



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Letícia Louzada Ferreira

Produção de xilanase pelo fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA e
caracterização da enzima

São José do Rio Preto
2017

Letícia Louzada Ferreira

Produção de xilanase pelo fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA e
caracterização da enzima

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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: CAPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira
Alves do Prado

São José do Rio Preto
2017

Produção de xilanase pelo fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA e
caracterização da enzima

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves do Prado
Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, UNESP – Ilha Solteira
Orientador

Prof^a. Dr^a. Daniela Alonso Bocchini Martins
Faculdade de Ciências e Letras, UNESP- Araraquara

Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini
Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, UNESP – Ilha Solteira

São José do Rio Preto
07 de novembro de 2017

AGRADECIMENTOS

Depois de tantos momentos e emoções nos últimos dois anos, eu tenho o prazer de agradecer algumas pessoas que me ajudaram nessa caminhada.

Primeiramente, Deus, como faço para agradecer por tanto carinho, obrigada pela minha vida, por ouvir minhas orações e se fazer tão presente nas minhas escolhas e na minha vida.

Agradeço a toda a minha família, aos meus pais Pedro Ferreira e Celia Vilela Louzada Ferreira, e ao meu irmão Pedro Tiago Louzada Ferreira, a minha cunhada Lindanil Ferreira, e aos meus sobrinhos, palavras não são suficientes para expressar meu amor por vocês, obrigada por todo os momentos de alegria ao lado de vocês.

À minha orientada, Professora Doutora Heloiza Ferreira Alves do Prado, por ter me aceitado neste desafio, pelo apoio e por todo conhecimento compartilhado ao longo desses anos.

Agradeço a todos os professores, técnicos e demais funcionários do IBILCE e da FEIS, cujo suporte foi essencial para a finalização deste trabalho, em especial aos técnicos de laboratório, Diego Feitosa, Marcelo Rinaldi e Sidival, de Carvalho e Selma Bozzite Moraes, pela participação mais efetiva neste trabalho.

À CAPES pelo suporte e financiamento, facilitando o desenvolvimento do projeto.

As minhas amigas do Laboratório de Biotecnologia, Ana Carolina, Ana Paula, especialmente a Lumena, Sirlene e Larissa, que acompanharam toda luta diária e que me ajudaram no desenvolvimento deste projeto.

Aos meus amigos de coração, Marcela, Vanessa e Carlos, obrigada por estarem sempre presentes, pelo apoio, pela preocupação, pelas conversas, que alegria a minha ter vocês ao meu lado.

E um agradecimento especial, aquela pessoa que sempre esteve e está ao meu lado, ao meu noivo Diego Gonçalves Feitosa, obrigada por todo amor e carinho nesses anos, obrigada pela companhia nos finais de semana no laboratório, pela paciência nessa etapa final, ter você por perto tornou tudo mais especial, assim como você.

Dedico este trabalho aos meus pais **Pedro Ferreira** e **Célia Vilela Louzada Ferreira**, por todo amor e dedicação, em cada fase da minha vida tem um pouco de vocês.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta.”

Carl Sagan

RESUMO

O complexo de enzimas extracelulares degradadoras de parede celular vegetal secretadas pela maioria dos microrganismos fúngicos, transformam compostos complexos presentes na constituição do material lignocelulósico, em compostos mais simples, que são absorvidos pelos fungos. Fungos fitopatogênicos utilizam este mesmo mecanismo de nutrição, absorvendo os nutrientes a partir de células de plantas que infectam. Pesquisas sobre produção destas enzimas por microrganismos, assim como a diversidade de substratos alternativos têm crescido significativamente nos últimos anos, dentre elas, as xilanases têm um potencial de aplicação na indústria de alimentos, indústria de papel e celulose e mais recentemente na produção de etanol. Fungos fitopatogênicos vem sendo estudados quanto a produção enzimática, como por exemplo, o fungo *Rhizoctonia solani*, e os fungos do gênero *Pythium* e *Fusarium*. Estes fungos vêm demonstrando potencial na produção de enzimas, tais como xilanase, pectinase e celulase. Neste contexto vinte isolados de *Rhizocotnia solani* AG-1 IA foram avaliados quanto a produção xilanolitica. Dentre esses isolados, dez apresentaram potencial para a produção da enzima de interesse e foram testados utilizando diferentes materiais lignocelulósicos como substrato destes. Os substratos utilizados no ensaio de produção foram caracterizados em relação aos constituintes do material lignocelulósico. Dentre os isolados avaliados quanto a produção em deifrentes substratos, o isolado MTAFOB11-1 obteve os maiores valores de produção enzimática ($41,38 \text{ U mL}^{-1}$) quando cultivado em estado sólido, utilizando o substrato farelo de trigo por um período de noventa e seis horas. O isolado RR_A24 obteve os valores máximos de produção quando cultivado utilizando como substrato a *U. decumbes*, com valor máximo de produção de $36,62 \text{ U mL}^{-1}$. Em relação ao perfil de produção ao longo do tempo o melhor tempo foi obtido pelo isolado MTAFOB11-1 que apresentou valores máximos de produção em 144 horas de cultivo. Posteriormente, realizou-se análise do efeito do pH, da temperatura e de íons sobre a atividade da enzima bruta produzida pelo fungo fitopatogênico em estudo. Observou-se, portanto, a efetividade de produção da enzima de interesse principalmente sob cultivo

sólido, utilizando o farelo de trigo como substrato. As análises bioquímicas revelaram um pH ótimo de ação de atividade de 5,0, sendo que no teste de estabilidade a enzima se manteve estável entre a faixa de pH 4,5 a 7,5. Em relação ao efeito da temperatura de incubação observou que a temperatura ótima é de 60 °C, e a estabilidade térmica foi observada nos intervalos de temperaturas de 20 °C a 50 °C, sendo que a enzima não se manteve estável por um período superior a 60 minutos a 60 °C. Ademais dos dezoitos compostos utilizados para avaliar os efeitos de íons na atividade enzimática, a maioria os íons e reagentes testados diminuíram a atividade enzimática de xilanase, sendo que o reagente Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi responsável por uma inibição de 95% da atividade enzimática em questão nas concentrações de 5 mmol L⁻¹ e 10 mmol L⁻¹.

Palavras-chave: Caracterização bioquímica. Cultivo em estado sólido. Enzima fúngica. Fungos fitopatogênicos.

ABSTRACT

The complex of extracellular enzymes that degrade the plant cell wall secreted by most fungal microorganisms, transform complex compounds present in the constitution of the lignocellulosic material into simpler compounds that are absorbed by the fungi. Phytopathogenic fungi use the same nutrition mechanism, absorbing nutrients from living plant cells that infect. Research on the production of these enzymes by microorganisms, as well as the diversity of alternative substrates have grown significantly in recent years, among them, xylanases have a potential of application in the food industry, pulp and paper industry and more recently in ethanol production. Phytopathogenic fungi have been studied for enzymatic production, for example, the fungus *Rhizoctonia solani*, and fungi of the genus *Pythium* and *Fusarium*. These fungi have been demonstrating potential in the production of enzymes, such as xylanase, pectinase and cellulase. In this context, twenty isolates of *Rhizocotnia solani* AG-1 IA were evaluated for xylanolytic production. Among these isolates, ten presented potential for the production of the enzyme of interest and were tested using different lignocellulosic materials as substrate, of which the MTAFOB11-1 strain obtained the largest (41.38 U mL^{-1}) when cultivated in the solid state, using the wheat bran substrate for a period of ninety-six hours. The strain RR_A24 obtained the maximum production values when cultivated using as substrate the U. decumbes, with a maximum production value of 36.62 U mL^{-1} . In relation to the production profile over time the best time was obtained by the isolate MTAFOB11-1 that presented maximum values of production in 144 hours of cultivation. Subsequently, the effect of pH, temperature and ions on the activity of the crude enzyme produced by the phytopathogenic fungus was analyzed. The efficiency of production of the enzyme of interest was therefore observed mainly under solid culture, using the wheat bran as substrate. The biochemical analysis revealed an optimum activity action pH of 5.0, and in the stability test the enzyme the enzyme remained stable in the range of pH 4.5 to 7.5. Regarding the effect of the incubation temperature, it was observed that the optimum temperature was $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, and the thermal stability was observed in the temperature ranges of $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ to

50 °C, and the enzyme did not remain stable for more than 60 minutes at 60 °C. In addition to the eighteen compounds used to evaluate the effects of ions on the enzymatic activity, most ions and reagents tested decreased the enzymatic activity of xylanase, and sodium dodecyl sulfate (SDS) was responsible for a 95% inhibition of activity enzyme in concentrations of 5 mmol L⁻¹ and 10 mmol L⁻¹

Keywords: Biochemical characterization; Cultivation in solid state; Fungal enzyme; Phytopathogenic fungus

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Crescimento do microrganismo fúngico *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em placa contendo meio BDA. 21
- Figura 2** Representação dos constituintes presentes na parede celular vegetal 23
- Figura 3** Representação esquemática da molécula de celulose e as ligações de hidrogênio presentes na fibra de celulose. 24
- Figura 4** Representação esquemática da estrutura da lignina 25
- Figura 5** Estrutura da Hemicelulose e seus principais constituintes 26
- Figura 6** Representação esquemática da estrutura do xilana, e as principais enzimas envolvidas no processo de degradação da xilana. 27
- Figura 7** Representação esquemática de alguns processos de microescala que ocorrem durante o CES. 31
- Figura 8** Atividade de xilanase produzida pelas linhagens fúngicas de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, após 96 horas de cultivo em estado sólido, utilizando diferentes substratos. A barra representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão. 50
- Figura 9** Valores médio de produção de xilanase ($U\ mL^{-1}$) nos diferentes substratos lignocelulósicos, sob cultivo em estado sólido após 96 horas. A barra representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão. 51
- Figura 10** Regressão da atividade de xilanase pelo fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, RR_A24, cultivado em estado sólido, utilizando como substrato a *U. decumbens*, por um período de 240 horas. 52

Figura 11 Atividade de xilanase pelo fungo <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA-RR_A24, cultivado em estado sólido, utilizando como substrato a <i>U. decumbens</i> , por um período de 240 horas. A barra representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.....	53
Figura 12 Regressão da atividade de xilanase pelo fungo <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA MTAFOB11-1, cultivado em estado sólido, utilizando como substrato o farelo de trigo, por um período de 240 horas.	54
Figura 13 Atividade de xilanase pelo fungo <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA - MTAFOB11-1, cultivado em estado sólido, utilizando como substrato o farelo de trigo, por um período de 240 horas. A barra representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.....	54
Figura 14 Efeito do pH sobre atividade da xilanase produzida pelo fungo <i>R. solani</i> AG-1 IA MTAFOB11-1, O símbolo representa o valor da média e a linha vertical o desvio padrão.	64
Figura 15 Efeito da estabilidade de pH na atividade de xilanase produzida pelo fungo <i>R.solani</i> AG-1 IA MTAFOB11-1. Os ensaios foram executados em tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,0 com 1% (m/v) de xilana.....	65
Figura 16 Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade xilanólítica de <i>R. solani</i> AG-1 IA - MTAFOB11-1. Os ensaios foram executados em tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,5 com 1% (m/v) de xilana. O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.	67
Figura 17 Efeito da temperatura de estabilidade sobre a atividade de xilanase em extrato bruto, após a pré-incubação nos tempos de 30 e 60 minutos.	68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Origem e dimensões dos substratos utilizadas no processo de cultivo em estado sólido das linhagens fúngicas..... 44
- Tabela 2** Teores médios de fibra em detergente neutro (FDN), de fibra em detergente ácido (FDA), de hemicelulose, celulose e de lignina..... 46
- Tabela 3** Fonte de variação e probabilidade F para a atividade de xilanase das linhagens após 96h de cultivo em estado sólido. 48
- Tabela 4** Efeito de substâncias químicas na concentração de 1,0, 5,0 e 10,0 mM, sobre a atividade residual percentual (média \pm D.P.) de xilanases presentes em extrato bruto produzido pelo fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA – MTAFUB11-1. 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA	Batata Dextrose Agar
CES	Cultivo em estado sólido
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
D.P.	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FT	Farelo de trigo
FS	Folha de soja
PM	Palha de milho
PS	Palhada de soja
<i>R. solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UD	<i>Urochloa decumbens</i>
UR	<i>Urochloa ruzieziensis</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2. OBJETIVOS.....	18
CAPÍTULO I.....	19
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
1. <i>Rhizoctonia solani</i>	20
2. Parede celular vegetal.....	22
2.1. Celulose.....	23
2.2. Lignina.....	24
2.3. Hemicelulose.....	25
2.3.1. Enzimas que hidrolisam a hemicelulose.....	26
3. Aplicação industrial da xilanase.....	28
4. Cultivo em estado sólido.....	30
5. Referências Bibliográficas.....	32
CAPÍTULO II.....	38
SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE XILANASE E ESTUDO ENZIMÁTICO.....	38
Resumo.....	39
1. Introdução.....	40
2. Objetivos.....	41
3. Material e Métodos.....	41
3.1. Microrganismo.....	41
3.2. Pré-inóculo para o cultivo em estado sólido.....	42
3.3. Produção de xilanase por cultivo em estado sólido.....	42

3.4	Caracterização dos substratos quanto aos constituintes do material lignocelulósicos.....	43
3.5	Cultivo em estado sólido utilizando diferentes substratos.....	43
3.5.1	Preparo dos substratos.....	43
3.6.	Determinação da atividade enzimática	44
3.7.	Perfil de Produção enzimática	45
3.8.	Análise estatística	45
4.	Resultados e Discussões	46
4.1	Caracterização dos teores dos constituintes do material lignocelulósico.....	46
4.2	Avaliação da atividade enzimática das linhagens estudadas.....	47
4.3	Atividade xilanolítica em diferentes substrato	48
5.	Conclusões.....	55
6.	Referências Bibliográfica.....	55
CAPÍTULO III		59
CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....		59
Resumo.....		60
1.	Introdução	61
2.	Objetivos	62
3.	Material e Métodos	62
3.1.	Caracterização físico-química das enzimas.....	62
3.1.1.	Determinação do pH Ótimo	62
3.1.2.	Determinação da Temperatura ótima	62
3.1.3.	Estabilidade em relação ao pH.....	63
3.1.5.	Efeito de íons e reagentes sobre a atividade xilanolítica.....	63
4.	Resultados	63
4.1.	Avaliação do efeito do pH ótimo e de estabilidade na atividade enzimática.....	63

4.2. Efeitos da temperatura ótima e a estabilidade térmica na atividade enzimática	66
4.3. Efeito de íons e reagentes sobre a atividade xilanolítica	69
5. Conclusões	71
6. Referências Bibliográficas	72

1. INTRODUÇÃO GERAL

A grande maioria dos microrganismos fúngicos secretam enzimas extracelulares, este complexo de enzimas transformam compostos complexos, como por exemplo, polissacarídeos ou proteínas presentes na constituição do material lignocelulósico, em monoméricos, açúcares, aminoácidos, entre outros, que são absorvidos pelos fungos. Fungos fitopatogênicos utilizam este mesmo mecanismo de nutrição, absorvendo os nutrientes a partir de células de plantas que infectam (BROCK, 2016).

Para os microrganismos fitopatogênicos as enzimas degradadoras de parede celular de plantas são essências na patogenicidade desses organismos, hidrolisando polissacarídeos específicos para a retirada de nutrientes, que são necessários para o seu desenvolvimento (DE LORENZO et al., 1997).

Pesquisas sobre produção de enzimas por microrganismos em diversos substratos alternativos têm crescido significativamente nos últimos anos, estas enzimas extracelulares são utilizadas em diversos processos industriais, dentre elas, as xilanases têm um potencial de aplicação industrial em vários setores, como por exemplo, na indústria de alimentos, na formulação de ração animal, indústria de papel e celulose e mais recentemente na produção de etanol (HOWARD, 2003; MORETTI et, al., 2012). Para a produção destas enzimas em laboratório, o cultivo em estado sólido é uma tecnologia que tem sido amplamente utilizada, em relação as vantagens, e em relação as questões de custo de produção e alto rendimento (KOYANI, 2015).

Entre os fungos fitopatogênicos que estão sendo estudado quanto a produção enzimática, os fungos *Rhizoctonia solani*, e os fungos do gênero *Pythium* e *Fusarium*, vem demonstrando potencial na produção de enzimas, tais como xilanase, pectinase e celulase (BISTRATINI, 2016; ELIAS; FERREIRA; BUENO, 2015; GEETHU; RESNA; NAIR, 2013). Sendo que o fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA é um patógeno amplamente distribuído por todo o mundo, sendo hospedeiro de diversas culturas de importância mundial. Devido sua grande importância por ser um fungo patógeno de grande importancia na agricultura, estudos estão buscando entender os seus principais mecanismos de

patogenicidade, e a relação das enzimas degradadoras de parede celular nesses mecanismos (PASCUAL, 2000).

Dentro deste contexto, o presente trabalho visou a seleção de fungos fitopatogênicos da espécie *Rhizoctonia solani* AG-1 IA que apresentem boa atividade xilanolítica, por cultivo em estado sólido utilizando materiais lignocelulósicos como substrato, a caracterização destes substratos, bem como a caracterização físico-química das enzimas produzidas pelos fungos selecionados.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo o estudo da produção de xilanase pelo fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. Para alcançar esses objetivos foram realizados.

- a) Seleção entre os isolados amostrados de diferentes regiões e hospedeiros;
- b) Produção de xilanase utilizando farelo de trigo como substrato, no cultivo em estado sólido;
- c) Cultivo em estado sólido utilizando diferentes substratos e potenciais hospedeiros naturais do fungo;
- d) Caracterização bromatológica dos substratos utilizados nos ensaios de produção;
- e) Caracterização bioquímica da xilanase produzida pelos isolados.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani é um fungo fitopatogênico que está associado a diversas doenças de culturas de importância econômica mundial, como a soja, arroz, feijão e milho (Figura1), (BASSETO 2007; GUTIÉRREZ, 2007; NECHET, 2006; POLONI, 2016).

. Apresenta duas formas, a assexuada, denominada de *Thanatephorus cucumeris* (Frank), que tem como fase anamórfica o *Rhizoctonia solani*, uma espécie composta por vários grupos de anastomose (CARLING, 1996; PASCUAL, 2000).

Segundo dados disponíveis no MycoBank a classificação desta espécie segue a ordem: Fungi, Basidiomycota, Agaricomycotina, Agaricomycetes, Cantharellales, Cerato, basidiaceae, *Rhizoctonia*. (MYCOBANK, 2017).

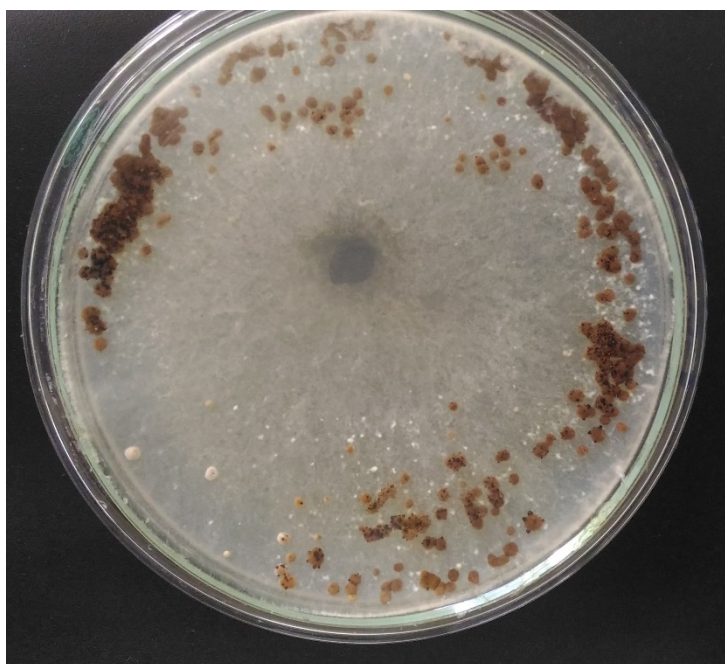
O fungo *Rhizoctonia solani* é classificado em 14 grupos de anastomose que compreendem desde o grupo AG-1 a AG- 13 e o grupo AG-BI, ainda há um grupo intraespecífico (ISG), que permite a diferenciação de 23 ISG, dentre os AGs de *Rhizoctonia solani*, este grupo intraespecífico diferencia-se dos grupos de anastomose (AGs), e essa diferenciação é fundamentada por evidências de reação de anastomose, patogenicidade e morfologia, dentre outros critérios. (CARLING, 1990 ; CARLING, 2000).

Geralmente o *Rhizoctonia solani* não produz esporos, mas sim estruturas denominadas escleródios ou esclerócios, que são estruturas de resistência a condições desfavoráveis, desempenhando assim uma estratégia de sobrevivência. (KRUGNER 1995; PÁDUA 2007). O gênero *Rhizoctonia* inclui espécies, como *R. solani*, *R. circinada* var. *Oryzae* , *R. circinada* var. *Zeeae* , *R. oryzae-sativae* , e *R. circinada* var. *Circinata*, que estão associadas ao complexo de doenças das queimas e manchas da bainha nas regiões arrozeiras da Argentina (GUTIÉRREZ, 2007). No Brasil, *R. solani* AG-1 IA emergiu como importante agente causal da queima das folhas e morte de pastagens do gênero *Urochloa* (PEREIRA et al., 2014).

Há evidências que o fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, adaptado a *Urochloa* mantém uma ampla gama de hospedeiros, estudos indicam que este patógeno têm um potencial adaptativo para emergir como patógeno em

outras culturas, como por exemplo, de feijão-caupi, á soja e ao milho, sendo altamente agressivos a estas culturas (POLONI et al., 2016).

Figura 1 Crescimento do microrganismo fúngico *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em placa contendo meio BDA.



Fonte: Elaborada pelo Próprio Autor.

Na literatura além de estudos relacionados ao controle deste patógeno, há pesquisas que buscam identificar compostos benéficos que podem ser explorados. Estudos sobre a composição química da biomassa de *R. solani*, principalmente em relação aos polissacarídeos, demonstram que a biomassa fúngica pode ser uma fonte promissora de moléculas para aplicação em ensaios biológicos. Alexandre (2015) relatou que o uso da β -glucana e da fucomanogalactana foram citotóxicas para células de câncer de cólon humano (HT-29, HCT-116), apresentando melhores resultados quando administrado as doses de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de polissacarídeo que foram obtidos da biomassa fúngica de *Rhizoctonia solani*. (ALEXANDRE, 2015).

2. Parede celular vegetal

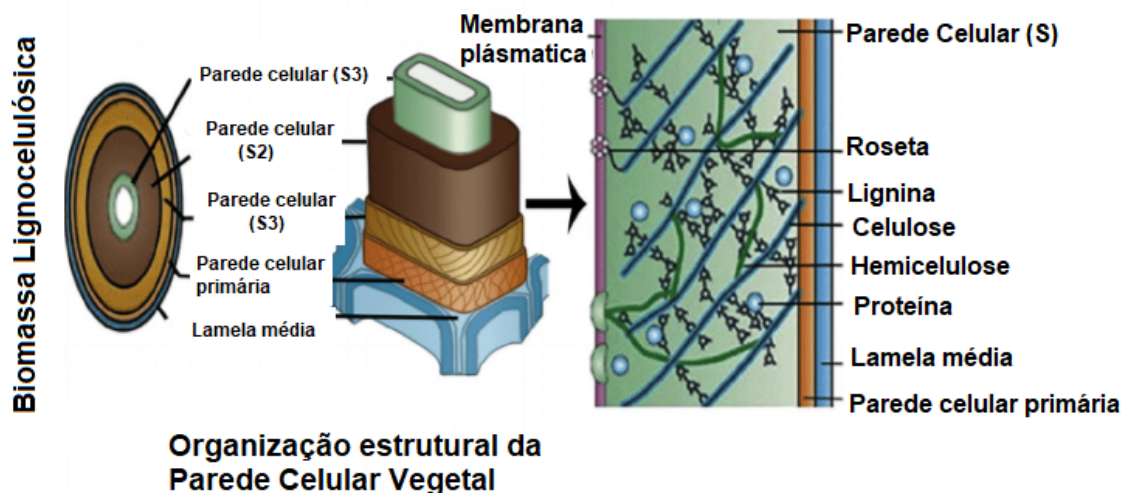
A parede celular vegetal é responsável pela forma e rigidez da célula, além de limitar o tamanho do protoplasto, impedindo a ruptura da membrana plasmática pela entrada de água no interior da célula, além de desempenhar um papel importante na defesa contra bactérias e fungos patogênicos (RAVEN et al., 2016).

Morfologicamente, a parede celular é dividida em três regiões diferentes, a lamela média, parede primária e parede secundária. 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 et al., 2012).

A parede celular primária da maioria dos vegetais é formada por três estruturas independentes, as microfibrilas de celulose, os polissacarídeos não-celulósicos, que incluem hemiceluloses e pectinas, essa estrutura está relacionada com a flexibilidade e resistência a parede celular vegetal em crescimento. Enquanto que a parede celular secundária apresenta três camadas distintas (S1, S2 e S3) que são diferentes em relação a espessura, composição e orientação de microfibrilas, a parede celular secundária é formada principalmente por celulose, cerca de 50-80%, hemicelulose e lignina, e apresenta quantidade de água reduzida (Figura 2) (RAVEN et al., 2016).

Quimicamente, a parede celular é uma matriz complexa composta de composto fenólico, como a lignina e polissacarídeos, sendo que dos polissacarídeos, destacam-se a celulose, hemicelulose e a pectina, além da presença de proteínas, água e minerais. (JUNG, 1992).

Figura 2 Representação dos constituintes presentes na parede celular vegetal



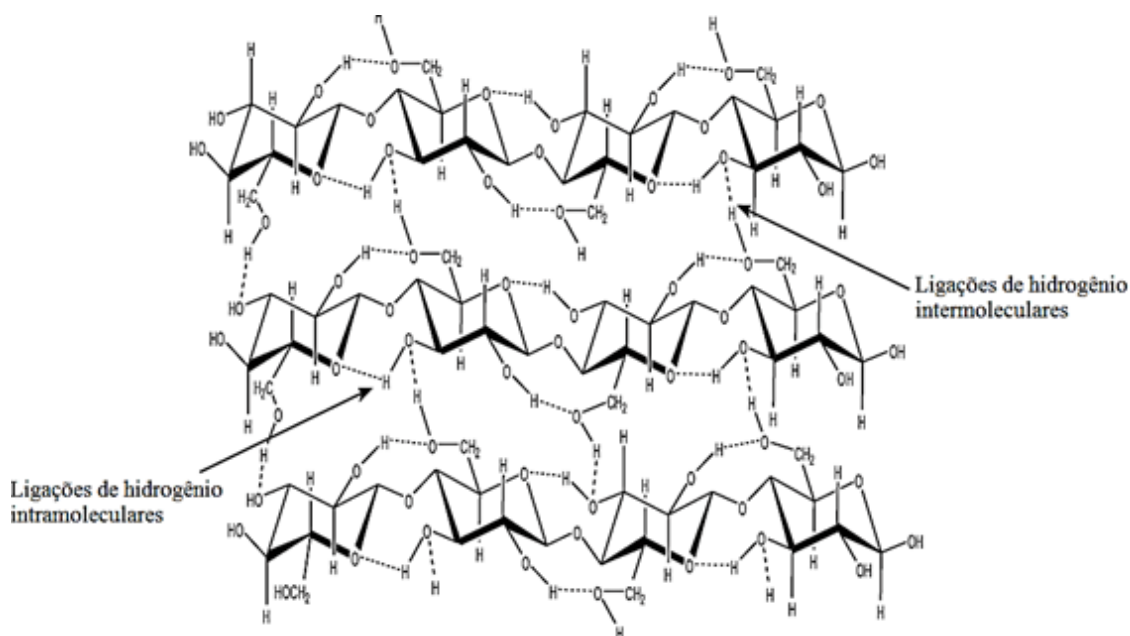
Fonte: Adaptado de Manavalan et al., (2015)

2.1. Celulose

O principal componente da parede celular vegetal é a celulose, compreendendo cerca de 35-60% da biomassa vegetal, este componente estrutural proporciona resistência mecânica e estabilidade química para as plantas, determinando grande parte de sua estrutura. A celulose é um homopolímero fibroso e insolúvel composto de monômeros de glicose ligados pela extremidade, sendo os polímeros da celulose agrupados em microfibrilas (RAVEN, 2016). Ainda de acordo com a nomenclatura da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), a molécula de celulose é estabelecida por ligações β -1,4 glicosídicas.

Os polissacarídeos presentes na celulose são formados por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4. O dissacarídeo formado recebe o nome de celobiose, e é considerada a unidade básica da celulose (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006; CHAMPAGNE; LI, 2009; SINGH et al., 2014).

Figura 3 Representação esquemática da molécula de celulose e as ligações de hidrogênio presentes na fibra de celulose.



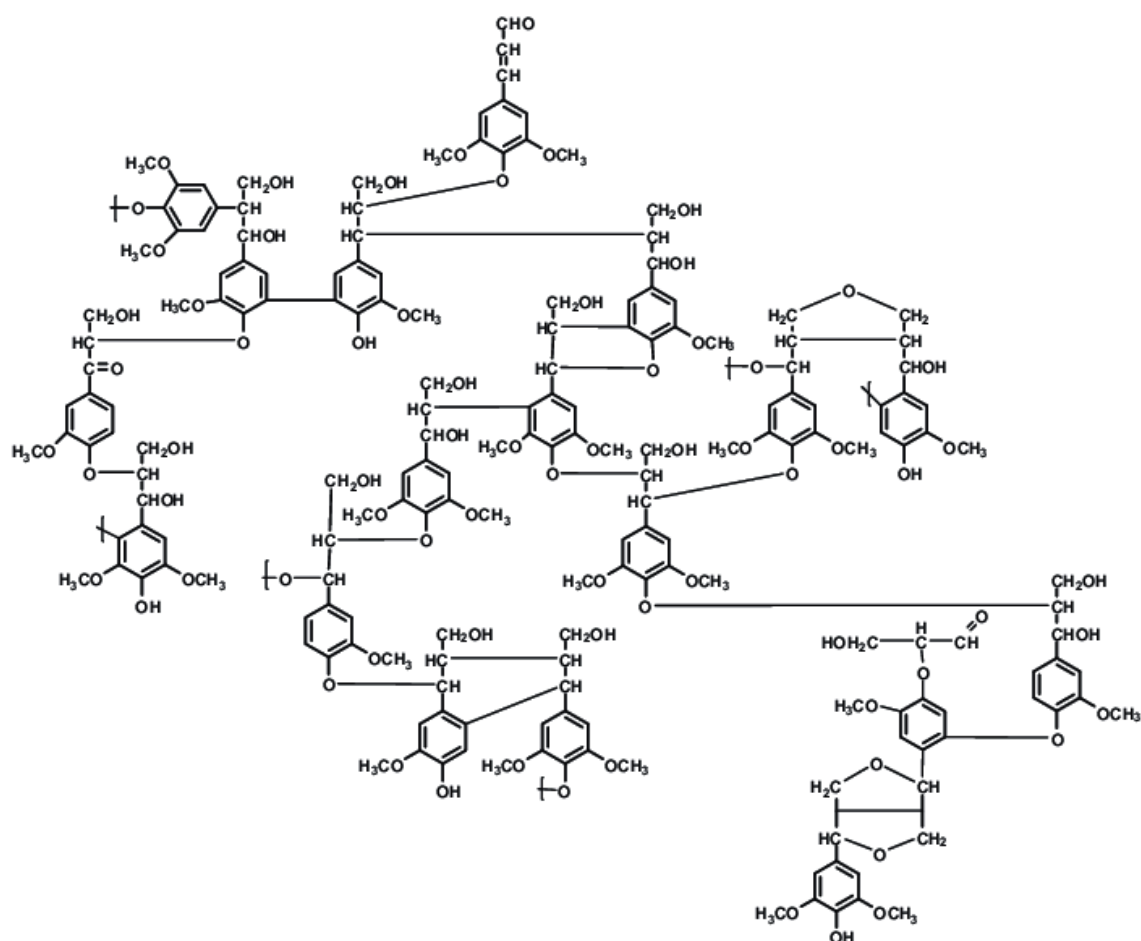
Fonte: (SANTOS et al., 2012)

2.2. Lignina

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante no material vegetal, superado apenas pela celulose. É um constituinte importante da parede celular vegetal que fornece resistência à compressão e rigidez na maioria dos vegetais, mas comumente encontrada em parede de células vegetais que têm uma função mecânica ou de sustentação, representando teores de 10-25% da composição química da biomassa lignocelulósica. (RAVEN, 2014; SANTOS; et, al. 2012).

A lignina corresponde a porção mais externa na parede celular vegetal, responsável pela união entre as frações de celulose e hemicelulose, por ligações covalentes que garantem a sustentabilidade e rigidez da fibra vegetal. São formadas monômeros de fenilpropanóides, sintetizados a partir de monolignóis como álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico interligados entre si por ligações entre carbonos e ligações tipo éster (Figura 5) (PENG et al., 2012).

Figura 4 Representação esquemática da estrutura da lignina



Fonte: SANTOS et al., (2012)

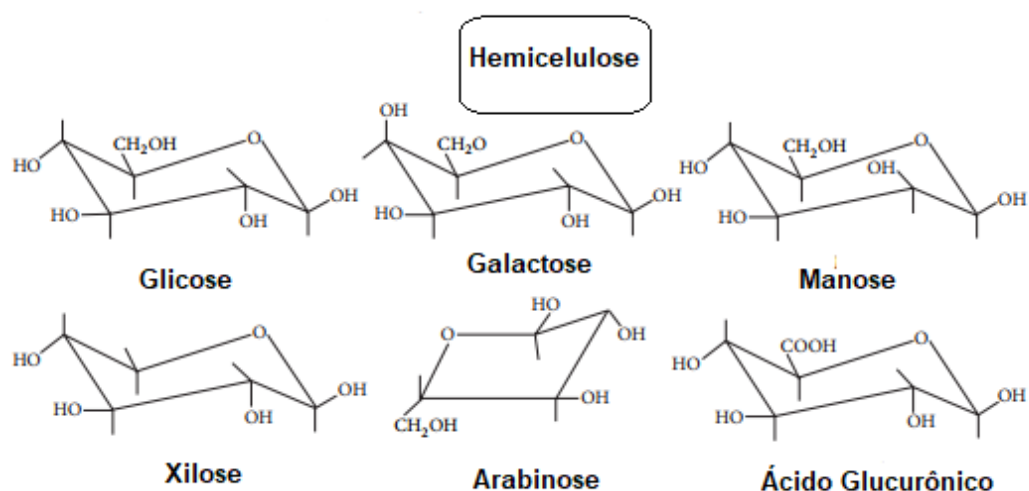
2.3. Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo ramificado constituído por monômeros de pentoses (β -D-xilose e β -D-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose e β -D-galactose), e ácidos urônicos, como ácido α -D-glucorônico, ácido α -D-4-O-metilgalacturônico e ácido α -D-galacturônico, sendo a xilose a mais abundante (Figura 5). (KUMAR et al., 2008).

A xilana é o principal polissacarídeo da hemicelulose e pode ser agrupadas em subclasses: homoxilanas, glucuroxilanas, arabinoglucuroxilanas, arabinoxilanas, glucuronoarabinoxilanas e heteroxilanas. A xilana tem sua estrutura formada por unidades de D-xilose ligadas entre si por ligações xilopiranosídicas β (1 \rightarrow 4). A xilana está presente na madeira numa proporção

que varia de 7 a 30% de todo o material da parede celular de organismos vegetais., e realizam um papel importante na textura da madeira, interagem covalentemente com a pectina, estão intimamente associadas a lignina e estão ligadas por pontes de hidrogênio e forças de van der Waals à cadeia de celulose (BEG et al, 2001; POLIZELI et al, 2005; EBRINGEROVÁ, 2006).

Figura 5 Estrutura da Hemicelulose e seus principais constituintes



Fonte: Adaptado de Saini et al., (2015)

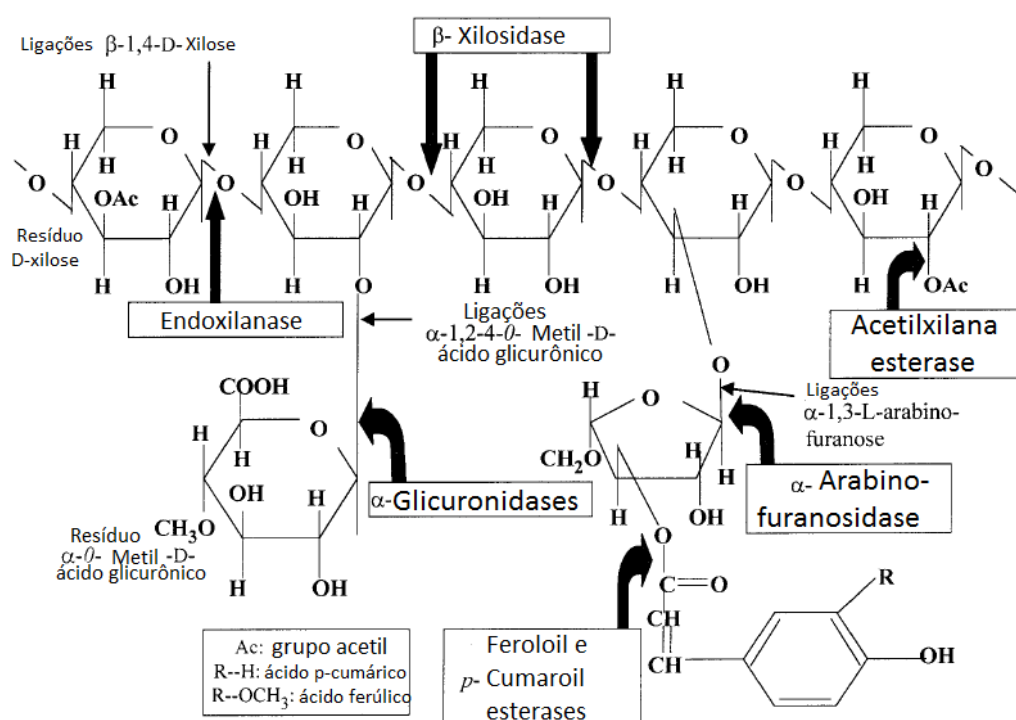
2.3.1. Enzimas que hidrolisam a hemicelulose

As xilanases são enzimas que degradam os constituintes da hemicelulose presente na parede celular vegetal, no entanto, a degradação total da xilana inclui as enzimas que degradam o esqueleto, formado pelos resíduos de D-xilose e aqueles que atuam nos resíduos substituintes das ramificações do esqueleto. O complexo xilanolítico pode ser clivado pela ação de diferentes enzimas que atuam no xilana (Figura 6). (POLIZELI et al, 2005).

As xilanases são agrupadas em famílias de acordo com a análise dos domínios catalíticos e nas semelhanças das sequências de aminoácidos, essas informações estão disponíveis no banco de dados Cazy (Carbohydrate-Active enzymes), esta base de dados apresenta a classificação e as informações em relação as enzimas envolvidas na síntese, no metabolismo e no transporte de

carboidratos, e considera as xilanases pertencentes às famílias 10 e 11 de glicosídeo hidrolases, a família 10 envolve as xilanases com capacidade de hidrolisar as ligações β -1,4 (endoxilanases) e algumas também β -1,3, as xilanases da família 11 também hidrolisam as ligações tipo β -1,4, apresentando mecanismo semelhante. Esta base de dados compreende atualmente 94 famílias de glicosil transferases, 22 famílias de polissacarídeo-liases e 16 famílias de polissacarídeo-esterases (CANTAREL et al., 2009).

Figura 6 Representação esquemática da estrutura do xilana, e as principais enzimas envolvidas no processo de degradação da xilana.



Fonte: Adaptado (BEG et al., 2001).

As endo-1,4- β -xilanases (E.C 3.2.1.8) são responsáveis por realizar a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo β entre os carbonos 1 e 4 dos monômeros de xilose, já as endo-1,3- β -xilanases (E.C 3.2.1.32) hidrolisam de forma randômica as ligações β entre os carbonos 1 e 3 das cadeias de xilana. As exo-1,4- β -xilosidases (E.C. 3.2.1.37) e as exo-1,3- β -xilosidases (E.C. 3.2.1.72) hidrolisam as ligações β entre os carbonos 1 e 3 ou 4 dos resíduos de xilose do terminal não redutor da cadeia de xilana (NC-IUBMB, 2010).

As enzimas acessórias, são responsáveis por hidrolisar as ligações das ramificações da cadeia de xilana, como as acetilxilana esterases (E.C. 3.1.1.72) responsáveis por promover a desatilação da cadeia de xilana e de xilooligosacarídeos; feruloil e cumaroil esterases (E.C. 3.1.1.73) que catalizam a hidrólise dos ácidos ferúlicos e cumáricos ligados à arabinofuranose; as α -L-arabinofuranosidasas (E.C. 3.2.1.55) hidrolisam as ligações alfa entre os carbonos 1,3 e ou 1,5 dos terminais não redutores de α -L-arabinofuranosídeo, liberando α -L-arabinofuranosil; α -D-glicuronidasas (E.C. 3.2.1.131) são necessárias para hidrolisar as ligações alfa entre os carbonos 1 e 2 dos resíduos de ácido glicurônicos; enquanto as glicuronoarabinoxilana endo-1,4- β -xilanasas (E.C. 3.2.1.136) realizam a hidrólise das ligações β entre os carbonos 1 e 4 dos resíduos de D-xilose e algumas glicuronoarabinoxilanas (NC-IUBMB, 2010).

3. Aplicação industrial da xilanase

O uso de enzimas em processos biotecnológicos tem crescido e ganhado grande interesse, justificada pelo uso em bioprocessos, sua ampla utilização abrange, o setor industrial, de alimentos e em vários outros processos biotecnológicos. A aplicação destas enzimas em processos biotecnológicos, reduz custos operacionais podendo aumentar a qualidade de um produto, utilizando processos limpos que contribuem para minimizar os impactos ambientais, o uso de xilanases e celulases, juntamente com pectinases, representam 20% do mercado mundial de enzimas. (MAYRINK, 2010).

Juntamente com outras enzimas, como por exemplo, glucanases, pectinases, celulases, proteases, amilases e lipase, as xilanases são usadas na produção de ração animal, sendo importante para o setor do agronegócio, elas são adicionadas nos ingredientes da ração, reduzindo a viscosidade da matéria crua (POLIZELLI, et al., 2005). A adição de xilanase também pode ser observada em dietas compostas por milho e farelo de soja com objetivo de melhorar a utilização da energia e a produção de ovos em dietas para galinhas poedeiras, melhorando a produção e a massa de ovos comerciais. (VIANA 2011).

Outra aplicação em ascensão é o estudo das xilanases, associadas a outras enzimas como mananases, ligninasas, xilosidasas, glucanases e

glicosidases, para a produção de combustíveis biológicos de segunda geração e do xilitol a partir de biomassa lignocelulolítica. O processo biológico de produção de etanol requer a deslignificação da lignocelulose para liberar celulose e hemicelulose complexada com a lignina, em seguida há uma despolimerização dos polímeros de carboidrato para produzir açúcar livre e que será fermentado por um microrganismo, como por exemplo, a *Saccharomyces* sp para a produção de etanol. (BEG et al,2001; POLIZELI et al, 2005).

A enzima xilanase é utilizada na indústria de polpa e papel, onde essas enzimas possuem papel importante na etapa de branqueamento da polpa kraft, onde o uso da xilanase substituiu o cloro neste processo de biobranqueamento da polpa, promovendo a retirada da xilana ao complexo lignina-carboidrato facilitando a lixiviação da lignina. O tratamento do material com a xilanase na etapa inicial de pré-cozimento ajuda a desorganizar a estrutura da parede celular, facilitando, também, as etapas seguintes do processo (GOMES et al., 2007; NIEHAUS et al., 1999).

Estudos sobre a produção enzimática por fungos fitopatogênicos têm crescido, em busca de compostos benéficos que podem ser explorados e utilizados para fins de aplicação na indústria (Tabela 1).

Tabela 1 Estudos sobre a produções de enzimas extracelulares produzidas por fungos fitopatogênicos, e algumas de suas aplicações.

Fungo Fitopatogênico	Enzima	Aplicação	Referência
<i>Pythium myriotylum</i>	Celulase	Em conjunto com outras enzimas, é utilizada no processo de extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais.	(GEETHU; RESNA; NAIR, 2013); (BHAT, 2000).
<i>Myrothecium verrucaria</i>	Protease	Utilizada na preparação de queijos, processamento de alimentos e fabricação de cerveja.	(MOREIRA et al., 2005); (SILVA, 2011) (WARD,2011)

<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Pectinase	Na maceração da uva para extração de suco.	(MARCHI et al., 2009) (HOWARD, 2011)
<i>Rhizoctonia solani</i>	Xilanase	Indústria de alimentos, e no tratamento de polpa Kraft.	(RUIZ; PIETRO; RONCERO, 1997); (GOMES et al., 2007)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Carboximetilcelulose (CMCase)	Agente espessante, e estabilizante na indústria alimentícia.	(MORAIS et al., 2016); (CALEGUER; BENASSI, 2007)

Continuação tabela 1.

Fonte: Elaborada pelo Próprio Autor

4. Cultivo em estado sólido

Para a produção de enzimas extracelulares, existem dois processos de cultivo, sendo eles, o cultivo submerso (CS) e o cultivo em estado sólido. (CES).

O cultivo submerso é um processo na qual o microrganismo se desenvolve em presença de água, onde as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis e livres. A vantagem neste processo está em relação a à facilidade de crescimento dos micro-organismos em condições controladas de pH e temperatura, além de tornar fácil a recuperação das enzimas extracelulares (ORLANDELLI et al., 2012), sendo este processo de cultivo mais utilizado para os microrganismos, tais como bactérias que requerem elevada umidade (SUBRAMANIYAM e VIMALA, 2012).

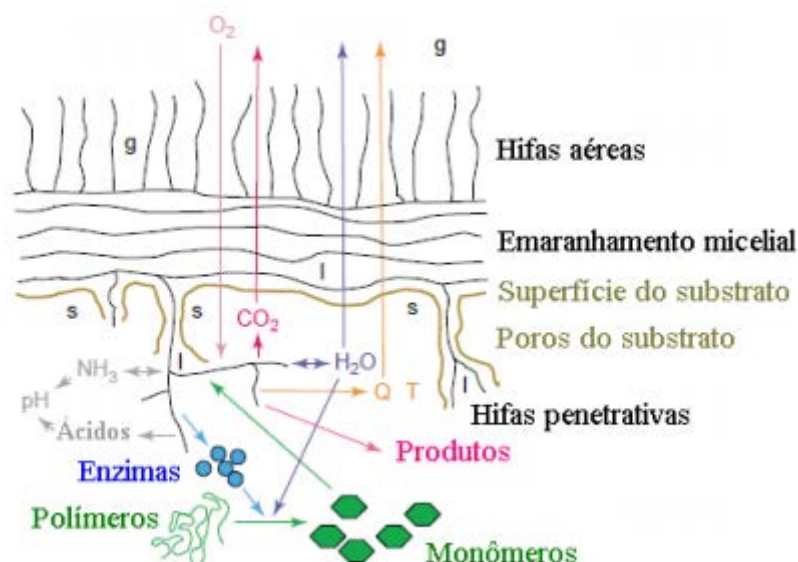
O cultivo em estado sólido (CES) está relacionado com o crescimento do microrganismo em substratos sólidos e com uma quantidade de água mínima requerida para o crescimento do microrganismo. O substrato sólido utilizado no cultivo, fornece uma estrutura de fixação, ou até mesmo pode ser uma fonte de nutrientes para o crescimento do microrganismo, este processo reproduz um

ambiente próximo as condições ambientais em que muitos destes fungos vivem, permitindo a penetração das hifas no substrato, auxiliando as trocas gasosas e a manutenção metabólica (Figura 7) (HÖLKER; LENZ, 2005).

Nas últimas duas décadas, o cultivo em estado sólido vem crescendo significativamente, para o desenvolvimento dos bioprocessos industriais, em particular devido à menor demanda de energia associada ao produto, um aumento rendimentos e menor produção de águas residuais.(THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

O cultivo em estado sólido (CES) está relacionado com o crescimento do microrganismo em substratos sólidos e com uma quantidade de água mínima. O substrato sólido utilizado no cultivo, fornece uma estrutura de fixação, ou até mesmo pode ser uma fonte de nutrientes para o crescimento do microrganismo, este processo reproduz um ambiente próximo as condições ambientais em que muitos destes fungos vivem, permitindo a penetração das hifas no substrato, auxiliando as trocas gasosas e a manutenção metabólica (Figura 7) (HÖLKER; LENZ, 2005).

Figura 7 Representação esquemática de alguns processos de microescala que ocorrem durante o CES



Fonte: Hölker; (2005), adaptado por Pereira (2013)

Existem vários aspectos importantes, que devem ser considerados para o desenvolvimento deste bioprocesso em CES. Assim algumas variáveis podem influenciar este processo, dentre elas, a temperatura, é um exemplo, que pode influenciar no crescimento do microrganismo, na produção enzimática e na estabilidade da enzima. Outro fator está relacionado aos níveis de umidade ao longo do cultivo, além da escolha do substrato, o tamanho da sua partícula influencia no espaço vazio que é ocupado pelo ar, e na taxa de transferência de oxigênio para o espaço vazio, podendo influenciar o crescimento fúngico. Estas variáveis devem ser avaliadas para que ocorra a otimização de parâmetros do processo cultivo em estado sólido (PANDEY, 2003).

5. Referências Bibliográficas

ALEXANDRE, S. M. A. Polissacarídeos da biomassa do basidiomiceto *Rhizoctonia solani*: extração, purificação e atividade biológica. 105 f. 2015. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2015.

BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their applications: a review. **Applied microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326- 338, 2001.

BASSETO, M.A; CERESINI, P.C.; VALÉRIO FILHO, W.V. Severidade da mela da soja causada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em função de doses de potássio. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.1, p.56-62, 2007.

BISTRATINI, E. A. S. Enzimas degradadoras de parede celular de plantas produzidas por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA: estudo da produção extracelular, purificação e caracterização. 213 f. 2016.Tese (Doutorado em Microbiologia) Universidade Estadual Paulista, São Jose do Rio Preto, 2016.

CALEGUER, V. D. F.; BENASSI, M. D. T. Efeito da adição de polpa, carboximetilcelulose e goma arábica nas características sensoriais e aceitação

de preparados em pó para refresco sabor laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 270–277, 2007.

CANTAREL, B. I. et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 233–238, 2009.

CARLING, D.E., KUNINAGA, S. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn: inter – and intragroup relatedness of anastomosis group 9. **Phytopathology**, v.80, p.1362-64, 1990.

CARLING, D.E. Anastomosis groups and subsets of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RHIZOCTONIA, 3, 2000, Taichung. Abstracts... Taichung: International Symposium on Rhizoctonia, p.14, 2000.

Cazypedia. Glycoside Hydrolase family classification. Disponível em <<http://www.cazy.org/glycoside-hydrolases.html>> Acesso em 01 de setembro de 2017.

CHAMPAGNE, P.; LI, C. Enzymatic hydrolysis of cellulosic municipal waste water treatment process residuals as feedstocks for the recovery of simple sugars. **Bioresource Technology**, v.100, n.23, p.5700-5706, 2009.

CHANWICHA, N. et al. Purification and characterization of alkaline xylanase from *Thermoascus aurantiacus* var. levisporus KKU-PN-I2-1 cultivated by solid-state fermentation. **Mycoscience**, v. 56, n. 3, p. 309–318, 2015.

DE CASSIA PEREIRA, J. Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos/termotolerantes produtores de celulases e xilanases e aplicação dos extratos enzimáticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. 2013. 94 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2013.

DE CASSIA PEREIRA, J. et al. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 928–939, 2015.

DE LORENZO, G. et al. Fungal invasion enzymes and their inhibition. In *The Mycota. Plant Relationships, Part B*, G. C. Carroll and P. Tudzynski, eds. p.61–83,1997.

EBRINGEROVÁ, A. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. **Macromolecular Symposia**, v. 232, n. 333, p. 1-12, 2006.

ELIAS, A.; FERREIRA, A. B. M.; BUENO, C. J. Produção in vitro de enzimas extracelulares por fungos e sua relação com os sintomas descritos em planta hospedeira. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 4, p. 315–317, dez. 2015.

GEETHU, C.; RESNA, A. K.; NAIR, R. A. Characterization of major hydrolytic enzymes secreted by *Pythium myriotylum*, causative agent for soft rot disease. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 5, p. 749–757, 30 nov. 2013.

GOMES, E. et al. Enzimas termoestáveis: Fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136–145, 2007.

GUTIÉRREZ, S. A. *Sclerotium hydrophilum* em cultivos de arroz de Argentina. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 100, 2007.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–6, 2005.

HOWARD, R. L. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology, Nairobi**, v. 2, p. 602-619, 2003

JUNG, H.G. AND K.P. VOGEL. Lignification of switchgrass (*Panicum virgatum*) and big bluestem (*Andropogon gerardii* Vitman) plant parts during maturation and its effect on fibre degradability. **Journal Science Food and Agriculture**, v.59, p.769-776, 1992

KUMAR R, Singh S, Singh O. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 2008;35:374, 2008.

KRUGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Fungos. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap. 4, p. 85

MANAVALAN, T.; MANAVALAN, A.; HEESE, K. Characterization of Lignocellulolytic Enzymes from White-Rot Fungi. **Current Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 485-498, 2015.

MARCHI, C. E. et al. Atividade pectinolítica de *colletotrichum gloeosporioides* e a relação com a agressividade ao *Stylosanthes* spp. **Bragantia**, v. 68, n. 2, p. 423–433, 2009.

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-MG, 2010

MORAIS, S. et al. Complexo celulolítico produzido por duas espécies de fungos fitopatogênicos isolados de mandioca. **Summa Phytopathologica**, v.42, n.3, p.249-253, 2016

MOREIRA, F. G. et al. Production of hydrolytic enzymes by the plant pathogenic fungus *Myrothecium verrucaria* in submerged cultures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 7–11, 2005.

MORETTI, M. M.S.; et al., Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.3, p.1062-1071, 2012.

NC-IUBMB. The Enzyme List Class 3 — Hydrolases. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. September 2010. Disponível em < <http://www.enzyme-database.org/downloads/ec3.pdf>> Acesso em 14 de maio de 2017.

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.

NIEHAUS, F. et al. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 51, n. 6, p. 711–729, 1999.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; ALENCAR, J. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

PÁDUA, R. R.; ALVARENGA, D. O.; QUEIROZ, P. R.; MELLO, S. C. M. Avaliação e caracterização de potenciais antagonistas de *Sclerotium rolfsii* pertencentes ao gênero *Trichoderma*. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento). **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Brasília, p.23, 2007.

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

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.

PENG, F. et al. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 4, p. 879-903, 2012.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

POLONI, N. M. et al. Evidência de que o fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA adaptado à *Urochloa* na Colômbia mantém ampla gama de hospedeiros incluindo o milho. **Summa Phytopathologica**, n. 14, p. 228–232, 2016

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. Biology of plants. New York: Worth Publ., p. 791, 2016.

RUIZ, M. C.; PIETRO, A. DI; RONCERO, M. I. G. Purification and characterization of an acidic endo-. **FEMS Microbiology letters**, v. 148, p. 75–82, 1997.

SAINI, A. et al., Actinomyetes: A Source of Lignocellulolytic Enzymes. **Enzyme Research**, v. 2015, 2015.

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.

SANTOS, F. A et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quimica nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SUBRAMANIYAM, R. AND VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. *I.J.S.N.*, V. 3 n. 3, p. 480-486, 2012.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–161, 2013.

UMSZA-GUEZ, M. A. et al. Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1585–1597, 2011

VIANA, Maurício Tácio dos Santos; ALBINO, Luis Fernando Teixeira. Rostango, Horacio Santiago; et al. Utilização de xilanase em dietas compostas por milho e farelo de soja de poedeiras comerciais em postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.40, N.2, p. 385-390, 2011.

CAPÍTULO II

SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE XILANASE E ESTUDO ENZIMÁTICO

Resumo

A produção enzimática por microrganismos tem sido amplamente estudada, justificado por suas potencialidades e aplicações em diversos setores da indústria. No processo de obtenção dessas enzimas, diversos substratos lignocelulósicos têm sido utilizados para a produção de diferentes enzimas celulolíticas e xilanolíticas por diferentes fungos. Nesta etapa vinte isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA foram avaliados quanto ao potencial de produção de enzimas xilanolíticas utilizando o cultivo em estado sólido e farelo de trigo na etapa inicial. Dentre os isolados avaliados, os que apresentaram as melhores médias de atividade enzimática foram avaliados quanto a produção de xilanase utilizando diferentes substratos, como por exemplo, palha de milho triturada, planta de soja, folha de soja, e duas espécies de braquiárias (*Urochloa ruzieziensis* e *decumbens*). Os substratos utilizados neste estudo foram avaliados quanto aos constituintes da parede celular vegetal, onde foram analisando os valores médios de celulose, hemicelulose e lignina. Sendo que o farelo de trigo apresentou os maiores teores de hemicelulose (44,60%), já os maiores teores de celulose e lignina foram observados na planta de soja, com valores médios 37,04 e 10,85%, respectivamente. Para a produção utilizando-se diferentes substratos lignocelulósicos, os maiores valores de produção enzimática utilizando diferentes substratos lignocelulósicos foram obtidas pelo isolado MTAFUB11-1 ($41,38 \text{ U mL}^{-1}$), quando cultivado em estado sólido, utilizando o farelo de trigo como substrato, para o substrato *U. decumbes*, o valor máximo de produção foi observado pelo isolado RR_A24 com valores de $36,62 \text{ U mL}^{-1}$. Dentre os seis substratos utilizados para avaliar a produção enzimática, o farelo de trigo teve os maiores valores médios de produção, em relação aos outros substratos, por outro lado, o substrato contendo somente a folha de soja apresentou os menores valores de produção. Os isolados MTAFUB11-1 e RRA_24 foram avaliadas quanto a produção ao longo do tempo, o isolado MTAFUB11-1 apresentou valores máximos de produção em 144 horas.

1. Introdução

Os microrganismos produzem um complexo de enzimas para a degradação dos constituintes do material lignocelulósico, e estas enzimas degradadoras de parede celular tem sido amplamente estudada, pois apresentam um interesse econômico e vem sendo utilizadas comercialmente pelas indústrias. (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; PHUTELA et al., 2005).

Entre os microrganismos, os fungos fitopatogênicos vem sendo estudado quanto a produção enzimática, como por exemplo, o fungo *Rhizoctonia solani*, e os fungos do gênero *Pythium* e *Fusarium*, vem demonstrando potencial na produção de enzimas, tais como xilanase, pectinase e celulase (BISTRATINI, 2016; ELIAS; FERREIRA; BUENO, 2015; GEETHU; RESNA; NAIR, 2013).

Várias enzimas extracelulares estão comercialmente disponíveis e utilizadas na indústria. O uso destas enzimas pelas indústrias é indispensável, uma vez que elas podem melhorar a qualidade de um produto ou tornar mais fácil a sua obtenção, isto deve-se ao fato das enzimas atuarem sobre as substâncias que compõem um determinado produto. (BARATTO et al., 2011).

No processo de obtenção dessas enzimas, diversos substratos lignocelulósicos têm sido utilizados para a produção de diferentes enzimas celulolíticas e xilanolíticas por diferentes fungos. A diferença do percentual dos teores de celulose, hemicelulose e lignina presentes nestes substratos induzem a produção de diferentes complexos enzimáticos. (SÁNCHEZ, 2009)

Substratos lignocelulósicos como farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e derivados de soja, têm se mostrado eficiente para a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por alguns fungos, como por exemplo os fungos *Rhizoctonia solani* e *Myceliophthora thermophila* (BISTRATINI, 2016; DE CASSIA PEREIRA et al., 2015).

O farelo de trigo é muito utilizado na etapa inicial de crescimento do microrganismo em cultivo em estado sólido, ele é um subproduto da moagem convencional do trigo e é largamente comercializado, porém como produto de baixo valor agregado, constituindo uma boa fonte de e proteínas e minerais, além de ser uma rica fonte de fibra, sendo as fibras presente no trigo constituídos

principalmente de celulose, material cuticular e xilanos complexos (SWENNEN et al., 2006).

Resíduos lignocelulósicos e resíduos agrícolas são abundantes na natureza, e pesquisas em relação a utilização destes resíduos, de forma a convertê-los em produtos de valor têm mostrado uma crescente tendência. A utilização destes resíduos podem resultar na redução do volume destes no ambiente, além de gerar compostos de valor, que podem ser retirados ou sintetizados a partir de diferentes resíduos, para a produção de enzimas, por exemplo, que podem ser de interesse para a indústria (SÁNCHEZ, 2009).

Desta forma neste capítulo será avaliado a produção de xilanase por microrganismos, por cultivo em estado sólido, utilizando-se diferentes resíduos lignocelulósicos como substratos, bem como a produção enzimática ao longo do tempo.

2. Objetivos

- a) Seleção entre os isolados amostrados de diferentes regiões e hospedeiros do país;
- b) Produção xilanolítica utilizando farelo de trigo como substrato no cultivo em estado sólido, na etapa inicial;
- c) Caracterização bromatológica dos substratos utilizados nos ensaios de produção;
- d) Uso de diferentes substratos potenciais hospedeiros naturais do fungo em estudo.
- e) Perfil de produção xilanolítica ao longo do tempo de cultivo em estado sólido.

3. Material e Métodos

3.1. Microrganismo

Foram utilizados vinte isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA de diferentes hospedeiros, como braquiária e cultura de arroz e soja, e que estão depositados

na coleção de fungos fitopatogênicos da UNESP- Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos da UNESP Campus de Ilha Solteira, sob responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Ceresini.

3.2. Pré-inóculo para o cultivo em estado sólido

O inóculo dos isolados fúngicos foram feitos em placa de Petri contendo o meio de cultivo Batata Dextrose Agar (BDA), composto de 200 g de batata, 20 g de glicose e 18 g de ágar, com pH final de 5,6 mantendo-se as placas por 96h a 25 °C. Após este período foram retirados 5 discos com o crescimento fúngico de 0,5 cm de diâmetro, que foram transferidos para frascos de Erlenmeyer para o cultivo em estado sólido.

3.3. Produção de xilanase por cultivo em estado sólido

Para a produção enzimática utilizou-se o cultivo em estado sólido (CES), o cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 5g de substrato esterilizado, na etapa inicial foi utilizado como substrato o farelo de trigo, foi inoculado 5 discos contendo o crescimento fúngico de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em placa de Petri com meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Agar). Posteriormente estes frascos foram umedecidos com 5,5 mL de solução salina ($1,4 \text{ g L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $2 \text{ g L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$, $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4$, $0,3 \text{ g L}^{-1}$), a fim de se manter uma umidade relativa de 50% e incubados a 25 °C por 96 h. Ao final de cada fermentação, a solução enzimática bruta foi extraída pela adição de 40 mL de água deionizada em cada frasco, os quais permaneceram sob agitação de 100 ciclos por minuto, em temperatura de 25 °C por 1 hora. Decorridos esse tempo o material foi filtrado e centrifugado a 10.000 rpm por 15 min, a suspensão resultante como extrato enzimático bruto, foi utilizado para a determinação da atividade enzimática.

3.4 Caracterização dos substratos quanto aos constituintes do material lignocelulósicos.

As análises para a determinação dos teores dos constituintes do material lignocelulósico foram realizadas na UNESP- Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, no Laboratório de Bromatologia.

Para a determinação de hemicelulose, lignina e celulose utilizou-se o método proposto por VAN SOEST (1965) e descrito por SILVA (2002). Este método baseia-se na separação das diversas frações dos constituintes da parede celular vegetal, por meio de reagentes específicos, denominados detergentes. São utilizados dois detergentes, o neutro e o ácido, sendo que o detergente neutro tem por finalidade, retirar a parte solúvel, que é o conteúdo celular, composto de proteínas solúveis, açúcares, lipídeos, nitrogênio não proteico, pectina, amido e outros constituintes solúveis, assim a porção não insolúvel, a fibra constituída basicamente de celulose, hemicelulose, lignina, proteína lignificada e sílica, denominado fibra em detergente neutro (FDN).

O uso do detergente ácido na etapa seguinte irá solubilizar a hemicelulose e a maior parte da proteína insolúvel na etapa anterior. A lignina é insolúvel, a celulose, sílica e o nitrogênio lignificado, esta amostra não solúvel é denominado de fibra em detergente ácido (FDA). O fracionamento dos constituintes da parede celular é finalizado a partir da solubilização da lignina, utilizando a solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4).

3.5 Cultivo em estado sólido utilizando diferentes substratos

3.5.1 Preparo dos substratos

Os substratos utilizados para o cultivo em estado sólido estão dispostos na Tabela 2. A palha de milho, a palhada de soja, folha de soja, *Urochloa ruziezensis* e *Urochloa decumbens* foram cedidos pela Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE), da UNESP Campus de Ilha Solteira,

situada no município de Selvíria-MS. O farelo de trigo, da marca Moinho Globo, foi adquirido no mercado local.

Tabela 2 Origem e dimensões dos substratos utilizadas no processo de cultivo em estado sólido das linhagens fúngicas.

Substrato	Abreviação	Origem	Dimensões (mm)
Farelo de Trigo	FT	Comercio local	-
Palha de Milho	PM	FEPE-UNESP	
<i>Urochloa ruzieziensis</i>	BR	FEPE-UNESP	2
<i>Urochloa decumbens</i>	BD	FEPE-UNESP	2
Folha de soja	FS	FEPE-UNESP	-
Palhada de soja	OS	FEPE-UNESP	2

Fonte: Elaborada pelo próprio autor

O material vegetal da palha de milho (PM), a palhada constituída de toda a planta da soja, incluindo caule, folha e vagens sem semente (PS) e somente a folha de soja (FS), e duas espécies de braquiária, a *U. ruzieziensis* (UR) e *decumbens* (UD), foram reduzidos em partículas por meio de um triturador de forragens, que reduziu os materiais vegetais em partículas menores que 20 mm de comprimento.

O farelo de trigo foi submetido a diversas lavagens sob água corrente para retirada de açúcares, amidos e possíveis detritos e cinzas presentes. Ensaio para açúcar redutor total foram realizados, utilizando o método proposto por Miller (1959) durante o processo de lavagem para verificar a retirada dos açúcares livres no substrato. Todo o matéria vegetal foi previamente lavado, seguido de secagem ao sol e posterior secagem em câmara de circulação de ar a 60 °C, os substratos foram guardados em sacos plásticos e depositados em câmara de armazenamento, com temperatura de 12 ± 3 °C.

3.6. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática para xilanase foi determinada adotando o micro-ensaio, onde a mistura de reação contendo 0,025 mL da solução do extrato

enzimático bruto e 0,225 mL de uma solução contendo 1,0% do substrato xilana birchwood em tampão de acetato de 100 mmol L⁻¹ a pH 5,5 foi incubada a 40 °C em banho maria por 10 mim. Decorridos esse tempo foi adicionado 0,250 mL do reagente DNS à mistura de reação. Tal mistura foi incubada em banho maria a 100 °C por 5 minutos, e em seguida resfriada, adicionando-se 2,5 mL água destilada. Após a homogeneização, foi realizada leitura em espectrofotômetro em λ 540 nm. O açúcar redutor liberado nesta reação foi quantificado pelo método do DNS (ácido 1-3-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Para o cálculo da atividade enzimática de xilanase, uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de xilose por minuto, nas condições de reação, a partir da curva padrão de xilose.

3.7. Perfil de Produção enzimática

Após o cultivo em diferentes substratos, dois isolados que apresentaram boa produção da enzima testada, foram avaliados quanto a produção enzimática ao longo do tempo no substrato de melhor indução xilanolítica. As amostras foram cultivadas em estado sólido e foram retiradas a cada 24 horas de cultivo, por um período de 240 horas.

3.8. Análise estatística

A análise estatística dos resultados das diferentes linhagens cultivadas em estado sólido utilizando o farelo de trigo como substrato, foram feitas Teste de Scott-Knott. O procedimento de Scott e Knott (1974) é uma técnica que compara as médias de tratamentos para agrupar “n” tratamentos em “k” grupos. Portanto, foi utilizado este procedimento para analisar a significância dos valores de atividade enzimática de cada linhagem.

4. Resultados e Discussões

4.1 Caracterização dos teores dos constituintes do material lignocelulósico

Os teores de hemicelulose, celulose e lignina dos substratos utilizados no cultivo em estado sólido estão dispostos nas Tabela 3.

Os resultados mostraram que o farelo de trigo apresentou o maior valor de hemicelulose (44,60%), por outro lado a palhada de soja apresentou o menor valor com 16,10% de hemicelulose. Analisando os teores médios dos componentes da parede celular vegetal do trigo, Carvalho (2010) observou valores relativamente próximos aos encontrados neste estudo, sendo 29,55% de hemicelulose, 18,71 % de celulose e 3,43% de lignina.

O farelo de trigo é uma fonte de carbono e nitrogênio e tem sido utilizado para produção de celulasas e hemicelulasas, além de outros constituintes, o farelo de trigo apresenta valores de celulose (7,57%), hemicelulose (31,19%) e contem baixo teor de lignina (4,06%), sendo utilizado pelos fungos na etapa inicial de crescimento (LEITE et al. 2008).

Tabela 3 Teores médios de fibra em detergente neutro (FDN), de fibra em detergente ácido (FDA), de hemicelulose, celulose e de lignina.

Material lignocelulósico	FDN %	FDA %	Hemicelulose %	Celulose %	Lignina %
<i>U. ruzieziensis</i>	59,89	32,76	27,13	27,44	4,20
<i>U. decumbens</i>	67,53	39,99	27,54	33,22	4,84
Farelo de Trigo	65,85	21,25	44,60	14,54	5,37
Palha de Milho	72,46	35,40	37,06	33,13	1,02
Palhada da Soja	65,38	49,28	16,10	37,04	10,85

Fonte: Elaborada pelo próprio Autor

Em relação aos valores dos constituintes da parede celular vegetal, Silva (2002) analisando os teores médios de *U. ruzieziensis* e *decumbens* encontrou valores de hemicelulose e celulose próximos ao encontrado neste presente

estudo, com um porcentual de 27,7% de hemicelulose, 30,2 % de celulose e 10,9 % de lignina para *U. ruzieziensis*, enquanto que para *U. decumbens* observou um porcentual de 29,1% de hemicelulose, 32,2 % de celulose e 8,7% de lignina.

Vários fatores podem influenciar os constituintes da parede celular na maioria dos vegetais, assim os valores de celulose, hemicelulose e a lignina, depende não só apenas do tipo de vegetal, mas também de condições de crescimento, da parte da planta escolhida, além da idade de colheita do material vegetal a ser utilizado no estudo (LUCY; PETRI, 2010).

Para o melhor aproveitamento do resíduo pelo microrganismo, seria interessante o uso de um pré-tratamentos no material, com o intuito de aumentar sua susceptibilidade ao agente de interesse, pela remoção da lignina, como por agentes físicos, químicos ou biológicos. (MOSIER, 2005).

4.2 Avaliação da atividade enzimática das linhagens estudadas

As análises em relação a produção xilanolítica dos isolados de *Rhizoctonia solani* AG1-IA, demonstram que os isolados MTAFOB11-1, RR_A24, MT_SO85 e RR_A41 tiveram destaque no que se refere à produção xilanolítica, com valores de atividade de 41,38 U mL⁻¹, 36,63 U mL⁻¹, 34,62 U mL⁻¹ e 32,93 U mL⁻¹, dentre os vinte isolados avaliados na etapa inicial adotando o cultivo em estado sólido, e utilizando o farelo de trigo como substrato, por um período de 96 horas, por outro lado, é possível observar que os menores valores de atividade enzimática foram obtidos pelos isolados MTAFOB13-2 A (2,27 U mL⁻¹) (Tabela 4).

A produção de xilanase obtidas no presente estudo apresentou valores superiores ao encontrado por Ellouze et.al (2007), que estudando o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* apresentou valores de atividade máxima de xilanase de 2,5 U mL⁻¹ quando cultivado em farelo de trigo.

Tabela 4 Fonte de variação e probabilidade F para a atividade de xilanase das linhagens após 96h de cultivo em estado sólido. Utilizando o farelo de trigo como substrato.

	Fontes de variação	Hospedeiro Isolado	Atividade (U mL ⁻¹)
<u>Linhagem</u>			
	MTAFUB11-1	Braquiária	41,38 A
	RR_A24	Arroz	36,63 A
	MT_SO85	Soja	34,62 A
	RR_A41	Arroz	32,93 A
	MTUB02-D	Braquiária	29,01 B
	MTAFUB03-1	Braquiária	26,04 B
	PABIF6	Braquiária	24,88 B
	MTAFUB05-1	Braquiária	15,60 C
	TO_064	Soja	15,20 C
	MTAFUB04-1	Braquiária	13,14 C
	MTAFUB08-1	Braquiária	8,85 D
	MTUB03-C	Braquiária	8,58 D
	ROB4D7	Braquiária	8,54 D
	MTAFUB12-1	Braquiária	7,34 D
	MTAFUB05-B	Braquiária	6,13 D
	MTAFUB15-2 A	Braquiária	4,30 E
	MTUB04-B	Braquiária	4,22 E
	MTUB06-B	Braquiária	3,37 E
	MTUB01-F	Braquiária	2,69 E
	MTAFUB13-2 A	Braquiária	2,26 E
<u>Probabilidade de F</u>			
Linhagem	56,763**		
CV (%)	18,30		

**= significativo a 1% de probabilidade, letras maiúsculas se diferem entre linhagens

Fonte: Elaborada pelo próprio Autor

4.3 Atividade xilanolítica em diferentes substratos

Dos vinte isolados avaliados inicialmente, dez apresentaram boa atividade enzimática quando cultivado em farelo de trigo, na etapa anterior, e foram selecionados para o estudo da produção de enzimas xilanolíticas em diferentes substratos lignocelulósicos. Os substratos selecionados para avaliar a atividade enzimática foram as duas espécies de braquiárias (*U. decumbes* e *U. ruzieziensis*), a palhada de milho e palhada de soja e somente a planta de soja, que são hospedeiro natural do fungo *Rhizoctonia solani*.

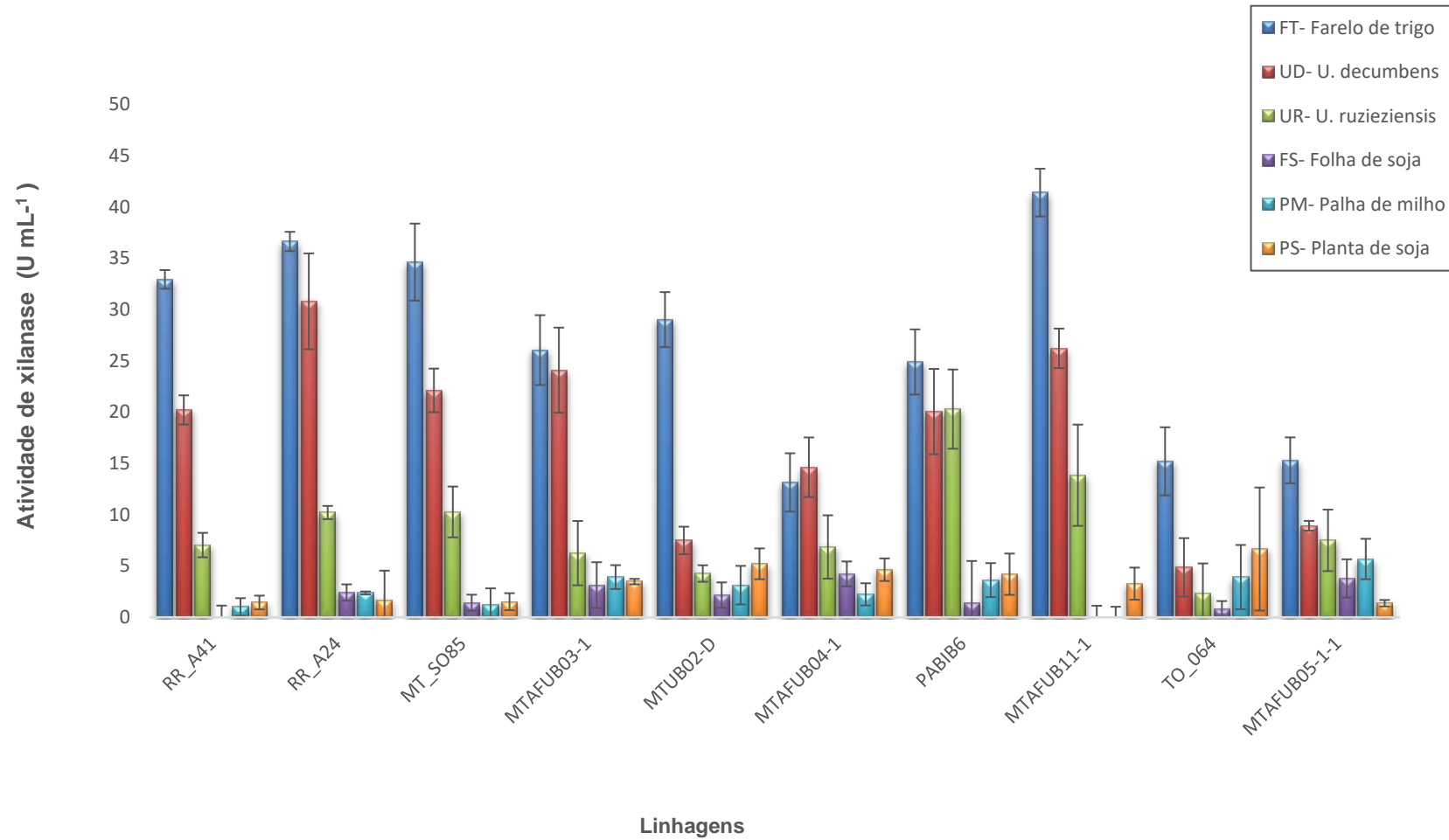
Os resultados estão dispostos na Figura 8, e demonstram que os maiores valores de produção enzimática utilizando diferentes substratos lignocelulósicos foram obtidas pelos isolados MTAFUB11-1 (41,38 U mL⁻¹), quando cultivado em estado sólido, utilizando o farelo de trigo como substrato, enquanto que para o substrato de braquiária (*U. decumbes*) o isolado RR_A24 apresentou os valores máximos de produção, para este substrato (36,62 U mL⁻¹).

Avaliando a produção de xilanase em extrato bruto pelo fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata* RM 35, Coura (2012) encontrou valores de produção de xilanase de 14,40 U mL⁻¹ após 168 horas de cultivo em farelo de trigo .

O farelo de trigo, foi o que apresentou os maiores valores médios de atividade xilanolítica pelos isolados estudados, como pode ser observado na figura 9. O Farelo de trigo é um subproduto da moagem convencional do trigo e é largamente comercializado, porém como produto de baixo valor agregado. De forma geral, o farelo de trigo constitui-se de uma mistura heterogênea de compostos provenientes da parede celular como celulose, hemicelulose, lignina e xilanos complexos. (SWENNEN et al., 2006) como pode ser observado na tabela 3, e é muito utilizado na etapa inicial de crescimento de microrganismos em cultivo em estado sólido.

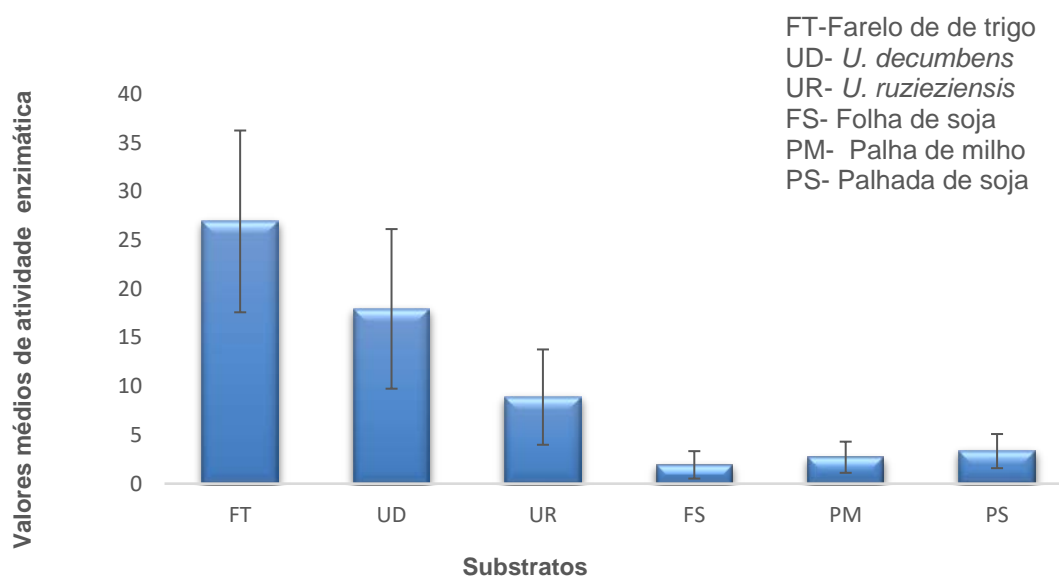
Avaliando a produção de enzimas xilanolíticas pelo fungo *Rhizoctonia solani* AG1- IA utilizando diferentes substratos, Bistratini (2016) encontrou os melhores valores de produção de enzimas nos substratos de farelo de trigo, braquiária e palha de soja, com valores de médios de produção de 17,5 U mL⁻¹ nestes substratos.

Figura 8 Atividade de xilanase produzida pelas linhagens fúngicas de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, após 96 horas de cultivo em estado sólido, utilizando diferentes substratos. A barra representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Figura 9 Valores médio de produção de xilanase (U mL^{-1}) nos diferentes substratos lignocelulósicos, sob cultivo em estado sólido após 96 horas. A barra representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

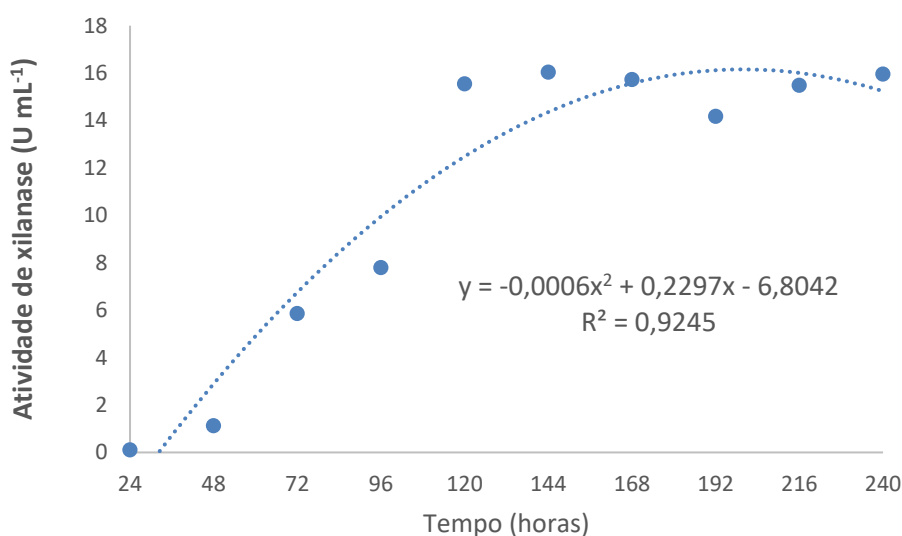
Por outro lado, os menores valores de produção enzimática foram observados por todos os isolados quando cultivado em estado sólido, por um período de 96 horas, utilizando a palhada de soja como substrato (Figura 9). A soja apresenta um alto teor de lignina, como pode ser observado na tabela 3, a lignina é um dos constituintes da parede celular, e confere resistência mecânica aos vegetais, além de proteger os tecidos contra o ataque de microrganismos, como por exemplo de fungos. Consiste de polímeros fenilpropanóides da parede celular, altamente condensados e muito resistentes à degradação. Eles são compostos de unidades *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), em proporções diferentes, de acordo com sua origem. Diferentes tipos de lignina são degradadas de forma diferente por microrganismos, e a lignina rica em siringila é degradada mais facilmente do que aquelas que apresentam guaiacila. (OLIVEIRA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002). Ainda a lignina é apontada pela sua deposição em resposta a vários tipos de lesões e ataques em plantas provocadas por fungos, aumentando a resistência das paredes à ação de enzimas degradadoras, impedindo a difusão de toxinas do patógeno em direção

ao hospedeiro, e restringindo a colonização por patógenos, assim a lignificação assume um papel importante na proteção das plantas por ataques por estes microrganismos, protegendo-as contra a atividade enzimática degradadoras de parede celular (RAVEN, 2016).

4.4 Perfil de Produção xilanólica pelos isolados selecionados

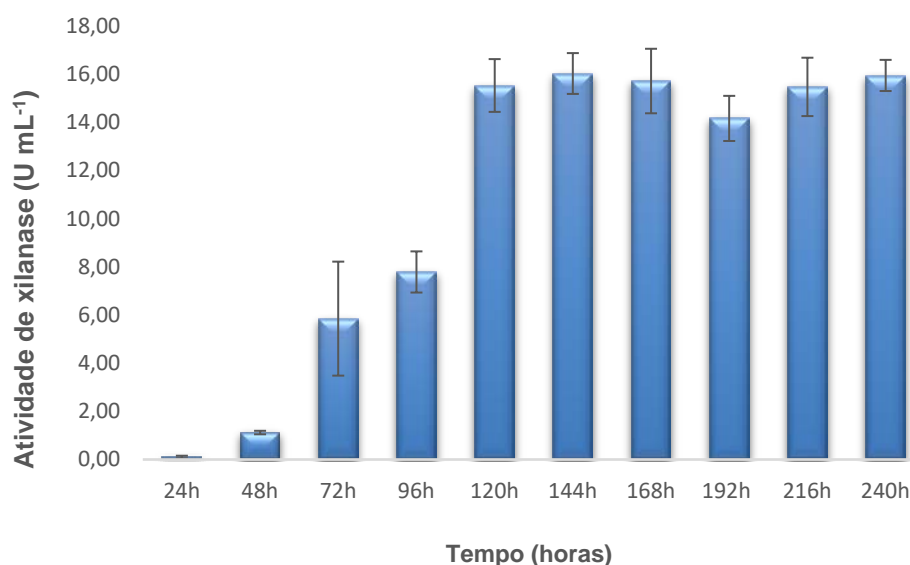
Os melhores isolados quanto a produção enzimática na etapa anterior, foram selecionadas, e avaliadas quanto a produção enzimática ao longo do tempo, por um período de 240 horas. O isolado RR_A24 obteve os melhores resultados quando cultivado no substrato braquiária (*U. decumbes*), e o isolado MTAFOB11-1 quando cultivado no substrato farelo de trigo, assim estes isolados foram avaliados quanto a produção enzimática ao longo do tempo nestes substratos, afim de avaliar o melhor tempo de cultivo para os isolados em estudo. As amostras foram retiradas a cada 24 horas do início do cultivo em estado sólido em BOD a 25 °C. Os resultados demonstram que para o isolado RR_A24, obteve o pico de atividade enzimática máxima em torno de 144 horas, quando cultivado em estado sólido, utilizando braquiária, com valores de 15,37 U mL⁻¹. (Figura 10 e 11).

Figura 10 Regressão da atividade de xilanase pelo fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, RR_A24, cultivado em estado sólido, utilizando como substrato a *U. decumbens*., por um período de 240 horas.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Figura 11 Atividade de xilanase pelo fungo *Rhizoctonia solani* AG1- IA- RR_A24, cultivado em estado sólido, utilizando como substrato a *U. decumbens*, por um período de 240 horas. A barra representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



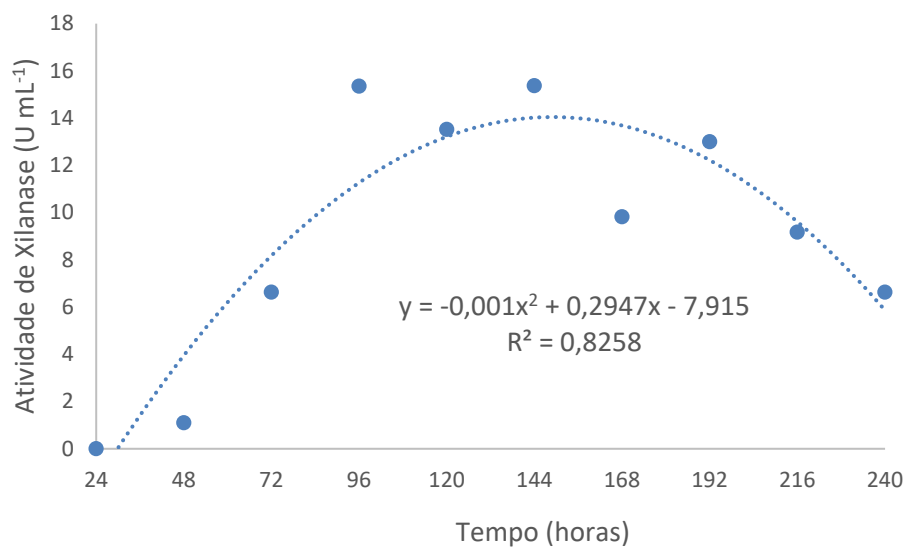
Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Para o isolado MTAFOB11-1 o tempo de cultivo de 144 horas apresentou os maiores valores, com médias de produção enzimática de 15,37 U mL⁻¹, quando cultivado em farelo de trigo (Figura 12 e 13).

Avaliando o perfil de produção do fungo fitopatogênico *Fusarium solani* SYRN7, ao longo do tempo, por um período de 144 horas, Arabi e colaboradores observaram valores de atividade de xilanase máxima 14,65 U mL⁻¹, após 96 horas de cultivo em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato (ARABI; BAKRI; JAWHAR, 2011). Os resultados encontrados na literatura se aproximam dos valores de produção de xilanase pelo isolado MTAFOB11-1.

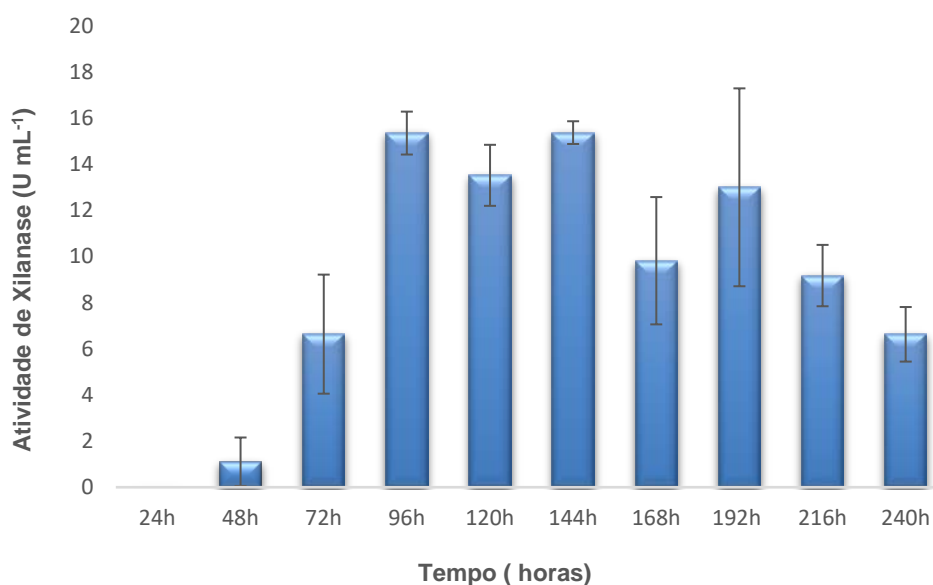
Cervantes e colaboradores avaliando o perfil de produção de xilanase ao longo do tempo, observou que o fungo *Sporisorium reilianum* não apresentou atividade nas primeiras 48 horas de fermentação, mas após o tempo de 72 e 96 horas observou o valor de atividade de 12,6 U mL⁻¹ de atividade xilanase entre 72 e 96 h de cultivo em estado sólido. (ÁLVAREZ-CERVANTES et al., 2013)

Figura 12 Regressão da atividade de xilanase pelo fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA MTAUFUB11-1, cultivado em estado sólido, utilizando como substrato o farelo de trigo, por um período de 240 horas.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Figura 13 Atividade de xilanase pelo fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA - MTAUFUB11-1, cultivado em estado sólido, utilizando como substrato o farelo de trigo, por um período de 240 horas. A barra representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

5. Conclusões

Dentre os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA avaliadas, quatro não apresentaram diferença estatística quanto a atividade xilanolítica, sendo elas a MTAFUB11-1, RR_A24, MT_SO85 e RR_A41, sendo que o isolado MTAFUB11-1 apresentou os melhores valores de produção de xilanase (41,38 UmL⁻¹) quando cultivado em estado sólido, utilizando o farelo de trigo como substrato, em BOD a 25 °C.

Em relação aos materiais lignocelulósicos utilizados como substrato, quando avaliado os teores dos constituintes da parede celular, o farelo de trigo apresentou os maiores valores médios de hemicelulose (44,60%), por outro lado o menor valor, foi observado pela palhada de soja (16,10%), que apresentou os maiores valores de celulose e lignina, com valores de 37,04% e 10,85%, respectivamente.

O isolado RR_A24 apresentou melhor indução para a produção de xilanase sob cultivo em estado sólido utilizando a braquiária *Urochloa decumbes* como substrato, com pico de atividade de xilanolítica em 144 horas de cultivo.

O isolado MTAFUB11-1 apresentou melhor atividade xilanolítica sob cultivo em estado sólido utilizando o farelo de trigo como substrato, após 96 horas de cultivo. Este isolado apresentou efetividade na produção da enzima de interesse, nesta etapa, este isolado foi então selecionado para a caracterização físico-química da enzima de interesse.

6. Referências Bibliográfica

ÁLVAREZ-CERVANTES, J. et al. Purification and characterization of xylanase SRXL1 from *Sporisorium reilianum* grown in submerged and solid-state fermentation. **BioResources**, v. 8, n. 4, p. 5309–5318, 2013.

ARABI, M. I. E.; BAKRI, Y.; JAWHAR, M. Extracellular xylanase production by *Fusarium* species in solid state fermentation. **The Polish Society of Microbiologists**, v. 60, n. 3, p. 209–12, 2011.

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, 2011.

BISTRATINI, E. A. S. Enzimas degradadoras de parede celular de plantas produzidas por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA: estudo da produção extracelular, purificação e caracterização. 213f. 2016. Tese (Doutorado em Microbiologia) Universidade Estadual Paulista- São Jose do Rio Preto, 2016.

CARVALHO, A. M.; DANTAS, R. A.; COELHO, M. C.; et al. Teores de hemiceluloses, celulose e lignina em plantas de cobertura com potencial para sistema plantio direto no Cerrado. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p.15 2010.

COURA, R. R. Purificação e caracterização de uma β -xilosidade do fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata* RM 35. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia molecular de plantas; Bioquímica e Biologia molecular animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

ELIAS, A.; FERREIRA, A. B. M.; BUENO, C. J. Produção in vitro de enzimas extracelulares por fungos e sua relação com os sintomas descritos em planta hospedeira. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 4, p. 315–317, dez. 2015.

ELLOUZE, O., et., al. Induction, properties and application of xylanase activity from *Sclerotinia sclerotiorum* S2 fungus. **Journal Food Biochemical**. 31 (1), 96-107, 2007.

GEETHU, C.; RESNA, A. K.; NAIR, R. A. Characterization of major hydrolytic enzymes secreted by *Pythium myriotylum*, causative agent for soft rot disease. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 5, p. 749–757, 30 nov. 2013.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40 (9), p. 2931 - 2944, 2005.

LEITE, R. M. V. B. D. C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. **Society**, p. 1–3, 2005.

LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; et al. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e 85 *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 391–395, 2008.

LUCY, T.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

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

MOSIER, N.; Wyman, et al., Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass . **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-658, 2005.

OLIVEIRA, E. DE et al. Ligninas- Métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.31, n.5, p.917-928, 2001

OLIVEIRA, E. DE et al. Chemical characterization of the lignins of corn and soybean agricultural residues. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootenia**. vol.54, n.1, 2002.

PEREIRA, J. C; et al., Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 928-939, 2015.

PHUTELA, U. et al. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing Orange peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 63–69, 2005.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biology of plants**. New York: Worth Publ., p. 791, 2016.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185–194, 2009.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. 2. ed. Viçosa, MG: UFV. 2002. 178 p

SCOTT, A.; J. KNOTT. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, p. 507-512, 1974.

SWENNEN, K.; COURTIN, C. M.; LINDEMANS, G. CJE; DELCOUR, J. A. Large-scale production and characterization of wheat bran arabinoxylooligosaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. V. 86 p.1722–1731, 2006.

VAN SOEST, P. J. Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by ruminants: Voluntary intake relation to chemical composition and digestibility. **J. Anim. Sci.**, v.24, n.3, p.834-844, 1965.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Resumo

O conhecimento do conjunto de enzimas que um micro-organismo produz e a caracterização destas, é fundamental para que se conheçam suas propriedades de atividade ótima de atuação e de estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura. O conhecimento dessas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em diferentes processos. Neste capítulo foi avaliado o efeito de íons sobre a atividade enzimática, a influência do pH na atividade e na estabilidade da xilanase, bem como a influência da temperatura na atividade e na estabilidade da enzima xilanase produzida pelo fungo *R. solani* AG-1 IA MTAFUB11-1 cultivado em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, após um período de 144 horas de cultivo. Em relação ao pH ótimo o isolado MTAFUB11-1 apresentou 50% de atividade em pH 4,5, sendo que seu pH ótimo de ação de atividade é de 5,0. A atividade em relação ao pH se manteve estável entre a faixa de pH 4,5 a 7,5. Em relação ao efeito da temperatura de incubação observou que a temperatura ótima é de 60 °C, na qual foi observada os valores máximos de atividade enzimática, de 35,9 U.mL⁻¹., e a estabilidade térmica foi observada nos intervalos de temperaturas de 20 °C a 50 °C, sendo que a enzima não se manteve estável por um período superior a 60 minutos a 60 °C. Dos dezoitos compostos utilizados para avaliar os efeitos de íons, na maioria os íons e reagentes testados diminuíram a atividade enzimática de xilanase, dentre os reagentes utilizados o Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi responsável por uma inibição de 95% da atividade enzimática em questão nas concentrações de 5 e 10 mmol L⁻¹.

1. Introdução

A caracterização das enzimas xilanolíticas é importante para sua aplicação biotecnológica. Conhecer os diversos fatores que podem influenciar a atividade enzimática contribui para a sua aplicação na indústria.

A estrutura e a forma do sítio catalítico de uma enzima são resultados da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura da proteína (LEHNHNGER, 2011). Dentre os fatores que podem afetar a estabilidade da proteína e conseqüentemente influenciar na atividade enzimática estão a alteração de pH, temperatura, compostos orgânicos e diferentes substâncias inibidoras (LEITE et al., 2008).

A instabilidade enzimática é um dos fatores que dificulta a aplicação de algumas enzimas na indústria, assim vários estudos buscam tornar a utilização destas enzimas em processos biotecnológicos mais favorável, implementando diferentes métodos que possam aumentar a efetividade da enzima e reduzir os custos. Vários métodos e técnicas são utilizadas para melhorar a estabilidade das enzimas, como por exemplo, a imobilização ou tratamento com aditivos de baixo peso molecular. (MOHAMAD et al., 2015)

O conhecimento do conjunto de enzimas que um microrganismo produz, a caracterização das enzimas é um passo importante para que se conheçam suas propriedades de atividade ótima de atuação e de estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura. O conhecimento dessas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em diferentes processos (KASHYAP et al., 2001).

O conhecimento de temperatura e o pH ideal de ação dessas enzimas tornam-se as interessantes e possível de utilização na indústria, de acordo com as necessidades da aplicação industrial. Por exemplo, enzimas que não atuam em temperaturas elevadas superiores a 55 °C e pH superior a 7,0 tem a sua aplicação limitada na indústria. Atualmente as empresas produtoras de enzimas já comercializam produtos estáveis em elevados valores de pH e elevadas temperaturas, tornando-as compatíveis com as condições de aplicação industrial (ANDRÉ AGUIAR, 2011; GOMES et al., 2007).

Assim conhecer as características que podem influenciar na atividade enzimática, auxilia a criar estratégias que possam aumentar a produtividade e diminuir o custo da produção destas enzimas. Neste capítulo, a influência do pH, a temperatura, bem como o efeito dos íons metálicos na atividade da xilanase foram avaliados buscando otimizar as variáveis que possam influenciar na atividade xilanolítica.

2. Objetivos

- a) Estabelecer pH e temperaturas ótimas de atividade da enzima de maior destaque;
- b) Determinar estabilidade térmica e de pH da enzima;
- c) Analisar o efeito de íons metálicos e compostos químicos na atividade enzimática.

3. Material e Métodos

3.1. Caracterização físico-química das enzimas

3.1.1. *Determinação do pH Ótimo*

A determinação do pH ótimo da atividade xilanolítica foi avaliada incubando-se 0,25 mL da solução enzimática bruta, em 0,225 mL de solução de xilana a 0,5% (p/v) em diferentes valores de pH, a 40 °C por 10 minutos. As soluções de xilano a 0,5% foram preparadas com tampões a 0,1 mol mL⁻¹, McIlvaine na faixa de pH de 3,0 a 8,0 com intervalo de 0,5 unidades.

3.1.2. *Determinação da Temperatura Ótima*

A temperatura ótima foi determinada por ensaio enzimático, utilizando 0,25 mL de enzima bruta, juntamente com 0,225 mL de solução de xilano a 0,5%, nas temperaturas de 30 a 90 °C, com intervalos de 5 °C, nas condições de pH ótimo. A atividade enzimática pelo método pré estabelecido.

3.1.3. Estabilidade em relação ao pH

A estabilidade das enzimas em relação ao pH, foi determinada utilizando um volume final de 1 mL do extrato bruto diluído em tampão com pH na faixa de 3,0 a 8,0, na proporção de 1:1 (v/v), e posteriormente foi incubado por 24 horas a 24 °C. Após o período de incubação, a atividade enzimática foi determinada pelo ensaio enzimático na condição de pH ótimo determinada anteriormente.

3.1.4. Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica da enzima foi determinada incubando 0,25 mL do extrato bruto na ausência de substrato, nas temperaturas de 40 a 80 °C, por um período de 30 e 60 minutos. Decorridos esse tempo, foi determinada a atividade enzimática.

3.1.5. Efeito de íons e reagentes sobre a atividade xilanolítica

As amostras foram avaliadas em relação aos efeitos de íons, foram selecionados 18 compostos (CuSO₄, NaCl, FeSO₄, CoCl₂, CaCl₂, HgCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, MnSO₄, NH₄Cl, MgSO₄, ZnSO₄, AgNO₃) e agentes químicos (EDTA, DTT, Triton e SDS) nas concentrações de 1, 5 e 10 mmol L⁻¹.

As amostras foram incubadas nos diferentes compostos selecionados por 60 minutos em temperatura ambiente. Após esse período realizou-se o ensaio enzimático.

4. Resultados

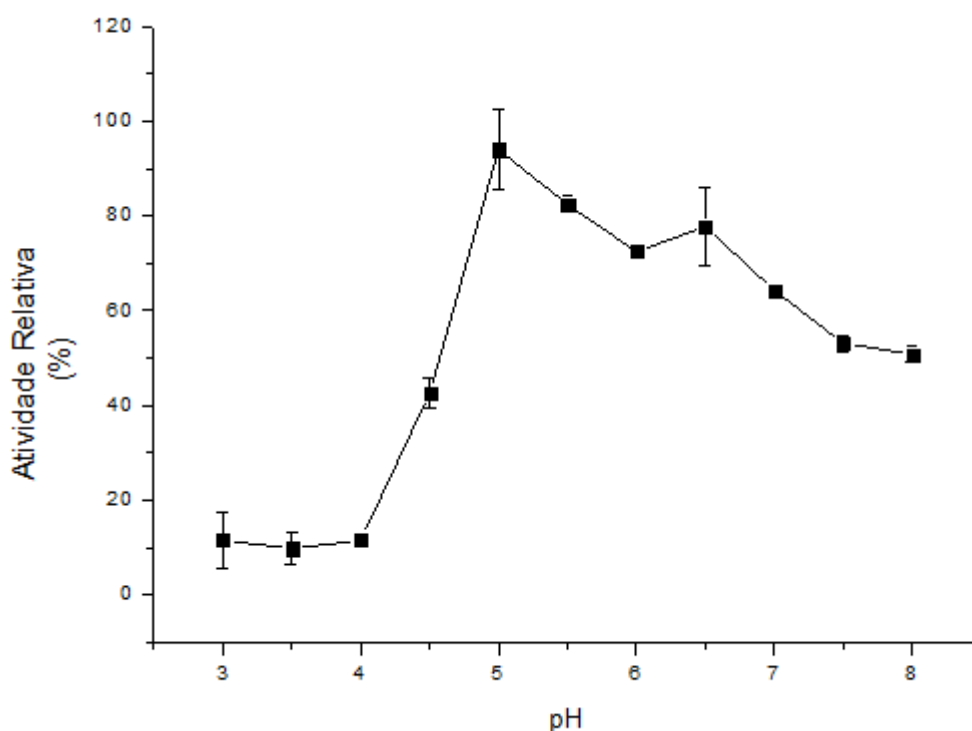
4.1. Avaliação do efeito do pH ótimo e de estabilidade na atividade enzimática

A determinação do pH ótimo de ação da atividade de xilanase produzida pelo fungo *Rhizoctonia solani* foi realizada na faixa de pH 3,0 a 8,0, com intervalo de 0,5 unidades. Dentro da faixa de valores de pH estudada, o isolado MTAFOB11-1 apresentou 50% de atividade em pH 4,5, sendo que seu pH ótimo de ação de

atividade é de 5,0. Ainda, pode-se observar valores de atividade de 72% em pH 7,0, e em pH 8,0, 58% da atividade residual foi quantificada. (Figura 14).

Estes valores encontrados neste presente trabalho corroboram com o encontrado na literatura, por xilanasas produzidas por outros fungos fitopatogênicos. Avaliando produção de xilanase pelo fungo *Fusarium proliferatum*, foi encontrado valores de pH ótimo na faixa de 5,0 a 5,5 quando cultivado no substrato de xilano de fibra de milho (SAHA, 2002), como foi observado pelo isolado MTAUFUB11-1, que apresentou valor ótimo de pH de 5,5. Enquanto que avaliando a produção de pelo fungo *Myrothecium verrucaria*, Moreira (2005), observou valores de pH ótimo na faixa de 4,5 a 5,0. (MOREIRA et al., 2005)

Figura 14 Efeito do pH sobre atividade da xilanase produzida pelo fungo *R. solani*-MTAFUB11-1, O símbolo representa o valor da média e a linha vertical o desvio padrão.

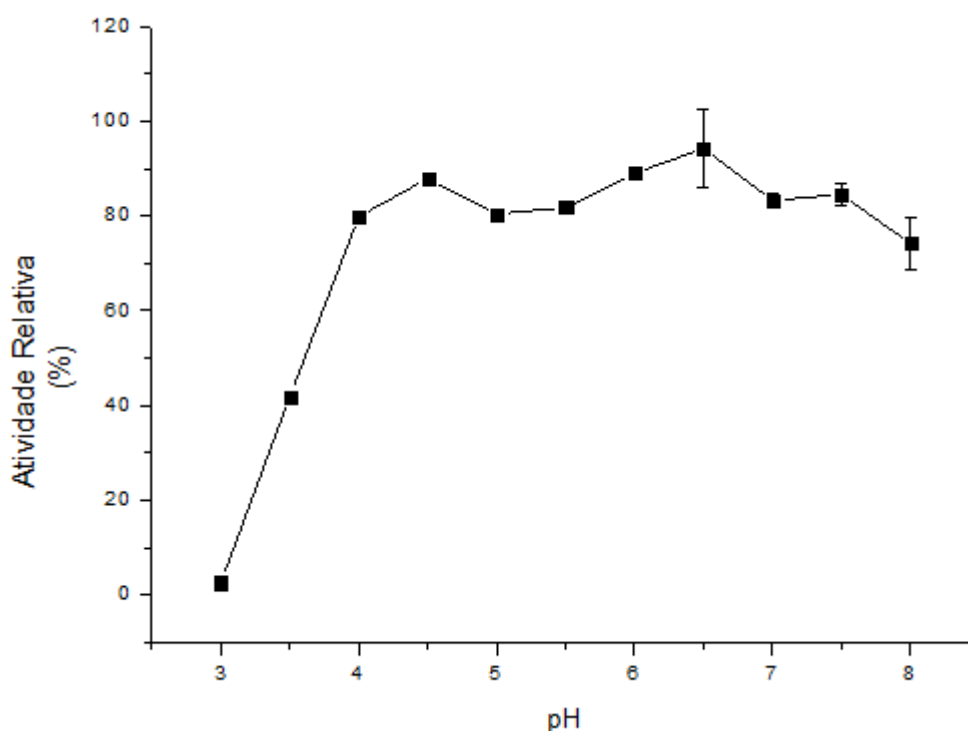


Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Para a análise de estabilidade de pH, a enzima bruta foi incubada por um período de 24 horas em tampões de pH variando os valores de 3,0 a 8,0, com

intervalos de 0,5 unidade. Posteriormente a incubação foi realizada a atividade residual nas condições de temperatura e pH encontrados anteriormente, o valor máximo de atividade obtida foi definido com 100% de atividades residual. Os resultados da estabilidade da enzima em relação ao pH podem ser observados na Figura 15, os dados demonstram que a enzima produzida pela linhagem MTAFUB11-1, se manteve estável entre a faixa de pH 4,5 a 7,5. E chegou a 100% de atividade residual, com valores de atividade de $15,25 \text{ U mL}^{-1}$ em pH 6,5, e quando incubada em pH 3,0 apresentou apenas 2,79% de atividade residual.

Figura 15 Efeito da estabilidade de pH na atividade de xilanase produzida pelo fungo *R.solani*-MTAFUB11-1. Os ensaios foram executados em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0 com 1% (m/v) de xilana.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

As enzimas têm um pH, ou uma faixa de pH, ótimo na qual a atividade catalítica é máxima, assim alterações no pH influencia diretamente a atividade

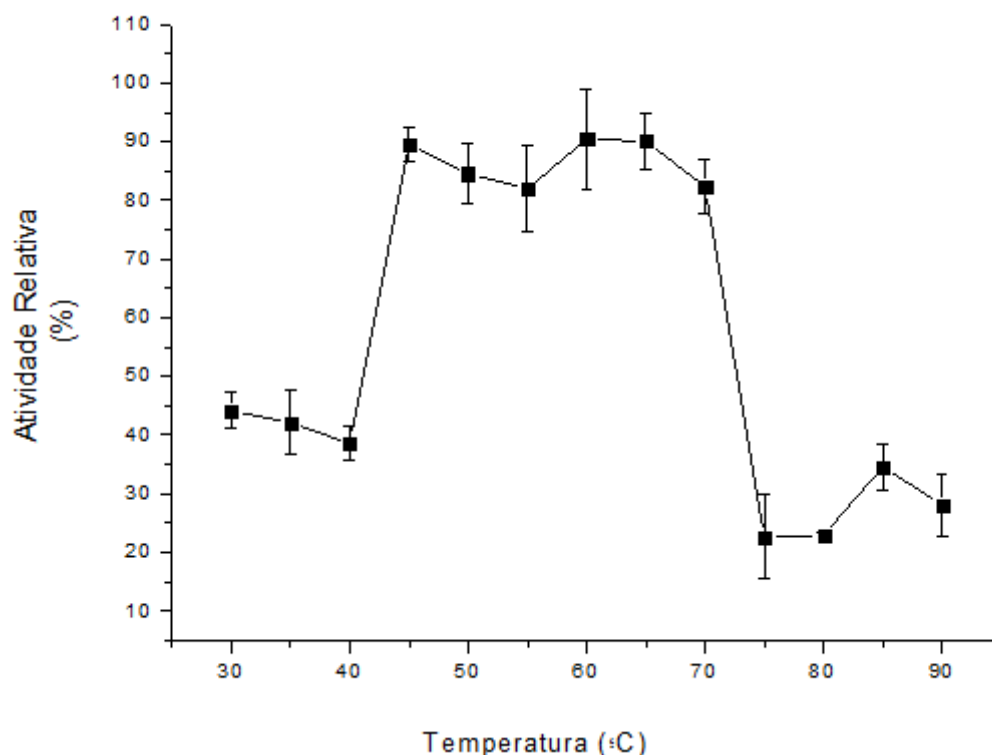
enzimática, por meio de mudanças nas cargas de aminoácidos essenciais, situados no sítio ativo da enzima, de modo a favorecer ou desfavorecer o domínio catalítico a receber o substrato. Valores de pH altos ou baixos podem causar desnaturação considerável na proteína ou até mesmo inativação. (LEHNINGER, 2011).

4.2. Efeitos da temperatura ótima e a estabilidade térmica na atividade enzimática

Em relação ao efeito da temperatura de incubação, ao realizar a reação por 10 minutos, foi possível observar que os maiores valores de atividade de xilanase foram encontrados na faixa de temperatura de 50 °C a 60 °C, na qual se observou os valores médios de atividade enzimática de 34,47 U.mL⁻¹, sendo que na temperatura de 60 °C foi observada os valores máximos de atividade enzimática, de 35,9 U.mL⁻¹ para o isolado MTAFUB11-1 (Figura 16). A partir da temperatura de 70 °C ocorreu uma queda brusca, apresentando apenas 25% de atividade residual em relação à máxima, sendo que em 75 °C não foi mais quantificado valores de atividade.

De modo geral, os dados obtidos no presente trabalho são próximos aos relatados na literatura, ao avaliar os valores ótimos de temperatura de incubação de enzimas produzidas por fungos fitopatogênicos. Moctezuma-Zárate (2013), avaliando o pH ótimo da xilanase produzida pelo fungo *Fusarium solani* encontrou valores ótimos a 60 °C. Por outro lado, ao analisar a atividade de xilanase produzida pelo fungo *Sporisorium reilianum* em diferentes temperaturas, Álvarez-Cervantes e colaboradores, encontraram valores ótimos de temperatura de 70 °C, valor este superior ao encontrado neste presente trabalho. (ÁLVAREZ-CERVANTES et al., 2013). Em geral as endoxilanases apresentam temperatura de incubação, para análise de atividade, entre a faixa de 40 °C a 80 °C (POLIZELI et al., 2005).

Figura 16 Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade xilanolítica de *R. solani*- MTAUFUB11-1. Os ensaios foram executados em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,5 com 1% (m/v) de xilana. O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

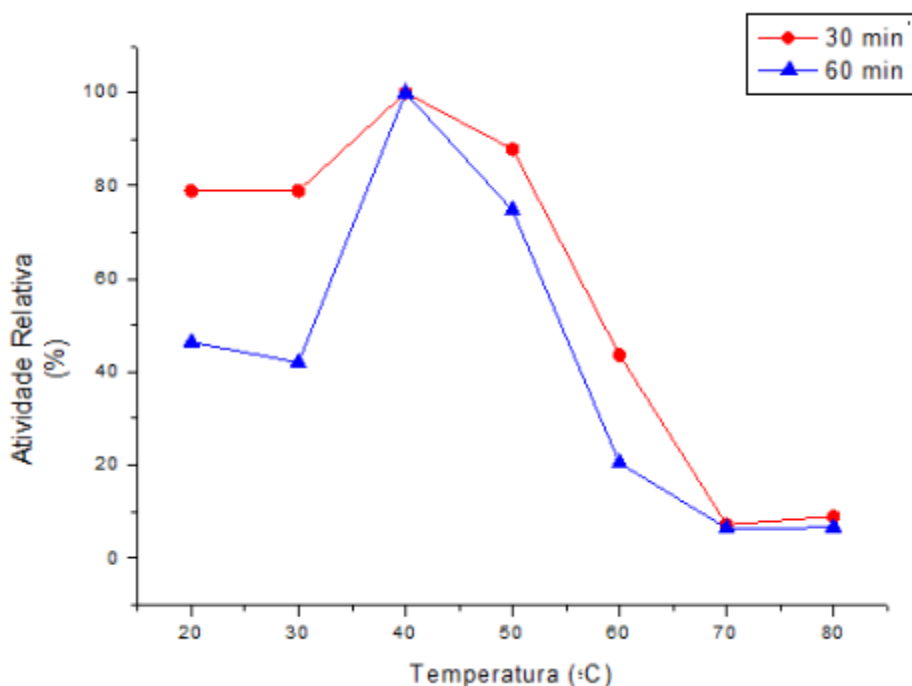
Em relação a estabilidade de temperatura, o extrato bruto foi incubado em diferentes temperaturas de 20 °C a 90 °C, com intervalos de 10 °C, e foram retiradas alíquotas nos tempos de 30 e 60 minutos para a análise de atividade, a atividade residual foi obtida nas condições de pH e temperatura ótimas encontradas anteriormente.

Os resultados estão dispostos na figura 17, e demonstram que a enzima produzida pelo fungo *R. solani* em estudo apresentou estabilidade térmica nos intervalos de temperaturas de 20 °C a 50 °C, porém quando exposta por um período superior de 60 minutos a 60 °C, é quantificado apenas 18% da atividade residual. Dessa forma é possível observar que a enzima bruta não apresenta

boa estabilidade quando expostas a temperaturas acima de 70 °C apresentando apenas 8% da atividade residual.

Avaliando a linhagem PA_B1F6 de *Rhizoctonia solani*, Bistratini, (2016) observou uma faixa de estabilidade de temperatura de 25 °C a 65 °C, sendo que após um período de 30 minutos exposta a temperatura de 70 °C, a autora observou uma queda de atividade residual. Enquanto que Zimbardi, 2013 relatou que a enzima xilanase, produzida pelo fungo *Colletotrichum graminicola* se manteve estável com atividade total durante 72 horas a 50 °C e durante 120 min a 60 °C.

Figura 17 Efeito da temperatura de estabilidade sobre a atividade de xilanase em extrato bruto, após a pré-incubação nos tempos de 30 e 60 minutos.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

O uso de enzimas termoestáveis é de grande interesse para aplicação industrial, alguns processos demandam altas temperaturas e pH alcalino, um exemplo é a produção de polpa através da madeira, na etapa de branqueamento da polpa Kraft (GOMES et al., 2007)

4.3. Efeito de íons e reagentes sobre a atividade xilanolítica

Conhecer os efeitos que determinados íons e/ou reagentes podem causar na atividade enzimática secretada por microrganismos, é essencial, uma vez que estes compostos podem inibir ou aumentar a atividade enzimática, assim o conhecimento destes efeitos, podem tornar possível a aplicação destas enzimas em um determinado processo industrial, bem como pode inibir a atividade de determinadas enzimas secretadas por fungos patogênicos em seu hospedeiro.

Os resultados estão dispostos na tabela 5, e demonstram que na maioria os íons e reagentes testados diminuíram a atividade enzimática de xilanase, dentre os reagentes utilizados o SDS foi o que mais inibiu a atividade da enzima. O SDS (Dodecil sulfato de sódio) é um detergente aniônico, potente agente desnaturante de proteínas, normalmente nas concentrações de 3-8 mmol L⁻¹, ele é capaz de desnaturar proteínas globulares (FENNEMA, 1996). No presente trabalho, na concentração de 1 mmol L⁻¹ já é possível observar uma taxa de diminuição, apresentando valores de 33,11% de atividade residual, ao aumentar a concentração para 5 e 10 mmol L⁻¹ é possível observar uma efetiva inativação com o aumento da concentração, apresentando apenas 5% da atividade residual, inibindo em 95% a atividade enzimática.

Saha (2002) avaliando os efeitos de íons e reagentes sobre a atividade de xilanase produzida pelo fungo *Fusarium proliferatum* NRRL 26517, observou uma inibição da atividade enzimática, pelo uso do sulfato de cobre (CuSO₄), a uma molaridade de 5 mmol L⁻¹, relatando valores de 28% de atividade residual, valores estes próximos ao encontrado neste presente trabalho quando utilizando CuSO₄, na mesma molaridade. O Sulfato de cobre (CuSO₄) é um sal, e há relatos na literatura que os íons Cu₂₊ está relacionado com a inibição da atividade de xilanase, na tabela 4, pode se observar que os íons de Cu₂₊ presente nos compostos de Cloreto de cobre (CuCl₂) e sulfato de cobre (CuSO₄) inibiram as atividades enzimáticas, conforme foram aumentando as concentrações. Esta inibição pode estar relacionada com a quebra de ligações dissulfeto em proteínas, que são ligações covalentes que se juntam a estrutura da proteína e desempenham um papel importante na conformação enzimática para atividade catalítica. (UMSZA-GUEZ et al., 2011)

Tabela 5 Efeito de íons metálicos e substâncias químicas na concentração de 1,0, 5,0 e 10,0 mmol L⁻¹, sobre a atividade residual percentual (média ± D.P.) de xilanases presentes em extrato bruto produzido pelo fungo *R.solani* AG-1 IA MTAFOB11-1.

Atividade Específica (%)			
Compostos	1 mmol L⁻¹	5 mmol L⁻¹	10 mmol L⁻¹
CONTROLE	100.00±0,22	100.00± 0,22	100.00±0,22
CuSO ₄	66,34±0,14	26,83±0,15	20,27±0,04
NaCl	81,46±0,28	86,30±0,19	69,62±0,15
FeSO ₄	80,32±0,18	64,77±0,14	45,51±0,09
CoCl ₂	88,16±0,20	85,59±0,19	74,04±0,16
CaCl ₂	96,72±0,21	67,34±0,15	80,46±0,18
HgCl ₂	45,80±0,10	43,66±0,09	34,39±0,07
CuCl ₂	73,76±0,17	45,51±0,09	14,14±0,03
ZnCl ₂	120,40±0,30	67,91±0,15	70,62±0,15
MnSO ₄	100,71±0,34	96,43±0,21	61,63±0,14
NH ₄ Cl	74,33±0,16	84,74±0,19	86,31±0,19
MgSO ₄	101,43±0,22	71,05±0,15	66,48±0,14
ZnSO ₄	50,65±0,15	80,03±0,18	65,06±0,14
AgNO ₃	20,13±0,04	21,70±0,03	39,24±0,08
NH ₄ SO ₄	117,83±0,26	62,92±0,14	66,48±0,14
EDTA	78,46±0,17	67,34±0,15	69,33±0,15
DTT	108,56±0,024	79,60±0,18	72,19±0,16
Triton X100	108,99±0,024	90,02±0,20	71,19±0,15
SDS	33,11±0,07	05,29±0,01	05,25±0,01

Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Por outro lado, quando incubada a enzima no cloreto de zinco (ZnCl₂), a uma concentração de 1 mmol L⁻¹ observou um aumento de 20% na atividade, mas com o aumento das concentrações para 5 e 10 mmol L⁻¹ a atividade enzimática foi inibida. O mesmo ocorreu com a enzima produzida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus var. levisporus* KKU-PN-I2-1, que analisando o efeito de íons sobre a atividade, Chanwicha (2015) relatou a inibição da atividade enzimática

conforme as concentrações foram aumentando para 5 e 10 mmol L⁻¹, inibindo em até 73% na maior concentração. (CHANWICHA et al., 2015)

5. Conclusões

A utilização de diferentes substratos lignocelulósicos afim de avaliar o efeito na atividade da xilanase produzida pelo fungo *Rhizoctonia solani* AG1- IA, não sobrepôs à utilização primordial de farelo de trigo, mas ainda assim revelaram efetividade de produção enzimática, utilizando a *Urochloa decumbes* como substrato, esses resultados ressaltam a importância de análises como estas.

Ao fim de tais análises, pode-se concluir, ainda, que inúmeros fatores podem interferir na atividade de determinada enzima, como diferentes faixas de temperatura e pH, e a presença de íons metálicos e alguns compostos químicos como detergentes (agentes quelantes). A temperatura de 60 °C foi evidenciada como a que apresentou os maiores níveis aparentes de ação xilanolítica, bem como o valor de pH 5,0. Os compostos testados em geral provocaram a diminuição em menor ou maior grau da atividade enzimática do extrato bruto, compostos como SDS foram responsáveis pela inibição em até 95% da atividade enzimática.

Conhecer tais características se faz indispensável, uma vez que a otimização do processo deve ser sempre buscada para que níveis industriais sejam posteriormente almejados.

6. Referências Bibliográficas

ÁLVAREZ-CERVANTES, J. et al. Purification and characterization of xylanase SRXL1 from *Sporisorium reilianum* grown in submerged and solid-state fermentation. **BioResources**, v. 8, n. 4, p. 5309–5318, 2013.

ANDRÉ AGUIAR, A. F. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729–1738, 2011.

CHANWICHA, N. et al. Purification and characterization of alkaline xylanase from *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* KKU-PN-I2-1 cultivated by solid-state fermentation. **Mycoscience**, v. 56, n. 3, p. 309–318, 2015.

COURA, R. R. Purificação e caracterização de uma β -xilosidade do fungo fitopatogenico *Ceratocystis fimbriata* RM 35. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia molecular de plantas; Bioquímica e Biologia molecular animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 3 ed, v. 76, New York, 1996.

GOMES, E. et al. Enzimas termoestáveis: Fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136–145, 2007.

LEITE, R. S. R. et al. Production and characteristics comparison of crude-glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 391–395, 2008.

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

LEHNHNGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. Princípios de Bioquímica, 5ª ed., Ed.Sarvier, 2011.

MOCTEZUMA-ZÁRATE, M. DE G. et al. Induction of Extracellular Lytic Enzymes by *Fusarium solani*. **Advances in Microbiology**, v. 3, n. 8, p. 24–30, 2013.

MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.

MOREIRA, F. G. et al. Production of hydrolytic enzymes by the plant pathogenic fungus *Myrothecium verrucaria* in submerged cultures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 7–11, 2005.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

SAHA, B. C. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1279–1284, 2002.

UMSZA-GUEZ, M. A. et al. Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace. **Brazilian Journal of Microbiology (2011)**, v. 42, p. 1585–1597, 2011.

ZIMBARDI, A. L. R. L. et al. Optimization of Glucosidase, Xylosidase and Xylanase Production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 2875–2902, 2013.