ). The best pectinase activity was by the PA\_B1F6 isolated signalgrass culture ( $17.69 \text{ U mL}^{-1}$ ) when grown in signalgrass as substrate. The MT\_S085 isolated from soybean showed better protease activity (UAP  $1154.52 \text{ mL}^{-1}$ ) in culture with wheat bran. For this same isolated, but when grown in signalgrass substrate was observed the best lipase activity ( $30.57 \text{ U mL}^{-1}$ ). The five isolates of each type were grown in culture substrates that indicated better xylanase activity to evaluate the activity profile over time. Isolates obtained from signalgrass culture were those who generally had higher levels of xylanase activity. Crops using signalgrass and wheat bran as substrate presented the best xylanase activity and, in general, the cultivation time with greater enzymatic activity in 120h. The crude xylanase produced by rice culture isolates (RR\_A23), signalgrass (PA\_B1F6) and soybean (MT\_S085) showed

optimum temperature at 55 ° C. The optimal pH of these xylanase was pH 6.0 for isolated RR\_A23, pH 6.5 for PA\_B1F6, and pH 7.5 for MT\_S085. The pH was stable at pH 4.0 to 7.5. It was possible to verify that the xylanases produced by these isolates differ with the type of substrate used in cultivation when subjected to polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE. They were identified 35 gene sequences for the xylanase in *Rhizoctonia solani*, however, there is not until now, gene sequence described for xylanase produced by *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. It was found 4 gene sequences of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA that showed greater similarity when compared to sequences of xylanase described for other groups of the same species. Thus, it was performed the purification of a xylanase produced by *Rhizoctonia solani* AG-1 IA isolated PA\_B1F6 from the signalgrass culture. The cultivation in the solid state was carried out using wheat bran with xylan. For the purification of this xylanase concentration was performed by ultrafiltration, ethanol precipitation and ion exchange in Hitrap SP Sepharose FF, which can recover 4% of the initial activity. The molecular mass was estimated as 33.11 kDa. The purified xylanase showed optimal activity at 55 ° C and higher activity at pH 6.5. The enzyme was inhibited by ions and modifying agents and the kinetic parameters  $K_m$ ,  $V_{max}$ , using xylan birch (beerchwood) as substrate were  $1.42 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $1415 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , respectively.

**Keywords:** Phytopathogenic fungus, microbial enzymes, xylanase, genomic sequences.

## **ORGANIZAÇÃO DOS CAPÍTULOS**

A presente tese foi organizada na forma de capítulos, conforme descrito a seguir.

### **Capítulo 1: Introdução, Revisão Bibliográfica e objetivos**

Nesta seção, estão apresentados: uma breve introdução e motivação para realização desta tese, a revisão bibliográfica sobre os principais tópicos abordados e os objetivos delineados para o trabalho.

### **Capítulo 2: Produção de enzimas degradadoras de parede celular e caracterização físico-química da xilanase em extrato bruto.**

Descrição do processo de produção das enzimas degradadoras de parede celular de plantas através de fermentação em estado sólido. Na fermentação em estado sólido testou-se xilanase, CMCase, Avicelase,  $\beta$ -glucosidase, pectinase, protease, lipase e amilase. Após a produção inicial foi realizado teste variando as fontes de carbono. A xilanase produzida em farelo de trigo foi utilizada para caracterização físico-química

### **Capítulo 3: Otimização da produção, análise de nucleotídeos e purificação parcial de xilanase de isolados *Rhizoctonia solani* AG-1 IA obtidos de cultura de arroz, soja e braquiária**

O capítulo tem o objetivo de descrever a produção extracelular das enzimas degradadoras de parede celular sob cultivo em estado sólido e cultivo submerso em diferentes substratos e a purificação parcial da xilanase produzida por cultivo em estado sólido em farelo de trigo e farelo de trigo com xilana através do método de

cromatografia em gel.

#### **Capítulo 4: Purificação e caracterização de xilanase produzida por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA isolado de cultura braquiária.**

Descrição do processo de purificação completa e caracterização da xilanase produzida por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. Foi realizada a caracterização da enzima bruta utilizada na purificação e enzima pura quanto à atividade em função do pH e temperatura, às estabilidades térmica e de pH, à especificidade ao efeito da concentração de substrato e a estabilidade ao efeito de íons e agentes químicos.

#### **Capítulo 5: Considerações finais**

Apresentação das principais conclusões obtidas no decorrer desta tese e algumas sugestões para trabalhos futuros.

#### **Anexos**

Os dados sobre georreferenciamento dos isolados utilizados neste trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Esquema da célula vegetal com detalhes das diferentes camadas da parede celular secundária (S1, S2 e S3), a parede primária e a lamela média entre as paredes primárias de células adjacentes.....   | 32 |
| Figura 2. Parede celular primária e suas estruturas.....   | 32 |
| Figura 3. Estruturas parciais dos componentes lignocelulósicos e derivados. ....   | 33 |
| Figura 4. Ilustração da estrutura da parede celular de plantas, demonstrando as diferentes camadas e seus principais componentes .....   | 34 |
| Figura 5. Estrutura geral da pectina. (A) Visão geral, mostrando rami cações laterais; (B) cadeia central de ácido poligalacturônico com grupos carboxílicos metilados destacados em vermelho .....  | 38 |
| Figura 6. Estrutura química da amilose. ....   | 39 |
| Figura 7. Estrutura química da amilopectina. ....  | 40 |
| Figura 8. Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico. ....  | 43 |
| Figura 9. Planta hipotética da estrutura do xilana, mostrando os diferentes grupos substituintes e o ponto de clivagem das xilanases microbianas.....  | 44 |
| Figura 10. Modo de ação enzimática das pectinases em uma molécula de pectina. PMGL: polimetilgalacturonato liase. PMG: polimetilgalacturonase. PMGE: polimetilgalacturonato esterase (pectina esterase). PGL: poligalacturonato liase (pectato liase). PG: poligalacturonase. .... | 46 |
| Figura 11. Reações catalisadas por lipases .....   | 51 |
| Figura 12. Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. (●) molécula glicose com extremidade redutora; (o) molécula de glicose sem extremidade redutora; (→) indicam o ponto de clivagem preferido na molécula de amido. ....                  | 53 |
| Figura 13. Representação da ação da enzima $\alpha$ -amilase sobre as frações de amido (amilose e amilopectina).....   | 55 |
| Figura 14. Efeito da fonte carbono, na atividade enzimática para os isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA RR_A43, RR_A41, RR_A33, RR_A30 e RR_A23 oriundos de cultura de   |    |

|  |     |
|--|-----|
| arroz, cultivados sob fermentação em estado sólido por 96h a 25 °C. a) CMCCase; b) Avicelase, c) $\beta$ -glucosidase d) Xilanase, e e) Amilase .....  | 98  |
| Figura 15. Efeito da fonte carbono, na atividade enzimática de Pectinase, Protease e Lipase para a isolado RR_A23, cultivados sob fermentação em estado sólido por 96h. a) Atividade Pectinase; b) Atividade Protease e c) Atividade Lipase.....   | 99  |
| Figura 16. Efeito da fonte carbono na atividade enzimática para os isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA PA_B1F6, PA_B1B6, RO_B3B4, ROB1A3 e RO_B4D7, oriundas de braquiária cultivados sob fermentação em estado sólido por 96h a 25 °C. a) CMCCase; b) Avicelase, c) $\beta$ -glucosidase d) Xilanase, e e) Amilase. ....                                      | 100 |
| Figura 17. Efeito da fonte carbono, na atividade enzimática de pectinase, protease e lipase para a isolado <i>R. solani</i> AG-1 IA oriundo de braquiária PA_B1F6, cultivados sob fermentação em estado sólido por 96h. a) Atividade Pectinase; b) Atividade Protease e c) Atividade Lipase.....   | 101 |
| Figura 18. Efeito da fonte carbono, na atividade enzimática para os isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA MA_159, TO_022, MA_217, MT_S085 e TO_064, oriundos de cultura de soja, cultivados sob fermentação em estado sólido por 96h a 25 °C. a) CMCCase; b) Avicelase, c) $\beta$ -glucosidase d) Xilanase, e e) Amilase. ....                                  | 103 |
| Figura 19. Efeito da fonte carbono, na atividade enzimática de pectinase, protease e lipase para a isolado de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, oriundos de culturas de soja MT_S085, cultivados sob fermentação em estado sólido por 96h. a) Atividade Pectinase; b) Atividade Protease e c) Atividade Lipase.....   | 104 |
| Figura 20. Atividades CMCCase e Avicelase (U mL <sup>-1</sup> ) para os isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA RR_A43, RR_A41, RR_A33, RR_A30 e RR_A23 oriundos de cultura de arroz, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) e b) braquiária; c) e d) farelo de trigo e e) e f) palha de soja. .... | 109 |
| Figura 21. Atividades xilanase (U mL <sup>-1</sup> ) para os isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA RR_A43, RR_A41, RR_A33, RR_A30 e RR_A23, oriundos de cultura de arroz, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) braquiária; b) farelo de trigo e c) palha de soja. ....                          | 110 |
| Figura 22. Atividade amilase (UmL <sup>-1</sup> ) para os isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA RR_A43, RR_A4, RR_A33, RR_A30 e RR_A23, oriundos de cultura de arroz, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) braquiária; b) farelo de trigo e c) palha de soja. ....                              | 111 |

- Figura 23. Atividades CMCase e Avicelase (U mL<sup>-1</sup>) para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA PA\_B1F6, PA\_B1B6, RO\_B3B4, ROB1A3 e RO\_B4D7, oriundos de cultura de braquiária, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) e b) braquiária; c) e d) farelo de trigo e e) e f) palha de soja. .... 112
- Figura 24. Atividades xilanase (U mL<sup>-1</sup>) para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA PA\_B1F6, PA\_B1B6, RO\_B3B4, ROB1A3 e RO\_B4D7, oriundos de cultura de braquiária, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) braquiária; b) farelo de trigo e c) palha de soja. .... 113
- Figura 25. Atividade amilase (U mL<sup>-1</sup>) para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA PA\_B1F6, PA\_B1B6, RO\_B3B4, ROB1A3 e RO\_B4D7, oriundos de cultura de braquiária, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) braquiária; b) farelo de trigo e c) palha de soja. .... 113
- Figura 26. Atividades CMCase e Avicelase (U mL<sup>-1</sup>) para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA MA\_159, MA\_217, MT\_S085, TO\_022 e TO\_064, oriundos de culturas de soja, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) e b) braquiária; c) e d) farelo de trigo e e) e f) palha de soja. .... 114
- Figura 27. Atividades xilanase (U mL<sup>-1</sup>) para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA MA\_159, MA\_217, MT\_S085, TO\_022 e TO\_064, oriundos de culturas de soja, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) braquiária; b) farelo de trigo e c) palha de soja. .... 116
- Figura 28. Atividades amilase (U mL<sup>-1</sup>) para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA MA\_159, MA\_217, MT\_S085, TO\_022 e TO\_064, oriundos de culturas de soja, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) braquiária; b) farelo de trigo e c) palha de soja. .... 117
- Figura 29. Efeito da temperatura na atividade da xilanase produzida por isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundas de culturas de arroz (RR\_A23), braquiária (PA\_B1F6) e soja (MT\_S085) em tampão de acetato com xilana a 1% a pH 5,0..... 118
- Figura 30. Determinação de pH ótimo e efeito da estabilidade de pH na atividade da xilanase produzida por isolado de *Rhizoctonia solani* oriundo de culturas de arroz (RR\_A23), cultivada sob fermentação em estado sólido, usando farelo de trigo como fonte de carbono, após 96 horas de cultivo. Os tampões usados foram: MacIlvaine (pH 3.0-8.0) e glicine-NaOH (pH 8.0-11). .... 120
- Figura 31. Determinação de pH ótimo e efeito da estabilidade de pH na atividade da xilanase produzida por isolado de *Rhizoctonia solani* oriundo de culturas de *Braquiária* sp.

|  |     |
|--|-----|
| (PA_B1F6), cultivada sob fermentação em estado sólido, usando farelo de trigo como fonte de carbono, após 96 horas de cultivo. Os tampões usados foram: MacIlvaine (pH 3.0-8.0) e glicine-NaOH (pH 8.0-11).....  | 121 |
| Figura 32. Determinação de pH ótimo e efeito da estabilidade de pH na atividade da xilanase produzida por isolado de <i>Rhizoctonia solani</i> oriundo de culturas de soja (MT_S085), cultivada sob fermentação em estado sólido, usando farelo de trigo como fonte de carbono, após 96 horas de cultivo. Os tampões usados foram: MacIlvaine (pH 3.0-8.0) e glicine-NaOH (pH 8.0-11). ..... | 122 |
| Figura 33. Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE dos diferentes substratos obtidos por fermentação em estado sólido.....  | 123 |
| Figura 34. Atividade de Xilanase (U mL <sup>-1</sup> ) e de CMCCase (U mL <sup>-1</sup> ) de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA oriundos de cultura de arroz (RR_A41 e RR_A23), braquiária (PA_B1F6 e ROB4D7) e soja (MA_217 e MT_S085) usando farelo de trigo como substrato sob fermentação em estado sólido. ....  | 143 |
| Figura 35. Atividade de Xilanase (U mL <sup>-1</sup> ) de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA oriundos de cultura de arroz (RR_A41), braquiária (PA_B1F6) e soja (MA_217) usando farelo de trigo com xilana como substrato sob fermentação em estado sólido.....   | 144 |
| Figura 36. Atividade de CMCCase (U mL <sup>-1</sup> ) de isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA oriundos de cultura de arroz (RR_A41), braquiária (PA_B1F6) e soja (MA_217) usando farelo de trigo com xilana como substrato sob fermentação em estado sólido.....  | 144 |
| Figura 37. Atividade de xilanase (U mL <sup>-1</sup> ) e CMCCase (U mL <sup>-1</sup> ) dos isolados de cultura de arroz (RR_A41 e RR_A23), braquiária (PA_B1F6 e ROB4D7) e soja (MA_217 e MT_S085) sob fermentação líquida com farelo de trigo como substrato. ....  | 145 |
| Figura 38. Atividade de xilanase (U mL <sup>-1</sup> ) e CMCCase (U mL <sup>-1</sup> ) dos isolados de cultura de arroz (RR_A41 e RR_A23), braquiária (PA_B1F6 e ROB4D7) e soja (MA_217 e MT_S085) sob fermentação líquida com xilana como substrato. ....   | 146 |
| Figura 39. Alinhamento da sequência de proteína do <i>Rhizoctonia solani</i> AG-3 Rhs1AP (EUC63187.1) com as quatro sequências da espécie do fungo <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA que apresentaram maiores similaridades (ELU42220.1; ELU41328.1; ELU41329.1 e ELU40332.1) .....  | 148 |
| Figura 40. Resultado da análise <i>Protein</i> BLAST da sequência de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-3 Rhs1AP comparada com <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA mostrando os melhores alinhamentos. ....  | 150 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 41. Alinhamento da endo-1,4-beta-xilanase, parcial de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-3 Rhs1AP com a proteína glicosil hidrolase família 10 (ELU42220.1) de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA. ....  | 152 |
| Figura 42. Alinhamento da endo-1,4-beta-xilanase, parcial de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-3 Rhs1AP com a proteína glicosil hidrolase família 10 contendo domínio (ELU41328.1) de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA. ....                                 | 152 |
| Figura 43. Alinhamento da endo-1,4-beta-xilanase, parcial de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-3 Rhs1AP com a proteína glicosil hidrolase família 10 contendo domínio (ELU41329.1) de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA. ....                                 | 152 |
| Figura 44. Alinhamento da endo-1,4-beta-xylanase, parcial de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-3 Rhs1AP com a proteína glicosil hidrolase família 10 contendo domínio (ELU40332.1) de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA. ....                                 | 153 |
| Figura 45. Alinhamento das sequências de nucleotídeos para sequência de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-3 Rhs1AP com as sequências de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA que apresentaram maiores similaridades na análise da sequência de aminoácidos. .... | 154 |
| Figura 46. Eletroforese de DNA em gel de agarose 1% para os isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA obtidos de culturas de arroz, soja e braquiária.....   | 159 |
| Figura 47. Eletroforese de PCR em gel de agarose 1% para as amostras de DNA extraídas de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA obtidos de culturas de arroz, soja e braquiária.....  | 160 |
| Figura 48. Eletroforese de RNA e cDNA em gel de agarose 1% para os isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA obtidos de culturas de arroz, soja e braquiária.....  | 162 |
| Figura 49. Gel de acrilamida (10%) com amostras de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA isolado de diferentes hospedeiros sob fermentação sólida com farelo de trigo como substrato. ....   | 163 |
| Figura 50. Gel de poliacrilamida (15%) com amostras de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA isolado de diferentes hospedeiros sob fermentação sólida com farelo de trigo como substrato. ....   | 164 |
| Figura 51. Ultrafiltração com sistema Amicon de centrifugação para amostras de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA obtidos de diferentes hospedeiros cultivados sob fermentação sólida com farelo de trigo como substrato.....                             | 164 |
| Figura 52. Gel de poliacrilamida (15%) com amostras de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA obtido de diferentes hospedeiros usando fermentação sólida com farelo de trigo e xilana como substrato. ....  | 165 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 53. Perfil cromatográfico de filtração em gel utilizando Sephacryl S-200 usando enzima bruta obtida sob fermentação em estado sólido com farelo de trigo como substrato de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA. ....   | 166 |
| Figura 54. Perfil cromatográfico de gel filtração em Sephacryl S-200 usando enzima bruta obtida sob fermentação em estado sólido usando farelo de trigo e 0,5g de xilana como substrato de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA. ....  | 166 |
| Figura 55. SDS-PAGE para amostras de filtração em gel obtida por fermentação em estado sólido com farelo de trigo como substrato para o fungo <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA. ....   | 167 |
| Figura 56. SDS-PAGE para amostras de filtração em gel obtida por fermentação em estado sólido com farelo de trigo e 0,5g de xilana como substrato para o fungo <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA. ....  | 167 |
| Figura 57. SDS-PAGE das frações eluídas de cromatografia em gel agrupadas e concentradas utilizando extrato bruto obtido após fermentação em estado sólido com 5g de farelo de trigo e 0,5 g de xilana como substrato. ....   | 168 |
| Figura 58. Processo de purificação da proteína de xilanase do isolado PA_B1F6 obtido de cultura de braquiária do fungo <i>R. solani</i> AG-1 IA. ....   | 179 |
| Figura 59. Gel de poliacrilamida (12%) com isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA obtido de diferentes hospedeiros usando fermentação em estado sólido com Farelo de trigo, braquiária e farelo de trigo com xilana como substrato. ....   | 184 |
| Figura 60. Perfil cromatográfico de coluna de troca iônica do tipo Hitrap SP Sepharose FF do isolado PA_B1F6 do fungo <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA. ....   | 186 |
| Figura 61. Gel de poliacrilamida 12% com amostras eluídas em Hitrap SP Sepharose FF com tampão acetato da purificação da xilanase obtida de isolado de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, PA_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono. .... | 188 |
| Figura 62. Análise eletroforética por SDS-PAGE 12% (A) e Zimograma (B) das etapas de purificação da xilanase obtida de isolado de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, PA_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono. ....                      | 188 |
| Figura 63. Enzima purificada obtida por cromatografia de troca iônica com coluna Hitrap SP Sepharose FF em gel de poliacrilamida 12%. ....  | 189 |
| Figura 64. Estimativa da massa molecular de xilanase. Os coeficientes para as regressões foram calculados utilizando o programa Prism7. ....  | 189 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 65. Análise de pH ótimo para enzima bruta e enzima purificada da xilanase obtida de isolado de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, PA_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono. ....  | 191 |
| Figura 66. Efeito do pH na estabilidade da xilanase em extrato bruto e da xilanase purificada obtida de isolado de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, PA_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono. ....   | 192 |
| Figura 67. Efeito da temperatura na atividade xilanolítica da enzima bruta e enzima purificada obtida de isolado de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, PA_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono em tampão acetato de sódio 0,1M pH 6,5. .... | 193 |
| Figura 68. Temperatura de estabilidade da xilanase em extrato bruto obtido de isolado de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, PA_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono em tampão acetato de sódio 0,1M pH 6,5. ....                            | 195 |
| Figura 69. Temperatura de estabilidade da xilanase purificada obtido de isolado de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, PA_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono em tampão acetato de sódio 0,1M pH 6,5. ....                                  | 196 |
| Figura 70. Efeito da concentração do substrato xilana birchwood na velocidade da reação catalisada pela xilanase pura. ....   | 200 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Classificação das enzimas pécicas .....   | 47 |
| Tabela 2. Comparação das características da fermentação no estado sólido (FES) e da fermentação submersa (FSm) .....  | 58 |
| Tabela 3. Funções e aplicações das pectinases na indústria de alimentos e de vinhos .....   | 62 |
| Tabela 4. Aplicações das pectinases em diferentes segmentos industriais .....   | 63 |
| Tabela 5. Inúmeras aplicações industriais das proteases .....   | 64 |
| Tabela 6. Aplicações Industriais das Lipases .....  | 66 |
| Tabela 7. Proteína ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) e atividade xilanase ( $\text{U mL}^{-1}$ e $\text{U g}^{-1}$ de substrato) dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA oriundos da cultura de arroz, cultivados sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C. ....        | 89 |
| Tabela 8. Proteína ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) e atividade de Celulases ( $\text{U mL}^{-1}$ e $\text{U g}^{-1}$ de substrato) dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA oriundos da cultura de arroz, cultivados sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C. ....    | 90 |
| Tabela 9. Proteína ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) e atividade amilase ( $\text{U mL}^{-1}$ e $\text{U g}^{-1}$ de substrato) dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA oriundos da cultura de arroz, cultivados sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C. ....         | 91 |
| Tabela 10. Proteína ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) e atividade de celulases ( $\text{U mL}^{-1}$ e $\text{U g}^{-1}$ de substrato) dos isolados <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA oriundos de cultura de braquiária, cultivados sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C. .... | 92 |
| Tabela 11. Proteína ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) e atividade xilanase ( $\text{U mL}^{-1}$ e $\text{U g}^{-1}$ de substrato) dos isolados <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA oriundos de cultura de braquiária, cultivados sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C. ....     | 93 |
| Tabela 12. Proteína ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) e atividade amilase ( $\text{U mL}^{-1}$ e $\text{U g}^{-1}$ de substrato) dos isolados <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA oriundos de braquiária, cultivados sob fermentação solida, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C. ....                           | 93 |
| Tabela 13. Proteína ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) e atividade de celulases ( $\text{U mL}^{-1}$ e $\text{U g}^{-1}$ de substrato) dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA oriundos de cultura de soja, cultivados sob fermentação solida, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C. ....              | 94 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 14. Proteína ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) e atividade xilanase ( $\text{UmL}^{-1}$ e $\text{Ug}^{-1}$ de substrato) dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA oriundos de cultura de soja, cultivados sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C. .... | 94  |
| Tabela 15. Proteína ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) e atividade amilase ( $\text{U mL}^{-1}$ e $\text{U g}^{-1}$ de substrato) dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA oriundos de cultura de soja, cultivados sob fermentação solida, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C.....           | 95  |
| Tabela 16. Concentração lignocelulósica dos resíduos agrícolas (em % de base seca). ....   | 97  |
| Tabela 17. Análise de macro e micronutrientes dos resíduos agrícolas utilizados.....   | 97  |
| Tabela 18. Protocolo de reação de PCR usado para amplificação do gene de xilanase para ELU42220.1.....   | 140 |
| Tabela 19. Protocolo de reação de PCR usado para amplificação do gene de xilanase para ELU41328.1.....   | 140 |
| Tabela 20. Protocolo de reação de PCR usado para amplificação do gene de xilanase para ELU41329.1.....   | 141 |
| Tabela 21. Protocolo de reação de PCR usado para amplificação do gene de xilanase para WANG.....   | 141 |
| Tabela 22. Mix de reação usado para amplificação do gene de xilanase. ....   | 141 |
| Tabela 23, Amostras de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA isolados de diferentes hospedeiros....  | 163 |
| Table 24. Etapas de purificação da xilanase obtida de isolado de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, PA_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono.....   | 186 |
| Tabela 25. Efeito dos íons na atividade da enzima em extrato bruto e enzima purificada obtido de isolado de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, PA_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono. ....                             | 197 |
| Tabela 26. Efeito dos agentes modificadores na atividade da enzima em extrato bruto e enzima purificada obtido de isolado de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, PA_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono.....             | 199 |
| Tabela 27. Parâmetros cinéticos estimados baseados no modelo de Michaelis-Menten.....  | 201 |

# SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>CAPÍTULO 1 .....</b>   | <b>26</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....</b>  | <b>26</b> |
| <b>1.1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>  | <b>27</b> |
| <b>1.2. OBJETIVOS.....</b>  | <b>29</b> |
| <i>1.2.1. Objetivo Geral .....</i>  | <i>29</i> |
| <i>1.2.2. Objetivos Específicos.....</i>  | <i>29</i> |
| <b>1.3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | <b>30</b> |
| <i>1.3.1. Rhizoctonia solani.....</i>   | <i>30</i> |
| <i>1.3.2. Parede Celular Vegetal .....</i>  | <i>31</i> |
| <i>1.3.3. Enzimas .....</i>   | <i>41</i> |
| 1.3.3.1. Celulases .....  | 41        |
| 1.3.3.2. Hemiceluloses .....  | 44        |
| 1.3.3.3. Pectinase .....  | 45        |
| 1.3.3.4. Protease.....  | 48        |
| 1.3.3.5. Lipase.....  | 50        |
| 1.3.3.6. Enzimas Amilolíticas .....   | 52        |
| <i>1.3.4. Enzimas Degradadoras de Parede Celular de Plantas .....</i>   | <i>56</i> |
| <i>1.3.5. Processos Fermentativos para a Produção de Enzimas .....</i>  | <i>57</i> |
| <i>1.3.6. Aplicações Biotecnológicas das Enzimas .....</i>  | <i>58</i> |
| 1.3.6.1. Celulases .....  | 59        |
| 1.3.6.2. Hemicelulases .....  | 60        |
| 1.3.6.3. Pectinase .....  | 61        |
| 1.3.6.4. Protease.....  | 64        |
| 1.3.6.5. Lipase.....  | 65        |
| 1.3.6.6. Amilases.....  | 66        |
| <b>1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>68</b> |
| <b>CAPÍTULO 2 .....</b>   | <b>78</b> |
| <b>2. PRODUÇÃO DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE PAREDE CELULAR E<br/>CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA XILANASE EM EXTRATO BRUTO</b> | <b>78</b> |
| <b>2.1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>79</b> |
| <b>2.2. OBJETIVOS DO CAPÍTULO .....</b>   | <b>81</b> |
| <b>2.3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>82</b> |
| <i>2.3.1. Micro-organismo.....</i>  | <i>82</i> |
| <i>2.3.2. Enzimas .....</i>   | <i>82</i> |
| <i>2.3.3. Produção da enzima.....</i>   | <i>82</i> |
| 2.3.3.1. Fermentação em Estado Sólido.....  | 82        |
| <i>2.3.4. Determinação da Atividade Enzimática .....</i>  | <i>83</i> |
| 2.3.4.1. Determinação de atividade celulase, hemicelulase e pectinase .....   | 83        |
| 2.3.4.2. Determinação de atividade $\beta$ -glucosidase.....  | 83        |

|  |            |
|--|------------|
| 2.3.4.3. Determinação de atividade amilase .....   | 84         |
| 2.3.4.4. Determinação da atividade de Protease .....   | 85         |
| 2.3.4.5. Determinação da Atividade de Lipase .....   | 85         |
| <b>2.3.5. Determinação de proteína</b> .....   | <b>86</b>  |
| <b>2.3.6. Estudo do perfil de produção enzimática</b> .....  | <b>87</b>  |
| <b>2.3.7. Características Físico-Químicas</b> .....  | <b>87</b>  |
| 2.3.7.1. Temperatura Ótima .....   | 87         |
| 2.3.7.2. pH Ótimo e de estabilidade .....  | 87         |
| <b>2.3.8. Eletroforese e coloração</b> .....   | <b>88</b>  |
| <b>2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | <b>89</b>  |
| <b>2.4.1. Produção de enzimas</b> .....  | <b>89</b>  |
| 2.4.1.1. Isolados de cultura de arroz .....  | 89         |
| 2.4.1.2. Isolados de braquiária .....  | 91         |
| 2.4.1.3. Isolados de cultura de soja .....   | 91         |
| <b>2.4.2. Efeito da fonte carbono na produção de enzima</b> .....  | <b>96</b>  |
| 2.4.2.1. Isolados de Arroz .....   | 97         |
| 2.4.2.2. Isolados de Braquiária .....  | 100        |
| 2.4.2.3. Isolados de soja .....  | 102        |
| <b>2.4.3. Perfil de produção enzimática</b> .....  | <b>108</b> |
| 2.4.3.1. Isolados de arroz .....   | 108        |
| 2.4.3.2. Isolados de braquiária .....  | 108        |
| 2.4.3.3. Isolados de soja .....  | 111        |
| <b>2.4.4. Características Físico-Químicas</b> .....  | <b>117</b> |
| 2.4.4.1. Determinação da temperatura ótima .....   | 118        |
| 2.4.4.2. Determinação do pH ótimo e pH de estabilidade .....   | 119        |
| <b>2.4.5. Análise em SDS-PAGE da produção enzimática em diferentes substratos</b> .....  | <b>123</b> |
| <b>2.5. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO</b> .....  | <b>125</b> |
| <b>2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | <b>126</b> |
| <b>CAPITULO 3</b> .....  | <b>132</b> |
| <b>3. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO, ANÁLISE DE NUCLEOTÍDEOS E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE XILANASE DE ISOLADOS <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA OBTIDOS DE CULTURA DE ARROZ, SOJA E BRAQUIÁRIA</b> ..... | <b>132</b> |
| <b>3.1. INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>133</b> |
| <b>3.3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | <b>136</b> |
| <b>3.3.1. Micro-organismo</b> .....  | <b>136</b> |
| <b>3.3.2. Enzimas</b> .....  | <b>136</b> |
| <b>3.3.3. Produção da enzima</b> .....   | <b>136</b> |
| 3.3.3.1. Fermentação em Estado Sólido .....  | 136        |
| 3.3.3.2. Fermentação Estado Submerso .....   | 137        |
| <b>3.3.4. Determinação da Atividade Enzimática</b> .....   | <b>137</b> |
| 3.3.4.1. Determinação de atividade celulase e hemicelulase .....   | 137        |
| <b>3.3.5. Análises da sequências de nucleotídeos da enzima de estudo.</b> .....  | <b>138</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>3.3.6. Análises da sequência de nucleotídeos para proteína degradadoras de parede celular de planta</b> .....                           | 138        |
| 3.3.6.1. Extração do DNA genômico de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA.....  | 138        |
| 3.3.6.2. Extração do RNA genômico de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA.....  | 138        |
| 3.3.6.3. cDNA .....  | 138        |
| 3.3.6.4. Quantificação de DNA, RNA e cDNA.....   | 139        |
| 3.3.6.5. Gel de Agarose.....   | 139        |
| 3.3.6.6. Amplificação do gene de xilanase .....  | 139        |
| <b>3.3.7. Purificação da xilanase</b> .....  | 142        |
| 3.3.7.1. Cromatografia de Filtração em Gel.....  | 142        |
| 3.3.7.2. Eletroforese e coloração.....   | 142        |
| <b>3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | <b>143</b> |
| <b>3.4.1. Fermentação em estado sólido com farelo de trigo e farelo de trigo com xilana</b> .....  | 143        |
| <b>3.4.2. Fermentação em estado submerso</b> .....   | 145        |
| 3.4.2.1. Farelo de trigo como substrato.....   | 145        |
| 3.4.2.1. Xilana como substrato.....  | 145        |
| <b>3.4.3. Análise das sequências de nucleotídeos das proteínas degradadoras de parede celular vegetal</b> .....                            | 147        |
| 3.4.3.1. Análise da sequência de nucleotídeos da enzima estudada .....   | 147        |
| 3.4.3.2. Extração de DNA genômico de <i>R. solani</i> .....  | 153        |
| 3.4.3.3. Extração de mRNA de <i>R. solani</i> AG-1 IA e construção de biblioteca genômica de cDNA ...                                      | 161        |
| <b>3.4.4. Purificação da enzima</b> .....  | 163        |
| 3.4.4.1. Análise de proteína dos diferentes isolados por SDS-PAGE.....   | 163        |
| 3.4.4.2. Cromatografia de Filtração em Gel.....  | 165        |
| <b>3.5. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO</b> .....  | <b>169</b> |
| <b>3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | <b>170</b> |
| <b>CAPITULO 4</b> .....  | <b>173</b> |
| <b>4. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XILANASE PRODUZIDA POR <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA ISOLADO DE CULTURA BRAQUIÁRIA.</b> .....    | <b>173</b> |
| <b>4.1. INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>174</b> |
| <b>4.2. OBJETIVOS DO CAPÍTULO</b> .....  | <b>176</b> |
| <b>4.3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | <b>177</b> |
| <b>4.3.1. Micro-organismo</b> .....  | 177        |
| <b>4.3.2. Enzimas</b> .....  | 177        |
| <b>4.3.3. Produção da enzima</b> .....   | 177        |
| 4.3.3.1. Fermentação em Estado Sólido.....   | 177        |
| <b>4.3.4. Análise de proteína liberada pelos isolados obtidos das culturas de arroz, soja e braquiária em diferentes substratos.</b> ..... | 178        |
| <b>4.3.5. Purificação de xilanase</b> .....  | 178        |
| 4.3.5.1. Ultrafiltração .....  | 178        |
| 4.3.5.2. Precipitação com Sulfato de Amônio. ....  | 178        |
| 4.3.5.3. Precipitação com Etanol .....   | 179        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.3.5.4. Cromatografia de Troca iônica .....  | 180        |
| 4.3.5.5. Eletroforese e coloração.....  | 180        |
| <b>4.3.6. Zimograma .....</b>   | <b>180</b> |
| <b>4.3.7. Caracterização da enzima bruta e enzima purificada .....</b>  | <b>181</b> |
| 4.3.7.1. Quantificação de Proteínas .....   | 181        |
| 4.3.7.2. Determinação da Atividade Xilanolítica.....  | 181        |
| 4.3.7.3. pH Ótimo e de estabilidade.....  | 182        |
| 4.3.7.4. Temperatura Ótima e temperatura de estabilidade .....  | 182        |
| 4.3.7.5. Influência de Íons metálicos na atividade xilanolítica.....  | 182        |
| 4.3.7.6. Influência de agentes modificadores na atividade xilanolítica. ....                                    | 183        |
| 4.3.7.7. Determinação dos Parâmetros Cinéticos Aparentes .....  | 183        |
| <b>4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>184</b> |
| <b>4.4.1. Análise de proteína liberada por <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA em diferentes substratos. ....</b> | <b>184</b> |
| <b>4.4.2. Purificação de Proteína .....</b>   | <b>185</b> |
| <b>4.4.3. Caracterização Enzimática .....</b>   | <b>190</b> |
| 4.4.3.1. pH ótimo e de estabilidade.....  | 190        |
| 4.4.3.2. Temperatura ótima e temperatura de estabilidade .....  | 193        |
| 4.4.3.3. Influência de Íons metálicos na atividade xilanolítica.....  | 197        |
| 4.4.3.4. Influência de agentes modificadores na atividade xilanolítica. ....                                    | 198        |
| 4.4.3.5. Determinação dos Parâmetros Cinéticos Aparentes .....  | 200        |
| <b>4.5. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO .....</b>   | <b>202</b> |
| <b>4.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>203</b> |
| <b>CAPITULO 5 .....</b>   | <b>208</b> |
| <b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>  | <b>208</b> |
| <b>5.1. CONCLUSÃO GERAL.....</b>  | <b>209</b> |
| <b>5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>  | <b>211</b> |
| <b>Anexos:.....</b>   | <b>212</b> |
| <b>Anexo 1: .....</b>   | <b>212</b> |

# **CAPÍTULO 1**

## **1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

## 1.1. INTRODUÇÃO GERAL

A parede celular das plantas é composta por um arranjo compacto de polissacarídeos heterogêneos e proteínas, os quais garantem a sustentação estrutural das plantas. Para a degradação dessa parede celular, faz-se necessária a atuação de série combinada de enzimas (GUTTMAN et al, 2006; LIU et al, 2005). As enzimas de degradação de parede celular de plantas (EDPCP) compreende um grupo de enzimas que são produzidas por uma série de organismos, a fim de desfazer o complexo estrutural presente na parede celular das plantas. Essas enzimas são representadas, principalmente, por pectinases, xilanases, celulases, amilases e quitinases (JONES; BELMAR, 1989; PASCUAL; HYAKUMACHI, 2000).

A utilização de enzimas nas indústrias é indispensável, pois podem-se melhorar a qualidade de um produto ou tornarem mais fácil a sua obtenção. Essa capacidade deve-se ao fato de as enzimas atuarem sobre as substâncias que compõem um determinado produto, sendo que, para cada substância, existem enzimas específicas que a degradam (BARATTO et al., 2011).

A busca por enzimas com características próprias, capazes de degradar a parede celular vegetal tem sido uma constante, uma vez que são requeridas nos processos biotecnológicos de produção de biocombustíveis, bem como em vários setores da indústria de alimentos (SIMÕES, 2006).

O Brasil, atualmente, importa a maior parte das enzimas que utiliza, embora apresente um enorme potencial para produzi-las. Essa potencialidade é evidenciada pela grande diversidade biológica, ainda pouco explorada, que serviria como fonte para a obtenção de novos organismos produtores de enzimas de interesse industrial e pela abundância de matéria orgânica (resíduos agrícolas, como, a palha de arroz, o bagaço de cana, dentre outros) que constitui substrato de baixo custo para as fermentações (BARATTO et al., 2011).

Os micro-organismos em geral, são conhecidos por produzirem uma gama de enzimas microbianas, as quais atuam na parede celular vegetal, hidrolisando polissacarídeos específicos para retirada de nutrientes, necessários ao seu desenvolvimento. Estudos recentes, com micro-organismos fitopatogênicos demonstraram que as EDPCP (Enzimas Degradadoras de Parede

Celular de Planta) são essências na patogenicidade desses organismos (DE LORENZO et al., 1997).

*R. solani* apresenta característica de patogenicidade própria para cada um de seus hospedeiros. Há estudos que buscam compreender tais mecanismos e uma hipótese levantada é com relação à ação das EDPCP. *Rhizoctonia solani* AG-1 IA é considerado um patógeno importante, afetando uma ampla gama de culturas hospedeiras de importância mundial (JONES; BELMAR, 1989; PASCUAL; HYAKUMACHI, 2000). Na América do Sul *R. solani* AG-1 IA causa a queima da bainha no arroz (SOUZA et al., 2007); folha bandeada e queima da bainha do milho (PERDOMO et al., 2007); queima foliar da soja (FENILLE et al., 2002), e a mela no feijão caupi (NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2006). As enzimas microbianas podem ser tanto intracelulares como extracelulares. Do ponto de vista biotecnológico, as enzimas extracelulares são preferíveis, por serem mais fáceis de serem obtidas. Assim, a avaliação do potencial de produção extracelular das EDPCP é um grande passo para o estudo das propriedades dessas enzimas e seu real potencial de aplicação biotecnológica.

Sabe-se que os catalisadores enzimáticos têm grande utilização em diversas áreas, como indústrias de alimentos, farmacêuticas, de detergentes, papelerias, ração animal, têxteis e cosméticas e na produção de biocombustível, o bioetanol. Como parâmetro de aplicação tecnológica, uma enzima somente possui valor comercial se houver demanda ou apresentar propriedades de acordo com os requerimentos técnicos e econômicos do processo em escala industrial. Dessa forma, a viabilidade econômica e comercial para a produção de celulasas, hemicelulasas ou amilases faz-se necessário identificar micro-organismos com grande potencial lignocelulolítico ou amilolítico.

O avanço da tecnologia enzimática no Brasil é favorecido pela enorme quantidade e variedade de matérias-primas renováveis passíveis de serem transformadas, por via enzimática, em produtos úteis e de maior valor agregado. A utilização de processos biotecnológicos alternativos, como a biocatálise industrial, têm um papel fundamental na implementação de tecnologias sustentáveis, contribuindo para a redução dos problemas de poluição ambiental, além de trazer outros benefícios processuais.

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. *Objetivo Geral*

O presente trabalho tem como objetivo o estudo da produção de EDPCP, principalmente celulase,  $\beta$ -glucosidase, xilanase e amilase, produzidas pelo fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, isolado de diferentes hospedeiros e analisar as enzimas quanto suas características bioquímicas e moleculares.

### 1.2.2. *Objetivos Específicos*

- a) Avaliar a produção de enzimas degradadoras de parede celular do fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA isolados de culturas de arroz, braquiária e soja;
- b) Avaliar o efeito da fonte de carbono, frente às linhagens selecionadas;
- c) Ensaios visando seleção do meio de cultivo e melhor tempo de produção das enzimas de interesse.
- d) Cultivar os isolados nos substratos braquiária, palha de soja e farelo de trigo, para obtenção das proteínas de interesse;
- e) Caracterizar física e quimicamente a enzima xilanase das linhagens que apresentarem maior atividade enzimática.
- f) Produção de xilanase e CMCase em fermentação em estado sólido e em fermentação submersa como método de comparação
- g) Analisar comparativamente sequências de genes para xilanase em *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.
- h) Extrair DNA e RNA para amplificação do gene da xilanase
- i) Produzir a enzima xilanase para os processos de purificação.
- j) Purificar a xilanase de interesse por método cromatográfico e análise eletroforética.
- k) Caracterizar as propriedades físico-químicas da xilanase purificada.

## 1.3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.3.1. *Rhizoctonia solani*

O gênero *Rhizoctonia*, divide-se em espécies com hifas binucleadas como *R. callae*, *R. cerealis*, *R. endophytica*, *R. fragariae*, *R. fumigata*, *R. ramicola*, *R. oryzae-sativae*, *R. repens*, *R. anaticula* e espécies com hifas multinucleadas como *R. zea*, *R. oryzae* e *R. solani* (a espécie mais importante do gênero, como fitopatógeno (SOUZA et al., 2007).

*R. solani* é um fungo habitante do solo, pertencente ao Filo Basidiomycota. A anamorfase (ou estágio assexual) *R. solani* ocorre mundialmente causando doenças em uma ampla variedade de plantas cultivadas (SOUZA et al., 2007).

Ao contrário do que se postulava no passado a respeito da condição de patógeno polífago, a gama de hospedeiros de cada um dos grupos de anastomose de *R. solani* é restrita. Cada grupo de anastomose está frequentemente associado a determinado hospedeiro ou a um grupo restrito de hospedeiros. *R. solani* é uma espécie complexa composta por pelo menos 14 grupos (e diversos subgrupos): AG-1 a 13 e AG-IB. Baseando-se na ocorrência de fusão de hifas (anastomose) com isolados padrões (AG), isolados pertencentes ao mesmo AG têm as hifas atraídas e fundidas umas as outras, enquanto hifas de isolados de AG diferentes não são capazes de se fundirem entre si (SOUZA et al, 2007).

Os AG são unidades taxonômicas correspondentes a espécies filogenéticas do complexo denominado de *Rhizoctonia solani* (GONZALEZ et al., 2001) e cada grupo de anastomose está frequentemente associado a determinado hospedeiro ou a um grupo restrito de hospedeiros (SNEH et al., 1991). Segundo Black et al. (1996), braquiária é hospedeira de dois AG distintos de *R. solani*, o AG-1 IA e o AG-1 IB. Ambos produzem escleródios em abundância no tecido doente. Entretanto, o AG-1 IA produz escleródios maiores (de 1 a 6 mm de diâmetro) os quais, geralmente, não são dispersos pelo ar (SUMNER, 1996). Em contraste, o AG-1 IB produz micro escleródios, o que permite ao patógeno dispersão aérea (GALINDO et al., 1983).

*Rhizoctonia solani* AG-1 IA é amplamente distribuído por todo o mundo como agente patogênico.

No geral, *R. solani* AG-1 IA sobrevive como micélio e escleródios no solo e em sementes, onde ciclos recorrentes de infecção aumentam o inóculo no solo (OGOSHI, 1987). A

dispersão de inóculo associado com plantas invasoras pode ter também um papel importante na disseminação do patógeno entre cultivos distintos (BLACK et al., 1996).

Embora o subgrupo AG-1 IA de *R. solani* esteja associado com uma ampla gama de hospedeiros, estudos indicam que populações simpátricas de isolados que infectam Poaceas (Ex: Milho, Arroz, Trigo) e Fabaceas (Soja), representam dois grupos-irmãos filogeneticamente bem definidos e que, provavelmente, a seleção para especialização a hospedeiros deve ter conduzido a divergência observada entre populações (BERNARDES-DE-ASSIS et al., 2009).

No início dos anos 90, o fungo *R. solani* emergiu como um patógeno importante associado à morte de pastagens do gênero *Braquiária* na América do Sul. Esse fungo emergiu pela primeira vez na Colômbia, em áreas onde o cultivo de arroz, um hospedeiro altamente suscetível ao fungo, foi substituído pelo cultivo de braquiária, em resposta à crescente demanda por pecuária extensiva (LEE; RUSH, 1983; HASHIBA; KOBAYASHI, 1996).

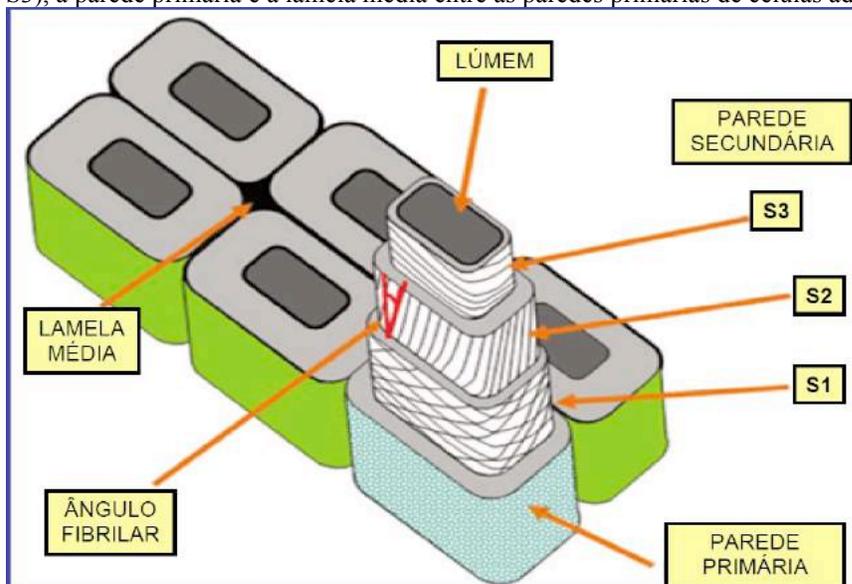
Seleção e deriva podem ter aumentado a diferenciação genética, dado que muitas dessas populações são geneticamente isoladas e seguem um modelo de isolamento por distância sobre esta grande área geográfica. Diferenciação genética entre essas populações podem indicar diferenças funcionais dentro da faixa de espécies, o que poderia levar a expressão de enzimas e outras características adaptativas da população (ZAKHAROV, 2008). Postula-se que a natureza genética altamente diversa de *R. solani* AG-1 IA, fornece ao patógeno, um elevado potencial evolutivo para adaptação (ZHAN, 2011).

### ***1.3.2. Parede Celular Vegetal***

A parede celular é uma estrutura muito complexa que possui uma grande diversidade de funções durante a vida da planta: proporcionam às células robustez mecânica, mantêm a sua morfologia, controlam a expansão celular e o transporte intercelular, protegem a célula contra a maioria dos organismos potencialmente patogênicos e predadores, participam na comunicação intercelular e contribuem em alguns casos como reserva alimentar (BRETT; WALDRON, 1990).

Morfologicamente, a parede celular é dividida em três regiões distintas, a lamela média, parede primária e parede secundária (Figura 1). A lamela média é a região de intersecção entre duas células. Esta camada intercelular é rica em substâncias pécticas mergulhadas em um meio aquoso (SANTOS, 2012).

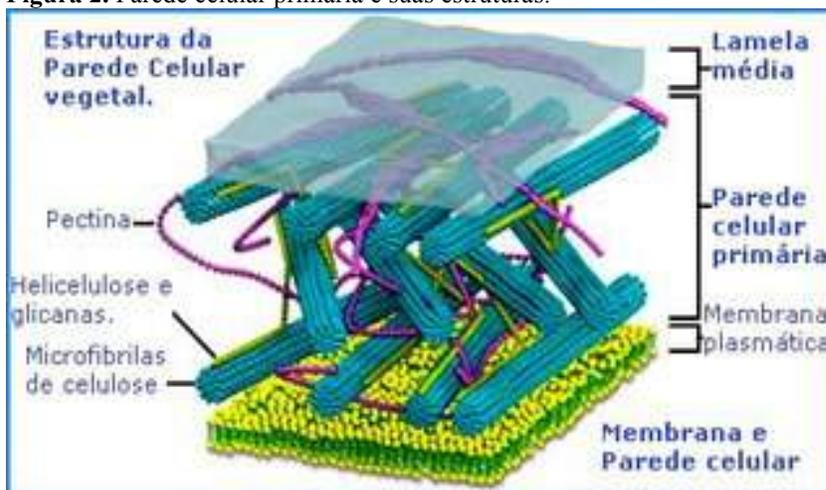
**Figura 1.** Esquema da célula vegetal com detalhes das diferentes camadas da parede celular secundária (S1, S2 e S3), a parede primária e a lamela média entre as paredes primárias de células adjacentes.



Fonte: KRETSCHMANN, 2003.

A parede primária de grande parte dos vegetais é composta por três estruturas independentes (Figura 2.), as microfibrilas de celulose (~30%), os polissacarídeos não-celulósicos, que incluem hemiceluloses (~30%) e pectinas (~30%) e as proteínas estruturais (~10%). (RAVEN et al., 2001).

**Figura 2.** Parede celular primária e suas estruturas.



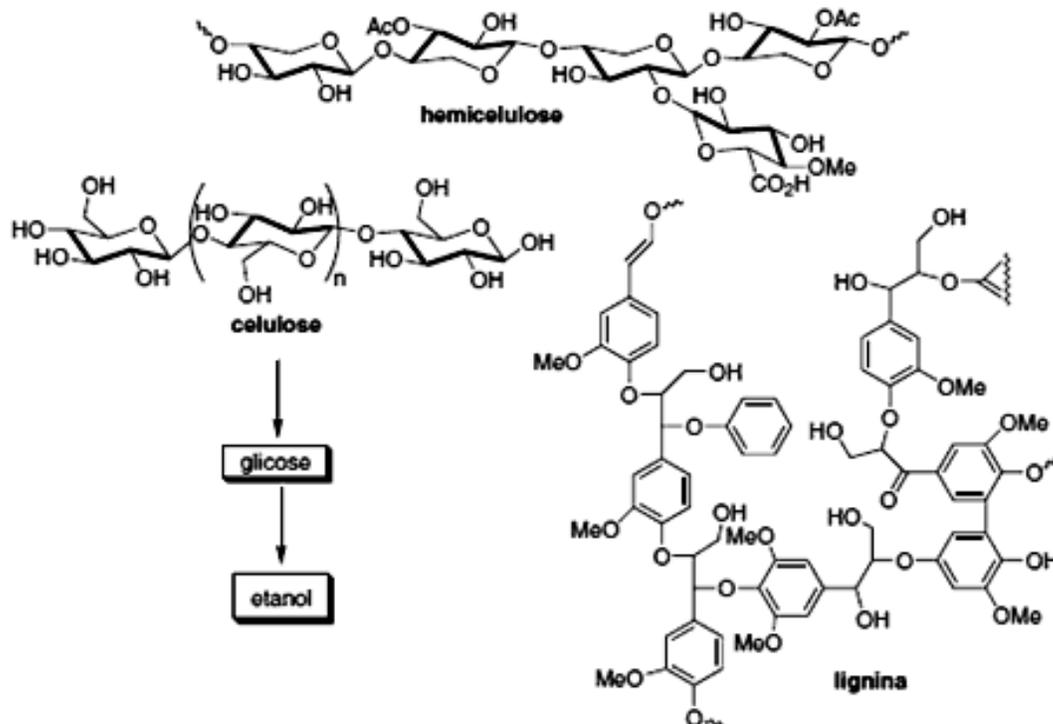
Fonte: SO BIOLOGIA, 2016.

As paredes celulares secundárias contêm tipicamente 3 camadas distintas, S1, S2 e S3, que diferem em espessura, orientação de microfibrilas e composição. A camada exterior (S1) e a interior (S3) possuem microfibrilas orientadas aproximadamente de maneira transversal; a camada intermédia (S2) é muito mais grossa que as outras duas e apresenta microfibrilas orientadas longitudinalmente em relação ao comprimento da célula. Esta orientação proporciona à célula grande resistência à tensão e à compressão (SILVA, 1993).

Numa célula com parede celular secundária a camada que compreende a lamela média e a parede celular primária é rica em substâncias pécicas quando comparada com o restante material; S3 e a parte interior de S2 têm um conteúdo em celulose mais elevado enquanto S1 e a camada exterior de S2 são relativamente ricas em hemiceluloses (glucuronoxilanas) (SILVA, 1993).

A parede celular vegetal é constituída principalmente, por celulose, hemicelulose e lignina (Figura 3).

Figura 3. Estruturas parciais dos componentes lignocelulósicos e derivados.

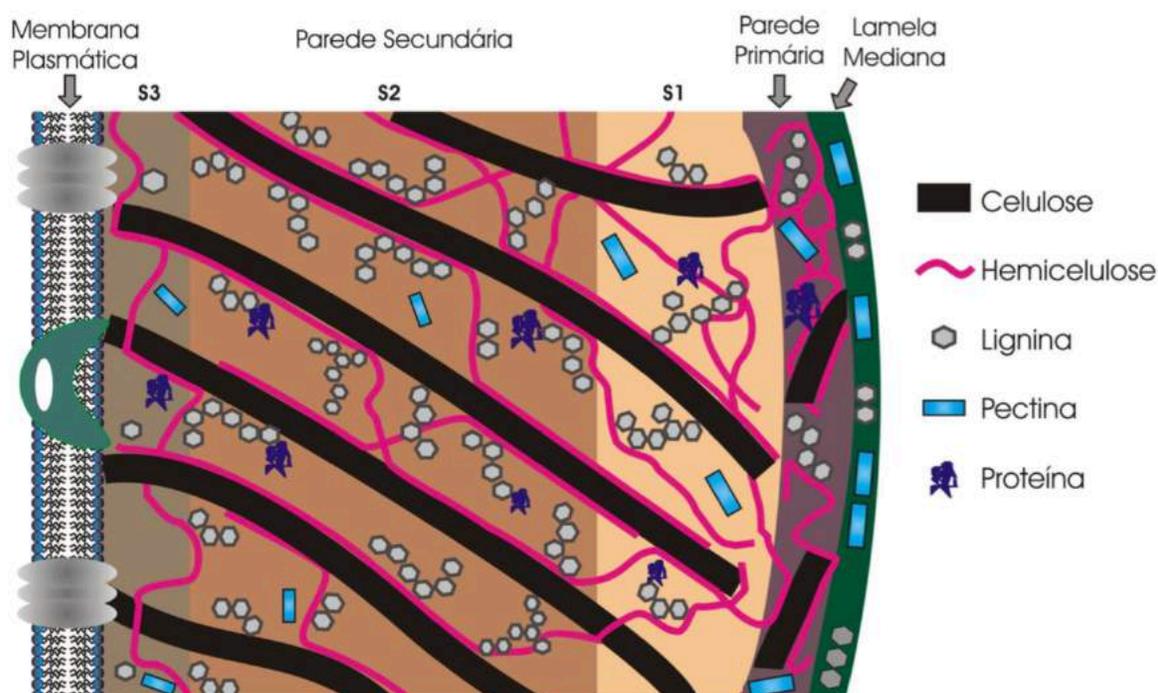


Fonte: FERREIRA; ROCHA, 2009.

Esses polissacarídeos formam uma estrutura rígida e organizada (ROWELL, 2005) (Figura 4). As madeiras apresentam altos teores de celulose (30-75%) e resíduos agrícolas baixos teores (30-45%). Por outro lado, a porcentagem de hemicelulose varia (10-40%) dependendo do tipo de material. O teor de lignina, em geral, é maior em madeira do que em resíduos agrícolas. Desta forma, as madeiras são mais difíceis de serem biodegradadas, devido à natureza recalcitrante inerente à lignina, o que dificulta o ataque de micro-organismos e enzimas (TAVARES, 1998).

As hemiceluloses estão intimamente associadas à celulose, definindo as propriedades estruturais na parede celular além de desempenhar funções na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas (FERREIRA; ROCHA, 2009).

**Figura 4.** Ilustração da estrutura da parede celular de plantas, demonstrando as diferentes camadas e seus principais componentes



Fonte: ANDRADE, 2014.

## **Celulose**

A celulose encontrada na parede celular das plantas é a biomolécula mais abundante na natureza. Todos os anos as plantas produzem aproximadamente 180 bilhões de toneladas de celulose. Esta biomolécula tem enorme valor comercial para diversos setores industriais, em particular pode-se destacar o setor de produção de celulose e papel (SANTOS, 2012).

A celulose é um homopolímero linear de unidade de anidro-glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, formando microfibrilas. É o efeito da configuração secundária e terciária da cadeia de celulose, bem como sua associação estrita com outras estruturas poliméricas protetoras dentro da parede celular da planta, tais como lignina, amido, pectina, hemicelulose, proteínas e elementos minerais que torna tão difícil o sucesso da hidrólise destes compostos (Figura 4) (O'SULLIVAN, 1997).

Cada microfibrila de celulose consiste de aproximadamente 36 cadeias lineares de glicose, cuja organização determina as propriedades mecânicas da célula e promovem o suporte e resistência à parede celular. Em geral, a parede primária contém de 10 a 40% de celulose e a secundária aproximadamente 40 a 60% (BRAGATTO, 2007).

A celulose contém regiões amorfas e regiões cristalinas, dependendo do padrão de interações. (O'SULLIVAN, 1997).

## **Hemicelulose**

O termo hemicelulose é utilizado coletivamente para denominar grupos distintos de polissacarídeos constituídos por açúcares pentoses (xilose e arabinose) e/ou hexoses (glucose, manose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetila (FENGEL; WEGENER, 1989; CARVALHO et al., 2009). São heteropolissacarídeos complexos compostos por D-glucose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico (SANTOS et al., 2012).

As hemiceluloses são os principais constituintes das paredes celulares das plantas e constituem cerca de 20 a 30% da biomassa vegetal lignocelulósica. São heteropolissacarídeos de baixo peso molecular (Figura 3), altamente ramificados, que estão associados à celulose nos tecidos vegetais, ligando-se firmemente à superfície das microfibrilas de celulose, mantendo ligações cruzadas, via pontes de hidrogênio, em uma rede complexa (SANTOS et al., 2012).

Os xiloglucanos (Xg) e os galactomananos são hemiceluloses presentes tanto em parede primária (função estrutural) como em parede de reserva em sementes de algumas espécies (função de reserva). O grau de ramificação e o tamanho da cadeia afetam a interação entre Xg e a celulose. Enquanto os graus de galactosilação e fucosilação estão relacionados com a força de ligação entre os polissacarídeos, o tamanho da molécula do Xg afeta a sua capacidade (quantidade) de interação à celulose, conseqüentemente a auto interação (FERREIRA; ROCHA, 2009).

As estruturas das hemiceluloses apresentam ramificações que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado. (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010). Comparadas com a celulose, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores. Esta reatividade é usualmente atribuída ao caráter amorfo destes polissacarídeos (FENGEL; WEGENER, 1989).

### **Lignina**

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante, superado apenas pela celulose. É um componente fundamental da madeira, representando cerca de 15 a 35% de seu peso seco. A lignina é um complexo polimérico com caráter fenólico que é resistente à hidrólise. Sua rigidez e hidrofobia são importantes para o suporte mecânico. Característica que provavelmente permitiu a melhor adaptação das plantas. A complexidade deste polímero na célula, lhe confere alta eficiência na condução de água da base até o topo do vegetal e também na defesa ao ataque de patógenos. A distribuição do conteúdo de lignina é diferente para cada região da célula. A maior concentração da lignina está localizada na região da lamela média. Já no interior da parede celular secundária a concentração é menor (RAVEN et al., 2001).

A lignina é biossintetizada nas plantas vasculares em um complexo processo de reações, iniciado pelo metabolismo do ácido xiquímico, seguido da via do aminoácido aromático L-fenilalanina. A fenilalanina amônialiase (PAL), é uma enzima que regula o metabolismo fenólico nas células vegetais, convertendo o aminoácido L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico, que posteriormente é hidroxilado para ácido  $\rho$ -coumárico. Esse último, pelas ações de enzimas específicas produz os três principais componentes da lignina, o  $\rho$ -coumarílico, coniferílico e sinapílico. Portanto por definição, lignina é um complexo de biopolímeros com

estrutura de natureza aromática, com alto peso molecular, composto por várias combinações de três tipos de ligninas, a lignina  $\rho$ -hidroxi-fenila, lignina guaiacila e siringila, tendo como precursores os três álcoois do tipo fenilpropanóides ( $\rho$ -coumarílico, coniferílico e sinapílico), respectivamente. A deposição dos monômeros da lignina na parede celular vai depender da espécie vegetal, tipo de célula e estágio do desenvolvimento do tecido. No complexo polimérico da lignina ocorre uma variedade de ligações, incluindo éster, éter e carbono-carbono. A ligação éter é dominante, representando aproximadamente 2/3 das ligações. Os restantes das ligações são do tipo carbono e éster. Como resultado destas ligações, ocorre a formação de uma complexa rede tridimensional hidrofóbica, com importantes ligações covalentes e não covalentes com a celulose e as hemiceluloses, em particular com as cadeias de xilanas (BRAGATTO, 2007).

### **Pectina**

Substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular que formam o maior componente da lamela média, uma fina camada de material adesivo extracelular entre as paredes primárias de células de vegetais superiores, contribuindo para dar firmeza, estrutura aos tecidos e resistência à compressão. A pectina está também envolvida na interação entre planta-patógeno e na textura das frutas e vegetais durante o crescimento, amadurecimento e armazenamento (SANTI, 2005).

Quimicamente, são um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, composto de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações  $\alpha$ -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil éster e parcial ou completamente neutralizadas por uma ou mais bases (íons sódio, potássio ou amônio) (UENOJO; PASTORE, 2007).

Ao contrário das proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, e sendo polissacarídeos, as substâncias pécticas não possuem massa molecular definida, variando de 25 a 360 kDa (UENOJO; PASTORE, 2007).

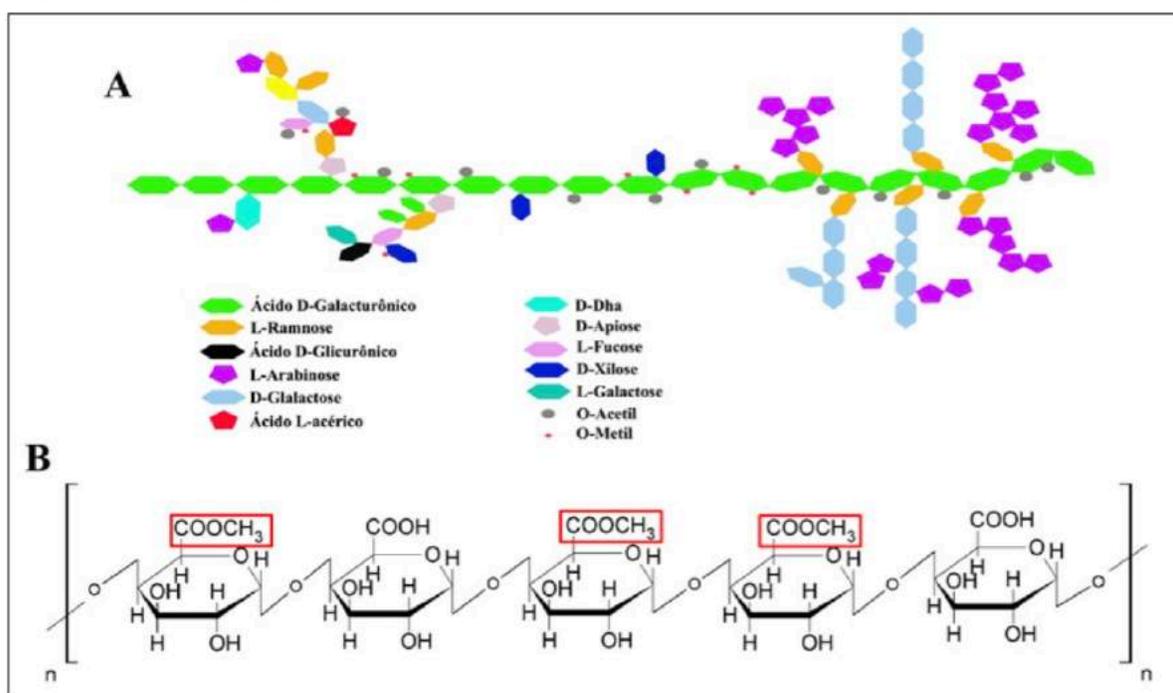
Como muitos polissacarídeos, a pectina é uma molécula heterogênea, apresentando diversos açúcares em sua composição, variando de acordo com a fonte, fatores ambientais e métodos de extração (Figura 5). A pectina é formada por uma estrutura central de 100 a quase 1.000 monômeros de ácido galacturônico, podendo apresentar ainda ramnose. Muitos outros açúcares, como galactose, arabinose e xilose, são facilmente encontrados formando cadeias laterais (KASHYAP et al., 2001). Este polímero é um polissacarídeo solúvel de natureza

coloidal, que pode apresentar diferentes graus de esterificação, variando consideravelmente, dessa maneira, o grau de solubilidade (SANTI et al. 2014).

Baseado no tipo de modificação da cadeia central, as substâncias pécnicas são classificadas em (SANTI, 2005):

**Protopectina:** insolúvel em água, sendo decorrente tanto do tamanho da molécula como pela presença de cátions divalentes. Representa a maior parte da pectina de frutas imaturas.

**Figura 5.** Estrutura geral da pectina. (A) Visão geral, mostrando rami cações laterais; (B) cadeia central de ácido poligalacturônico com grupos carboxílicos metilados destacados em vermelho



Fonte: SANTI, et al., 2014

**Pectina:** material solúvel no qual pelo menos 75% dos grupamentos carboxílicos são metilados. Apresenta solubilidade em água e em alguns solventes como formamida e glicerol.

**Ácido pectínico:** ácido poligalacturônico que apresenta um número significativo de grupos metoxila. Pode formar gel com açúcares e ácidos e, caso o conteúdo destes grupos seja reduzido, pode formar gel com alguns íons metálicos.

**Ácido pécnico (pectato):** ácido poligalacturônico coloidal e isento de grupos metoxila.

A celulose e as hemiceluloses são os componentes da parede celular com maior importância econômica para o setor de papel e celulose. Portanto, conhecer o mecanismo de regulação da biossíntese da celulose e hemiceluloses é um pré-requisito para alterarmos as características das fibras e isto pode ser alcançado através de técnicas de biologia molecular (BRAGATTO, 2007).

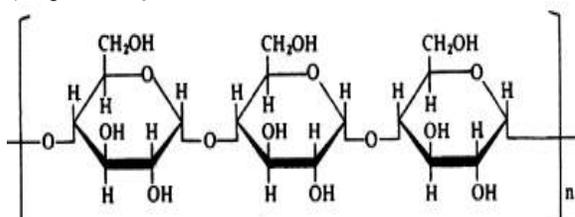
### Amilase

A amilose é um polímero consistindo de mais de 6000 unidades de D-glicose unidas com ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4 (Figura 6a). Apesar da consideração que a amilose é essencialmente linear, atualmente é evidenciado que a amilose não assume completamente esta característica (KARIM; NORIZAH; SEOW, 2000). A presença de ramificações não alterou o comportamento em solução das cadeias de amilose, permanecendo idêntico ao comportamento das cadeias completamente lineares. O teor médio de amilose que o amido contém pode variar de quase zero a aproximadamente 75%. No entanto, o valor típico fica entre 20 e 25% (LACERDA, 2006).

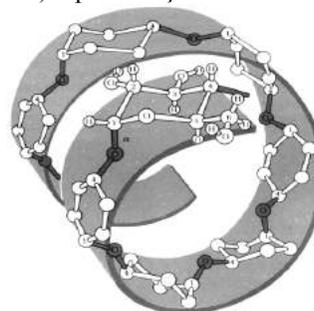
Na forma cristalina, a molécula de amilose tem uma conformação helicoidal (Figura 6b). Esta hélice, devido à conformação das unidades de glicose, tem um interior hidrofóbico. Esta estrutura helicoidal propicia a formação de um complexo de cor azulada com o iodo, desde que a cadeia seja suficientemente longa, com pelo menos 40 unidades de glicose. Isto ocorre devido à inserção de uma cadeia linear de iodo-iodeto no interior da hélice. Na presença de cadeias menores de amilose, o complexo se apresenta na cor vermelha, amarela ou marrom (GUPTA et al., 2003).

**Figura 6.** Estrutura química da amilose.

a) representação estrutural



b) representação helicoidal

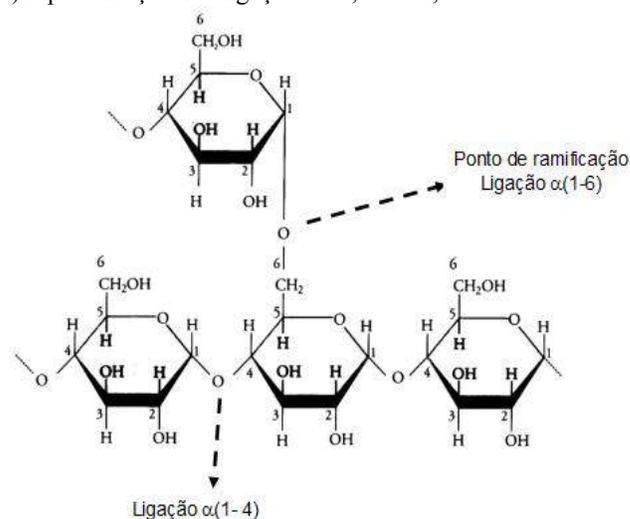


Fonte: LACERDA, 2006

A amilopectina é uma macromolécula ramificada (Figura 7) e consiste em cadeias lineares mais curtas de ligações  $\alpha$ -1,4 contendo 10 a 60 unidades de glicose e cadeias laterais de ligação  $\alpha$ -1,6 com 15 a 45 unidades de glicose (VAN DER MAAREL et al., 2002). Esquemáticamente, a amilopectina consiste de uma cadeia principal que possui o grupo redutor e numerosas cadeias ramificadas. As ramificações ocorrem por conta das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6.

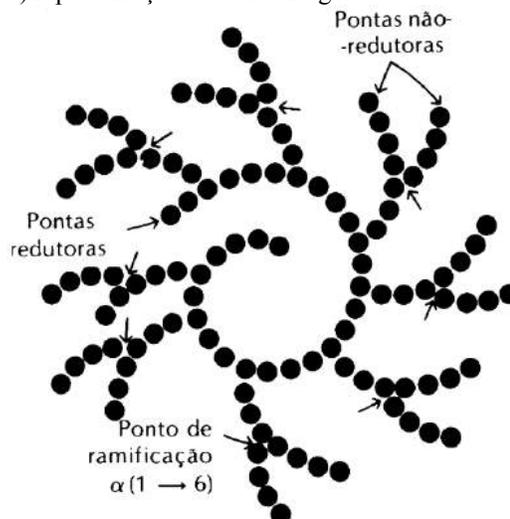
**Figura 7.** Estrutura química da amilopectina.

a) representação das ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6



Fonte: LACERDA, 2006

b) representação da estrutura geral



Além da amilose e amilopectina, o grânulo de amido apresenta compostos nitrogenados, lipídeos e minerais como o fósforo. Apesar de estarem presentes em menor percentual, podem ter influências marcantes nas propriedades do amido (CEREDA, 1996).

Os lipídeos, que representam em média 0,6% da composição de amidos de cereais, e são considerados a fração mais importante associada, podem complexar com amilose, alterando as propriedades reológicas do amido. Outros componentes como proteínas e várias substâncias inorgânicas, podem ser consideradas impurezas, uma vez que não estão ligadas covalentemente com os polissacarídeos formadores do grânulo (PERONI, 2003).

### 1.3.3. Enzimas

Muitas enzimas receberam seus nomes pela adição do sufixo “ase” ao nome dos seus substratos ou a uma palavra que descreve sua atividade. Assim, a uréase catalisa a hidrólise da ureia e a DNA-polimerase catalisa a polimerização de nucleotídeos para formar DNA. Outras enzimas foram batizadas pelos seus descobridores em razão de uma função ampla, antes que fosse conhecida a reação específica catalisada por elas. Por exemplo, uma enzima conhecida por atuar na digestão de alimentos foi denominada pepsina, do grego pepsis (digestão), e a lisozima foi denominada pela sua capacidade de lisar (degradar) a parede de bactérias. Outras foram ainda denominadas a partir de sua fonte: a tripsina, denominada em parte do grego tryein (desgastar), foi obtida esfregando tecido pancreático com glicerina. Às vezes, a mesma enzima tem dois ou mais nomes, ou duas enzimas têm o mesmo nome. Devido a essa ambiguidade e também ao número cada vez maior de enzimas que são descobertas, os bioquímicos, por meio de um acordo internacional, adotaram um sistema de nomenclatura e classificação de enzimas. Esse sistema divide as enzimas em seis classes (1- Oxidorredutases; 2- Transferases; 3- Hidrolases; 4- Liases; 5- Isomerasas e 6- Ligases), cada uma com subclasses, com base nos tipos de reações que catalisam. Um número de classificação de quatro partes e um nome sistemático, que identifica a reação catalisada, são especificados para cada enzima. Ex: glicose-fosfotransferase, indicando que ela catalisa a transferência de um grupo fosforribosil do ATP para a glicose. Seu número da Comissão de Enzimas (número E. C., do inglês Enzyme Commission) é 2.7.1.1. O primeiro número (2) indica o nome da classe (transferase); o segundo número (7), a subclasse (fosfotransferase); o terceiro número (1), uma fosfotransferase que tem um grupo hidroxila como aceptor, e o quarto número (1), D-glicose como o aceptor do grupo fosforil. Para muitas enzimas, é usado um nome comum com mais frequência, hexocinase, nesse caso específico (NELSON; COX, 2014).

#### 1.3.3.1. Celulases

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações O-glicosídicas, sendo classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a celulase avaliada (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010).

Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente

específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (LYND et al., 2002).

As celulases são enzimas que clivam as ligações  $\beta$ -1,4 da celulose. Elas podem ser produzidas por plantas, participando da formação e remodelamento da parede celular, e por bactérias e fungos, com intuito de despolimerizar a cadeia de celulose. As celulases são de vários tipos e elas operam sinergisticamente para a hidrólise da celulose (SANTOS, 2012).

Para a degradação completa da celulose são necessárias as atuações sinérgicas de quatro tipos de celulases. As endoglucanases (1,4- $\beta$ -D-glicana-4-glicanohidrolase; EC 3.2.1.4) hidrolisam ligações  $\beta$ -1,4 internas da celulose (LYND et al., 2002). Essas enzimas são inativas sobre a celulose cristalina como algodão, mas elas hidrolisam celulose amorfa e substratos solúveis como carboximetilcelulose e hidroxietilcelulose. A atividade de endoglucanases é caracterizada por hidrólise aleatória de ligações  $\beta$ -glicosídicas, resultando em uma rápida diminuição da viscosidade acompanhada da taxa de aumento de grupos redutores. Os produtos incluem glicose, celobiose e celodextrinas de vários tamanhos (ALMEIDA, 2009).

O segundo grupo de enzimas são as celobiohidrolases (1,4- $\beta$ -D-glicana celobiohidrolase; EC 3.2.1.91), que são exocelulases. Este grupo degrada celulose amorfa por remoção consecutiva de celobiose dos terminais não redutores do polissacarídeo. Quando puras podem degradar Avicel, porém o mesmo não acontece com algodão. Em relação às endoglucanases, as celobiohidrolases apresentam uma maior capacidade de redução da viscosidade. Celobiohidrolases e endoglucanases atuam sinergisticamente para degradação completa da celulose cristalina (ALMEIDA, 2009).

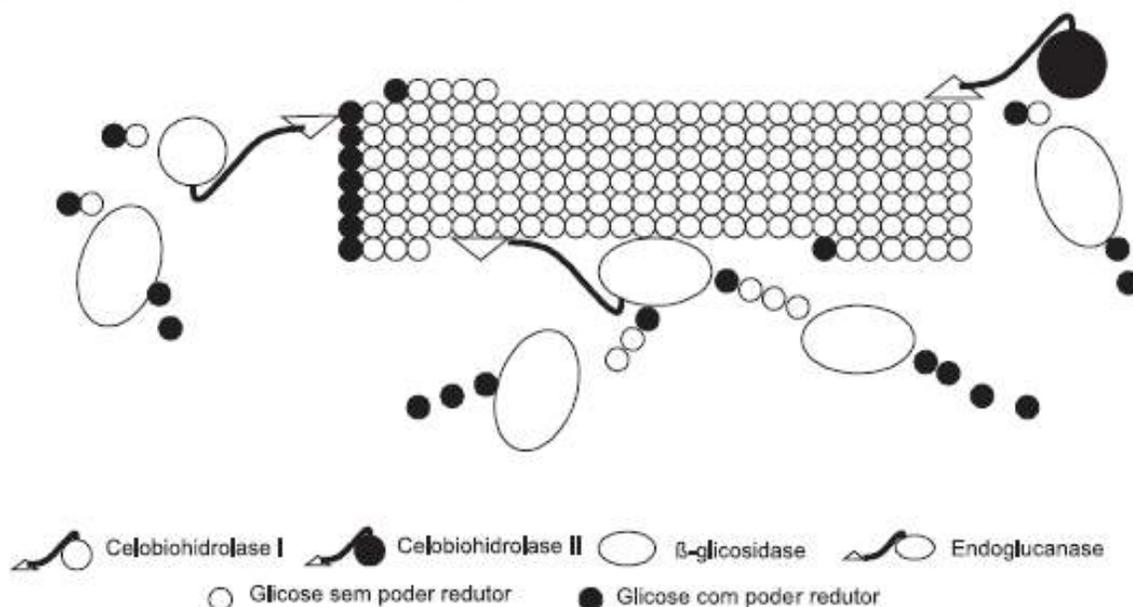
O terceiro grupo de enzimas são as exoglicohidrolases (1,4- $\beta$ -D-glicana glicobiohidrolase, EC 3.2.1.74), que hidrolisam consecutivamente a remoção de unidades de glicose de terminais não redutores de celodextrinas. A taxa de hidrólise diminui proporcionalmente à diminuição do tamanho da cadeia (ALMEIDA, 2009).

O quarto grupo de enzimas são as  $\beta$ -glucosidases ( $\beta$ -D-glucosideoglicohidrolase; EC 3.2.1.21) que clivam celobiose em glicose e removem glicose de terminais não redutores de pequenas celodextrinas. Ao contrário das exoglucosidases, a taxa de hidrólise das celobioses aumenta proporcionalmente à diminuição do tamanho do substrato. As  $\beta$ -glucosidases e as exoglicohidrolases têm em comum os substratos de cadeias de glicose de 2 até 6 unidades. Elas

podem ser distinguidas baseadas nas suas atividades relativas sobre os dois substratos celobiose e celohexose. As  $\beta$ -glucosidases hidrolisam muito mais rapidamente a celobiose do que as celobiohexoses, enquanto o oposto ocorre com as exoglicohidrolases (WHITAKER, 1972).

Quando atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras. Tal efeito é conhecido como sinergia. São conhecidas pelo menos três formas de sinergia entre as celulases: sinergia EnG-ExG - a endoglucanase, atuando nas regiões amorfas da fibra, disponibiliza terminais redutores e não redutores para atuação de CBH I e CBH II, respectivamente; sinergia ExG-ExG - as CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação da endoglucanase; sinergias ExG-BG e EnG-BG - como seus produtos de hidrólise, a celobiohidrolase e a endoglucanase liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a  $\beta$ -glucosidase. A Figura 8 ilustra a ação sinérgica entre exoglucanases, endoglucanase e  $\beta$ -glucosidase na hidrólise da fibra celulósica (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010).

**Figura 8.** Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico.



Fonte: CASTRO; PEREIRA JUNIOR, (2010)

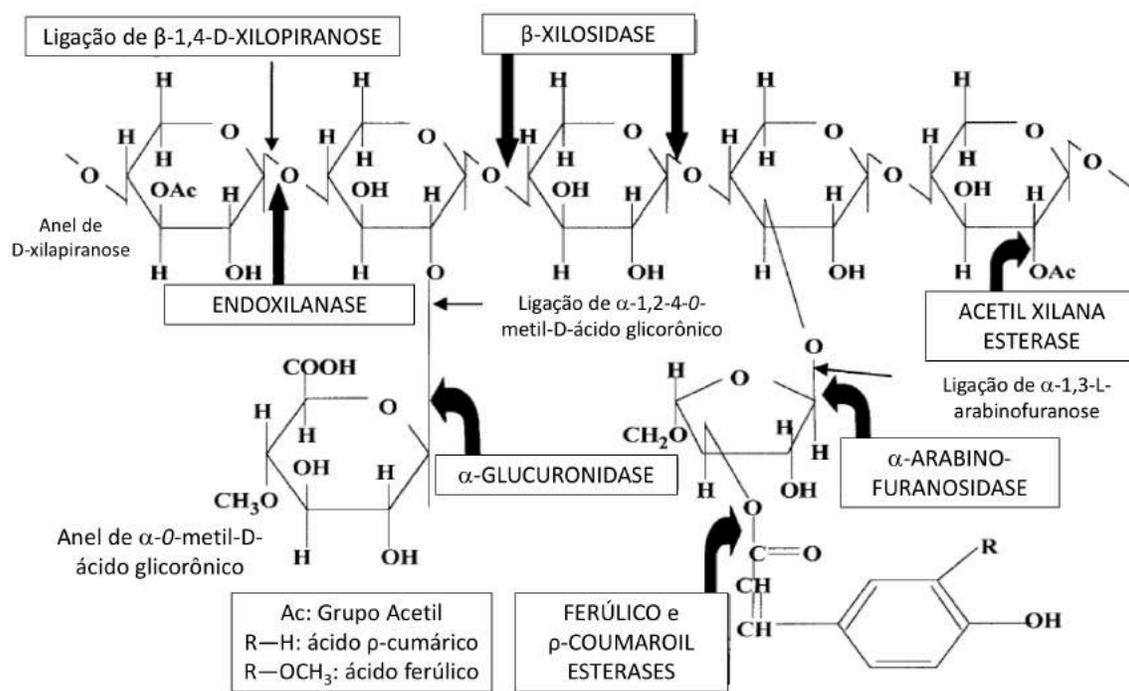
### 1.3.3.2. Hemiceluloses

A xilana é o principal carboidrato encontrado nas hemicelulose. As principais xilanases podem ser classificadas como endo-1,4- $\beta$ -xilanase (EC 3.2.1.8) gera oligossacarídeos a partir da clivagem da xilana e 1,4- $\beta$ -xilosidase (EC 3.2.1.37) produz xilose de oligossacarídeos mostrada na Figura 9 (SÁNCHEZ, 2009; PEREZ, 2002).

O complexo xilanolítico pode ser clivado pela ação de diferentes enzimas que atuam na xilana. Assim, têm-se:

**Endo- $\beta$ -1,4-xilanases** (1,4- $\beta$ -D-xilana xilanohidrolase; E.C. 3.2.1.8): clivam as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 internas das moléculas de xilana, liberando xilooligossacarídeos e consequentemente reduzindo o grau de polimerização do substrato. É uma das principais enzimas envolvidas na degradação deste polímero. De acordo com Wong et al. (1992) as endoxilanases podem ser de dois tipos, de acordo com o produto final da reação. Assim podem ser endoxilanases não desramificantes as quais não conseguem hidrolisar o ponto de ramificação 1,3- $\alpha$ -L-arabinofuranosil da arabinoxilana e as endoxilanases desramificantes as quais conseguem clivar essa ligação liberando arabinose.

**Figura 9.** Planta hipotética da estrutura do xilana, mostrando os diferentes grupos substituintes e o ponto de clivagem das xilanases microbianas.



Fonte: BEG et al., 2001

**Arabinases:** as quais removem resíduos de L-arabinose na posição do C2 e C3 de  $\beta$ -D-xilopiranosil. Elas podem apresentar dois modos de ação: *exo- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase* (E.C. 3.2.1.55) a qual degrada arabinanas ramificadas e o  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosideo; e a *endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinase* (E.C. 3.2.1.99) a qual hidrolisa as arabinanas lineares (WONG et al., 1992);

**$\alpha$ -Glicuronosidase** (E.C. 3.2.1.-): hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,2 entre o ácido glicurônico e o  $\beta$ -D-xilopiranosil removendo os resíduos de  $\alpha$ -4-O-metil (WONG et al., 1992);

**$\beta$ -D-xilosidase** (1,4- $\beta$ -D-xilana xilohidrolase; E.C. 3.2.1.37): liberam xilose a partir de xilooligossacarídeos curtos e xilobiose. São capazes de clivar substratos artificiais como  $\rho$ -nitrofenil e o-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosideo (WONG et al., 1992)

**Acetilxilana esterase** (E.C. 3.1.1.6): que remove os grupos O-acetil na posição do C2 e/ou C3 do resíduo  $\beta$ -D-xilopiranosil da acetil xilana (WONG et al., 1992);

**Ácido ferúlico esterase** (E.C.3.1.1.-) e a **Ácido  $\rho$ -cumaril esterase** (E.C.3.1.1.-) as quais clivam as ligações ésteres da xilana, sendo que a primeira cliva entre a arabinose e o ácido ferúlico e a segunda entre a arabinose e o ácido  $\rho$ -cumarico (WONG et al., 1992).

### 1.3.3.3. Pectinase

Uma grande variedade de micro-organismos é capaz de produzir enzimas pectinolíticas, incluindo bactérias, fungos filamentosos, leveduras, protozoários, insetos e nematoides (FAVELA-TORRES et al., 2005). Entretanto, devido à fácil produção e à diversidade de pectinases, os fungos filamentosos são os mais empregados para a produção em escala industrial dessas enzimas (SANTI et al., 2014).

A síntese destas enzimas sofre influência dos componentes do meio de cultura, particularmente da fonte de carbono, presença de indutores (pectina e derivados) e das condições de cultivo, como pH, temperatura, aeração, agitação e tempo de incubação (UENOJO; PASTORE, 2007).

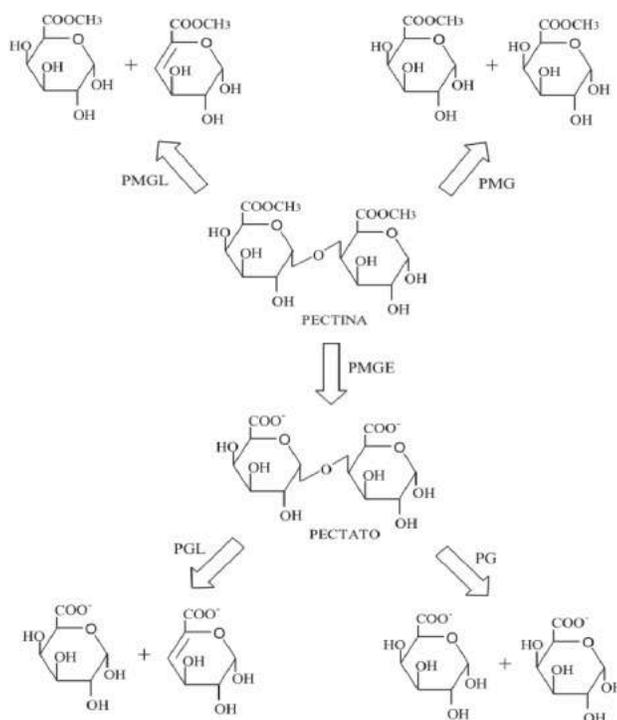
Embora a pectina apresente outros açúcares em sua composição, o termo enzimas pectinolíticas, ou pectinases, refere-se ao grupo de enzimas que agem sobre os resíduos de ácido galacturônico. Devido à presença de várias formas de pectina nas células das plantas, são

necessárias pectinases com diferentes formas de ação para sua degradação. Estas enzimas podem ser induzidas por substratos pécnicos ou produzidas constitutivamente, dependendo do organismo estudado (SANTI, 2005).

A classificação das enzimas pécnicas está baseada no ataque ao esqueleto galacturônico, pela preferência de substrato (pectina, ácido pécnico ou protopectina), ação por transeliminação ou hidrólise e por clivagem randômica (enzima endo-, liquidificante ou despolimerizante) ou terminal (enzima exo- ou sacarificante) (SILVA et al., 2005).

Existem basicamente três tipos de pectinases (Figura 10): pectina esterase (desesterificante ou desmetoxilante) remove os grupos metil éster; as despolimerizantes (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases) catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécnicas e, as protopectinases que solubilizam protopectina para formar pectina. Estas enzimas foram classificadas e nomeadas de acordo com a “Enzyme Commission” (EC), segundo as recomendações da IUPAC-IUB (Tabela 1) (UENOJO; PASTORE, 2007).

**Figura 10.** Modo de ação enzimática das pectinases em uma molécula de pectina. PMGL: polimetilgalacturonato liase. PMG: polimetilgalacturonase. PMGE: polimetilgalacturonato esterase (pectina esterase). PGL: poligalacturonato liase (pectato liase). PG: poligalacturonase.



Fonte: UENOJO; PASTORE, 2007.

As enzimas podem ainda ser classificadas como exoenzimas, atuando nas extremidades da cadeia de açúcares, liberando dímeros ou monômeros, ou endoenzimas, clivando a molécula de pectina e liberando oligômeros menores. O efeito da clivagem do polímero e liberação dos oligômeros pode acarretar em diminuição rápida e acentuada da viscosidade da solução. Por exemplo, pode-se obter cerca de 50% de redução da viscosidade com apenas 2-3% de quebra das ligações glicosídicas (SANTI et al., 2014).

### Enzima desmetoxilante ou desesterificante

A pectina esterase (polimetilgalacturonato esterase, PMGE) catalisa a hidrólise dos grupos metil éster da pectina, liberando metanol e convertendo pectina em pectato (polímero não esterificado). Age preferencialmente no grupo metil éster da unidade de galacturonato próxima a uma unidade não esterificada, apresenta valores de pH ótimo variando de 4 a 8 e temperatura ótima de 40 a 50 °C (SHEN et al., 1999).

**Tabela 1.** Classificação das enzimas pécticas

| Tipo de pectinase | Nome sugerido pela EC             | Sigla     | Nome comum        | Número EC |
|-------------------|-----------------------------------|-----------|-------------------|-----------|
| Desesterificante  | polimetilgalacturonase esterase   | PMGE      | pectina esterase  | 3.1.1.11  |
| Hidrolase         | endo poligalacturonase            | endo-PG   | poligalacturonase | 3.2.1.15  |
|                   | exo poligalacturonase 1           | exo-PG 1  | poligalacturonase | 3.2.1.67  |
|                   | exo poligalacturonase 2           | exo-PG 2  | Poligalacturonase | 3.2.1.82  |
|                   | endo polimetilgalacturonase       | endo-PMG  | pectina hidrolase |           |
| Liase             | exo polimetilgalacturonase        | exo-PMG   | pectina hidrolase |           |
|                   | endo poligalacturonase liase      | endo-PGL  | pectato liase     | 4.2.2.2   |
|                   | exo poligalacturonase liase       | exo-PGL   | pectato liase     | 4.2.2.9   |
|                   | endo polimetilgalacturonato liase | endo-PMGL | pectina liase     | 4.2.2.10  |
|                   | exo polimetilgalacturonato liase  | exo-PMGL  | pectina liase     |           |

Pectinases que atuam sobre oligogalacturonatos não estão incluídas na tabela porque não são muito abundantes e possuem pouco interesse industrial na degradação de pectina. **Fonte:** UENOJO; PASTORE, 2007.

### Enzimas despolimerizantes

As enzimas despolimerizantes são classificadas de acordo com a clivagem hidrolítica (hidrolases) ou transeliminativa (liases) das ligações glicosídicas; mecanismos endo- (randômica) ou exo- (a partir do final da molécula) de ação e preferência por ácido péctico ou

pectina como substrato. Envolvem as hidrolases (catalisam a hidrólise de ligações  $\alpha$ -1,4) e as liases (catalisam a  $\beta$ -eliminação) (ALKORTA et al., 1998).

***Hidrolases:***

***Polimetilgalacturonases (PMG):*** presumivelmente hidrolisa polimetil-galacturonatos a oligometilgalacturonatos por clivagem de ligações  $\alpha$ -1,4, podendo ser endo- ou exo-PMG (UENOJO; PASTORE, 2007).

***Poligalacturonases (PG):*** hidrolisam  $\alpha$ -1,4 ligações glicosídicas entre dois resíduos de ácido galacturônico, podendo apresentar ação endo- (hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise sequencial) do ácido péctico (UENOJO; PASTORE, 2007).

***Liases:***

Rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado e incluem as pectinas liases e as pectato liases (UENOJO; PASTORE, 2007).

***Pectina liase (polimetilgalacturonato liase, PMGL):*** catalisa a  $\beta$ - eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico mais ou menos esterificados. Quebram as ligações por transeliminação do hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5 da porção aglicona do substrato (pectina) de modo endo- ou exo- (UENOJO; PASTORE, 2007).

***Pectato liase (poligalacturonato liase, PGL):*** catalisa a clivagem de ligações  $\alpha$ -1,4 de ácido péctico de modo endo- ou exo- por trans-eliminação, requer  $\text{Ca}^{2+}$  para atividade (UENOJO; PASTORE, 2007).

#### ***1.3.3.4. Protease***

As enzimas proteolíticas, proteases ou proteinases pertencem ao grupo das hidrolases as quais têm em comum o envolvimento da água na formação do produto. As proteinases catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas, ocorrendo a transferência de componentes do substrato para a água (FEDATTO, 2004).

As proteases (peptidases ou enzimas proteolíticas) constituem um grande grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em outras proteínas. A clivagem de ligações peptídicas conduz à degradação de substratos proteicos nos seus aminoácidos constituintes, ou pode ser específica, levando a clivagem seletiva de proteína para a modificação

e o processamento pós-translacional. (SOUZA et al., 2014).

São enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem uma grande família (EC 4.3), dividida em endopeptidases ou proteinases (EC 4.2. 21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica. (FEDATTO, 2004)

Elas também podem ser classificadas de acordo com a faixa de pH onde elas apresentarem maior atividade: ácido (pH 2.0 a 6.0), neutro (pH 6.0 a 8.0) e alcalino (pH 8.0 a 13.0) (SABOTIC; KOS, 2012).

Exopeptidases requerem a presença de grupos terminais livres perto da ligação clivado. (KUDRYAVTSEVA et al., 2008). Baseado em seus sitio de ação, N ou C terminal, elas são classificadas como amino e carboxipeptidases, respectivamente (SOUZA et al., 2014).

As **aminopeptidases** (EC 3.4.14) agem em um N terminal livre da cadeia polipeptídica e liberam um único resíduo de amino ácido, um péptide, ou um tripéptido. E as **carboxipeptidases** agem no C terminal da cadeia polipeptídica e liberam um único aminoácido ou um dipéptido (SOUZA et al., 2014).

**Carboxipeptidases** podem ser ainda divididas em 3 grupos maiores: serine peptidases (EC 2.4.16), metalopeptidases (EC 2.4.17), e cisteine peptidases (EC 2.4.18), baseado na natureza do resíduo de aminoácido do sitio de atividade da enzima (SOUZA et al., 2014).

**Endopeptidases** clivam ligações peptídicas internas de proteínas. Sua classificação em subgrupos baseia-se principalmente na estrutura de seu sitio catalítico. Geralmente, os grupos funcionais do sitio ativo são identificados por meio de inibidores específicos. De acordo com a estrutura dos seus sítios de atividade, as proteases são subdivididos em quatro subgrupos (KUDRYAVTSEVA et al., 2008): **serino proteases** (EC 2.4.21), **cisteína proteases** (EC 2.4.22), **aspártico proteases** ou **endopeptidases** (EC 2.4.23), **metaloproteinases** ou **metaloendopeptidases** (EC 2.4.24) (SOUZA et al., 2014).

**Serino proteases** - caracterizadas pela presença de um resíduo de serina em seu sitio ativo. São geralmente ativas em pH neutro e alcalino, com pH ótimo entre 7 e 11, baixo peso molecular (18-35 kDa) (GUPTA et al., 2002).

**Cisteína protease:** A atividade de todas as proteases cisteína depende de uma díade catalítica constituída de cisteína e histidina. Geralmente as cisteínas proteases são ativas somente na presença de agentes redutores como HCN ou cisteína (SOUZA et al., 2014).

**Aspártico proteases:** comumente conhecida como proteases ácidas, são as endopeptidases que dependem do resíduo de ácido aspártico para sua atividade catalítica (SOUZA et al., 2014).

**Metaloproteases:** são as mais diversificadas do tipo catalítico das proteases. Elas são caracterizadas pelo requerimento de um íon metal divalente para sua atividade. (VRANOVA et al., 2013).

#### *1.3.3.5. Lipase*

Lipases (triacilglicerol éster hidrolases – E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de lipídeos para liberar ácidos orgânicos e glicerol, podendo a reação inversa (síntese) ocorrer em ambientes não aquosos. Este fenômeno é devido à sua capacidade de utilização em uma ampla gama de substratos, à sua estabilidade na presença de solventes orgânicos e à sua quimio, regio e enantiosseletividade (MENDES et al., 2013). De maneira geral, as lipases não requerem cofatores, atuam em ampla faixa de pH, são estáveis à altas temperaturas; possuem elevada especificidade e suas propriedades de regio, quimio e enantiosseletividade fazem com que sejam altamente aplicáveis em processos industriais (MESSIAS et al., 2011).

As lipases (E.C.3.1.1.3) têm sido definidas como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila constituída por mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são denominadas genericamente como esterases (GHALY et al., 2010). A figura 11 demonstra reações catalisadas por lipases.

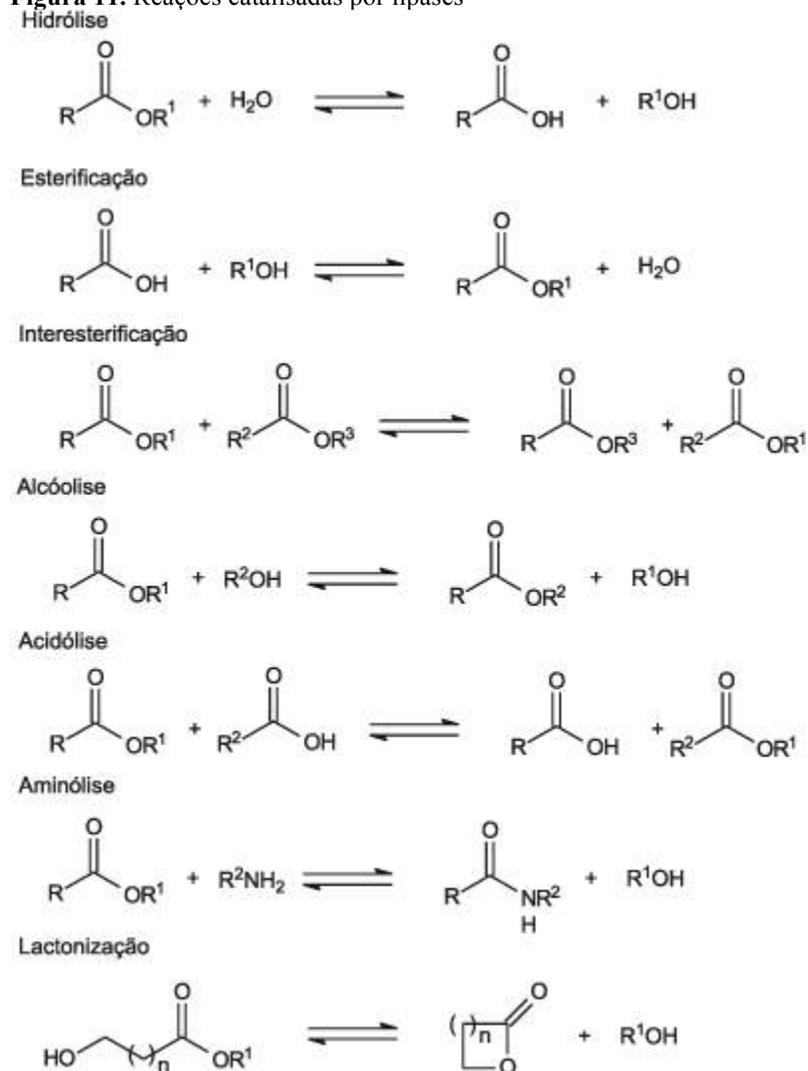
As lipases são amplamente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (CASTRO et al., 2004). Entretanto, somente as lipases microbianas são comercialmente utilizadas. As lipases microbianas constituem um importante grupo de enzimas, devido à versatilidade de suas propriedades e à fácil produção em massa. As lipases microbianas são amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e especificidade do substrato, o que as torna muito atrativas para a aplicação industrial (HASAN;

SHAH; HAMMED, 2006).

Os fungos filamentosos são considerados bons produtores de enzimas, e as lipases fúngicas são as preferidas para aplicação industrial (ROVEDA et al., 2010).

Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplices, enquanto esterases atuam sobre um único tipo de ligação éster, liberando ácidos graxos de baixo peso molecular. Deve-se enfatizar que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (MESSIAS et al., 2011).

**Figura 11.** Reações catalisadas por lipases



Fonte: COSTA, 2009

### 1.3.3.6. Enzimas Amilolíticas

As enzimas são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam, portanto, o termo amilase indica a ação sobre o amido (amilo), que contém dois tipos de polissacarídeos: a amilose (15-20%) e a amilopectina (80-85%) (SPIER, 2005). Para a indústria a hidrólise enzimática do amido tem sido preferível, devido à especificidade das enzimas na produção de xaropes de açúcar com propriedades químicas e físicas conhecidas e porque a hidrólise enzimática é mais branda resultando em poucas reações intermediárias e menor escurecimento (BULÉON et al, 1998).

GUPTA et al. (2003) mostra que as amilases são divididas em duas categorias, endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam as hidrólises de forma aleatória no interior da molécula de amido. Esta ação causa a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos. As exoamilases hidrolisam a partir das extremidades não-redutoras da cadeia resultando em produtos finais pequenos. Atualmente são conhecidas várias enzimas que hidrolisam a molécula de amido (Figura 12) em diferentes produtos e a ação combinada de várias enzimas é necessária para a completa hidrólise do amido.

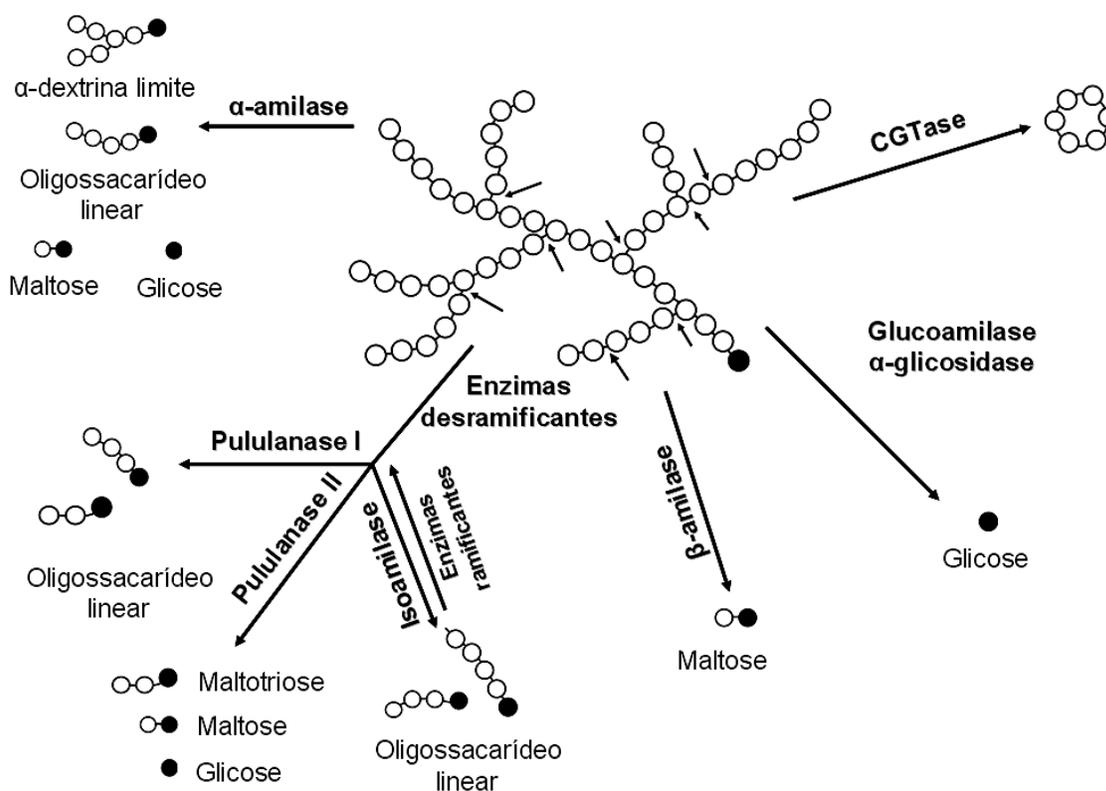
A amilose, um dos componentes do amido e fécula, é formada por unidades de D-glicose unidas linearmente por ligações  $\alpha$ -1,4 (CONN; STUMPF, 1975). Segundo os autores, possui uma extremidade redutora e uma não-redutora. A  $\alpha$ -amilase hidrolisa a cadeia linear da amilose, atacando ao acaso as ligações  $\alpha$ -1,4 por toda a cadeia, produzindo uma mistura de maltose e glucose. A  $\beta$ -amilase ataca a extremidade não redutora da amilose, liberando sucessivas unidades de maltose.

A amilopectina também pode ser atacada por  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase, mas as ligações  $\alpha$ -1,4 próximas das ramificações da amilopectina, e as ligações  $\alpha$ -1,6 não são hidrolisadas por essas enzimas. Desse modo, um núcleo condensado e ramificado, obtido da amilopectina original – denominado dextrina limite – é o produto dessas enzimas. Uma outra enzima, a  $\alpha$ -1,6 glucosidase irá hidrolisar a amilopectina até uma mistura de glucose e maltose (CONN; STUMPF, 1975).

Várias enzimas capazes de degradar o amido são hidrolíticas, elas quebram as ligações na molécula do amido, reagindo em presença de água, resultando em uma nova extremidade não redutora. Tais enzimas podem ser classificadas grosseiramente em amilases, que hidrolisam as

ligações do tipo  $\alpha$ -1,4, e amilases desramificantes que hidrolisam as ligações do tipo  $\alpha$ -1,6. Alguns autores, propõem quatro grupos de enzimas que convertem o amido os quais estão representados na Figura 12: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificantes e as transferases. (VAN DER MAAREL et al., 2002)

**Figura 12.** Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. (●) molécula glicose com extremidade redutora; (○) molécula de glicose sem extremidade redutora; (→) indicam o ponto de clivagem preferido na molécula de amido.



**Fonte:** modificada BERTOLDO; ANTRANIKIAN, 2002.

**Endoamilases:** são capazes de quebrar as ligações  $\alpha$ -1,4 aleatoriamente nas moléculas de amido, produzindo oligossacarídeos de vários tamanhos, ramificados ou não. Uma típica endoamilase é a  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1) que é encontrada em uma grande variedade de organismos desde Archae até bactéria e Eucaria. Glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltohexaose são produtos originários da ação de  $\alpha$ -amilase (BERTOLDO; ANTRANIKIAN, 2002).

**Exoamilases:** são capazes de atuar nas ligações  $\alpha$ -1,4 a partir da extremidade não redutora da molécula de amido, gerando apenas produtos de baixo peso molecular, principalmente glicose e maltose.  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.2) é um representante das exoamilases que converte o amido em maltose e  $\beta$ -dextrina limite. Muitas dessas enzimas são incapazes de atuar nas ligações  $\alpha$ -1,6 e a degradação de compostos ramificados fica incompleta, resultando em compostos com alta massa molecular (dextrinas limite). A glucoamilase (EC 3.2.1.3) é outra amilase importante desse grupo que atua no amido ou oligossacarídeos liberando  $\beta$ -glicose. A  $\alpha$ -glicosidase (EC 3.2.1.20) pode quebrar as ligações  $\alpha$ -1,6, porém, essa reação é mais lenta, quando comparada com a hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4 (BERTOLDO; ANTRANIKIAN, 2002).

**Enzimas desramificantes:** são enzimas que quebram exclusivamente ligações do tipo  $\alpha$ -1,6. Exemplos de enzimas desramificantes são a isoamilase e a pululanase. A isoamilase (EC 3.2.1.68) quebra especificamente as ligações  $\alpha$ -1,6 de amilopectina e dextrinas ramificadas. Tanto isoamilase como pululanase hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,6 da amilopectina liberando oligossacarídeos lineares de cadeia longa como produto final. A pululanase pode ser classificada em dois grupos de acordo com a especificidade ao substrato e o produto formado: pululanase do tipo I e pululanase do tipo II. A pululanase do tipo I (EC 3.2.1.41) hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,6 do pululano, que é um polímero formado por unidades de maltotriose unidas pelas ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 e de oligossacarídeos ramificados, liberando maltotriose e oligossacarídeos lineares, respectivamente. A pululanase do tipo II ou amilopululanase hidrolisa também, as ligações  $\alpha$ -1,4 da amilopectina liberando açúcares menores como glicose, maltose e maltotriose (BERTOLDO; ANTRANIKIAN, 2002).

**Transferases:** são enzimas que quebram ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 da molécula doadora e transferem parte do doador a um aceptor glicosídico com a formação de uma nova ligação glicosídica. As enzimas amilomaltase (EC 2.4.1.25) e ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) formam uma nova ligação  $\alpha$ -1,4, enquanto as enzimas de ramificação (EC 2.4.1.18) formam uma nova ligação  $\alpha$ -1,6. Essas enzimas realizam reações de transglicosilação intermolecular ou intramolecular, dependendo da posição do fragmento a ser transferido se está entre duas moléculas de açúcar (amilomaltase) ou se faz parte da mesma cadeia polissacarídica (CGTase e algumas enzimas ramificantes), respectivamente. A CGTase apresenta baixa atividade hidrolítica e geralmente, catalisa reações de transglicosilação e é considerada uma exoenzima, incapaz de atuar em pontos de ramificações. Seus principais

produtos quando atua no amido são as ciclodextrinas e dextrinas ramificadas de alto peso molecular (CGTase dextrina limite) (BERTOLDO; ANTRANIKIAN, 2002).

### Ação da enzima $\alpha$ -amilase

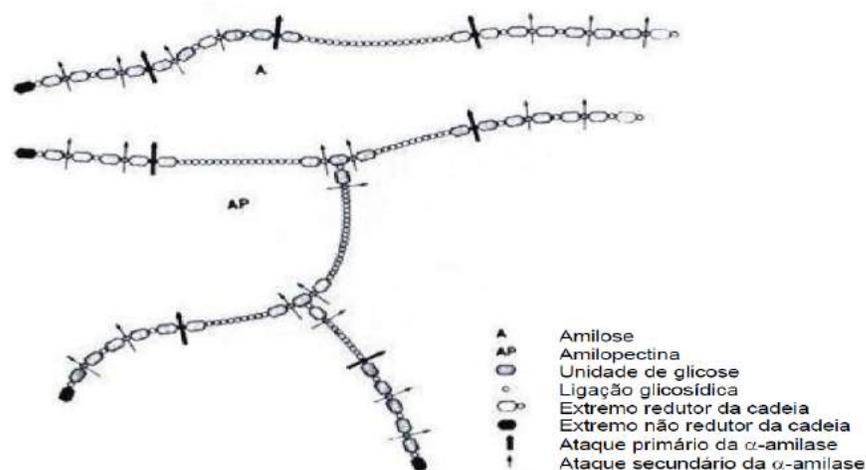
A atuação da  $\alpha$ -amilase tem por objetivo a quebra das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 em cadeias mais curtas, no entanto, as ligações  $\alpha$ -1,6 não são quebradas pela ação desta enzima (LACERDA, 2006). Na figura 8 pode-se observar o local de ação das  $\alpha$ -amilase, que após seu ataque rompendo as ligações representadas, originam fragmentos de 5 a 7 unidades de glicose (BRUCHMANN, 1980).

A ação da  $\alpha$ -amilase sobre a amilose se dá em duas etapas. A primeira consiste no ataque aleatório e rápido do substrato, resultando maltose e maltotriose, enquanto que a segunda, bem mais lenta, permite a formação de glicose e maltose.

A hidrólise da amilopectina pela  $\alpha$ -amilase fornece como produtos finais glicose, maltose e as  $\alpha$ -dextrinas limite, as quais são oligossacarídeos contendo quatro ou mais unidades de glicose unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -1,6 (LACERDA, 2006).

As ligações  $\alpha$ -1,6 da amilopectina não são hidrolisadas pela amilase, sendo o produto final do ataque da amilopectina pela amilase moléculas de isomaltose. A seguir é mostrada uma representação esquemática da ação da  $\alpha$ -amilase sobre a amilose e amilopectina. Para melhor visualização das cadeias de ambas as moléculas, são apresentadas na Figura 13 as moléculas na forma linear ao invés da forma espiral (SPIER, 2005).

**Figura 13.** Representação da ação da enzima  $\alpha$ -amilase sobre as frações de amido (amilose e amilopectina)



Fonte: BRUCHMANN, 1980

#### ***1.3.4. Enzimas Degradadoras de Parede Celular de Plantas***

Enzimas são proteínas que têm a propriedade de catalisar transformações de moléculas orgânicas em condições brandas de reação. A enzima, uma vez elaborada, poderá atuar independentemente da célula que a produziu, mesmo “in vitro”, desde que o pH, a temperatura e o substrato, entre outros fatores, sejam adequados. As enzimas apresentam características peculiares que favorecem seu emprego em processos biotecnológicos, sendo relevantes as vantagens de conversões enzimáticas nos processos industriais (COLEN, 2006).

Enzimas degradadoras de parede celular de plantas (EDPCP) foram identificadas como fatores de patogenicidade essenciais para fungos fitopatogênicos (DE LORENZO et al., 1997), incluindo *Rhizoctonia solani* (Rhizoctonia Genome Initiative, CVI - Craig Venter Institute e NCSU - North Carolina State University, 2008). Elas são essenciais para fitopatógenos como *R. solani* que dependem da digestão de paredes celulares da planta para liberar nutrientes a partir dos polissacarídeos da parede celular. Porque as EDPCPs e seus respectivos produtos de degradação podem provocar respostas de defesa das plantas, eles geralmente estão sob seleção diversificadora devido ao processo de co-evolução antagônica associado ao sistema de interação patógeno-hospedeiro (GUTTMAM et al., 2006; LIU et al., 2005). EDPCPs poderiam, também, evoluir sob efeito da seleção purificadora devido a processos de especialização a hospedeiros (BRUNNER et al., 2009).

A hipótese levantada por esse grupo é que uma série de mudanças de hospedeiros (de arroz para o milho, ou de arroz para braquiária) ou de salto de hospedeiros (de arroz para soja) têm acelerado a evolução das EDPCPs em cada população hospedeiro-adaptadas de AG-1 IA. Espera-se que seleção purificadora mais forte agiu sobre o cenário de salto de hospedeiro, quando o patógeno, a partir de uma população que originalmente infectava o arroz, se adaptado à Fabaceas (passando a infectar soja), em contraste com o cenário de mudança de hospedeiro (adaptando-se para infectar milho ou braquiária) (WU et al., 2010).

Dentro desse cenário, atualmente há estudos buscando a produção de algumas EDPCP para fins biotecnológicos, como é o caso de pectinases e celulases produzidas por um patógeno de tomate, *Botrytis cinerea* (WU et al., 2010). Outros estudos buscam a expressão dessas enzimas na própria planta como estudado por ZHANG et al. (2011), expressando EDPCP em milho. Não menos importante estão os estudos a nível molecular dessas enzimas. PAUCHET et

al., 2010 vem estudando por análises de pirosequenciamento as EDPCP produzidas por fungos Deuteromicetos, com finalidade de obter enzimas com potencial de aplicação em processos de degradação do material lignocelulósico.

Assim o estudo com *R. solani* pode nos trazer informações importantes do potencial de aplicação das EDPCP, especialmente as relativas a degradação da biomassa vegetal como as celulases, xilanases e pectinases. Da mesma forma, os conhecimentos da estrutura molecular dessas enzimas são muito promissores tanto para os estudos de fisiologia do aspecto de interação patógeno-planta, como para os estudos de expressão e clonagem visando uma aplicação biotecnológica para aplicação na produção de biocombustíveis como nos setores alimentícios.

### ***1.3.5. Processos Fermentativos para a Produção de Enzimas***

A produção industrial de enzimas é frequentemente limitada pelos custos dos meios para o cultivo de micro-organismos produtores de enzimas. A utilização de substratos de baixo custo, tais como resíduos agrícolas, tem sido sugerido como uma alternativa para reduzir os custos de produção de enzimas (PANDEY, 2000). O Brasil é um país com uma grande extensão territorial e com uma grande área agrícola. Assim, os resíduos agrícolas e/ou agroindustriais, tais como bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, casca de arroz, palha de milho, sabugo de milho, efluentes de indústria de papel, cascas de frutas e sementes estão disponíveis para uso (SÁNCHEZ, 2009). Em alguns casos, estes resíduos podem causar problemas ambientais devido à sua grande quantidade e o não reaproveitamento. Sendo assim, esses resíduos representam fontes de carbono alternativas para o crescimento microbiano, visando à produção de biomassa ou enzimas (SÁNCHEZ, 2009). Celulose e hemicelulose podem ser convertidas em açúcares solúveis a partir desses resíduos por hidrólise ácida ou enzimática. Assim, eles podem ser utilizados como uma fonte abundante e barata de energia renovável no mundo (SÁNCHEZ, 2009; PANDEY, 2000).

As duas principais estratégias para a produção de celulases e hemicelulases por micro-organismos são a fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FSm). A tabela 2 apresenta algumas características comparativas desses dois processos fermentativos (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010). A grande maioria dos microrganismos utilizados no processo de fermentação no estado sólido são fungos filamentosos (SILVA, 2002). A quantidade reduzida de água no substrato limita bastante o número de micro-organismos

capazes de se adaptar a este processo, porém os fungos se mostram bastante tolerantes a esse ambiente (FERNANDES, 2006).

### ***1.3.6. Aplicações Biotecnológicas das Enzimas***

Globalmente, o comércio e a aplicação de enzimas movimentaram, em 2010, cerca de US\$ 3,6 bilhões, sendo esperado um aumento de 9% para 2016 (DEWAN, 2012).

O mercado se encontra dividido em três segmentos, o de enzimas técnicas (constituído pelas indústrias de detergente, amido, têxtil, álcool combustível, polpa de papel e celulose e couro), alimentação e bebidas e alimentação animal (MUSSATTO et al., 2007).

Tal variedade de enzimas e ramos de aplicação para as mesmas, somado com a necessidade da utilização de processos industriais menos agressivos para o meio ambiente demonstra o potencial para aplicação de enzimas microbianas e justificam a pesquisa e produção de enzimas (MUSSATTO et al., 2007).

**Tabela 2.** Comparação das características da fermentação no estado sólido (FES) e da fermentação submersa (FSm)

| FES   | FSm   |
|---|---|
| Menor gama de produtos obtidos e de micro-organismos aptos a crescer nessas condições   | Maior demanda energética associada à esterilização do meio e à remoção de produto do meio fermentado  |
| Menor possibilidade de contaminação, pela ausência de água livre no sistema   | Em que pese a menor concentração de produtos obtida pela FS, a purificação dessas moléculas é facilitada pela ausência ou baixa concentração de partículas de substrato             |
| Menor disponibilidade de informações na literatura, no que tange a fenômenos de transporte e cinéticas de crescimento e de produção enzimática                | O alto teor de água e a natureza diluída do meio facilitam o controle da temperatura de cultivo, reduzindo a degradação do produto, em especial enzimas com baixa termoestabilidade |
| O extrato obtido é em geral de três a quatro vezes menos diluído que na FS, de forma que a produtividade e a concentração final de produto são maiores na FES | Quando operando com elevadas concentrações de substrato, podem ocorrer problemas reológicos no sistema  |
| Maior dificuldade no controle do processo e na adição de soluções desejadas   | Processos difusionais e de mistura são facilitados devido ao caráter homogêneo do sistema   |
| Menor volume de resíduos líquidos gerado  | Tecnologias de monitoramento de variáveis <i>on line</i> mais amplamente disponíveis  |

**Fonte:** CASTRO; PEREIRA JUNIOR (2010)

Há várias aplicações das celulasas, hemicelulasas e amilases em processos biotecnológicos em diversas indústrias como de alimentos, papel e celulose, biocombustível, têxtil, farmacêutica, etc. Para essas indústrias, a aplicação de tecnologia enzimática reduz custos

operacionais, aumenta a qualidade do produto, utilizando processos limpos que contribuem para diminuir os impactos ambientais (MAYRINK, 2010).

Nas últimas décadas, especial atenção tem sido dada aos processos de bioconversão da biomassa lignocelulósica, empregando processos enzimáticos microbianos, incluindo fungos, leveduras e bactérias, para despolimerização da celulose, conversão à glicose e posterior fermentação na produção de solventes e combustíveis como etanol (HOWARD, 2003).

#### *1.3.6.1. Celulases*

Na indústria têxtil, as celulases são capazes de tornar os tecidos mais lisos e macios, degradando as fibras da superfície. Também usadas no tratamento de jeans para retirar o excesso de corante, dão a aparência de lavado, processo denominado bioestonagem (LYND et al., 2002; DIENES, 2003). Na indústria de papel e celulose, participam do refino da poupa, aumentando sua qualidade e modificam as propriedades das fibras, o que aumenta a velocidade de fabricação do papel e tem a função de colaborar no processo de despigmentação da matriz celulósica, favorecendo o aumento da drenagem da água presente na polpa de papel para fabricação das folhas de papel reciclado (BHAT, 2000).

Na indústria de alimentos, as celulases participam na extração de compostos do chá-verde, proteína da soja, óleos essenciais, aromatizantes etc. Atuam também nos processos de produção de vinagre de laranja, inclusive, no processamento de sucos de frutas e vegetais, a ação combinada das hemicelulases e celulases apresenta um efeito sinérgico que é vantajoso sob os aspectos de rendimento, operacionalidade e qualidade do produto final (DaSILVA et al., 1997). Também na indústria de alimentos, celulases são utilizadas em processos de maceração, geralmente em conjunto com hemicelulases e pectinases, como na extração de suco de frutas e óleo de sementes (SILVA, 2008). Também possuem importante papel na filtração e clarificação de sucos de frutas, aumento na efetividade da extração da cor de sucos e na liquefação do tecido vegetal, o que permite melhor extração de pigmentos dos frutos (MUSSATTO et al., 2007).

Dentre as celulases, as  $\beta$ -glucosidases possuem capacidade de liberar compostos aromáticos durante a fabricação do vinho, como terpenos, compostos fenólicos de capacidade antioxidante, nutracêutica e flavorizante (DAROIT et al., 2007). A utilização de infusões de  $\beta$ -glucosidases em conjunto com pectinases faz com que aromas e características voláteis de

frutas e vegetais aumentem, o que é de grande importância para a indústria de alimentos (BHAT, 2000).

#### *1.3.6.2. Hemicelulases*

Quanto às hemicelulases, especialmente a xilanase, podem auxiliar na diminuição da poluição ambiental causada pelas indústrias de papel e celulose. Nestas indústrias, o cloro é usado na forma de agente químico branqueador, mas resulta em produtos residuais chamados compostos orgânicos, nocivos ao meio ambiente (DaSILVA, et al., 1997).

A xilanase vem sendo empregada no processo de biobranqueamento da polpa Kraft, a fim de diminuir a concentração do cloro utilizado no processo. Isto tem a função principal de diminuir a taxa de organoclorados produzidos nos efluentes desta indústria, que são lançados nos rios, poluindo-os. A xilanase degrada a xilana que liga a lignina à celulose e também a xilana que se deposita sobre a lignina após o cozimento com a redução do pH da pasta. Com esta ação, há uma melhor extração da lignina aderida à celulose, além de um favorecimento da acessibilidade do cloro à fração de lignina para oxidá-la, solubilizando-a e, conseqüentemente, levando à sua extração, deixando a polpa com grau de alvura adequada à fabricação do papel. O uso destas enzimas permite uma redução de 30% na quantidade de cloro usado (DaSILVA et al., 1997).

Hemicelulases podem ser utilizadas também no processo de polpação biomecânica, onde as lascas de madeira são tratadas enzimaticamente e a polpação mecânica subsequente resulta na utilização reduzida de energia, resistência melhorada, e tempo de cozimento reduzido (BHAT, 2000).

As xilanases são usadas na alimentação animal juntamente com glucanases, pectinases, celulases, proteases, amilases, fitase, galactosidases e lipases. Estas enzimas quebram arabinoxilanos nos ingredientes da ração, reduzindo a viscosidade da matéria-prima (POLIZELLI et al., 2005)

Na indústria alimentícia, as xilanases têm sido utilizadas para o aperfeiçoamento da qualidade de massas, pães, biscoitos, tortas e outros produtos de padaria. A capacidade das xilanases em hidrolisar a arabinoxilana, presente nos compostos utilizados para confecção dos produtos, facilita a redistribuição de água nas massas e nos pães. Esta alteração seria responsável pelos efeitos favoráveis na manipulação das massas, volume dos pães, textura e estabilidade.

Além disso, a produção de xilooligossacarídeos nos pães acarreta benefícios à saúde humana (FLANDER, 2008).

Xilanase e xilana são pouco utilizados na indústria farmacêutica. As xilanases são por vezes adicionadas em combinação com um complexo de enzimas (hemicelulases, proteases entre outros) como um suplemento dietético ou para tratar má digestão, mas poucos medicamentos podem ser encontradas com esta formulação (POLIZELLI et al., 2005).

O complexo xilanolítico pode ser utilizado na indústria têxtil para processar fibras vegetais, tais como juta ou linho. Para este propósito, a xilanase deve estar livre de enzimas celulolíticas. O processo consiste em incubar hastes de ramee seca (China grama) com xilanase para liberar as longas fibras de celulose intactas. Depois de utilizar este método, não há necessidade de usar fortes processos de branqueamento, uma vez que a lignina não sofre a oxidação, o que levaria a escurecimento das fibras. Relativamente pouca pesquisa tem sido feita sobre a preparação enzimática de fibras têxteis, e, no entanto este parece ser um mercado promissor exigindo o desenvolvimento de novas técnicas (POLIZELLI, et al., 2005).

#### *1.3.6.3. Pectinase*

Somente o mercado de alimentos e bebidas, segmento industrial com maior uso de pectinases, movimentou US\$ 1,2 bilhão em 2010. As pectinases, especificamente, equivalem a aproximadamente 10% da produção total de enzimas (MUKESH KUMAR et al., 2012). Elas são empregadas em diversos segmentos industriais e sua utilização em escala comercial iniciou a partir de 1930 para a preparação de sucos e vinhos (KASHYAP et al., 2001).

São muito utilizadas nas indústrias de sucos de frutas para reduzir viscosidade e melhorar e aumentar a eficiência de filtração e de clarificação; no tratamento preliminar da uva em indústrias vinícolas; na maceração, liquefação e extração de tecidos vegetais; na fermentação de chá, café e cacau; para melhorar a extração de óleos vegetais; na extração de polpa de tomate e no tratamento e degomagem de fibras naturais para as indústrias têxtil e de papel (UENOJO et al., 2007).

As pectinases também são utilizadas para reduzir o de amargor excessivo em cascas de citros, restaurar o aroma perdido durante secagem e melhorar a firmeza de pêssego e pickles processados. A infusão de pectinase e  $\beta$ -glucosidase aumenta o aroma e as substâncias voláteis de frutas e vegetais, aumenta a quantidade de agentes antioxidantes em óleo de oliva extra

virgem e reduz a indução ao ranço, além de outras aplicações (Tabela 3) (UENOJO & PASTORE, 2007).

**Tabela 3.** Funções e aplicações das pectinases na indústria de alimentos e de vinhos

| <b>Enzima</b>  | <b>Função</b>   | <b>Aplicação</b>  |
|--|---|---|
| Enzimas de maceração (pectinases, celulasas e hemicelulasas).                                      | Hidrólise de pectina solúvel e de componentes de paredes celulares, diminuição de viscosidade e manutenção de textura de sucos de frutas.             | Melhoramento na extração de sucos de frutas e de óleo de oliva, liberação de aromas, enzimas, proteínas, polissacarídeos, amido e ágar. |
| Pectinase ácida e termoestável com poligalacturonase, pectina esterase e pectina transeliminase.   | Rápida diminuição de viscosidade e quebra dos tecidos vegetais.   | Melhora o rompimento da fruta e aumenta a extração de pigmentos de cor.   |
| Poligalacturonase com alta atividade de pró-pectinase e baixa celulase.                            | Hidrólise parcial de pró-pectina  | Produção de purês com alta viscosidade.   |
| Poligalacturonase e pectina transeliminase com baixa atividade de pectina esterase e hemicelulase. | Hidrólise parcial de pró-pectina e de pectina solúvel em fragmentos de tamanho médio, formação de precipitado e remoção de hidrocolóides de celulose. | Produção de sucos vegetais não clarificados de baixa viscosidade.   |
| Poligalacturonase, pectina transeliminase e hemicelulase.  | Hidrólise completa de pectina e de polissacarídeos ramificados.   | Clarificação de sucos de frutas.  |
| Pectinase e $\beta$ -glicosidase.  | Infusão de pectinase e glicosidase para facilitar o descascamento e melhorar a firmeza de frutas e vegetais.  | Alteração das propriedades sensoriais de frutas e vegetais.   |
| Pectina esterase com atividade de poligalacturonase e de pectina liase.                            | Processamento de frutas.  | Produção de ketchup de alta qualidade e de polpas de frutas.  |
| Pectina esterase.  | Desesterificação e geleificação de pectina.   | Melhoramento na clarificação de cidra.  |
| Enzimas de maceração (pectinases, celulasas e hemicelulasas).                                      | Hidrólise de polissacarídeos das paredes celulares vegetais.  | Melhoramento da maceração da casca e extração de pigmentos de cor de uvas, qualidade, estabilidade, filtração e clarificação de vinhos. |

**Fonte:** UENOJO; PASTORE, 2007.

Na indústria farmacêutica, a enzima é utilizada para reduzir os níveis de colesterol no sangue e no tratamento de distúrbios gastrointestinais. Foi relatado também o possível efeito da pectina e seus produtos de degradação no combate ao câncer de cólon (SANTI et al., 2014).

Pectinases, associadas com outras carbohidrolases, como celulases, vêm sendo estudadas visando à sua aplicação na extração de óleos vegetais, como óleo de oliva, soja, semente de abóbora e dendê (TEIXEIRA et al., 2013; JIAO et al., 2014). O uso de enzimas durante a maceração para extração de óleo torna o processo mais brando e aumenta a quantidade de agentes antioxidantes e de vitamina E em óleo de oliva extravirgem (UENOJO et al., 2007). Essas enzimas também estão sendo empregadas para a produção de bioetanol de segunda geração na liberação de açúcares fermentáveis a partir de biomassa vegetal, ampliando ainda mais a aplicabilidade (tabela 4) (THOMPSON et al., 2013; REZIC et al., 2013; VIJAYALAXMI et al., 2013).

Outro campo de aplicação importante é na indústria têxtil e de papel. Na primeira, as pectinases são utilizadas para tratar as fibras naturais com o objetivo de facilitar a degomagem e tratar o resíduo líquido, na biopreparação de algodão e no polimento enzimático de tecidos mistos de juta e algodão (MONTEIRO; SILVA, 2009).

**Tabela 4.** Aplicações das pectinases em diferentes segmentos industriais

| <b>Indústria</b> | <b>Aplicação</b>   |
|------------------|--|
| Sucos e vinhos   | Melhoria na extração de sucos, clarificação, pigmentos, liberação de aromas e outros compostos.                              |
| Alimentos        | Produção de purês, polpas de frutas, liberação de aromas, compostos prebióticos e ração animal.                              |
| Farmacêutica     | Redução dos níveis de colesterol e tratamento de desordens intestinais.<br>Possível tratamento do câncer do cólon intestinal |
| Óleos            | Melhoria na extração de óleos e recuperação de óleos essenciais de cítricos, extração de agentes antioxidantes.              |
| Bioetanol        | Degradação de material orgânica e liberação de açúcares redutores para degradação microbiana e produção de bioetanol         |
| Chá e café       | Melhora na fermentação   |
| Têxtil           | Tratamento de fibras naturais  |
| Papel            | Bramqueamento da polpa <i>kraft</i>  |

**Fonte:** SANTI et al., 2014

Em algodão cru, a remoção da pectina, cera e agentes de goma com a utilização de pectinases, amilases, lipases e hemicelulases em condições adequadas substitui o uso da soda

cáustica e gera produtos de alta qualidade para posterior tingimento e processo de tecelagem com menor consumo de energia (UENOJO et al., 2007).

Na indústria de papel as pectinases são utilizadas para “branquear” a polpa kraft, reduzindo assim o impacto ambiental gerado pelos resíduos desse segmento industrial (KAUR et al., 2010; GUO et al., 2013).

#### 1.3.6.4. *Protease*

Enzimas proteolíticas foram as primeiras com aplicação tecnológica, pois já na antiguidade as proteases foram utilizadas na preparação de queijos e no tratamento de couros. Proteases microbianas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas de aplicação industrial; são responsáveis por cerca de 60% do mercado mundial de enzimas industriais (tabela 5). (SILVA, 2011).

**Tabela 5.** Inúmeras aplicações industriais das proteases

| <b>Fonte de obtenção</b>   | <b>Enzima</b>                 | <b>Aplicação Industrial</b>  |
|--|-------------------------------|--|
| Animal   | Tripsina, Quimotripsina, etc. | Indústria farmacêutica, de couro, processamento de alimentos, especialmente hidrólise de proteínas, e síntese de peptídeos |
| Vegetal  | Papaína, Ficina, Bromelina    | Produção de extratos de leveduras, cerveja resistente ao congelamento, panificação, fármacos, amaciamento e carne.         |
| <b>Micro-organismos</b>  |                               |  |
| <i>Aspergillus niger</i> ,<br><i>Aspergillus oryzae</i>  | Proteases ácidas e neutras    | Queijos, carnes, pescados, cereais, bebidas. Indústria cervejeira e de panificação. Manufatura de queijo                   |
| <i>(Aspergillus melleus, Endothia parasitica, Mucor mehei e Mucor pusillus)</i><br><i>(Bacillus licheniformis e Bacillus subtilis)</i><br><i>(Bacillus subtilis e Bacillus cereus)</i> | Proteases alcalinas           | Fabricação de detergentes e indústrias de couro, processamento de carnes, pescados e derivados lácteos.                    |
|  | Proteases neutras             | Produção de bebidas e panificação.   |

**Fonte:** SILVA, 2011

Proteases possuem uma grande variedade de aplicações na indústria alimentícia, e entre eles, aqueles relacionados aos valores nutricional e funcional dos produtos. Estes incluem uma

melhora na digestibilidade e qualidade sensorial dos alimentos, bem como proporcionar benefícios para a saúde, reduzindo compostos alergênicos (TAVANO, 2013).

No segmento das indústrias de alimentação, elas são o grupo de enzimas com maior aplicação, possuindo papel fundamental na fabricação de cervejas, na maturação de queijos, no amaciamento de carnes, na produção de hidrolisados funcionais, na panificação, na fabricação de adoçantes artificiais, como o aspartame (GIONGO, 2006).

A qualidade hidrolítica de proteases é explorado para a degradação do complexo de turbidez resultante da proteína em sumos de fruta e bebidas alcoólicas, a melhoria da qualidade de alimentos ricos em proteínas, a hidrólise da proteína de soja, a hidrólise de gelatina, caseína e hidrólise de proteínas de soro de leite, a recuperação de proteína de carne, e amaciamento de carne (SOUZA et al., 2014).

#### *1.3.6.5. Lipase*

Embora as lipases sejam produzidas por vegetais, animais e micro-organismos, os fungos são valorizados porque produzem enzimas extracelulares, o que facilita a recuperação destas do meio fermentativo, menor custo de produção, possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, além de oferecer um amplo espectro de características físico-químicas (CARVALHO et al., 2005).

As fontes fúngicas têm sido preferenciais, não somente devido às suas melhores características em relação à lipases bacterianas, mas porque, na sua maioria, não são nocivas à saúde humana e reconhecidas como GRAS (Generally Regarded As Safe) (MESSIAS et al., 2011). A identificação de novas fontes microbianas, principalmente não tóxicas ao organismo humano, é de interesse estratégico, pois, além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, tornam possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser realizados a partir de enzimas vegetais ou animais (OLIVEIRA et al., 2006).

Fungos de diversos gêneros são bons produtores de lipases e têm sido estudados do ponto de vista acadêmico e industrial (MESSIAS et al., 2011) A diversidade de microrganismos existentes justifica a busca por novos produtores de enzimas. (ROVEDA et al., 2010)

Uma das maiores aplicações industriais das lipases tem sido como aditivos em detergentes, pois facilitam os processos de limpeza, hidrolisando os lipídeos e favorecendo a

solubilização destas biomoléculas em água. Estas hidrolases são adicionadas em detergentes líquidos e sólidos, domésticos e industriais, e devem ser estáveis em pH alcalino, em altas temperaturas, e não devem sofrer desnaturação pela ação de surfactantes. A principal vantagem do uso de lipases nos detergentes em substituição aos polissulfatos está na biodegradabilidade e redução dos impactos ambientais, incluindo-se a vida aquática (MESSIAS et al., 2011).

A Tabela 6 apresenta algumas aplicações industriais das lipases (COSTA, 2009).

**Tabela 6.** Aplicações Industriais das Lipases

| <b>Indústria</b>       | <b>Aplicação</b>   |
|------------------------|--|
| Laticínios             | Hidrólise da gordura do leite                            |
| Panificação            | Aumento do aroma e da vida de prateleira                 |
| Cervejaria             | Aceleração da fermentação em função dos lipídeos         |
| Carne                  | Desenvolvimento do aroma e remoção do excesso de gordura |
| Farmacêutica           | Digestão de óleos e gorduras em alimentos                |
| Médica                 | Determinação de triglicerídeos no sangue                 |
| Papel                  | Tratamento de polpas de celulose                         |
| Tratamento de resíduos | Decomposição e remoção de substâncias oleosas            |

**Fonte:** (COSTA, 2009).

As lipases se destacam entre as hidrolases devido as suas múltiplas aplicações, e embora atualmente as aplicações das lipases estejam concentradas nas indústrias de detergentes e de alimentos e ainda sejam, em sua maioria, baseadas nas reações de hidrólise, novas aplicações decorrentes também das reações de síntese e transesterificação vêm se estabelecendo nos mais diversos campos: indústria farmacêutica, têxteis, polpa e papel, curtumes, cosméticos, biodiesel, biossensores e também no tratamento de efluentes (COSTA, 2009).

#### *1.3.6.6. Amilases*

As enzimas amilolíticas são amplamente aplicadas em processos biotecnológicos, tais como nas indústrias têxteis, de papel e celulose, de couro, detergentes, bebidas destiladas, cervejas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica (BARATO et al., 2011). Sendo disponível comercialmente, as amilases microbianas têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias que processam este polímero (PANDEY et al., 2005).

As amilases além de estarem presentes na formulação de detergentes enzimáticos, são importantes para conferir maior qualidade no processo de panificação e na fermentação da cerveja (SILVA, 2008).

Na indústria de panificação, as amilases proporcionam melhor coloração, volume e textura de miolo de pães. O emprego dessas enzimas na preparação do pão “fresco” por mais tempo. A  $\alpha$ -amilase fúngica confere maior potencial fermentativo, já a amiloglucosidase confere melhora do sabor e aroma de pães e também proporciona crosta com melhor coloração. As amilases fúngicas, na indústria cervejeira, convertem substratos amiláceos e açúcares antes da fermentação alcoólica, além de controlarem a turbidez devido ao amido presente e são utilizadas na produção de cervejas livres de dextrina (SANTANA et al., 2012).

As amilases, mais especificamente a  $\alpha$ -amilase, tem sido usada na indústria papelreira com o propósito de diminuir a viscosidade da goma de amido que é empregada sobre o papel durante o processamento do mesmo. A ação da  $\alpha$ -amilase sobre a camada de amido utilizada no revestimento do papel também contribui para a sua qualidade final (GUPTA et al., 2003). As  $\alpha$ -amilases têm sido utilizadas nas formulações de detergentes líquidos para reduzir em parte, a agressividade dos detergentes sobre madeiras e porcelanas (SILVA, 2009). Algumas limitações do uso de  $\alpha$ -amilases na composição dos detergentes consistem no fato de que, a maioria dessas enzimas demonstra sensibilidade ao cálcio e sua estabilidade pode ser severamente comprometida em baixas concentrações desse íon, e também na presença de alguns agentes oxidantes (GUPTA et al., 2003).

## 1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, C. C. P. **Produção, purificação e caracterização de xilanase termoestável produzida por *Cryptococcus flavescens* e expressão em *Pichia pastoris***. 2014. 184 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.
- ALMEIDA, M. N. **Celulases e hemicelulases de espécies de *Acremonium endofíticos***. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.
- ALKORTA, I. et al. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 33, n. 1, p. 21-28, 1998.
- BARATTO, C. M. et al. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, Joaçaba, v. 11, n. 2, p. 15-28, jul./dez. 2011.
- BEG, Q. K. et al. Microbial xylanases and their applications: a review. **Applied microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, n.3/4, p. 326-338, 2001.
- BERNARDES-DE-ASSIS, J. et al. Genetic structure of populations of the rice-infecting pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from China. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, n. 9, p. 1090-1099, 2009.
- BERTOLDO, C.; ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, GB, v. 6, n. 2, p. 151-60, Apr. 2002.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, issue 5, p. 355–383, 2000.
- BLACK, B. D. et al. Weed hosts for *Rhizoctonia solani*, causal agent for *Rhizoctonia* foliar blight of soybean (*Glycine max*). **Weed Technology**, Champaign, Ill., US, v. 10, n. 4, p. 865-869, 1996.
- BRAGATTO, J. **Avaliação da composição química da parede celular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene *ugdH* de soja, que codifica a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22)**. 2007. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- BRETT, C. E; WALDRON, K. W. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**.

London: Unwin Hyman, 1990.

BRUCHMANN, E. **Bioquímica técnica**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1980. 233 p.

BRUNNER, P. C.; KELLER, N.; McDONALD, B. A. Wheat domestication accelerated evolution and triggered positive selection in the  $\beta$ -Xylosidase enzyme of *Mycosphaerella graminicola*. **PLoS ONE**, Califórnia, US, v. 4, n. 11, p. e7884, 2009.

BULÉON, A. et al. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, Inglaterra, GB, v. 23, issue 2, p. 85-112, 1998.

CARVALHO, P. O. et al. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

CARVALHO, W. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CEREDA, M. P. Amidos Modificados. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v. 1, n. 30, p. 31-36, 1996.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

COSTA, R. J. **Avaliação do processo de extração de lipases de semente de trigo**. 2009. 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2009.

CONN, E. E.; STUMPF, P. K. **Introdução à bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. 447p.

DAROIT, D. J. et al. Production of extracellular b-glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 904-908, 2007.

DASILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulasas e celulasas, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim da SBCTA**,

Campinas, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.

DE LORENZO, G. et al. Fungal invasion enzymes and their inhibition. In *The Mycota. V Plant Relationships*, Part B, G. C. Carroll and P. Tudzynski, eds (Berlin: Springer-Verlag), p. 61–83.

DEWAN, S. S. Enzymes in the fruit juice industry. In: **Global Markets for enzymes in industrial application** – BIO030G. BBC Research. 2012.

DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Industrial Crops and Products: an International Journal**, Amsterdam, v. 20, n. 1, p. 11- 21, 2003.

FAVELA-TORRES E. et al. Pectinases. In: **Enzyme technology**. New Delhi: Asiatech Publisher, 2005. p. 273-296.

FEDATTO, L. M. **Caracterização de Proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira**. 2004. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agrossistemas)-Centro de Energia Nuclear na Agricultura [ESALQ/CENA], Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FENILLE, R. C.; SOUZA, N. L.; KURAMAE, E. E. Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, Holanda, NL, v. 108, n. 8, p. 783-792, 2002.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1984.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2006. 130 f. Tese (Doutorado em Química)-Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FLANDER, F. et al. Effects of laccase and xylanase on the chemical and rheological properties of oat and wheat doughs. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 56, n. 14, p. 5732-5742, 2008.

GALINDO, J. J. et al. Source of inoculums and development of bean web blight in Costa Rica. **Plant Disease**, Saint Paul, US, v. 67, p.1016-1021, 1983.

- GHALY, A. E. et al. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 6, n. 2, p. 54-76, 2010.
- GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp.** 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)-Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- GONZALEZ, D. et al. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. **Mycologia**, New York, US, v. 93, n. 6, p. 1138-1150, 2001.
- GUO, F. et al. An effective degumming enzyme from *Bacillus* sp. Y1 and synergistic action of hydrogen peroxide and protease on enzymatic degumming of ramie fibers. **Biomed Research International**, China, v. 2013, p. 1-9, 20
- GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied microbiology and Biotechnology**, Berlin, 59:15-32, 2002.
- GUPTA, R. MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v.38, p.1559-1616, 2003.
- GUTTMAN, D. S.; GROPP, S. J.; MORGAN, R. L.; WANG, P. W. Diversifying selection drives the evolution of the type III secretion system pilus of *Pseudomonas syringae*. **Molecular Biology and Evolution** 2006, 23(12):2342-2354.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMMED, A. Industrial application of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- HASHIBA, T.; KOBAYASHI, T. Rice diseases incited by *Rhizoctonia* species. In: SNEH, B. et al. (Ed.). ***Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p. 331-340.
- HOWARD, R. L. Lignocellulose biotechnonology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnonology**, Nairobi, v. 2, p. 602-619, 2003.
- JIAO, J. et al. Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pumpkin seeds and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 147, p. 17-24, 2014.
- JONES, R. K.; BELMAR, S. B. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from rice, soybean, and other crops grown in rotation with rice in Texas. **Plant Disease**, v. 73, p. 1004-1010, 1989.

- KARIM, A. A.; NORZIAH, M. H.; SEOW, C. C. Methods for the study of starch retrogradation. **Food Chemistry**, v. 71, p. 9-36, 2000.
- KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.
- KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Bioresource Technology**, v. 94, p. 239-243, 2004.
- KRETSCHMANN, D. Velcro mechanics in wood. **Natural Materials**, Madison, v. 2, n. 12, p. 775-776, 2003.
- KUDRYAVTSEVA, O. A. et al. Fungal Proteolytic Enzymes: Features of the Extracellular Proteases of Xylotrophic *Basidiomycetes*. **Microbiology**, Belozersky, 2008, v. 77, n. 6, p. 643-653. DOI:10.1134/S0026261708060015.
- LACERDA, L. G. **Uso de técnicas termoanalíticas na caracterização da hidrólise enzimática parcial de amidos de matérias-primas tropicais**. 2006. 81 f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.
- LEE, F. N.; RUSH, M. C. Rice sheath blight: a major rice disease. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, p. 829-832, 1983.
- LIU, Z. et al: Patterns of diversifying selection in the phytotoxin-like scr74 gene family of *Phytophthora infestans*. **Molecular Biology and Evolution** 2005, 22(3):659-672.
- LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.
- MAYRINK, M. I. C. B. **Produção de enzimas fúngicas e avaliação do potencial das celulases na sacarificação da celulose**. 2010. 94 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F; GIORDANO, R. L. C. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 245-251, 2013.
- MESSIAS, J. M et al. A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011. DOI: 10.5433/1679-0375.2011v32n2p213.

- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, Goiás, p. 9-23, 2009.
- MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.
- MUKESH KUMAR, D. J. et al. Production and Optimization of Pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using Cassava Waste. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 2, n. 3, p. 369-375, 2012.
- NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à mela do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 505-508, 2006.
- NELSON, D. R.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga et al.; revisão técnica: Carlos Termignoni et al. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1250 p.
- OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, n. 1, p. 125-143, 1987.
- OLIVEIRA, A. N. et al. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de *Rizóbia* nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.
- O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**. 1997; 4(3):173-207.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, London, v. 35, n. 1- 10, p.1153-1169, 2000.
- PANDEY, A. et al. **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005. 760 p.
- PASCUAL, C. B.; HYAKUMACHI, M. Distribution of vegetatively compatible populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA in a field planted with different host species. **Journal of General Plant Pathology**, v. 66, p. 206-209, 2000.
- PAUCHET, Y. et al. Diversity of beetle genes encoding novel plant cell wall degrading enzymes. **PLoS ONE**; December, e15635, 2010.

PERDOMO, R. et al. Caracterización y evaluación de virulencia en aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn, causante de la mancha bandeada en maíz. **Interciência**, v. 32, n. 1, p. 48-55, 2007.

PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology** v. 5, p. 53–63, 2002.

PERONI, F. H. G. **Características estruturais e físico-químicas de amidos obtidos de diferentes fontes botânicas**. 2003. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2003.

POLIZELLI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology** (2005) 67: 577–591. DOI 10.1007/s00253-005-1904-7

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Biology of plants. New York: **Worth Publishers**, 2001. 791 p.

ROWELL, R. M. **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**. Madison: CRC Press, 2005.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 30(1): 126-131, jan.-mar. 2010. ISSN 0101-2061

SABOTIC, J.; KOS, J. Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 93:1351-1375, 2012.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, p.185–194, 2009.

SANTANA, R. S. M.; GONÇALVES, Z. S.; FRANCO, M. Produção de amilase a partir da fermentação em estado sólido do farelo de cacau. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 14, p.1981-1987, 2012.

SANTI, L.; BERGER, M.; SILVA, W. O. B. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. **Caderno Pedagógico**, Lajeado, v. 11, n. 1, p. 130-139, 2014.

SANTI, L. **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais**. 2005. 90 f. Dissertação

(Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Centro de Biotecnologia , Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SANTOS, E. A. O. **Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de xilanase.** 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Ilha Solteira, 2012.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, São Paulo, 1-7. (2012).

SHEN, Z. et al. 1999. Pectin methylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (*Coleoptera: Curculionidae*): Purification and characterization. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 209–214.

SILVA, M. A. C. R. da. **Isolamento e caracterização dos polissacarídeos das paredes celulares da azeitona.** 1993. 205 f. Tese (Doutorado em Química)- Universidade de Aveiro, Portugal, 1993.

SILVA, A. R. Z. **Desenvolvimento de bioprocessos para a produção de fitase por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido utilizando subprodutos agrícolas para aplicação como aditivo na alimentação de aves e suínos.** 2002. 96 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal do Paraná- Setor de Tecnologia, Curitiba, 2002.

SILVA, D. et al. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, v.40, p.2885-2889, 2005.

SILVA, L. A. D. **Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis*.** 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SILVA, T. M. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus*.** 2009. 216 f. Tese (Doutorado em Ciências)-Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SILVA, M. A. **Produção de protease e biossurfactante por *Bacillus licheniformis*.** 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais)- Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2011.

SIMÕES, M. L. G. **Produção de xilanase por fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga.** 2006. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2006.

SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of *Rhizoctonia* species**. Saint Paul: The American Phytopathological Society Press, 1991. 133 p.

SO BIOLOGIA. **Estrutura da parede celular vegetal**. [Porto Alegre, Copyright © 2008-2016]. Disponível em:  
<[http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Morfofisiologia\\_vegetal/morfovegetal15.php](http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Morfofisiologia_vegetal/morfovegetal15.php)>.  
Acesso em: 22 ago. 2016.

SOUZA, E. C. et al. Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado ao arroz em Tocantins, Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 129-136. 2007. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-54052007000200005&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052007000200005&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 20 de agosto de 2016

SOUZA, P. M. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology** 46, 2, 337-346 (2014). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246220140359>.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas A-amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 178 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal do Paraná- Setor de Tecnologia, Curitiba, 2005.

SUMNER, D. R. Sclerotia formation by *Rhizoctonia* species and their survival. In: SNEH, B. et al. (Ed.). ***Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p. 207-215.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 90:1- 11, 2013.

TAVARES, V. B. et al. Utilização de resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 722-725, 1998.

TEIXEIRA, C. B. et al. Simultaneous extraction of oil and antioxidant compounds from oil palm fruit (*Elaeis guineensis*) by an aqueous enzymatic process. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 575-581, 2013.

THOMPSON, C. E. et al. A potential source for cellulolytic enzyme discovery and environmental aspects revealed through metagenomics of Brazilian mangroves. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 65, 2013.

REZIC, T. et al. Integrated hydrolyzation and fermentation of sugar beet pulp to bioethanol. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 9, p.1244-1252, 2013.

- VIJAYALAXMI, S. et al. Production of bioethanol from fermented sugars of sugarcane bagasse produced by lignocellulolytic enzymes of *Exiguobacterium* sp. VSG-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 1, p. 246-260, 2013.
- UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388-394, 2007.
- UENOJO, M.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, São Paulo Vol. 30, No. 3, 616-622, 2007
- VRANOVA, V.; REJSEK, K.; FORMANEK, P. Proteolytic activity in soil: A review. **Applied Soil Ecology** 70:23-32, 2013
- VAN DER MAAREL, M.J.E.C. et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v.94, p.137 – 155, 2002.
- WHITAKER, J. R. Principles of enzymology for food sciences. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1972. 636 p.
- WONG, K. K. Y.; SADDLER, J. N. Trichoderma xylanases, their properties and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 12, n. 1-6, p. 413-35, 1992.
- WU, J.Y.; JI, Z.; XU, J.; CHEN, X.; TONG, Y. Analysis on the pathogenicity of the cell wall degradation enzymes produced by *Botrytis cinerea* to tomato plant. Journal of Yangzhou University, **Agricultural and Life Sciences Edition**. 31 (3): 3, 70-74, 2010.
- ZAKHAROV, E.V, HELLMANN, J.J. Genetic differentiation across a latitudinal gradient in two co-occurring butterfly species: revealing population differences in a context of climate change. **Mol Ecol** 2008, 17(1):189-208.
- ZHAN J, MCDONALD BA: Thermal adaptation in the fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Mol Ecol**. 2011, 20:1689–1701.

# CAPÍTULO 2

---

## **2. PRODUÇÃO DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE PAREDE CELULAR E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA XILANASE EM EXTRATO BRUTO**

## 2.1. INTRODUÇÃO

Os setores agroindustriais e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos como sólidos. A observação ao longo dos tempos ficou comprovado que esses resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final e potencial poluente, além de representarem, muitas vezes, perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor. Ao contrario do que acontecia no passado, quando resíduos era disposto em aterros sanitários ou empregados sem tratamento para ração animal ou adubo, atualmente, conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agroindustriais (ROCHA, 2010).

A estrutura desses materiais tem como seus principais componentes celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas, o que os caracteriza como materiais extremamente heterogêneos, que servem tanto como fonte de carbono e energia quanto de suporte para o crescimento microbiano (PANDEY, 2003).

Reconhecidamente, as células microbianas são importantes produtoras de enzimas, oferecendo uma serie de vantagens: a produção pode ser aumentada facilmente, apresenta natureza diversa permitindo a produção de varias enzimas, são relativamente fáceis de serem cultivadas em ambiente controlado e são altamente sensíveis a alterações genéticas, o que permite obtenção de linhagens melhoradas quanto a produção e qualidade da enzima. O processo fermentativo permite também a produção de enzimas com consistente produtividade e menor custo (ROCHA, 2010).

Fungos fitopatogênicos (que causam doenças em plantas) produzem enzimas durante o processo de infecção, assim como fungos endofíticos (que colonizam as plantas de forma assintomática) produzem enzimas para penetrar na planta hospedeira ou durante a competição com fungos fitopatogênicos. A enzima, uma vez elaborada, poderá atuar independentemente da célula que a produziu, mesmo “*in vitro*”, desde que o pH, a temperatura e o substrato, entre outros fatores, sejam adequados. (SANTOS et al., 2014).

DeBary (1886) foi o primeiro a sugerir que as enzimas extracelulares podem estar envolvidas no processo de infecção de planta de fungos patogênicos. Desde então, muita pesquisa tem sido focada em tentar determinar o papel e a importância das enzimas

extracelulares de degradação da parede celular de planta (EDPCP) para a virulência por fungos patogênicos. Tradicionalmente, isto tem sido feito por meio de purificação e caracterização de EDPCP e examinando o efeito de enzimas purificadas ou parcialmente purificadas em células vegetais. Apesar do progresso considerável, isso não resultou em conclusões definitivas sobre a importância da EDPCP por fungos patogênicos (ANNIS; GOODWIN, 1997).

Além da patogênese, a análise da produção enzimática de fungos, em meio de cultura sólido, é descrita como um método simples e rápido para constatar variantes genéticas em uma população, pela presença ou ausência de enzimas específicas (BUENO et al., 2009).

Apesar da alta produção de enzimas extracelulares degradadora de parede celular de planta produzida por fungos patogênicos, poucos estudos têm como objetivo a produção e a utilização dessas enzimas.

## 2.2. OBJETIVOS DO CAPÍTULO

- a) Avaliar a produção de enzimas degradadoras de parede celular do fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA isolados de culturas de arroz, braquiária e soja;
- b) Avaliar o efeito da fonte de carbono, frente às linhagens selecionadas;
- c) Ensaios visando seleção do meio de cultivo e melhor tempo de produção das enzimas de interesse.
- d) Cultivar os isolados nos substratos braquiária, palha de soja e farelo de trigo, para obtenção das proteínas de interesse;
- e) Caracterizar física e quimicamente a enzima xilanase das linhagens que apresentarem maior atividade enzimática.

## 2.3. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.3.1. *Micro-organismo*

Foram utilizados 87 isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA selecionado de diferentes hospedeiros, procedentes de diferentes regiões do país como Mato Grosso, Tocantins, Roraima, Rondônia, Pará, Maranhão. Foi realizada uma seleção com 26 isolados da cultura de arroz, 36 da cultura de braquiária e 25 da cultura de soja. Todos os isolados estão depositados na coleção de fungos fitopatogênicos do Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos da UNESP Campus de Ilha Solteira, sob responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Ceresini.

Os escleródios (estrutura de reprodução) de todos os isolados são mantidos em sílica gel a  $-21^{\circ}\text{C}$  até sua utilização. Para crescimento dos micro-organismo foi utilizado o meio BDA (Batata Dextrose Agar). Os pontos de coleta foram georreferenciados (ANEXO 1).

### 2.3.2. *Enzimas*

As enzimas analisadas inicialmente foram algumas das que se caracterizam como degradadoras de parede celular de plantas: celulases (CMCase e Avicelase) e hemicelulases (xilanase). Posteriormente foi avaliada a produção de enzimas do complexo amilolítico ( $\alpha$ -amilase) e  $\beta$ -glucosidase. Também foram avaliadas a produção de enzimas como pectinase, protease e lipase

### 2.3.3. *Produção da enzima*

#### 2.3.3.1. *Fermentação em Estado Sólido*

Para a produção das enzimas extracelulares, degradadoras de parede celular de plantas utilizou-se a fermentação em estado sólido (FES). Foi realizado cultivo de farelo de trigo como substrato, o qual foi obtido do mercado local. Os frascos contendo substrato foram esterilizados antes de serem inoculados. A fermentação foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com 5g de substrato e inoculados com 5 discos do crescimento em placa de Petri com meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Agar) de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, umedecidos com 5 mL de solução salina ( $1,4 \text{ gL}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $2 \text{ gL}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$ ,  $0,2 \text{ gL}^{-1} \text{ MgSO}_4$ ,  $0,3 \text{ gL}^{-1} (\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ), a fim de se manter uma umidade relativa de 50% e incubados a  $25^{\circ}\text{C}$  por 96h. Ao final de cada fermentação,

a solução enzimática bruta foi extraída pela adição de 40 mL de água estéril em cada frasco, os quais permaneceram sob agitação de 100 ciclos por minuto, em temperatura ambiente por 1 hora. Decorridos esse tempo o material foi filtrado à vácuo e centrifugado a 10.000  $\times g$  por 15 min. obtendo uma solução livre de células, a qual foi utilizada para as análises enzimáticas. Para avaliar o efeito da fonte de carbono na produção das enzimas, foram selecionados 5 isolados de cada cultura, os quais apresentaram maior produção de xilanase e testados para os diferentes resíduos agrícolas (sabugo e palha de milho, palha de arroz, palha de soja e braquiária triturada), os quais foram lavados, secos em estufa e triturados. Foi utilizado 5g de cada substrato na fermentação.

### ***2.3.4. Determinação da Atividade Enzimática***

#### *2.3.4.1. Determinação de atividade celulase, hemicelulase e pectinase*

As atividades de endoglucanase (CMCase), Avicelase, endoxilanase e exopoligalacturonase (exo-PG) foram detectadas pela formação de açúcares redutores a partir dos substratos carboximetilcelulose, celulose microcristalina (Avicel), xilana birchwood e pectina cítrica, respectivamente, pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS (MILLER, 1959). A mistura de reação contendo 25  $\mu\text{L}$  da enzima bruta e 225  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 1,0% de substrato em tampão acetato 100 mM a pH 5,5 foi incubada a 40°C em banho maria por 10 min. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540 nm, e a quantidade de enzima produzida foi determinada utilizando-se como padrão a glicose (0 – 1,0  $\text{mg mL}^{-1}$ ), a xilose (0 – 1,0  $\text{mg mL}^{-1}$ ) e ácido galacturônico (0 – 1,0  $\text{mg mL}^{-1}$ ) para a determinação de unidades enzimáticas de celulasas, xilanase e pectinase, respectivamente. Uma unidade de atividade enzimática é definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto. A atividade específica foi expressa por unidade de atividade total por mg de proteína total ( $\text{U mg}^{-1}$  proteína). A atividade enzimática foi calculada pela equação linear obtida da curva padrão ( $y = ax+b$ ) x tempo de reação x volume da enzima x fator de diluição (quando houver)

#### *2.3.4.2. Determinação de atividade $\beta$ -glucosidase*

A avaliação da atividade  $\beta$ -glucosidase foi determinada com a utilização do substrato cromogênico  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (PNPG) (LEITE et al., 2007).

A mistura de reação contendo 5  $\mu\text{L}$  da enzima bruta, 250  $\mu\text{L}$  de tampão acetato 100 mM a pH 5,5 e 250  $\mu\text{L}$  de solução de  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (PNPG) a 4,0 mM foi incubada a 55°C em banho maria por 10 min e paralisada com 2,0 mL de solução de carbonato de sódio 2,0 M. O controle foi preparado conforme descrito, colocando-se carbonato de sódio antes da enzima para inativação da mesma.

A absorbância foi determinada a 410 nm em espectrofotômetro e cubeta de quartzo. Uma unidade de  $\beta$ -glucosidase corresponde à quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de nitrofenol por minuto nas condições de reação. A atividade  $\beta$ -glucosidase foi calculada pela equação linear obtida da curva padrão ( $y = ax+b$ ) x tempo de reação x volume da enzima x fator de diluição (quando houver)

#### 2.3.4.3. *Determinação de atividade amilase*

A atividade para  $\alpha$ -amilase (1,4- $\alpha$ -D-glucano glucanohidrolase, E.C. 3.2.1.1) foi analisada utilizando os métodos dextrinizante descrito por Fuwa (1954) e Pongsawadi; Yagisawa (1987) com algumas modificações.

Para o método dextrinizante a mistura da reação foi composta por 100  $\mu\text{L}$  da solução enzimática convenientemente diluída, onde foi adicionado a 300  $\mu\text{L}$  de solução de amido solúvel a 0,5%, em tampão acetato 0,1 M, pH 5,5. Após incubação a 40°C, por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 4,0 mL de solução de HCl 0,2 M. Em seguida, a reação recebeu 500  $\mu\text{L}$  de reativo de Iodo (0,30 % de KI e 0,03 % de  $\text{I}_2$ ). A mistura de reação foi diluída com 10 mL de água destilada. O controle foi preparado conforme o processo descrito, substituindo-se a enzima pelo volume equivalente de enzima inativa. A absorbância foi determinada a 700 nm em espectrofotômetro. A atividade amilolítica foi calculada da seguinte maneira:  $\text{U/mL} = ((\text{Controle} - \text{reação}) / \text{controle}) \times 10$  (fator de descoloração) x volume da enzima x fator de diluição (quando houver)

Uma unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10 % a intensidade da cor azul do complexo Iodo-Amido por minuto.

#### 2.3.4.4. *Determinação da atividade de Protease*

Atividade proteolítica foi determinada de acordo com o protocolo descrito por Sarath et al. (1996) com algumas modificações.

Foi utilizado 500 µL de caseína a 1% (m/v), preparada em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, + 100 µL de tampão fosfato 50 mM pH 6,5 + 50 µL da solução enzimática. A mistura reacional foi incubada por 15 min a 40°C. Depois de percorrido o tempo de reação foi adicionado 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para interromper a reação, em seguida, os tubos testes e brancos foram centrifugados por 15 min a 10000g a 30°C. Um controle foi preparado, onde o TCA foi adicionado antes do extrato enzimático. Os sobrenadantes dos tubos testes foram lidos contra seus respectivos controles no comprimento de onda 280 nm, em espectrofotômetro.

Uma unidade de atividade proteolítica (UAP) corresponde a 1 µmol de tirosina por mL liberado por minuto de reação. A atividade proteolítica foi calculada da seguinte maneira:  $UAP/mL = (\Delta \text{ Abs. } 280 \text{ nm} \times 10^6 \times \text{Volume reação}) / E \times t \times 1029$ , onde:  $10^6$  = unidades do substrato produzidas no tempo de ensaio (µmol); E = volume de enzima; t = tempo da reação; 1029 = coeficiente de extinção molar.

A atividade específica foi expressa como unidades de atividade enzimática por mg de proteína (HAMIN NETO, 2012).

#### 2.3.4.5. *Determinação da Atividade de Lipase*

A avaliação da atividade lipolítica foi realizada pelo método descrito por Gupta et al., (2002) e Singh, Banerjee (2007) com modificações. Tal método baseia-se na reação de hidrólise catalisada pela lipase de ésteres de p-nitrofenil, com formação de produto cromóforo p-nitrofenol. A atividade lipolítica foi realizada por espectrofotometria usando p-nitrofenil-palmitato (pNPP, massa molar: 377,5 g mol<sup>-1</sup>) como substrato em um sistema em emulsão. Para a solução de substrato 6 mg de pNPP foram solubilizados em 2 mL de isopropanol. Para o preparo da solução aquosa 50 µL de Triton X-100 e 10 mg de goma arábica foram homogeneizados em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,0) em um volume total de 18 mL. Para o preparo da emulsão, 2 mL da solução do substrato foram acrescidos a 18 mL da solução aquosa. A reação enzimática foi realizada pela mistura de 50 µL de extrato enzimático com 450 µL do substrato e foi incubada a 45°C por 30 min. A reação foi interrompida por fervura por 1 min e,

após o resfriamento das amostras foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de solução saturada de tetraborato de sódio. As absorvâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro a 410 nm, após leitura contra seus respectivos brancos. Os tubos brancos foram realizados com a enzima inativada por fervura e seguiu os mesmos parâmetros experimentais. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os cálculos de atividade lipolítica baseiam-se na variação de absorvância demonstrado pela Equação abaixo. Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde a 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol liberado em um minuto de reação (TOMBINI, 2015).

$$\text{Atividade enzimática (UmL}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta\text{abs.} \times 10 \times 10^6}{t \times 12276}$$

Em que:

$\Delta\text{abs.}$  = variação de absorvância durante 30 minutos de ensaio;

10 = fator de diluição da enzima no meio reacional;

$10^6$  = unidades do substrato produzidas no tempo de ensaio ( $\mu\text{mol}$ );

t = tempo de reação;

12276 = coeficiente de extinção molar do substrato *p*-nitrofenol ( $\epsilon$ ).

### ***2.3.5. Determinação de proteína***

A proteína foi determinada pelo método de Hartree-Lowry (HARTREE, 1972), no qual a mistura da reação de proteína foi composta de 500  $\mu\text{L}$  da solução de proteína convenientemente diluída, onde foi adicionado 450  $\mu\text{L}$  do reagente A (2 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ , 100 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,5 mL  $\text{L}^{-1}$  solução NaOH a 1N) e incubado em banho Maria a 50°C por 10 min. Após, a reação foi resfriada em temperatura ambiente e adicionado o reagente B (2%  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ , 1%  $\text{CuSO}_4$ , 10% solução NaOH, a 1N) e incubado em temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, foi adicionado 1,5 mL do reagente C (1 vol. de Folin Ciocalteu (Sigma) com 15 vol. de água) e incubado em banho Maria a 50°C por 10 min. A absorvância da mistura de reação foi determinada a 650 nm e a concentração de proteína nas amostras foi determinada por uma curva analítica de soro albumina bovina (0 – 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### ***2.3.6. Estudo do perfil de produção enzimática***

Após a análise da produção enzimática em diferentes fontes de carbono, foram selecionados cinco isolados de cada tipo de cultura, as quais apresentaram boa produção das enzimas testadas. Os isolados selecionados foram submetidos a fermentação em estado sólido com avaliação a cada 24h por um período de 192h, utilizando como substrato palha de soja, braquiária triturada e farelo de trigo.

### ***2.3.7. Características Físico-Químicas***

As propriedades físicas e químicas das enzimas bruta foram determinadas utilizando um isolado de cada cultura (arroz, braquiária e soja), os quais exibiram maior atividade xilanolítica. Assim, a enzima xilanase foi caracterizada usando a solução enzimática bruta produzida na fermentação em estado sólido por 96h utilizando farelo de trigo, como fonte de carbono.

#### ***2.3.7.1. Temperatura Ótima***

Para determinar a temperatura ótima de atuação da xilanase. As misturas reacionais foram mantidas sob diferentes temperaturas, de 5 a 95°C, por 10 min, em banho-maria. As temperaturas ótimas foram determinadas utilizando tampão de xilana 1% para a determinação da atividade residual da xilanase.

#### ***2.3.7.2. pH Ótimo e de estabilidade***

Para determinação do pH ótimo da xilanase foi utilizado o tampão McIlvaine 100 mM (pH 3,0-8,0) (McILVAINE, 1921) e tampão glicina-NaOH 100 mM (pH 8,0-11) com substrato xilana 1%. A mistura reacional foi incubada em banho-maria a 55 °C por 10 min.

A estabilidade da xilanase, foi avaliada mantendo a enzima por 24h em tampões de pH variando na faixa de 3,0 a 11,0, com intervalo de 0,5 unidade de pH, em banho-maria a 18 °C. Após esse período, foi realizada a dosagem enzimática no pH ótimo de cada isolado (pH 6,0 para RR\_A23 isolado de arroz, pH 6,5 para PA\_B1F6 isolado de braquiária e pH 7,5 para MT\_S085 isolado de soja) utilizando xilana 1% e incubadas na temperatura ótima em banho maria, 55 °C por 10 min para a determinação da atividade xilanolítica remanescente.

### ***2.3.8. Eletroforese e coloração***

Para a verificação das diferentes proteínas liberadas pelos isolados nos substratos de arroz, braquiária, farelo de trigo e soja produzidas de acordo com o item 2.3.3.1., foram aplicadas amostras do extrato obtido em géis de poliacrilamida 12 % sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), como descrito por Laemmli (1970), a 110W de corrente constante utilizando um sistema Mini-Protein III Cell (BioRad Laboratories; Hercules, CA, EUA). As amostras foram preparadas adicionando-se 10 µl de amostra concentrada 10X e 5 µl de tampão de amostra 4X (4 vezes concentrado - Tris HCl 1M pH 6,8, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,4% e SDS 8% e DTT (ditiotreitól) 0,4M). Em seguida as amostras foram fervidas por 10 min. Um volume de 5 µl foi aplicado no gel. O marcador de peso molecular usado foi Amersham<sup>TM</sup> – LMW Calibration Kit para SDS Electrophoresis. O gel foi corado com Coomassie R-250.

## 2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.4.1. Produção de enzimas

Os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundos das culturas de arroz, soja e braquiária, foram submetidos inicialmente a ensaios para produção da enzima e determinação da atividade enzimática utilizando farelo de trigo como fonte de carbono, sob fermentação em estado sólido por 96h a 25 °C. O farelo de trigo foi escolhido por ser um substrato complexo rico em proteínas (14%), carboidratos (27%), minerais (5%), gordura (6%) e vitamina B (ALVES-PRADO et al., 2010) contribuindo para um melhor crescimento e produção de enzimas por vários micro-organismos (LEITE et al., 2007; 2008).

Com base nestes resultados, para as análises posteriores, foram selecionados apenas 5 isolados proveniente de cada cultura agrícola (arroz, soja e braquiária).

#### 2.4.1.1. Isolados de cultura de arroz

Os valores da produção de atividade enzimática dos 25 isolados do fungo *Rhizoctonia solani* do grupo AG-1-IA provenientes de culturas de arroz estão apresentados na tabela 7. Dentre eles, o isolado RR\_A41 apresentou alta produção de xilanase com 41,1 U mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 7.** Proteína (mg mL<sup>-1</sup>) e atividade xilanase (U mL<sup>-1</sup> e U g<sup>-1</sup> de substrato) dos isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundos da cultura de arroz, cultivados sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C.

| Isolados | Proteína<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Amilase<br>(U mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Amilase<br>(U g <sup>-1</sup> ) | Específica<br>(U mg <sup>-1</sup> ) | Isolados | Proteína<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Amilase<br>(U mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Amilase<br>(U g <sup>-1</sup> ) | Específica<br>(U mg <sup>-1</sup> ) |
|----------|------------------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------------|----------|------------------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------------|
| RR_A41   | 4,49                               | 41,11                                  | 328,91                                | 9,17                                | RR_A4    | 7,59                               | 9,23                                   | 73,82                                 | 1,22                                |
| RR_A43   | 4,63                               | 26,89                                  | 215,09                                | 5,81                                | RR_A37   | 5,04                               | 8,28                                   | 66,23                                 | 0,87                                |
| RR_A30   | 7,92                               | 17,10                                  | 136,81                                | 2,16                                | RR_A47   | 7,96                               | 8,06                                   | 64,51                                 | 1,01                                |
| RR_A24   | 10,29                              | 16,35                                  | 130,84                                | 1,59                                | RR_A5    | 10,08                              | 7,89                                   | 63,09                                 | 0,78                                |
| RR_A23   | 12,47                              | 14,05                                  | 112,41                                | 1,13                                | RR_A31   | 10,52                              | 7,81                                   | 62,48                                 | 0,74                                |
| RR_A33   | 7,89                               | 13,80                                  | 110,38                                | 1,75                                | RR_A27   | 9,25                               | 7,61                                   | 60,86                                 | 0,82                                |
| RR_A6    | 6,97                               | 13,67                                  | 109,37                                | 1,96                                | RR_A2    | 7,71                               | 6,44                                   | 51,48                                 | 0,83                                |
| RR_A10   | 8,95                               | 13,51                                  | 108,05                                | 1,51                                | RR_A45   | 8,63                               | 5,54                                   | 44,35                                 | 0,64                                |
| RR_A32   | 9,36                               | 13,44                                  | 107,54                                | 1,44                                | RR_A12   | 8,86                               | 3,85                                   | 30,76                                 | 0,43                                |
| RR_A9    | 9,24                               | 11,96                                  | 95,70                                 | 1,30                                | RR_A19   | 6,68                               | 3,53                                   | 28,25                                 | 0,53                                |
| RR_A49   | 9,52                               | 10,32                                  | 82,53                                 | 1,08                                | RR_A21   | 3,76                               | 2,53                                   | 20,27                                 | 0,67                                |
| RR_A42   | 7,34                               | 9,76                                   | 78,08                                 | 1,33                                | RR_A13   | 8,52                               | 1,59                                   | 12,72                                 | 0,19                                |
| RR_A7    | 6,45                               | 9,29                                   | 74,33                                 | 1,44                                |          |                                    |  |                                       |                                     |

Fonte: Próprio autor

Os valores para as atividades de celulase, onde foram analisadas CMCase e Avicelase estão apresentados na tabela 8. A produção de CMCase foi superior à de avicelase, onde pode-se destacar os isolados RR\_A37 com 2,38 U mL<sup>-1</sup> para CMCase e o isolado RR\_A23 com 2,19 U mL<sup>-1</sup> para avicelase.

**Tabela 8.** Proteína (mg mL<sup>-1</sup>) e atividade de Celulasas (U mL<sup>-1</sup> e U g<sup>-1</sup> de substrato) dos isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundos da cultura de arroz, cultivados sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C.

| Isolados | Proteína<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. CMCase<br>(U mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. CMCase<br>(U g <sup>-1</sup> ) | Específica<br>(U mg <sup>-1</sup> ) | Isolados | Proteína<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Avicelase<br>(U mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Avicelase<br>(U g <sup>-1</sup> ) | Específica<br>(U mg <sup>-1</sup> ) |
|----------|------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|----------|------------------------------------|--|---|-------------------------------------|
| RR_A37   | 9,49                               | 2,38                                  | 19,03                                | 0,32                                | RR_A23   | 12,47                              | 2,19                                     | 17,56                                   | 0,18                                |
| RR_A41   | 4,49                               | 1,71                                  | 13,67                                | 0,34                                | RR_A37   | 5,04                               | 2,08                                     | 16,67                                   | 0,22                                |
| RR_A47   | 7,96                               | 1,51                                  | 12,06                                | 0,16                                | RR_A2    | 7,71                               | 1,85                                     | 14,79                                   | 0,24                                |
| RR_A43   | 4,63                               | 1,47                                  | 11,79                                | 0,33                                | RR_A32   | 9,36                               | 1,67                                     | 13,40                                   | 0,18                                |
| RR_A30   | 7,92                               | 1,45                                  | 11,64                                | 0,14                                | RR_A31   | 10,52                              | 1,67                                     | 13,33                                   | 0,16                                |
| RR_A4    | 7,59                               | 1,44                                  | 11,55                                | 0,14                                | RR_A24   | 10,29                              | 1,11                                     | 8,85                                    | 0,11                                |
| RR_A32   | 9,36                               | 1,34                                  | 10,75                                | 0,17                                | RR_A33   | 7,89                               | 0,89                                     | 7,09                                    | 0,11                                |
| RR_A49   | 9,52                               | 1,34                                  | 10,68                                | 0,14                                | RR_A41   | 4,49                               | 0,81                                     | 6,48                                    | 0,18                                |
| RR_A42   | 7,34                               | 1,31                                  | 10,50                                | 0,15                                | RR_A43   | 4,63                               | 0,80                                     | 6,42                                    | 0,17                                |
| RR_A45   | 8,63                               | 1,23                                  | 9,87                                 | 0,15                                | RR_A13   | 8,52                               | 0,66                                     | 5,28                                    | 0,05                                |
| RR_A23   | 12,47                              | 1,20                                  | 9,63                                 | 0,12                                | RR_A7    | 6,45                               | 0,64                                     | 5,13                                    | 0,18                                |
| RR_A2    | 7,71                               | 1,14                                  | 9,15                                 | 0,15                                | RR_A21   | 3,76                               | 0,48                                     | 3,85                                    | 0,24                                |
| RR_A21   | 3,76                               | 1,09                                  | 8,72                                 | 0,09                                | RR_A42   | 7,34                               | 0,46                                     | 3,64                                    | 0,06                                |
| RR_A5    | 10,08                              | 0,95                                  | 7,63                                 | 0,14                                | RR_A45   | 8,63                               | 0,41                                     | 3,29                                    | 0,05                                |
| RR_A12   | 8,86                               | 0,79                                  | 6,34                                 | 0,09                                | RR_A19   | 6,68                               | 0,37                                     | 2,97                                    | 0,06                                |
| RR_A33   | 7,89                               | 0,73                                  | 5,83                                 | 0,08                                | RR_A47   | 7,96                               | 0,28                                     | 2,26                                    | 0,04                                |
| RR_A9    | 9,24                               | 0,68                                  | 5,40                                 | 0,08                                | RR_A5    | 10,08                              | 0,23                                     | 1,82                                    | 0,02                                |
| RR_A6    | 6,97                               | 0,67                                  | 5,38                                 | 0,10                                | RR_A12   | 8,86                               | 0,22                                     | 1,75                                    | 0,02                                |
| RR_A7    | 6,45                               | 0,67                                  | 5,38                                 | 0,07                                | RR_A27   | 9,25                               | 0,17                                     | 1,37                                    | 0,02                                |
| RR_A13   | 8,52                               | 0,64                                  | 5,12                                 | 0,10                                | RR_A49   | 9,52                               | 0,07                                     | 0,59                                    | 0,01                                |
| RR_A24   | 10,29                              | 0,60                                  | 4,84                                 | 0,07                                | RR_A9    | 9,24                               | 0,04                                     | 0,28                                    | 0,00                                |
| RR_A10   | 8,95                               | 0,58                                  | 4,60                                 | 0,06                                | RR_A6    | 6,97                               | 0,00                                     | 0,00                                    | 0,00                                |
| RR_A19   | 6,68                               | 0,55                                  | 4,40                                 | 0,15                                | RR_A4    | 7,59                               | 0,00                                     | 0,00                                    | 0,00                                |
| RR_A27   | 9,25                               | 0,33                                  | 2,62                                 | 0,04                                | RR_A10   | 8,95                               | 0,00                                     | 0,00                                    | 0,00                                |
| RR_A31   | 10,52                              | 0,10                                  | 0,76                                 | 0,01                                | RR_A30   | 7,92                               | 0,00                                     | 0,00                                    | 0,00                                |

Fonte: Próprio autor

O Amido é o maior componente de muitos produtos agrícolas, ex: milho, batata, arroz e trigo, é depositado nas células de reserva de material em plantas e ele é o carboidrato mais utilizado em produtos alimentícios. Devido a sua importância, foi avaliado a produção de amilase. Pode-se destacar para o isolado RR\_A37 obtidos da cultura de arroz com 83,18 U mL<sup>-1</sup> (Tabela 9).

Os isolados da cultura de arroz selecionados, com base na atividade xilanase, para análises posteriores foram RR\_A41, RR\_A43, RR\_A23, RR\_A30 e RR\_A33.

**Tabela 9.** Proteína (mg mL<sup>-1</sup>) e atividade amilase (U mL<sup>-1</sup> e U g<sup>-1</sup> de substrato) dos isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundos da cultura de arroz, cultivados sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C.

| Isolados | Proteína<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Amilase<br>(UmL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Amilase<br>(Ug <sup>-1</sup> ) | Específica<br>(U mg <sup>-1</sup> ) | Isolados | Proteína<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Amilase<br>(U mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Amilase<br>(U g <sup>-1</sup> ) | Específica<br>(U mg <sup>-1</sup> ) |
|----------|------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|----------|------------------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------------|
| RR_A37   | 9,49                               | 83,18                                 | 665,42                               | 8,77                                | RR_A4    | 7,59                               | 29,07                                  | 232,52                                | 3,83                                |
| RR_A30   | 7,92                               | 67,62                                 | 540,93                               | 8,54                                | RR_A24   | 10,29                              | 28,38                                  | 227,07                                | 2,76                                |
| RR_A10   | 8,95                               | 63,63                                 | 509,03                               | 7,11                                | RR_A49   | 9,52                               | 28,16                                  | 225,32                                | 2,96                                |
| RR_A33   | 7,89                               | 61,92                                 | 495,34                               | 7,85                                | RR_A5    | 10,08                              | 23,41                                  | 187,27                                | 2,32                                |
| RR_A19   | 6,68                               | 48,70                                 | 389,63                               | 7,30                                | RR_A12   | 8,86                               | 20,42                                  | 163,39                                | 2,30                                |
| RR_A13   | 8,52                               | 47,13                                 | 377,06                               | 5,53                                | RR_A41   | 4,49                               | 19,35                                  | 154,80                                | 4,31                                |
| RR_A2    | 7,71                               | 45,48                                 | 363,86                               | 5,90                                | RR_A43   | 4,63                               | 15,78                                  | 126,25                                | 3,41                                |
| RR_A42   | 7,34                               | 44,60                                 | 356,82                               | 6,08                                | RR_A47   | 7,96                               | 7,88                                   | 63,04                                 | 0,99                                |
| RR_A27   | 9,25                               | 44,16                                 | 353,32                               | 4,77                                | RR_A32   | 9,36                               | 7,78                                   | 62,24                                 | 0,83                                |
| RR_A9    | 9,24                               | 41,48                                 | 331,81                               | 4,49                                | RR_A23   | 12,47                              | 7,74                                   | 61,92                                 | 0,62                                |
| RR_A31   | 10,52                              | 40,88                                 | 327,01                               | 3,89                                | RR_A45   | 8,63                               | 4,45                                   | 35,64                                 | 0,52                                |
| RR_A21   | 3,76                               | 38,65                                 | 309,19                               | 10,28                               | RR_A6    | 6,97                               | 0,00                                   | 0,00                                  | 0,00                                |
| RR_A7    | 6,45                               | 36,76                                 | 294,11                               | 5,70                                |          |                                    |  |                                       |                                     |

Fonte: próprio autor

#### 2.4.1.2. Isolados de braquiária

Foram cultivadas 36 isolados fúngicos de *Rhizoctonia solani* obtidos de cultura de *Braquiária* sp.

Observa-se valores próximos entre os isolados para a produção de CMCase e Avicelase, sendo o mais produtivo o PA\_B1F6 com 3,23 U mL<sup>-1</sup> e 3,26 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 10).

O isolado PA\_B1B6 também apresentou uma maior produção de xilanase comparado aos demais isolados de braquiária testados com 46,13 UmL<sup>-1</sup> (Tabela 11).

Com relação à produção de amilase, os isolados de braquiária também apresentaram alta produção da enzima, (Tabela 12) sendo o isolado o ROB2D5 o que apresentou maior produção, com 74,52 U mL<sup>-1</sup>.

Dos isolados obtidos da cultura de braquiária os selecionados com base na produção de xilanase, para posteriores análises foram, PA\_B1F6, PA\_B1B6, ROB3B4, ROB1A3 e ROB4D7.

#### 2.4.1.3. Isolados de cultura de soja

Dentre os 26 isolados de *R. solani* AG-1 IA oriundos de cultura de soja, vários apresentaram produção enzimática, sendo as maiores encontradas para os isolados MT\_S085,

com 4,38 U mL<sup>-1</sup>, para a atividade CMCCase e pelo isolado MA\_217, com 11,83 U mL<sup>-1</sup>, para a atividade avicelase (Tabela 13).

**Tabela 10.** Proteína (mg mL<sup>-1</sup>) e atividade de celulases (U mL<sup>-1</sup> e U g<sup>-1</sup> de substrato) dos isolados *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundos de cultura de braquiária, cultivados sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C.

| Isolados   | Proteína (mg mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. CMCCase (U mL <sup>-1</sup> ) | (U g <sup>-1</sup> ) | Específica (U mg <sup>-1</sup> ) | Isolados   | Proteína (mg mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Avicelase (U mL <sup>-1</sup> ) | (U g <sup>-1</sup> ) | Específica (U mg <sup>-1</sup> ) |
|------------|---------------------------------|-------------------------------------|----------------------|----------------------------------|------------|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------|----------------------------------|
| PA_B1B6    | 4,76                            | 3,23                                | 25,81                | 0,83                             | PA_B1B6    | 3,89                            | 3,26                                  | 26,05                | 0,84                             |
| ROB3B4     | 9,28                            | 3,22                                | 25,75                | 0,35                             | ROB1A3     | 6,27                            | 2,32                                  | 18,58                | 0,37                             |
| RO_PV_SOB3 | 8,59                            | 2,83                                | 22,63                | 0,33                             | ROB2D2     | 9,15                            | 2,26                                  | 18,10                | 0,25                             |
| ROB2E7     | 7,33                            | 2,80                                | 22,41                | 0,38                             | ROB2C8     | 8,19                            | 1,98                                  | 15,82                | 0,24                             |
| ROB1B3     | 6,44                            | 2,71                                | 21,68                | 0,42                             | PA_B1F6    | 4,76                            | 1,81                                  | 14,47                | 0,38                             |
| ROB1C2     | 8,77                            | 2,29                                | 18,36                | 0,26                             | ROB1C2     | 8,77                            | 1,67                                  | 13,35                | 0,19                             |
| ROB2C3     | 8,22                            | 2,23                                | 17,87                | 0,27                             | ROB2C3     | 8,22                            | 1,62                                  | 12,97                | 0,20                             |
| ROB1A7     | 10,09                           | 2,06                                | 16,49                | 0,20                             | ROB3A2     | 5,77                            | 1,58                                  | 12,62                | 0,27                             |
| ROB2E6     | 9,33                            | 2,00                                | 16,01                | 0,21                             | ROB1B3     | 6,44                            | 1,57                                  | 12,54                | 0,24                             |
| ROB2C1     | 7,34                            | 1,98                                | 15,87                | 0,27                             | ROB2C1     | 7,34                            | 1,51                                  | 12,06                | 0,21                             |
| ROB2D4     | 8,83                            | 1,94                                | 15,55                | 0,22                             | ROB3A6     | 4,95                            | 1,49                                  | 11,90                | 0,30                             |
| ROB1A3     | 6,27                            | 1,94                                | 15,54                | 0,31                             | ROB2B6     | 7,46                            | 1,47                                  | 11,76                | 0,20                             |
| ROB3A6     | 4,95                            | 1,92                                | 15,34                | 0,39                             | ROB3B4     | 9,28                            | 1,34                                  | 10,70                | 0,14                             |
| ROB1E7     | 7,26                            | 1,83                                | 14,61                | 0,25                             | ROB2E1     | 7,75                            | 1,33                                  | 10,63                | 0,17                             |
| ROB2C8     | 8,19                            | 1,78                                | 14,24                | 0,22                             | RO_PV_SOB3 | 8,59                            | 1,32                                  | 10,57                | 0,15                             |
| RO_B1E3    | 4,56                            | 1,75                                | 13,97                | 0,38                             | ROB1E7     | 7,26                            | 1,23                                  | 9,81                 | 0,17                             |
| ROB4C5     | 8,06                            | 1,72                                | 13,73                | 0,21                             | ROB2E7     | 7,33                            | 1,04                                  | 8,32                 | 0,14                             |
| ROB4B8     | 9,28                            | 1,67                                | 13,33                | 0,18                             | RO_B1E3    | 4,56                            | 1,03                                  | 8,23                 | 0,23                             |
| ROB2D2     | 9,15                            | 1,56                                | 12,45                | 0,17                             | ROB1A2     | 8,88                            | 1,02                                  | 8,16                 | 0,11                             |
| PA_B1F6    | 3,89                            | 1,51                                | 12,06                | 0,32                             | ROB4C5     | 8,06                            | 0,98                                  | 7,87                 | 0,12                             |
| ROB4D1     | 7,36                            | 1,42                                | 11,39                | 0,19                             | ROB4D1     | 7,36                            | 0,97                                  | 7,79                 | 0,13                             |
| ROB3D4     | 7,96                            | 1,42                                | 11,36                | 0,18                             | ROB2E2     | 8,46                            | 0,91                                  | 7,25                 | 0,11                             |
| ROB2C5     | 9,55                            | 1,35                                | 10,77                | 0,14                             | ROB2A1     | 9,35                            | 0,78                                  | 6,28                 | 0,08                             |
| ROB1A2     | 8,88                            | 0,93                                | 7,42                 | 0,10                             | ROB4D3     | 7,30                            | 0,77                                  | 6,15                 | 0,11                             |
| ROB2C2     | 8,82                            | 0,92                                | 7,39                 | 0,10                             | ROB2E6     | 9,33                            | 0,62                                  | 4,95                 | 0,07                             |
| ROB3B3     | 8,74                            | 0,89                                | 7,11                 | 0,10                             | ROB1A7     | 10,09                           | 0,56                                  | 4,52                 | 0,06                             |
| ROB2A1     | 9,35                            | 0,72                                | 5,78                 | 0,08                             | ROB2D4     | 8,83                            | 0,52                                  | 4,17                 | 0,06                             |
| ROB2E2     | 8,46                            | 0,67                                | 5,38                 | 0,08                             | ROB1D7     | 8,64                            | 0,52                                  | 4,12                 | 0,06                             |
| ROB2D5     | 9,53                            | 0,67                                | 5,38                 | 0,07                             | ROB2C2     | 8,82                            | 0,50                                  | 3,99                 | 0,06                             |
| ROB3A2     | 5,77                            | 0,67                                | 5,38                 | 0,12                             | ROB2C5     | 9,55                            | 0,49                                  | 3,89                 | 0,05                             |
| ROB2B6     | 7,46                            | 0,67                                | 5,38                 | 0,09                             | ROB3D4     | 7,96                            | 0,42                                  | 3,35                 | 0,04                             |
| ROB2E1     | 7,75                            | 0,27                                | 2,13                 | 0,03                             | ROB2D5     | 9,53                            | 0,40                                  | 3,16                 | 0,02                             |
| ROB4D3     | 7,30                            | 0,20                                | 1,60                 | 0,03                             | ROB2C6     | 7,50                            | 0,18                                  | 1,45                 | 0,00                             |
| ROB1D7     | 8,64                            | 0,16                                | 1,26                 | 0,02                             | ROB4D7     | 8,66                            | 0,00                                  | 0,00                 | 0,00                             |
| ROB2C6     | 7,50                            | 0,03                                | 0,21                 | 0,00                             | ROB3B3     | 8,74                            | 0,00                                  | 0,00                 | 0,00                             |
| ROB4D7     | 8,66                            | 0,00                                | 0,00                 | 0,00                             | ROB4B8     | 9,28                            | 0,00                                  | 0,00                 | 0,00                             |

Fonte: Próprio autor

Para xilanase o isolado MT\_S085 apresentou a mais alta atividade com 20,26 U mL<sup>-1</sup> (tabela 14).

**Tabela 11.** Proteína (mg mL<sup>-1</sup>) e atividade xilanase (U mL<sup>-1</sup> e U g<sup>-1</sup> de substrato) dos isolados *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundos de cultura de braquiária, cultivados sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C.

| Isolados | Proteína<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Xilanase        |                      | Específica<br>(U mg <sup>-1</sup> ) | Isolados   | Proteína<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Xilanase        |                      | Específica<br>(U mg <sup>-1</sup> ) |
|----------|------------------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------------------|------------|------------------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------------------|
|          |                                    | (U mL <sup>-1</sup> ) | (U g <sup>-1</sup> ) |                                     |            |                                    | (U mL <sup>-1</sup> ) | (U g <sup>-1</sup> ) |                                     |
| PA_B1B6  | 4,76                               | 46,13                 | 369,01               | 11,85                               | ROB2C6     | 7,50                               | 8,15                  | 65,22                | 1,09                                |
| ROB4D7   | 8,66                               | 26,24                 | 209,92               | 3,03                                | ROB2E2     | 8,46                               | 8,14                  | 65,11                | 0,96                                |
| PA_B1F6  | 3,89                               | 23,67                 | 189,37               | 4,98                                | ROB2D2     | 9,15                               | 7,76                  | 62,08                | 0,85                                |
| ROB4D3   | 7,30                               | 20,76                 | 166,08               | 2,84                                | ROB2D5     | 9,53                               | 7,65                  | 61,16                | 0,80                                |
| RO_B1E3  | 4,56                               | 19,00                 | 152,00               | 4,17                                | ROB4D1     | 7,36                               | 7,43                  | 59,46                | 1,01                                |
| ROB4B8   | 9,28                               | 18,81                 | 150,48               | 2,03                                | ROB2D4     | 8,83                               | 6,23                  | 49,80                | 0,70                                |
| ROB1D7   | 8,64                               | 16,91                 | 135,29               | 1,96                                | ROB2C1     | 7,34                               | 6,15                  | 49,24                | 0,84                                |
| ROB3D4   | 7,96                               | 15,86                 | 126,89               | 1,99                                | ROB3B4     | 9,28                               | 5,65                  | 45,16                | 0,61                                |
| ROB2E6   | 9,33                               | 14,21                 | 113,68               | 1,52                                | ROB2E7     | 7,33                               | 5,62                  | 44,96                | 0,77                                |
| ROB2B6   | 7,46                               | 12,87                 | 102,99               | 1,73                                | ROB2C3     | 8,22                               | 5,11                  | 40,89                | 0,62                                |
| ROB1A7   | 10,09                              | 12,66                 | 101,27               | 1,25                                | ROB3A6     | 4,95                               | 4,94                  | 39,49                | 1,00                                |
| ROB3B3   | 8,74                               | 12,11                 | 96,91                | 1,39                                | ROB1C2     | 8,77                               | 4,93                  | 39,41                | 0,56                                |
| ROB2A1   | 9,35                               | 12,00                 | 96,00                | 1,28                                | ROB1A3     | 6,27                               | 4,89                  | 39,13                | 0,78                                |
| ROB2C5   | 9,55                               | 11,94                 | 95,49                | 1,25                                | RO_PV_SOB3 | 8,59                               | 4,85                  | 38,83                | 0,57                                |
| ROB2E1   | 7,75                               | 10,34                 | 82,73                | 1,34                                | ROB2C8     | 8,19                               | 4,42                  | 35,36                | 0,54                                |
| ROB4C5   | 8,06                               | 9,48                  | 75,85                | 1,18                                | ROB1A2     | 8,88                               | 4,23                  | 33,82                | 0,48                                |
| ROB3A2   | 5,77                               | 9,22                  | 73,72                | 1,60                                | ROB1B3     | 6,44                               | 4,09                  | 32,71                | 0,64                                |
| ROB2C2   | 8,82                               | 9,06                  | 72,51                | 1,03                                | ROB1E7     | 7,26                               | 3,39                  | 27,14                | 0,47                                |

Fonte: Próprio autor

**Tabela 12.** Proteína (mg mL<sup>-1</sup>) e atividade amilase (U mL<sup>-1</sup> e U g<sup>-1</sup> de substrato) dos isolados *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundos de braquiária, cultivados sob fermentação sólida, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C.

| Isolados | Proteína<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Amilase         |                      | Específica<br>(U mg <sup>-1</sup> ) | Isolados   | Proteína<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Amilase         |                      | Específica<br>(U mg <sup>-1</sup> ) |
|----------|------------------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------------------|------------|------------------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------------------|
|          |                                    | (U mL <sup>-1</sup> ) | (U g <sup>-1</sup> ) |                                     |            |                                    | (U mL <sup>-1</sup> ) | (U g <sup>-1</sup> ) |                                     |
| ROB2D5   | 9,53                               | 74,52                 | 596,18               | 7,82                                | ROB2B6     | 7,46                               | 20,31                 | 162,51               | 2,72                                |
| ROB4B8   | 9,28                               | 62,53                 | 500,24               | 6,74                                | ROB2C1     | 7,34                               | 16,15                 | 129,19               | 2,20                                |
| PA_B1B6  | 4,76                               | 51,25                 | 409,96               | 13,17                               | ROB4D1     | 7,36                               | 14,56                 | 116,50               | 1,98                                |
| ROB2E1   | 7,75                               | 49,52                 | 396,18               | 6,39                                | ROB2D4     | 8,83                               | 14,03                 | 112,26               | 1,59                                |
| ROB4D3   | 7,30                               | 44,07                 | 352,58               | 6,03                                | ROB2E6     | 9,33                               | 13,64                 | 109,09               | 1,46                                |
| ROB2C6   | 7,50                               | 40,48                 | 323,81               | 5,39                                | ROB4C5     | 8,06                               | 11,72                 | 93,75                | 1,45                                |
| ROB2A1   | 9,35                               | 38,85                 | 310,83               | 4,15                                | ROB1E7     | 7,26                               | 10,79                 | 86,35                | 1,49                                |
| ROB2C2   | 8,82                               | 37,34                 | 298,73               | 4,23                                | ROB1A7     | 10,09                              | 8,81                  | 70,48                | 0,87                                |
| ROB2C5   | 9,55                               | 35,21                 | 281,69               | 3,69                                | ROB3A6     | 4,95                               | 7,88                  | 63,07                | 1,59                                |
| ROB4D7   | 8,66                               | 31,63                 | 253,06               | 3,65                                | ROB2D2     | 9,15                               | 6,69                  | 53,55                | 0,73                                |
| ROB3D4   | 7,96                               | 31,01                 | 248,05               | 3,90                                | ROB2E7     | 7,33                               | 5,77                  | 46,15                | 0,79                                |
| RO_B1E3  | 4,56                               | 27,86                 | 222,84               | 6,11                                | ROB1C2     | 8,77                               | 5,44                  | 43,50                | 0,62                                |
| ROB3A2   | 5,77                               | 26,93                 | 215,40               | 4,67                                | ROB3B4     | 9,28                               | 3,52                  | 28,17                | 0,38                                |
| ROB2C3   | 8,22                               | 26,46                 | 211,70               | 3,22                                | ROB1B3     | 6,44                               | 2,99                  | 23,93                | 0,46                                |
| ROB1D7   | 8,64                               | 24,92                 | 199,36               | 2,88                                | ROB1A3     | 6,27                               | 2,33                  | 18,64                | 0,37                                |
| PA_B1F6  | 3,89                               | 24,67                 | 197,33               | 5,19                                | RO_PV_SOB3 | 8,59                               | 0,41                  | 3,31                 | 0,05                                |
| ROB2E2   | 8,46                               | 23,89                 | 191,08               | 2,82                                | ROB2C8     | 8,19                               | 0,00                  | 0,00                 | 0,00                                |
| ROB3B3   | 8,74                               | 21,76                 | 174,08               | 2,49                                | ROB1A2     | 8,88                               | 0,00                  | 0,00                 | 0,00                                |

Fonte: Próprio autor

**Tabela 13.** Proteína (mg mL<sup>-1</sup>) e atividade de celulases (U mL<sup>-1</sup> e U g<sup>-1</sup> de substrato) dos isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundos de cultura de soja, cultivados sob fermentação sólida, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C.

| Isolados    | Proteína<br>mg mL <sup>-1</sup> | Ativ. CMCase       |                   | Específica<br>U mg <sup>-1</sup> | Isolados    | Proteína<br>mg mL <sup>-1</sup> | Ativ. Avicelase    |                   | Específica<br>U mg <sup>-1</sup> |
|-------------|---------------------------------|--------------------|-------------------|----------------------------------|-------------|---------------------------------|--------------------|-------------------|----------------------------------|
|             |                                 | U mL <sup>-1</sup> | U g <sup>-1</sup> |                                  |             |                                 | U mL <sup>-1</sup> | U g <sup>-1</sup> |                                  |
| MT_S085     | 8,28                            | 4,38               | 35,07             | 0,53                             | MA_217      | 6,22                            | 11,83              | 94,62             | 1,90                             |
| MT_S004     | 9,76                            | 4,19               | 33,49             | 0,43                             | TC98BR_S053 | 9,29                            | 7,35               | 58,81             | 0,79                             |
| TO_034      | 6,84                            | 2,12               | 16,98             | 0,31                             | TO_022      | 9,34                            | 6,20               | 49,59             | 0,66                             |
| TC98BR_S053 | 9,29                            | 1,88               | 15,06             | 0,20                             | TC98BR_S037 | 8,50                            | 6,08               | 48,60             | 0,72                             |
| MA_281      | 6,31                            | 1,87               | 14,99             | 0,30                             | TO_034      | 6,84                            | 6,03               | 48,23             | 0,88                             |
| TO_033      | 8,39                            | 1,73               | 13,87             | 0,21                             | TO_058      | 7,94                            | 5,86               | 46,88             | 0,74                             |
| MA_159      | 7,52                            | 1,66               | 13,31             | 0,22                             | MT_S018     | 8,46                            | 5,52               | 44,17             | 0,65                             |
| PA_002      | 8,28                            | 1,63               | 13,08             | 0,20                             | MT_S085     | 8,28                            | 5,44               | 43,56             | 0,66                             |
| TO_022      | 9,34                            | 1,61               | 12,86             | 0,17                             | TO_033      | 8,39                            | 5,10               | 40,79             | 0,61                             |
| TO_062      | 9,47                            | 1,45               | 11,59             | 0,15                             | MA_283      | 8,35                            | 5,06               | 40,48             | 0,61                             |
| MA_283      | 8,35                            | 1,41               | 11,26             | 0,17                             | MT_S001     | 9,91                            | 4,70               | 37,59             | 0,47                             |
| TO_058      | 7,94                            | 1,40               | 11,22             | 0,18                             | MT_S004     | 9,76                            | 4,51               | 36,11             | 0,46                             |
| TO_136      | 6,63                            | 1,26               | 10,05             | 0,19                             | MA_159      | 7,52                            | 4,41               | 35,31             | 0,59                             |
| MT_S018     | 8,46                            | 1,13               | 9,07              | 0,13                             | TO_062      | 9,47                            | 4,28               | 34,21             | 0,45                             |
| TO_064      | 7,16                            | 1,11               | 8,90              | 0,16                             | MA_170      | 7,84                            | 4,25               | 33,96             | 0,54                             |
| MA_217      | 6,22                            | 1,05               | 8,37              | 0,17                             | MA_192      | 6,68                            | 3,88               | 31,07             | 0,58                             |
| TC98BR_S037 | 8,50                            | 1,02               | 8,13              | 0,12                             | MT_S007     | 10,44                           | 3,56               | 28,48             | 0,34                             |
| MT_S001     | 9,91                            | 0,93               | 7,46              | 0,09                             | MT_S_121    | 7,84                            | 3,33               | 26,64             | 0,42                             |
| MT_S121     | 7,84                            | 0,89               | 7,14              | 0,11                             | MA_281      | 6,31                            | 2,24               | 17,92             | 0,35                             |
| MA_170      | 7,84                            | 0,75               | 6,02              | 0,10                             | PA_002      | 8,28                            | 1,34               | 10,73             | 0,16                             |
| MT_S007     | 10,44                           | 0,68               | 5,45              | 0,07                             | TO_064      | 7,16                            | 1,33               | 10,63             | 0,19                             |
| MA_005      | 7,49                            | 0,51               | 4,07              | 0,07                             | MA_005      | 7,49                            | 1,26               | 10,09             | 0,17                             |
| MA_278      | 6,39                            | 0,46               | 3,67              | 0,07                             | MA_275      | 2,69                            | 0,07               | 0,54              | 0,03                             |
| MA_275      | 2,69                            | 0,46               | 3,65              | 0,17                             | MA_278      | 6,39                            | 0,00               | 0,00              | 0,00                             |
| MA_192      | 6,68                            | 0,33               | 2,63              | 0,05                             | TO_136      | 6,63                            | 0,00               | 0,00              | 0,00                             |

Fonte: Próprio autor

**Tabela 14.** Proteína (mg mL<sup>-1</sup>) e atividade xilanase (UmL<sup>-1</sup> e Ug<sup>-1</sup> de substrato) dos isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundos de cultura de soja, cultivados sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C.

| Isolados | Proteína<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Xilanase        |                      | Específica<br>(U mg <sup>-1</sup> ) | Isolados    | Proteína<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Xilanase        |                      | Específica<br>(U mg <sup>-1</sup> ) |
|----------|------------------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------------------|-------------|------------------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------------------|
|          |                                    | (U mL <sup>-1</sup> ) | (U g <sup>-1</sup> ) |                                     |             |                                    | (U mL <sup>-1</sup> ) | (U g <sup>-1</sup> ) |                                     |
| MT_S085  | 8,28                               | 20,26                 | 162,07               | 2,45                                | MA_283      | 8,35                               | 7,11                  | 56,91                | 0,85                                |
| TO_064   | 7,16                               | 15,15                 | 121,22               | 2,12                                | MA_192      | 6,68                               | 7,02                  | 56,12                | 1,05                                |
| MA_159   | 7,52                               | 12,69                 | 101,55               | 1,69                                | TO_136      | 6,63                               | 6,95                  | 55,59                | 1,05                                |
| MT_S018  | 8,46                               | 11,76                 | 94,10                | 1,39                                | MA_281      | 6,31                               | 6,81                  | 54,48                | 1,08                                |
| MA_278   | 6,39                               | 10,22                 | 81,72                | 1,60                                | MT_S004     | 9,76                               | 5,94                  | 47,55                | 0,61                                |
| MT_S007  | 10,44                              | 9,77                  | 78,14                | 0,94                                | TC98BR_S053 | 9,29                               | 5,86                  | 46,87                | 0,63                                |
| TO_022   | 9,34                               | 9,67                  | 77,37                | 1,04                                | TO_034      | 6,84                               | 5,17                  | 41,40                | 0,76                                |
| PA_002   | 8,28                               | 9,64                  | 77,12                | 1,16                                | TO_058      | 7,94                               | 5,01                  | 40,10                | 0,63                                |
| MT_S001  | 9,91                               | 9,62                  | 76,98                | 0,97                                | MA_005      | 7,49                               | 4,19                  | 33,52                | 0,56                                |
| MA_170   | 7,84                               | 9,15                  | 73,19                | 1,17                                | TO_033      | 8,39                               | 4,06                  | 32,51                | 0,48                                |
| MT_S_121 | 7,84                               | 9,08                  | 72,67                | 1,16                                | TC98BR_S037 | 8,50                               | 2,35                  | 18,84                | 0,28                                |
| TO_062   | 9,47                               | 8,53                  | 68,23                | 0,90                                | MA_275      | 2,69                               | 0,98                  | 7,82                 | 0,36                                |
| MA_217   | 6,22                               | 7,43                  | 59,46                | 1,20                                |             |                                    |                       |                      |                                     |

Fonte: Próprio autor

Para produção de amilase, o isolado MA\_278 apresentou atividade de 67,55 U mL<sup>-1</sup> (Tabela 15).

Os cinco isolados selecionados oriundos da cultura de braquiária, para análises posteriores foram MA\_159, TO\_022, MA\_217, MT\_S085 e TO\_064.

**Tabela 15.** Proteína (mg mL<sup>-1</sup>) e atividade amilase (U mL<sup>-1</sup> e U g<sup>-1</sup> de substrato) dos isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundos de cultura de soja, cultivados sob fermentação sólida, utilizando farelo de trigo como substrato, por 96h a 25 °C.

| Isolados    | Proteína<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Amilase<br>(U mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Amilase<br>(U g <sup>-1</sup> ) | Específica<br>(U mg <sup>-1</sup> ) | Isolados    | Proteína<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Amilase<br>(U mL <sup>-1</sup> ) | Ativ. Amilase<br>(U g <sup>-1</sup> ) | Específica<br>(U mg <sup>-1</sup> ) |
|-------------|------------------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------|------------------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------------|
| MA_278      | 6,39                               | 67,55                                  | 540,38                                | 10,56                               | MA_159      | 7,52                               | 18,91                                  | 151,26                                | 2,51                                |
| MA_217      | 6,22                               | 55,24                                  | 441,95                                | 8,89                                | MA_192      | 6,68                               | 17,84                                  | 142,69                                | 2,67                                |
| TO_064      | 7,16                               | 50,72                                  | 405,77                                | 7,08                                | MT_S007     | 10,44                              | 15,36                                  | 122,90                                | 1,47                                |
| MT_S085     | 8,28                               | 48,15                                  | 385,23                                | 5,82                                | MT_S018     | 8,46                               | 14,92                                  | 119,35                                | 1,76                                |
| TO_058      | 7,94                               | 35,08                                  | 280,65                                | 4,42                                | TO_034      | 6,84                               | 14,84                                  | 118,76                                | 2,17                                |
| TO_033      | 8,39                               | 32,20                                  | 257,61                                | 3,84                                | MT_S_121    | 7,84                               | 12,63                                  | 101,03                                | 1,61                                |
| TO_022      | 9,34                               | 31,68                                  | 253,47                                | 3,39                                | TC98BR_S053 | 9,29                               | 10,41                                  | 83,31                                 | 1,12                                |
| MT_S004     | 9,76                               | 31,61                                  | 252,88                                | 3,24                                | TO_136      | 6,63                               | 9,38                                   | 75,00                                 | 1,41                                |
| MA_283      | 8,35                               | 31,02                                  | 248,15                                | 3,71                                | MA_281      | 6,31                               | 9,11                                   | 72,88                                 | 1,44                                |
| TO_062      | 9,47                               | 28,36                                  | 226,88                                | 3,00                                | MA_170      | 7,84                               | 6,13                                   | 49,04                                 | 1,78                                |
| PA_002      | 8,28                               | 26,96                                  | 215,66                                | 3,25                                | MA_005      | 7,49                               | 4,21                                   | 33,65                                 | 0,56                                |
| MT_S001     | 9,91                               | 22,90                                  | 183,16                                | 2,31                                | MA_275      | 2,69                               | 0,00                                   | -8,65                                 | 0,00                                |
| TC98BR_S037 | 8,50                               | 21,42                                  | 171,34                                | 2,52                                |             |                                    |  |                                       |                                     |

Fonte: Próprio autor

Para as atividades celulósicas, em média as mais altas atividades foram observadas nos isolados da cultura de soja, enquanto atividades para CMCase e Avicelase foram mais altas dentre os isolados de cultura de braquiária e cultura de arroz.

Para a atividade xilanase, foram determinadas as melhores atividades nas linhagens isolados de cultura de arroz e de braquiária. Alves-Prado, et al. (2010), estudando xilanase produzida por *Neosartorya spinosa* obteve atividade de 20,6 U mL<sup>-1</sup> em 72 h de fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato. Leite et al. (2007) relataram que a produção de xilanase pelo fungo *Aureobasidium pullulans* cultivado sob fermentação em estado sólido, usando farelo de trigo como substrato foi de 5,0 U mL<sup>-1</sup>. A produção de xilanase por *Fusarium culmorum* SYRN4 e *F. verticillioides* SYRN17 sob fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo e extrato de levedura como substrato foi de 12,16 e 16,56 U g<sup>-1</sup> (ARABI et al., 2011).

Para a atividade de amilase, bons níveis de atividade foram encontrados para isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA provenientes de cultura de arroz. Barato et al. (2011) observou

uma produção de amilase de  $0,53 \text{ U mL}^{-1}$ ,  $0,51 \text{ U mL}^{-1}$  e  $0,52 \text{ U mL}^{-1}$  em 96h de cultivo sob fermentação em estado sólido para 3 isolados de fungos obtidos da região do meio oeste de Santa Catarina.

Santana et al., (2012) obteve uma produção de amilase de  $24,98 \text{ U g}^{-1}$  de substrato de farelo de cacau em 24h de cultivo sob fermentação em estado sólido para *Aspergillus niger*. Comparando os dados da produção enzimática obtida pelos isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundos de diferentes culturas agrícolas com dados obtidos na literatura, tem-se que o fungo em questão apresenta grande potencial para excreção de enzimas degradadoras de parede celular de plantas, em particular as xilanases.

#### **2.4.2. Efeito da fonte carbono na produção de enzima**

Essa etapa do trabalho aborda o efeito de diferentes substratos na produção enzimática de isolados do fungo *Rhizoctonia solani* do grupo AG-1 IA, fungo patógeno de várias culturas de importância agrícola.

Segundo Bueno (2009) este fungo inicialmente infectava culturas de arroz e posteriormente emergiu como patógeno de braquiária. Foi analisado a produção de enzimas em seis substratos, farelo de trigo, como controle dos ensaios e braquiária, palha de arroz, palha de milho, palha de soja e sabugo de milho, pelos isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundos de culturas de arroz, braquiária e soja, que apresentaram os níveis mais altos de produção de enzima, quando cultivados em farelo de trigo como substrato.

O farelo de trigo foi obtido no mercado local e os demais substratos foram disponibilizados pela Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE) da UNESP – Campus de Ilha Solteira. Esses substratos foram lavados, secos e triturados.

Na tabela 16 pode-se observar a concentração lignocelulósica presente nos diferentes substratos testados.

Para as análises de pectinase, protease e lipase, foram utilizados apenas um isolado de cada cultura agrícola e os substratos testados foram farelo de trigo, soja e braquiária.

Na tabela 17 estão presentes as concentrações dos macros e micronutrientes dos substratos que serão utilizados como fontes de carbono para estudo de produção enzimática pelo fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

**Tabela 16.** Concentração lignocelulósica dos resíduos agrícolas (em % de base seca).

| Substratos      | Celulose (%) | Lignina (%) | Hemicelulose (%) |
|-----------------|--------------|-------------|------------------|
| Braquiária      | 48,2         | 22,9        | 19,9             |
| Farelo de trigo | 11           | 3,6         | 23,7             |
| Palha de arroz  | 43,5         | 17,2        | 22,0             |
| Palha de milho  | 25 - 41,2    | 14,1        | 34,5             |
| Palha de soja   | 40 - 53      | 1 - 3       | 14,0 - 33,0      |
| Sabugo de milho | 31,7         | 20,3        | 34,7             |

**Fonte:** SOUZA NETO et al. (2012); TELLES (2013); AGUIAR (2010).

**Tabela 17.** Análise de macro e micronutrientes dos resíduos agrícolas utilizados.

| Nutrientes  | Braquiária               | Farelo de trigo         | Palha de arroz           | Palha de milho           | Palha de soja             | Sabugo de milho         |
|-------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <b>MS</b>   |                          |                         |                          |                          |                           | 87,94                   |
| <b>N(%)</b> | 3,33 Kg m <sup>-3</sup>  | --                      | 1,1 %                    | 5,7                      | --                        | 0,7%                    |
| <b>P</b>    | 1,03 Kg m <sup>-3</sup>  | 1,07 g Kg <sup>-1</sup> | 2,0 g Kg <sup>-1</sup>   | 0,4g Kg <sup>-1</sup>    | 0,14%                     | 1,1 g Kg <sup>-1</sup>  |
| <b>K</b>    | 0,83 Kg m <sup>-3</sup>  | 1,34 g Kg <sup>-1</sup> | 10,6g Kg <sup>-1</sup>   | 3,1g Kg <sup>-1</sup>    |                           | 7,0 g Kg <sup>-1</sup>  |
| <b>Ca</b>   | 1,46 Kg m <sup>-3</sup>  | 0,13 g Kg <sup>-1</sup> | 4,5g Kg <sup>-1</sup>    | 2,9g Kg <sup>-1</sup>    | 0,44%                     | 0,6 g Kg <sup>-1</sup>  |
| <b>Mg</b>   | 0,40 Kg m <sup>-3</sup>  | 0,50 g Kg <sup>-1</sup> | 2,3 g Kg <sup>-1</sup>   | 1,5 g Kg <sup>-1</sup>   | 0,19%                     | 0,3 g Kg <sup>-1</sup>  |
| <b>Fe</b>   | 132,16 g m <sup>-3</sup> | 140 mg Kg <sup>-1</sup> | 96,4mg Kg <sup>-1</sup>  | --                       | 865 mg Kg <sup>-1</sup>   | 144 mg Kg <sup>-1</sup> |
| <b>Mn</b>   | 21,76 g m <sup>-3</sup>  | 158 g Kg <sup>-1</sup>  | 806,2mg Kg <sup>-1</sup> | 88 mg Kg <sup>-1</sup>   | 30,96 mg Kg <sup>-1</sup> | 7,8 mg Kg <sup>-1</sup> |
| <b>Zn</b>   | 73,6 g m <sup>-3</sup>   | 83 g Kg <sup>-1</sup>   | 30,2 mg Kg <sup>-1</sup> | 20,4 mg Kg <sup>-1</sup> | 53,20 mg Kg <sup>-1</sup> | 23,3mg Kg <sup>-1</sup> |

**Fonte:** BARNABÉ et al., 2007; BLASI et al., 1998; FIGUEIRÓ, 2011; CECCON et al., 2010; SILVA, 2011.

Na sequência estão as análises detalhadas para os isolados obtidos das culturas de arroz, braquiária e soja, nas diferentes fontes de carbono.

#### 2.4.2.1. Isolados de Arroz

A produção de enzimas por *R. solani* AG-1 IA pelos isolados de culturas de arroz, foi estudada sob fermentação em estado sólido utilizando diferentes fontes de carbono. A produção de CMCase pelos isolados de culturas de arroz foi superior no cultivo com substrato de palha de soja tendo o isolado RR\_A30 com uma produção de 2,01 U mL<sup>-1</sup> (Figura 14a). A atividade enzimática de Avicelase foi elevada com a isolado RR\_A33 para o substrato palha de soja, com 1,08 U mL<sup>-1</sup> (Figura 14b).

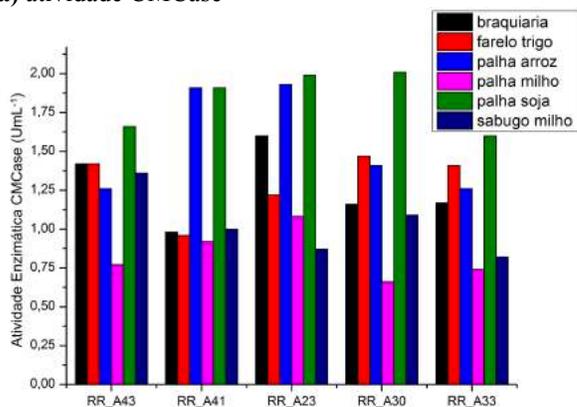
A atividade de β-glucosidase foi maior no substrato de palha de arroz com atividade de 1,84 UmL<sup>-1</sup> pelo isolado RR\_A23 (Figura 14c)

A atividade de xilanase para o isolado RR\_A23 apresentou maior produção com 10,39 UmL<sup>-1</sup> com substrato de farelo de trigo e 10,16 U mL<sup>-1</sup> com substrato de braquiária para o isolado RR\_A33 (Figura 14d). Todos os isolados obtidos de cultura de arroz apresentaram

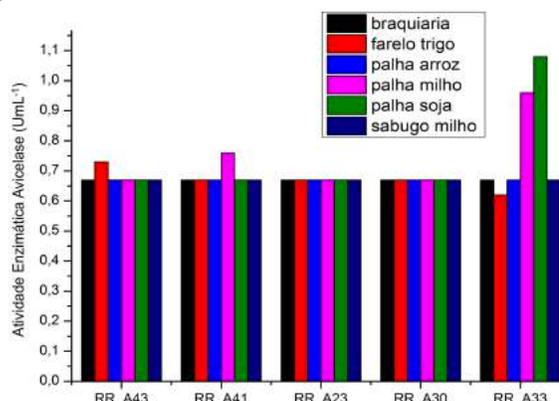
produção elevada de amilase em farelo de trigo quando comparada aos demais substratos sendo a mais alta atividade  $73,62 \text{ U mL}^{-1}$ , para o isolado RR\_A30 (figura 14e)

**Figura 14.** Efeito da fonte carbônica, na atividade enzimática para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA RR\_A43, RR\_A41, RR\_A33, RR\_A30 e RR\_A23 oriundos de cultura de arroz, cultivados sob fermentação em estado sólido por 96h a 25 °C. a) CMCase; b) Avicelase, c)  $\beta$ -glucosidase d) Xilanase, e) Amilase

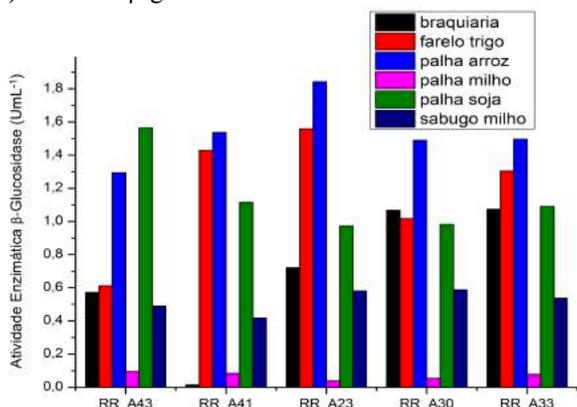
a) atividade CMCase



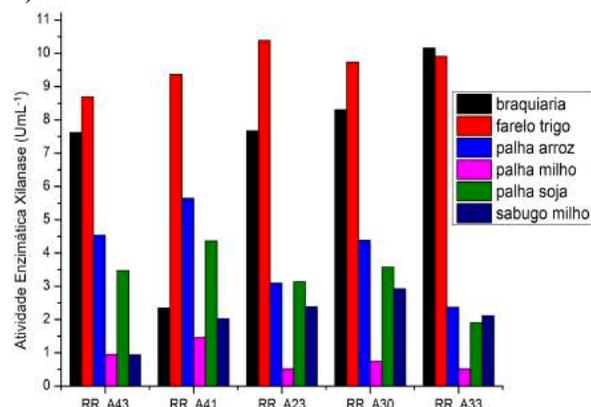
b) atividade Avicelase



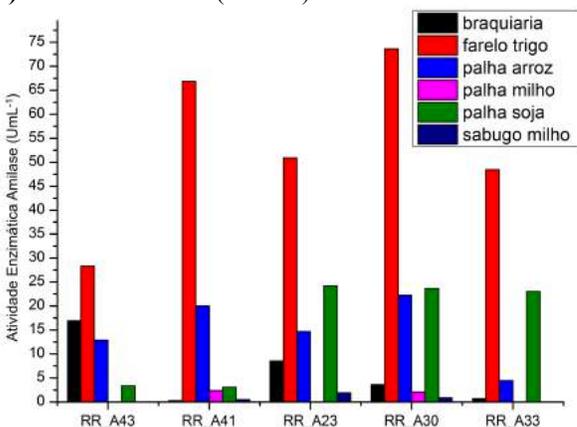
c) atividade  $\beta$ -glucosidase



d) atividade xilanase



e) atividade amilase (U mL<sup>-1</sup>)

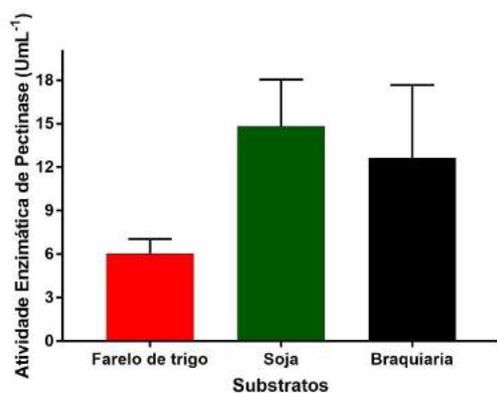


Fonte: Próprio autor

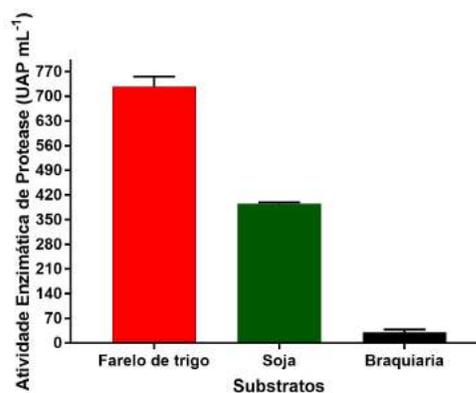
Para a atividade enzimática de pectinase o isolado RR\_A23 foi mais produtivo quando cultivado em substrato de soja com media de  $15,02 \text{ U mL}^{-1}$  (figura 15a).

**Figura 15.** Efeito da fonte carbono, na atividade enzimática de Pectinase, Protease e Lipase para a isolado RR\_A23, cultivados sob fermentação em estado sólido por 96h. a) Atividade Pectinase; b) Atividade Protease e c) Atividade Lipase

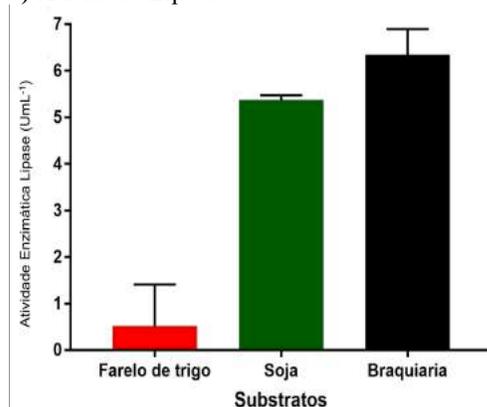
a) Atividade Pectinase



b) Atividade Protease



c) Atividade Lipase



Fonte: Próprio autor

Para a atividade de protease, a melhor produção pode-se observar no substrato de farelo de trigo com  $730,029 \text{ UAP mL}^{-1}$ . A produção de lipase foi maior quando a isolado foi cultivado em substrato de braquiária com  $6,97 \text{ U mL}^{-1}$ .

Considerando que o RR\_A23 oriundo de cultura de arroz, apresentou atividade elevada para todas as enzimas, especialmente xilanase, ele foi selecionado para determinação da atividade de pectinase, protease e lipase.

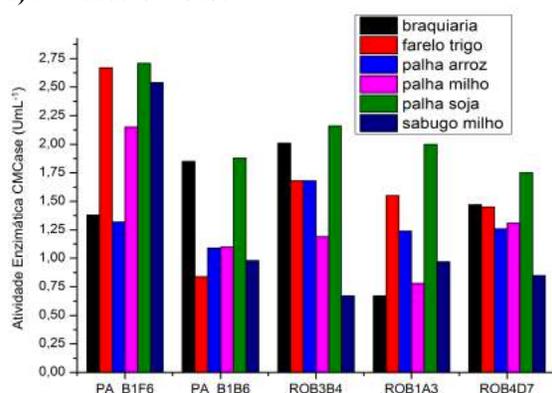
### 2.4.2.2. Isolados de Braquiária

Com relação a produção enzimática para os isolados de *R. solani* AG-1 IA oriundos de cultura de braquiária, a atividade de CMCase foi superior quando no cultivo com os substratos de palha de soja e farelo de trigo o isolado PA\_B1F6 apresentou uma produção de 2,71 UmL<sup>-1</sup> e 2,67 UmL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 16a). O mesmo isolado (PA\_B1F6) quando cultivado em substratos de palha de milho apresentou 1,80 UmL<sup>-1</sup> de atividade enzimática de Avicelase (Figura 16b).

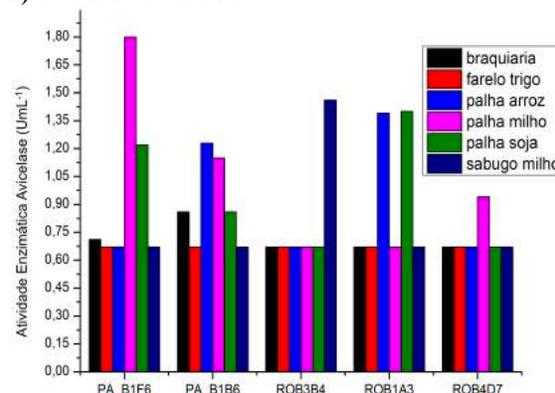
A atividade de  $\beta$ -glucosidase dos isolados de cultura de braquiária foi superior quando no cultivo com o substrato de palha de arroz, tendo o mesmo isolado (PA\_B1B6) apresentando uma produção de 2,10 UmL<sup>-1</sup> (Figura 16c). A atividade de xilanase foi maior no substrato de farelo de trigo, também para isolado PA\_B1F6 com 15,82 UmL<sup>-1</sup> (Figura 16d).

**Figura 16.** Efeito da fonte carbono na atividade enzimática para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA PA\_B1F6, PA\_B1B6, RO\_B3B4, ROB1A3 e RO\_B4D7, oriundas de braquiária cultivados sob fermentação em estado sólido por 96h a 25 °C. a) CMCase; b) Avicelase, c)  $\beta$ -glucosidase d) Xilanase, e) Amilase.

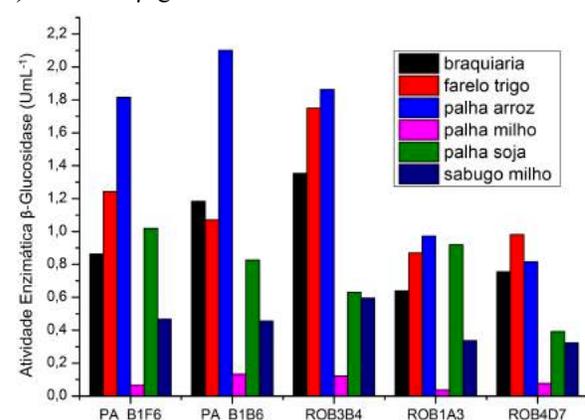
a) atividade CMCase



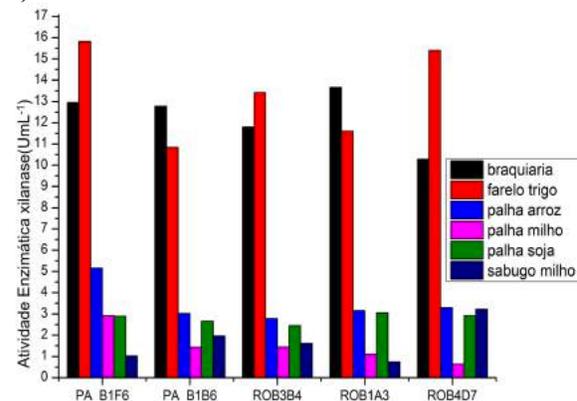
b) atividade avicelase



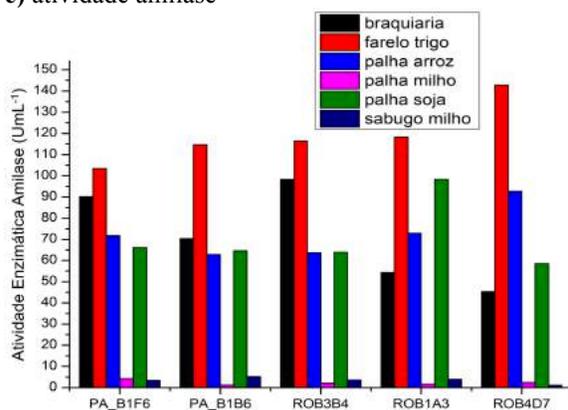
c) atividade  $\beta$ -glucosidase



d) atividade xilanase



## e) atividade amilase



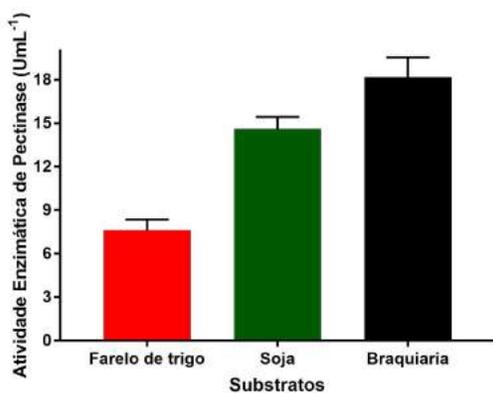
Fonte: Próprio autor

Comportamento diferente foi verificado para a atividade enzimática de amilase, a qual foi alta para todas as linhagens de *R. solani* AG-1 IA. No entanto, no substrato farelo de trigo foi determinada a maior produção enzimática, com  $142,88 \text{ U mL}^{-1}$ , para a isolado ROB4D7 (Figura 16e).

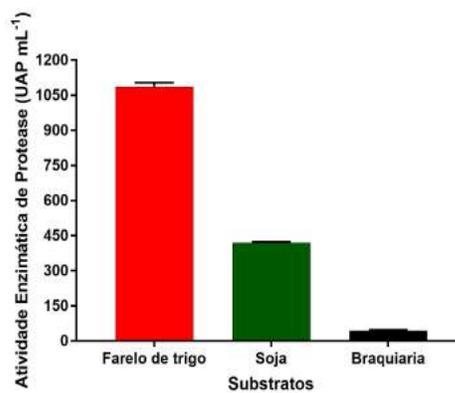
Para isolado de cultura de braquiária PA\_B1F6 que mostrou alta produção das enzimas analisadas, foi selecionado para análise de pectinase, protease e lipase. A maior produção de pectinase foi quando cultivado em substrato de braquiária, com  $17,69 \text{ U mL}^{-1}$  (Figura 17a). Para a atividade de protease, a maior produção pode-se observada no substrato de farelo de trigo com  $1080,661 \text{ UAP mL}^{-1}$ . A atividade lipase foi melhor quando cultivado em substrato de soja com  $6,67 \text{ U mL}^{-1}$ .

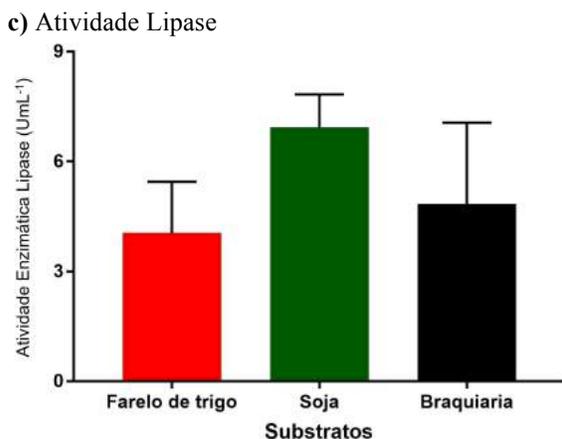
**Figura 17.** Efeito da fonte carbono, na atividade enzimática de pectinase, protease e lipase para a isolado *R. solani* AG-1 IA oriundo de braquiária PA\_B1F6, cultivados sob fermentação em estado sólido por 96h. a) Atividade Pectinase; b) Atividade Protease e c) Atividade Lipase

## a) Atividade pectinase



## b) Atividade Protease





Fonte: próprio autor

#### 2.4.2.3. Isolados de soja

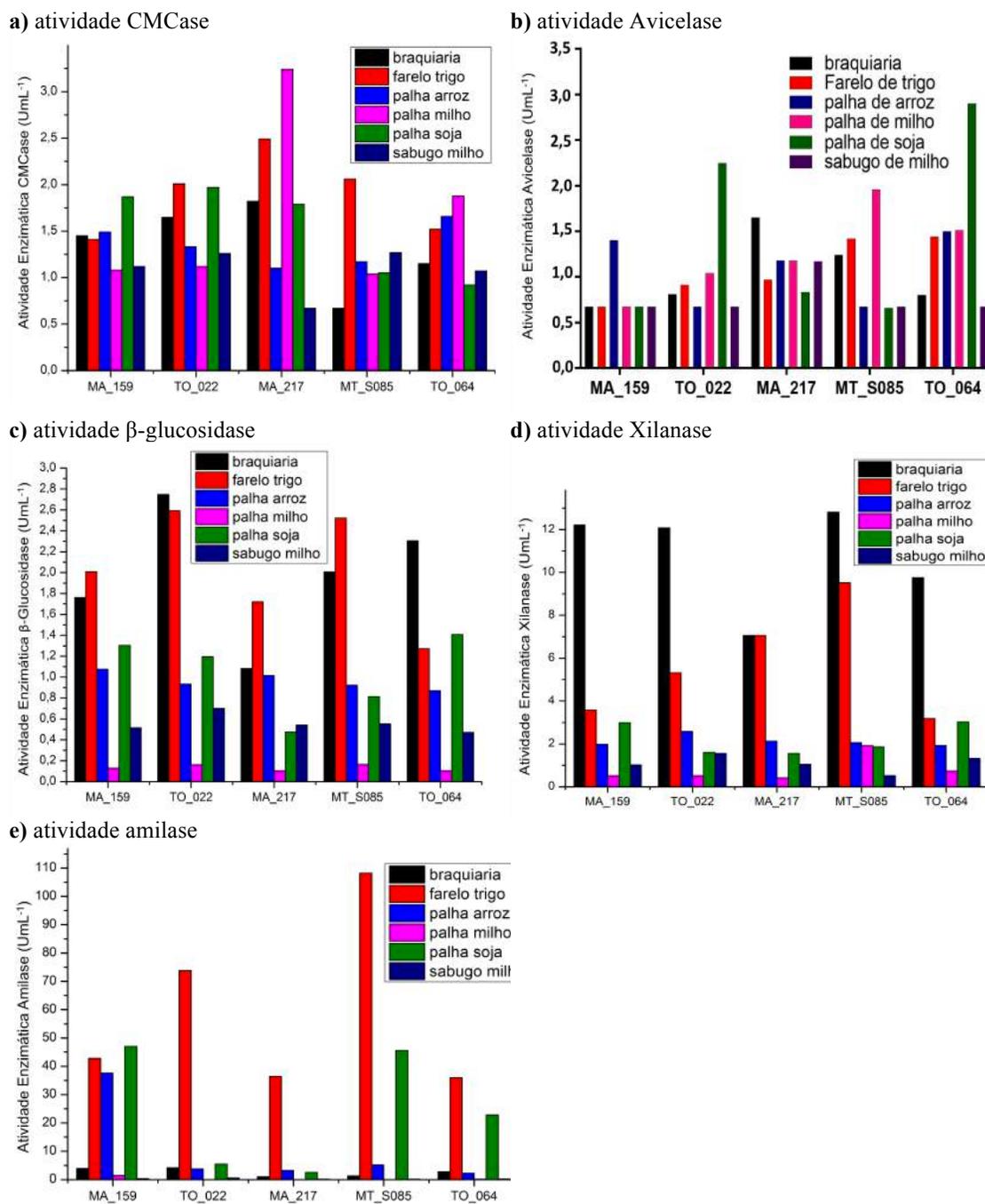
Dentre os isolados de *R. solani* AG-1 IA obtidos da cultura de soja, atividade de CMCase foi superior quando cultivado no substrato com palha de milho, com produção de 3,24 U mL<sup>-1</sup> para a isolado MA\_217 (Figura 18a). A atividade enzimática de Avicelase foi maior para o isolado TO\_064 quando cultivado em substratos de palha de soja, com 2,91 U mL<sup>-1</sup> (Figura 18b).

A atividade de  $\beta$ -glucosidase foi superior no cultivo com substrato braquiária e farelo de trigo onde a isolado TO\_022 apresentou produção de 2,75 UmL<sup>-1</sup> e 2,59 UmL<sup>-1</sup>, respectivamente para os substratos (Figura 18c), enquanto que a produção de xilanase foi maior no substrato de braquiária para as linhagens MA\_159 e MT\_S085 com, 12,22 U mL<sup>-1</sup> e 12,82 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 18d).

A atividade enzimática de amilase foi mais alta principalmente, no substrato de farelo de trigo, com exceção de alguns isolados que foram mais produtivos em palha de soja e palha de arroz. Os isolados com maior produção em farelo de trigo foram MT\_S085 e TO\_022 com 108,24 U mL<sup>-1</sup> e 73,83 UmL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 18e)

Dentre os 5 isolados de *R. solani* AG-1 IA obtidos de cultura de soja, MT\_S085 foi selecionado para continuar sendo avaliado para as enzimas pectinase, protease e lipase.

**Figura 18.** Efeito da fonte carbona, na atividade enzimática para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA MA\_159, TO\_022, MA\_217, MT\_S085 e TO\_064, oriundos de cultura de soja, cultivados sob fermentação em estado sólido por 96h a 25 °C. a) CMCase; b) Avicelase, c)  $\beta$ -glucosidase d) Xilanase, e) Amilase.



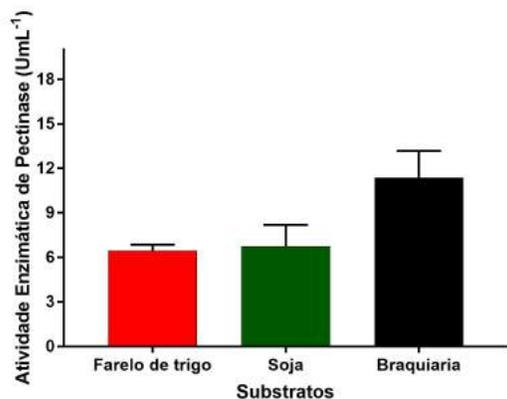
Para a produção de pectinase, esta foi maior quando cultivado no substrato de braquiária com 11,93 U mL<sup>-1</sup>. Para a atividade de protease, a maior produção foi com o substrato

farelo de trigo  $1154,519 \text{ UAP mL}^{-1}$ , enquanto que para a atividade lipase a maior produção foi obtida quando o isolado foi cultivado em substrato de braquiária com  $30,57 \text{ U mL}^{-1}$  (figura 19).

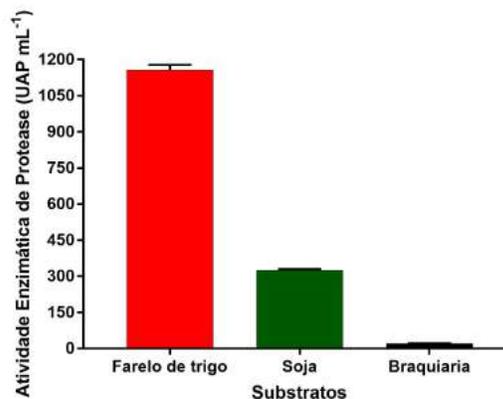
Na literatura os valores de produção enzimática de xilanase são inferiores aos apresentados pelos isolados *Rhizoctonia solani* AG-1 IA obtidos no presente trabalho. *Aspergillus niger* ANL301 quando cultivado sob fermentação em estado sólido, usando farelo de trigo como fonte de carbono, por exemplo, foi de  $6,47 \text{ U mL}^{-1}$  em 96 horas de cultivo. Os valores relatados foram ainda mais baixos quando se utilizou bagaço de cana como substrato, gerando atividade enzimática de  $0,95 \text{ U mL}^{-1}$  em 96 horas de cultivo (OKAFOR, 2007).

**Figura 19.** Efeito da fonte carbono, na atividade enzimática de pectinase, protease e lipase para a isolado de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, oriundos de culturas de soja MT\_S085, cultivados sob fermentação em estado sólido por 96h. a) Atividade Pectinase; b) Atividade Protease e c) Atividade Lipase

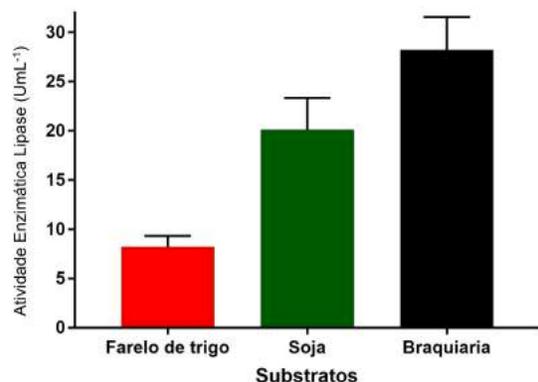
a) Atividade Pectinase



b) Atividade Protease



c) Atividade Lipase



Fonte: Próprio autor

Gawande and Kamat (1999) observaram que a atividade de xilanase produzida por *Aspergillus terreus* quando cultivado sob fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato foi de 21,2 U mL<sup>-1</sup>, enquanto a atividade de CMCase foi de 0,48 U mL<sup>-1</sup>, ou seja, uma baixa produção enzimática inferior aos resultados apresentados neste trabalho. Os mesmos autores estudando a isolado *Aspergillus niger* 44 nas mesmas condições de cultivo, acima apresentadas, obtiveram uma atividade enzimática um pouco mais alta, de 26,7 UmL<sup>-1</sup> e 0,62 UmL<sup>-1</sup> para xilanase e CMCase, respectivamente. Quando os autores utilizaram bagaço de cana como substrato para fermentação em estado sólido para os fungos *A. terreus* e *A. niger* 44 a atividade enzimática de xilanase foi de 3,5 U mL<sup>-1</sup> e 18,0 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Ainda a atividade de CMCase nas mesmas condições de cultivo e com as mesmas linhagens os resultados foram de 0,13 U mL<sup>-1</sup> e 0,5 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Zanchetta (2012) observou, para o fungo *Chaetomium* sp. N13 uma produção máxima de avicelase (12,7 U g<sup>-1</sup> ou 0,6 U mL<sup>-1</sup>) em 144h de cultivo em palha de milho e farelo de trigo (9:1). Para *Humicola grisea* var. *thermoidea*, o mesmo autor obteve maior produção de avicelase, quando cultivada em cevada e farelo de trigo (9:1) de 18,1 U g<sup>-1</sup> ou 0,9 U mL<sup>-1</sup>, em 192h de cultivo.

Para *R. solani* AG-1 IA, a maior produção de Avicelase foi obtida por isolados oriundos de culturas de soja quando utilizando como fonte de carbono palha de milho e palha de soja para o isolado MT\_S085 com 1,96 U mL<sup>-1</sup> e TO\_064 com 2,91 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente para os substratos.

As atividades de β-glucosidase foram promissoras para o isolado TO\_022 oriundo de culturas de soja, tendo como substrato braquiária e farelo de trigo com 2,75 UmL<sup>-1</sup> e 2,59 UmL<sup>-1</sup>, respectivamente para os substratos.

Foram relatados por Almeida (2009) estudando espécies de *Acremonium* sp. valores bem inferiores aos obtidos neste estudo, para atividades de β-glucosidase, com 0,08 U mL<sup>-1</sup> ou 2,88 U g<sup>-1</sup> quando cultivado em bagaço de cana por 33 dias sob fermentação em estado sólido 0,01 U mL<sup>-1</sup> e 0,22 U g<sup>-1</sup> quando cultivado em palha de milho. Para *Fusarium oxysporum*, cultivado em palha de milho, em fermentação em estado sólido (FES), produziu 0,14 U g<sup>-1</sup> de β-glucosidase, segundo Panagiotou et al. (2003).

*Chaetomium* sp. N13A apresentou uma produção máxima de β-glucosidase (13,9 Ug<sup>-1</sup> e 0,7 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente) em 240h de cultivo em bagaço de cana e farelo de trigo (1:9).

*Humicola grisea* var. *thermoidea*, as maiores produções de  $\beta$ -glucosidase (124,9 U g<sup>-1</sup> ou 6,2 U mL<sup>-1</sup> e 123,1 U g<sup>-1</sup> ou 6,2 U mL<sup>-1</sup>) foram observadas em 288 e 336h de cultivo, utilizando como substrato bagaço de cana e farelo de trigo (1:9) e farelo de trigo, respectivamente (ZANCHETTA, 2012).

Os maiores resultados para as atividades de amilase foram obtidos para os isolados de culturas de braquiária utilizando como substrato braquiária triturada e farelo de trigo, para os isolados ROB3B4 e ROB4D7, com 98,38 U mL<sup>-1</sup> e 142,88 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

A atividade máxima de  $\alpha$ -amilase para o fungo *Macrocybe titans*, em substrato de bagaço de malte tratado com 4g de farelo de soja (12,71 U g<sup>-1</sup> de meio sólido) foi superior ao do substrato tratado com 7 g de farelo de soja (6,28 U g<sup>-1</sup> de meio sólido). Da mesma forma, a maior atividade de glicoamilase foi obtida no meio com 4g de farelo (19,07 U g<sup>-1</sup> de meio sólido) sobre 13,33 U g<sup>-1</sup> de meio sólido no meio com 7 g de farelo de soja (WISIEWSKI, 2009).

Balkan e Ertan (2007) estudando a produção de  $\alpha$ -amilase para o fungo *Penicillium chrysogenum* em diferentes fontes de carbono, ou seja, sabugo de milho (folha), palha de centeio, palha de trigo, farelo de trigo, verificaram que a produção de amilase foi induzida pelos substratos, tendo os maiores resultados obtidos com farelo de trigo, cuja atividade específica foi de 152 U mg<sup>-1</sup> de proteína.

Ertan et al., (2014) observaram a produção de  $\alpha$ -amilase a partir de *P. chrysogenum* em FES com farelo de trigo como substrato obteve 694 U mL<sup>-1</sup>. No entanto, quando o meio foi suplementado com diferentes concentrações de glicose (10 mg g<sup>-1</sup>, 20 mg g<sup>-1</sup> e 160 mg g<sup>-1</sup>) obteve uma atividade de  $\alpha$ -amilase de 687 U mL<sup>-1</sup>, 649 U mL<sup>-1</sup> e 553 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Estes dados confirmam que isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA estudados tem grande potencial para produção de amilase, uma vez que a atividade enzimática obtida foi superior aos analisados por outros autores, não sendo utilizado qualquer forma de enriquecimento dos substratos.

A produção de pectinase foi superior para o isolado PA\_B1F6 obtido de culturas de braquiária, quando utilizando como fonte de carbono a braquiária com 17,69 U mL<sup>-1</sup>(143,59 Ug<sup>-1</sup>).

Valores inferiores aos encontrados para estes isolados tem sido relatado, no entanto, alguns isolados de *A. niger* exibiram produções semelhantes para pectina, que os isolados de *R. solani* AG-1 IA.

Martins et al., (2005), estudando o perfil enzimático produzido pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação em estado sólido e fracionamento de uma poligalacturonase (PG) verificou que a atividade máxima de exo-PG foi de  $40,0 \text{ U g}^{-1}$ , o equivalente a  $5,0 \text{ U ml}^{-1}$  com 4 dias de fermentação. Já a produção máxima de endo-PG foi de  $3,6 \text{ U g}^{-1}$ , o equivalente a  $0,45 \text{ U ml}^{-1}$ , coincidindo com o tempo de maior produção da exo-PG.

Panarotto et al., (2006) avaliando a produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger*, alcançaram uma atividade máxima de endo-PG de  $47,1 \text{ U g}^{-1}$ , utilizando cascas de limão Taiti como substrato sólido. Salvador et al., (2004) avaliando o efeito de diferentes concentrações de glicose sobre a produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em meio sólido alcançaram atividade máxima de endo-PG de  $165 \text{ U g}^{-1}$  em 72 horas de cultivo em meio contendo 10% de glicose.

Trentini (2014) ao avaliar a produção de pectinase para *Aspergillus niger* ATCC 9642 em sistemas aquosos obteve uma produção de  $86,411 \text{ U mL}^{-1}$ .

Para extrato obtido por fermentação em estado sólido com farelo de trigo como substrato, Dini (2010) obteve uma produção de protease de  $352,00 \text{ UAP mg}^{-1}$  para o fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. A partir desses dados, constata-se que *Rhizoctonia solani* AG-1 IA isolado MT\_S085 obtido de cultura de soja apresentou alta produção de protease quando cultivado em farelo de trigo, com uma média de  $1154,52 \text{ UAP mL}^{-1}$  e atividade específica de  $599,39 \text{ UAP mg}^{-1}$ . Este mesmo isolado foi também o que exibiu a maior atividade de lipase com produção  $30,57 \text{ U mL}^{-1}$  quando cultivado em substrato de braquiária. Assim, como observado para outras enzimas, este isolado mostrou ser mais eficiente que outros relatados.

*Aspergillus terreus* isolado de solos contaminados com querosene, mostrou alta produção de lipase ( $15,463 \pm 0,39 \text{ U mL}^{-1}$ ) e a atividade específica de  $142,74 \pm 0,95 \text{ U mg}^{-1}$  de proteína (MAHMOUD et al., 2015).

MOURA et al. (2013) ao analisar extrato enzimático bruto dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* obteve  $7,6$  e  $9,5 \text{ U mL}^{-1}$ , respectivamente após 48 h de incubação a  $30^\circ\text{C}$  cultivados sob fermentação semi-sólida contendo meio de cultivo enzimático.

Ferrarezi et al., (2010) reportaram atividade lipolítica de fungos termófilos, *Aspergillus* T5.1.2 e *Aspergillus* T5.62, cultivados em meio de cultura sólido contendo peptona (0,1%), óleo de soja (2,5%) como substrato da enzima, emulsificado com Tween 80 (0,4%) e cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) como revelador. Como resultado ficou comprovado a atividade lipolítica pelo gênero

*Aspergillus*, sendo obtidas  $8 \text{ UmL}^{-1}$  para o *Aspergillus* T5.62 e  $7 \text{ UmL}^{-1}$  para o *Aspergillus* T5.1.2.

### **2.4.3. Perfil de produção enzimática**

Com base nas análises anteriores realizada para 5 isolados obtido de cada uma das culturas, arroz, braquiária e soja, foram selecionados 3 substratos, farelo de trigo, braquiária e palha de soja, por apresentarem de modo geral, maior produção enzimática para as enzimas testadas, para avaliar o melhor tempo de cultivo para esses isolados. Para determinação das atividades enzimáticas, foram retiradas amostras a cada 24h ao longo de um período de 192h.

#### **2.4.3.1. Isolados de arroz**

A Figura 20 ilustra o perfil de produção das enzimas Avicelase e CMCCase nos três substratos analisados. Observando os 5 isolados analisados nos três substratos, tem-se que as maiores atividades enzimáticas foram obtidas no intervalo de tempo entre 96h a 144h, com uma variação para o isolado RR\_A23 que apresentou alta produção de CMCCase no período de 120h a 168h quando cultivada em substrato de braquiária. A avicelase mostrou melhor produção no substrato de farelo de trigo, no tempo entre 120h e 144h.

O perfil da produção de xilanase nos diferentes substratos, de modo geral, mostrou que a atividade enzimática apresenta uma elevação a partir de aproximadamente 70h de cultivo, sendo que no substrato de farelo de trigo, dois isolados, RR\_A43 e RR\_A41, apresentaram um pico de produção em 144h (Figura 21).

A atividade amilase tendo o farelo de trigo como o farelo de trigo como substrato que resultou nos maiores níveis de atividade e o isolado RR\_A43 apresentou um pico de produção em 144 horas de cultivo (Figura 22b). Para todos os substratos os melhores tempos para produção da enzima foi entre 120h a 144h.

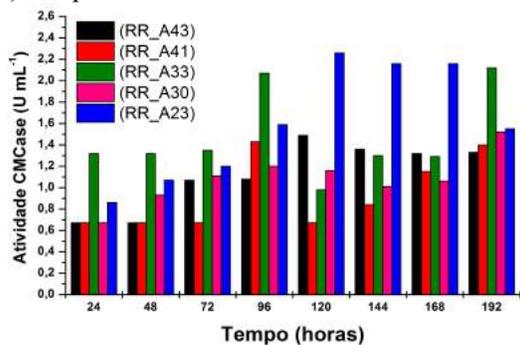
#### **2.4.3.2. Isolados de braquiária**

A Figura 23 ilustra as atividades para CMCCase e Avicelase para os isolados obtidos da cultura braquiária, a CMCCase mostrou maior produção no intervalo entre 120h a 144h, o isolado ROB4D7 mostrou-se mais promissor quando cultivado em farelo de trigo a 120h. Para a enzima

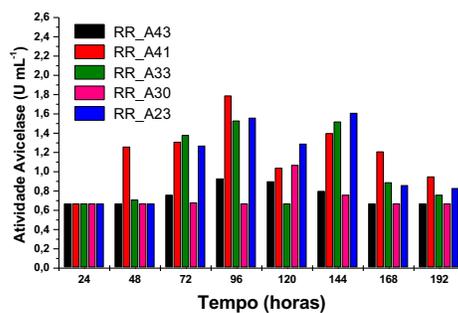
Avicelase os isolados apresentaram melhor desempenho no intervalo entre 96h a 144h, com maior produção no substrato de farelo de trigo a 120h com a isolado ROB3B4.

**Figura 20.** Atividades CMCase e Avicelase ( $\text{U mL}^{-1}$ ) para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA RR\_A43, RR\_A41, RR\_A33, RR\_A30 e RR\_A23 oriundos de cultura de arroz, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) e b) braquiária; c) e d) farelo de trigo e e) e f) palha de soja.

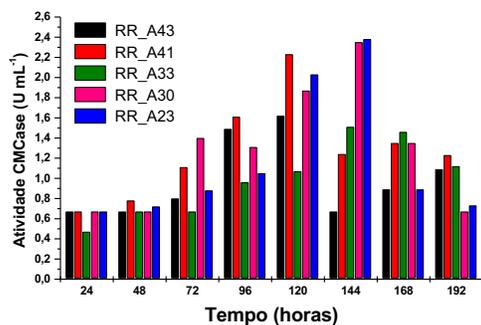
a) braquiária



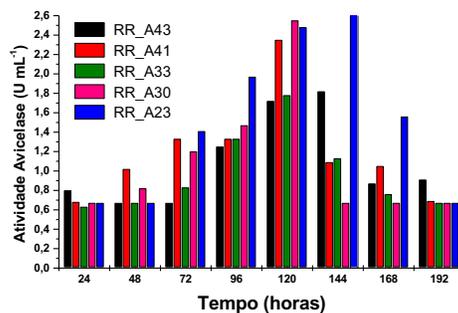
b) braquiária



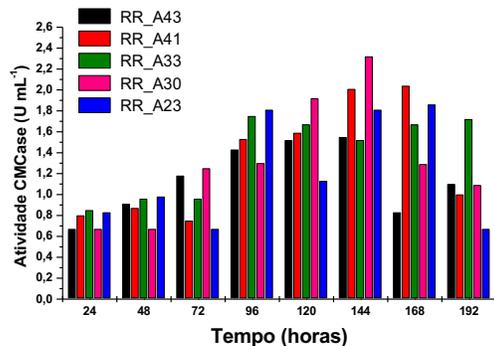
c) farelo de trigo



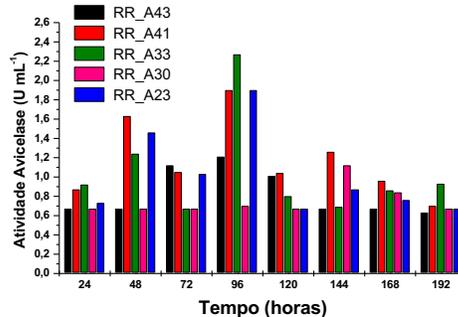
d) farelo de trigo



e) palha de soja



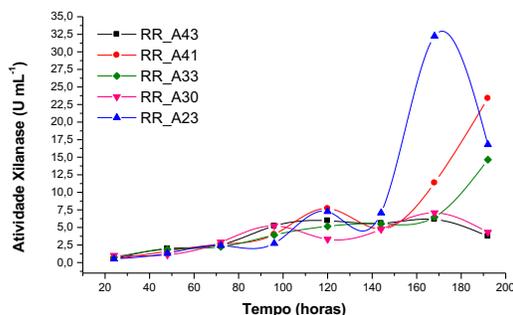
f) palha de soja



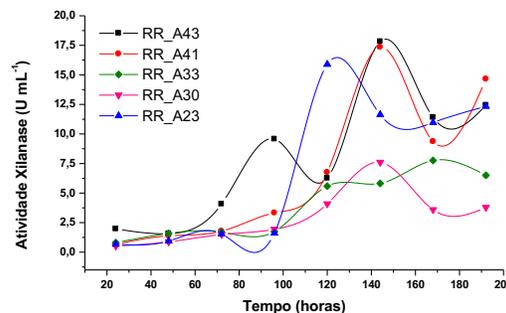
Fonte: próprio autor

**Figura 21.** Atividades xilanase ( $\text{U mL}^{-1}$ ) para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA RR\_A43, RR\_A41, RR\_A33, RR\_A30 e RR\_A23, oriundos de cultura de arroz, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) braquiária; b) farelo de trigo e c) palha de soja.

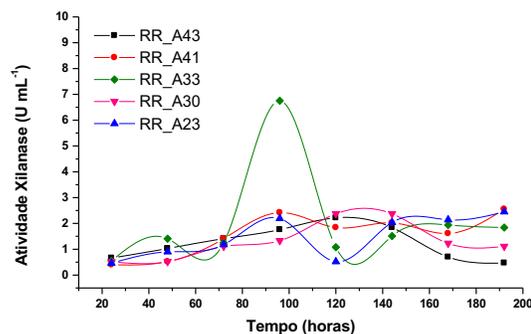
a) braquiária



b) farelo de trigo



c) palha de soja



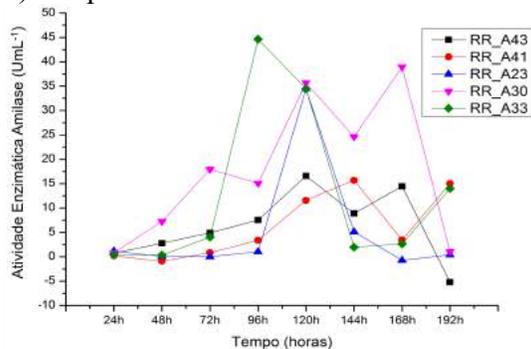
Fonte: Próprio autor

Os níveis de atividade xilanólítica variaram entre os substratos, sendo maior no farelo de trigo, porém com um pico de atividade no substrato de braquiária (Figura 24b e 24a). O isolado ROB1A3 apresentou um crescimento exponencial a partir de 144h de cultivo, no substrato braquiária (Figura 24a), enquanto que no substrato farelo de trigo o mesmo isolado apresentou maior atividade após 96 horas de cultivo. No substrato palha de soja os níveis de atividade xilanase entre os isolados ficaram próximos, havendo alguns com picos de atividade em torno de 96h e outros entre 166h de cultivo (Figura 24c).

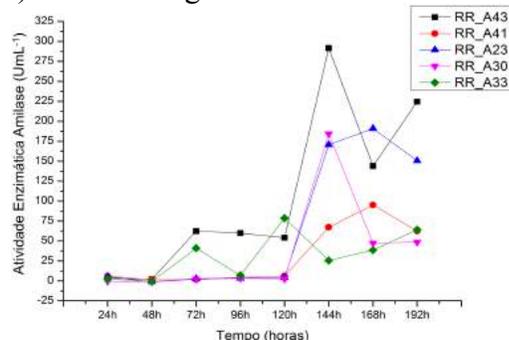
A produção de amilase por isolados de *R. solani* AG-1 IA obtidos de cultura de braquiária (Figura 25), apresentou os níveis de atividade amilolítica maiores no substrato farelo de trigo, no tempo de 144h. Enquanto que no substrato braquiária, as produções enzimáticas mais altas foram entre 120h e 168h, e em palha de soja entre 96h e 168h.

**Figura 22.** Atividade amilase ( $\text{UmL}^{-1}$ ) para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA RR\_A43, RR\_A4, RR\_A33, RR\_A30 e RR\_A23, oriundos de cultura de arroz, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) braquiária; b) farelo de trigo e c) palha de soja.

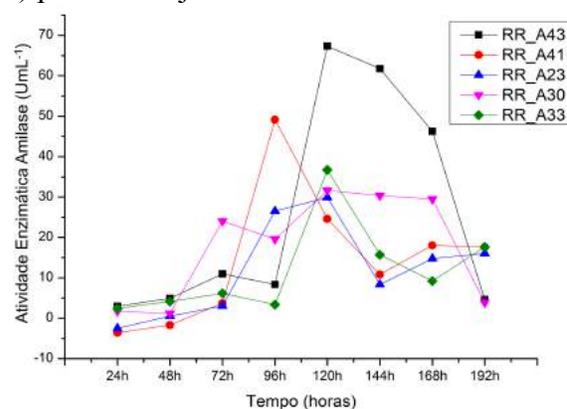
a) braquiária



b) farelo de trigo



c) palha de soja



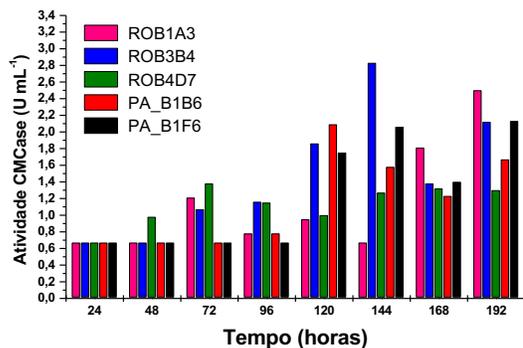
Fonte: Próprio autor

#### 2.4.3.3. Isolados de soja

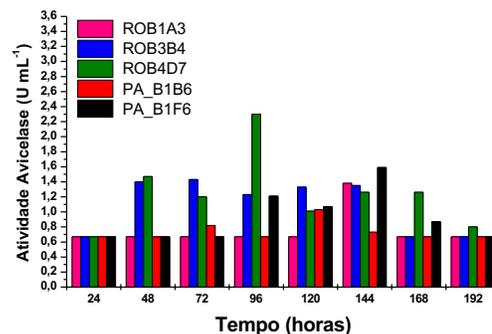
As atividades enzimáticas de CMCase e avicelase produzida por isolados de *R. solani* AG-1 IA obtidos de cultura de soja, mostrou maior produção no intervalo de tempo entre 96h a 168h com farelo de trigo como o melhor substrato (Figura 26). Para a Avicelase, o farelo de trigo também foi o melhor substrato, porém no intervalo de tempo entre 144h a 168h. Pode-se observar uma variação no melhor tempo de produção para o substrato de braquiária, onde a mais alta atividade enzimática foi no intervalo entre 72h a 96h.

**Figura 23.** Atividades CMCase e Avicelase ( $\text{U mL}^{-1}$ ) para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA PA\_B1F6, PA\_B1B6, RO\_B3B4, ROB1A3 e RO\_B4D7, oriundos de cultura de braquiária, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) e b) braquiária; c) e d) farelo de trigo e e) e f) palha de soja.

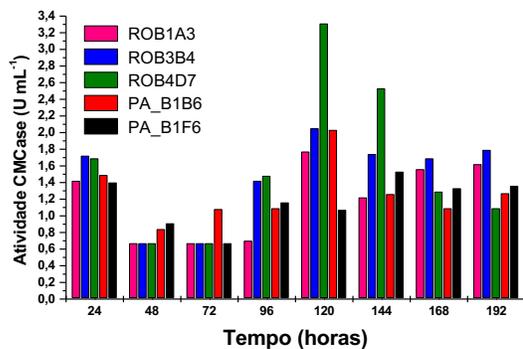
a) braquiária



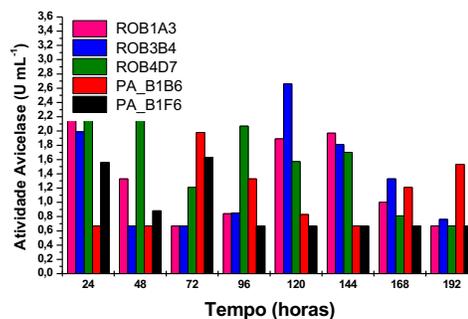
b) braquiária



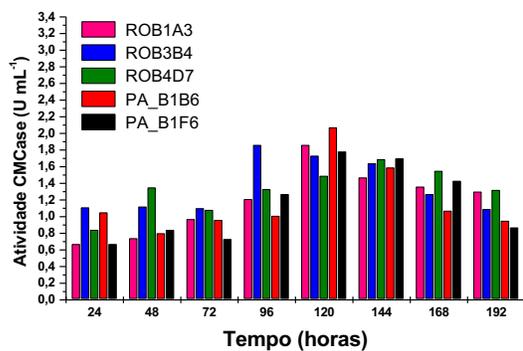
c) farelo de trigo



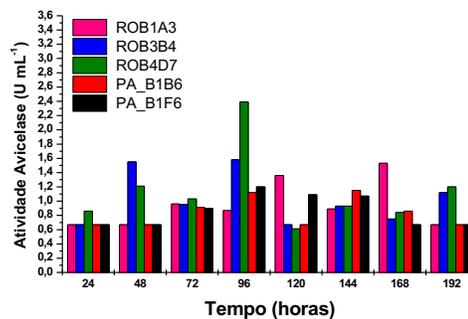
d) farelo de trigo



e) palha de soja



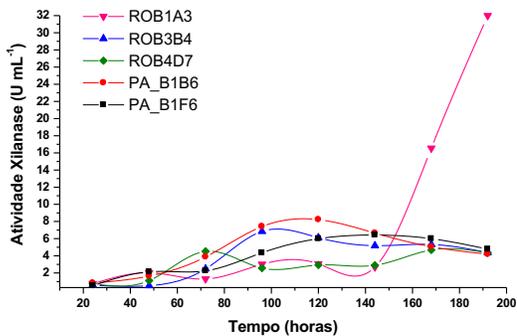
f) palha de soja



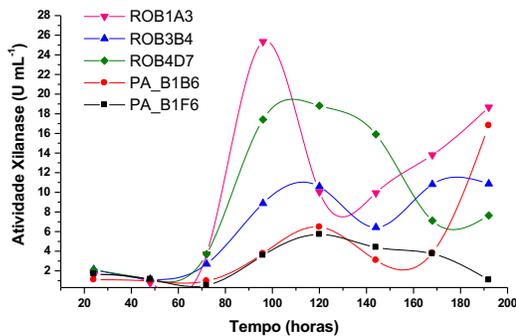
Fonte: Próprio autor

**Figura 24.** Atividades xilanase (U mL<sup>-1</sup>) para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA PA\_B1F6, PA\_B1B6, RO\_B3B4, ROB1A3 e RO\_B4D7, oriundos de cultura de braquiária, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) braquiária; b) farelo de trigo e c) palha de soja.

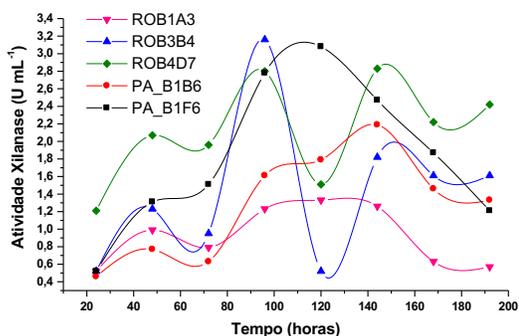
a) braquiária



b) farelo de trigo



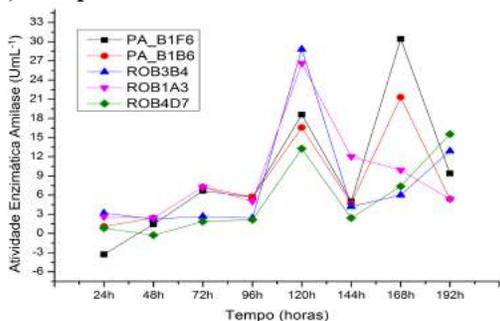
c) palha de soja



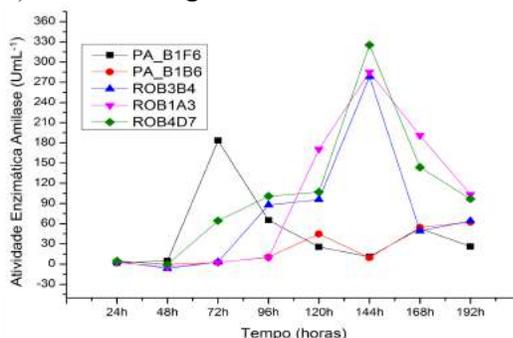
Fonte: Próprio autor

**Figura 25.** Atividade amilase (U mL<sup>-1</sup>) para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA PA\_B1F6, PA\_B1B6, RO\_B3B4, ROB1A3 e RO\_B4D7, oriundos de cultura de braquiária, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) braquiária; b) farelo de trigo e c) palha de soja.

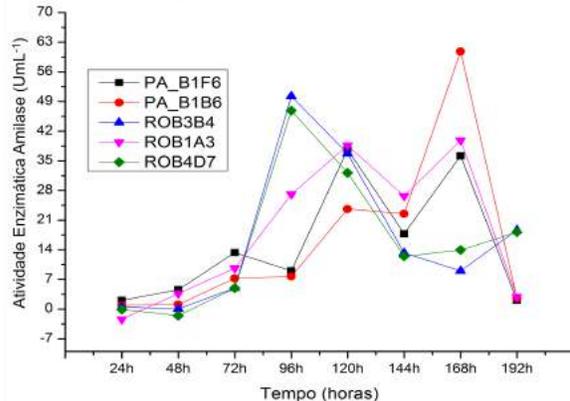
a) braquiária



b) farelo de trigo



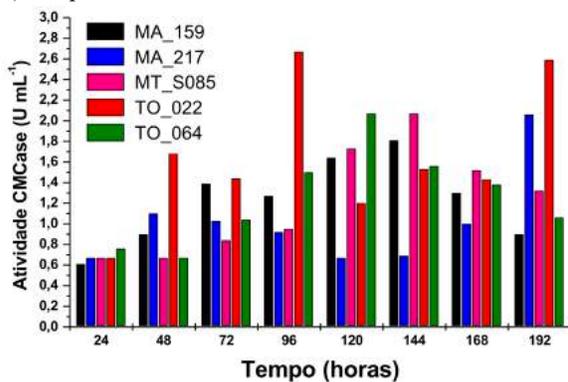
c) palha de soja



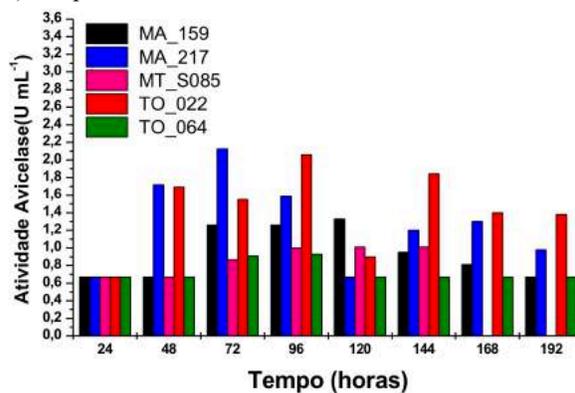
Fonte: Próprio autor

**Figura 26.** Atividades CMCase e Avicelase (U mL<sup>-1</sup>) para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA MA\_159, MA\_217, MT\_S085, TO\_022 e TO\_064, oriundos de culturas de soja, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) e b) braquiária; c) e d) farelo de trigo e e) e f) palha de soja.

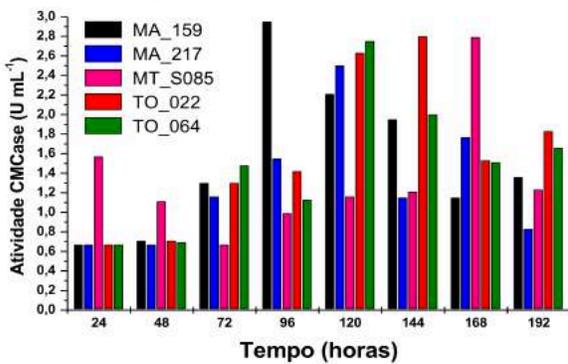
a) braquiária



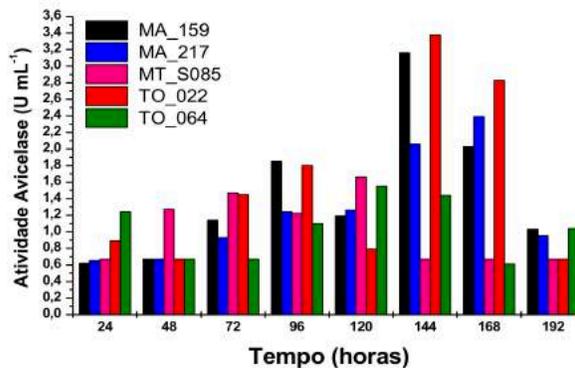
b) braquiária

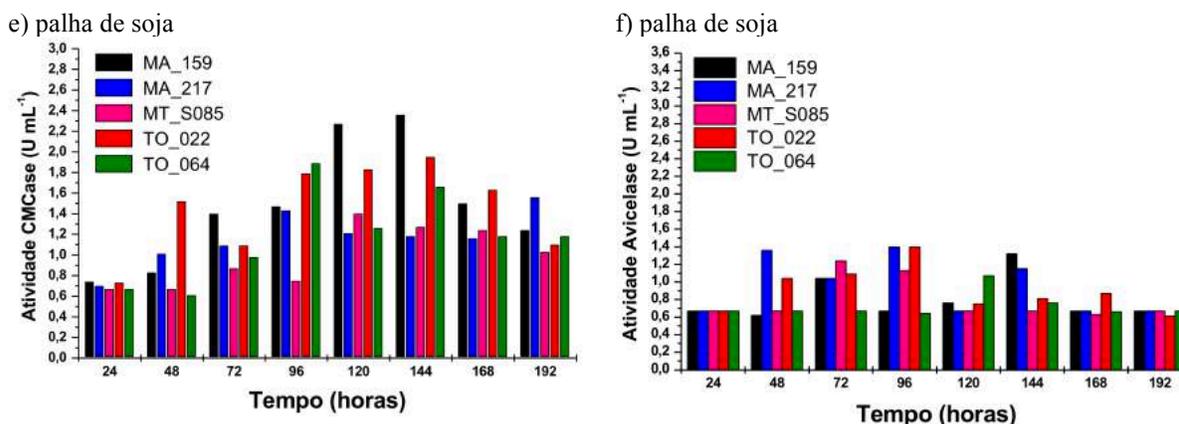


c) farelo de trigo



d) farelo de trigo





Fonte: Próprio autor

A atividade de xilanase para os diferentes isolados de *R. solani* AG-1 IA obtidos de cultura de soja, no substrato de braquiária, apresentou maior atividade no final do processo fermentativo entre 166 e 192 horas de cultivo (Figura 27a). No substrato farelo de trigo o pico de atividade foi ao redor de 96h (Figura 27b) para todas as linhagens testadas. Enquanto que, no substrato palha de soja, a maior atividade ficou no intervalo entre 96h e 120h (Figura 27c).

Para a amilase produzida pelos isolados de *R. solani* AG-1 IA obtidos da cultura de soja (Figura 28), o substrato de farelo de trigo foi o que resultou nas maiores atividades no tempo de 144h (Figura 28b). Enquanto que, no substrato de braquiária e palha de soja o melhor tempo para produção de amilase foi em 120h (Figura 28c).

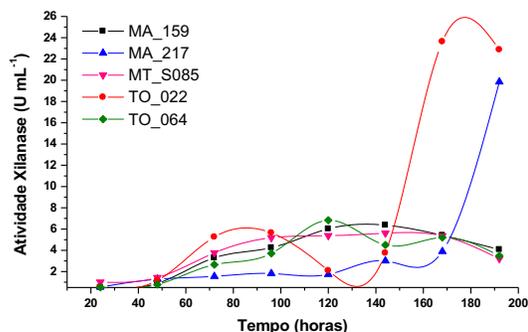
Almeida (2009) relatou que sua maior produção da atividade xilanolítica foi 2,46 UmL<sup>-1</sup>, por *Acremonium* sp. EA0810 ocorreu sob em fermentação líquida após 10 dias de cultivo. A produção com substrato palha de milho, foi 2,08 UmL<sup>-1</sup>, e valores similares foram observados com bagaço de cana como substrato, após 16 dias de cultivo. *Acremonium zeae* EA0802 produziu 2,16 UmL<sup>-1</sup> com bagaço de cana como fonte de carbono sob fermentação submersa após 14 dias de cultivo e com palha de milho a atividade de xilanase foi 0,76 UmL<sup>-1</sup>, após 9 dias de cultivo.

Xilana foi um bom indutor de xilanase para *A. zeae* EA0802 e *Acremonium* sp. EA0810. A atividade de xilanase de *A. zeae* EA0802 foi 1,56 U mL<sup>-1</sup> após 15 dias de cultivo, no entanto, após 3 dias esta atividade já estava em 1,38 UmL<sup>-1</sup>. No cultivo da cultura de *Acremonium* sp. EA0810 com xilana foi detectada 2,02 U mL<sup>-1</sup> após 3 dias de crescimento

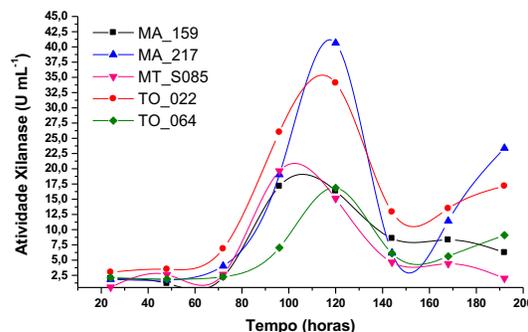
(ALMEIDA, 2009). Porém, mesmo utilizando a xilana como substrato, os dados obtidos por Almeida foram inferiores aos obtidos neste estudo.

**Figura 27.** Atividades xilanase ( $\text{U mL}^{-1}$ ) para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA MA\_159, MA\_217, MT\_S085, TO\_022 e TO\_064, oriundos de culturas de soja, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) braquiária; b) farelo de trigo e c) palha de soja.

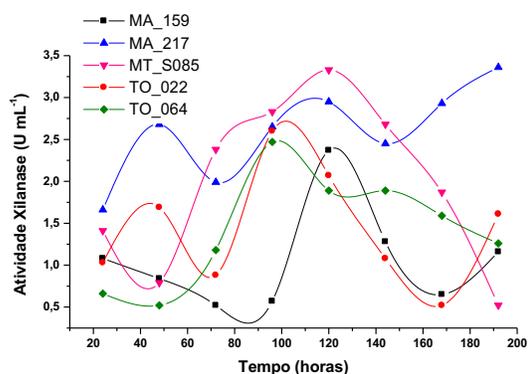
a) braquiária



b) farelo de trigo



c) palha de soja



Fonte: Próprio autor

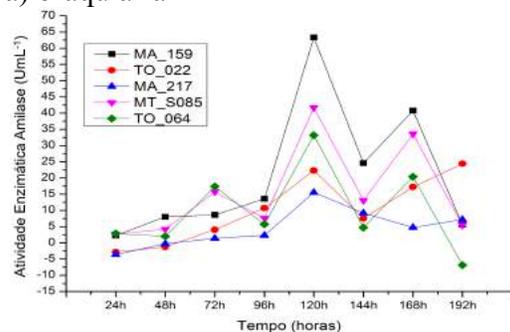
*Fusarium solani* SYRN7 foi cultivado em meio basal contendo alguns materiais lignocelulósicos como palha de trigo, farelo de trigo, polpa de beterraba e torta de sementes de algodão como fontes de carbono durante 6 dias. Observou-se que a atividade enzimática máxima da xilanase ( $1465 \text{ U g}^{-1}$ ) foi obtida usando farelo de trigo durante 4 dias de incubação (ARABI et al., 2011).

*Trichoderma viridi* (S34) produziu  $245 \text{ UL}^{-1}$  de xilanase em fermentação em estado sólido com palha de milho como substrato por um período de tempo entre 7 dias de incubação.

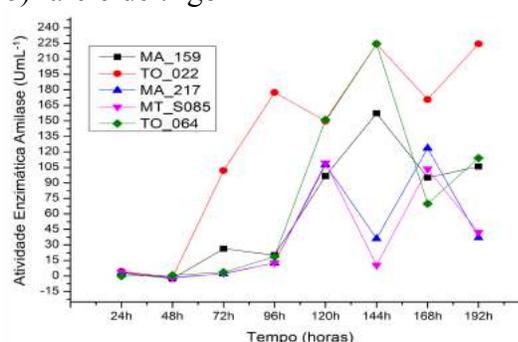
Para o mesmo fungo e mesmo substrato no período de 21 dias a produção de xilanase foi de 252  $UL^{-1}$  (GOYAL et al., 2008).

**Figura 28.** Atividades amilase ( $U mL^{-1}$ ) para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA MA\_159, MA\_217, MT\_S085, TO\_022 e TO\_064, oriundos de culturas de soja, cultivados sob fermentação em estado sólido em diferentes fontes de carbono, por até 192h a 25 °C. a) braquiária; b) farelo de trigo e c) palha de soja.

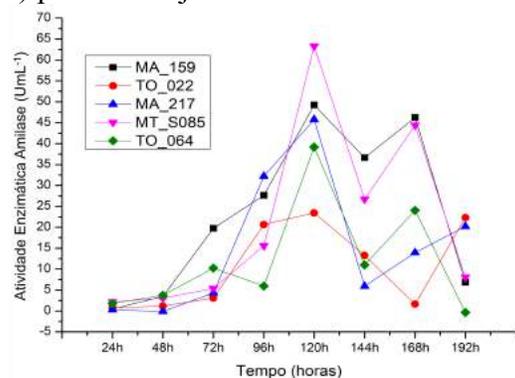
a) braquiária



b) farelo de trigo



c) palha de soja



Fonte: Próprio autor

*Rhizopus oryzae* produziu 0,39  $UmL^{-1}$  usando 1% de xilana como fonte de carbono após 6 dias e quando usado 2% de sabugo de milho como substrato o fungo produziu 2,8  $UmL^{-1}$  após 5 dias (BAKIR et al, 2001).

Dados como estes nos comprovam a eficiência de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA como produtor de xilanase.

#### 2.4.4. Características Físico-Químicas

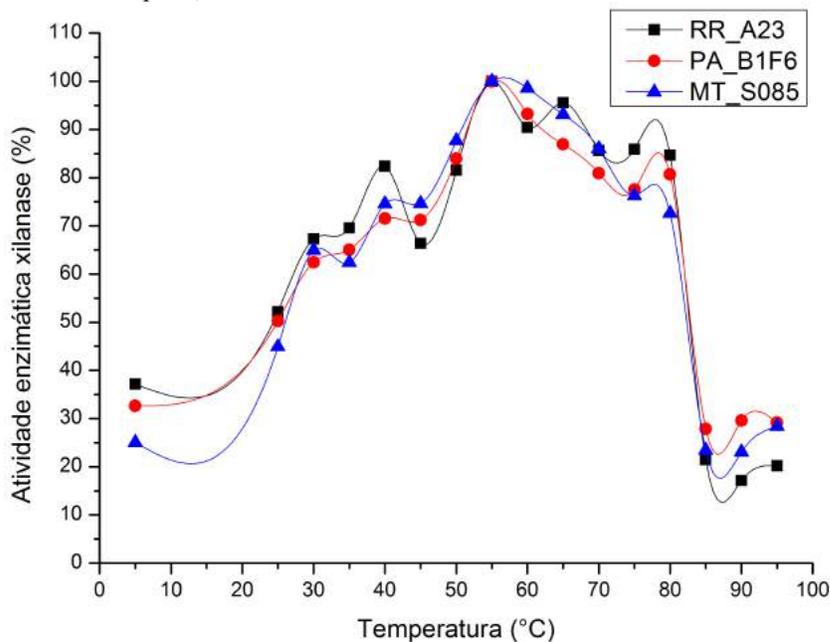
As características físico-químicas foram avaliadas para enzima bruta produzida pelos isolados RR\_A23, PA\_B1F6, e MT\_S085 de *Rhizoctonia solani* obtidos culturas de arroz,

braquiária e soja, respectivamente. Essas linhagens apresentaram as atividades enzimáticas mais altas para a xilanase, quando comparadas a estudos anteriores. O extrato bruto utilizado foi obtido por Fermentação em Estado Sólido utilizando o farelo de trigo como fonte de carbono, no tempo de 96 horas.

#### 2.4.4.1. Determinação da temperatura ótima

A temperatura de ação para a xilanase produzida por *Rhizoctonia solani* foi determinada até 95 °C com variação de 5 °C. A temperatura de 55 °C demonstrou ser a temperatura de melhor atividade para xilanase, para os diferentes isolados. Cerca de 80% da atividade foi mantida a temperatura de 80 °C e a 90 °C ainda se observou 25% de atividade enzimática (Figura 29).

**Figura 29.** Efeito da temperatura na atividade da xilanase produzida por isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundas de culturas de arroz (RR\_A23), braquiária (PA\_B1F6) e soja (MT\_S085) em tampão de acetato com xilana a 1% a pH 5,0.



**Fonte:** próprio autor; atividade xilanase 15,37 U mL<sup>-1</sup>(RR\_A23, arroz); 21,31 U mL<sup>-1</sup> (braquiária, PA\_B1F6) e 14,94 U mL<sup>-1</sup> (soja, MT\_S085)

Xilanases de origem fúngica normalmente mostram atividade ótima em torno de 50 °C, sendo inativas em temperaturas superiores a 65 °C (GASPAR et al., 1997; QUERIDO, 2002). A xilanase produzida por *Thermoascus aurantiacus* apresentou temperatura ótima de 75 °C

(DaSILVA et al., 2005), sendo superior ao obtido no presente estudo. Passarinho (2014) estudando xilanases produzidas por *Orpinomyces* PC-2 observou temperatura ótima a 60 °C, com redução brusca da atividade em 70 °C e 80 °C.

As enzimas, em geral, apresentam temperatura máxima em determinada temperatura. A temperatura pode modificar a estrutura da proteína de forma que seu sítio ativo permaneça mais exposto, aumentando a atividade da enzima (LEHNINGER et al., 2002). O aumento da temperatura resulta em aumento no número de moléculas com energia suficiente para sobrepor a barreira energética, por meio da energia de ativação. Por outro lado, temperaturas altas promovem a desnaturação enzimática e, conseqüentemente, a perda da atividade da enzima (LEHNINGER et al., 2002).

#### 2.4.4.2. Determinação do pH ótimo e pH de estabilidade

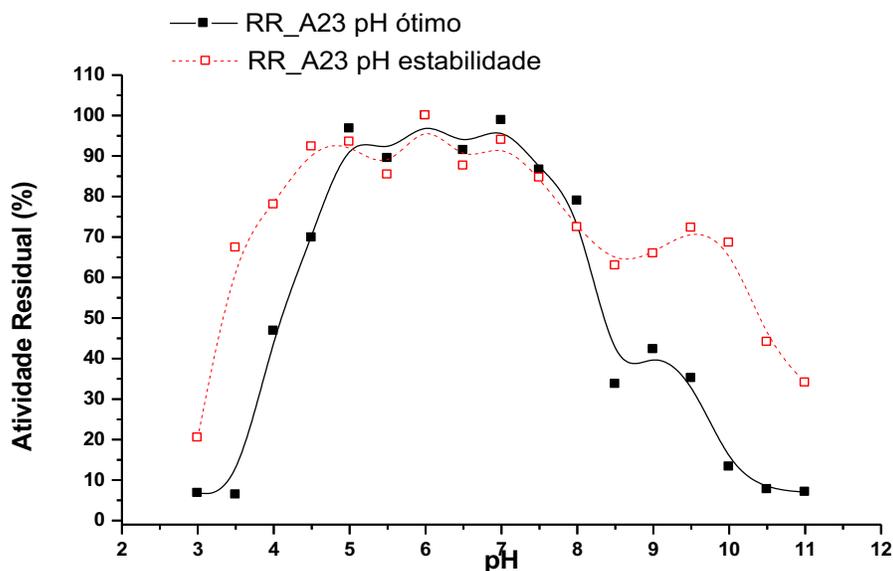
A determinação do pH ótimo de ação da xilanase produzida por isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA foi realizada na faixa de pH 3,0 – 11,0 com 1% de xilana em cada sistema tamponante. Para a estabilidade ao pH a enzima bruta foi incubada por 24h em tampões de pH variando de 3,0 a 11,0, com intervalos de 0,5 unidade de pH. Posteriormente à incubação, foi realizada a determinação da atividade residual na temperatura ótima de 55°C e nos pH ótimos de pH 6,0 para o isolado de arroz (RR\_A23), pH 6,5 para o isolado de braquiária (PA\_B1F6) e pH 7,5 para o isolado de soja (MT\_S085).

O isolado RR\_A23 de cultura de arroz, apresentou 40% de atividade em pH 4,0 e chegou a 100% em pH 6,0, o qual foi sua maior atividade com 7,69 U mL<sup>-1</sup>, pode-se observar ainda, que em pH 7,0 ha 97% de atividade, a qual foi decrescendo e com pH 9,5 manteve-se ainda uma atividade de 30% (Figura 30). Quanto à estabilidade ao pH a xilanase mostrou-se estável em pH na faixa de 4,5-7,5. Em pH 3,5, 9,5 e 10,0 manteve 78%, 72 % e 68% da atividade máxima da enzima, respectivamente. Em pH 11,0 permaneceu com 35% da atividade residual (Figura 30).

O isolado de cultura de braquiária, PA\_B1F6 mostrou 40% de atividade em pH 4,0 e aumentou até pH 6,5, o qual foi sua maior atividade 8,0 U mL<sup>-1</sup>, pode-se observar ainda, que em pH 7,0 a isolado apresentou atividade de 97% de atividade, a qual foi decrescendo e em pH 9,5, 47% de atividade residual ainda foi quantificada (Figura 31). A estabilidade ao pH da xilanase produzida pelo isolado PA\_B1F6 ocorreu quando incubada em pH na faixa de 4,5-7,0.

Em pH 3,5, 9,5 e 11,0 manteve 86 %, 80 % e 67 % da atividade residual da xilanase, respectivamente (Figura 31).

**Figura 30.** Determinação de pH ótimo e efeito da estabilidade de pH na atividade da xilanase produzida por isolado de *Rhizoctonia solani* oriundo de culturas de arroz (RR\_A23), cultivada sob fermentação em estado sólido, usando farelo de trigo como fonte de carbono, após 96 horas de cultivo. Os tampões usados foram: MacIlvaine (pH 3.0-8.0) e glicine-NaOH (pH 8.0-11).



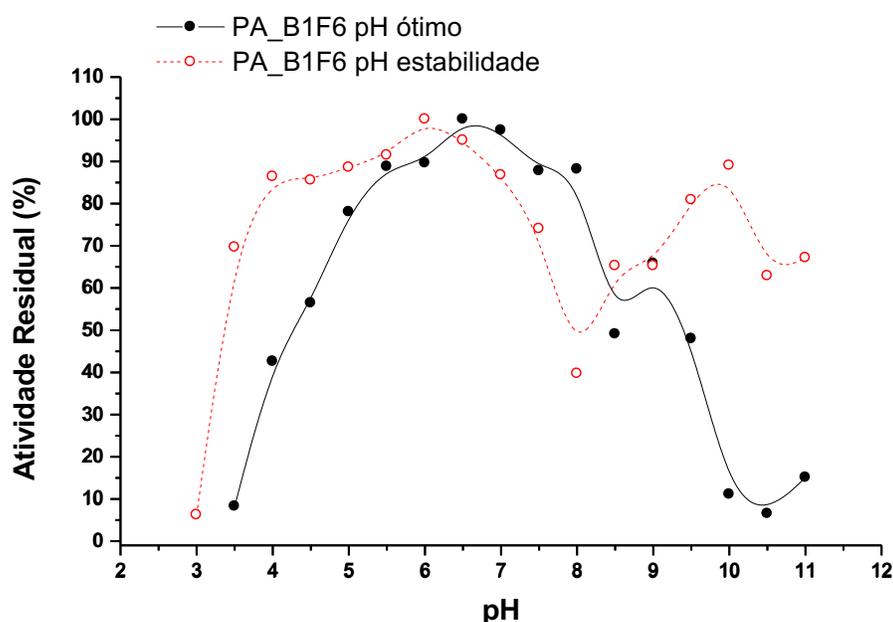
Fonte: Próprio autor.

O isolado de cultura de soja, MT\_S085 apresentou 54% de atividade xilanase em pH 4,5 que aumentou gradualmente até pH 7,5, ao qual foi determinada 100% de atividade xilanase ( $8,08 \text{ U mL}^{-1}$ ). Pode-se observar ainda, que em pH 9,5 o isolado apresentou 65% de atividade, a qual foi decrescendo bruscamente até atingir valores nulos em pH entre 10,0 e 11,0 (Figura 32). A xilanase produzida pelo isolado MT\_S085 mostrou-se estável quando incubada em pH na faixa de 4,0-7,0. Em pH 3,5, 10,0 e 11,0 manteve 61, 89 e 67% da atividade máxima da enzima, respectivamente (Figura 32).

Em torno do pH 9,0 todos os isolados apresentaram atividade residual para o pH ótimo, tal fato pode sugerir que existe mais de um tipo de enzima no extrato enzimático (SILVA et al, 2009).

Para a xilanase de *Penicillium funiculosum*, estudada por Lafond et al (2011), o pH ótimo compreendeu apenas os valores de 4,0-5,5. Junpei et al., (2013) mostraram que uma endoxilanase de *Humicola sp.* Ly01 apresentou atividade ótima em pH 6,0 e reteve mais de 75 % da atividade entre pH 5,0 e 7,0, mas valores próximos a 15% para pH 2,0 e 9,0.

**Figura 31.** Determinação de pH ótimo e efeito da estabilidade de pH na atividade da xilanase produzida por isolado de *Rhizoctonia solani* oriundo de culturas de *Braquiária sp.* (PA\_B1F6), cultivada sob fermentação em estado sólido, usando farelo de trigo como fonte de carbono, após 96 horas de cultivo. Os tampões usados foram: MacIlvaine (pH 3.0-8.0) e glicine-NaOH (pH 8.0-11).



Fonte: Próprio autor.

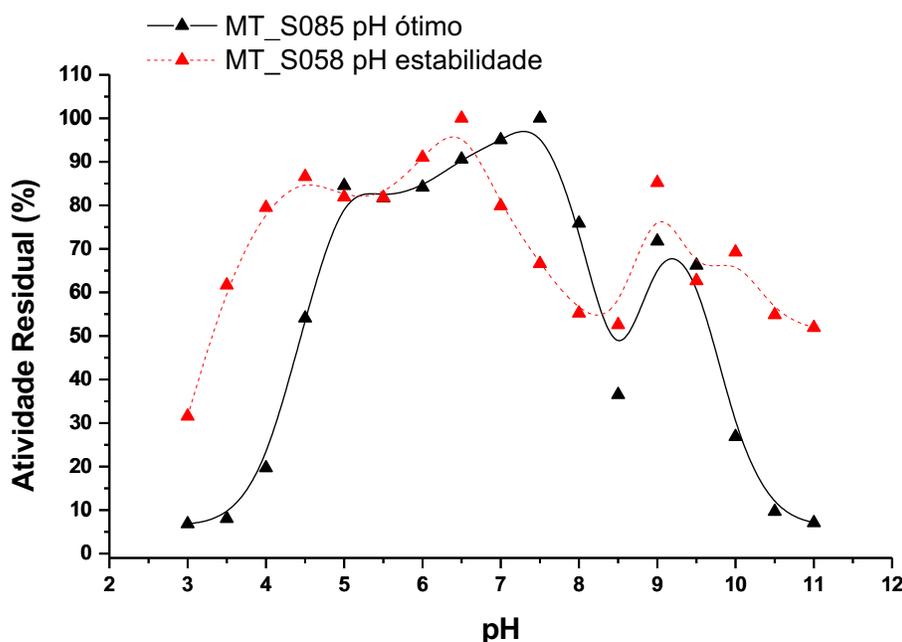
*Orpinomyces* PC-2 apresentou atividade em pH 3 foi em torno de 40% e aumentou continuamente até o pH 5,0, no qual foi observada maior atividade. A partir deste ponto, houve queda discreta da atividade até o pH 7,0, mantendo sua atividade em aproximadamente 80 %. Em valores de pH superiores a 7,0, houve queda brusca e considerável da atividade e esta atingiu valor nulo nos valores de pH entre 8,5 a 11,0 (PASSARINHO, 2014).

A xilanase produzida por *Thermophilus sp.* alcalitolerantes mostrou-se estável em pH 5,5-9,5 (cepa SP) e pH 6,0-7,5 (cepa BC), após 30 minutos a 60 °C (PLAMEN et al., 1997).

As enzimas em geral apresentam atividade máxima em determinado pH. Em valores de pH maiores ou menores que este, sua atividade diminui. 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 (LEHNINGER et al., 2002).

**Figura 32.** Determinação de pH ótimo e efeito da estabilidade de pH na atividade da xilanase produzida por isolado de *Rhizoctonia solani* oriundo de culturas de soja (MT\_S085), cultivada sob fermentação em estado sólido, usando farelo de trigo como fonte de carbono, após 96 horas de cultivo. Os tampões usados foram: MacIlvaine (pH 3.0-8.0) e glicine-NaOH (pH 8.0-11).



Fonte: próprio autor.

O pH pode influenciar diretamente a atividade enzimática por meio de mudanças nas cargas de aminoácidos essenciais, como aqueles situados no sítio ativo da enzima, ou nos sítios de ligação, acarretando maior ou menor afinidade da enzima para com o substrato (LEHNINGER et al., 2002). Mudanças de pH afetarão profundamente o caráter iônico dos aminogrupos e dos grupos carboxílicos da proteína, afetando marcadamente, portanto, o sítio catalítico e a conformação de uma enzima. Além dos efeitos puramente iônicos, valores baixos ou altos de pH podem causar desnaturação considerável e conseqüentemente inativação da proteína enzimática (CONN e STUMPF, 1987).

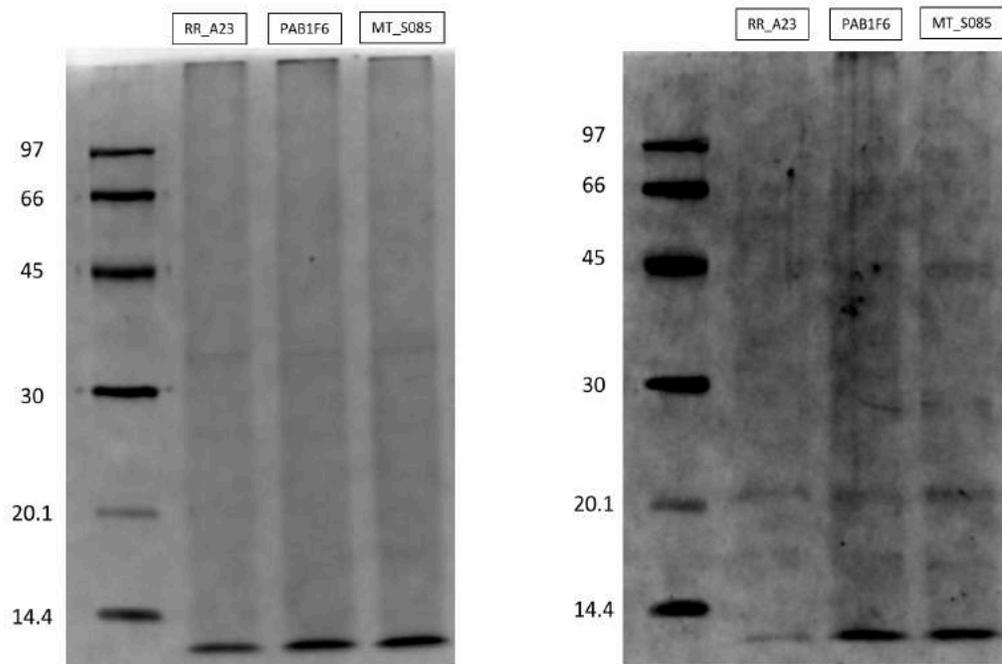
#### 2.4.5. Análise em SDS-PAGE da produção enzimática em diferentes substratos

As linhagens RR\_A23, PA\_B1F6 e MT\_S085 isoladas de culturas de arroz, braquiária e soja, respectivamente, foram cultivadas em fermentação em estado sólido nos substratos de arroz, braquiária, farelo de trigo e soja. O extrato bruto obtido foi utilizado em análise de SDS-PAGE 12% para visualização das enzimas produzidas de acordo com o substrato utilizado, os quais podem ser observados na figura 33.

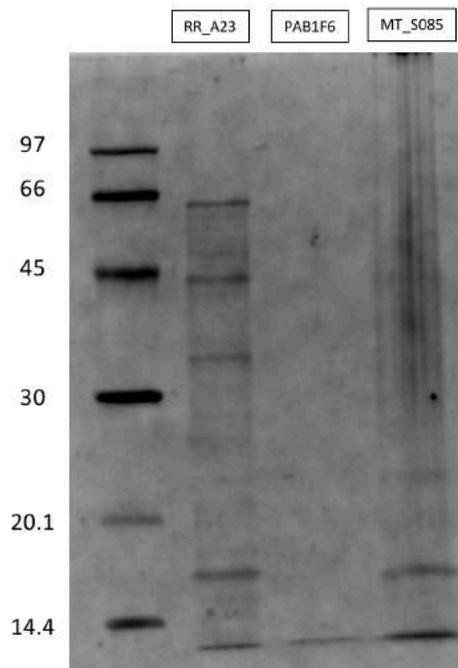
Analisando comparativamente os géis, podemos verificar que as linhagens produzem diferentes enzimas de acordo com o substrato de cultivo, fato este que já era esperado, uma vez que cada substrato possui diferentes constituintes, aos quais são disponibilizados para o fungo como fonte nutricional. O fungo por sua vez, produz enzimas lipases, invertases, lactases, proteinases, amilases, xilanasas, celulases etc., que hidrolisam o substrato tornando-o assimilável.

Dessa forma, o fungo produz a enzima necessária para a quebra da molécula daquele nutriente que lhe foi oferecido. No final do processo, podemos até obter as mesmas enzimas, mas em diferentes concentrações, como foi observado nas análises bioquímicas.

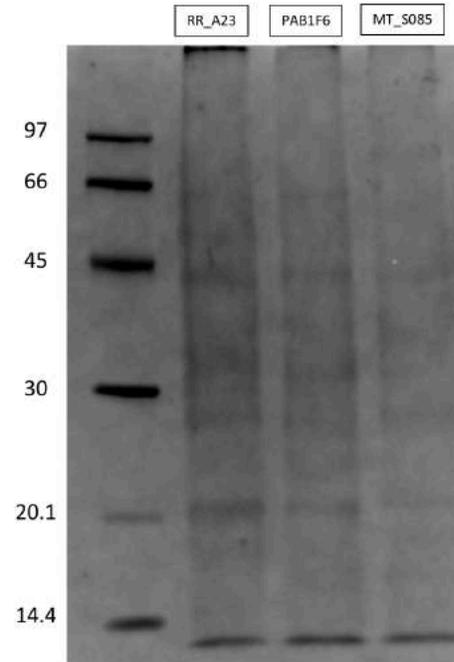
**Figura 33.** Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE dos diferentes substratos obtidos por fermentação em estado sólido  
a) Arroz  
b) Braquiária



c) farelo de trigo



d) Soja



Fonte: Próprio autor

## 2.5. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

Os isolados de *Rhizoctonia solani* do grupo AG-1 IA obtidos de culturas de arroz, braquiária e soja, apresentam potencial na degradação de resíduos agroindustriais e na produção de enzimas degradadoras de parede celular de planta e outras enzimas que hidrolisam parede celular vegetal. Pelo seu baixo custo de produção torna-se economicamente importante para vários processos biotecnológicos em diversos pólos industriais.

Como produtores de enzimas, os isolados de *R. solani* AG-1 IA obtidos de culturas de soja e braquiária mostraram-se mais promissores, quando comparados aos isolados obtidos da cultura de arroz. Foram selecionados 5 isolados de cada tipo de cultura para teste posteriores em diferentes fontes de carbono.

Dentre os substratos utilizados como fontes de carbono, farelo de trigo, braquiária e palha de soja proporcionaram maior produtividade, sendo o farelo de trigo o que mostrou produção bem elevada em relação aos demais substratos.

Os perfis de produção enzimática para os 5 melhores isolados de cada cultura mostraram variações entre os 3 substratos. A braquiária foi o substrato promissor para todos os isolados, porém com farelo de trigo as produções enzimáticas mais elevadas foram obtidas no período de 120h.

A temperatura ótima para a atividade de xilanolítica foi de 55°C, com atividade residual em até 80°C, fato importante para aplicação industrial dessa enzima.

O pH ótimo foi de 6,0, 6,5 e 7,5 para os isolados de arroz, braquiária e soja, respectivamente. As enzimas mantiveram-se estáveis em pH entre 4,0 e 7,5.

As análises em SDS-PAGE demonstraram a produção de diferentes enzimas de acordo com o substrato usado na fermentação.

## 2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus Níger***. 118 f. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)–Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2010.

ALMEIDA, M. N. **Celulasas e hemicelulasas de espécies de *Acremonium* endofíticos**. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

ALVES-PRADO, H. F. et al. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian cerrado. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 161, p. 333-346, Maio 2010.

ANNIS, S. L.; GOODWIN, P. H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology** 103: 1–14, 1997.

ARABI, M. I. E; BAKRI, Y.; JAWHAR, M. Extracellular Xylanase Production by *Fusarium species* in Solid State Fermentation. Polish Journal of Microbiology, 2011, Vol. 60, No 3, 209–212

BALKAN B.; ERTAN F. Production of  $\alpha$ -Amylase from *P. chrysogenum*, **Food Technology and Biotechnology**, v.45, n.4, p. 439–442, 2007.

BAKIR, U.; YAVASCAOGLU, S.; GUVENC, F.; ERSAYIN, A. An endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae* production, partial purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, p. 29:328-334, 2001.

BARATTO, C. M. et al. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência, Joaçaba** v. 11 n. 2, p. 15-28, julho/dezembro 2011.

BARNABÉ, M. C. et al. Produção e composição químico- bromatológica da *Brachiaria brizantha* cv. marandu adubada com dejetos líquidos de suínos, **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 435-446, jul./set. 2007.

BLASI, D. A. et al. Wheat middlings composition, feeding value and storage guidelines. Kansas State University, **Agricultural Experimental Station and Cooperative Extension Service**, Bull. MF-2353, 21 p. 1998.

BUENO, C. J. et al. Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de

maracujazeiro amarelo. **Tropical Plant Pathology** 34 (5) September - October 2009.

CECCON, G. et al. Composição química na palha do milho e no solo em função do cultivo de milho solteiro e consorciado com *Brachiaria ruziziensis*. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 79.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 13.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 11.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 8., 2010, Guarapari. [Anais...] Guarapari: [SBCS], 2010. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/863006/1/329271586.pdf>>. Acesso em: 18 de outubro de 2016.

CONN, E. E.; STUMPF, P. K. **Introdução à bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1987. 447p.

DASILVA, R. et al. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miede. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 36, p. 235-241, 2005.

DeBARY, A. Ueber einige Sclerotinien und Sclerotien- Krankheiten. **Bot Zeit** 44: 376–480, 1886.

DINI, C. M. **Produção, purificação e caracterização da protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* n31 e avaliação de sua aplicação na fabricação de queijo maturado**. 2010. 138 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Jose do Rio Preto, 2010.

ERTAN, F.; BALKANB, B.; YARKINA, Z. Determination of the effects of initial glucose on the production of  $\alpha$ -amylase from *Penicillium* sp. under solid-state and submerged fermentation. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 2014, Vol. 28, No. 1, 96–101, <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2014.901670>.

FERRAREZI, A. L. et al. Seleção e otimização da produção de lipases por fungos termófilos. In: WORKSHOP DE BIOCATALISE E BIOTRANSFORMAÇÃO, 4., 2008, São Carlos. **Anais...** São Carlos: USP, 2010. p. 64.

FIGUEIRO, G. G.; GRACIOLLI, L. A. Influência da composição química do pelo substrato sem cultivo de *Pleurotus florida*. **Ciência e Agrotecnologia**, 2011, vol.35, n.5, pp. 924-930. ISSN 1413-7054.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. **Journal of Biochemistry**. v. 41, p. 583-603, 1954.

GASPAR, A. et al. Study on the Production of a Xylanolytic Complex from *Penicillium canescens* 10-10c. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 6: 45- 58, 1997.

GAWANDE, P. V.; KAMAT, M. Y. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application, **Journal of Applied Microbiology**, Oxford/Inglaterra, v. 87, p. 511-519, 1999.

GOYAL, M.; KALRA, K.L.; SAREEN, V.K.; SONI, G. Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. **Brazilian Journal of Microbiology**, (2008) 39:535-541

GUPTA, R.; BEG, Q.K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59:15-32, 2002.

HAMIN NETO, Y. A. A. **Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e microencapsulação da protease produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum***. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, dec. 1972.

JUNPEI, Z.; WU, Q.; ZHANG, R.; YANG, Y.; TANG, X.; LI, J.; DING, J.; DONG, Y.; HUANG, Z. Production and Characterization of Etanol- and Protease-Tolerant and Xylooligosaccharides-Producing Endoxylanase from *Humicola* sp. Ly01. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 23(6):794-801, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685, 1970.

LAFOND, M.; TAUZIN, A.; DESSEAUX, V.; BONNIN, E.; AJANDOUZ, E.; GIARDINA, T. GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production. **Microbial Cell Factories**, 10:20-28, 2011.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D. A.; MARTINS, E. S.; SILVA, D.; GOMES, E.; DASILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pulluans* on solid state fermentation, **Applied biochemistry and biotechnology**, Clifton, 2007. 136-140, 281-288.

LEITE, R. S. R. et al. Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 43, p. 391–395, 2008.

MAHMOUD, G. A. et al. Characterization of lipase enzyme produced by hydrocarbons utilizing fungus *Aspergillus terreus*. **European Journal of Biological Research**. 2015; 5 (3): 70-77

MARTIN, E.S. et. al. Perfil Enzimático produzido pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação em estado sólido e fracionamento de uma poligalacturonase termoestável. Anais In: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM), 2005, Recife, Pernambuco, 2005.

McILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Biochemistry** 49:183-186, 1921.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-8, 1959.

MOURA, L. F. W. G. et al. Bioprospecção de atividade lipolítica de fungos anemófilos isolados do Centro Vocacional Tecnológico (CVT) de Tauá-CE. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.15, n.2, p.157-165, 2013. ISSN 1517-8595

OKAFOR, U. A. et al. Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro – wastes. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 14, p. 1710-1714, July 2007.

PANAGIOTOU, G.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products** 18:37-45, 2003.

PANDEY, A. Solid state fermentation. Biochemical. **Engineering Journal**, v.13, n.2/3, p.81-84, 2003.

PANAROTTO, C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Avaliação de cascas de limão Taiti como fonte de indutor na produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em estado sólido. Anais In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis. 2003.

PASSARINHO, A. T. P. **Produção e caracterização de xilanases derivadas do gene xyna de *Orpinomyces* PC-2 e avaliação da eficiência para hidrólise de farinha e clarificação de sucos**. 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

PLAMEN, L. D. et al. Isolation and characterization of xylan-degrading alkali-tolerant thermophiles. **FEMS Microbiology Letters**. 157: 27-30, 1997.

PONGSAWASDI, P. E.; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal Fermentation Technology**, v.65, n.4, p. 463-467, 1987.

QUERIDO, A. L. S. **Purificação parcial e caracterização da xilanase produzida por *Penicillium expansum***. 2002. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. 2010. 161 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

SANTANA, R. S. M.; GONÇALVES, Z. S.; FRANCO, M. Produção de amilase a partir da fermentação em estado sólido do farelo de cacau. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n.14, p. 1982, 2012.

SANTOS, E. A. O. et al. Produção de xilanase e celulase pelo patógeno *Rizoctonia solani* AG1-IA em cultura de soja. **Ciência & Tecnologia: Fatec-JB**, Jaboticabal, v. 6, 2014. Número especial.

SALVADOR, S.; SILVEIRA, M. M. da; FONTANA, R. C. Avaliação de diferentes concentrações de glicose sobre a produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em meio sólido. **Laboratório de Processos Biotecnológico/INBI/UCS**, 2004.

SARATH G., DE LA MOTTE, R.S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYNON, R.J.; BOND J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. New York: Oxford University, 1996.

SILVA, T. M. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. 2009. 216 f. Tese (Doutorado em Ciências)-Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SILVA, M.A. **Produção de protease e biossurfactante por *Bacillus licheniformis***. 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais)-Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2011.

SINGH, S.; BANERJEE, U. C.; Purification and characterization of trans-3-(4-methoxyphenyl) glycidic acid methyl ester hydrolyzing lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1063-1068, 2007.

SOUZA NETO, G. P. et al. Pré-tratamentos químicos auxiliados por radiação de micro-ondas sobre *Brachiaria brizantha* como matéria-prima para produção de etanol combustível. In: I CONGRESSO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO DO CÂMPUS RIO VERDE DO IFGOIANO, 1., 2012, [Anais...] Rio Verde: Instituto Federal Goiano, 2012.

TELLES, A. C. et al. Disponibilização enzimática de constituintes de materiais lignocelulósicos. In: SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA, 3., 2013. Anais... Londrina: UEL, 2013. v. 2, n. 3, p. 75-78.

TOMBINI, J. **Produção de lipase fúngica a partir de subprodutos do processamento de soja.** 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)-Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2015.

TRENTINI, M. M. S. **Purificação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em sistemas aquosos bifásicos e precipitação por solventes orgânicos.** 2014. 122 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)-Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.

WISIEWSKI, A. C. **Produção de  $\alpha$ -amilase e glucoamilase por *Macrocybe titans* cultivado em resíduos sólidos agroindustriais.** 2009. 126 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)-Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2009.

ZANCHETTA, A. **Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido e submersa utilizando biomassa lignocelulósica.** 2012. 121 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2012.

# CAPITULO 3

---

**3. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO, ANÁLISE DE NUCLEOTÍDEOS E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE XILANASE DE ISOLADOS *Rhizoctonia solani* AG-1 IA OBTIDOS DE CULTURA DE ARROZ, SOJA E BRAQUIÁRIA**

### 3.1. INTRODUÇÃO

O Basideomiceto contaminante de solo, o fungo *Rhizoctonia solani* é um complexo com mais de 100 espécies que atacam espécies de culturas, pastagens e horticultura conhecida. *Rhizoctonia solani* está dividido em 14 grupos de anastomose (AG-1 até AG-13 e GABI). No grupo *Rhizoctonia solani* AG-1 está presente os três principais grupos intraespecíficas (ISG), o subgrupo AG-1 IA é um dos mais importantes patógenos de plantas, o que provoca doenças como a ferrugem da bainha, folha faixas, mela e manchas marrom em muitas plantas, incluindo mais do que 27 famílias de monocotiledôneas e dicotiledôneas (ZHENG et al., 2013).

Bactérias e fungos produtores de xilanases secretam grandes quantidades destas enzimas sob uma variedade de condições. Fungos filamentosos têm sido utilizados por mais de 60 anos na produção de enzimas industriais. Eles são amplamente utilizados como produtores de xilanase e são geralmente considerados como produtores mais potentes do que bactérias e leveduras, secretando quantidades muito mais elevadas no meio de cultivo (BERGQUIST et al., 2002; FANG et al., 2008; PEDERON et al., 2007; POLIZELI et al., 2005).

Estudos recentes, com micro-organismos fitopatogênicos demonstraram que as enzimas degradadoras de parede celular de plantas (EDPCP) são essenciais na patogenicidade desses organismos. A busca por enzimas com características próprias, capazes de degradar a parede celular vegetal tem sido uma constante, uma vez que são requeridas nos processos biotecnológicos de produção de biocombustíveis, bem como em vários setores da indústria de alimentos (ALVES- PRADO et al, 2011)

A multiplicidade do sistema xilanolítico em diversos micro-organismos foi descrita nas décadas de setenta e oitenta (WONG et al., 1988). A produção de um sistema de enzimas, sendo cada enzima com funções especializadas, considerando que essa possa ser uma estratégia microbiana para alcançar a hidrólise efetiva da xilana (WONG et al., 1988)

Apesar de alguns micro-organismos possuírem genes distintos para xilanases, como no caso do *Trichoderma reesei* que apresentou pelo menos 4 genes (HEROLD et al., 2013), muitas vezes, um único gene de xilanase codifica mais de uma xilanase (JUTURU; WU, 2011). Essa multiplicidade de xilanases em micro-organismos pode ser causada por uma redundância na expressão gênica, pelo processamento diferencial do RNA mensageiro (splicing alternativo), ou ainda por modificações pós-traducionais da proteína, como glicosilação diferencial, proteólise

e/ou autoagregação (BADHAN et al., 2007).

Considerando que o custo das enzimas é um dos fatores que determinam a economia de um processo biocatalítico, esse pode ser reduzido ao se encontrar condições ideais para sua produção, pelo isolamento de cepas hiperprodutoras através de triagem e seleção de mutantes induzidos e pela construção de produtores eficientes utilizando técnicas de engenharia genética (ANDRADE, 2014).

Para atender os fins comerciais, genes que codificam diversas xilanases foram clonados em hospedeiros homólogos e heterólogos. Xilanases recombinantes demonstraram propriedades equivalentes ou melhores do que as enzimas nativas (ANDRADE, 2014).

### 3.2. OBJETIVOS DO CAPÍTULO

- a) Produção de xilanase e CMCase em fermentação em estado sólido e em fermentação submersa como método de comparação
- b) Analisar comparativamente sequências de genes para xilanase em *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.
- c) Extrair DNA e RNA para amplificação do gene da xilanase
- d) Produzir a enzima xilanase para os processos de purificação.
- e) Purificar a xilanase de interesse por método cromatográfico e análise eletroforética.

### **3.3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### ***3.3.1. Micro-organismo***

Foram utilizados 15 isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA selecionado de diferentes hospedeiros, procedentes de diferentes regiões do país como Mato Grosso, Tocantins, Roraima, Rondônia, Pará, Maranhão. Foi realizada uma seleção e escolheu-se 5 isolados da cultura de arroz (RR\_A43, RR\_A41, RR\_A23, RR\_A20 e RR\_A33), 4 da cultura de braquiária (PA\_B1F6, ROB3D4, ROB1A3 e ROB4D7) e 4 da cultura de soja (MA\_159, MA-217, MT\_S085 e TO\_064). Todos os isolados estão depositados na coleção de fungos fitopatogênicos do Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos da UNESP Campus de Ilha Solteira, sob responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Ceresini.

Os escleródios (estrutura de reprodução) de todos os isolados são mantidos em sílica gel a -21°C até sua utilização. Para crescimento dos micro-organismo foi utilizado o meio BDA (Batata Dextrose Agar). Os pontos de coleta foram georreferenciados (ANEXO 1).

#### ***3.3.2. Enzimas***

Para estudo da produção enzimática por foi, inicialmente, selecionado 2 isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundos da cultura de arroz (RR\_A41 e RR\_A43), cultura de braquiária (PA\_B1F6) e ROB4D7) e cultura de soja (MA\_217 e MT\_S085). As enzimas analisadas foram algumas das que se caracterizam como degradadoras de parede celular de plantas: celulasas (CMCase) e hemicelulasas (xilanase).

#### ***3.3.3. Produção da enzima***

##### ***3.3.3.1. Fermentação em Estado Sólido***

Para a produção das enzimas extracelulares, degradadoras de parede celular de plantas utilizou-se a fermentação em estado sólido (FES). Como substrato foi adotado o farelo de trigo e farelo de trigo com xilana, para indução da produção de xilanase, o qual foi obtido do mercado local. Os frascos contendo substrato foram esterilizados antes de serem inoculados. A fermentação foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com 5g de substrato e inoculados com 5 discos do crescimento em placa de Petri com meio de cultivo BDA (Batata Dextrose

Agar) de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, umedecidos com 5 mL de solução salina ( $1,4 \text{ gL}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $2 \text{ gL}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $0,2 \text{ gL}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ ,  $0,3 \text{ gL}^{-1}$   $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ), a fim de se manter uma umidade relativa de 50% e incubados a  $25^\circ\text{C}$  por 96h. Ao final de cada fermentação, a solução enzimática bruta foi extraída pela adição de 40 mL de água estéril em cada frasco, os quais permaneceram sob agitação de 100 ciclos por minuto, em temperatura ambiente por 1 hora. Decorridos esse tempo o material foi filtrado à vácuo e centrifugado a  $10.000 \text{ xg}$  por 15 min obtendo uma solução livre de células, a qual foi utilizada para as análises enzimáticas.

### 3.3.3.2. Fermentação Estado Submerso

O meio de cultura composto de substrato (xilana birchwood ou farelo de trigo)  $10\text{g/L}$ , peptona  $20,0 \text{ g/L}$ , extrato de levedura a  $20,0\text{gL}^{-1}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $20,0\text{gL}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0,2\text{gL}^{-1}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $1,5\text{gL}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$  a  $0,3\text{gL}^{-1}$  e  $10,0 \text{ ml}$  de solução de sais  $\text{L}^{-1}$  ( $\text{MgSO}_4$   $0.0016\text{gL}^{-1}$ ,  $\text{ZnSO}_4$   $0.0014\text{gL}^{-1}$ ,  $0,002 \text{ g}$  de  $\text{CaCl}_2\text{L}^{-1}$  e  $0,005\text{g}$  de  $\text{FeSO}_4\text{L}^{-1}$ ). As fermentações submersas foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de  $125 \text{ mL}$  contendo  $30 \text{ ml}$  de meio de cultivo. O meio de cultivo foi inoculado com 3 discos do crescimento de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em placa de Petri com BDA (Batata Dextrose Agar). Os inóculos em Erlenmeyer foram incubados num agitador rotativo a  $25^\circ\text{C}$  e  $150$  ciclos por minuto, durante 96 horas. Após a fermentação, o volume de todos os frascos foi centrifugado a  $15.000\text{g}$ , a  $4^\circ\text{C}$  durante 15 min. O líquido sobrenadante, livre de células, foi utilizado para determinar atividades enzimáticas.

### 3.3.4. Determinação da Atividade Enzimática

#### 3.3.4.1. Determinação de atividade celulase e hemicelulase

As atividades de endoglucanase (CMCase), endoxilanase foram detectadas pela formação de açúcares redutores a partir dos substratos carboximetilcelulose e xilana birchwood, respectivamente, pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS (MILLER, 1959). A mistura de reação contendo  $25 \mu\text{L}$  da enzima bruta e  $225 \mu\text{L}$  de uma solução contendo 1,0% de substrato em tampão acetato  $100 \text{ mM}$  a pH 5,5 foi incubada a  $55^\circ\text{C}$  em banho maria por 10 min. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a  $540 \text{ nm}$ , e a quantidade de enzima produzida foi determinada utilizando-se como padrão a glicose ( $0 - 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e a xilose ( $0 - 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) para a determinação de unidades enzimáticas de celulases e xilanase, respectivamente.

Uma unidade de atividade enzimática é definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto. A atividade específica foi expressa por unidade de atividade total por mg de proteína total ( $\text{U mg}^{-1}$  proteína). A atividade enzimática foi calculada pela equação linear obtida da curva padrão ( $y = ax+b$ ) x tempo de reação x volume da enzima x fator de diluição (quando houver). Quantidade de proteínas totais foi determinada pelo método de Hartree-Lowry (HARTREE, 1972). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

### ***3.3.5. Análises da sequências de nucleotídeos da enzima de estudo.***

O programa Seaview foi utilizado para a análise da sequência de nucleotídeos e alinhamento de sequência e a base de dados do NCBI foi utilizado para comparação com regiões conservadas de cada proteína.

### ***3.3.6. Análises da sequência de nucleotídeos para proteína degradadoras de parede celular de planta***

#### ***3.3.6.1. Extração do DNA genômico de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.***

O micélio foi produzido por incubação o fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em 30 mL de BDA (Batata Dextrose Agar) por quatro dias sob fermentação submersa. O Wizard® Genomic DNA Purification Kit foi usado para a extração do DNA fúngico seguindo as instruções para isolamento do DNA genômico a partir de tecido animal e vegetal.

#### ***3.3.6.2. Extração do RNA genômico de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.***

O micélio foi produzido por incubação o fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em 30 mL de BDA (Batata Dextrose Agar) por quatro dias sob fermentação submersa. O Aurum™ Total RNA Mini Kit, (BIO-RAD) foi usado para a extração do RNA fúngico seguindo as instruções para isolamento do RNA genômico a partir de tecido animal e vegetal.

#### ***3.3.6.3. cDNA***

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA usando iScript™ Reverse Transcription Supermix para RT-qPCR (BIO-RAD). O procedimento foi realizado usando iScript RT

supermix 4 µl, RNA template (1 µg–1 pg total RNA) 1 µl e Nuclease-free water 15 µl num total de 20 µl.

#### 3.3.6.4. *Quantificação de DNA, RNA e cDNA*

O DNA, RNA e cDNA foi quantificado usando equipamento de NANODROP (ND-1000 V3.8.1).

#### 3.3.6.5. *Gel de Agarose*

As amostras de DNA e cDNA foram submetidas a técnica de PCR e visualizadas em eletroforese com gel de agarose 1%. O tampão TAE 50X foi preparado de acordo com SAMBROOK, RUSSEL (2001) e diluído para 1X, o qual também foi usado para a diluição da agarose. As amostras foram diluídas em tampão de carregamento 5X.

#### 3.3.6.6. *Amplificação do gene de xilanase*

Três pares de primers foram sintetizados baseado na sequência do gene para endo-1,4-beta-xilanase para *Rhizoctonia solani* AG-1 IA da base de dados do NCBI. Os primers sintetizados para *Rhizoctonia solani* foram AG-1 IA:

a) ELU42220.1

Forward = 5'ATGAGCAAGCCTAACGAGGTT3'

Reverse = 3'TCACGACCTGCAGATATTGGT5',

b) ELU41328.1

Forward = 5'CTTGACTGGTTCCGG3'

Reverse = 3'CGTTGACGACATCCC5'

c) ELU41329.1

Forward = 5'ATGATGGCACCTACCGTA3'

Reverse = 3'TTAAGCAAGAGCCTGGG 5'

d) WANG

Forward = 5'GTAAAACGACGGCCAGT3'

Reverse = 3'GGATAACAATTTACACAGGA5'.

A sigla usada para denominar os primers a, b e c, é o código de armazenamento da sequência no GenBank. O primer d, foi desenhado com base em WANG et al., 2010.

Todos os pares de primers foram desenhados pelo programa OligoEvaluator<sup>TM</sup> - Sequence Analysis e sintetizado por Sigma<sup>TM</sup>. A reação PCR ocorreu de acordo com o descrito na tabela 18 para o primer ELU42220.1, tabela 19 para o primer ELU41328.1, tabela 20 para o primer ELU41329.1 e tabela 21 para o primer WANG. O DNA genômico e cDNA foram usados na concentração de 100 ng ml<sup>-1</sup>. A mistura de reação usada para amplificação do gene de xilanase esta descrito na tabela 22.

**Tabela 18.** Protocolo de reação de PCR usado para amplificação do gene de xilanase para ELU42220.1.

| <b>Reações</b>              | ELU42220.1  |
|-----------------------------|-------------|
| <b>Desnaturação Inicial</b> | 95°C/2,3min |
| <b>Ciclos</b>               | 25 ciclos   |
|                             | 95°C/30 sec |
|                             | Tm 58°C     |
|                             | /20 sec     |
|                             | 72°C/50 sec |
| <b>Extensão Final</b>       | 72°C/5 min  |

**Tabela 19.** Protocolo de reação de PCR usado para amplificação do gene de xilanase para ELU41328.1.

| <b>Reações</b>              | ELU41328.1  |             |             |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Desnaturação Inicial</b> | 95°C/2,3min | 95°C/2,3min | 95°C/2,3min |
| <b>Ciclos</b>               | 25 ciclos   | 25 ciclos   | 25 ciclos   |
|                             | 95°C/30 sec | 95°C/30 sec | 95°C/30 sec |
|                             | Tm 56°C     | Tm 59°C     | Tm 63°C     |
|                             | /20 sec     | /20 sec     | /20 sec     |
|                             | 72°C/40 sec | 72°C/40 sec | 72°C/40 sec |
| <b>Extensão Final</b>       | 72°C/5 min  | 72°C/5 min  | 72°C/5 min  |

**Tabela 20.** Protocolo de reação de PCR usado para amplificação do gene de xilanase para ELU41329.1.

| <b>Reações</b>              | <b>ELU41329.1</b> |             |             |             |
|-----------------------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Desnaturação Inicial</b> | 95°C/2,3min       | 95°C/2,3min | 95°C/2,3min | 95°C/2min   |
| <b>Ciclos</b>               | 25 ciclos         | 25 ciclos   | 25 ciclos   | 25 ciclos   |
|                             | 95°C/30 sec       | 95°C/30 sec | 95°C/30 sec | 95°C/30 sec |
|                             | Tm 52°C           | Tm 56°C     | Tm 59°C     | Tm 63°C     |
|                             | /20 sec           | /20 sec     | /20 sec     | /20 sec     |
|                             | 72°C/50 sec       | 72°C/50 sec | 72°C/50 sec | 72°C/50 sec |
| <b>Extensão Final</b>       | 72°C/5 min        | 72°C/5 min  | 72°C/5 min  | 72°C/5 min  |

**Tabela 21.** Protocolo de reação de PCR usado para amplificação do gene de xilanase para WANG.

| <b>Reações</b>              | <b>WANG</b> |             |
|-----------------------------|-------------|-------------|
| <b>Desnaturação Inicial</b> | 95°C/2 min  | 95°C/2min   |
| <b>Ciclos</b>               | 25 ciclos   | 25 ciclos   |
|                             | 95°C/30 sec | 95°C/30 sec |
|                             | Tm 54°C     | Tm 58°C     |
|                             | /30 sec     | /30 sec     |
|                             | 72°C/15 sec | 72°C/15 sec |
| <b>Extensão Final</b>       | 72°C/5 min  | 72°C/5 min  |

**Tabela 22.** Mix de reação usado para amplificação do gene de xilanase.

| <b>Reação</b>                  | <b>Volume</b>    |
|--------------------------------|------------------|
| <b>H<sub>2</sub>O</b>          | 6 (µL)           |
| <b>GOTaq green</b>             | 10 (µL)          |
| <b>DNA/cDNA genômico</b>       | 1,0 (µL)         |
| <b>Primer <i>F</i> (10 µM)</b> | 1,5 (µL)         |
| <b>Primer <i>R</i> (10 µM)</b> | 1,5 (µL)         |
| <b>Volume final</b>            | <b>20,0 (µL)</b> |

### **3.3.7. Purificação da xilanase**

#### **3.3.7.1. Cromatografia de Filtração em Gel**

O extrato bruto usado foi produzido pelo isolado PA\_B1F6 obtido de cultura de braquiária e cultivada sob fermentação em estado sólido com 5g de farelo de trigo e 0,5g de xilana birchwood como substrato, com o intuito de obter maior produção de xilanase. O extrato bruto foi concentrado 20x usando ultrafiltração por sistema Amicon com membrana de corte 3kDa (PM3). Aliquotas de 1ml do concentrado foi aplicada em coluna Sephacryl S-200 HR 16/60 (5.000 – 250.000 Da) previamente equilibrada com soluções de NaOH (0,2M) e após com tampão de fosfato 20mM pH5,5 pelo sistema AKTA. A taxa de fluxo foi de 0,6 ml min<sup>-1</sup>. As frações coletadas foram submetidas a ensaios enzimáticos de xilanase (conforme descrito na seção 3.3.4.1.). As frações contendo atividade de xilanase foram agrupadas e concentradas novamente com *Centrifugal Devices* membrana de corte 3kDa para aplicação em gel de poliacrilamida.

#### **3.3.7.2. Eletroforese e coloração**

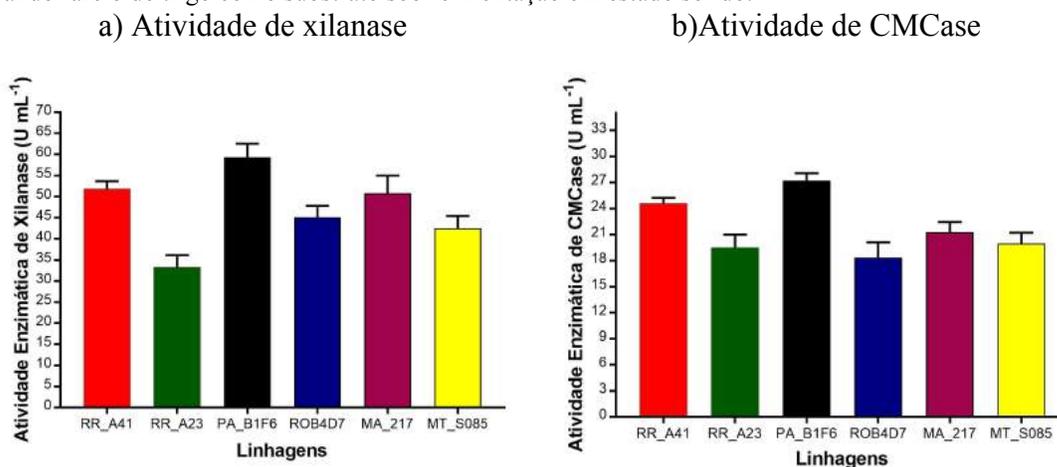
As amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida 15% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) como descrito por Laemmli (1970) a 180W de corrente constante utilizando um sistema Mini-Protean III Cell (BioRad Laboratories; Hercules, CA, EUA). Os géis foram corados com prata de acordo com Meril (1970) e azul Coomassie de acordo JUDITH, et al., (2000). O marcador de peso molecular utilizado foi Precision Plus Protein™ Dual Color Standards.

### 3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1. Fermentação em estado sólido com farelo de trigo e farelo de trigo com xilana

As figuras 34 mostra os valores de atividade enzimática de Xilanase e CMCase, dos isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundos de culturas de arroz (RR\_A41 e RR\_A23), braquiária (PA\_B1F6 e ROB4D7) e soja (MA\_217 e MT\_S085) sob fermentação em estado sólido com farelo de trigo como substrato incubada por 96h a 25 °C. A partir das análises apresentadas na figura 34, foi selecionado um isolado obtido de cada cultura, os quais apresentaram maior atividade xilanólítica, para os testes fermentativos utilizando farelo de trigo e xilana como substrato. Os isolados selecionadas foram RR\_A41, PA\_B1F6 e MA\_217. Na figura 35 encontram-se os dados para atividade xilanólítica e na figura 36 encontram-se os dados para a atividade de CMCase usando farelo de trigo com xilana como substrato.

**Figura 34.** Atividade de Xilanase ( $\text{U mL}^{-1}$ ) e de CMCase ( $\text{U mL}^{-1}$ ) de isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundos de cultura de arroz (RR\_A41 e RR\_A23), braquiária (PA\_B1F6 e ROB4D7) e soja (MA\_217 e MT\_S085) usando farelo de trigo como substrato sob fermentação em estado sólido.

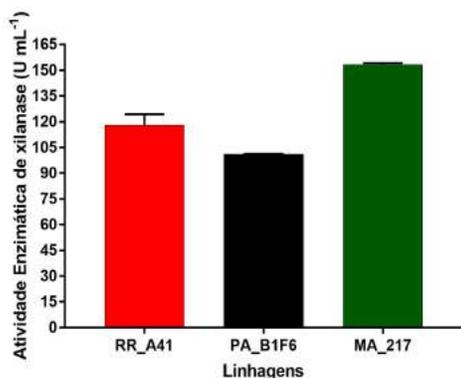


Fonte: Próprio autor.

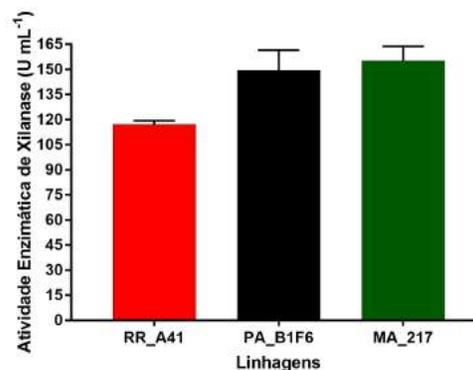
A maior atividade de xilanase foi obtida pelo isolado de soja MA\_217 com  $153,61 \text{ U mL}^{-1}$  para crescimento em farelo de trigo com  $0,25\text{g}$  de xilana. Para a atividade de CMCase a maior atividade foi apresentada pelo mesmo isolado com  $24,63 \text{ U mL}^{-1}$  quando cultivado com farelo de trigo.

**Figura 35.** Atividade de Xilanase ( $\text{U mL}^{-1}$ ) de isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundos de cultura de arroz (RR\_A41), braquiária (PA\_B1F6) e soja (MA\_217) usando farelo de trigo com xilana como substrato sob fermentação em estado sólido.

a) Farelo de trigo +0,25g de xilana



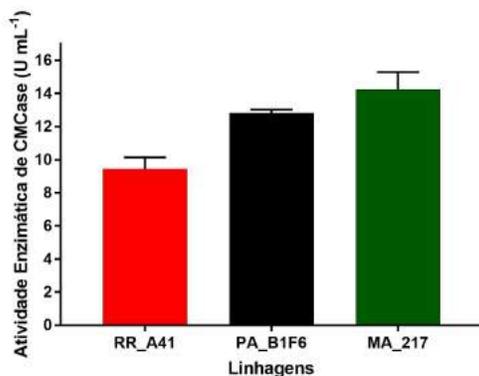
b) Farelo de trigo +0,5g de xilana



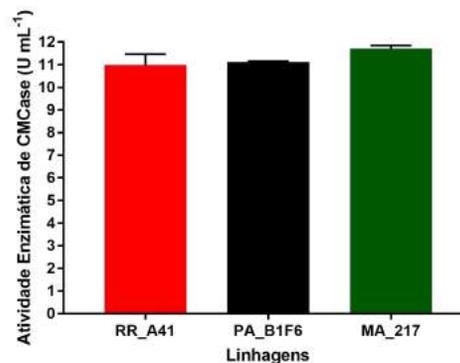
Fonte: Próprio autor.

**Figura 36.** Atividade de CMCase ( $\text{U mL}^{-1}$ ) de isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA oriundos de cultura de arroz (RR\_A41), braquiária (PA\_B1F6) e soja (MA\_217) usando farelo de trigo com xilana como substrato sob fermentação em estado sólido.

a) Farelo de trigo +0,25g de xilana



b) Farelo de trigo +0,5g de xilana



Fonte: Próprio autor.

Como podemos observar, quando adicionado xilana ao farelo de trigo e utilizado como substrato, obteve-se uma maior produção de xilanase, porém a produção de CMCase foi bem inferior comparada ao cultivo utilizando somente com farelo de trigo como substrato.

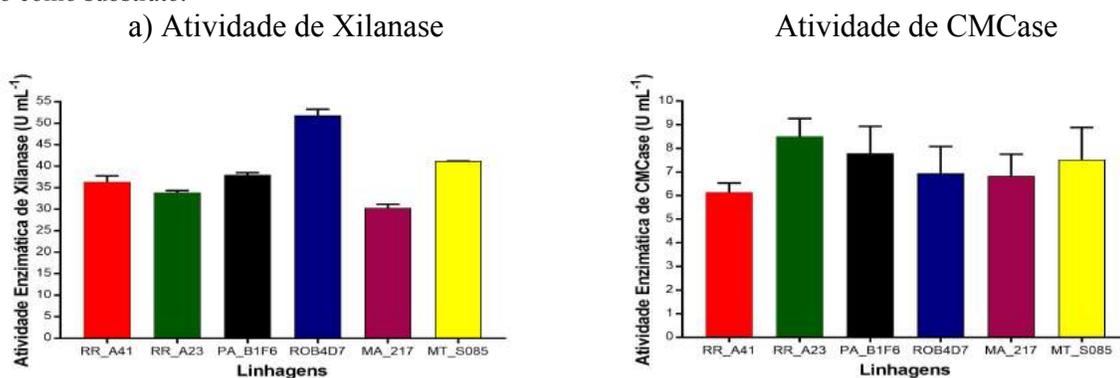
### 3.4.2. Fermentação em estado submerso

Para fermentação em estado submerso, foram utilizados isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA obtidos de culturas de arroz (RR\_A41 e RR\_A23), braquiária (PA\_B1F6 e ROB4D7) e soja (MA\_217 e MT\_S085) com farelo de trigo e xilana como substrato, mantidos a 25 °C por 96h para a produção da enzima.

#### 3.4.2.1. Farelo de trigo como substrato

A produção da xilanase por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em fermentação em estado submerso com farelo de trigo como substrato foi maior para o isolado ROB4D7 com 52,51 UmL<sup>-1</sup>, em média e para CMCase a produção foi maior para o isolado RR\_A23 com 8,84 UmL<sup>-1</sup> (Figura 37).

**Figura 37.** Atividade de xilanase (U mL<sup>-1</sup>) e CMCase (U mL<sup>-1</sup>) dos isolados de cultura de arroz (RR\_A41 e RR\_A23), braquiária (PA\_B1F6 e ROB4D7) e soja (MA\_217 e MT\_S085) sob fermentação líquida com farelo de trigo como substrato.



Fonte: Próprio autor.

#### 3.4.2.1. Xilana como substrato

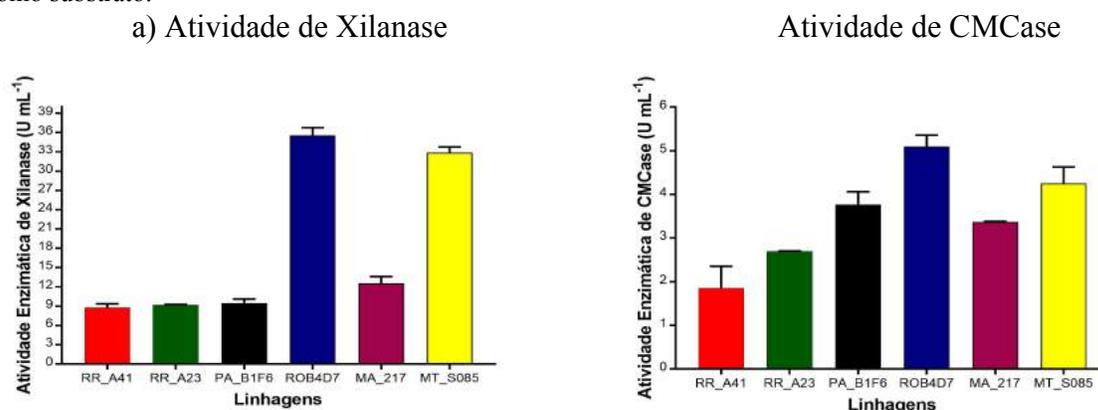
A produção da xilanase por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em fermentação em estado submerso com xilana como substrato foi maior para o isolado ROB4D7 com 34,13 UmL<sup>-1</sup> e para CMCase a produção foi maior para o isolado RR\_A23 com 5,10 UmL<sup>-1</sup> (Figura 38).

Almeida (2013) estudando a produção de xilanase e CMCase por *Aspergillus niger* em diferentes substratos (bagaço de cana, bagaço de cevada, casca de maracujá, farelo de arroz, farelo de trigo, farelo de soja, palha de milho, palha de trigo, resíduo fibroso de mandioca e torta de girassol) sob fermentação submersa, observou produção de xilanase em todos os cultivos,

independente do substrato que estava sendo utilizado, porém os melhores resultados foram obtidos nos cultivos com farelo de trigo e palha de milho com uma produção de 43,97 e 46,56  $\text{UmL}^{-1}$  respectivamente, sendo que os menores resultados foram apresentados nos cultivos contendo torta de girassol (2,58  $\text{UmL}^{-1}$ ), que também não contribuíram para produção alguma de celulase.

Os melhores resultados para celulase foram observados nos cultivos que continham como substrato palha de trigo (0,87  $\text{UmL}^{-1}$ ), seguido dos cultivos com cevada (0,71  $\text{UmL}^{-1}$ ), farelo de trigo (0,69  $\text{UmL}^{-1}$ ) e farelo de soja (0,62  $\text{UmL}^{-1}$ ), já para os demais cultivos os valores de atividade celulásica variaram entre 0,12 e 0,39  $\text{UmL}^{-1}$  (ALMEIDA, 2013)

**Figura 38.** Atividade de xilanase ( $\text{U mL}^{-1}$ ) e CMCCase ( $\text{U mL}^{-1}$ ) dos isolados de cultura de arroz (RR\_A41 e RR\_A23), braquiária (PA\_B1F6 e ROB4D7) e soja (MA\_217 e MT\_S085) sob fermentação líquida com xilana como substrato.



Fonte: Próprio autor.

O mesmo autor estudando *A. fumigatus* obteve como melhor fonte de carbono indutora da produção de xilanase a palha de milho (11,95  $\text{UmL}^{-1}$ ), sendo a pior fonte o resíduo farelo de soja (0,07  $\text{UmL}^{-1}$ ). Para celulase, maiores valores foram observados nos cultivos com casca de maracujá (0,46  $\text{UmL}^{-1}$ ), seguido do resíduo fibroso de mandioca (0,42  $\text{UmL}^{-1}$ ) e palha de milho (0,38  $\text{UmL}^{-1}$ ), sendo os menores resultados obtidos com farelo de soja e trigo, ambos com atividade de 0,07  $\text{UmL}^{-1}$  (ALMEIDA, 2013).

He, et al., 2014 ao analisarem a produção de xilanase e CMCCase para *Trichoderma reesei* obteve uma produção de xilanase de sob fermentação em estado submerso utilizando

melaço de cana e meio básico convencional de lactose, obteve 36,7 U $mg^{-1}$  e 17,2 U $mg^{-1}$  para xilanase enquanto que para CMCase 3,948 U $mg^{-1}$  e 1,270 U $mg^{-1}$ .

Neste trabalho, podemos observar que os melhores resultados foram obtidos sob fermentação submersa quando se utilizou farelo de trigo como substrato. Tanto para atividade de xilanase quanto para a CMCase, obteve-se valores superiores aos observado por Almeida (2013).

### ***3.4.3. Análise das sequências de nucleotídeos das proteínas degradadoras de parede celular vegetal***

#### ***3.4.3.1. Análise da sequência de nucleotídeos da enzima estudada***

Foi encontrado na base de dados do NCBI, 35 sequências de proteína descritas para a endo-1,4- $\beta$ -xilanase para o fungo *Rhizoctonia solani*, porém, mesmo com o genoma já sequenciado e depositado na base dados, não foi encontrada sequência descrita para xilanase de *Rhizoctonia solani* do grupo AG-1 IA. Todas as sequências encontradas de xilanase para *Rhizoctonia solani* foram usadas para análise de *protein BLAST* para o fungo do grupo AG-1 IA.

Encontrou-se 4 possíveis sequências proteicas pertencente a família das hidrolases, para *Rhizoctonia solani* do grupo AG-1 IA que apresentaram maior similaridade com as sequências de xilanase descritas para mesma espécie, mas de grupo diferente.

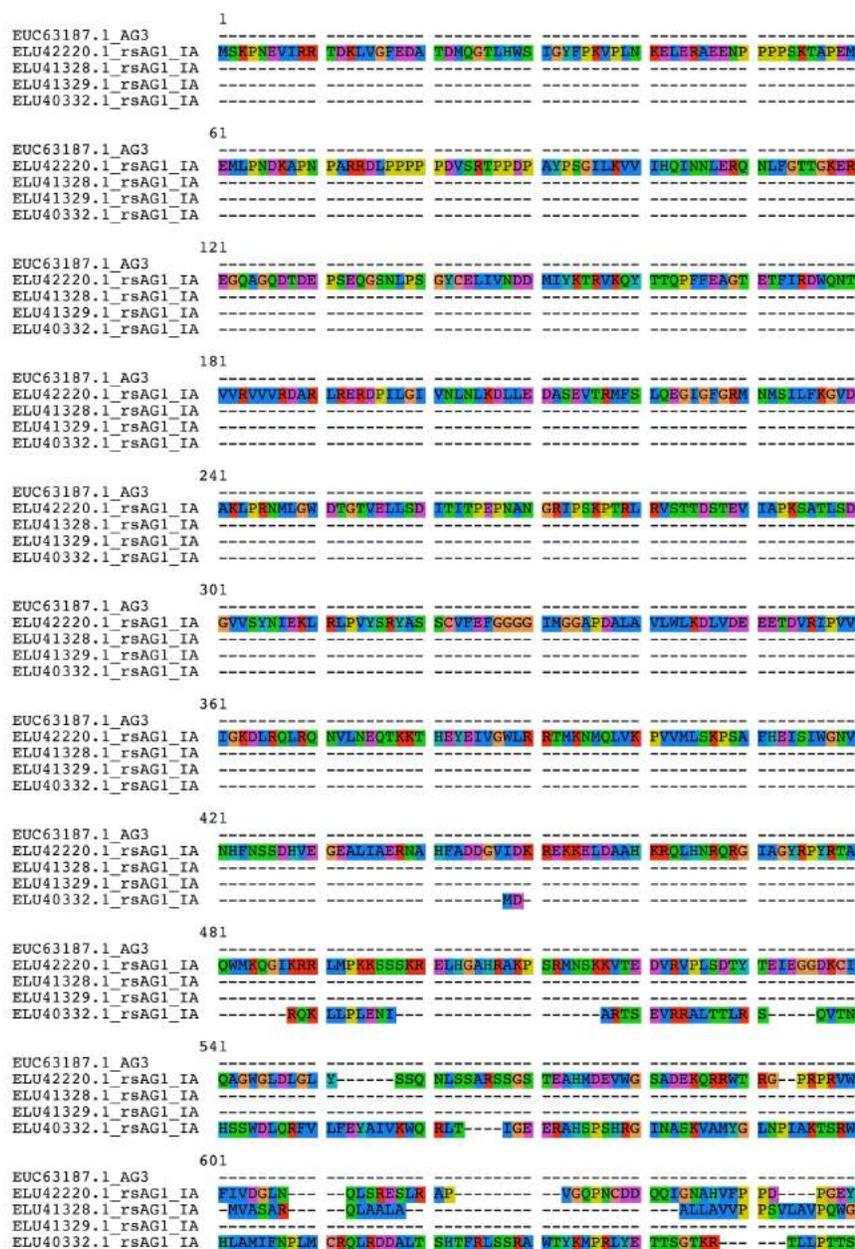
O alinhamento das sequências de aminoácidos pode ser observado na figura 39.

Na figura 40 observa-se o resultado da análise do *protein BLAST* para a sequência de *Rhizoctonia solani* AG-3 Rhs1AP, a qual apresentou maior similaridade com as sequências obtidas para *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

A ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) possibilita a busca em bancos de dados de sequências de nucleotídeos ou de proteínas similares à sequência de interesse consultada (“query”) (ALTSCHUL et al., 1990). O BLAST é uma família de programas, a qual inclui, entre outros: o blastn (“nucleotide-nucleotide blast”) - que busca e compara sequências de nucleotídeos depositadas no banco de dados de nucleotídeos com a sequência de nucleotídeo consultada; o blastp (“protein-protein blast”) - que busca e compara sequências de proteínas depositadas em banco de dados de proteínas com a sequência da proteína consultada e o blastx

(“nucleotide 6-frame translation-protein”) - que faz a busca em um banco de dados de seqüências de proteínas usando a seqüência de nucleotídeo consultada traduzida nas seis possíveis fases (FERRAZ, 2011).

**Figura 39.** Alinhamento da seqüência de proteína do *Rhizoctonia solani* AG-3 Rhs1AP (EUC63187.1) com as quatro seqüências da espécie do fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA que apresentaram maiores similaridades (ELU42220.1; ELU41328.1; ELU41329.1 e ELU40332.1)



```

661
EUC63187.1_AG3 ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU42220.1_rsAG1_IA LIDSQGWPI S PTLCLYLLT --LDNPFPPH PNMHF----- --SAATILA LLAAAPAAFG
ELU41328.1_rsAG1_IA QCGGIWGSVS GGTTCDSFVY CTRINDYYQ CLTGSQSPTT APTTGTGPTT TAAPPPASTG
ELU41329.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU40332.1_rsAG1_IA CLOGKGV--T GGTTCDAGSY COAQDKTGV PGTA----- --SGTITSG AATPTSTALR

721
EUC63187.1_AG3 QLDARIKAG KKYFGTCADS ALLSNSON-- --AARISDFG OLTPENSAKW DAIEPSRGNF
ELU42220.1_rsAG1_IA QLDARMKARG KKYFGTCADS ALLDENSEN-- --AARISDFG OLTPENSATP AENN---GKI
ELU41328.1_rsAG1_IA GLDGLIKAG KKYFGTCADS ALLNNAQN-- --AATKAEFG OLTPENSAKW DSIEPSQGNF
ELU41329.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU40332.1_rsAG1_IA GLHALAKSKG -RYFGTATDQ LWNINDAAYL SLTGNPSEFG MNTPGNQLKW DATERSRGSF

781
EUC63187.1_AG3 NFGGFDTLVN FAQSNGLVLR GHTFVWHSOL PSWVNSIGDS GTLTSVIONH IT-----
ELU42220.1_rsAG1_IA VRGHTCKPSC FPTHGDTNNO YHLVWVHSOL PSWVNSIGDS ATLTSVIENH IT-----
ELU41328.1_rsAG1_IA NWGGFDTLVN WAVQNGKIVR GHTFVWHSOL PSWVNSINNO NTLTTVIONH VS-----
ELU41329.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU40332.1_rsAG1_IA IYTYADYEV S WAKNHSQAIR GHTLGGFNI----- --KILAQ PTPIVGLQRG IQCCDPDLDY

841
EUC63187.1_AG3 -TIGNRYFKG IYAWDVVNEI FNEDGSLRSS VFSRVLGENF VAIAFKAARA ADPSAKLYIN
ELU42220.1_rsAG1_IA -TIAKRYFKG IYAWDVVNEI FNEDGTLRSS VFSRVLGENF VAISFKAARA ADPSAKLYIN
ELU41328.1_rsAG1_IA -TIGKRYAGK IYAWDVVNEI ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU41329.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU40332.1_rsAG1_IA AEPYLECYGT VGNRDVVNEM FNDDGTRRSS VFYNTIGFSF VAVALRAARA TDAKAKLYLN

901
EUC63187.1_AG3 DYNLDYV--- NSKLNGLVSL VQRORSAGTP IDGIGSQSHL SA--GGAG-G VQAALALAN
ELU42220.1_rsAG1_IA DYNLDSV--- NSKVRGLIDL VQRORAAGTP IDGIGSQTHL QA--GGAG-G VQAALSELAG
ELU41328.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU41329.1_rsAG1_IA DYNLDNLGWA APKVNAINI VKSETAAGTP IDGIGTOIHL SA--GOSS-T TLETTLKLAT
ELU40332.1_rsAG1_IA EYNTDWW--- GAKSNAMYNI AKDLVGQVVP IDGIGFHPEA HLVVNSFERS FGTNYQRPAD

961
EUC63187.1_AG3 SGVSEVAITE LDIA----- --NASGND YATAVKACLN VPKCVGITVW GVSDDKDSWA
ELU42220.1_rsAG1_IA SGIPEVAITE LDIA----- --GASGND YATVVRACL S VPKCVGITVW GVSDDKDSWS
ELU41328.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU41329.1_rsAG1_IA AGV-DVAITE LDIA----- --GASAND YATVTKACLA VPKCVGITVW GVSDDKDSWS
ELU40332.1_rsAG1_IA R-KLDVAITE LDIRMTLPAT SALLTAQAE N YKYVMNSCLA VSRCVGITVW DTSDDVSPNR

1021
EUC63187.1_AG3 SSSPILFDGN YQRKAAYNS ---VISALS ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU42220.1_rsAG1_IA SSSPILFDRN YOKKPAYNA ---VIAVKS GLTLAVDITC TRAEVDAAPM VGYONKFSAF
ELU41328.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU41329.1_rsAG1_IA SSSPILFDGN YQRKAAYNA ---VAQALA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU40332.1_rsAG1_IA SLAKL---GR LERLMRWVES IINGSLVBSLV QVTLYFST-N TRNPSRHITQ SLMRWLLRPF

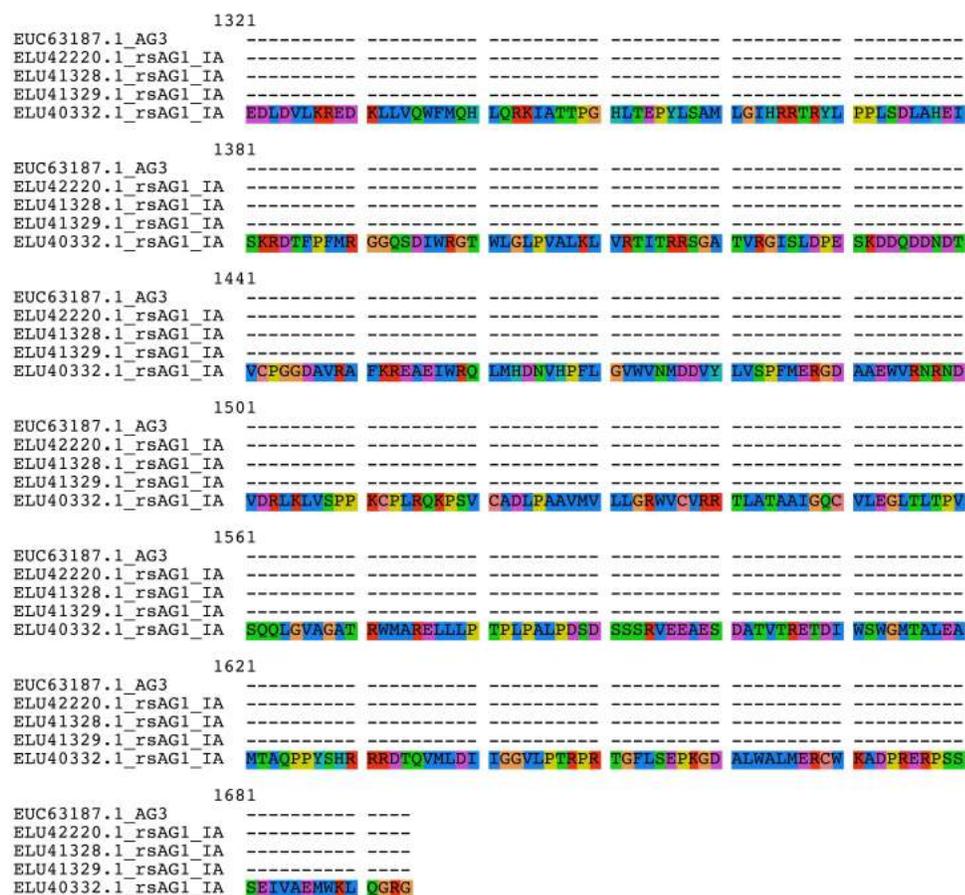
1081
EUC63187.1_AG3 ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU42220.1_rsAG1_IA GPKNAKQDIE LSGELFDMS E PRL----- Y APPAPTITIC RS-----
ELU41328.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU41329.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU40332.1_rsAG1_IA RHPSE----- --SFIPAV PRCRRGRMHV AMGHPTIVVC HRPALPPGCG TSGSMPIFGC

1141
EUC63187.1_AG3 ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU42220.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU41328.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU41329.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU40332.1_rsAG1_IA FALSALCGPT NAQLDISHAH VSGAFKAPKK ARTPDEEFFV WFGWPAGLPE EVHQHOLEHI

1201
EUC63187.1_AG3 ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU42220.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU41328.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU41329.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU40332.1_rsAG1_IA RSCAVELYDV TLREBLGGAVD NRSEIGVSD SIKLHVYFFL CNGSKTINGE IMLGLIASA

1261
EUC63187.1_AG3 ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU42220.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU41328.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU41329.1_rsAG1_IA ----- --MHF----- --STATILA VLAATPAVLG
ELU40332.1_rsAG1_IA GSPRTGPREV TEQHTHYGF GRDFQVRWLC VIVQEDVYER ARALDLAAL E VLGICTKTP

```



**Figura 40.** Resultado da análise *Protein BLAST* da sequência de *Rhizoctonia solani* AG-3 Rhs1AP comparada com *Rhizoctonia solani* AG-1 IA mostrando os melhores alinhamentos.

| Description   | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession                  |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| glycosyl hydrolase family 10 protein [Rhizoctonia solani AG-1 IA]                   | 451       | 451         | 100%        | 4e-152  | 74%   | <a href="#">ELU42220.1</a> |
| glycosyl hydrolase family 10 domain-containing protein [Rhizoctonia solani AG-1 IA] | 223       | 223         | 40%         | 3e-73   | 80%   | <a href="#">ELU41328.1</a> |
| glycosyl hydrolase family 10 domain-containing protein [Rhizoctonia solani AG-1 IA] | 216       | 216         | 49%         | 4e-71   | 68%   | <a href="#">ELU41329.1</a> |
| glycosyl hydrolase family 10 domain-containing protein [Rhizoctonia solani AG-1 IA] | 143       | 143         | 87%         | 1e-38   | 37%   | <a href="#">ELU40332.1</a> |
| DNA repair helicase RAD3 [Rhizoctonia solani AG-1 IA]                               | 30.4      | 30.4        | 11%         | 0.60    | 32%   | <a href="#">ELU45534.1</a> |

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

A confiabilidade da análise por Blastx é determinada pelo valor esperado ou “E- value” (“Expect value”) que é uma pontuação conferida à cada sequência do banco de dados apontada como similar à sequência “query”. Quanto menor for ou mais próximo estiver o E-value de zero

(0.0), mais significativo será a relação de similaridade da sequência consultada com a sequência do banco de dados. E ao contrário, quanto maior for o E-value, menos relevante será o resultado de similaridade obtido (ALTSCHUL et al., 1990).

E-value  $< 10e-100$  indicam que as sequências comparadas são idênticas, com alinhamentos longos entre elas.  $10e-50 < \text{E-value} < 10e-100$  significam que as sequências comparadas são quase idênticas, com um longo trecho da proteína consultada alinhada com a proteína do banco indicada.  $10e-10 < \text{E-value} < 10e-50$  relacionam sequências parecidas, podendo ter domínios ou outras características compartilhadas.  $1 < \text{E-value} < 10e-6$  podem indicar sequências homólogas, mas de baixa significância. E-value  $> 1$  indicam proteínas diferentes, que aparentemente não estão relacionadas (FERRAZ, 2011).

A sequência glycosyl hydrolase family 10 protein [*Rhizoctonia solani* AG-1 IA] apresenta um *Query cover* de 100% o que significa que a sobreposição das sequências total indicando maior confiabilidade.

Pelo E-value verificamos que as sequências são homólogas, porém de baixa significância. Isso demonstra que ainda não se encontra depositado no banco de dados do NCBI uma sequência para a xilanase produzida pelo fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, tornando este estudo de grande importância.

Nas figuras 41, 42, 43, e 44 podemos observar o alinhamento individual de cada sequência de aminoácido encontrado para *Rhizoctonia solani* AG-1 IA com a sequência de xilanase de *Rhizoctonia solani* AG-3 Rhs1AP.

Posteriormente foi realizado o alinhamento para a sequência de nucleotídeos codificada por cada uma das sequências de aminoácidos analisadas anteriormente e podemos verificar um padrão diferente de alinhamento, quando comparado ao das sequências de aminoácidos. Isso significa que um mesmo aminoácido está sendo codificado por diferentes nucleotídeos. O alinhamento das sequências de nucleotídeos pode ser observado na figura 45.

Após a análise no banco de dados, foi realizada a extração do DNA genômico para a amplificação dos genes.

As sequências ELU42220.1; ELU41328.1; ELU41329.1 foram utilizadas na confecção de primers para análise de PCR.

**Figura 41.** Alinhamento da endo-1,4-beta-xilanase, parcial de *Rhizoctonia solani* AG-3 Rhs1AP com a proteína glicosil hidrolase familia 10 (ELU42220.1) de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

Range 1: 664 to 977 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score          | Expect   | Method                       | Identities   | Positives    | Gaps        |
|----------------|--|------------------------------|--------------|--------------|-------------|
| 451 bits(1161) | 4e-152   | Compositional matrix adjust. | 247/335(74%) | 273/335(81%) | 39/335(11%) |
| Query 1        | MHFSTATILAVLAATPAVLGQLDAKIKAKGKKYFGTCADSALLSNSQNAAIIRSDFGQLT |                              |              |              | 60          |
| Sbjct 664      | MHFS ATILA+LAA PA GQLDAK+KA+GKKYFGTC+DSALL NS+NAAIIRSDFGQLT  |                              |              |              | 723         |
| Query 61       | PENSAKWD AIEPSRGNFNF GGFDTLVNFAQSNGKLVRGHT-----FV            |                              |              |              | 102         |
| Sbjct 724      | PENSA FA++NGK+VRGHT V  |                              |              |              | 762         |
| Query 103      | WHSQLPSWVNSIGDSGTLTSVIQNHITTIGNRYKGIYAWDVVNEIFNEDGSLRSSVFSR  |                              |              |              | 162         |
| Sbjct 763      | WHSQLPSWV++IGDS TLTSVI+NHITTI RYKGIYAWDVVNEIFNEDG+LRSSVFSR   |                              |              |              | 822         |
| Query 163      | VLGENFVAIAFKAARAADPSAKLYINDYNLDVNSKLNGLVSLVQRQRSAGTPIDGIGSQ  |                              |              |              | 222         |
| Sbjct 823      | VLGENFVAI+FKAARAADPSAKLYINDYNLD VNSK+ GL+ LV+RQR+AGTPIDGIGSQ |                              |              |              | 882         |
| Query 223      | SHLSAGGAGGVQAALTALANSVSEVAITELDIANASGNDYATAVKACLNVKPCVGITVW  |                              |              |              | 282         |
| Sbjct 883      | +HL AGGAGGVQAAL+ LA SG+ EVAITELDIA ASGNDYAT VKACL+VPKCVGITVW |                              |              |              | 942         |
| Query 283      | GVSDKDSWRASSNPLLLFDGNYQRKAAYNSVISALS 317                     |                              |              |              |             |
| Sbjct 943      | GVSDKDSWR+SS+PLLFD NYQ+K AYN+VI+ S                           |                              |              |              | 977         |

**Figura 42.** Alinhamento da endo-1,4-beta-xilanase, parcial de *Rhizoctonia solani* AG-3 Rhs1AP com a proteína glicosil hidrolase familia 10 contendo dominio (ELU41328.1) de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

Range 1: 89 to 216 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score         | Expect  | Method                       | Identities   | Positives    | Gaps      |
|---------------|---|------------------------------|--------------|--------------|-----------|
| 223 bits(569) | 3e-73   | Compositional matrix adjust. | 102/128(80%) | 118/128(92%) | 0/128(0%) |
| Query 20      | GQLDAKIKAKGKKYFGTCADSALLSNSQNAAIIRSDFGQLTPENSAKWD AIEPSRGNFNF |                              |              |              | 79        |
| Sbjct 89      | G LD IKAKGKKYFGTCADSALL+N+QNAAI I+++FGQLTPENSAKWD+IEPS+GNFN+  |                              |              |              | 148       |
| Query 80      | GGFDTLVNFAQSNGKLVRGHTFVWHSQLPSWVNSIGDSGTLTSVIQNHITTIGNRYKGI   |                              |              |              | 139       |
| Sbjct 149     | GGFDTLVN+A NGK+VRGHTFVWHSQLPSWV++I + TLT+VIQNH++TIG RY GKI    |                              |              |              | 208       |
| Query 140     | YAWDVVNE 147  |                              |              |              |           |
| Sbjct 209     | YAWDVVNE 216  |                              |              |              |           |

**Figura 43.** Alinhamento da endo-1,4-beta-xilanase, parcial de *Rhizoctonia solani* AG-3 Rhs1AP com a proteína glicosil hidrolase familia 10 contendo dominio (ELU41329.1) de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

Range 1: 14 to 172 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score         | Expect   | Method                       | Identities   | Positives    | Gaps      |
|---------------|--|------------------------------|--------------|--------------|-----------|
| 216 bits(551) | 4e-71  | Compositional matrix adjust. | 109/161(68%) | 132/161(81%) | 5/161(3%) |
| Query 160     | FSRVLGENFVAIAFKAARAADPSAKLYINDYNLD---YVNSKLNGLVSLVQRQRSAGTPI |                              |              |              | 216       |
| Sbjct 14      | +R+L +FV+IAFKAARAADP+AKLYINDYNLD + K+N +++LV+ + +AGTPI       |                              |              |              | 72        |
| Query 217     | DGIGSQSHLSAGGAGGVQAALTALANSVSEVAITELDIANASGNDYATAVKACLNVKPC  |                              |              |              | 276       |
| Sbjct 73      | DGIG+Q+HLSAG + LT LA +GV +VAITELDIA AS NDYAT KACL VPKC       |                              |              |              | 131       |
| Query 277     | VGITVWGVSDKDSWRASSNPLLLFDGNYQRKAAYNSVISALS 317               |                              |              |              |           |
| Sbjct 132     | VGITVWGVSDKDSWR+SS+PLLFDGNYQ+KAAYN+V AL+                     |                              |              |              | 172       |

**Figura 44.** Alinhamento da endo-1,4-beta-xylanase, parcial de *Rhizoctonia solani* AG-3 Rhs1AP com a proteína glicosil hidrolase familia 10 contendo dominio (ELU40332.1) de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

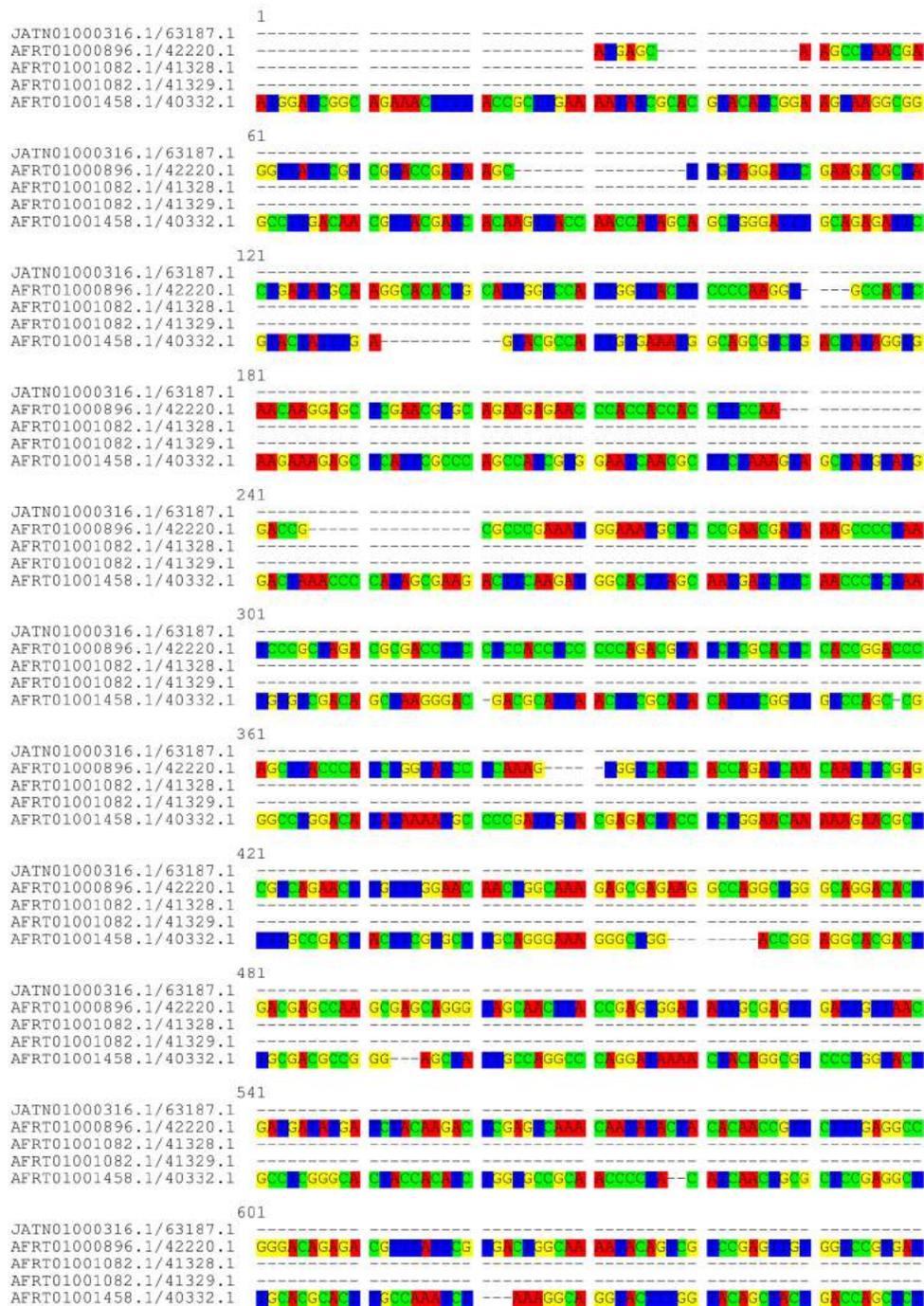
Range 1: 181 to 476 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

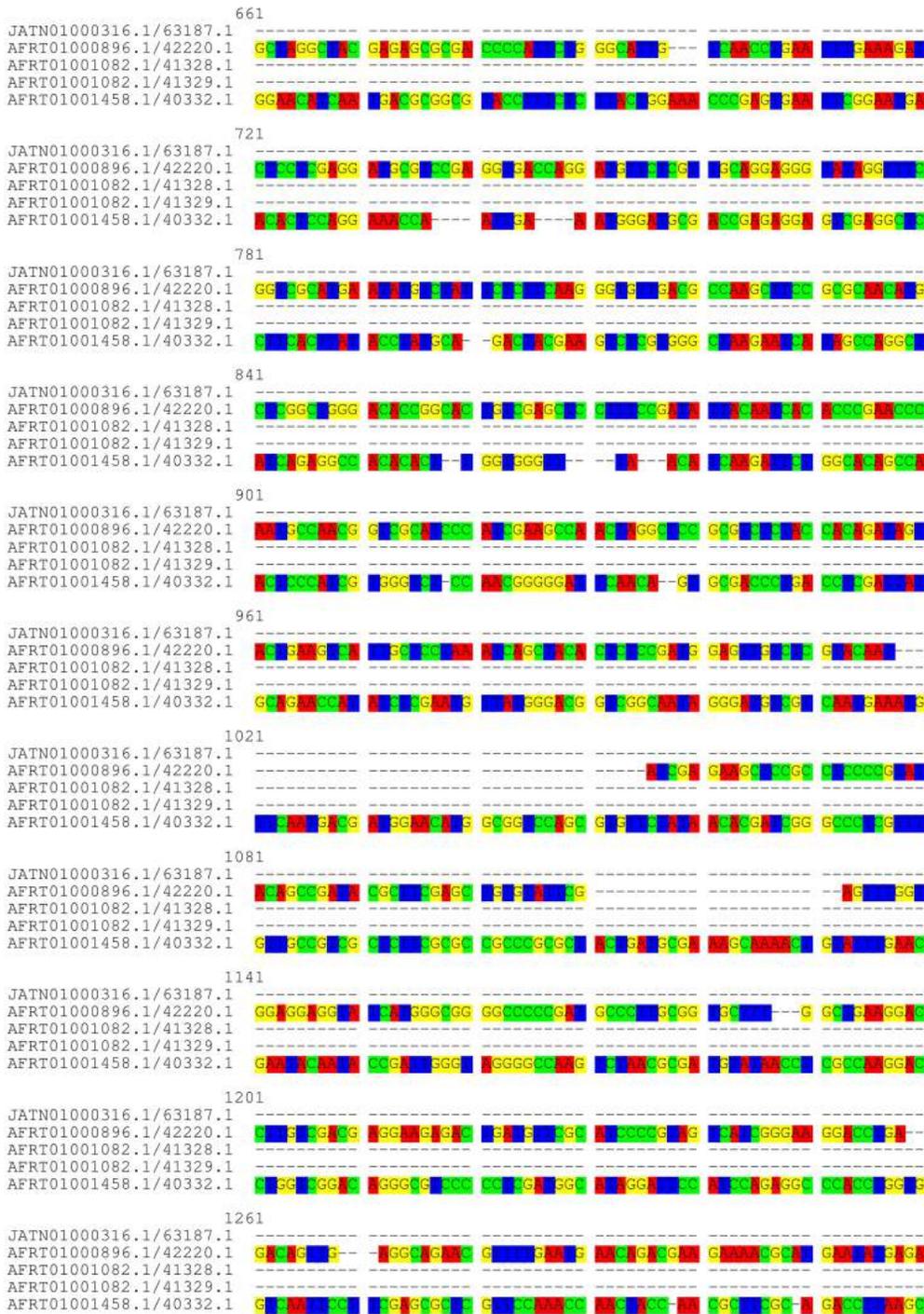
| Score         | Expect  | Method                   | Identities   | Positives    | Gaps        |
|---------------|---|--------------------------|--------------|--------------|-------------|
| 143 bits(361) | 1e-38   | Composition-based stats. | 117/314(37%) | 159/314(50%) | 55/314(17%) |
| Query 13      | AATPA--VLGQLDAKIKAKGKKYFGTCADSALLSNSQNAAIIR-----SDFGQLTPENSA  |                          |              |              | 65          |
| Sbjct 181     | AATPTSTALRGLHALAKSKGR-YFGTATDQ--LWNINDAAYLSLTGNPSEFGMNTPGNQL  |                          |              |              | 237         |
| Query 66      | KWDAIEPSRGNFNFGGFDTLVNFAQSNGLKVRGHTFVWHSQLPWSVNSIGDSGTLTTSVIQ |                          |              |              | 125         |
| Sbjct 238     | KWDATERSRGSFTYTYADYEVSWAKNHSQAIRGHT-----LGGFNIKILAQPTPIVGLQ   |                          |              |              | 291         |
| Query 126     | NHIT-----TIGNRYKGIYAWDVVNEIFNEDGSLRSSVFSRVLGENF               |                          |              |              | 168         |
| Sbjct 292     | RGIQQCDPDLDYAEPYLECYGTVGNR-----DVVNEMFNDDGTWRSSVFYNTIGPSF     |                          |              |              | 343         |
| Query 169     | VAIAFKAARAADPSAKLYINDYNLDYVNSKLNGLVSLVQRQRSAGTPIDGIG--SQSHLS  |                          |              |              | 226         |
| Sbjct 344     | VAVALRAARATDAKAKLYLNEYNTDWWGAKSNAMYNLAKDLVGQGVPLDGIGFHPHAHLV  |                          |              |              | 403         |
| Query 227     | AGG-AGGVQAALTALANSVSEVAITELDIA-----NAGNDYATAVKACLNVPK         |                          |              |              | 275         |
| Sbjct 404     | VNSFERSFQTNYQRFADLKL-DVAITELDIRMTLPATSALLTAQAENYKYVMNSCLAUSR  |                          |              |              | 462         |
| Query 276     | CVGITVWGVSDKDS  | 289                      |              |              |             |
| Sbjct 463     | CVGVTTWDTSDDVS  | 476                      |              |              |             |

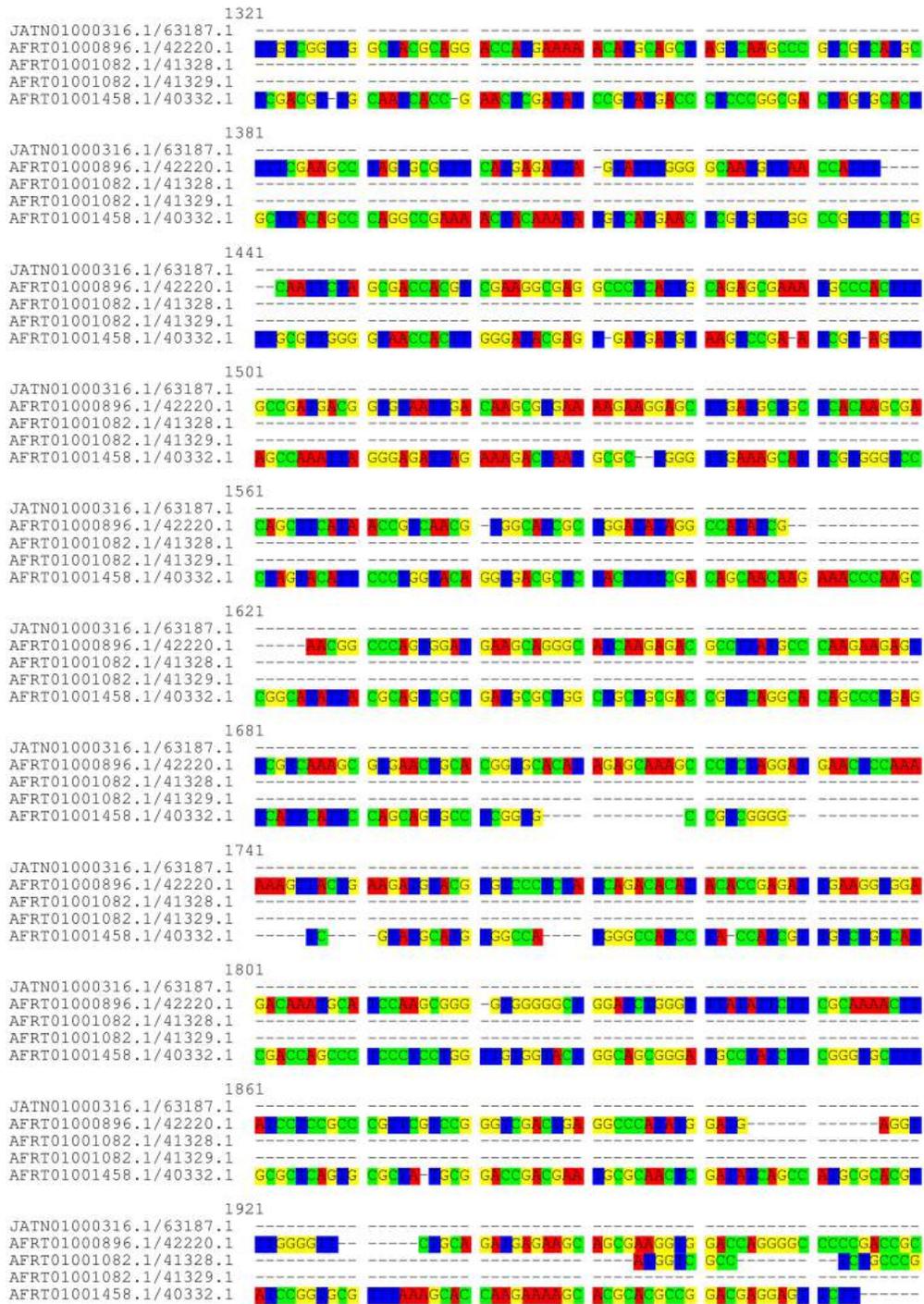
### 3.4.3.2. Extração de DNA genômico de *R. solani*

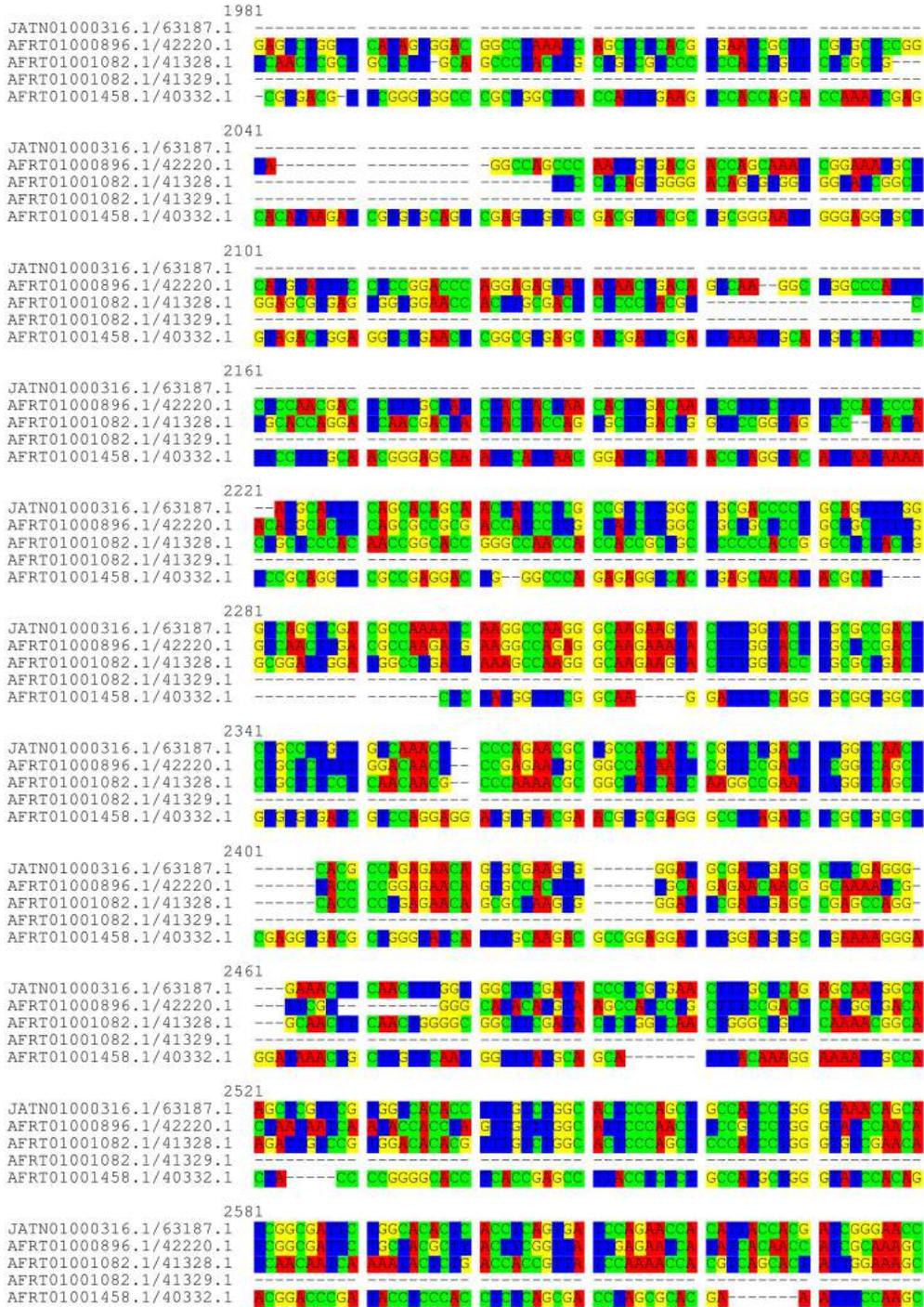
A extração do DNA genômico de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA foi realizado para dois isolados obtidos de cada cultura. As linhagens ([1]RR\_A41 e [2]RR\_A23 para os isolados de arroz, as linhagens ([3]PA\_B1F6 e [4]ROB4D7 para os isolados de braquiária e [5]MA\_217 e [6]MT\_S085 para os isolados de soja. A extração foi realizada com o kit Wizard® Genomic DNA Purification, seguindo os procedimentos para isolamento de DNA genômico a partir de tecidos de plantas. O resultado da extração de DNA pode ser observado na figura 46. A concentração obtida de DNA foi obtida através de nanadrop apresentando 298,3 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  RR\_A41, 211,5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  RR\_A23; 420,9 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  PA\_B1F6; 472,0 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  ROB4D7; 446,7 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  MA\_217 e 442,3 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  MT\_S085. Posteriormente, as amostras de DNA foram utilizadas para análise de PCR com os primers ELU42220.1f e ELU42220.1r, porém nestas condições, o gene da enzima não pode ser amplificado, como mostrado na figura 47.

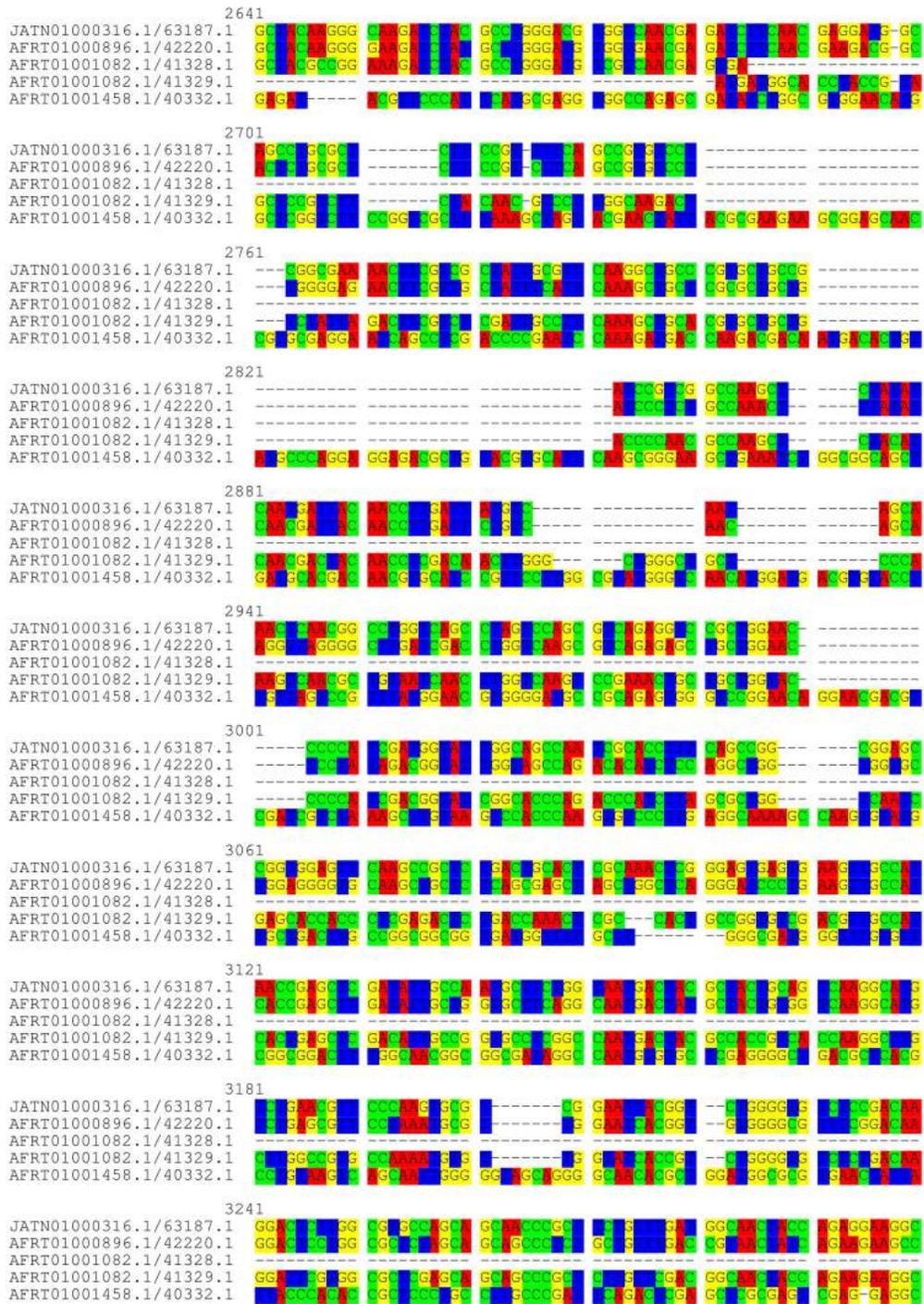
**Figura 45.** Alinhamento das seqüências de nucleotídeos para seqüência de *Rhizoctonia solani* AG-3 Rhs1AP com as seqüências de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA que apresentaram maiores similaridades na análise da seqüência de aminoácidos.

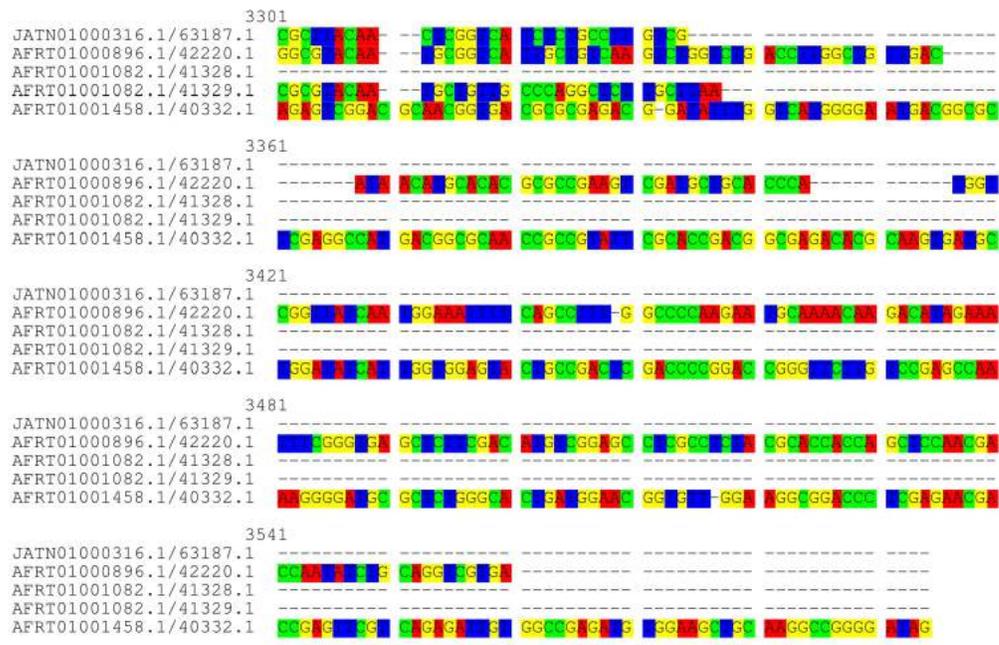




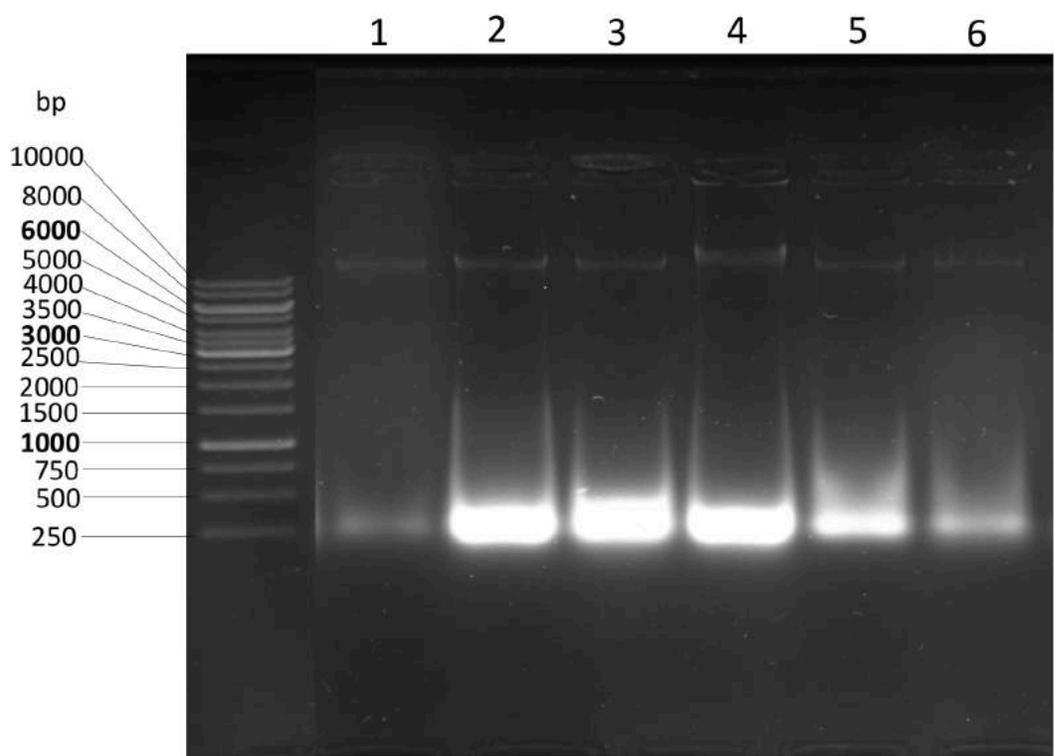








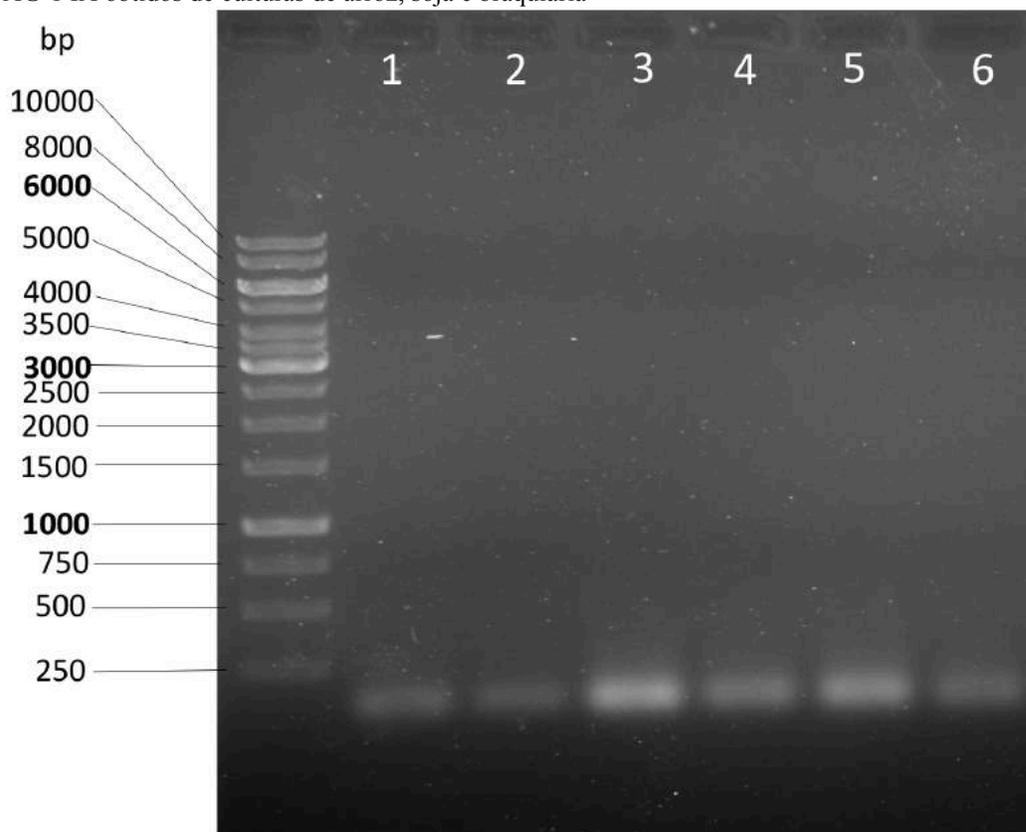
**Figura 46.** Eletroforese de DNA em gel de agarose 1% para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA obtidos de culturas de arroz, soja e braquiária



**Fonte.** Próprio autor: 1. RR\_A41; 2. RR\_A23; 3. PA\_B1F6; 4. ROB4D7; 5. MA\_217 e 6. MT\_S085

Em muitos Eucariontes superiores, a maioria dos genes possuem íntrons que são maiores do que os éxons e maiores do que os encontrados em eucariontes simples, como os fungos filamentosos e as leveduras. Os íntrons possuem códons de terminações, e eles não recebe interferência com o funcionamento dos éxons. Os fungos possuem códons de aproximadamente 300 aminoácidos, que não são interrompidos pelos íntrons, em outras palavras, são únicos. Em eucariontes existem muitos íntrons, desta forma é muito difícil saber quantos genes estão presentes baseado somente na quantidade de DNA, uma vez que a maior parte do DNA não está codificado. Contudo, o numero de ORFs (open reading frames), sequências de nucleotídeos responsáveis por codificar cadeia de polipeptídios podem mostrar uma melhor estimativa, mas mesmo assim eles podem ser separados pelos íntrons. Torna-se mais fácil calcular o número de genes pelo mRNA ou proteínas formadas (AZEVEDO, 2008).

**Figura 47.** Eletroforese de PCR em gel de agarose 1% para as amostras de DNA extraídas de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA obtidos de culturas de arroz, soja e braquiária



**Fonte.** Próprio autor: 1. RR\_A41; 2. RR\_A23; 3. PA\_B1F6; 4. ROB4D7; 5. MA\_217 e 6. MT\_S085

É comum nos eucariotos que o quadro aberto de leitura ou ORF (a região do gene que vai desde o primeiro ATG a ser traduzido até o códon de terminação) seja interrompido por um ou mais trechos de DNA que não serão posteriormente traduzidos, pois serão retirados do conjunto, no nível do RNA, no processo de maturação do RNA mensageiro. Este mecanismo de retirada de segmentos de DNA não codificantes, chamados íntrons, é conhecido como *splicing* (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PERNAMBUCO, 2011)

Um procarioto não será capaz de produzir uma proteína igual àquela produzida pelo eucarioto, se iniciar o processo com genes contendo íntrons. Na verdade, mesmo um outro eucarioto poderá não o fazer se o sistema de *splicing* não compreender os sinais de *splicing* (sequências de bases) contidos no início e no fim dos íntrons. Por isso, a estratégia para se clonar e expressar genes eucariotos tem que ser necessariamente partir de genes cujos íntrons já foram retirados (salvo algumas exceções, quando os genes não contiverem íntrons, como é o caso de muitos protozoários, por exemplo). Portanto, precisamos partir de RNAs mensageiros (que não contêm íntrons) e seguir um caminho inverso, inicialmente, produzindo DNA, para depois, então, clonar este DNA no vetor e permitir que seja traduzido de volta num mRNA sem íntrons (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PERNAMBUCO, 2011).

Há vários procedimentos para se produzir um DNA fita dupla a partir de um mRNA. Este DNA é chamado cDNA, pois a primeira etapa de sua construção envolve a produção de um DNA complementar (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PERNAMBUCO, 2011).

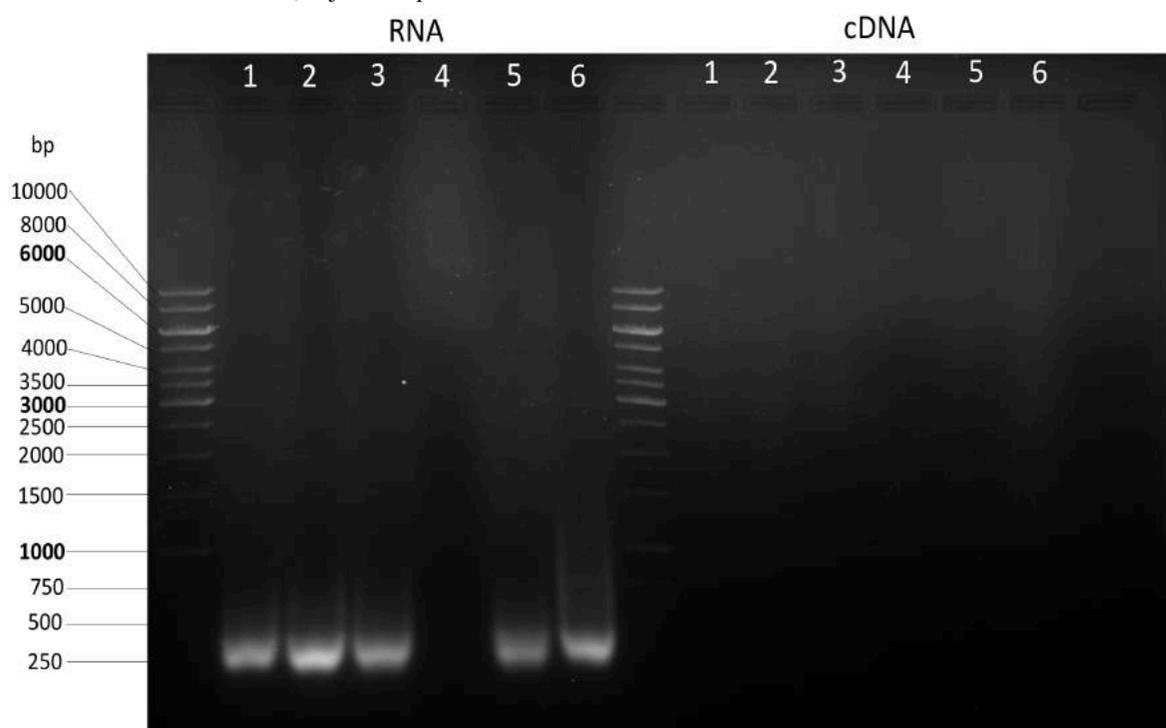
### 3.4.3.3. *Extração de mRNA de R. solani AG-1 IA e construção de biblioteca genômica de cDNA*

Após a extração do DNA de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, foi realizada a extração de mRNA pelo procedimento descrito por Aurum™ Total RNA Mini Kit, BIO-RAD, seguindo instruções do fabricante para isolamento do DNA genômico a partir de tecido animal e vegetal e posteriormente quantificado em Nanodrop. As concentrações obtidas de mRNA foram 1117,2 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  RR\_A41; 1747,5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  RR\_A23; 1507,7 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  PA\_B1F6; 14,1 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  ROB4D7; 975,7 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  MA\_217 e 2014,0 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  MT\_S085. O cDNA foi quantificado em Nanodrop com concentrações de 1159,0 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  RR\_A41; 1336,0 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  RR\_A23; 875,3 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  PA\_B1F6;

988,2 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  ROB4D7; 1022,5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  MA\_217 e 1003,1 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  MT\_S085. O resultado da extração de RNA e síntese de cDNA podem ser observados na figura 48.

Na figura 48, as amostras de mRNA apresentam apenas uma banda no final do gel, normalmente nas análises de mRNA total pode-se observar duas bandas. O gel apresentado sugere que as amostras de mRNA estão desnaturadas, impossibilitando a síntese de cDNA, o que ocasionou o não surgimento de bandas no gel e deste modo o gene não pode ser amplificado.

**Figura 48.** Eletroforese de RNA e cDNA em gel de agarose 1% para os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA obtidos de culturas de arroz, soja e braquiária



**Fonte.** Próprio autor: 1. RR\_A41; 2. RR\_A23; 3. PA\_B1F6; 4. ROB4D7; 5. MA\_217 and 6. MT\_S085

A extração de mRNA é uma análise de alta sensibilidade, podendo ser facilmente afetada. A partir disso, iniciou-se o processo inverso, obter a proteína a partir de sua purificação do extrato enzimático para identificação do gene e sequenciamento do mesmo.

### 3.4.4. Purificação da enzima

#### 3.4.4.1. Análise de proteína dos diferentes isolados por SDS-PAGE

As amostras de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA foram isoladas de diferentes hospedeiros. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida para observar-se diferenças entre as enzimas liberadas pelos diferentes isolados.

Na tabela 23 estão descritas as amostras usadas nas análises de SDS-PAGE. Os isolados selecionados foram os que apresentaram maior atividade xilanolítica.

**Tabela 23,** Amostras de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA isolados de diferentes hospedeiros

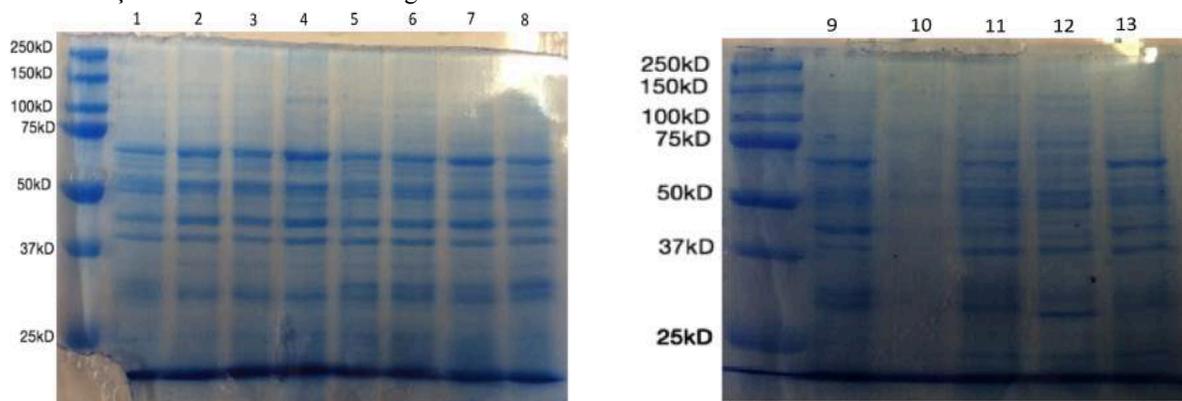
| Isolados de Arroz | Isolados de Braquiária | Isolados de Soja |
|-------------------|------------------------|------------------|
| 1- RR_A43         | 6- PA_B1F6             | 10- MA_159       |
| 2- RR_A41         | 7- ROB3B4              | 11- MA_217       |
| 3- RR_A23         | 8- ROB1A3              | 12- MT_S085      |
| 4- RR_A30         | 9- ROB4D7              | 13- TO_064       |
| 5- RR_A33         |                        |                  |

**Fonte:** Próprio autor.

Na figura 49 e 50 estão apresentados os géis em duas concentrações diferentes para as amostras dos isolados de arroz, soja e braquiária cultivados em farelo de trigo e corados em Coomassie blue e Nitrato de prata para comparação.

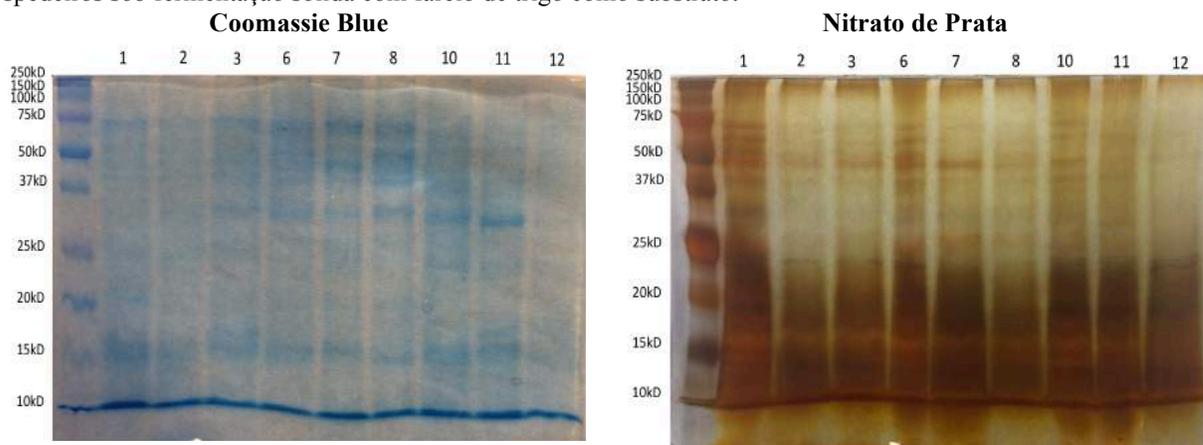
O extrato bruto foi concentrado por Ultrafiltração usando sistema Amicon com membrana de 3K e 10K (PM3 e PM 10) o qual pode ser observado na Figura 51.

**Figura 49.** Gel de acrilamida (10%) com amostras de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA isolado de diferentes hospedeiros sob fermentação solida com farelo de trigo como substrato.



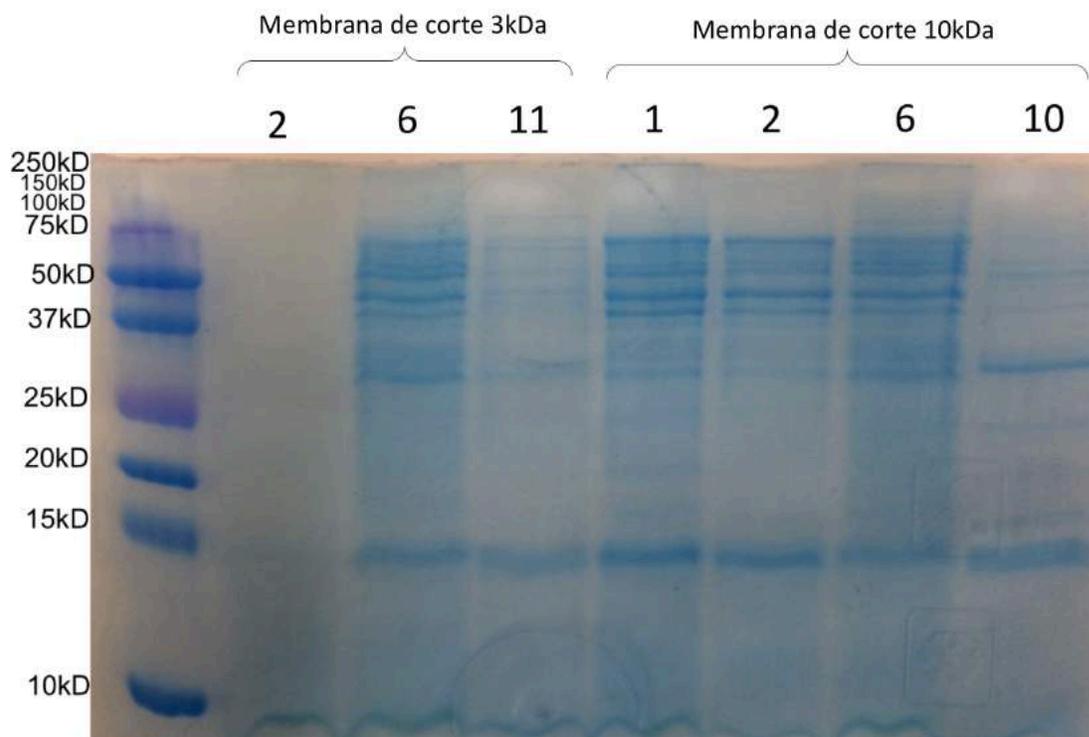
**Fonte:** Próprio autor.

**Figura 50.** Gel de poliacrilamida (15%) com amostras de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA isolado de diferentes hospedeiros sob fermentação sólida com farelo de trigo como substrato.



**Fonte:** Próprio autor.

**Figura 51.** Ultrafiltração com sistema Amicon de centrifugação para amostras de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA obtidos de diferentes hospedeiros cultivados sob fermentação sólida com farelo de trigo como substrato.

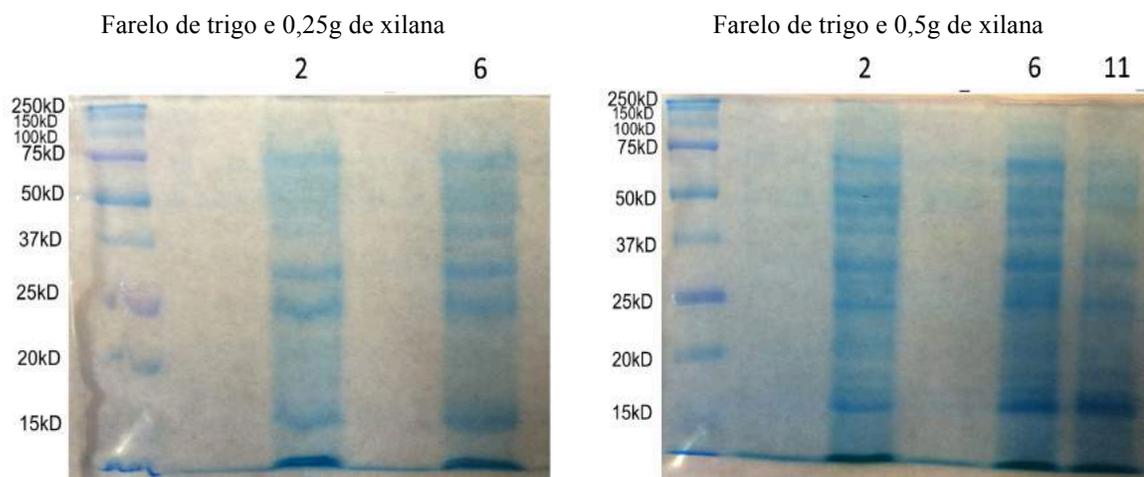


**Fonte:** Próprio autor.

Para melhor visualização das bandas de proteína e possivelmente uma melhor expressão e aumento na concentração da proteína xilanolítica, foi utilizada a fermentação sólida,

na qual utilizou-se 5g de farelo de trigo e uma variação de 0,25g e 0,5g de xilana como substrato para verificar qual a melhor concentração, a qual pode ser observada na figura 52.

**Figura 52.** Gel de poliacrilamida (15%) com amostras de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA obtido de diferentes hospedeiros usando fermentação sólida com farelo de trigo e xilana como substrato.



**Fonte:** Próprio autor.

Os géis apresentados nas figuras anteriores foram realizados para visualização das bandas proteicas e uma possível detecção da banda de xilanase, porém como foi utilizado extrato bruto, todas as proteínas produzidas pelo organismo foram expressas nos géis o que dificulta a identificação de uma proteína específica.

#### 3.4.4.2. Cromatografia de Filtração em Gel

O extrato bruto obtido do isolado PA\_B1F6 obtido de cultura de braquiária, aproximadamente 20 ml, foi concentrado por Sistema Amicon com membrana de corte de 3 kDa (PM 3) até a obtenção de aproximadamente 2 mL e 1 mL foi aplicado em coluna Sephacryl S-200 previamente equilibrada. A primeira análise foi realizada com a enzima bruta obtida por fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato (figura 53).

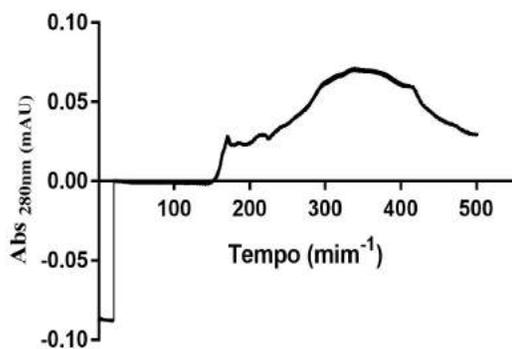
A segunda análise foi realizada com enzima bruta obtida por fermentação em estado sólido com farelo de trigo com xilana (figura 54). As frações da coluna foram detectadas pela formação de açúcares redutores a partir do substrato xilana birchwood, respectivamente, pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS (MILLER, 1959).

Para as análises com farelo de trigo, as frações 60 e 94 apresentaram maior atividade

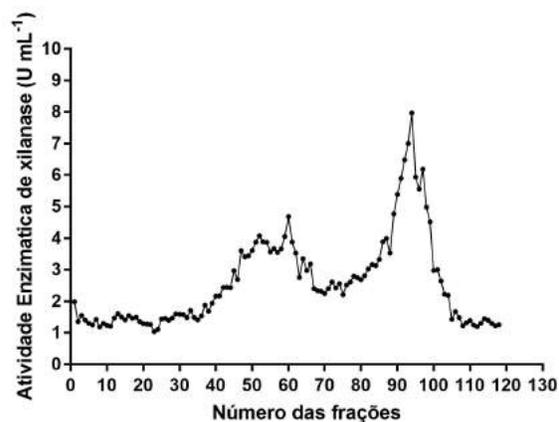
xilanolítica. Para as análises com farelo de trigo e xilana as frações com maiores atividades xilanolíticas foram 64, 65, 66 e 67, em ambos os casos as amostras foram submetidas a análise por SDS-PAGE como mostrada na figura 55 e 56.

**Figura 53.** Perfil cromatográfico de filtração em gel utilizando Sephacryl S-200 usando enzima bruta obtida sob fermentação em estado sólido com farelo de trigo como substrato de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

a) Absorbância em 280 nm x Tempo em minutos



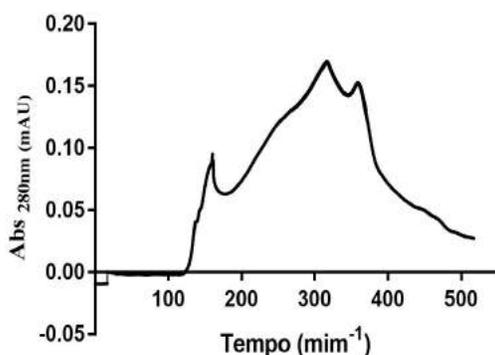
b) Atividade enzimática da xilanase x Frações Eluídas



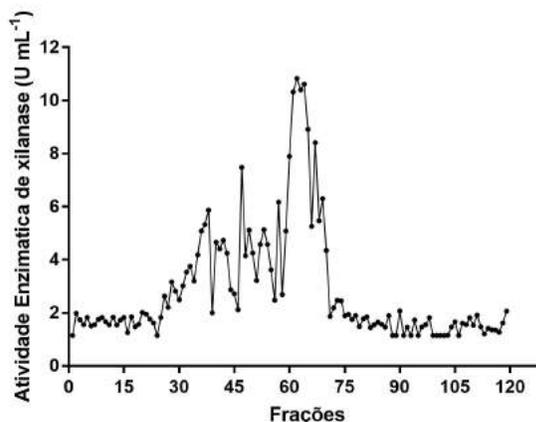
Fonte: Próprio autor.

**Figura 54.** Perfil cromatográfico de gel filtração em Sephacryl S-200 usando enzima bruta obtida sob fermentação em estado sólido usando farelo de trigo e 0,5g de xilana como substrato de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

a) Absorbância em 280 nm x Tempo em minutos



b) Atividade enzimática da xilanase x Frações Eluídas

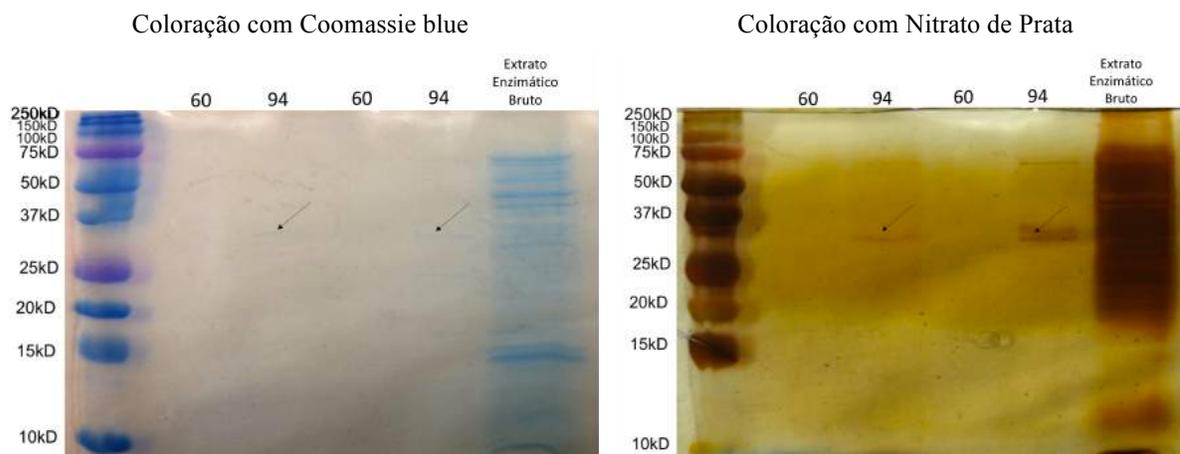


Fonte: Próprio autor.

As frações contendo atividade xilanolítica mostrada na figura 54b foram agrupadas e concentradas com Ultrafiltração pelo sistema Amicon com membrana de 3kDa (PM3) e um

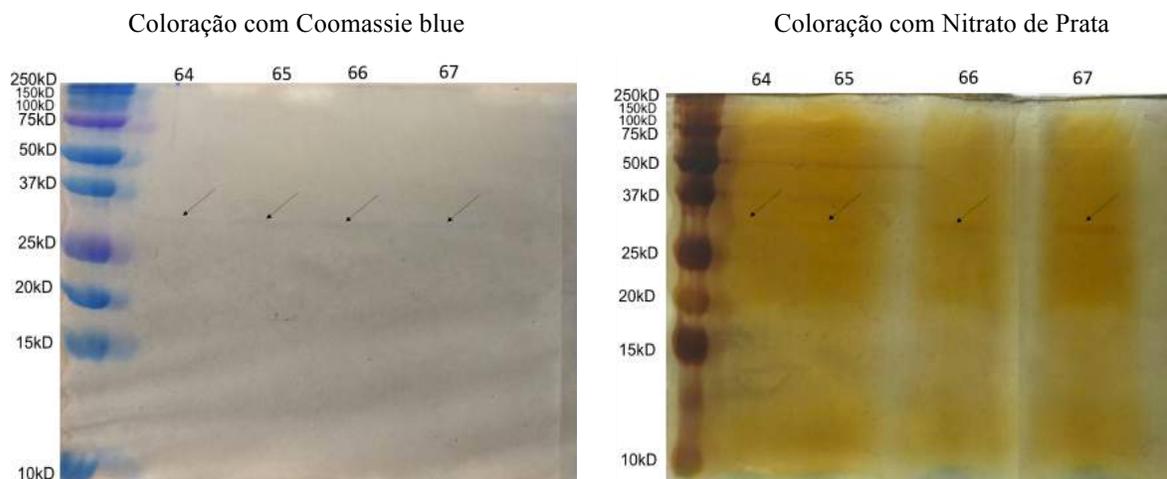
novo gel SD-PAGE foi realizado como mostrado na figura 57.

**Figura 55.** SDS-PAGE para amostras de filtração em gel obtida por fermentação em estado sólido com farelo de trigo como substrato para o fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.



**Fonte:** Próprio autor.

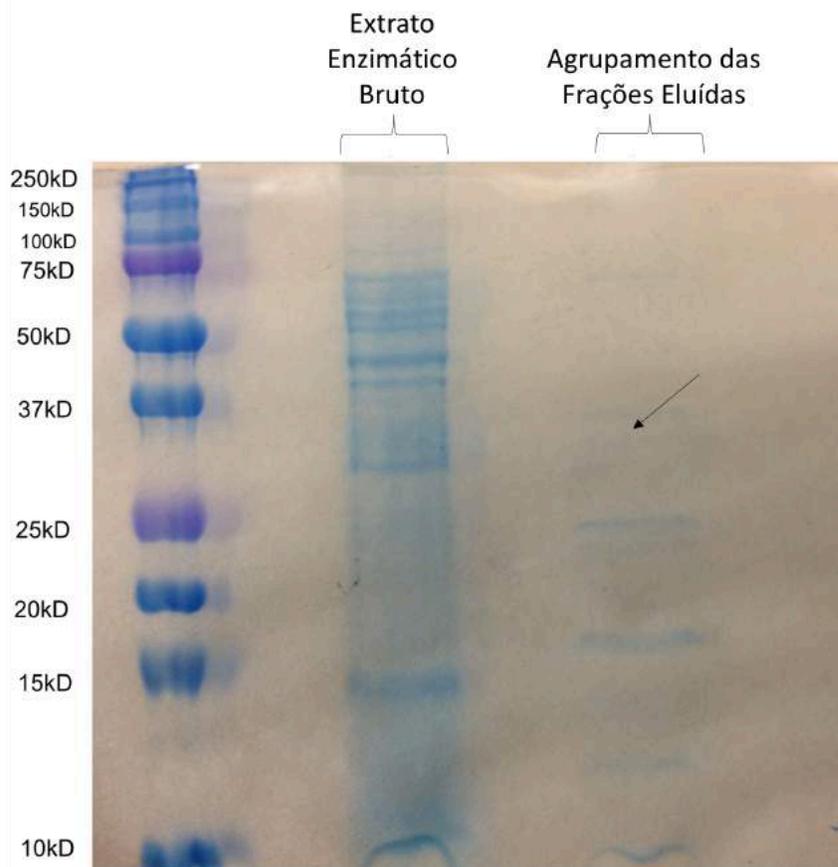
**Figura 56.** SDS-PAGE para amostras de filtração em gel obtida por fermentação em estado sólido com farelo de trigo e 0,5g de xilana como substrato para o fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.



**Fonte:** Próprio autor.

O volume obtido da coluna foi pequeno, o qual foi usado para análise da atividade de xilanase e no preparo das análises de SDS-PAGE, ficando impossível de determinar o conteúdo de proteína no final do processo de cromatografia.

**Figura 57.** SDS-PAGE das frações eluídas de cromatografia em gel agrupadas e concentradas utilizando extrato bruto obtido após fermentação em estado sólido com 5g de farelo de trigo e 0,5 g de xilana como substrato.



**Fonte:** Próprio autor.

Porém, a partir desta análise visual do gel podemos verificar que a proteína da xilanase apresenta um peso molecular de aproximadamente 33 kDa.

Segundo Harri; Ramalingam (2010) endoxilanase de fungos e bactérias são quase exclusivamente subunidade única de proteínas com peso molecular variando de 8,5 a 85 kDa.

### 3.5. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

*Rhizoctonia solani* AG-1 IA mostrou ser um bom produtor de xilanase. Quando cultivado em farelo de trigo com xilana foi observado um aumento significativo na produção da enzima xilanase, enquanto que a produção de CMCase diminuiu.

O gene da xilanase para *Rhizoctonia solani* AG-1 IA não está descrito, isso impossibilitou as análises posteriores para a realização da clonagem do mesmo. Deste modo, deu-se início a purificação da xilanase produzida por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA para futura identificação da proteína e sequenciamento do mesmo.

A proteína xilanase foi parcialmente purificada pelo processo de cromatografia em gel usando Sephacryl S-200 e pode-se observar que a xilanase produzida por *R. solani* AG-1 IA apresenta um peso molecular de aproximadamente 33 kDa.

O fato de o gene para a proteína xilanase não ter sido descrito anteriormente, expande as oportunidades para mais investigação e torna de grande importância os estudos realizados neste trabalho.

### 3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. **Seleção de fungos filamentosos produtores de xilanases e celulasas utilizando resíduos agroindustriais**. 2013. 45 f. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais)-Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2013.

ALVES-PRADO, H. F. et al. Cellulolytic enzymes isolated from Brazilian areas: production, characterization and applications. In: GOLAN, A. E. (Org.). **Cellulase: Types and Action, Mechanism and Uses**. Hauppauge: Nova Science, 2011. cap. 6, p. 178-206.

ANDRADE, C. C. P. **Produção, purificação e caracterização de xilanase termoestável produzida por *Cryptococcus flavescens* e expressão em *Pichia pastoris***. 2014. 184 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos**. 2. ed. rev. ampl. Goiânia: Ed. da UFG, 2008. 536 p.

BADHAN, A. K. et al. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 3, p. 504-510, 2007.

BERGQUIST, P. et al. Expression of xylanase enzymes from thermophilic microorganisms in fungal host. **Extremophiles**, Tokyo, v. 6, n. 3, p. 177-184, 2002.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PERNAMBUCO. **Clonagem de DNA - Parte II** : [Programa de Disciplinas de Genética Molecular]. Recife, 2011. Disponível em: <[https://www.ufpe.br/biolmol/aula6\\_clonagem2.htm](https://www.ufpe.br/biolmol/aula6_clonagem2.htm)>. Acesso em: 4 set. 2016.

FANG, H. Y. et al. Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. **Process Biochemistry**, London, v. 43, n. 1, p. 49-55, 2008.

FERRAZ, M. C. M. **Caracterização do transcrito parcial do fungo patogênico *Fonsecaea pedrosoi***. 133 f. 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)-Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2011.

HARRIS, A. D.; RAMALINGAM, C. Xylanases and its Application in Food Industry: A review. **Journal of Experimental Sciences**, Noida, v. 1, n. 7, p. 01-11, 2010.

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 48, n. 2, p. 422-427, dec. 1972.

He, J. et al. Cost-effective lignocellulolytic enzyme production by *Trichoderma reesei* on a cane molasses medium. **Biotechnology for Biofuels**, London, v.7, n. 43, 2014.

HEROLD, S. et al. Xylanase gene transcription in *Trichoderma reesei* is triggered by different inducers representing different hemicellulosic pentose polymers. **Eukaryotic cell**, Washington, DC, v. 12, n. 3, p. 390–398, 2013.

AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos**. 2. ed. rev. ampl. Goiânia: Ed. da UFG, 2008. 536 p.

JUDITH A.; CASSIN, P. E; GAMBIER, R. M S. **Biotechnology Explorations: Applying the Fundamentals**. American Society for Microbiology, USA, 2000. 288p.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, n. 6, p. 1219–1227, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, n. 227, p. 680-685, 1970.

MERIL, C. R. **Gel-staining techniques**. In *Methods in Enzymology*, Deutscher, M. P. ed., New York: Academic Press, 1990.v. 182, p. 477-488.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical chemistry**, Washington, DC, v. 31, n. 3, p. 426-8, 1959.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Bethesda, [201-]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 4 set. 2016.

PEDERON, M. et al. Identification of thermostable beta-xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 29, n. 5, p. 743-748, 2007.

POLIZELI, M. L. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1, 2001.

WONG, K. K.; TAN, L. U.; SADDLER, J. N. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 52, n. 3, p. 305– 317, 1988.

WANG, G. et al. Molecular detection and diversity of xylanase genes in alpine tundra soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, n. 4, p. 1383-1393, 2010. DOI 10.1007/s00253-010-2564-9.

ZHENG, A. et al. The evolution and pathogenic mechanisms of the rice sheath blight pathogen. **Nature Communications**, New York, v. 4, n. 1424, p.1-10 1424, 2013. DOI: 10.1038/ncomms2427.

# CAPITULO 4

---

## **4. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XILANASE PRODUZIDA POR *Rhizoctonia solani* AG-1 IA ISOLADO DE CULTURA BRAQUIÁRIA.**

## 4.1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia pode ser entendida como o conjunto de conhecimentos, técnicas e métodos, de base científica ou prática, que permite a utilização de seres vivos como parte integrante e ativa do processo de produção industrial de bens e serviços (CANILHA et al., 2005).

Em biotecnologia industrial, uma ampla variedade de produtos vem sendo produzido, ao longo dos anos. Em particular, os sistemas de produção microbiana, tais como bactérias (ácido láctico), leveduras e fungos filamentosos têm uma longa história de uso (PUNT et al., 2011).

Já na Antiguidade o homem fazia pão e bebidas fermentadas. Atualmente, diversos processos fermentativos são operados em escala industrial, com alta eficiência e baixo custo, para a geração de produtos biotecnológicos de interesse comercial (CANILHA et al., 2005).

Além disso, uma variedade de compostos antimicrobianos, tais como penicilinas e cefalosporinas, são produzidas em sistemas de produção de bactérias e fungos. Uma aplicação biotecnológica bem conhecida de várias espécies de leveduras é a produção de bebidas alcoólicas. Em particular, fungos filamentosos têm sido uma importante fonte de uma grande variedade de enzimas hidrolíticas para ser utilizado em aplicações alimentares e alimentos para animais, para as indústrias de papel e têxteis, e também na indústria química (PUNT et al., 2011).

Ambos fungos parasitas de plantas e saprófitas produzem enzimas extracelulares que podem degradar os componentes da parede celular de plantas. Estes fungos não só digerem polímeros da parede celular vegetal para obter uma importante fonte de nutrientes, mas também degradam a parede celular para ajudar a penetrar as células e se espalhar através de tecido da planta (ANNIS; GOODWIN, 1997).

Os fungos eficientemente secretam enzimas no seu meio de cultura, estas enzimas têm sido passíveis de aplicações industriais com procedimentos de purificação relativamente simples. Em tempos mais recentes, com o advento das ferramentas de engenharia genética para fungos, enzimas geneticamente modificadas têm sido progressivamente manipuladas, a fim de proporcionar as propriedades físico-químicas necessárias para melhorar os processos industriais e, assim, diminuir o custo do produto final produzido (PUNT et al., 2011).

Reações mediadas por enzimas são alternativas eficazes a métodos químicos,

geralmente poluentes. Os catalisadores têm grande utilização em diversas áreas, como indústrias de alimentos, farmacêuticas, de detergentes, papelarias, ração animal, têxteis e cosméticas e na produção de biocombustível, o etanol. Como parâmetro de aplicação tecnológica, uma enzima somente possui valor comercial se houver demanda ou apresentar propriedades de acordo com os requerimentos técnicos e econômicos do processo em escala industrial. Para obter uma viabilidade econômica e comercial da produção de celulases e hemicelulases é necessário identificar e isolar fungos filamentosos com grande potencial lignocelulolítico. A utilização de processos biotecnológicos alternativos, como a biocatálise industrial, têm um papel fundamental na implementação de tecnologias sustentáveis, contribuindo para a redução dos problemas de poluição ambiental, além de trazer outros benefícios processuais (POLIZELLI et al., 2005).

## 4.2. OBJETIVOS DO CAPÍTULO

- a) Produzir a enzima xilanase para os processos de purificação.
- b) Purificar a xilanase de interesse por método cromatográfico e análise eletroforética.
- c) Caracterizar as propriedades físico-químicas da xilanase purificada

## 4.3. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.3.1. *Micro-organismo*

Foi selecionado um isolado de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA PA\_B1F6 oriundo de cultura de braquiária. O isolado está depositado na coleção de fungos fitopatogênicos do Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos da UNESP Campus de Ilha Solteira, sob responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Ceresini.

Os escleródios (estrutura de reprodução) do isolados são mantidos em sílica gel a -21°C até sua utilização. Para crescimento do micro-organismo foi utilizado o meio BDA (Batata Dextrose Agar).

### 4.3.2. *Enzimas*

A enzima analisada se caracteriza como degradadora de parede celular de plantas: hemicelulases (endo-1,4- $\beta$ -xilanase).

### 4.3.3. *Produção da enzima*

#### 4.3.3.1. *Fermentação em Estado Sólido*

Para a produção da enzima extracelularmente, utilizou-se a fermentação em estado sólido (FES). Foi realizado cultivo de farelo de trigo com xilana birchwood como substrato, sendo que o farelo de trigo foi obtido do mercado local e a xilana birchwood da marca Sigma-Aldrich. Os frascos contendo substrato foram esterilizados antes de serem inoculados. A fermentação foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com 5g de farelo de trigo e 0,5g de xilana birchwood e inoculados com 5 discos do crescimento em placa de Petri com meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Agar) de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, umedecidos com 5 mL de solução salina (1,4 gL<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 gL<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 gL<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>, 0,3 gL<sup>-1</sup> (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO), a fim de se manter uma umidade relativa de 50% e incubados a 25°C por 96h. Ao final de cada fermentação, a solução enzimática bruta foi extraída pela adição de 40 mL de água estéril em cada frasco, os quais permaneceram sob agitação de 100 ciclos por minuto, em temperatura ambiente por 1 hora. Decorridos esse tempo o material foi filtrado à vácuo e centrifugado a

10.000 *xg* por 15 min. obtendo uma solução livre de células, a qual foi utilizada para as análises enzimáticas e purificação.

#### ***4.3.4. Análise de proteína liberada pelos isolados obtidos das culturas de arroz, soja e braquiária em diferentes substratos.***

Os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA foram obtidas de culturas de arroz, soja e braquiária. Os isolados foram cultivados em Fermentação em Estado Sólido utilizando 5g de farelo de trigo, 5g de farelo de trigo com 0,5g de xilana e 0,5g de braquiária como substrato, a 25°C por 96h. As amostras foram submetidas à análise em gel de poliacrilamida para observação das diferenças entre as proteínas liberadas pelos isolados nos diferentes substratos.

#### ***4.3.5. Purificação de xilanase***

Xilanases microbianas são comumente purificadas por combinação de ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio e processos cromatográficos (principalmente filtração em gel e troca iônica), empregando normalmente de duas a cinco etapas de purificação, com rendimentos que variam de 0,2 a 78% (SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002; SÁ-PEREIRA et al., 2003; SILVA, 2014).

O Extrato Bruto foi submetido a processos de separação de proteínas (esquematizado na figura 58) com o objetivo de purificar uma xilanase.

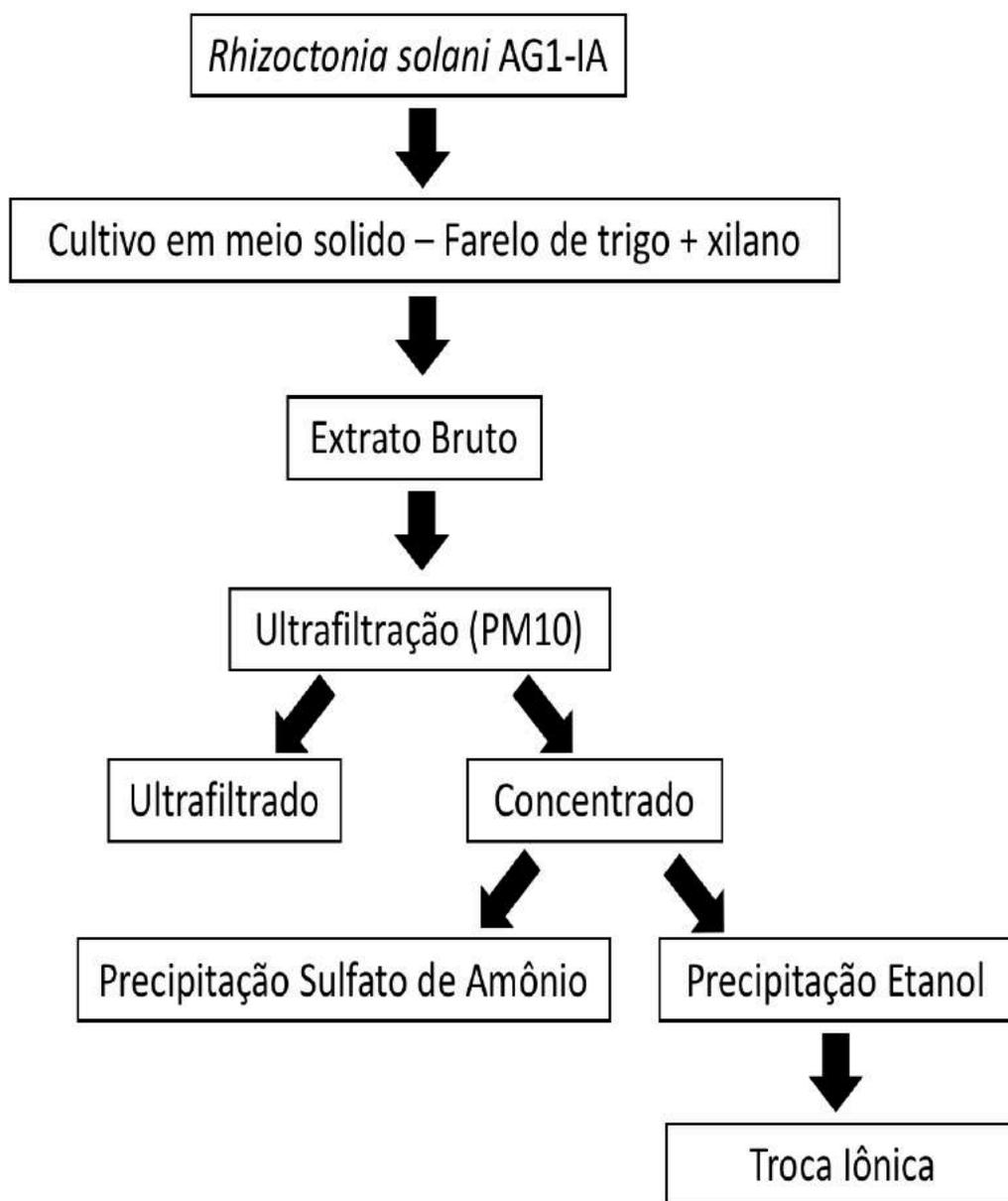
##### ***4.3.5.1. Ultrafiltração***

A enzima bruta foi submetida à Ultrafiltração com QuixStand™ benchtop systems (QSM-04SA) com aproximadamente 3 psi com membrana de corte de 10 kDa. As duas frações obtidas foram denominadas de concentrado (C) e ultrafiltrado (UF).

##### ***4.3.5.2. Precipitação com Sulfato de Amônio.***

O concentrado foi usado para precipitação com sulfato de amônio (60% de saturação, m/V). A mistura foi incubada a 0° C durante 30 minutos e o precipitado foi separado por centrifugação (8000 rpm, 15min., a 4 ° C). O precipitado foi ressuscitado em água destilada de modo a concentrar a amostra em 50% e submetido a análise para determinação da atividade enzimática de xilanase.

**Figura 58.** Processo de purificação da proteína de xilanase do isolado PA\_B1F6 obtido de cultura de braquiária do fungo *R. solani* AG-1 IA.



**Fonte:** Próprio autor

#### 4.3.5.3. Precipitação com Etanol

O concentrado foi usado para precipitação com etanol, a qual foi colocada em banho de gelo e adicionando-se lentamente etanol a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  (75% de saturação, V/V). A mistura foi incubada a  $0^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos e o precipitado foi separado por centrifugação (8000rpm,

15min., a 4 ° C). O precipitado foi ressuscitado em água destilada de modo a concentrar a amostra em 50% e submetido a análise para determinação da atividade enzimática de xilanase.

#### *4.3.5.4. Cromatografia de Troca iônica*

A amostra obtida da precipitação por etanol foi equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5, na proporção de 1:1. Alíquota de 2 mL foi utilizada na cromatografia de troca iônica em coluna Hitrap SP Sepharose FF em sistema AKTA. A proteína foi eluída com gradiente de cloreto de sódio 500 mM no mesmo tampão, com fluxo de 1 mL/minuto e 0,5 mL/minuto na aplicação. As frações que apresentaram atividade de xilanase foram coletadas, concentradas e submetidas à eletroforese em SDS-PAGE. A concentração de proteína foi determinada pelo método Hartree-Lowry (HARTREE, 1972), usando BSA (Bovine Serum Albumin) como padrão. Estas técnicas serão descritas a seguir.

#### *4.3.5.5. Eletroforese e coloração*

Para a verificação do grau de pureza das amostras nos diversos passos da purificação e da massa molecular aparente da xilanase purificada, as amostras foram aplicadas em géis de poliácridamida 10 % sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) como descrito por Laemmli (1970) a 110W de corrente constante utilizando um sistema Mini-Protean III Cell (BioRad Laboratories; Hercules, CA, EUA). As amostras foram preparadas adicionando-se 20 µl de amostra e 5 µl de tampão de amostra 4X (4 vezes concentrado - Tris HCl 0,5M pH 6,8, glicerol 10%, azul de bromofenol 1% e SDS 2% e β-mercaptoetanol). Em seguida as amostras foram fervidas por 10 mim. Um volume de 25 µl foi aplicado no gel. O marcador de peso molecular usado foi Amersham<sup>TM</sup> – LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis. O gel foi corado com nitrato de prata de acordo com Meril (1970) e Coomassie blue R-250.

A massa molecular da enzima foi determinada a partir de uma curva padrão correlacionando os valores de log das massas moleculares das proteínas padrão e a distancia em mm, percorrida no gel.

#### *4.3.6. Zimograma*

Para a detecção de atividades xilanolíticas presentes no Extrato Bruto (EB), no

ultrafiltrado (UF) e no precipitado de etanol, comparativamente, utilizou-se o protocolo adaptado de zimograma descrito por Wang et al. (1993). Após a eletroforese em condições desnaturantes, o gel foi submerso em solução contendo 1% de Triton X-100 em agitação por 30 minutos. O gel foi então incubado em tampão acetato 0,1M pH5,5 por 15 minutos e após lavado com água destilada e incubado com solução de xilana 1% em tampão acetato 0,1M pH5,5 a 50°C por 30 minutos. O gel foi novamente lavado com água destilada e corado com Vermelho Congo 0,1% por uma hora, e então descorado com solução de NaCl 1 M até o aparecimento das bandas. Após o aparecimento das bandas de xilanase em amarelo sobre o fundo vermelho, foi adicionada solução de HCl 1 M, para dar contraste, tornando o fundo azul escuro.

#### ***4.3.7. Caracterização da enzima bruta e enzima purificada***

A caracterização foi realizada para enzima em extrato bruto e enzima purificada obtida de fermentação em estado sólido utilizando com 5g de farelo de trigo com 0,5g de xilana birchwood como substrato. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

##### *4.3.7.1. Quantificação de Proteínas*

A quantidade de proteínas presentes no extrato bruto (EB), ultrafiltrado (UF), concentrado (C), no precipitado por sulfato de amônio e precipitado por etanol (PE) e na enzima purificada (EP) foi determinada pelo método de Hartree-Lowry (HARTREE, 1972).

##### *4.3.7.2. Determinação da Atividade Xilanolítica*

As atividades de xilanolíticas do extrato bruto (EB), do concentrado (C), do ultrafiltrado (UF), do precipitado com etanol (PE) e da enzima purificada (EP) foram detectadas pela formação de açúcares redutores a partir do substrato xilana birchwood, pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS (MILLER, 1959). As misturas de reação foram utilizadas para amostra bruta e a amostra purificada, onde os volumes reacionais para o extrato bruto foi 5 µL da enzima e 45 µL de uma solução contendo 1,0% de substrato em tampão acetato 100mM a pH 5,5 e para a amostra purificada foi de 30 µL da enzima e 20 µL de uma solução contendo 1,0% de substrato em tampão acetato 100mM a pH 5,5, ambas foram incubadas a 50°C em banho maria por 15 min. As reações foram paralisadas com 50 µL de DNS e incubadas a 100

°C por 10 minutos e ao final adicionada 500 µL de água destilada. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540 nm, e a quantidade de enzima produzida foi determinada utilizando-se como padrão a xilose (0 – 1 mg/mL) para a determinação de unidades enzimáticas de xilanase. Controles foram preparados com a enzima adicionada após o DNS. Uma unidade de atividade enzimática é definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto. A atividade específica foi expressa por unidade de atividade total por mg de proteína total ( $U\ mg^{-1}$  proteína).

#### *4.3.7.3. pH Ótimo e de estabilidade*

Para determinação do pH ótimo da atividade enzimática foi utilizado o tampão McIlvaine 100 mM (pH 3,0 a 8,0) (McILVAINE, 1921).

A estabilidade da xilanase ao pH, foi avaliada incubando a enzima por 2h em tampões de pH variando na faixa de 3,0 a 8,0, com intervalo de 0,5 unidade de pH, em temperatura ambiente. Após incubação, foi realizada dosagem enzimática no pH ótimo da enzima pura.

#### *4.3.7.4. Temperatura Ótima e temperatura de estabilidade*

Foram realizados os ensaios para determinar a temperatura ótima de atuação da atividade enzimática. As misturas reacionais foram incubadas em diferentes temperaturas, de 25°C a 90°C, por 10 min. em banho-maria utilizando uma solução contendo 1,0% de substrato em tampão acetato 100mM a pH 6,5 (pH ótimo da enzima pura).

A temperatura de estabilidade foi determinada incubando-se alíquotas do extrato bruto e da enzima pura em diferentes temperaturas, variando de 25 a 75 °C na ausência de substrato e retiradas em intervalos de tempo de 5, 15, 30 e 60 minutos e mantidas a -20 °C antes de serem utilizadas para determinar a atividade enzimática residual usando o ensaio padrão descrito na seção 3.3.7.2.

#### *4.3.7.5. Influência de Íons metálicos na atividade xilanolítica.*

Extrato enzimático contendo xilanase foi incubada por 5 minutos a 50 °C com soluções contendo íons metálicos de modo a manter uma concentração final em 5 mM e depois testada quanto à sua atividade xilanolítica. As soluções utilizadas foram:  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ , NaCl,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , KCl,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $CuCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $BaCl_2$ , LiCl,  $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ ,

CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O. Em cada ensaio foram adicionados 5 µL de enzima para o extrato bruto, 45 µL de xilana 1% em tampão acetato de sódio pH 6,5 e 2,6 µL de solução de íons. Para a enzima purificada foi utilizado 30 µL de enzima, 20 µL de xilana 1% em tampão acetato de sódio pH 6,5 e 2,6 µL de solução de íons.

#### *4.3.7.6. Influência de agentes modificadores na atividade xilanolítica.*

Extrato enzimático contendo xilanase foi incubada por 5 minutos a 50 °C com soluções contendo modificadores de modo a manter uma concentração final em 0,1 e 1,0% e DTT 0,5M de modo a manter uma concentração final em 1 e 10 mM e depois testada quanto à sua atividade xilanolítica.

#### *4.3.7.7. Determinação dos Parâmetros Cinéticos Aparentes*

Para a determinação do  $K_m$  e de  $V_{max}$  de xilanase, foram realizados ensaios com concentrações crescentes de substrato de xilana birchwood em tampão acetato pH6,5 variando de 0,1 a 1%. A reação enzimática ocorreu de acordo com o descrito na sessão 4.2.5.2.

Os parâmetros cinéticos foram então obtidos por meio de regressão não-linear pela equação de Michaelis-Menten utilizando-se o software Prism 7.

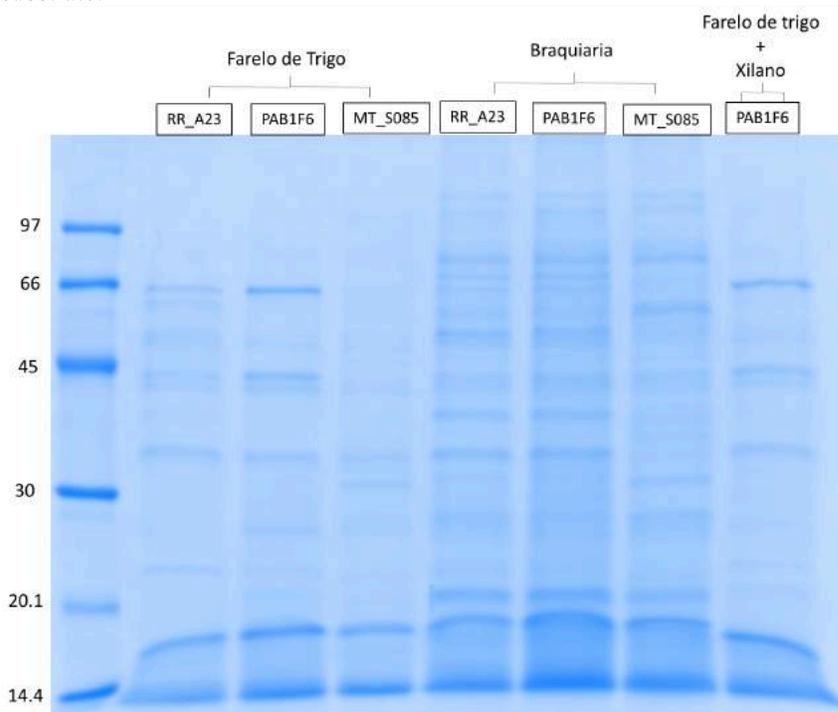
## 4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.4.1. Análise de proteína liberada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em diferentes substratos.

Os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA foram obtidas de culturas de soja, arroz e braquiária. Um isolado obtido de cada cultura (Arroz: RR\_A23; Braquiária: PA\_B1F6 e Soja: MT\_S085) foi cultivada nos substratos de farelo de trigo, braquiária e o isolado PA\_B1F6 também foi cultivado em substrato de farelo de trigo com xilana sob fermentação em estado sólida a 25°C por 96h e submetido a SDS-PAGE para análise das proteínas liberadas em cada substrato por cada isolado (figura 59).

Podemos notar que para a produção em farelo de trigo e farelo de trigo com xilana não houve diferenças na produção de proteínas. Porém, nota-se que o isolado de soja (MT\_S085) foi o que apresentou maior diferença na produção de proteínas de acordo com o substrato e entre os outros isolados para um mesmo substrato.

**Figura 59.** Gel de poliacrilamida (12%) com isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA obtido de diferentes hospedeiros usando fermentação em estado sólido com Farelo de trigo, braquiária e farelo de trigo com xilana como substrato.



**Fonte:** Próprio autor.

#### 4.4.2. Purificação de Proteína

Dentre os diferentes isolados, o isolado de Braquiária PA\_B1F6 foi utilizado para a produção do extrato bruto a ser utilizado para a purificação. A enzima foi obtida por fermentação em estado sólido com 5g de farelo de trigo e 0,5g de xilana como substrato.

A Extrato Bruto (EB) foi submetido a Ultrafiltração e após Ultrafiltração do EB através de membrana de retenção de 10 kDa, atividade xilanolítica foi encontrada em ambas as amostras, no concentrado (amostra que ficou retida antes da membrana) e no ultrafiltrado (amostra que passou através da membrana). Pelo fato da atividade específica da xilanase do Concentrado (C) ( $32,5 \text{ U mg}^{-1}$ ) ter sido bem superior em relação ao EB ( $26,3 \text{ U mg}^{-1}$ ) e superior à do Ultrafiltrado ( $13,22 \text{ U mg}^{-1}$ ), escolheu-se o Concentrado para prosseguir com o processo de purificação de xilanases.

A enzima obtida do concentrado pela ultrafiltração foi novamente submetida a ensaios de concentração usando as técnicas de precipitação com sulfato de amônio e precipitação com etanol.

A precipitação com Etanol apresentou melhor atividade específica ( $42,2 \text{ U mg}^{-1}$ ), quando comparada a precipitação com sulfato de amônio ( $2,86 \text{ U mg}^{-1}$ ), deste modo escolheu-se a amostra concentrada por etanol para dar sequência as análises posteriores.

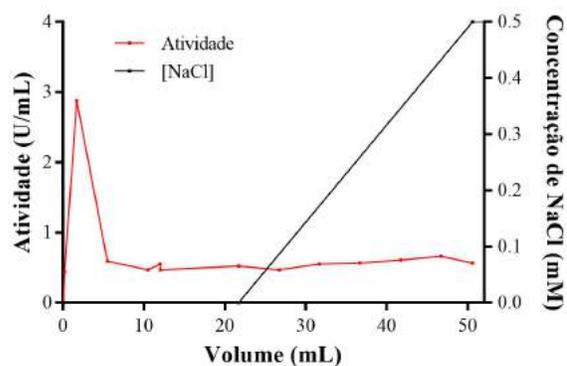
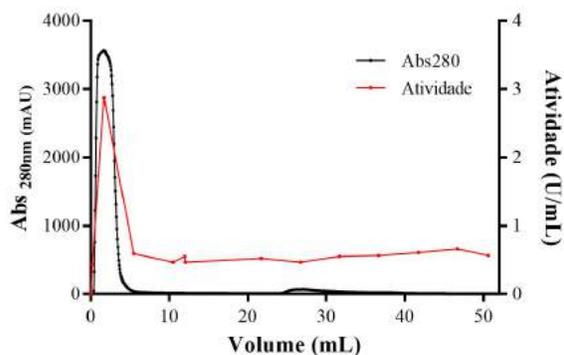
A enzima produzida pelo isolado PA\_B1F6 do fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, concentrada por ultrafiltração e precipitação com etanol denominou-se de precipitado (PE) e então foi aplicado em coluna de troca iônica Hitrap SP Sepharose FF 2mL em sistema ACTA e foi aplicado um volume de 2mL diluído em tampão acetato 50mM pH4,5 (1:1). O perfil cromatográfico de PE aplicado em SP Sepharose FF está mostrado na figura 60.

A xilanase não se ligou a resina catiônica, sugerindo que esta proteína apresenta carga negativa quando em pH 4,5 (pH do tampão), ou seja, apresenta ponto isoelétrico (pI) menor que 4,5. O cromatograma para troca iônica revelou apenas um pico de atividade, o qual foi observado para o primeiro tubo de eluição confirmando a liberação da enzima logo no início da corrida.

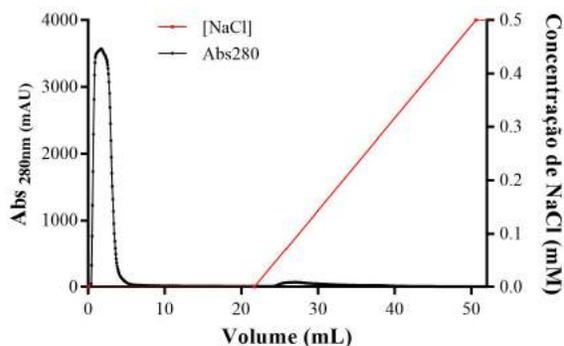
Como mostrado na tabela 24 o processo de purificação não proporcionou aumento na atividade específica da xilanase purificada em relação ao extrato bruto, com um rendimento de 4%.

**Figura 60.** Perfil cromatográfico de coluna de troca iônica do tipo Hitrap SP Sepharose FF do isolado PA\_B1F6 do fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

- a) Absorbância em 280nm X Atividade enzimática de xilanase das frações eluídas
- b) Atividade enzimática de xilanase das frações eluídas X Concentração de NaCl



- c) Concentração de NaCl X Absorbância em 280nm



Fonte: Próprio autor.

**Table 24.** Etapas de purificação da xilanase obtida de isolado de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, PA\_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono.

| Etapas              | Atividade (U) | Proteínas totais (mg) | Atividade específica (U/mg) | Rendimento (%) | Purificação |
|---------------------|---------------|-----------------------|-----------------------------|----------------|-------------|
| Extrato bruto       | 29811         | 1134                  | 26,3                        | 100            | 1,0         |
| Extrato concentrado | 18662         | 575                   | 32,5                        | 63             | 1,2         |
| Precipitação        | 11646         | 276                   | 42,2                        | 39             | 1,6         |
| Troca Iônica        | 1174          | 180                   | 6,5                         | 4              | 0,2         |

Fonte: Próprio autor.

Os ensaios enzimáticos com amostras não purificadas não medem somente a atividade de uma xilanase, mas de todas as enzimas envolvidas em conjunto na degradação da xilana. A

separação de diferentes xilanases, xilosidases e enzimas acessórias presentes no EB durante o processo de purificação, que antes atuavam em sinergia na desconstrução da xilana, diminui a eficiência da xilanase purificada na hidrólise deste polissacarídeo. Por esse motivo, é esperado que o fator e o rendimento de purificação estejam subestimados (FILHO et al., 1993b).

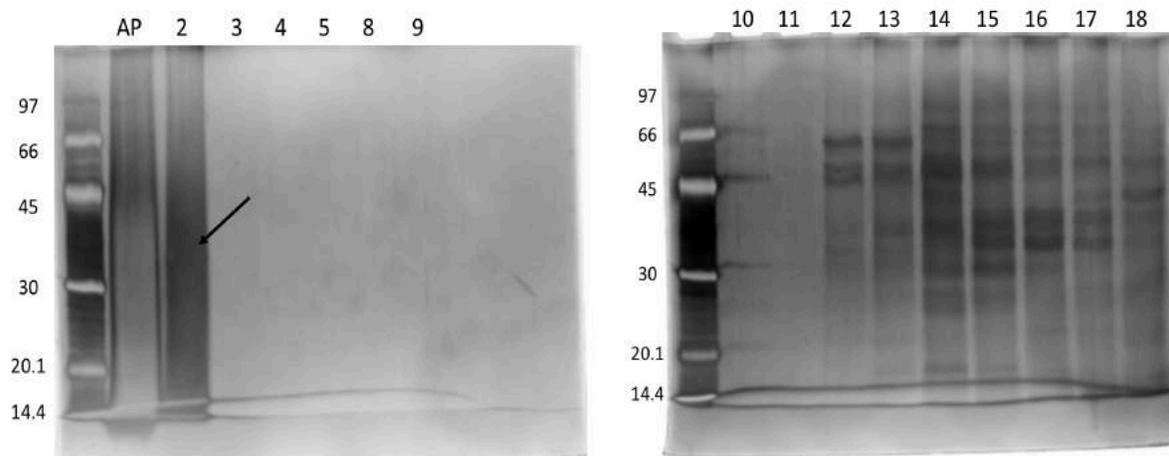
O passo de concentração da amostra com membrana de retenção de 10 kDa se mostrou como sendo possível responsável pelo baixo rendimento do processo de purificação. O procedimento não promoveu a diminuição da atividade específica e do fator de purificação, porém a quantidade de proteínas totais caiu para menos da metade do valor encontrado para o extrato bruto e uma perda de quase 40% no rendimento da enzima. O restante das proteínas pode ter permanecido no ultrafiltrado inclusive, xilanases de baixa massa molecular, fato este que pode ser confirmado neste trabalho, uma vez que o ultrafiltrado apresentou uma atividade específica de  $13,22 \text{ U mg}^{-1}$  (SILVA, 2014).

A habilidade de xilanases com massa molecular superior a 10 kDa (como a xilanase purificada neste trabalho) de atravessarem membranas de ultrafiltração com poros de retenção de 10 kDa já foi observada, e isso provavelmente ocorre devido a alterações conformacionais, à estrutura compacta da enzima ou à não-uniformidade dos poros da membrana. A habilidade de penetrar por pequenos poros as tornariam capazes de penetrar na matriz lignocelulósica. Xilanases de baixa massa molecular são úteis em etapas de branqueamento de papel, uma vez que podem penetrar com maior facilidade a estrutura das fibras constituintes da parede celular vegetal e alterar de maneira eficiente as propriedades da polpa (FILHO et al, 1993a, 1993b; MOREIRA et al, 2008).

As frações foram submetidas à análise por SDS-PAGE com gel a 12% (figura 61) e verificou-se o surgimento de apenas uma banda para o tubo de lavagem, tubo de maior atividade xilanolítica, confirmando a não aderência da enzima à resina, porém esta foi eluída pura, enquanto as outras enzimas se ligaram a resina e foram eluídas nas frações posteriores.

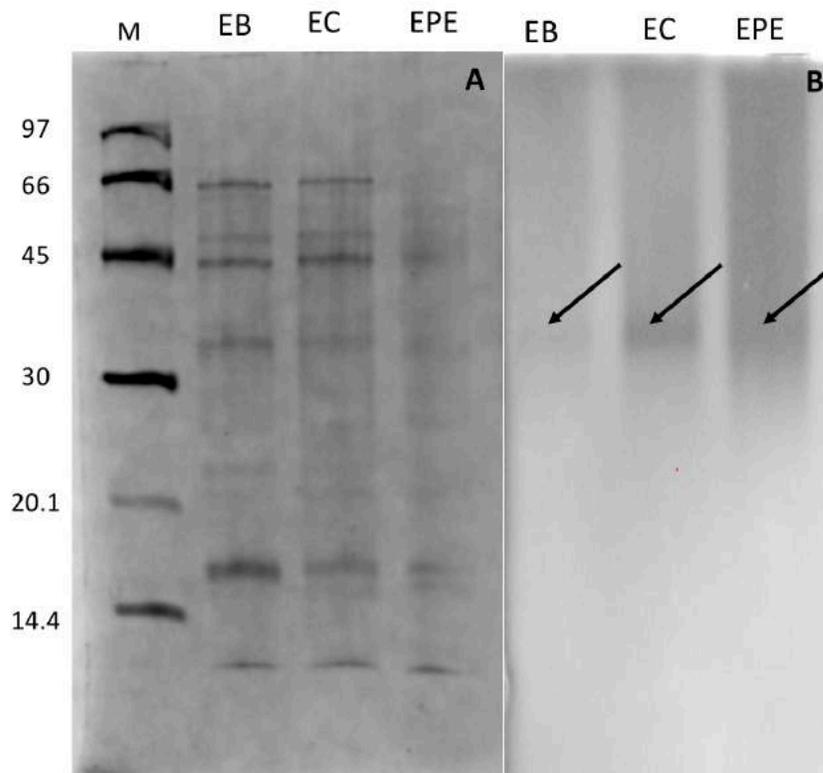
A figura 62 mostra a análise eletroforética sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) das três etapas de purificação (A) e respectivo zimograma (B). De acordo com o zimograma observamos a presença de apenas uma banda para a proteína xilanase.

**Figura 61.** Gel de poliacrilamida 12% com amostras eluídas em Hitrap SP Sepharose FF com tampão acetato da purificação da xilanase obtida de isolado de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, PA\_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono.



**Fonte:** Próprio autor. AP=Amostra aplicada; os números correspondem às frações eluídas

**Figura 62.** Análise eletroforética por SDS-PAGE 12% (A) e Zimograma (B) das etapas de purificação da xilanase obtida de isolado de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, PA\_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono.



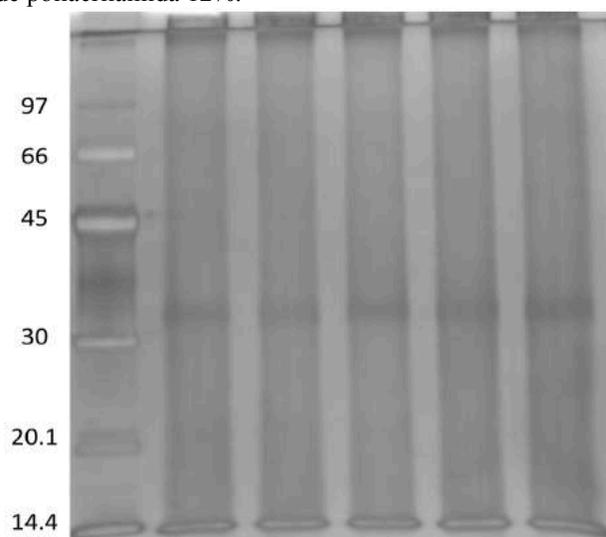
**Fonte:** Próprio autor. EB= Extrato Bruto; EC= Extrato concentrado; EPE= Extrato Precipitado Etanol

Na figura 63 pode-se observar um SDS-PAGE para a amostra purificada obtida de 5 cromatografias consecutivas, realizadas para obtenção de grande volume da amostra purificada para posterior caracterização.

Assim como no SDS quanto no zimograma podemos observar apenas uma banda com atividade xilanolítica.

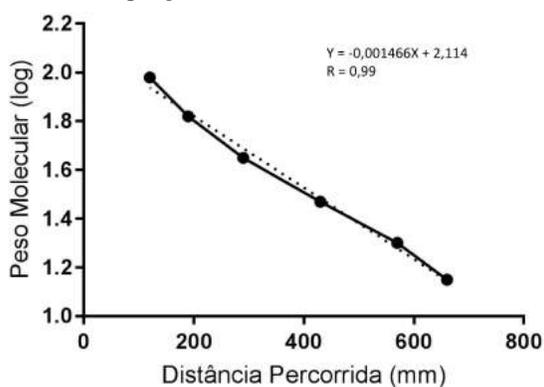
A massa molecular dessa xilanase foi de 33,11 kDa, conforme estimado pela figura 64, calculado usando o programa Prism7.

**Figura 63.** Enzima purificada obtida por cromatografia de troca iônica com coluna Hitrap SP Sepharose FF em gel de poliacrilamida 12%.



**Fonte:** Próprio autor

**Figura 64.** Estimativa da massa molecular de xilanase. Os coeficientes para as regressões foram calculados utilizando o programa Prism7.



**Fonte:** Próprio autor

A natureza e relevância de xilanases de baixa massa molecular nem sempre são claras, pois os procedimentos de purificação favorecem o isolamento de xilanase maiores. As xilanase menores podem ter funções que não são requeridas em grandes quantidades (como a hidrólise de ligações que não ocorrem com frequência). Elas podem não ser produzidas em grandes quantidades sob condições de cultivo utilizadas, ou elas podem ser perdidas devido a degradação ou adsorção em substratos insolúveis. Alternativamente, as xilanases maiores podem ser relativamente superproduzidas sob condições de cultivo. É possível que o conhecimento acerca da produção enzimática *in situ* possa esclarecer a importância dessas xilanases de baixa massa molecular (WONG et al., 1988).

#### ***4.4.3. Caracterização Enzimática***

A caracterização enzimática é a etapa posterior à padronização do cultivo e da purificação das enzimas. Diversos ensaios e técnicas podem ser utilizados na caracterização que revela, dentre as características das enzimas, aquelas que são mais promissoras do ponto de vista de aplicação industrial (MILANEZI, 2010).

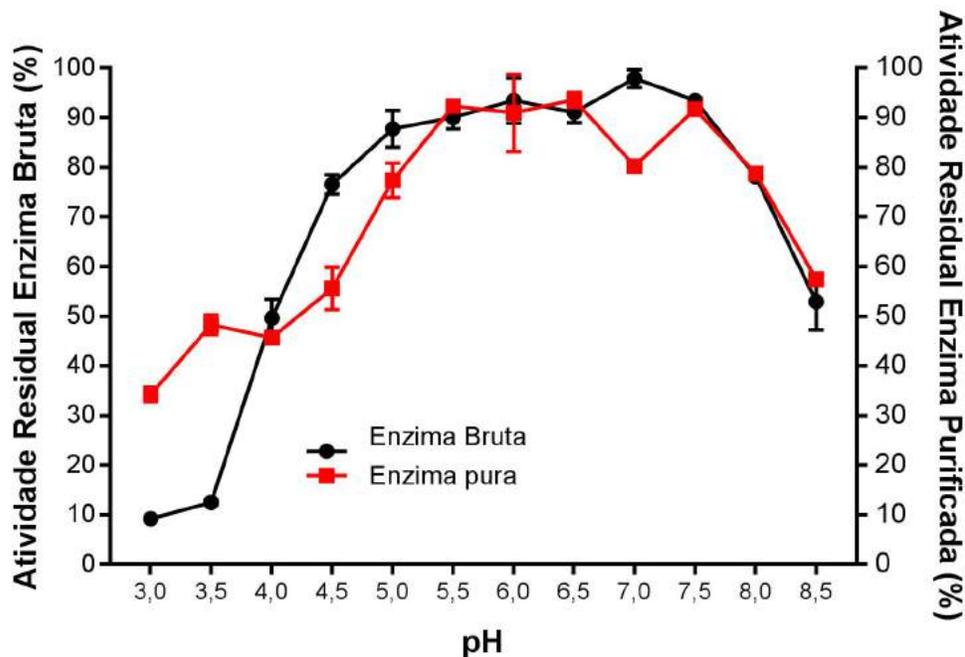
##### ***4.4.3.1. pH ótimo e de estabilidade***

Análise do efeito do pH na atividade enzimática, mostrou que a enzima bruta apresenta um pH ótimo na faixa de 5,5 a 7,5 sendo sua maior atividade em pH 7,0 (24,85 U mL<sup>-1</sup>). A partir deste ponto houve queda na atividade xilanolítica, porém em pH 8,0, a atividade xilanolítica ainda apresentou uma atividade residual de 80% (21,89 U mL<sup>-1</sup>). A enzima purificada apresentou uma faixa de pH ótimo de 5,5 a 6,5, com maior valor de atividade em pH 6,5 com 0,95 U mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, a atividade apresentou uma ligeira queda em pH 7,0 e em pH 7,5 e 8,0, sua atividade xilanolítica caiu bruscamente e em pH 8,5 restava 50 % de atividade residual. Estes dados podem ser observados na figura 65.

A curva da estabilidade da enzima ao pH também mostrou um padrão similar para ambas as amostras, sendo estáveis na faixa de pH de 4,0 a 7,0, podendo ser observado na figura 66. Em pH 4,0 ambas as amostras já apresentavam, aproximadamente 50% de atividade xilanolítica, e em pH 6,5 atingem seu pico máximo de atividade (14,95 U mL<sup>-1</sup> para o extrato bruto e 0,95 U mL<sup>-1</sup> para a enzima purificada). A partir deste ponto, ambas as amostras

apresentaram uma queda brusca na atividade xilanolítica, em pH 7,5 restou aproximadamente 20% de atividade residual para o extrato bruto ( $4,55 \text{ U mL}^{-1}$ ) e aproximadamente 50% para a enzima purificada ( $0,45 \text{ U mL}^{-1}$ ).

**Figura 65.** Análise de pH ótimo para enzima bruta e enzima purificada da xilanase obtida de isolado de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, PA\_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono.



Fonte: Próprio autor

As xilanases da maioria dos organismos estudados são estáveis na faixa de pH de 3,0 a 10,0, apresentando maior atividade no intervalo de pH de 4,0 a 7,0 (KULKARNI et al., 1999).

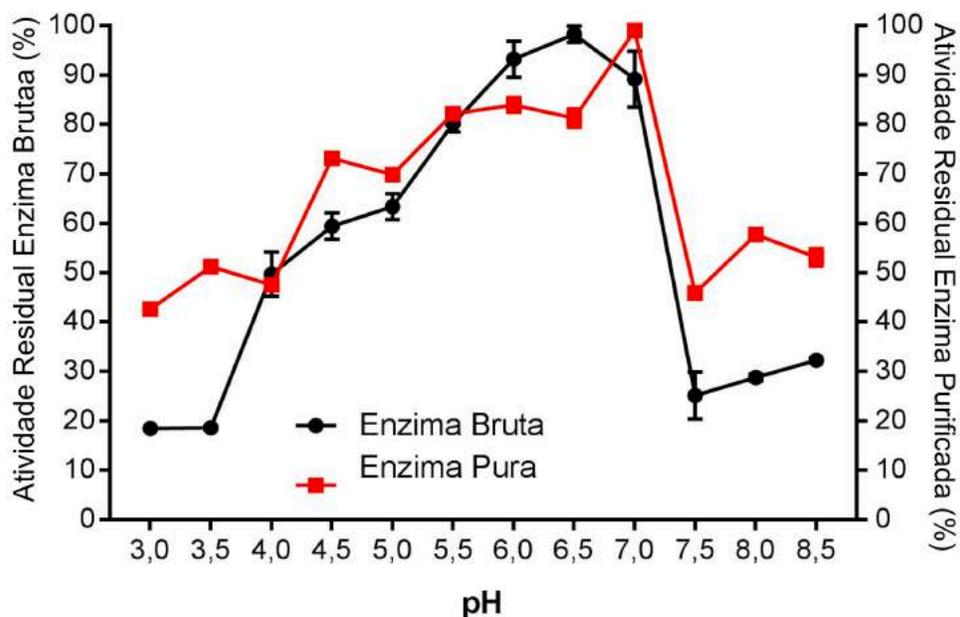
Para a xilanase estudada por Gong et al., (2013), a enzima exibiu máxima atividade quando incubada em uma faixa de pH entre 5,5 e 8,5, o que mostra um comportamento semelhante do observado para as enzimas deste trabalho.

Cai et al. (2011) e Collins et al. (2005) sugeriram que a maioria das xilanases fúngicas têm atividade ótima em pH ácido e perdem suas atividades em valores de pH maiores que 9,0.

Passarinho (2014) estudando uma xilanase mutada e uma não mutada para *Orpinomyces* PC-2, observou para a xilanase não mutada, um pH ótimo em torno de 5,0,

contudo em pH 7,0, sua atividade se manteve em aproximadamente 80 %. Para a xilanase mutada, o pH ótimo foi 3,0 e 60 % de sua atividade foi mantida até pH 8,0.

**Figura 66.** Efeito do pH na estabilidade da xilanase em extrato bruto e da xilanase purificada obtida de isolado de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, PA\_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono.



Fonte: Próprio autor

O intervalo de pH favorável para a atividade de xilanase de *Fusarium solani* SYRN7 foi entre 5,0 e 6,0, com pH ótimo a 5,0. Observou-se uma queda significativa na atividade enzimática abaixo de pH 5,0 e superior a 6,0. Observou-se uma acentuada diminuição da atividade da xilanase entre pH 5,0 (100%) e pH 8,0 (47,16%) (ARABI et al., 2011).

Para a xilanase de *Penicillium funiculosum*, estudada por Lafond et al., (2011), o pH ótimo compreendeu apenas os valores de 4,0-5,5. Junpei et al., (2013) mostraram que uma endoxilanase de *Humicola* sp. Ly01 apresentou atividade ótima em pH 6 e reteve mais de 75% da atividade entre pH 5,0 e 7,0, mas valores próximos a 15% para pH 2,0 e 9,0.

Verma et al. (2013) estudaram uma xilanase estável em pH alcalino e termoestável, que apresentou ampla atividade entre pH 6,0 e 12,0, com valor ótimo em 9,0, com mais de 55% de atividade residual em pH 10.

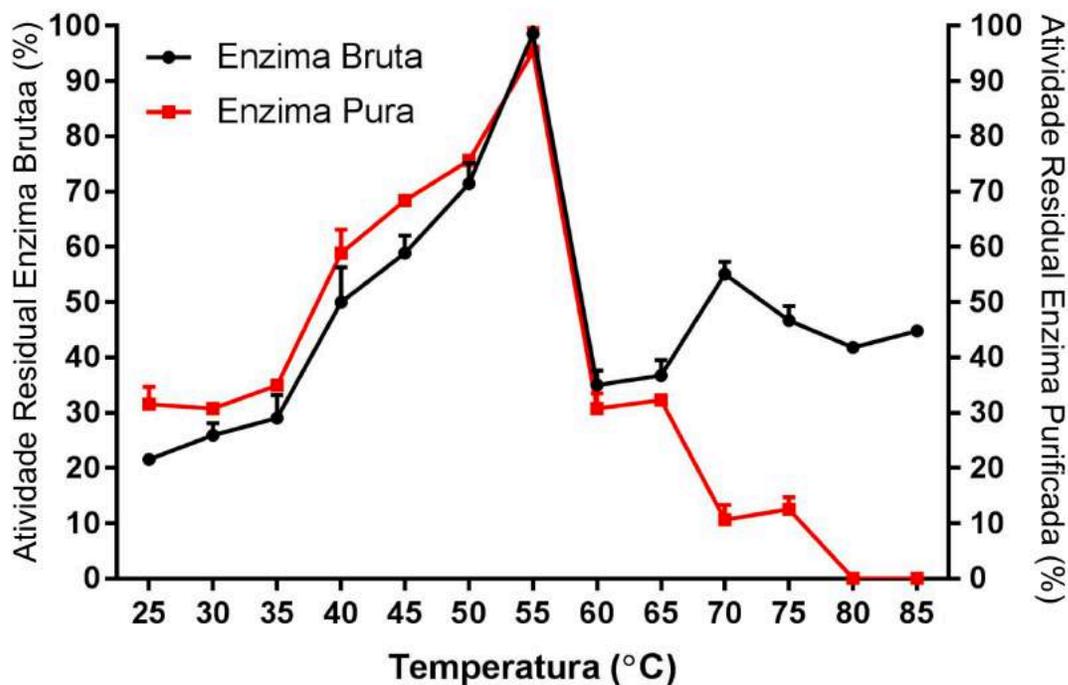
Por ser uma enzima alcalino-resistente, a xilanase estudada por Wang, et al. (2012) para *Saccharomonospora viridis* mostrou ampla adaptabilidade ao pH, exibindo atividade superior a 35 % entre os valores de pH de 5,0 a 11,0.

#### 4.4.3.2. Temperatura ótica e temperatura de estabilidade

A determinação do efeito da temperatura sobre uma amostra enzimática estabelece o tipo de processo industrial em que ela pode ser aplicada. A temperatura propícia para a ação de endoxilanases de bactérias e fungos varia entre 40 e 60°C (KULKARNI et al., 1999).

Nas análises do efeito de temperatura, tanto a xilanase do extrato bruto quanto a xilanase purificada apresentaram valor máximo quando incubada a 55 °C (21,11 UmL<sup>-1</sup> para atividade xilanolítica em extrato bruto e 1,22 UmL<sup>-1</sup> para enzima purificada), como mostrado na figura 67.

**Figura 67.** Efeito da temperatura na atividade xilanolítica da enzima bruta e enzima purificada obtida de isolado de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, PA\_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono em tampão acetato de sódio 0,1M pH 6,5.



Fonte: Próprio autor

Como ocorreu uma queda brusca na atividade xilanolítica após a temperatura de 55°C, optou-se por usar uma temperatura de 50°C para análises posteriores. Ambas amostras testadas ainda apresentaram 30% de atividade residual na temperatura de 60°C. A 80°C a enzima em extrato bruto demonstrou uma elevação na temperatura com 40% de atividade residual, enquanto que a atividade residual da enzima purificada foi nula.

Pela figura 67, assim como no pH, é possível perceber que as duas amostras seguem a mesma curva de resposta à temperatura, porém a atividade xilanolítica ( $\text{UmL}^{-1}$ ) da enzima purificada foi bem inferior à da enzima em extrato bruto. Esta diminuição pode estar relacionada à remoção, durante o processo de purificação, de cofatores ou enzimas que atuam em sinergismo com a xilanase, e cuja retirada resulta em uma diminuição do desempenho da amostra. Além disso, no extrato bruto estão presentes outras xilanases que podem apresentar características diferentes da enzima purificada neste trabalho, como maior atividade em temperaturas mais elevadas. Desta forma, é possível que, para diversos processos industriais, a utilização de uma combinação de enzimas seja mais eficaz do que apenas uma determinada enzima pura (MILANEZI, 2010).

Os resultados obtidos neste trabalho coincidem com o resultado obtido por Silva, 2014 quando estudou a melhor temperatura de atividade para *Emericella nidulans* com temperatura ótima também a 55°C.

Medeiros et al. (2003) relataram como sendo de 40°C a temperatura em que xilanases do extrato bruto de *A. Níger* cultivado em meio líquido contendo xilana apresentam maior atividade. O extrato bruto do mesmo fungo, mas crescido em farelo de trigo, apresentou maior atividade a 48°C, apesar de ser estável entre 45 e 55° (ZHAO et al., 2002).

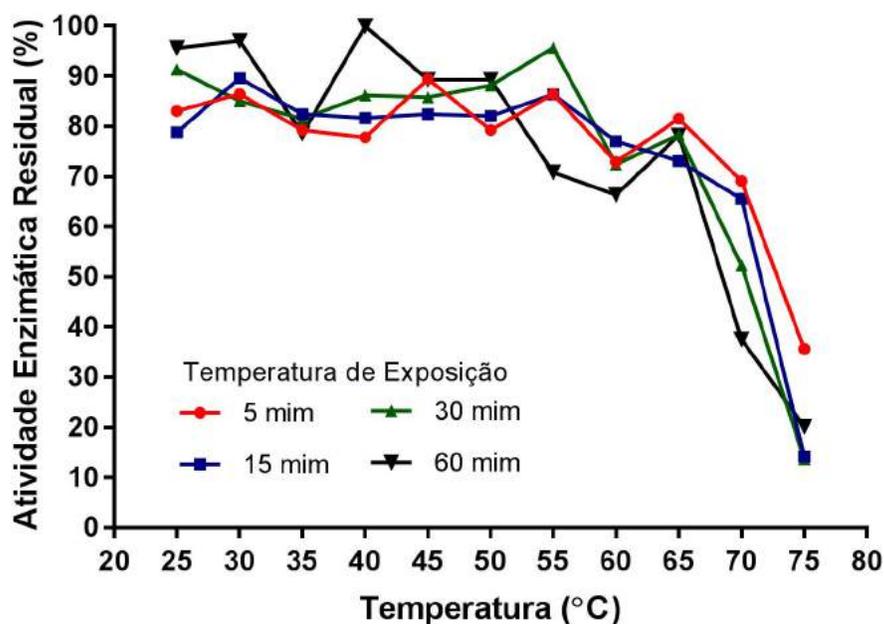
Lucena Neto; Filho, (2004) obteve para xilanase pura uma temperatura ótima na faixa de 55 a 60°C para o fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*.

Para a enzima pura, as condições ótimas para reação enzimática de xilanase do isolado *A. niger* foram determinadas como temperatura 50°C obtido por Almeida (2013). Resultados similares foram apresentados por Maciel (2006) que estudando diferentes linhagens de *A. niger* também obteve temperatura ótima de reação à 50°C.

A temperatura ótima na atividade de xilanase de *Fusarium solani* SYRN7 foi de 50°C. Quando a temperatura atingiu 60°C, a atividade relativa de xilanase retida era de cerca de 64,75% nas condições de ensaio utilizadas (ARABI et al., 2011).

A termoestabilidade da enzima foi testada para enzima bruta (figura 68) e para a enzima purificada (figura 69). Os testes foram realizados expondo a enzima nas temperaturas de 25 a 75°C retiradas em intervalos de 5, 15, 30 e 60 minutos. A atividade residual foi obtida utilizando o ensaio padrão em pH 6,5.

**Figura 68.** Temperatura de estabilidade da xilanase em extrato bruto obtido de isolado de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, PA\_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono em tampão acetato de sódio 0,1M pH 6,5.

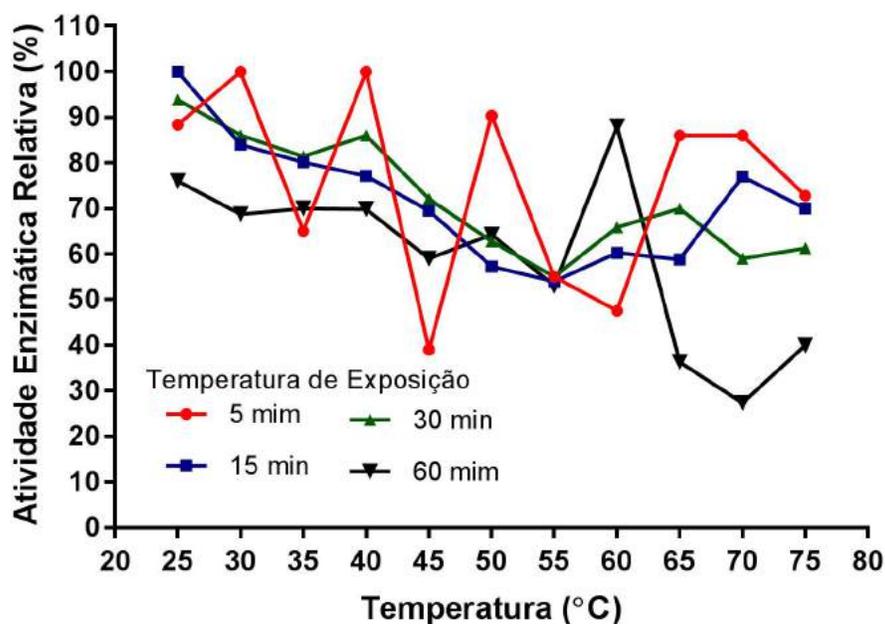


Fonte: Próprio autor

A enzima em extrato bruto apresentou estabilidade na faixa de 25 a 65°C para todos os intervalos de tempos testados com uma atividade residual de aproximadamente 80% (11,0 U mL<sup>-1</sup>). A 70°C podemos observar uma queda na atividade xilanolítica para todos os tempos de exposição testados e a 75°C a atividade residual foi inferior a 30%. Para a enzima purificada, figura 69, observa-se uma estabilidade inferior a obtida para enzima em extrato bruto, porém com um padrão de estabilidade semelhante, mas em escala diferente. A enzima apresentou maior atividade xilanolítica, quando esta foi exposta às temperaturas de 25 a 75 °C por 15 e 30 minutos, de modo que quando exposta a 75°C por 30 min, esta ainda apresentou uma atividade residual de 60%.

A baixa termoestabilidade de xilanase na forma purificada pode ser devido à separação de outras proteínas, corantes, carboidratos ou outros fatores estabilizantes presentes no EB. Para a aplicação desta enzima purificada em processos industriais de longa duração, fatores estabilizantes (tais como o etanol, poliois) teriam que ser adicionados (SILVA, 2014).

**Figura 69.** Temperatura de estabilidade da xilanase purificada obtido de isolado de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, PA\_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono em tampão acetato de sódio 0,1M pH 6,5.



Fonte: Próprio autor

A perda da termoestabilidade após a purificação foi também relatada em estudos de purificação de xilanase de *Thermotoga* sp. FjSS3-B (SIMPSON et al., 1991). A xilanase de extrato bruto concentrado (sobrenadante) de *Thermotoga* apresentou meia-vida superior a 20 min a 100°C, enquanto que a enzima purificada obteve meia-vida de 90 min a 95°C e 8 minutos a 100°C. De acordo com o autor, a redução da termoestabilidade da enzima purificada sugeriu que a xilanase poderia ser estabilizada por fatores presentes no extrato bruto ou por elevadas concentrações de proteína (SIMPSON et al., 1991).

#### 4.4.3.3. Influência de Íons metálicos na atividade xilanolítica.

A tabela 25 mostra o efeito de onze íons para a amostra em extrato bruto e amostra purificada, mantendo a concentração final de 5 mM para a atividade xilanolítica produzida por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

Comparado com o controle, nenhum dos íons testados estimulou a atividade xilanolítica, pelo contrário, a maioria dos íons promoveram uma diminuição significativa na atividade de xilanase tanto para amostra bruta como para a amostra purificada.

Estes podem ser casos de inibição não-competitiva do íon com um grupo funcional da enzima, como uma hidroxila, ou com um íon em um grupo prostético no sítio ativo da xilanase (SALAMA et al., 2008).

Para amostra bruta, o íon  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  foi o que apresentou maior inibição da atividade da enzima com 95,57% de inibição. Já  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  foi o íon que apresentou menor influência na atividade da enzima proporcionando uma inibição de 55,03%.

A atividade xilanolítica da enzima purificada também sofreu inibição por todos os íons testados. O íon  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  foi o que mais inibiu a atividade da enzima purificada (93%). A menor inibição foi promovida pelo íon  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  com 72%.

**Tabela 25.** Efeito dos íons na atividade da enzima em extrato bruto e enzima purificada obtido de isolado de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, PA\_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono.

| Íons                                      | Atividade da Enzima em Extrato Bruto ( $\text{mL}^{-1}$ ) | Atividade residual (%) | Atividade da Enzima Purificada ( $\text{mL}^{-1}$ ) | Atividade residual (%) |
|---|---|------------------------|---|------------------------|
| Controle                                  | 65,27±0,79  | 100                    | 3,13±0,45   | 100                    |
| $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 3,65±0,23   | 5,43                   | 0,28±0,04   | 9,06                   |
| NaCl                                      | 20,5±0,95   | 30,49                  | 0,57±0,02   | 18,27                  |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 15,62±1,46  | 23,23                  | 0,40±0,05   | 12,92                  |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 29,2±0  | 43,43                  | 0,88±0,21   | 28,07                  |
| $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 17,74±0,36  | 26,38                  | 0,71±0,1  | 22,73                  |
| BaCl <sub>2</sub>                         | 18,41±0,12  | 27,38                  | 0,55±0,10   | 17,68                  |
| $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 5,41±0,83   | 8,05                   | 0,22±0,02   | 6,98                   |
| KCl                                       | 19,55±0,23  | 29,08                  | 0,48±0,05   | 15,30                  |
| LiCl                                      | 20,56±0,63  | 30,57                  | 0,35±0,05   | 11,14                  |
| $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 18,86±0,12  | 28,04                  | 0,60±0,06   | 19,16                  |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 30,24±0,59  | 44,97                  | 0,59±0,09   | 18,86                  |

Fonte: Próprio autor

Guan et al. (2016) ao testar os íons  $K^+$ (1mM),  $Ca^{2+}$ (1mM),  $Ca^{2+}$ (5mM),  $Mg^{2+}$  (1mM),  $Mg^{2+}$ (5mM),  $Fe^{2+}$ (1mM),  $Cu^{2+}$ (1mM),  $Co^{2+}$ (1mM) e  $Mn^{2+}$ (1mM) para *Cladosporium oxysporum* obteve um resultado positivo em relação a produção de xilanase sem adição dos íons ( $36 U mL^{-1}$ ), com máximo de atividade xilanolítica de  $53,04 U mL^{-1}$  quando adicionou-se  $Mg^{2+}$ (5mM) e uma menor produção com o íon  $Cu^{2+}$  ( $0,24 U mL^{-1}$ ), o qual inibiu completamente a produção de xilanase.

Bankeeree et al. (2014) não observou alteração significativa na atividade xilanolítica para os íons  $CaCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CoCl_2$ ,  $ZnCl_2$  e EDTA em duas diferentes concentrações (1mM e 10mM), exceto  $Ca^{2+}$ , o qual influenciou de maneira igual a produção de xilanase para ambas as concentrações testadas (11%), enquanto  $Co^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  aumentou significativamente a atividade de xilanase somente com concentração de 10mM (6 e 11%, respectivamente).

A modificação química é um dos métodos mais uteis na identificação dos grupos funcionais de uma proteína. Na pesquisa básica, suas maiores aplicações estão na análise da sequência de aminoácidos e na identificação dos resíduos dos sítios catalíticos e de ligação das proteínas (GLAZER et al., 1987). Este tipo de procedimento causa mudanças na constante de Michaelis-Menten, e as vezes também uma queda na constante catalítica pode ser obtida pelo bloqueio deste com um reagente que cause pequena ou nenhuma alteração no tamanho, resultando em uma mudança na habilidade de ligação ao substrato (IMOTO & YAMADA, 1990). Sendo assim, os reagentes e as condições de reação devem ser escolhidos de acordo com as propriedades das proteínas e o propósito da investigação. (MILANEZI, 2010).

#### 4.4.3.4. *Influência de agentes modificadores na atividade xilanolítica.*

A modificação química de proteínas é uma técnica comumente usada para identificação de resíduos de aminoácidos no sítio catalítico e de ligação de uma proteína. Procedimentos envolvendo reagentes grupo-específicos, que resultam na modificação de um tipo específico de cadeia lateral de aminoácido, são úteis neste tipo de identificação (GLAZER et al., 1976).

Diversos agentes modificadores foram incubados com a enzima bruta e com a enzima pura a fim de se obter informações sobre sua influência na atividade xilanolítica.

Analisando a tabela 26 verificamos que nenhum dos agentes modificadores proporcionou aumento na atividade xilanolítica, tanto da amostra bruta quanto da enzima pura.

Os dados da incubação das amostras com DTT revelam uma diferença na atividade xilanolítica de acordo com a concentração usada. Com 1mM de DTT houve uma inibição da atividade xilanolítica de 91% para a enzima bruta e de 92% para a enzima pura. Com uma concentração de 10mM essa inibição foi menor, com 60% para a enzima bruta e 84% para a enzima purificada.

Era esperado que o DTT por apresentarem grupos sulfidríla e atuarem na redução de pontes dissulfeto não alterassem a atividade xilanolítica, entretanto, houve uma queda na atividade causada por DTT, a qual pode ser devido à quebra de pontes dissulfeto e alteração da estrutura nativa da enzima (CARDOSO e FILHO, 2003).

**Tabela 26.** Efeito dos agentes modificadores na atividade da enzima em extrato bruto e enzima purificada obtido de isolado de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, PA\_B1F6 oriundo de cultura de braquiária sob fermentação em estado sólido contendo farelo de trigo e xilana como fonte de carbono.

| Agentes Modificadores | Enzima Extrato Bruto (mL <sup>-1</sup> ) | Atividade Residual (%) | Enzima Pura (mL <sup>-1</sup> ) | Atividade Residual (%) |
|-----------------------|--|------------------------|---------------------------------|------------------------|
| Controle              | 65,27±0,79                               | 100                    | 3,13±0,45                       | 100                    |
| CTAB (0.1%)           | 24,07±1,34                               | 35,80                  | 0,53±0,01                       | 17,08                  |
| CTAB (1%)             | 17,04±0,32                               | 25,35                  | 0,64±0,03                       | 20,65                  |
| SDS (0.1%)            | 3,26±0,23                                | 4,85                   | 0,40±0,07                       | 12,92                  |
| SDS (1%)              | 4,04±0,39                                | 6,02                   | 0,88±0,18                       | 28,07                  |
| TWEEN (0.1%)          | 25,52±0,0                                | 37,96                  | 0,50±0,13                       | 15,89                  |
| TWEEN (1%)            | 20,25±2,01                               | 30,12                  | 0,47±0,1                        | 15,00                  |
| TRITON (0.1%)         | 23,12±1,10                               | 34,39                  | 0,31±0,01                       | 9,95                   |
| TRITON (1%)           | 22,85±0,11                               | 33,98                  | 0,58±0,09                       | 18,57                  |
| DTT (1mM)             | 5,94±2,9                                 | 8,84                   | 0,25±0,04                       | 7,87                   |
| DTT (10mM)            | 26,69±1,89                               | 39,70                  | 0,49±0,20                       | 15,89                  |

Fonte: Próprio autor

Os detergentes utilizados em laboratórios de biologia e bioquímica são surfactantes (= agentes que atuam na superfície) usados para romper a membrana das células (lise celular) e liberar o material intracelular na forma solúvel (JOHNSON, 2013). Eles atuam na quebra das interações proteína-proteína, proteína-lipídio e lipídio-lipídio; na desnaturação da estrutura

proteica; evitando ligações não específicas em abordagens imunoquímicas e na cristalização de proteínas (JOHNSON, 2013).

O detergente SDS, comumente atua como inibidor de xilanases (MILANEZI et al., 2011; DUARTE et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2010), e isso pode ser observado claramente para os dados da enzima bruta, a qual sofreu sua maior inibição quando comparada aos outros compostos, 95% com concentração de 0,1% e 94% com concentração de 1%. Já para a enzima bruta, esse composto não foi o que proporcionou maior inibição, com 87% a 0,1% de concentração e 72% a 1% de concentração.

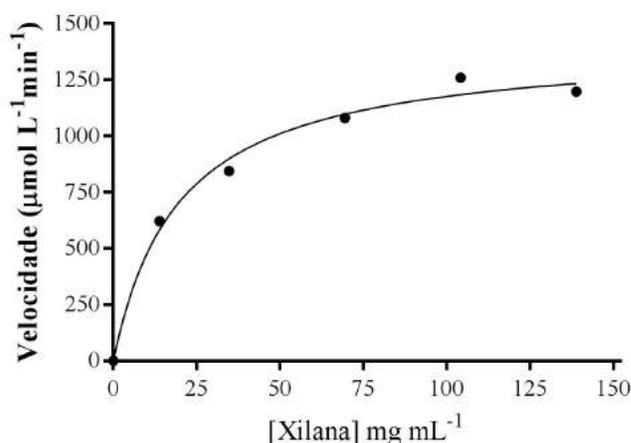
A ação do SDS foi observada em um trabalho de Rajagopalan, et al. (2013), em que este mostrou a maior inibição dentre todos os efetores. Na presença de 50 mM de SDS, a atividade da xilanase de *Clostridium* sp. BOH3 foi reduzida a 74 %.

#### 4.4.3.5. Determinação dos Parâmetros Cinéticos Aparentes

Neste trabalho, os parâmetros cinéticos foram estimados através do efeito da concentração do substrato para a enzima pura. Os resultados de atividade obtidos para as diferentes concentrações de substrato estão apresentados na figura 70. Como não houve inibição pelo substrato, dentro da faixa de valores estudados, concluiu-se que a cinética enzimática segue o modelo proposto por Michaelis-Menten (ANDRADE, 2014).

O valor das constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{max}$  são mostrados na tabela 27.

**Figura 70.** Efeito da concentração do substrato xilana birchwood na velocidade da reação catalisada pela xilanase pura.



Fonte: Próprio autor

É importante notar que enquanto o  $K_m$  é uma característica da enzima e de seu substrato e o seu valor independente da quantidade da enzima utilizada para a sua determinação experimental, o mesmo não é verdade para o  $V_{max}$ . Não existe um valor absoluto de  $V_{max}$  e o seu valor depende da quantidade de enzima usada (WILSON & WALKER, 2010).

O baixo valor encontrado para  $K_m$  demonstra que a enzima testada possui uma grande afinidade pelo substrato, com alta eficiência na conversão do substrato em produto. (GOMES, 2014).

**Tabela 27.** Parâmetros cinéticos estimados baseados no modelo de Michaelis-Menten.

| <b>Xilanase Pura</b>   |           |
|--|-----------|
| <b><math>K_m</math> (mg mL<sup>-1</sup>)</b>                               | 1,42±0,30 |
| <b><math>V_{m\acute{a}x}</math> (μmol L<sup>-1</sup> mim<sup>-1</sup>)</b> | 1415±79   |

**Fonte:** Próprio autor

Em seus estudos de purificação e caracterização de uma xilanase termoestável de *Actinomadura* sp. cepa Cpt2, Taibi e colaboradores (2012) determinaram os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ . Os valores encontrados foram de 1,55 mg mL<sup>-1</sup> e 781,71 μmol/min/mg, respectivamente. Xilana oat spelt foi utilizada como substrato.

Vikramathithan e colaboradores (2012) encontraram valores de  $K_m$  de 3,49 e 2,1 mg mL<sup>-1</sup>, usando xilana oat spelt como substrato. Os valores de  $V_{m\acute{a}x}$  foram de 10,4 e 8,9 μmol/min/mg para as xilanases de *Opuntia vulgaris* spp.

Andrade (2014) obteve em seus estudos com *Cryptococcus flavescens* os parâmetros  $K_m$  e  $V_{max}$  calculados foram 4,13 g L<sup>-1</sup> e 2,32 L mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

## 4.5. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

A análise das proteínas produzidas nos substratos de braquiária, farelo de trigo e farelo de trigo com xilana por SDS-PAGE mostrou que *Rhizoctonia solani* AG-1 IA produz diferentes proteínas, de acordo com a fonte de carbono utilizada.

A xilanase produzida por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA sob fermentação em estado sólido com farelo de trigo com xilana como fonte de carbono apresentou maior atividade em relação a produção somente em farelo de trigo. Neste caso, o extrato bruto obtido da fermentação em farelo de trigo com xilana foi utilizada no processo de purificação a qual deu-se em quatro etapas, ultrafiltração, seguida de precipitação com etanol e cromatografia de troca iônica com um fator de purificação de 0,2, atividade específica de  $6,5 \text{ U mg}^{-1}$  e com rendimento de 4% em relação a atividade inicial.

A xilanase purificada apresentou massa molecular estimada em 33,11 kDa, pH e temperatura ótima de 6,5 e 55 °C, respectivamente e apresentou estabilidade em pH na faixa de 4,0 a 7,0, porém apresentou uma faixa de estabilidade inferior à amostra em extrato bruto nas temperaturas testadas. A enzima em extrato bruto que apresentou estabilidade térmica na faixa de 25 a 65°C.

Todos os íons testados inibiram a atividade enzima da enzima, tanta para enzima bruta quanto para a enzima purificada. Para enzima pura o íon  $\text{AlCl}_3$  foi o que proporcionou maior diminuição na atividade da enzima em extrato bruto, já para a enzima purificada o íon  $\text{AlCl}_3$  foi o que mais afetou a ação da enzima.

Dentre os agentes modificadores testados não foi observado nenhuma influência positiva na atividade enzimática da enzima em extrato bruto e enzima purificada. Na enzima bruta o SDS numa concentração de 0,1%, porém na análise da enzima pura o agente que causou maior inibição foi o DDT numa concentração de 1mM.

As constantes cinéticas para a xilanase pura foram  $K_m$  de  $0,0014 \text{ g mL}^{-1}$ ,  $V_{\text{max}}$  de  $9,4 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Estes dados nos mostram que a enzima apresentou uma alta especificidade pelo substrato.

## 4.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. **Seleção de fungos filamentosos produtores de xilanases e celulases utilizando resíduos agroindustriais**. 45 f. 2013. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais)-Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2013.

ANDRADE, C. C. P. **Produção, purificação e caracterização de xilanase termoestável produzida por *Cryptococcus flavescens* e expressão em *Pichia pastoris***. 184 f. 2014. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2014.

ANNIS, S. L.; GOODWIN, P. H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, 103: 1-14, 1997.

ARABI, M. I. E; BAKRI, Y.; JAWHAR, M. Extracellular Xylanase Production by *Fusarium species* in Solid State Fermentation. **Polish Journal of Microbiology**, Bydgoszcz, v. 60, n. 3, p. 209-212, 2011.

BANKEEREE, W. et al. Effect of polyols on thermostability of xylanase from a tropical isolate of *Aureobasidium pullulans* and its application in prebleaching of rice straw pulp. **Springer Plus**, Heidelberg, v. 3, n. 37, p. 1-11, 2014.

CAI, H. et al. A novel thermoacidophilic family 10 xylanase from *Penicillium pinophilum* C1. **Process Biochemistry**, London, v. 46, n. 12, p. 2341-2342, 2011.

CANILHA, L. et al. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte3: Polissacarídeos e Enzimas. **Revista Analytica**, São Paulo, v. 20, p. 32-41, Dez./ jan. 2005/06.

CARDOSO, O. A. V.; FILHO, E. X. Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 223, p. 309-314, 2003.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 5-23, 2005.

DUARTE, G. C. et al. Use of Residual Biomass from the Textile Industry as Carbon Source for Production of a Low-Molecular-Weight Xylanase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Sciences**, Basel, v. 2, n. 4, p. 754-772, 2012.

- FILHO, E. X.; PULS, J.; COUGHLAN, M. P. Physicochemical and catalytic properties of a low-molecular-weight endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase from *Myrothecium verrucaria*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 15, n. 6, p. 535-540, 1993a.
- FILHO, E. X. F.; PULS, J.; COUGHLAN, M. P. Biochemical characteristics of two endo-  $\beta$ -1,4-D-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. **Journal of Industrial Microbiology**, Heidelberg, v. 11, n. 3, p. 171-180, 1993b.
- GLAZER, A. N.; DELANGE, R. J.; SIGMAN, D. S. Chemical modification of proteins. In: WORK, T. S.; WORK, E. (Ed.). **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology**. Amsterdam: North-Holland, 1976. v. 4. p. 3-205.
- GLAZER, A. N.; DELANGE, R. J.; SIGMAN, D. S. **Chemical Modification of Proteins: Selected Methods and Analytical Procedures**. Amsterdam: Elsevier Medical Press, 1987.
- GOMES, K. S. Purificação e caracterização de xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis* e utilização na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. 72 f. 2014. Dissertação (Mestrado em *Magister Scientiae*)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.
- GONG, X. et al. Biochemical analysis of a high specific, pH stable xylanase gene identified from a bovine rumen-derived metagenomic library. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin v. 97, n. 6, p. 2423-2431, 2013.
- GUAN, G-Q. et al. Production and Partial Characterization of an Alkaline Xylanase from a Novel Fungus *Cladosporium oxysporum*. **BioMed Research International**, New York, v. 2016, p. 1-7, 2016. Article ID 4575024. DOI: dx.doi.org/10.1155/2016/4575024. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/4575024/>>. Acesso em: 15 de Outubro de 2016.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 48, n. 2, p. 422-427, dec. 1972.
- IMOTO T.; YAMADA, H. Chemical Modification. In: Creighton, T. E. (Ed.). **Protein Function: A Practical Approach**. Oxford: IRL Press, 1990. p. 247-278.
- JOHNSON, M. Detergentes: Triton X100, Tween-20 e mais. **Materiais e Métodos**, Princeton, v. 3, n. 163, 2013. DOI: dx.doi.org/10.13070/mm.pt.3.163. Disponível em: <<http://www.labome.com.br/method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.html>>. Acesso em: 05 de Outubro de 2016.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xilanases. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 411-456, 1999.

JUNPEI, Z. et al. Production and Characterization of Etanol- and Protease-Tolerant and Xylooligosaccharides-Producing Endoxylanase from *Humicola* sp. Ly01. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 23, n. 6, p. 794-801, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, n. 227, p. 680-685, 1970.

LAFOND, M. et al. GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production. **Microbial Cell Factories**, London, v. 10, n. 20, p. 20-28, 2011.

LUCENA-NETO, S. A.; FILHO, E. X. Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola* grisea var. *Thermoidea*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, p. 86-90, 2004.

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. 146 f. 2006. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

McILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 49, p. 183-186, 1921. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/49/1/183.full.pdf?sid=f3ab0229-6d31-41ea-a372-bf85cff82df8>>. Acesso em: 23 de Setembro de 2016.

MEDEIROS, R. G.; HANADA, R.; FERREIRA FILHO, E. X. Production of xylan- degrading enzymes from Amazon Forest fungal species. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v. 52, n. 2, p. 97-100, 2003.

MERIL, C. R. **Gel-staining techniques**. In *Methods in Enzymology*, Deutscher, M. P. ed., New York: Academic Press, 1990.v. 182, p. 477-488.

MILANEZI, N. V. **Purificação e caracterização de uma endo-1,4- $\beta$ -xilanase produzida por *Aspergillus niger* com características de interesse industrial**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2010.

MILANEZI, N. V. G. et al. Isolation and Characterization of a Xylan-Degrading Enzyme from *Aspergillus niger* van Tieghem LPM 93 with Potential for Industrial Applications. **BioEnergy Research**, New York, v. 3, n. 2, 2011.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOREIRA, L. R. S. et al. The use of lignocellulosic substrates as carbon sources for production of xylan-degrading enzymes from *Acrophialophora nainiana*. **Current Topics in Biochemical Research**, Kerala, v. 10, n. 2, p. 35-45, 2008.

PASSARINHO, A. T. P. **Produção e caracterização de xilanases derivadas do gene xyna de *Orpinomyces* PC-2 e avaliação da eficiência para hidrólise de farinha e clarificação de sucos**. 2014. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

POLIZELI, M. L. T. M. Bioprospecção de fungos filamentosos produtores de holoenzimas com aplicação em biorefinaria. CNPq - SISBIOTA-Brasil. **Processo FAPESP: 10/52322-3. 2011-2014.**

PUNT, P. J. et al. Fungal Protein Production: Design and Production of Chimeric Proteins. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 65, p. 57-69, 2011.

RAJAGOPALAN, G. et al. Production, purification and characterization of a xylooligosaccharides-forming xylanase from high-butanol-producing strain *Clostridium* sp. BOH3. **BioEnergy Research**, New York, v. 6, n. 2, p. 448-457, June 2013.

SALAMA, M. A. et al. Biochemical studies of purified xylanases from *Aspergillus versicolor*. **International Journal of Botany**, Faisalabad, v. 4, n. 1, p. 41-48, 2008.

SÁ-PEREIRA, P. et al. A new look at xylanases: an overview of purification strategies. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 24, p. 257-281, 2003.

SILVA, C. O. G. ***Emericella nidulans* e bagaço de cana-de-açúcar: ferramentas para produção de endo- $\beta$ -1,4-xilanase**. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

SIMPSON, H. D.; HAUFLER, U. R.; DANIEL, R. M. An extremely thermostable xylanase from the *thermophilic eubacterium Thermotoga*. **The Biochemical Journal**, London, v. 277, n. 15, p. 413-417, 1991.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 22, n. 1, p. 33-64, 2002.

TAIBI, Z. et al. Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. strain cpt20 isolated from poultry compost. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v.166, p. 663-679, 2012.

TEIXEIRA, R. S. S. et al. Purification and characterization studies of a thermostable  $\beta$ -xylanase from *Aspergillus awamori*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 37, n. 10, p. 1041–1051, 2010.

VERMA, D. et al. Cloning, Expression and Characteristics of a Novel Alkalistable and Thermostable Xylanase Encoding Gene (*Myxl*) Retrieved from Compost-Soil Metagenome. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2013.

VIKRAMATHITHAN J. et al. Purification and biochemical characterization of two major and thermophilic xylanase isoforms (T70 and T90) from Xerophytic *Opuntia vulgaris* plant spp. **Cellulose**, Dordrecht, v. 19, n. 4, p. 1373-1383, 2012.

WANG, P.; MASON, C.; BRODA, P. Xylanases from *Streptomyces cyaneus*: their production, purification and characterization. **Journal of General Microbiology**, London, v. 139, p. 1987-1993, 1993.

WANG, Z. et al. A novel alkali-tolerant thermostable xylanase from *Saccharomonospora viridis*: direct gene cloning, expression and enzyme characterization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 28, n. 8, p. 2741-2748, 2012.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7<sup>th</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. 761p.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. **Microbiological Reviews**, Washington, v.52, n. 3, p. 305-317, 1988.

ZHAO, J. et al. Xylanase pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat straw. **Enzyme and Microbial Tehnology**, Philadelphia, v. 30, n. 6, p. 734-740, 2002.

# **CAPITULO 5**

---

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## 5.1. CONCLUSÃO GERAL

Com base nos estudos realizados no decorrer deste projeto, foi possível concluir que:

- O fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA possui grande potencial para degradação de resíduos agroindustriais.
- Os isolados obtidos de cultura de braquiária e soja foram os que apresentaram melhor produção das enzimas analisadas.
- Os substratos de farelo de trigo, braquiária triturada e palha de soja foram os que apresentaram maior produção enzimática e o melhor tempo de produção foi de 120h.
- A temperatura ótima para xilanase em extrato bruto produzida por fermentação em estado sólido com farelo de trigo foi de 55°C com atividade residual em até 80°C. O pH foi de 6,0, 6,5 e 7,5 para os isolados de arroz, braquiária e soja respectivamente, com uma faixa de estabilidade de 4,0 a 7,5.
- A análise em SDS-PAGE para os diferentes substratos mostrou a produção de diferentes enzimas de acordo com a fonte de carbono.
- A produção de xilanase por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA quando cultivada em farelo de trigo com xilana foi superior comparada a produção somente com farelo de trigo.
- Na purificação parcial da xilanase por cromatografia em gel por coluna Sephacryl S-200 podemos identificar a massa aproximada de 32 kDa para a enzima.
- Na literatura encontrou-se apenas 35 sequências descritas para xilanase para a espécie de fungo *Rhizoctonia solani*, porém não há sequência de xilanase descrita para *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.
- De acordo com SDS-PAGE a produção enzimática para cultivo com farelo de trigo e farelo de trigo com xilana foi a mesma, porém através da análise bioquímica podemos verificar que a produção da xilanase foi bem superior quando adicionado xilana ao farelo de trigo.

- A xilanase purificada apresenta massa molecular de 33,11 kDa, pH e temperatura ótima de 6,5 e 55°C, com estabilidade de pH na faixa de 4,0 a 7,0, porém com baixa estabilidade térmica.
- Todos os íons e agentes modificadores testados inibiram a atividade enzimática tanto para extrato bruto quanto para a enzima pura.
- As constantes cinéticas observadas para a xilanase pura demonstraram que a enzima apresenta alta especificidade pelo substrato, porém baixa eficiência na conversão do substrato em produto.

## 5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em continuidade ao estudo realizado nessa tese, sugere-se:

- Análise da proteína por espectrometria de massa;
- Determinação do N-terminal da xilanase produzida por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA;
- Design de PCR para amplificação do gene da xilanase de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA;
- Clonagem e Expressão do gene de xilanase em *Pichia pastoris*;
- A caracterização da enzima expressa, como: condições ótimas de operação, estabilidade, parâmetros cinéticos, e cofatores;
- Aplicação da enzima clonada em processos industriais.

# Anexos:

## Anexo 1:

Os Isolados das culturas de arroz, braquiária e soja foram cedidos da coleção de fungos fitopatogênicos do Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos da Faculdade de Engenharia, UNESP - Campus de Ilha Solteira, sob responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Ceresini, os quais foram isolados nos estados do Mato Grosso, Roraima, Tocantins, Maranhão, Pará e Rondônia. Os dados dos pontos de coleta foram georreferenciados e estão dispostos nas tabelas 2, 3 e 4, de acordo com o tipo de cultura.

**Tabela 1.** Dados de georreferenciamento dos isolados de culturas de Arroz.

| <b>Código isolado</b> | <b>Latitude</b> | <b>Longitude</b> | <b>Código isolado</b> | <b>Latitude</b> | <b>Longitude</b> |
|-----------------------|-----------------|------------------|-----------------------|-----------------|------------------|
| RR_A43                | +03 06 00       | -60 49 00        | RR_A21                | +03 06 00       | -60 49 00        |
| RR_A41                | +03 06 00       | -60 49 00        | RR_A23                | +03 06 00       | -60 49 00        |
| RR_A37                | +03 06 00       | -60 49 00        | RR_A24                | +03 06 00       | -60 49 00        |
| RR_A2                 | +03 06 00       | -60 49 00        | RR_A27                | +03 06 00       | -60 49 00        |
| RR_A4                 | +03 06 00       | -60 49 00        | RR_A30                | +03 06 00       | -60 49 00        |
| RR_A5                 | +03 06 00       | -60 49 00        | RR_A31                | +03 06 00       | -60 49 00        |
| RR_A6                 | +03 06 00       | -60 49 00        | RR_A32                | +03 06 00       | -60 49 00        |
| RR_A7                 | +03 06 00       | -60 49 00        | RR_A33                | +03 06 00       | -60 49 00        |
| RR_A9                 | +03 06 00       | -60 49 00        | RR_A37                | +03 06 00       | -60 49 00        |
| RR_A10                | +03 06 00       | -60 49 00        | RR_A42                | +03 06 00       | -60 49 00        |
| RR_A12                | +03 06 00       | -60 49 00        | RR_A45                | +03 06 00       | -60 49 00        |
| RR_A13                | +03 06 00       | -60 49 00        | RR_A47                | +03 06 00       | -60 49 00        |
| RR_A19                | +03 06 00       | -60 49 00        | RR_A49                | +03 06 00       | -60 49 00        |

Fonte: próprio autor

**Tabela 2.** Dados de georreferenciamento dos isolados de culturas de *Braquiária* sp.

| <b>Código isolado</b> | <b>Latitude</b> | <b>Longitude</b> | <b>Código isolado</b> | <b>Latitude</b> | <b>Longitude</b> |
|-----------------------|-----------------|------------------|-----------------------|-----------------|------------------|
| RO_B1E3               | -09 29 12.3     | -63 23 56.9      | ROB1B3                | -09 29 12.3     | -63 23 56.9      |
| PA_B1F6               | -02 53 45.5     | -47 33 27.9      | ROB3B4                | -10 42 30.4     | -62 27 20.4      |
| PA_B1B6               | -02 53 45.5     | -47 33 27.9      | ROB4D1                | -10 41 25.7     | -62 29 05.2      |
| ROB2C3                | -09 50 29.2     | -63 39 39.7      | ROB2D4                | -09 50 29.2     | -63 39 39.7      |
| ROB2C2                | -09 50 29.2     | -63 39 39.7      | ROB3A6                | -10 42 30.4     | -62 27 20.4      |
| ROB2E1                | -09 50 29.2     | -63 39 39.7      | ROB1A3                | -09 29 12.3     | -63 23 56.9      |
| ROB2A1                | -09 50 29.2     | -63 39 39.7      | ROB2C8                | -09 50 29.2     | -63 39 39.7      |
| ROB2E2                | -09 50 29.2     | -63 39 39.7      | ROB1A7                | -09 29 12.3     | -63 23 56.9      |

| Continuação tabela 2. |             |             |                |             |             |
|-----------------------|-------------|-------------|----------------|-------------|-------------|
| Código isolado        | Latitude    | Longitude   | Código isolado | Latitude    | Longitude   |
| ROB2D5                | -09 50 29.2 | -63 39 39.7 | ROB2E6         | -09 50 29.2 | -63 39 39.7 |
| ROB1E7                | -09 29 12.3 | -63 23 56.9 | ROB1A2         | -09 29 12.3 | -63 23 56.9 |
| ROB1D7                | -09 29 12.3 | -63 23 56.9 | RO_PV_SOB3     | -           | -           |
| ROB1C2                | -09 29 12.3 | -63 23 56.9 | ROB4D3         | -10 41 25.7 | -62 29 05.2 |
| ROB4C5                | -10 41 25.7 | -62 29 05.2 | ROB2C6         | -09 50 29.2 | -63 39 39.7 |
| ROB2C1                | -09 50 29.2 | -63 39 39.7 | ROB4D7         | -10 41 25.7 | -62 29 05.2 |
| ROB3A2                | -10 42 30.4 | -62 27 20.4 | ROB3D4         | -10 42 30.4 | -62 27 20.4 |
| ROB2B6                | -09 50 29.2 | -63 39 39.7 | ROB2C5         | -09 50 29.2 | -63 39 39.7 |
| ROB2D2                | -09 50 29.2 | -63 39 39.7 | ROB3B3         | -10 42 30.4 | -62 27 20.4 |
| ROB2E7                | -09 50 29.2 | -63 39 39.7 | ROB4B8         | -10 41 09.8 | -62 28 49.9 |

Fonte: próprio autor

**Tabela 3.** Dados de georreferenciamento dos isolados de culturas de Soja.

| Código isolado | Latitude | Longitude | Código isolado | Latitude | Longitude |
|----------------|----------|-----------|----------------|----------|-----------|
| TC98BR_S_037   | -16.33 S | -55.93 W  | TO_058         | -8.97 S  | -48.17 W  |
| TC98BR_S_053   | -16.33 S | -55.93 W  | TO_062         | -8.97 S  | -48.17 W  |
| MT_S001        | -12.60 S | -55.75 W  | MA_192         | -7.52 S  | -46.05 W  |
| MT_S_121       | -16.33 S | -55.93 W  | MA_217         | -7.52 S  | -46.05 W  |
| MT_S004        | -12.60 S | -55.75 W  | MA_283         | -7.52 S  | -46.05 W  |
| MT_S007        | -12.60 S | -55.75 W  | MT_S085        | -16.33 S | -55.93 W  |
| MT_S018        | -12.60 S | -55.75 W  | TO_064         | -8.97 S  | -48.17 W  |
| PA_002         | -12.60 S | -55.75 W  | TO_136         | -8.97 S  | -48.17 W  |
| MA_159         | -7.52 S  | -46.05 W  | MA_278         | -7.52 S  | -46.05 W  |
| MA_170         | -7.52 S  | -46.05 W  | MA_275         | -7.52 S  | -46.05 W  |
| TO_022         | -8.97 S  | -48.17 W  | MA_281         | -7.52 S  | -46.05 W  |
| TO_033         | -8.97 S  | -48.17 W  | MA_005         | -12.60 S | -55.75 W  |
| TO_034         | -8.97 S  | -48.17 W  |                |          |           |

Fonte: Próprio autor