

Roberta Gabriela Marto Mingote

**Produção e caracterização parcial da xilanase  
produzida por *Aspergillus* sp**

Araraquara  
2015

Roberta Gabriela Marto Mingote

**Produção e caracterização parcial da xilanase  
produzida por *Aspergillus* sp**

Monografia

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”-UNESP para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti  
Co- orientador: Julian Paul Martinez

Araraquara  
2015

**Dedico este trabalho à minha mãe Olga, por ser meu exemplo de determinação e boa índole, princípios que regem a minha vida. E à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara pela oportunidade de desenvolvimento pessoal e profissional.**

## **Agradeço**

A Deus, por Se fazer presente no meu dia a dia, guiando e iluminando meus caminhos.

Ao Prof. Dr. Rubens Monti, pela orientação, pela amizade, pelo carinho e por seus ensinamentos. O senhor foi essencial não só no desenvolvimento desta pesquisa como também em minha vida, sendo um exemplo de honestidade e de profissionalismo. Obrigada por todo o conhecimento transmitido e por confiar no meu trabalho.

Ao meu co-orientador e amigo Julian Paul Martínéz, por infinitos auxílios na pesquisa e pelas valiosas informações cedidas. Também pelas conversas e risadas no laboratório.

Aos meus colegas de laboratório: Antônio, Jú, Andrea, Clariana e Fernando por terem me acolhido e serem exemplos de dedicação e de amor pela pesquisa. A alegria de vocês tornou o ambiente de trabalho mais sereno.

Aos meus professores da graduação, especialmente ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa que, além de professor e de tutor, foi um grande amigo. Obrigada por me mostrar que humildade é um dos mais nobres valores que o ser humano pode e deve ter.

Aos meus colegas da turma 82, particularmente ao meu amado Five: Flávia, Larissa, Mariane e Rone. Vocês são a família que Deus me permitiu escolher. Obrigada por tornarem os momentos difíceis suportáveis e por trazerem paz para os meus dias. Vocês fizeram destes, os seis melhores anos da minha vida e estarão para sempre em meu coração.

Aos meus amigos de Jundiaí: Gabriela, Juliana, Camila, Nathália, Lucas e Samuel por entenderem minha ausência. Amizade verdadeira é um amor que nunca morre e a distância aproximou ainda mais os nossos corações.

Ao meu companheiro e parceiro de todos os momentos, Diego. Obrigada por ser anjo em minha vida, por dividir loucuras, por compartilhar bons sentimentos e trazer sempre boas energias.

Aos meus familiares por serem meus alicerces. Apesar de toda a saudade, o apoio de vocês foi fundamental para a concretização deste sonho.

Ao meu pai que, do céu, sempre se fez presente protegendo meu destino e indicando a direção a seguir. Saudades para sempre.

A minha mãe, pelo amor incondicional. Obrigada por nunca medir esforços para me proporcionar uma excelente educação. Você é meu porto seguro e seus ensinamentos fizeram eu me tornar quem sou hoje.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura da xilana. ....	17
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática de uma molécula de xilana e das enzimas do sistema xilanolítico. ....	18
<b>Figura 3</b> - Estrutura da molécula da xilana e ação das xilanases. Endo- $\beta$ -1,4-xilanases hidrolisam as ligações glicosídicas $\beta$ ,1-4 internas das molécula de xilana liberando xilooligossacarídeos. As $\beta$ -xilosidades liberam xilose a partir da xilobiose ou xilooligossacarídeos curtos. ....	19
<b>Figura 4</b> - Cálculo da atividade enzimática. ....	26
<b>Figura 5</b> - Cálculo da concentração de proteínas. ....	29
<b>Figura 6</b> - Curva analítica da xilose. ....	34
<b>Figura 7</b> - Curva de referência para determinação de proteína pelo método de Lowry (1951) modificado por Hartree (1972). ....	35
<b>Figura 8</b> - Efeito do pH na atividade xilanolítica do filtrado de <i>Aspergillus</i> sp (clade <i>niger</i> ). ....	37
<b>Figura 9</b> - Efeito da temperatura na atividade xilanolítica do filtrado de <i>Aspergillus</i> sp (clade <i>niger</i> ), ....	38
<b>Figura 10</b> - Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise da xilana de "beechwood" pela xilanase de <i>Aspergillus</i> sp (clade <i>niger</i> ), em diferentes tempos e utilizando como padrão a xilose. ....	39
<b>Figura 11</b> - Gel de SDS-PAGE 12% corado com prata com marcador de massa molecular, extrato dialisado de <i>Aspergillus</i> sp (clade <i>niger</i> ) nas concentrações 5,0 $\mu$ L (1-a), 10,0 $\mu$ L (1-b) e 15,0 $\mu$ L (1-c) e extrato bruto nas concentrações 15,0 $\mu$ L (2-a), 20,0 $\mu$ L (2-b) e 25,0 $\mu$ L (2-c). ....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Obtenção da curva analítica de xilose .....	25
<b>Tabela 2</b> - Obtenção da curva analítica para dosagem de proteínas totais .....	29
<b>Tabela 3</b> - Dosagem de proteínas nos diferentes extratos .....	30
<b>Tabela 4</b> - Quantificação de proteínas e atividade específica da xilanase produzida por <i>Aspergillus</i> sp (clade <i>niger</i> ) utilizando pó de sabugo de milho como fonte de Carbono .....	36
<b>Tabela 5</b> - Efeito da concentração do filtrado de xilana .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Sigma$  Abs= somatória das absorbâncias

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar

$\Sigma_t$  = somatória dos tempos

A = atividade enzimática

BSA = albumina de soro bovino

Da; kDa = dalton; kilodalton

DNS = ácido dinitrossalicílico

MM = massa molecular

Prot. = Concentração de proteína

SDS = dodecilsulfato de sódio

$V_e$  = volume total de enzima

XOS = xilooligossacarídeos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	10
1.1	Fungos filamentosos	12
1.2	Gênero <i>Aspergillus</i>	13
1.3	Enzimas	15
1.4	A xilana e o sistema xilanolítico	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	20
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	21
3.1.1	Isolamento e manutenção do microrganismo em meio sólido inclinado ágar-aveia	21
3.1.2	Crescimento do microrganismo em meio de cultivo Vogel	21
3.1.3	Obtenção de esporos e inoculação	23
3.1.4	Determinação da atividade da xilanase	24
3.1.5	Curva padrão da xilose	24
3.1.6	Determinação da atividade xilanolítica dos extratos brutos	25
3.1.7	Cálculo da atividade da xilanolítica	26
3.1.8	Determinação da concentração de proteína	27
3.1.9	Curva analítica da BSA	28
3.1.10	Cálculo da quantidade de proteínas	29
3.1.11	Dosagens de proteína pelo método de Hartree (1972)	30
3.1.12	Precipitação das proteínas com Sulfato de amônio	31
3.1.13	Determinação da atividade xilanolítica do extrato dialisado	31
3.1.14	Determinação do pH de máxima atividade da xilanase	32
3.1.15	Determinação da temperatura de máxima atividade da xilanase	32
3.1.16	Cromatografia em camada delgada	32
3.1.17	Eletroforese	33
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	34



<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>DADOS FINAIS</b> .....	<b>53</b>

## RESUMO

As xilanases são enzimas que hidrolisam as ligações 1,4- $\beta$ -xilósídicas da xilana e que possuem potencial biotecnológico em vários processos industriais, como na clarificação de sucos e vinhos, na fabricação de pães, na produção de biocombustíveis e no tratamento das polpas celulósicas. Além disso, os produtos de hidrólise da xilana, xilooligossacarídeos, podem ser utilizados como ingredientes prebióticos, ou seja, ingredientes nutricionais não digeríveis que estimulam seletivamente a proliferação e a atividade de bactérias benéficas do cólon. O uso de enzimas microbianas nas indústrias se dá devido às suas diversas vantagens sobre os métodos químicos e à facilidade de obtenção do microrganismo. Assim, os objetivos deste trabalho foram: produzir e caracterizar parcialmente a xilanase de *Aspergillus* sp isolado de pó de café utilizado, purificar parcialmente a enzima produzida e analisar os produtos de hidrólise da xilana. O *Aspergillus* sp mostrou-se bom produtor de xilanase quando o pó de sabugo de milho foi utilizado como fonte de carbono e a xilanase produzida apresentou melhor atividade específica quando o período de cultivo foi de 168 horas. Os processos de precipitação de proteínas e diálise promoveram o aumento da atividade específica do extrato. A xilanase de *Aspergillus* sp apresentou pH e temperatura de máxima atividade semelhantes aos de produzidas por *Aspergillus niger* isolados de outras fontes. A hidrólise da xilana produziu xilose e xilooligossacarídeos. Além da xilanase, o fungo revelou ser produtor de outras proteínas que podem ser estudadas em pesquisas futuras

**Palavras-chave:** Xilanases. Xilose. Xilana. Produção de xilooligossacarídeos.

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de enzimas microbianas vem ganhando destaque em processos biotecnológicos industriais devido à diversidade de microrganismos disponíveis, à facilidade de obtenção dos mesmos, ao menor consumo energético e à maior velocidade de reação em relação aos catalisadores químicos. (MUSSATO; FERNANDES; MILAGRES, 2007). O fato de serem biodegradáveis, atóxicas e derivadas de fontes renováveis também as tornam fontes interessantes e atrativas sob ponto de vista ecológico e econômico.

Com o objetivo de melhorar procedimentos e produtos já existentes ou estabelecer novos processos, atualmente, as enzimas são aplicadas na produção de alimentos, na síntese de fármacos, no diagnóstico e prognóstico de doenças, na indústria têxtil, de papel e celulose e de detergentes, em rações, no tratamento de efluentes e no desenvolvimento de novos cosméticos e de biocombustíveis. (PEREIRA, 2012; MUSSATO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

Os fungos filamentosos são os maiores produtores de enzimas devido à facilidade de cultivo e à secreção, em larga escala, de enzimas extracelulares (PEREIRA, 2012), sendo o *Trichoderma* sp, o *Saccharomyces* sp, o *Rhizopus* sp, o *Humicola* sp e o *Aspergillus* sp os gêneros mais utilizados na indústria. (TURNER, 1975; BIGELIS, 1985; GODFREY; WEST, 1996; BENNET, 1998). As grandes empresas fabricantes de enzimas são de origem holandesa (Gist-Brocades), finlandesa (Genencor International) e dinamarquesa (Novo Nordisk). (DAMASO; FARINAS; SALUM, 2013). O Brasil, apesar de importar enzimas, revela-se como um potencial produtor pela elevada geração de

resíduos agroindustriais e conversão de substratos em produtos agrícolas como farelo de trigo, farelo de algodão, casca de soja e outros. (ALBANO, 2012).

As principais enzimas utilizadas no setor industrial são proteases, amilases, lipases, celulases, fitases e xilanases. As xilanases degradam a xilana e sua produção se dá principalmente por *Aspergillus* sp e *Trichoderma* sp. Elas podem ser empregadas em rações animais, elevando a digestibilidade e absorção de nutrientes; na indústria alimentícia, como por exemplo, na panificação, melhorando a qualidade do pão e aumentando sua vida de prateleira e no processamento de sucos, frutas e vegetais, sendo utilizadas na clarificação de sucos e vinhos. (BIELY, 1985; POLIZELLI et al., 2005; MUSSATO; FERNANDES; MILAGRES, 2007). Outra aplicação é na indústria de papel, promovendo o branqueamento de polpas *Kraft*. Além disso, os produtos de hidrólise da xilana, os xilooligossacarídeos (XOS), podem auxiliar na digestão e na absorção de açúcares e na proteção contra doenças cardiovasculares e contra o câncer do colo retal. (MENEZES; DURRANT, 2008). Na indústria farmacêutica, a xilanase é pouco utilizada em suplementos alimentares. (POLIZELLI et al., 2005). Recentemente, ela também vem sendo empregada na produção de etanol de 2ª geração. (ZANETTI, 2012).

Hoje, a ampla diversidade de enzimas faz com que as mesmas sejam aplicadas em diferentes setores da indústria, intensificando a busca por novas fontes produtoras.

### **1.1 Fungos filamentosos**

Os fungos são organismos eucarióticos quimioheterotróficos pertencentes ao reino Fungi. (TORTORA et al., 2012). A maioria é aeróbio obrigatório com exceção de algumas leveduras que são fermentadoras anaeróbias facultativas. Acumulam glicogênio como material de reserva e nutrem-se por absorção de substâncias após digestão extracorpórea, realizada por enzimas sintetizadas e secretadas sobre a matéria orgânica do ambiente. (PEREIRA, 2012). Reproduzem-se assexuadamente ou sexuadamente. O ciclo parassexuado também é descrito na literatura (OLIVEIRA, 2009).

Como fontes de carbono utilizam, preferencialmente, carboidratos simples, como a glicose, mas também podem consumir sacarose, maltose, amido e celulose. Além disso, substâncias inorgânicas (amônia ou nitratos) ou orgânicas (peptona, sulfatos e fosfatos) podem ser fontes de nitrogênio. Em menor quantidade, necessitam de alguns oligoelementos (ferro, zinco, manganês, cobre, cálcio, por exemplo) e de vitaminas para o seu crescimento. (TRABULSI et al., 1999). A maioria dos fungos se desenvolve em meios ácidos, com pH em torno de 5,0 e com atividade de água na faixa de 0,8. (RODRIGUES, 2006; NETO, FIGUEIRÊDO, QUEIROZ, 2005). Eles podem ser encontrados em diversas temperaturas, sendo classificados como fungos psicrófilos, mesófilos e termófilos.

De acordo com a morfologia, são divididos em unicelulares (leveduras) ou multicelulares (mofos e bolores). (RAVEN et al., 2001). O corpo de um fungo multicelular ou filamentosos, como é conhecido, é formado pelo micélio, uma rede de filamentos constituídos por células alinhadas e conectadas, as hifas. As hifas podem se dividir em unidades celulares uninucleadas, compondo as hifas septadas. Os poros presentes nos septos fazem com que haja

comunicação com o citoplasma das células. A classe de fungos onde as hifas não são septadas, chamadas de cenocíticas, é visualizada como uma estrutura contínua composta de vários núcleos. (CARDOSO, 2011). Os fungos apresentam um micélio vegetativo, cujas hifas geralmente penetram no meio em busca de nutrientes e um micélio de reprodução, cujas hifas são responsáveis pela produção de esporos. (TORTORA et al., 2012).

Segundo Lima et al. (2005), os fungos filamentosos são os microrganismos de maior interesse na produção biotecnológica industrial devido a alta capacidade celular e à versatilidade bioquímica. O gênero *Aspergillus*, em particular, tem sido utilizado com muito sucesso nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de bebidas e na produção de enzimas e ácidos orgânicos. (BAKER, BENNETH, 2008).

## **1.2 Gênero *Aspergillus***

O gênero *Aspergillus* é um dos maiores representantes dos fungos filamentosos. Pertencente a divisão Eucomycota, subdivisão Deuteromycotina, classe dos Hyphomycetes, ordem dos Moniliales e família Monociliaceae, ele foi descrito pela primeira vez em 1729 pelo padre-micologista e biólogo, Pier Antonio Micheli e, atualmente, cerca de 250 espécies são conhecidas (SILVA, 2009; ROCHA, 2010; CARVALHO, 2013).

São capazes de colonizar diversos substratos e podem ser isolados do solo, água, vegetação, material em decomposição e ar (FERNANDES, 2012). A maioria é responsável pela degradação de polissacarídeos de plantas e, apesar de possuírem grande importância econômica, alguns de seus membros são prejudiciais às plantas e ao homem (WARD et al., 2006; KLICH, 2007).

A reprodução dos *Aspergillus* sp pode ser assexuada ou sexuada. O ciclo assexuado se dá com produção de esporos assexuados, os conídios, enquanto a reprodução sexuada ocorre por meio de ascósporos, produzidos em ascos (FAIA, 2011).

As espécies são identificadas de acordo com as características morfológicas, macroscópicas e microscópicas. Macroscopicamente suas colônias podem ser brancas, verdes, amarelas, marrons, pretas ou cinzas (KLICH, 2002). Na observação microscópica, identifica-se uma haste asseptada que se estende até a vesícula, onde as células conidiógenas, chamadas de métulas e fiálides, se originam. (ROCHA, 2010).

Muitos alimentos estão sujeitos à contaminação por *Aspergillus* sp por serem tratados, transportados e armazenados inadequadamente. Além de deteriorar produtos, algumas espécies desse gênero também são prejudiciais ao homem por produzir micotoxinas ou por causar a aspergilose, uma micose oportunista de relevância médica.

Entre os benefícios trazidos pelos *Aspergillus* sp, podemos destacar a produção de enzimas de aplicação industrial como  $\alpha$ -amilases, xilanases, celulasas,  $\beta$ -glicosidases, lipases e invertase além de ácidos orgânicos, como o ácido cítrico e ácido glucônico (ABARCA et al., 2004; WARD et al., 2006; SILVA, 2012). Outra vantagem é seu emprego na produção de proteínas recombinantes como, por exemplo, glicoamilase, quimosina bovina, lactoferrina humana, lisozima de ovos de galinha, interleucina humana 6 e taumatina (WANG et al., 2005).

### **1.3 Enzimas**

As enzimas são substâncias orgânicas responsáveis por regular os processos bioquímicos celulares, por meio do aumento da velocidade e diminuição da energia de ativação das reações químicas (LEHNINGER et al., 2006).

De natureza protéica ou ribonucléica, as enzimas são utilizadas desde o século XIX, quando seu mecanismo de ação foi elucidado. Algumas das suas propriedades permitem que elas sejam amplamente aplicadas em processos industriais: alta especificidade em condições brandas de pH e temperatura, maior facilidade em catalisar reações do que catalisadores químicos, menor produção de resíduos indesejáveis e produtos finais mais puros e de melhor qualidade, permitindo a redução de custos no processo de produção. Além disso, elas são biodegradáveis, atóxicas e derivadas de fontes renováveis, contribuindo com o meio ambiente (ZANETI, 2012).

Como mencionado, a maioria das enzimas utilizadas nas indústrias são de origem microbiana, devido às vantagens oferecidas por esta fonte. O microorganismo selecionado deve produzir enzimas que convertam facilmente o substrato em produto, não deve ser patogênico, deve ser estável fisiologicamente e também de simples e fácil manutenção. (LEISOLA et al., 2002).

### **1.4 A xilana e o sistema xilanolítico**

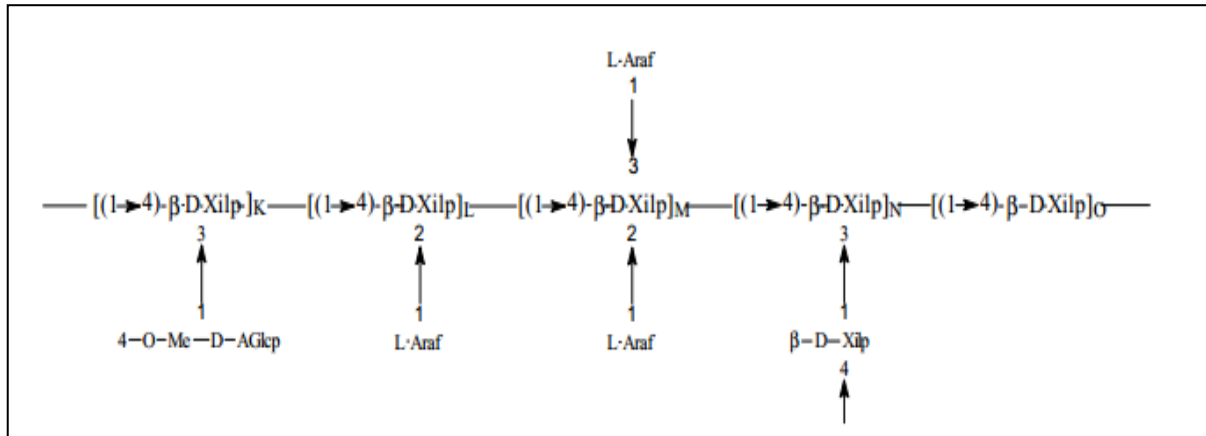
A importante função de decompositor de material orgânico exercida pelos fungos se dá devido à produção de enzimas extracelulares que degradam componentes da parede celular vegetal. De estrutura bastante complexa e com diversas funções, ela é constituída por polissacarídeos,



proteínas e substâncias fenólicas. A proporção de cada componente pode variar de acordo com a idade, a espécie e a parte de planta (CARVALHO, F. P., 2012). Entre os polissacarídeos, destacam-se a celulose, a lignina, a hemicelulose e a pectina (BEGUIN, AUBERT, 1994), que predominam nas três regiões da parede celular: lamela média, parede primária e parede secundária. A lamela média, responsável por aderir uma célula à outra, é rica em pectina enquanto que a parede primária é preenchida por microfibrilas de celulose, hemiceluloses, pectinas e proteínas estruturais. A parede secundária compreende três camadas distintas, S1, S2 e S3 onde, na S3 e no interior da S2 predominam as celuloses e na S1 e no exterior da S2, as hemiceluloses (BRAGATTO, 2007).

As hemiceluloses, um grupo de heteropolissacarídeos, são formadas por resíduos de  $\beta$ -D-xilose,  $\beta$ -D-manose,  $\alpha$ -L-arabinose,  $\alpha$ -D-galactose e  $\beta$ -D-glicose e por ácidos urônicos ( $\alpha$ -D-glucurônico,  $\alpha$ -D-4-O-metilgalacturônico e ácidos  $\alpha$ -D-galacturônico) (CARVALHO, F. P., 2012).

A xilanas é uma das hemiceluloses mais relevantes e abundantes que compõem a parede celular vegetal. Os monômeros de D-xilose estão ligados por pontes glicosídicas  $\beta$ -1,4 na cadeia principal e diferentes carboidratos, apresentando ramificações com ácidos urônicos e seus derivados, L-arabinose e oligossacarídeos, como é mostrado na Figura 1.

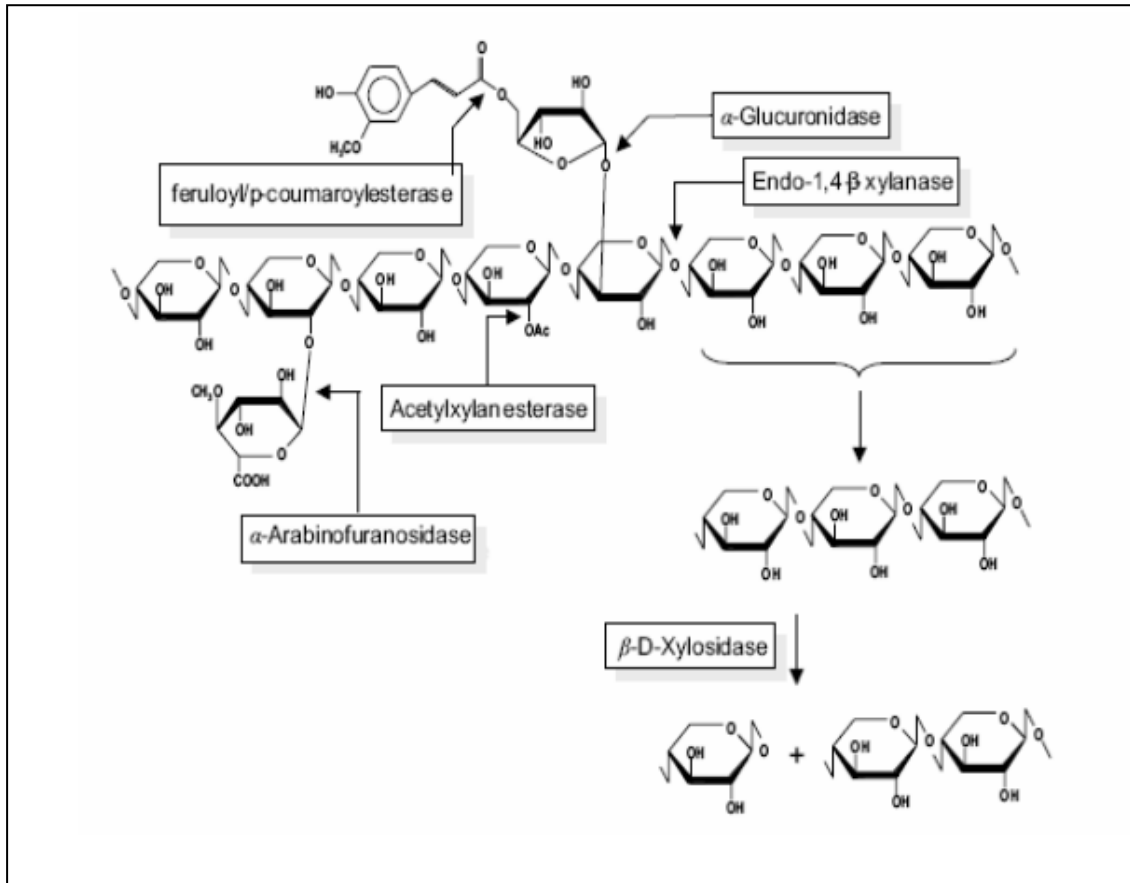


Fonte: SILVA, 1998.

**Figura 1** - Estrutura da xilana.

Devido a sua heterogeneidade estrutural, a degradação da xilana depende de um sistema enzimático encontrado especialmente em fungos e bactérias (CARDOSO,2011). Entre as fontes microbianas, os fungos filamentosos se destacam pela maior produção de xilanasas extracelulares em comparação com bactérias e leveduras (HALTRICH et al., 1996; POLIZELI et al., 2005).

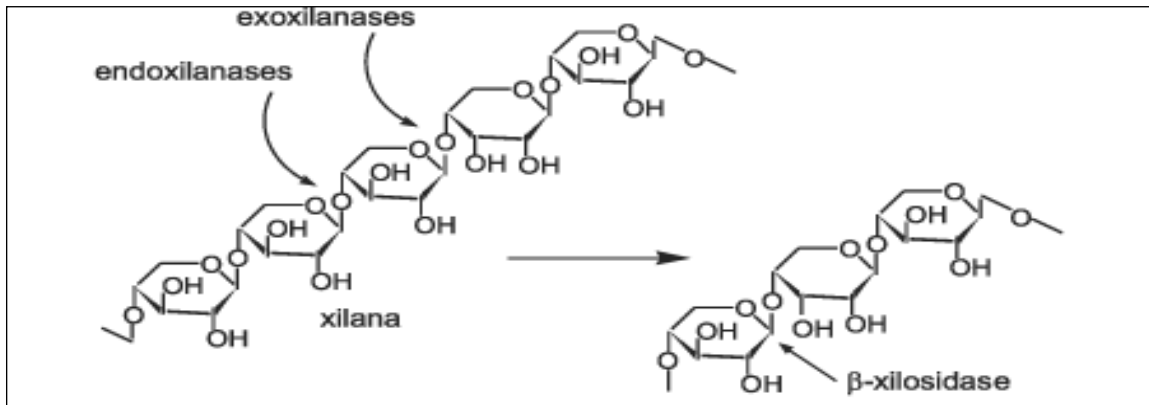
De acordo com a figura 2, o sistema xilanolítico é composto pelas enzimas  $\beta$ -1,4-endoxilanasas (1,4- $\beta$ -D-xilana xilohidrolases),  $\beta$ -D-xilosidases ( $\beta$ -D-xilosídeo xilohidrolases),  $\alpha$ -Larabinofuranosidases,  $\alpha$ -glucuronidasas, acetilxilana esterases, esterase para ácido ferrúlico e a esterase para ácido p-coumárico (ZANETI, 2012)(Figura 2).



Fonte: POLIZELI, 2008.

**Figura 2** - Representação esquemática de uma molécula de xilana e das enzimas do sistema xilanolítico.

As  $\beta$ -1,4-endoxilanasas hidrolisam as ligações glicosídicas internas da cadeia principal da xilana (Figura 3). Para acontecer a degradação completa desta cadeia, é necessário combinar endo e exo-xilanasas ( $\beta$ -xilosidases) e xilohidrolases, responsáveis pela hidrólise dos xilooligômeros de baixa massa molecular. Para hidrolisar os grupos substituintes são importantes ainda a  $\alpha$ -glucuronidase, a  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e a acetilesterase (BIELY, 1985).



Fonte: GOMES, 2007.

**Figura 3** - Estrutura da molécula da xilana e ação das xilanases. Endo- $\beta$ -1,4-xilanases hidrolisam as ligações glicosídicas  $\beta$ ,1-4 internas das molécula de xilana liberando xilooligossacarídeos. As  $\beta$ -xilosidades liberam xilose a partir da xilobiose ou xilooligossacarídeos curtos.

Os produtos da hidrólise das xilanas são xilooligossacarídeos e moléculas de monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeos de xilose. Os xilooligossacarídeos são oligômeros de açúcar constituídos por unidades de xilose obtidos de fontes altamente disponíveis e de baixo custo, como os resíduos florestais e agroindustriais, e que possuem potencial interesse para as indústrias alimentícia e farmacêutica devido às suas atividades funcionais (VÁZQUEZ et al., 2000; VÁZQUEZ et al., 2005). Entre suas ações estão a prevenção de cáries dentárias e a diminuição dos níveis séricos de colesterol total e de lipídeos, além de possuir propriedades prebióticas, proporcionando o bom funcionamento do intestino delgado, melhorando a digestão e absorção de açúcares. (MENEZES; DURRANT, 2008). Em grande quantidade, eles previnem doenças cardiovasculares e câncer do colo retal.

## 2 OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho é produzir a enzima xilanase por fungos do gênero *Aspergillus* sp isolados do pó de café utilizado.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1.1 Isolamento e manutenção do microrganismo em meio sólido inclinado ágar-aveia.

A cepa de *Aspergillus* sp foi isolada, em 2013, por semeadura em placa de Petri a partir do pó de café utilizado no Laboratório de Enzimologia do Departamento de Alimentos e Nutrição da FCFAr/UNESP e foi enviada ao Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Rio Claro para identificação da espécie. A manutenção do microrganismo se deu por repiques quinzenais em meio de cultura sólido inclinado de 2% (m/v) de ágar e 4% (m/v) de farinha de aveia (Quaker®) (MONTI, 1989) e incubação a temperatura ambiente por quatro dias, seguida por armazenamento em geladeira à 4°C. O meio foi preparado aquecendo o ágar junto à aveia até completa dissolução e aumento da viscosidade e, em seguida, foi distribuído em tubos de ensaio contendo 10,0 mL. Em seguida, os tubos foram autoclavados a 120°C por 16 minutos e inclinados até o meio se solidificar.

#### 3.1.2 Crescimento do microrganismo em meio de cultivo Vogel

Após o repique, o crescimento do microrganismo foi feito em meio líquido fermentativo, descrito por Vogel (1956).

##### Meio Líquido de Vogel

Solução de sais de Vogel	10,0 mL
Solução de Biotina	125,0 µL
Fonte de Carbono	5,0 g
Água destilada	q.s.p. 500,0 mL

De acordo com os estudos realizados por Benedetti (2009), a melhor fonte de carbono de baixo custo para produção de xilanase é o pó de sabugo de milho. Sendo assim, esse resíduo agroindustrial, gentilmente doado pela empresa SAGRAN, situada em Salto Grande/SP, foi utilizado na execução deste trabalho.

Para preparar a solução de sais de Vogel, foram elaboradas previamente uma solução estoque de traços de elementos e uma solução estoque de biotina, descritas a seguir.

#### **Solução estoque de traços de elementos**

Ácido cítrico.H <sub>2</sub> O	5,0 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,0 g
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,0 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,25 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,05 g
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,05 g
Clorofórmio	1,0 mL
Água destilada	q.s.p.100,0 mL

#### **Solução estoque de biotina**

Biotina	0,005 g
Etanol 50%	q.s.p.100,0 mL

Para compor a solução de sais de Vogel foram adicionados, em um erlenmeyer, em ordem e sob agitação magnética, os constituintes abaixo. Cada um

foi dissolvido sucessivamente, ou seja, o componente seguinte só foi acrescentado após a dissolução do anterior.

### **Solução de sais de Vogel**

Água destilada	750,0 mL
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	150,0 g
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	100,0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	250,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (pré dissolvido em 20,0mL de água destilada)	5,0 g
Solução estoque de traços de elementos	5,0 mL
Solução estoque de biotina	5,0 mL

O volume da solução de sais de Vogel foi ajustado com água destilada em um balão volumétrico de 1000,0 mL, acrescentando-se cerca de 2,0 mL de clorofórmio para preservar a mesma, que foi estocada a temperatura ambiente.

O meio de cultura foi preparado utilizando uma solução de sais de Vogel diluída 50 vezes em água destilada (v/v). Após a preparação, distribuíram-se 125,0mL de meio em quatro erlenmeyers de 500,0 mL, que foram autoclavados a 120 °C por 16 minutos.

### **3.1.3 Obtenção de esporos e inoculação**

Os esporos foram obtidos a partir das culturas armazenadas na geladeira. Em cada tubo de cultura foram acrescentados 10,0 mL de água estéril e retirados 1,0 mL



( $5 \times 10^7$  células/mL) da suspensão, colocados em cada erlenmeyer contendo o meio de cultura líquido Vogel para produção de enzima. Os inóculos de cada erlenmeyer foram mantidos sob agitação de 90 rpm a temperatura de 35°C por 24, 72, 120 e 168 horas. Após o período de incubação, a massa micelial foi separada do meio por filtração a vácuo, utilizando um funil de Büchner e papel de filtro. O sobrenadante de cada erlenmeyer foi armazenado separadamente em frascos âmbar para posteriores experimentos (MONTI, 1989).

### **3.1.4 Determinação da atividade da xilanase**

Para determinar a atividade da enzima foi necessário construir uma curva analítica. A curva de analítica é necessária para quantificar os açúcares em uma amostra desconhecida. (BENEDETTI, 2009).

### **3.1.5 Curva padrão da xilose**

Segundo Miller (1959) a atividade xilanolítica pode ser determinada colorimetricamente pela quantificação de açúcares redutores liberados após a reação com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

O experimento foi conduzido conforme descrito abaixo:

- A oito tubos de ensaio foram adicionados 0,25 mL de uma solução de DNS.
- Aos tubos foram acrescentados volumes de 0,0 mL até 0,25 mL de uma solução padrão de xilose (m/v). O volume foi completado com água milli-Q até 0,25 mL. □
- Os tubos foram fervidos em banho-maria por 5 minutos e, após esfriarem, 2,5 mL de água milli-Q foram colocados em cada um.

- As amostras foram agitadas e a leitura foi feita em espectrofotômetro (540nm).

O procedimento encontra-se resumido na tabela 1.

**Tabela 1** – Obtenção da curva analítica de xilose

Tubos	Xilose (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	DNS (mL)	µg xilose	µmol xilose/ 0,25 mL
1	0,0	0,25	0,25	0	0
2	0,01	0,24	0,25	10	0,066
3	0,025	0,225	0,25	25	0,166
4	0,05	0,20	0,25	50	0,333
5	0,10	0,15	0,25	100	0,666
6	0,15	0,10	0,25	150	0,999
7	0,20	0,05	0,25	200	1,332
8	0,25	0,0	0,15	250	1,665

Fonte: autoria própria.

### 3.1.6 Determinação da atividade xilanolítica dos extratos brutos

A atividade xilanolítica foi determinada pela liberação de açúcares a partir do substrato xilana de “*beechwood*” (Sigma – St. Louis, USA) (BAILEY et al.,1992). Foram realizados ensaios individuais para os extratos brutos de 24, 72, 120 e 168 horas de cultivo, conforme descrito abaixo:

- Em quatro erlenmeyers de 25,0 mL foram adicionados 27,0 mg de xilana de “*beechwood*” e 5,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0.
- Os frascos foram mantidos em banho maria a 80 °C, por 5 minutos sob agitação manual, para auxiliar na dispersão da xilana.
- Em seguida, os mesmos foram transferidos para um banho a 37 °C, permanecendo sob agitação.
- Foi acrescentado 1,0 mL do extrato aos quatro erlenmeyers. Alíquotas de 0,25mL foram retiradas nos tempos 0', 10', 20' e 30' e adicionadas a tubos de ensaio contendo 0,25 mL de DNS.
- Os tubos de ensaio foram fervidos por 5 minutos, resfriados e a eles adicionados 2,5mL de água destilada.
- Foram feitas as leituras das soluções a 540 nm.

### 3.1.7 Cálculo da atividade da xilanólítica

Para determinar a atividade da xilanase, os valores de absorvância lidos a 540nm foram transformados em  $\mu$ moles de xilose com auxílio da uma curva analítica de xilose. A atividade enzimática foi expressa em  $\mu$ moles de produto formado por minuto (Unidades Internacionais, U total), considerando-se o total de unidades obtidas em cada volume de solução de extrato. Para isso, foi utilizada a equação:

$$A = \left( \frac{\sum Abs}{(\epsilon \cdot \sum t \cdot Ve)} \right)$$

Fonte: autoria própria.

**Figura 4** - Cálculo da atividade enzimática.

Onde:

A: atividade enzimática (U/mL).

$\Sigma$  Abs: somatória das absorbâncias obtidas.

$\epsilon$ : coeficiente de extinção molar da curva analítica da xilose.

$\Sigma_t$ : somatória dos tempos de reação (minutos).

$V_e$ : volume total de amostra (enzima) utilizada (mL).

### 3.1.8 Determinação da concentração de proteína

A quantificação de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (1951) modificado por Hartree (1972), utilizando como padrão Soro Albumina Bovina (BSA).

#### Preparo da Solução A

##### Solução de $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2% em NaOH 0,1N

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	2,0 g
NaOH	0,4 g
Água destilada	q.s.p. 100,0 mL

##### Solução de $\text{CuSO}_4$ 1% em $\text{H}_2\text{O}$ destilada

$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Água destilada	q.s.p. 50,0 mL

##### Solução de Tartarato de sódio e potássio 1% em $\text{H}_2\text{O}$ destilada

Tartarato de sódio e potássio	0,5 g
Água destilada	q.s.p. 50,0 mL

**Solução A**

Solução de 2% em NaOH 0,1N	50,0 mL
CuSO <sub>4</sub> 1% em H <sub>2</sub> O destilada	0,5 mL
Solução de Tartarato de sódio e potássio 1% em H <sub>2</sub> O destilada	0,5 mL

**3.1.9 Curva analítica da BSA**

- Volumes de 0,0 mL até 0,6 mL de uma solução padrão de BSA (0,3 mg/mL) foram adicionados a diferentes tubos de ensaio, completando-os com água milli-Q até 1,0 mL. □
- A cada tubo foram acrescentados 5,0 mL de solução A, seguido de agitação e repouso por 15 minutos.
- 0,5 mL do reagente Folin- Ciocalteu diluído na relação 1:1 (v/v) foi colocado em cada tubo.
- Após breve agitação e repouso de 30 minutos, as amostras foram lidas em espectrofotômetro (660nm).

O procedimento encontra-se resumido na tabela 2.

**Tabela 2** - Obtenção da curva analítica para dosagem de proteínas totais

Tubos	Solução de SBA (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	Solução A (mL)	Tempo	Folin-Ciocalteu (mL)	Tempo
1	0,0	1,0	5,0	15'	0,50	30'
2	0,10	0,90	5,0	15'	0,50	30
3	0,20	0,80	5,0	15'	0,50	30'
4	0,30	0,70	5,0	15'	0,50	30'
5	0,40	0,60	5,0	15'	0,50	30'
6	0,50	0,50	5,0	15'	0,50	30'
7	0,60	0,40	5,0	15'	0,50	30'

Fonte: autoria própria.

### 3.1.10 Cálculo da quantidade de proteínas

A quantidade de proteína foi calculada pela equação:

$$Prot. = \left( \frac{\left( \frac{\sum Abs}{\epsilon} \right)}{V_e} \right)$$

Fonte: autoria própria.

**Figura 5** - Cálculo da concentração de proteínas

Onde:

Prot.: Concentração de proteína (mg mL<sup>-1</sup>).

Σ Abs: somatória das absorbâncias obtidas.

ε: coeficiente de absorção da curva analítica de BSA.

V<sub>e</sub>: Volume total de amostra (enzima) utilizado (mL).

### 3.1.11 Dosagens de proteína pelo método de Hartree (1972)

- Foram reservados cinco tubos de ensaio (1, 2, 3, 4 e 5) para a análise de cada amostra de 24, 72, 120 e 168 horas de cultivo.
- Ao tubo 1 foram adicionados 0,0 mL de amostra; ao tubo 2, 0,15 mL; ao tubo 3, 0,25 mL; ao tubo 4, 0,35 mL e ao tubo 5, 0,05 mL. Os volumes de cada tubo foram completados com água milli-Q até 0,5 mL.
- 2,5 mL da solução A foram acrescentados aos cinco tubos.
- Após um repouso de 15 minutos, 0,25mL de reagente Folin-Ciocalteu diluído na relação 1:1 (v/v) foram colocados em cada um.
- Seguidos 30 minutos, foram feitas as leituras das amostras em comprimento de onda de 660nm.

O procedimento encontra-se resumido na tabela 3.

**Tabela 3** - Dosagem de proteínas nos diferentes extratos

Tubos	Amostra (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	Solução A (mL)	Tempo	Folin-Ciocalteu (mL)	Tempo
1	0,0	0,5	2,5	15'	0,25	30'
2	0,15	0,35	2,5	15'	0,25	30'
3	0,25	0,25	2,5	15'	0,25	30'
4	0,35	0,15	2,5	15'	0,25	30'
5	0,50	0,0	2,5	15'	0,25	30'

Fonte: autoria própria.

### **3.1.12 Precipitação das proteínas com Sulfato de amônio**

O processo de purificação da enzima produzida foi iniciado a partir dos resultados obtidos com a determinação da atividade enzimática e quantificação de proteínas dos extratos. Ao extrato bruto de 168 horas de cultivo (100,75 mL) adicionou-se, aos poucos e sob agitação magnética, 56,52g de sulfato de amônio 85% (previamente macerados) e, após repouso de 12 horas na geladeira, a amostra foi centrifugada a 9000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado, ressuspendido no menor volume possível de água milli-Q. Essa suspensão, concentrada dez vezes, foi dialisada contra a água por 12 horas e duas trocas de água foram feitas para evitar que o excesso de sulfato de amônio altere posteriores experimentos.

### **3.1.13 Determinação da atividade xilanolítica do extrato dialisado**

Para a determinação da atividade enzimática da amostra precipitada e dialisada, um erlenmeyer contendo 27,0 mg de xilana de "*beechwood*" e 5,9 mL de tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0 foi mantido sob agitação em banho maria a temperatura de 37 °C. A ele foi acrescido 0,1 mL do extrato dialisado e, nos tempos 0', 10', 20' e 30' foram retiradas alíquotas de 0,25 mL, adicionadas a tubos de ensaio com DNS.

Os tubos de ensaio foram fervidos por 5 minutos, resfriados e a eles adicionados 2,5mL de água destilada.

Foram feitas as leituras das soluções a 540nm e para a determinação da atividade enzimática foi utilizado o valor da absorbância obtido com a curva analítica da xilose.



### 3.1.14 Determinação do pH de máxima atividade da xilanase

A atividade enzimática em função do pH também foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Foram utilizados oito erlenmeyers, cada um contendo 27,0 mg de xilana de "*beechwood*", 0,1 mL da amostra precipitada e dialisada e 5,9 mL dos tampões apropriados. Foram realizados ensaios em pH 3,0, pH 4,0, pH 5,0, pH 6,0, pH 7,0, pH 8,0 (tampões McIlvaine) e pH 9 e pH 10,0 (tampões glicina-hidróxido de sódio) a temperatura de 37°C. Após o período de incubação de 30 minutos, a reação foi interrompida pelo DNS e fervida por 5 minutos em banho-maria. A densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro ( $\lambda=540\text{nm}$ ).

### 3.1.15 Determinação da temperatura de máxima atividade da xilanase

A determinação da temperatura onde a atividade da enzima é máxima foi verificada por meio da incubação da amostra precipitada e dialisada com o substrato em diferentes temperaturas, no intervalo de 30°C a 65°C. Os ensaios enzimáticos utilizaram tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0 e agitação constante. A reação foi interrompida com adição de DNS e fervida por 5 minutos em banho maria. A densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro a 540nm e a atividade específica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de produto por unidade de tempo.

### 3.1.16 Cromatografia em camada delgada

Os produtos de hidrólise da xilana foram avaliados por cromatografia em camada delgada, em sílica gel G-60. Foi utilizado xilose como padrão.

Um erlenmeyer contendo 27,0 mg de xilana de “*beechwood*” e 5,9 mL de tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0 foi mantido sob agitação em banho-maria a 37 °C. Um volume de 0,1 mL da amostra dialisada foi adicionado e alíquotas de 100,0 µL foram retiradas em eppendorfs e aquecidas a 100 °C por três minutos após 0,5; 1; 2; e 12 horas de reação.

A placa de sílica gel G-60 foi previamente ativada em uma estufa a 100 °C por cinco minutos para, na seqüência, as amostras e o padrão serem aplicados. A fase móvel foi constituída por acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (9:3:1:4 v/v) e os açúcares foram detectados utilizando 0,2% (m/v) de orcinol em ácido sulfúrico e metanol (1:9 v/v), como descrito por Fontana et al. (1988). A revelação se dá a 120 °C após 10 minutos com o aparecimento da cor azul.

### **3.1.17 Eletroforese**

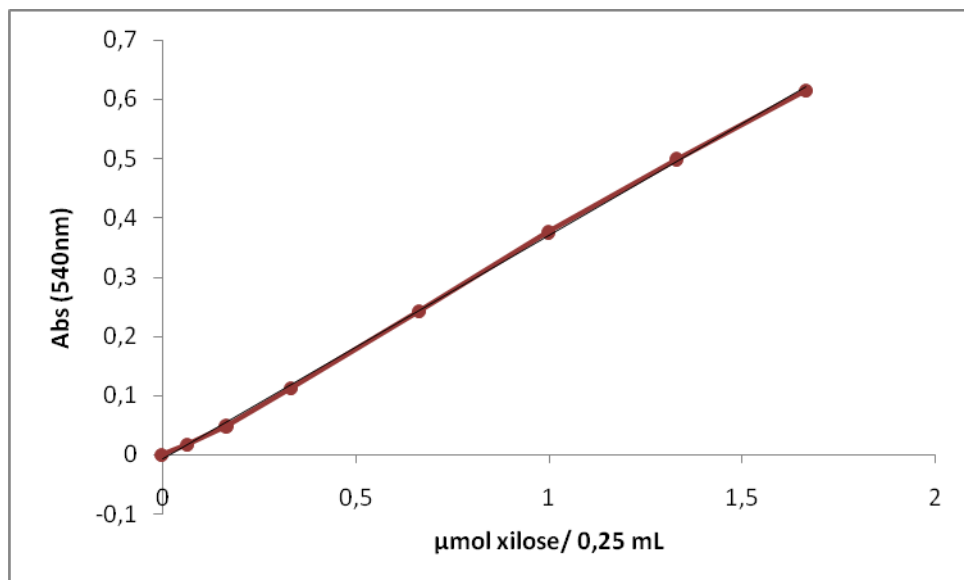
O extrato bruto de 168 horas de cultivos e a amostra dialisada foram submetidos à eletroforese, em condições desnaturantes, em gel de poliacrilamida a 12%, de acordo com o método de Laemmli (1970). No gel foram aplicados 15,0 µL, 20,0 µL e 25,0 µL do extrato bruto, 5,0 µL, 10,0 µL e 15,0 µL da amostra dialisada e 2,0 µL do padrão de massa molecular. O padrão (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia) consistiu em xilanase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa).

#### 4 RESULTADOS

O fungo foi isolado do pó de café utilizado em decomposição e identificado morfológicamente como uma cepa de fungo filamentosso *Aspergillus* sp (clade *niger*) pelo grupo do Prof. Dr. André Rodrigues, do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Rio Claro.

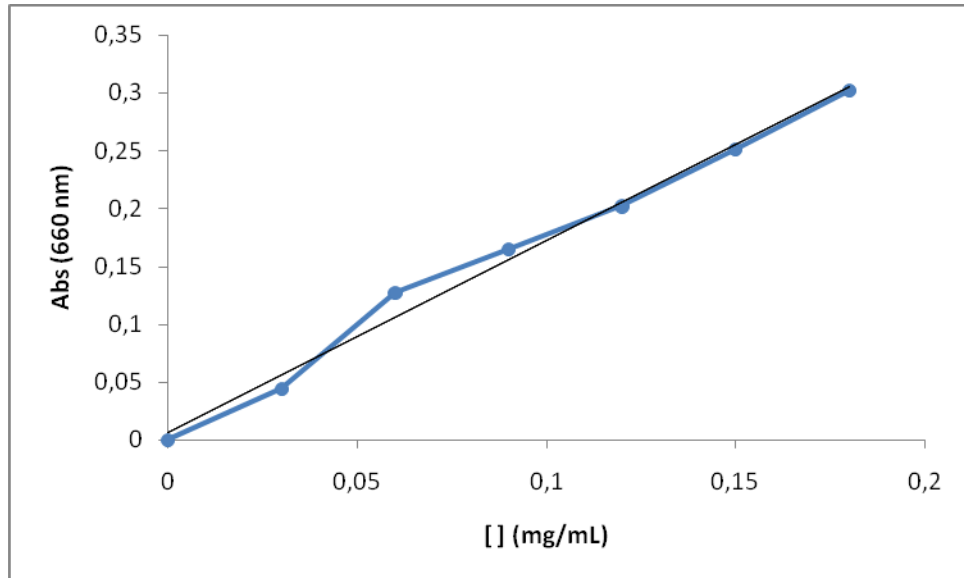
Na filogenia, o fungo apresentou similaridade com as linhagens de *Aspergillus niger*, porém, ainda faltam informações para se concluir que esta é a espécie do mesmo.

A fim de identificar a melhor condição para produção de xilanase pelo *Aspergillus* sp (clade *niger*) foram elaboradas uma curva analítica de xilose para determinar a atividade enzimática e uma curva analítica de albumina de soro bovino para quantificação de proteínas. As curvas analíticas são apresentadas nas Figuras 3 e 4.



Fonte: autoria própria.

**Figura 6** - Curva analítica da xilose.



Fonte: autoria própria.

**Figura 7** - Curva de referência para determinação de proteína pelo método de Lowry (1951) modificado por Hartree (1972).

A curva analítica da xilose obteve como absorvância molar o valor de  $0,3773 (\mu\text{mol}/0,25\text{mL})^{-1}$  e a curva para a quantificação de proteínas apresentou absorvância igual a  $1,6607 (\text{mg}/\text{mL})^{-1}$ .

A partir dos valores obtidos foi possível calcular a atividade xilanolítica e mensurar as proteínas do extrato enzimático em diferentes tempos de cultivo.

Os cultivos foram realizados em meio líquido de Vogel, utilizando pó de sabugo de milho como fonte de carbono. Sob agitação constante (90 rpm) e a  $35^{\circ}\text{C}$ , o crescimento se deu em 24, 72, 120 e 168 horas. Após esses períodos, o meio de cultivo foi filtrado a vácuo e realizou-se a dosagem protéica pelo método de Lowry e determinação da atividade enzimática. Os resultados obtidos se encontram na Tabela 4.

**Tabela 4** - Quantificação de proteínas e atividade específica da xilanase produzida por *Aspergillus* sp (clade *niger*) utilizando pó de sabugo de milho como fonte de Carbono

Tempo de cultivo (horas)	Atividade (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
24	0,0113	0,4094	0,0276
72	0,0125	0,4947	0,0252
120	0,0982	0,5472	0,1794
168	0,1117	0,6108	0,1828

Fonte: autoria própria.

A tabela 4 mostra baixas atividades específicas quando o tempo de cultivo foi de 24 horas e 72 horas, enquanto os filtrados de 120 horas e 168 horas apresentaram melhores resultados, evidenciando a interferência do tempo de cultivo na atividade xilanolítica.

A partir dos resultados apresentados, o filtrado do meio de cultivo em que o fungo teve maior atividade específica foi selecionado para dar início ao processo de purificação. A xilanase produzida teve maior atividade quando o período de cultivo era de 168 horas.

O processo de purificação parcial da enzima teve início com a precipitação das impurezas do extrato de 168 horas de cultivo por sulfato de amônio. Na sequência, a enzima foi concentrada 10 vezes e dialisada contra a água por 12 horas. Foram dosadas as proteínas da amostra e determinada a atividade enzimática, comparando os valores obtidos com os resultados apresentado pelo extrato bruto de 168 horas de cultivo, como é mostrado na Tabela 5.

**Tabela 5** - Efeito da concentração do filtrado de xilana

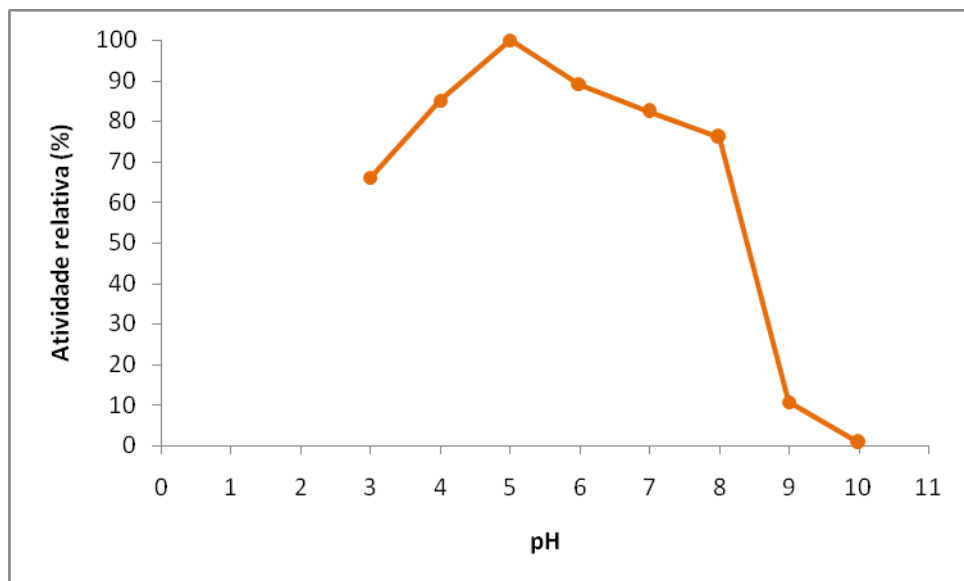
Tratamento	Atividade (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
Sem tratamento*	0,1117	0,6108	0,1828
Precipitado e dialisado	1,0636	1,4446	0,7362

\*Extrato bruto (168 horas de cultivo)

Fonte: autoria própria.

A partir dos valores apresentados pela tabela 5, pode-se afirmar que a atividade xilanolítica é maior quando foram utilizados métodos de precipitação e concentração do extrato. Dessa maneira, conclui-se que os mesmos foram efetivos para a concentração da enzima.

Após a definição do melhor período para o crescimento do fungo e produção de xilanase foi feita uma curva de pH para definir qual é o pH de máxima atividade da enzima.

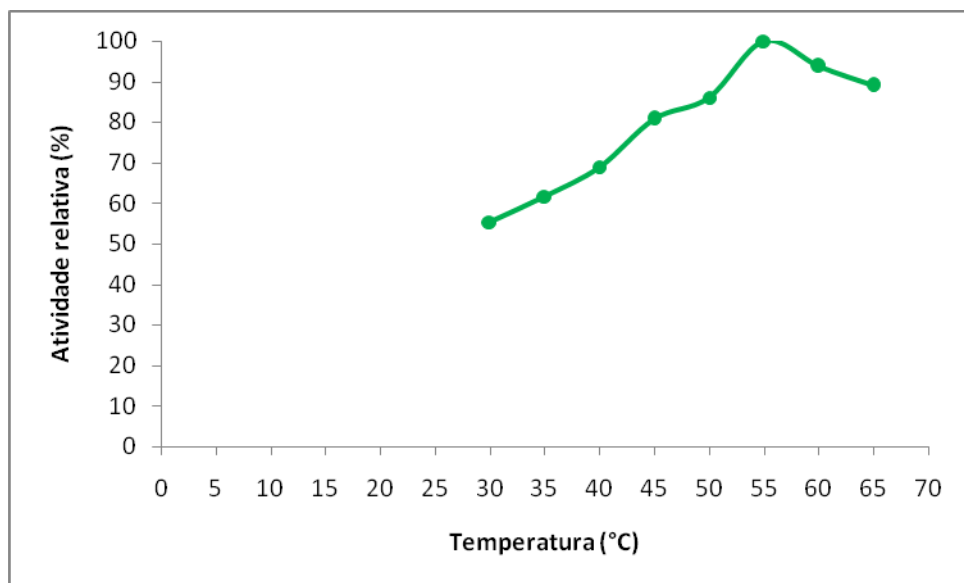


Fonte: autoria própria.

**Figura 8** - Efeito do pH na atividade xilanolítica do filtrado de *Aspergillus* sp (clade *niger*).

A máxima atividade da xilanase foi em pH 5,0 (Figura 8), valor semelhante aos demais determinados para xilanases microbianas (CARMONA et al., 1998; SUNNA; POLIZELI et al., 2005; MILAGRES et al., 2005; FENGXIA et al., 2008).

Após definir o pH ótimo da enzima xilanase realizaram-se experimentos para determinar a temperatura de máxima atividade enzimática.

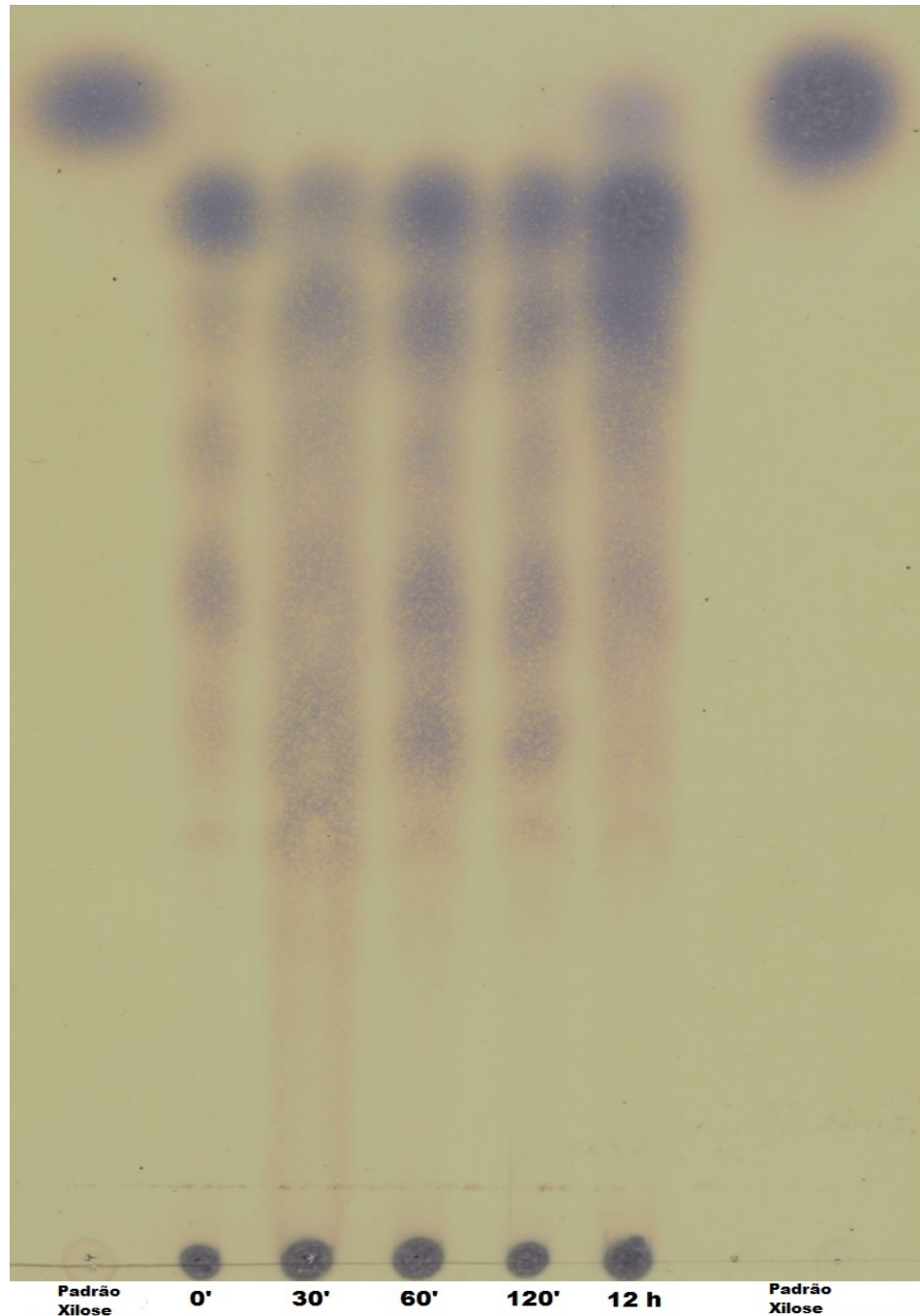


Fonte: autoria própria.

**Figura 9** - Efeito da temperatura na atividade xilanolítica do filtrado de *Aspergillus* sp (clade *niger*),

A temperatura de máxima atividade da xilanase presente no extrato dialisado foi de 55°C (Figura 9). Esse valor foi igual ao de *Aspergillus niger* (ARAGON, 2013) e comparável com o de xilanases de outros fungos termoestáveis, cujas temperaturas de maior atividade variam de 40°C a 60°C, tais como *Humicola grisea* var. *thermoidea* (MONTI et al., 1991; MONTI et al., 2003), *Rhizopus stolonifer* (GOULART et al., 2005), *Aspergillus versicolor* (CARMONA et al., 1998) e *Thermomyces lanuginosus* (PUCHART et al., 1999).

Os produtos de hidrólise da xilana pela xilanase produzida por *Aspergillus* sp (clade *niger*) foram avaliados com uma cromatografia em camada delgada, em sílica gel G-60 (Figura 10)



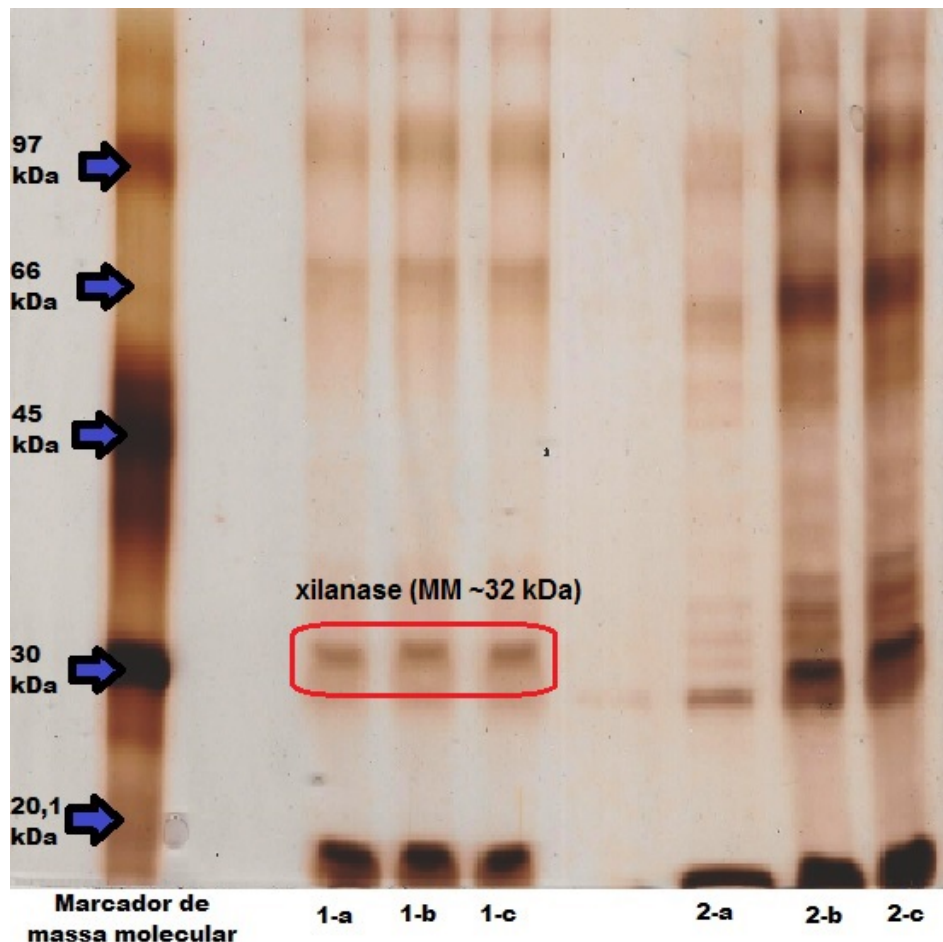
Fonte: acervo pessoal.

**Figura 10** - Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise da xilana de "beechwood" pela xilanase de *Aspergillus* sp (clade *niger*), em diferentes tempos e utilizando como padrão a xilose.



Nota-se que quanto maior foi o tempo de exposição do substrato (xilana) à enzima produzida (xilanase), maior foi a produção de xilose. Ao longo do tempo ocorre diminuição da produção de XOS com maior grau de polimerização e formação de xilooligossacarídeos menores e, em seguida, xilose, corroborando os estudos de Aragon (2013).

A Figura 11 mostra o gel de eletroforese, em condições desnaturantes, do extrato dialisado de *Aspergillus* sp (clade *niger*) nas concentrações 5,0  $\mu$ L (1-a), 10,0  $\mu$ L (1-b) e 15,0  $\mu$ L (1-c) e do extrato bruto nas concentrações 15,0  $\mu$ L (2-a), 20,0  $\mu$ L (2-b) e 25,0  $\mu$ L (2-c).



Fonte: acervo pessoal.

**Figura 11** - Gel de SDS-PAGE 12% corado com prata com marcador de massa molecular, extrato dialisado de *Aspergillus* sp (clade *niger*) nas concentrações 5,0  $\mu$ L (1-a), 10,0  $\mu$ L (1-b) e 15,0  $\mu$ L (1-c) e extrato bruto nas concentrações 15,0  $\mu$ L (2-a), 20,0  $\mu$ L (2-b) e 25,0  $\mu$ L (2-c).

Apesar do alvo do trabalho ser apenas a atividade xilanolítica, observou-se uma variedade de proteínas produzidas pelo fungo *Aspergillus* sp (clade *niger*) que, provavelmente atuam de maneira conjunta com a xilanase (massa molecular ~32 kDa). Notou-se também que após a diálise do extrato, houve redução do número de bandas, indicando a diminuição na multiplicidade de proteínas. Sendo assim, pode-se afirmar que o processo de purificação da enzima foi efetivo para selecionar a xilanase.

## 5 CONCLUSÃO

Conclui-se, com este trabalho, que o fungo *Aspergillus* sp (clade *niger*) produziu as enzimas xilanólíticas na presença de pó de sabugo de milho, em diversos períodos de cultivo, apresentando melhor atividade específica quando o período de cultivo é maior. Pode-se afirmar então que o período de cultivo do fungo afeta a atividade específica da enzima. O extrato que apresentou melhor atividade específica (168 horas de cultivo) foi dialisado e apresentou melhor atividade específica do que o extrato bruto, indicando que o método de concentração e de purificação parcial da enzima foi efetivo.

A xilanase de *Aspergillus* sp (clade *niger*) apresentou pH de máxima atividade enzimática 5,0 e temperatura de 55°C, propriedades já observadas por Aragon (2013).

Por meio dos resultados apresentados pela cromatografia em camada delgada, conclui-se que o fungo filamentoso estudado apresenta genes específicos que codificam a enzima xilanase, sendo responsável pela produção da mesma. A hidrólise da xilana pela xilanase do *Aspergillus* sp (clade *niger*) resultou na formação de compostos menores, os xilooligossacarídeos e, em seguida, na formação de xilose, como é observado na eletroforese em gel de poliacrilamida. O número de proteínas presentes no extrato dialisado foi menor do que no extrato bruto, indicando que a enzima foi parcialmente purificada. Os xilooligossacarídeos são capazes de atravessar a membrana celular e desencadeiam a transcrição de genes do sistema xilanólico (BIELY, 1985), permitindo que a xilanase utilize a xilana como substrato para produção dos mesmos. A produção de XOS por xilanases é mais vantajosa se comparada a

outros métodos porque a mesma atua especificamente em seu substrato não resultando em resíduos.

Os interessantes resultados obtidos revelam um potencial estudo de purificação total da enzima e imobilização para a melhor utilização da mesma.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 86, n. 1, p. 33-49, 2004.
- ALBANO, M. **Comparação da produção de celulases e xilanases por fungos filamentosos em fermentação submersa e estado sólido**. 2012. 82 f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2012.
- ARAGON, C. C. **Imobilização multipontual covalente de xilanases: seleção de derivados ativos e estabilizados**. 2013. 119 f. Tese de Doutorado em Biotecnologia- Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2013.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, Finland, v. 23, p.257-270, 1992.
- BAKER, S. E.; BENNETH, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. **Mycology**, New Jersey, v. 26, p. 551, 2008.
- BEGUIN, P. & AUBERT, J-P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiol. Rev.**, 1994.
- BENEDETTI, A. C. E. P. **Isolamento de fungo produtor de enzimas xilanólíticas: produção e caracterização de xilanase**. 2009. 110 f. Tese de doutorado em Ciências dos Alimentos- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2009.

BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v 66, pp. 101-107, 1998.

BIELY, P. Microbial xylanolytic system. **Trends in Biotechnology**, v.3, p.286-290, 1985.

BIGELIS, R. Primary metabolism and industrial fermentations. **Gene manipulations in fungi**. New York: Academic Press, p. 357-401, 1985.

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 de Mestrado em Ciências- Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CARDOSO, A. L. G. **Prospecção de fungos filamentosos produtores de xilanases e/ou celulases para realização de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 33 f. Trabalho de conclusão de curso de Engenharia Ambiental- Faculdades COC de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2011.

CARMONA, E. C.; BROCHETTE-BRAGA, M. R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; JORGE, J. A. Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 166, p. 311-315, 1998.

CARVALHO, F. P. **Enzimas celulolíticas e xilanolíticas de leveduras isoladas do cerrado mineiro**. 2012. 114 f. Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CARVALHO, L. I. C. ***Aspergillus* e Aspergilose- Desafios no combate da doença**. 2013. 43 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas- Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2013.

DAMASO, M. C. T.; FARINAS, C. S.; SALUM, T. F. C. Produção e imobilização de enzimas aplicadas à produção de etanol e biodiesel. In: MACHADO, C. M. M., *Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos*. Editora Técnica, **Embrapa Agroenergia**, Brasília, p. 101-125, 2013.

FAIA, A. M. **Isolamento e identificação de fungos filamentosos e leveduras em alguns pontos de uma rede de distribuição de água**. 2011. 44 f. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia- Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2011.

FENGXIA, L.; MEI, L.; ZHAOXIN, L.; XIAOMEI, B.; HAIZHEN, Z.; YI, W. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. **Bioresource Technol.**, v. 99, p. 5938-5941, 2008.

FERNANDES, N. H. **Produção de xilanase e xilosidase por *Aspergillus versicolor***. 2012. 42 f. Trabalho de conclusão de curso de Farmácia-Bioquímica- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2012.

FONTANA, J. D.; GEBARA, M.; BLUMEL, M.; SCHNEIDER, H.; MACKENZIE, C. R.; JOHNSON, K. G.  $\alpha$ -4-O-methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods Enzymology**, New York, v. 160, p. 560-571, 1988.

GODFREY, T.; WEST, S. *Industrial enzymology*. 2nd ed. New York: **Stockton Press**, 1996. 609 p.

GOMES, E. et al . Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 30, n. 1, p. 136-145, Fev. de 2007 .

Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422007000100025&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000100025&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 20 de Set. de 2015.

GOULART, A. J.; CARMONA, E. C.; MONTI, R. Partial purification and properties of cellulose free alkaline xylanase produced by *Rhizopus stolonifer* in solid-state fermentation. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 40, n. 3, p. 327-333, 2005.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D; STEINER, W.; ZUPANIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresour. Technol.**, v. 58, p. 137-161, 1996.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, England, v.48, p.422-427, 1972.

KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* species**. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 2002. 116 p.

KLICH, M.A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 713- 722, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v227/n5259/abs/227680a0.html>>. Acesso em 20 de Set. de 2015.

LEHNINGER, A. L. NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. **Bioquímica: princípios de bioquímica**. 4ª ed. São Paulo: Sarvier. 2006. 1202 p.

LEISOLA, M.; JOKELA, J.; PASTINEN, O.; TURUNEN, O.; SCHOEMAKER, H. Industrial use of enzymes. Disponível em: <[www.hut.fi/Units/Biotechnology/Kem-70.415/INDUSTRIAL\\_USE\\_OF\\_ENZYMES.DOC](http://www.hut.fi/Units/Biotechnology/Kem-70.415/INDUSTRIAL_USE_OF_ENZYMES.DOC)>. Acesso em 20 de Set. de 2015.



LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. Ed. **Edgard Blucher**, v. 3, São Paulo, 2005. 535p.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MENEZES, C. R.; DURRANT, L. R. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência. Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 587-592, 2008.

MILAGRES, A. M. F.; MAGALHÃES, P. O.; FERRAZ, A. Purification and properties of a xylanase from *Ceriporiopsis subvermispora* cultivated on *Pinus taeda*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 253, p. 267-272, 2005.

MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v.31,p. 426-428, 1959.

MONTI, R. **Produção de celulase e xilanase pelo fungo termófilo *Humicola grisea* variedade *thermoidea* RP-17: fatores que afetam a produção e propriedades bioquímicas das enzimas**. 1989. 167 f. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1989.

MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A. Purification and properties of an extracellular xylanase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Can. J. Microbiol.**, v. 37, p. 675-681, 1991.

MONTI, R.; CARDELLO, L.; CUSTÓDIO, M. F.; GOULART, A. J.; SAYAMA, A. H.; CONTIERO, J. Production and purification of an endo-1,4- $\beta$ -xylanase from

*Humicola grisea* var. *thermoidea* by electroelution. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, p. 124-128, 2003.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, São Paulo v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

NETO, C. J. F.; FIGUEIRÊDO, R. M. F. de; QUEIROZ, A. J. de M. Avaliação sensorial e da atividade de água em farinhas de mandioca temperadas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, SP, v. 29, n. 4, p. 795-802. Julho-Agosto/2005.

OLIVEIRA, B. **Biotransformação da R-(+) e S-(-) carvona por fungos filamentosos**. 2009. 77 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Moleculares- Unidade Universitária de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2009.

PEREIRA, C. de Q. M. **Identificação de espécies de fungos causadores de onicomicoses em idosos institucionalizados no município de São Bernardo do Campo**. 2012. 87 f. Dissertação de Mestrado em Dermatologia- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

PEREIRA, V. M. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulases por *Aspergillus sulphureus* (Fresen.) Wehmer**. 2012. 111 f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

POLIZELLI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

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

PUCHART, V.; KATAPODIS, P.; BIELY, P.; KREMICKY, L.; CHRISTAKOPOULOS, P.; VRSANSKA, M.; KEKOS, D.; MARCIS, B. J.; BHAT, M. K. Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme Microbial Technol.**, v. 24, p. 355-361, 1999.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. 2010. 136 f. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal De Uberlândia, Uberlândia, 2010.

RODRIGUES, K. de A. **Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética**. 2006. 145 f. Tese de Doutorado em Hidráulica e Saneamento- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

SILVA, D. M. da. **Identificação de espécies de *Aspergillus* seção *nigri* por taxonomia polifásica e descrição de duas novas espécies do gênero**. 2009. 89 f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SILVA, L. A. D. **Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis***. 105p. 2008. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade

Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. Aproveitamento de resíduos. In: A Lavoura, ano 115, n. 690, 2012.

SILVA, S. S. et al . Extração e caracterização de xilanas de sabugos de milho. Polímeros, São Carlos , v. 8, n. 2, p. 25-33, Jun. de 1998 . Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-14281998000200005&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14281998000200005&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 20 de Set. de 2015.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 17, p. 39-67, 1997.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia\_ 10<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F., GOMTERTZ, O. S., CANDEIAS, J. A. N. (1999). **Microbiologia**. São Paulo: Editora Ateneu, 3<sup>a</sup> ed. 588p.

TURNER, W. B. Commercially important secondary metabolites. In: SMITH, J. E.; BERRY, D. R. **The filamentous fungi: industrial mycology**. New York: Wiley, 1975. v. 1, p. 122-142.

VÁZQUEZ, M. J. et al. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p.387-393, 2000.

VÁZQUEZ, M. J. et al. Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: evaluation of operational strategies. **Bioresource Technology**, v.96, p.889-896, 2005.

VOGEL, H. J. A convenient growth médium for Neurospora (médium N).

**Microbial Genetics Bulletin**, v13, p.42-3, 1956.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations.

**Biotechnology Advances**, New York, 23, p. 115-129, 2005.

WARD, O. P.; QIN, W. M.; DHANJOON, J.; YE, J.; SINGH, A. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 58, p. 1-75, 2006.

ZANETI, V. M. **Produção de xilanases por *Aspergillus niger* utilizando planejamento experimental: purificação de xilanase**. 2012. 74 f. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia- Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2012.

## **7 DADOS FINAIS**

De acordo,

Araraquara, 14 de janeiro de 2016

---

Roberta Gabriela Marto Mingote

---

Prof. Dr. Rubens Monti  
Professor Orientador