
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO XILANOLÍTICO DE
Penicillium janczewskii

CÉSAR RAFAEL FANCHINI TERRASAN

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Junho - 2007

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO XILANOLÍTICO DE
Penicillium janczewskii

CÉSAR RAFAEL FANCHINI TERRASAN

Orientadora: PROFA. DRA. ELEONORA CANO CARMONA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Junho - 2007

À minha família,
dedico este trabalho
pelo apoio e incentivo constantes.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona pela orientação, por todos os ensinamentos e pela dedicação;

À Profa. Dra. Sâmia M. Tauk-Tornisielo pela concessão do microrganismo estudado;

À Carmem Silvia Casonato de Souza pela assistência técnica;

Às amigas de jornada no laboratório de Bioquímica de Microrganismos Adriana Knob, Danielle Bísvaro Pedrolli, Joyce Pelisson Pereira, Keli Nunes Balduino, Leonor Alves de Oliveira da Silva e Talita Ariela Sampaio e Silva, por toda a ajuda, pelos ensinamentos e pelo agradável convívio diário;

Aos amigos de Rio Claro tanto da pós-graduação, quanto do projeto de extensão Cursinho Comunitário Práxis, e também aqueles dos demais campi da Unesp;

A todos os familiares e amigos tão distantes fisicamente, mas tão perto na memória;

À Mariana Villa Lobos D'Amico pelo apoio, incentivo e compreensão em todos os momentos;

Aos docentes, funcionários e colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada, e do Departamento de Bioquímica e Microbiologia que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Hemicelulose e xilana	1
1.2 O complexo xilanolítico e seus componentes	3
1.3 Propriedades físico-químicas de xilanases e β -xilosidases e regulação do complexo xilanolítico	7
1.4 Aplicações biotecnológicas	8
1.5 O gênero <i>Penicillium</i> e a espécie <i>P. janczewskii</i> : características gerais e produção de xilanases e β -xilosidases	11
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1 Linhagem, cultivo e manutenção.....	19
2.2 Meios de cultura.....	20
2.2.1 Meio sólido de Vogel.....	20
2.2.2 Meio líquido de Vogel	21
2.3 Inóculo	21
2.4 Obtenção do filtrado de cultura	21
2.5 Extração do conteúdo intracelular.....	21
2.6 Atividades enzimáticas.....	22
2.6.1 Determinação da atividade xilanásica	22
2.6.2 Determinação da atividade β -xilosidásica	23
2.6.3 Determinação das atividades celulolíticas	23

2.7	Determinação de proteínas	24
2.8	Influência das fontes de carbono sobre a produção do complexo xilanolítico	24
2.9	Cinética de produção do complexo xilanolítico	24
2.10	Influência do pH e da temperatura sobre a produção do complexo xilanolítico	25
2.11	Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade	25
2.12	Estabilidade térmica e em diferentes valores de pH	26
2.13	Efeito de substâncias sobre as atividades xilanásica e β -xilosidásica	26
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1	Influência da fonte de carbono sobre a produção de xilanases, β -xilosidases e celulasas por <i>Penicillium janczewskii</i>	27
3.2	Cinética da produção de xilanases e β -xilosidases por <i>Penicillium janczewskii</i>	33
3.3	Efeito do pH e da temperatura sobre a produção de xilanase e β -xilosidase por <i>Penicillium janczewskii</i>	39
3.4	Efeito do pH e da temperatura sobre as atividades xilanásica e β -xilosidásica de <i>Penicillium janczewskii</i>	45
3.5	Estabilidade em diferentes valores de pH e temperaturas da xilanase e β -xilosidase de <i>Penicillium janczewskii</i>	48
3.6	Efeito de substâncias sobre as atividades xilanásica e β -xilosidásica de <i>Penicillium janczewskii</i>	52
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
5	REFERÊNCIAS.....	58

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Esquema da parede celular vegetal com seus principais polissacarídeos constituintes.....	2
Figura 2 - Xilana de uma planta hipotética e enzimas requeridas para hidrólise completa	5
Figura 3 - Representação de um conidióforo hipotético encontrado em espécies de <i>Penicillium</i>	12
Figura 4 - Produção de xilanases extracelulares por <i>P. janczewskii</i> em diferentes fontes de carbono	29
Figura 5 - Produção de β -xilosidases extracelulares (a) e intracelulares (b) por <i>P. janczewskii</i> em diferentes fontes de carbono	30
Figura 6 - Perfil da produção de xilanases extracelulares por <i>P. janczewskii</i> em condição estacionária (a) e sob agitação de 120 rpm (b)	35
Figura 7 - Perfil da produção de β -xilosidases por <i>P. janczewskii</i> em condição estacionária (a) e sob agitação de 120 rpm (b)	37
Figura 8 - Curva de proteínas intracelulares de <i>P. janczewskii</i> em condição estacionária (a) e sob agitação de 120 rpm (b)	38
Figura 9 - Perfil da produção de xilanases (a) e β -xilosidases (b) por <i>P. janczewskii</i> em diferentes pHs	41
Figura 10 - Perfil de proteínas intracelulares de <i>P. janczewskii</i> em diferentes pHs em culturas de 7 (a) e 8 (b) dias de idade	42
Figura 11 - Perfil da produção de xilanases (a) e β -xilosidases (b) por <i>P. janczewskii</i> em diferentes temperaturas.....	44

Figura 12 - Perfil de proteínas intracelulares de <i>P. janczewskii</i> em diferentes temperaturas	45
Figura 13 - Influência do pH (a) e da temperatura (b) sobre as atividades xilanásica e β -xilosidásica de <i>P. janczewskii</i>	47
Figura 14 - Estabilidade das atividades xilanásica e β -xilosidásica de <i>P. janczewskii</i> em diferentes pHs	49
Figura 15 - Termoestabilidade das atividades xilanásica (a) e β -xilosidásica (b) de <i>P. janczewskii</i>	51

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Condições de cultivo e propriedades de xilanases produzidas por <i>Penicillia</i>	15
Tabela 2 - Condições de cultivo e propriedades de β -xilosidases produzidas por <i>Penicillia</i>	17
Tabela 3 - Produção de CMCase e Avicelase extracelulares por <i>P. janczewskii</i>	33
Tabela 4 - Efeito de diferentes substâncias sobre as atividades xilanásica e β -xilosidásica de <i>P. janczewskii</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico

CMC – carboximetilcelulose

CMCase – carboximetilcelulase

DTT – 1,4-ditiotreitol

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

h - horas

kDa – kilo Dalton

min – minutos

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfônico

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

Tris – tris (hidroximetil) aminometano

RESUMO

Espécies de *Penicillium* estão entre os fungos mais comumente encontrados na natureza. São exímios degradadores de matéria orgânica apresentando, assim, papel fundamental nos *habitat* que ocupam. Neste trabalho, uma linhagem de *Penicillium janczewskii*, isolada do solo da Mata Atlântica, foi avaliada quanto à produção de xilanases e β -xilosidases, enzimas responsáveis pela degradação da xilana presente na matéria vegetal. Além disso, o outro objetivo desse trabalho foi caracterizar ambas as atividades no filtrado de cultura.

A xilana de aveia mostrou-se a melhor fonte de carbono para indução dessas enzimas seguida do farelo de trigo. A produção enzimática também foi induzida, em níveis inferiores, por outros substratos lignocelulósicos. Ressalta-se ainda que não houve produção de celulasas,

exceto em meios com farelo de trigo, farelo de aveia e lactose, nos quais baixos níveis foram produzidos.

O estudo cinético das atividades enzimáticas indicou níveis mais elevados de xilanase em culturas de 7 dias de idade, e de β -xilosidases em culturas de 8 dias. A linhagem se desenvolveu bem na faixa de pH entre 3,0 e 9,0 em temperaturas entre 20 e 35 °C, sendo selecionados o pH 6,5 e 30 °C e o pH 5,0 e 25 °C como condições para produção das maiores atividades xilanásica e β -xilosidásica, respectivamente.

As condições ótimas de atividade xilanásica foram pH 5,0 e 50 °C, e para a β -xilosidase foram pH 4,0 e 75 °C, temperatura bastante elevada considerando o caráter mesofílico desse microrganismo.

A atividade xilanásica apresentou-se mais estável em pHs de 6,0 a 9,5, enquanto a atividade β -xilosidásica apresentou-se mais estável em pHs ácidos, de 1,6 a 5,5, faixa na qual manteve praticamente 100 % da atividade. As meias-vidas da atividade xilanase a 40, 50 e 60 °C foram de 183, 15 e 2,8 min, respectivamente. A atividade β -xilosidásica apresentou T_{50} de 144, 7,6 e 4,2 min a 50, 65 e 75 °C, respectivamente.

DTT e β -mercaptoetanol mostraram-se ativadores da atividade xilanásica, o que sugere a importância de grupos -SH de resíduos de cisteína para essa enzima. O íon Ca^{2+} mostrou-se ativador da atividade β -xilosidásica, sugerindo possível necessidade deste íon como cofator. Hg^{2+} inibiu completamente a atividade da xilanase, enquanto SDS foi forte inibidor para as duas atividades enzimáticas.

Palavras-chave: xilanase, β -xilosidase, *Penicillium janczewskii*, produção, caracterização.

ABSTRACT

Species of *Penicillium* are among the most common fungi found in the nature. They are excellent organic matter degraders, playing an important role in the habitat they live. In this work, a *Penicillium janczewskii* strain, isolated from soil of Atlantic Forest, was valuated for the production of xylanase and β -xylosidase, enzymes responsible for degradation of xylan present in the vegetal material. Moreover, another aim of this work was to characterize both activities in the culture filtrate.

Oat spelts xylan was the best inducer carbon source to these enzymes, followed by wheat bran. The enzymatic production was also induced, in inferior levels, for others lignocellulosic substrates. It was observed that the strain did not produce celulasases, except when cultivated in medium with wheat bran, oat bran and lactose, in which low levels were produced.

The kinetic study of the enzymatic activities indicated higher levels of xylanase in 7 days-old cultures and higher levels of β -xylosidase in 8 days-old cultures. The strain developed well in pH between 3.0 and 9.0 and in temperature between 20 and 35 °C. It was selected pH 6.5 and 30 °C, and pH 5.0 and 25 °C as the conditions for highest production of xylanase and β -xylosidase activities, respectively.

The optima conditions for xylanase activity were pH 5.0 and 50 °C, and for β -xylosidase activity were the pH 4.0 and 75 °C, an elevated temperature considering the mesophilic character of this microorganism.

The xylanase activity was more stable in pH from 6.0 to 9.5, while the β -xylosidase activity was more stable in acid pH, between 1.6 and 5.5, maintaining practically 100 % of the activity in this range. The half-lives of the xylanase activity at 40, 50 and 60 °C was 183, 15 and 2.8 min, respectively. The β -xylosidase activity presented T_{50} of 144, 7.6 and 4.2 min at 50, 65 and 75 °C, respectively.

DTT and β -mercaptoethanol activated the xylanase activity, that suggests the importance of -SH groups of cystein residues for this enzyme. The ion Ca^{2+} activated the β -xylosidase activity, suggesting possible necessity of this ion as cofactor. Hg^{2+} completely inhibited the xylanase activity, while SDS was a strong inhibitor of both enzymatic activities.

Key words: xylanase, β -xylosidase, *Penicillium janczewskii*, production, characterization.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hemicelulose e xilana

A parede celular vegetal pode ser considerada o principal recurso renovável formado no processo da fixação fotossintética do gás carbônico (BIELY, 2003). Ela é formada principalmente por polissacarídeos como celulose, hemiceluloses e pectina que, juntamente com as proteínas e com a lignina, formam um complexo de estrutura rígida (**Fig. 1**). A celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza e possui um esqueleto insolúvel de cadeia linear e homogênea, composto por resíduos β -D-glicopiranosídicos unidos por ligações β -1,4; a pectina consiste em uma família de heteropolissacarídeos formados principalmente por unidades de ácido-D-galacturônico unidas por ligações α -1,4 (KULKARNI et al., 1999; ARO et al., 2005); já as hemiceluloses constituem um grupo heterogêneo de polissacarídeos, o segundo mais abundante na natureza, correspondendo a 20-35% da biomassa vegetal (SAHA, 2003).

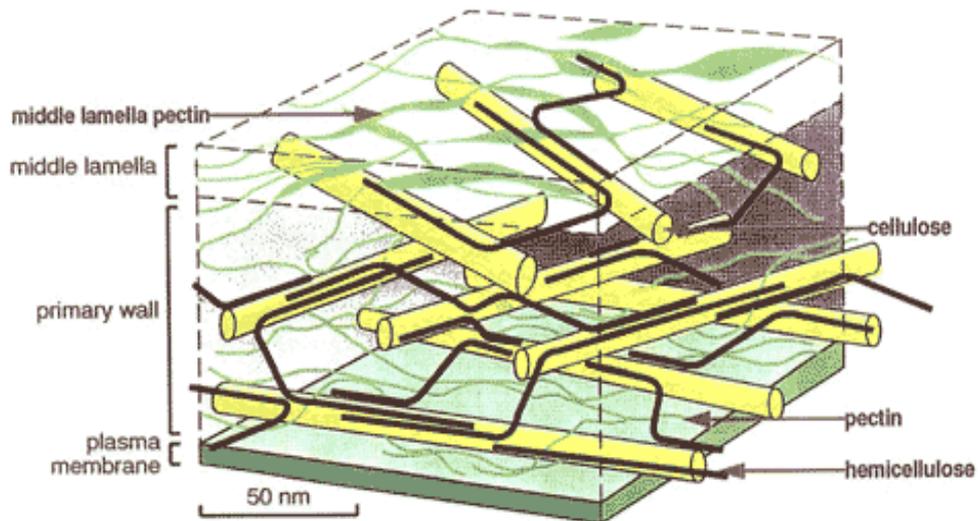


Figura 1 – Esquema da parede celular vegetal com seus principais polissacarídeos constituintes (DARLING, 2007).

Quimicamente, o grupo das hemiceluloses é constituído por um complexo de heteropolímeros formados por diferentes resíduos de açúcares como D-xilose, D-manose, D-arabinose, D-galactose e D-glicose, dentre outros, e por seus ácidos urônicos. Eles são denominados de acordo com o principal resíduo de açúcar da cadeia polimérica (ARO et al., 2005). Assim, xilanas possuem um esqueleto de D-xilose, xiloglucanas de D-xilose e D-glicose, glucomananas de D-glicose e D-manose, galactoglucomananas de D-galactose, D-glicose e D-manose e arabinogalactanas de D-galactose e arabinose (SHALLON e SHOHAM, 2003).

A xilana é a principal hemicelulose e está presente em todas as camadas da parede celular vegetal concentrando-se, majoritariamente, nas camadas primária (principalmente em monocotiledôneas) e secundária (WONG et al., 1988), localizando-se na interface entre a celulose e a lignina. Entre esses três constituintes ocorrem interações covalentes e não covalentes, que são importantes para adesão e coesão das fibras, manutenção da integridade da parede celular vegetal e proteção da celulose contra o ataque de celulasas (PRADE, 1995; UFFEN, 1997; BEG et al., 2001). Bem como os demais polissacarídeos de origem vegetal, a xilana apresenta grande variabilidade

química e molecular de espécie para espécie, o que está relacionado às suas funções em cada uma das plantas (EBRINGEROVÁ e HEINZE, 2002). De um modo geral, sua estrutura pode consistir desde uma cadeia principal linear de β -1,4-polixilose até uma cadeia altamente ramificada de heteropolissacarídeo (BIELY, 1985; BIELY, 1993; SUBRAMANYAN e PREMA, 2002). Os substituintes mais comuns da cadeia principal são resíduos de acetil, L-arabinosil, D-glucuronosil e 4-O-metil-D-glucuronosil (BIELY, 1985; SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997).

Nas madeiras duras das angiospermas, a xilana corresponde a 15-30 % da parede celular e existe como O-acetil-4-O-glucuroxilana com grau de polimerização variando de 150 a 200. Já, nas madeiras macias das gimnospermas, compostas de arabino-4-O-metilglucuroxilana, esse heteropolissacarídeo possui grau de polimerização entre 70 a 130 e corresponde a 7-10 % do conteúdo da parede celular (WOODWARD, 1984; PRADE, 1995; KULKARNI et al., 1999). A xilana de muitas madeiras, principalmente madeiras duras, é acetilada. A acetilação ocorre mais freqüentemente no oxigênio-3 do que no oxigênio-2, e, quanto maior o grau de acetilação, maior a solubilidade em água (BIELY, 1985).

1.2 O complexo xilanolítico e seus componentes

Como parte do ciclo do carbono, os três constituintes da parede celular vegetal não se acumulam na natureza, pois são degradados por sistemas enzimáticos especializados de microrganismos (BIELY, 1993; BIELY, 2003). Por sua heterogeneidade e complexidade, a xilana requer um sistema enzimático, conhecido como complexo xilanolítico, para que possa ser hidrolisada completa e eficientemente (BAJPAI, 1997; SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997; UFFEN, 1997; POLIZELI et al., 2005) (**Fig. 1**).

As endo- β -1,4-xilanases (β -1,4-xilana xilanhidrolase EC 3.2.1.8) são as principais enzimas no processo de despolimerização da xilana, atacando a cadeia principal, mais fácil e mais rapidamente em regiões sem substituições, o que gera oligossacarídeos não substituídos e ramificados ou

esterificados (BIELY, 1985; BIELY, 2003). Elas diferem na sua especificidade por substratos. Algumas enzimas quebram aleatoriamente entre resíduos de xilose não substituídos, enquanto outras dependem fortemente dos substituintes próximos aos resíduos de xilose atacados (de VRIES e VISSER, 2001).

As β -xilosidases (β -D-xilosídeo xilohidrolase EC 3.2.1.37) são exoglicosidades que hidrolisam xilooligossacarídeos pequenos e xilobiose, liberando xilose. A especificidade dessas enzimas por pequenos oligossacarídeos de xilose é alta (REILLY, 1981; SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997). Segundo de Vries e Visser (2001), elas são capazes de liberar xilose de terminais não redutores de oligossacarídeos ramificados, somente quando dois resíduos de xilose contíguos estão adjacentes a resíduos de xilose simples ou duplamente substituídos.

Outras enzimas, responsáveis por eliminar resíduos substituintes específicos, são conhecidas como enzimas auxiliares ou desramificadoras e atuam em sinergia com as xilanases e β -xilosidases no processo de despolimerização da xilana (**Fig. 2**). Dentro desse grupo são conhecidas as acetilxilanaesterases, α -glucuronidasas, α -L-arabinosidasas e esterases do ácido ferúlico e *p*-cumárico (PRADE, 1995; KULKARNI et al., 1999; ARO et al., 2005). Algumas atuam nas ligações entre um resíduo da cadeia principal e o grupo substituinte, enquanto outras quebram ligações internas ou terminais das cadeias laterais (de VRIES e VISSER, 2001).

Poucos são os microrganismos produtores de um único tipo de xilanase, sendo a ocorrência de múltiplas xilanases freqüentemente relatada. Este fenômeno não é considerado uma redundância, mas uma função especializada dos mesmos para obterem uma hidrólise mais efetiva do substrato. Neste mecanismo cooperativo, os componentes do sistema xilanolítico que ocorrem em menor proporção são necessários para hidrólise das ligações menos freqüentes no substrato (WONG et al., 1988; RUIZ-ARRIBAS et al., 1995). Há, portanto, diversas formas de xilanases com diferentes estruturas, mecanismos de ação, especificidade por substratos, atividades hidrolíticas e propriedades físico-químicas (COLLINS et al., 2005).

Sistemas xilanolíticos completos têm sido amplamente encontrados entre fungos, actinomicetos e bactérias, sendo que alguns dos mais importantes produtores destas enzimas pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Phanerochaete*, *Chytridiomyces*, *Ruminococci*, *Fibrobacter*, *Clostridium* e *Bacillus* (COLLINS et al., 2005).

Microrganismos produtores de enzimas do complexo xilanolítico ocorrem em diversos *habitat*, principalmente naqueles onde há acúmulo e deterioração de material vegetal. Eles são capazes de assimilar a biomassa vegetal como fonte primária de carbono (PRADE, 1995), convertendo a xilana em seus açúcares constituintes, o que é crucial para a reciclagem do carbono (GILBERT e HAZLEWOOD, 1993). Geralmente são saprofíticos, vivendo livremente no solo ou na água; alguns crescem anaerobicamente, outros aerobicamente, sob temperaturas médias ou extremas, e alguns, ainda, se associam simbioticamente ao trato digestivo de ruminantes ou de insetos que se alimentam de madeira (UFFEN, 1997). A maioria dos fungos fitopatogênicos produz e secreta enzimas que degradam polissacarídeos da parede celular vegetal para facilitar sua penetração nos tecidos vegetais (PRADE, 1995). As xilanases também podem ser produzidas por protozoários, gastrópodes e artrópodes (DEKKER e RICHARDS, 1976), com a função de auxiliar na degradação da dieta vegetariana, e também por sementes, permitindo a germinação (WOODWARD, 1984; SHOFIQR RAHMAN et al., 2003).

Fungos, especialmente de solo e de madeira, são predominantes na produção de xilanases (RAHMAN et al, 2003). Eles são particularmente interessantes, do ponto de vista industrial, pelo fato de secretarem suas enzimas diretamente no meio em que se encontram, não necessitando de ruptura celular para que ocorra a liberação; além disso, apresentam níveis de produção maiores que os obtidos com culturas bacterianas ou de leveduras (POLIZELI et al., 2005). Adicionalmente, muitas vezes os fungos também secretam várias outras enzimas auxiliares, que atuam como desramificantes da cadeia polissacarídica (HALTRICH et al, 1996). Entretanto, as xilanases produzidas por fungos geralmente requerem pH ácido e estão associadas a

celulases (STEINER et al., 1987), além de serem, geralmente, menos estáveis do que as xilanases de bactérias (KULKARNI et al., 1999).

Muitas bactérias e actinomicetos são produtores de xilanases e exibem sua produção quando se encontram em pH neutro ou próximo dele (BALL e McCARTHY, 1989). As xilanases bacterianas apresentam menores níveis de atividade que as fúngicas e são encontradas geralmente no espaço periplasmático (BIELY, 1985; BIELY, 2003; POLIZELI et al., 2005). Bactérias aeróbicas secretam um número moderado de enzimas, as quais produzem grande quantidade de oligossacarídeos no meio, sendo que a quebra completa desses oligossacarídeos ocorre intracelularmente. Essa estratégia faz com que os produtos da degradação não estejam facilmente acessíveis aos microrganismos competidores (SHALLON e SHOHAM, 2003).

As β -xilosidases apresentam localização celular variável: em várias espécies de bactérias e actinomicetos elas são estritamente intracelulares, em outros, como *Aerobasidium pullulans*, ela é encontrada tanto intra, quanto extracelularmente. Já, em culturas fúngicas, essas enzimas permanecem associadas ao micélio nos estágios iniciais de crescimento, e então são liberadas, posteriormente, no meio por secreção ou lise celular (BIELY, 1985; POLIZELI et al., 2005).

1.3 Propriedades físico-químicas de xilanases e β -xilosidases e regulação do complexo xilanolítico

As xilanases apresentam características diferentes quanto ao pH e temperatura ótimos, massa molar e especificidade por substratos, dependendo do microrganismo produtor (HALTRICH et al., 1996; WONG et al., 1988). De um modo geral, a temperatura ótima para as xilanases de fungos e bactérias situa-se entre 45 e 60 °C (UFFEN, 1997), sendo estáveis em pH entre 3 e 10, com ótimo entre 4 e 7, e apresentam massa molecular variável, entre 8 e 145 kDa (SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997).

As β -xilosidases apresentam características variáveis, o que tem dificultado a sua classificação. Aquelas até agora purificadas apresentaram pl

ácidos (3,6 - 6,1) e, com poucas exceções, apresentaram-se maiores que as xilanases com massas molares entre 26 e 360 kDa. Aquelas com pesos moleculares superiores a 120 kDa geralmente correspondem a agregados diméricos, triméricos ou tetraméricos. Algumas β -xilosidases podem apresentar atividade transferase, enquanto outras ainda podem apresentar atividade β -glucosidásica (COUGHLAN et al., 1993; BIELY, 2003;).

Enzimas xilanolíticas são indutíveis. Xilanases e β -xilosidases são produzidas em grandes quantidades quando o microrganismo é cultivado na presença de hemiceluloses como xilana, arabinana e manana, ou na presença de compostos derivados destes polímeros (BAJPAI, 1997; ARO et al. 2005). A síntese dessas enzimas é reprimida catabolicamente por fontes de carbono facilmente assimiláveis como glicose e xilose. O nível de indução pode variar dentre os diferentes microrganismos (KULKARNI et al., 1999). A xilana não pode adentrar as células, portanto, fragmentos da xilana com baixo peso molecular como xilobiose e xilotriose são prováveis sinais para a indução enzimática (BIELY, 1985) ao realizarem a ativação dos genes relacionados (ARO et al., 2005). Esses oligossacarídeos resultam da hidrólise da xilana, por pequenas quantidades de enzimas produzidas constitutivamente, que são liberadas no meio (BAJPAI, 1997). Análogos sintéticos não metabolizáveis de oligossacarídeos também funcionam como indutores em certos microrganismos (BAILEY e POUTANEM, 1989).

1.4 Aplicações biotecnológicas

As xilanases começaram a ser utilizadas a partir da década de 80, e deste então, vem atraindo grande interesse, assumindo um lugar de destaque entre as principais enzimas industriais. Este fato pode ser comprovado pela existência de 468 patentes, em 2005, com referência às xilanases e, devido às inúmeras aplicações, ocuparem 20 % do mercado mundial de enzimas (COLLINS et al., 2005; POLIZELLI et al., 2005).

Biely (1985) dividiu a utilização das xilanases em dois tipos de processos industriais: aqueles nos quais as xilanases atuam em conjunto com outras enzimas, e aqueles nos quais somente as xilanases devem atuar.

A mais importante aplicação industrial para xilanases livre de celulases é sua utilização na indústria de papel e celulose. Esta enzima facilita a liberação da lignina da polpa, e no processo de clareamento, reduz os níveis de aplicação de compostos organoclorados tóxicos, geralmente liberados em ambientes aquáticos (VIKARI et al., 1994; TECHAPUN et al., 2003, ZHAO et al., 2006). Outra aplicação em que celulases são indesejáveis é no processamento de fibras têxteis, no qual xilanases e pectinases atuam removendo material vegetal ligado às fibras (BIELY, 1985).

A biomassa vegetal é o único recurso natural renovável com ciclo de reposição suficientemente rápido para suprir a demanda mundial por produtos químicos (PRADE, 1995). Muitos resíduos agroindustriais contêm hemiceluloses, como a xilana, em grandes proporções, e a utilização desses resíduos tem recebido muita atenção, principalmente por terem grande potencial para serem convertidos em produtos de interesse comercial (SHOFIQR RAHMAN et al., 2003).

A hidrólise da xilana pode ser obtida pela utilização de ácidos ou de enzimas (BIELY, 1985). A hidrólise ácida foi a primeira utilizada em escala industrial por ser um processo rápido e simples, porém, além de não realizar uma quebra específica do substrato, requer condições rigorosas para obtenção do produto desejado (REILLY, 1981). Além disso, muitas vezes vem acompanhada da formação de produtos tóxicos, que podem impedir fermentações subsequentes (BIELY, 1985). A hidrólise enzimática é um processo mais específico, que pode ocorrer sob condições brandas, nas quais o produto final é obtido sem a presença de subprodutos (REILLY, 1981; POLIZELI et al., 2005).

Esses resíduos lignocelulósicos podem ser convertidos, por processos fermentativos, em aditivos alimentares (MOURE et al., 2006), em biocombustíveis, produtos químicos, ou serem utilizados como fontes alternativas de energia (WOODWARD, 1984; HOWARD et al., 2003).

Atualmente, os principais produtos resultantes da fermentação da xilana são o furfural, obtido de resíduos agrícolas e o xilitol, obtido de resíduos de madeira (KULKARNI et al, 1999). Também deve ser destacada a produção do álcool combustível e do 2,3-butenodiol (SAHA, 2003).

Na indústria de alimentos, xilanases em conjunto com celulases e pectinases podem ser utilizadas na obtenção de extratos de frutas e vegetais, ou na extração e no clareamento de sucos tornando estes processos mais vantajosos sob os aspectos de rendimento, operacionalidade e qualidade do produto final (BIELY, 1985; BHAT, 2000). Na indústria de vinhos, as hemicelulases em conjunto com pectinases e β -glucanases promovem a obtenção da cor e da estabilidade, e são ainda usadas no clareamento e na filtração (BHAT, 2000). Também participam da extração e da produção de café solúvel (COLLINS et al., 2005) e da preparação de cerveja (KULKARNI et al., 1999).

Quando usada em conjunto com amilases, elas aumentam a qualidade, o volume e o tempo de prateleira das massas panificadas (BHAT, 2000).

As xilanases também são utilizadas nas indústrias de detergentes, de polissacarídeos farmacêuticos, que atuam como antimicrobianos, na produção de biosurfactantes, na recuperação do óleo de minas terrestres, na extração de aromas, pigmentos, óleos vegetais e amido (KULKARNI et al., 1999; COLLINS et al., 2005).

No setor de alimentação animal, podem ser em utilizadas em conjunto com glucanases, pectinases, celulases, proteases, amilases, fitases, galactosidases e lipases. As xilanases aplicadas na dieta alimentar, atuam diminuindo a viscosidade do conteúdo intestinal de aves recém-nascidas, aumentando o ganho de peso desses animais (BEG et al., 2001). O pré-tratamento com um preparado enzimático de celulases, hemicelulases e pectinases aumenta a qualidade nutritiva da forragem fornecida a ruminantes, resultando num ganho de peso superior a 35 % (BEAUCHEMIN et al., 1995).

As xilanases também podem ser utilizadas em pesquisas científicas para obtenção de protoplastos, além de serem o próprio material de

estudo (WONG et al., 1988), e possuírem papel importante na elucidação das estruturas complexas das xilanas (SAHA, 2003).

1.5 O gênero *Penicillium* e a espécie *P. janczewskii*: características gerais e produção de xilanases e β -xilosidases

Na natureza, espécies de *Penicillium* estão em quase toda parte, são ubíquas. Algumas espécies são fungos de solo, outras se encontram na matéria orgânica em decomposição, algumas ainda se desenvolvem em ambientes secos, madeiras e sementes, entre outros. Possuem papel fundamental nos *habitat* que ocupam, por serem agentes naturais responsáveis pela reciclagem da matéria orgânica. Além disso, afetam o homem de diversas maneiras: causam deterioração de produtos e alimentos, podem produzir micotoxinas, ser patogênicos e causar alergias ou infecções. Algumas espécies são benéficas, produzindo antibióticos ou outros produtos de interesse e também podem participar no processamento de alguns alimentos (GAMS et al., 1985; PITT, 2000).

O tamanho do gênero, a quantidade de espécies aparentemente semelhantes, e mesmo a grande variabilidade interespecíficas tornam complicada a identificação das espécies de *Penicillium*. A taxonomia moderna envolve a morfologia, aspectos fisiológicos, especialmente o diâmetro da colônia, a produção de metabólitos e estudos moleculares. Ressalta-se, entretanto, que a taxonomia determinativa ainda é baseada em técnicas clássicas como a morfologia das culturas em placas de Petri e microscopia (PITT, 2000).

As espécies cujos teleomorfos são desconhecidos se dividem em 4 subgêneros – *Aspergilloides*, *Furcatum*, *Biverticillium* e *Penicillium* – determinados pelos tipos de corpos de frutificação formados.

A estrutura de frutificação conidial em *Penicillium* é denominada penicillus. Os conídios se desenvolvem em cadeias a partir de regiões de estreitamento (célula) no ápice das fiálides. As fiálides se desenvolvem a partir da estipe, tanto diretamente quanto a partir de estruturas-suporte conhecidas

como métula, rami e râmuli. O penicillus constitui toda a estrutura suportada pela estipe. A estrutura, incluindo a estipe, é um conidióforo, o qual se desenvolve de uma hifa fértil (**Fig. 3**). O critério para a divisão entre os 4 subgêneros são os pontos de ramificação presentes entre a fiálide e a estipe até o eixo principal do penicillus. Abaixo do nível subgenérico, a classificação é baseada em três critérios: morfologia microscópica, taxa de crescimento da colônia e morfologia da colônia desenvolvida em determinados meios de cultura (PITT, 2000).

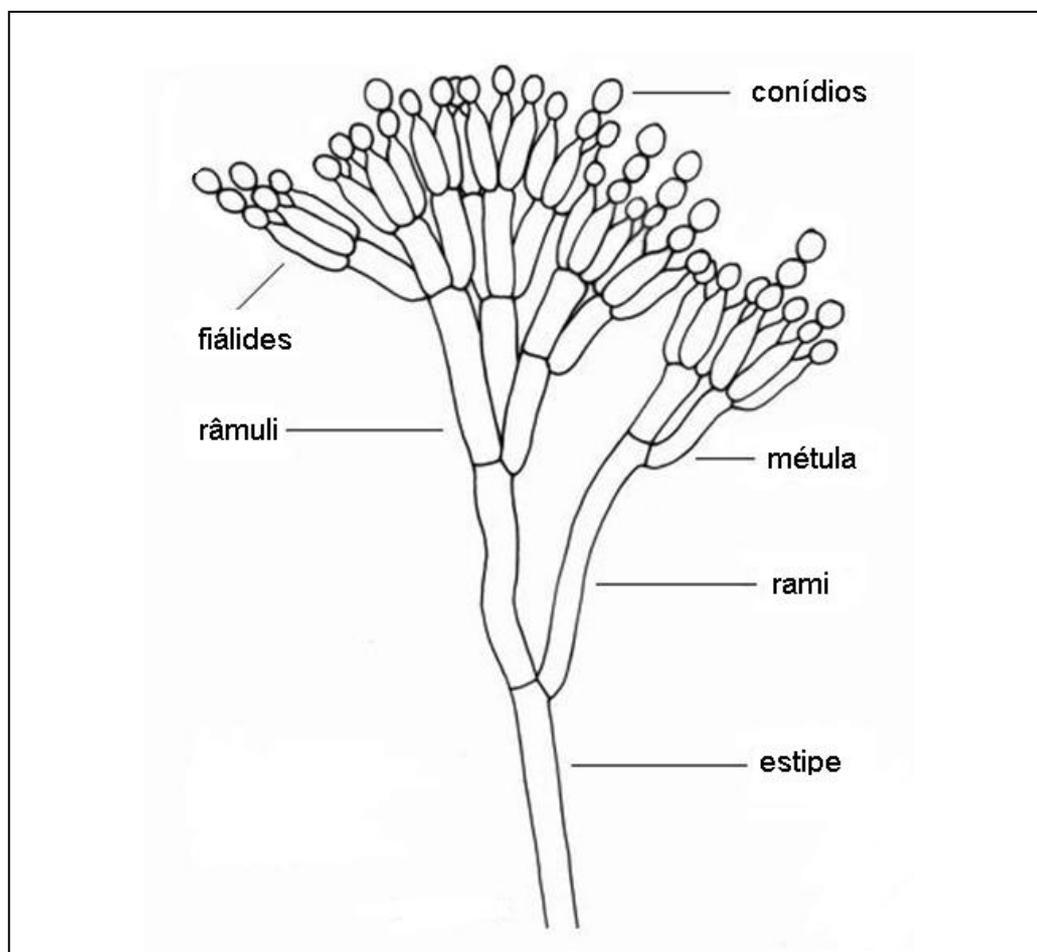


Figura 3 – Representação de um conidióforo hipotético encontrado em espécies de *Penicillium* (Adaptado de PITT, 2000).

Penicillium janczewskii Zalesky pertence ao subgênero *Furcatum* e é o nome aceito atualmente para a espécie que, até a década de 80, era conhecida como *Penicillium nigricans* Raper e Thom. Esta espécie é estritamente relacionada com *Penicillium canescens*, pois ambos possuem taxas de crescimento e pigmentação semelhantes. É um fungo típico de solo que se desenvolve na faixa de pH de 2,0 a 7,0 e em solução saturada de tartarato de sódio (SINGH, 1977). Apresenta colônia acinzentada a verde oliva escura, profunda, densa a moderadamente floculosa, micélio geralmente branco, conídios verde-acinzentados. O reverso do micélio é tipicamente salmão ou verde-alaranjado. Produz pigmentos solúveis laranjas ou amarelos e apresentam odor forte (DOMSCH et al., 1993; PITT, 2000). A espécie tem sido reportada como produtora de griseofulvina, penitreno A (PITT, 2000) e inulinasas extracelulares (PESSONI et al., 1999). Apresenta-se como indutora de resistência sistêmica adquirida em plantas de melão e algodão contra *Rhizoctonia solani* (MADI e KATAN, 1998). Como a espécie não está diretamente envolvida na deterioração de alimentos, a produção de micotoxinas em alimentos é improvável (PITT, 2000).

Muitas espécies de *Penicillium*, isoladas de diferentes *habitats*, têm sido avaliadas quanto à produção enzimática e relatadas como boas produtoras de xilanases e β -xilosidases, mostrando o potencial deste gênero na produção de enzimas do complexo xilanolítico. Reese et al. (1973) realizaram estudo com 250 microrganismos de diversos gêneros para produção de β -xilosidases extracelulares. Destes, 11 foram selecionados, sendo 5 deles pertencentes ao gênero *Penicillium* (*P. chermisinum*, *P. islandicum*, *P. pusillum*, *P. roseopurpureum* e *P. wortmanni*). Medeiros et al. (2003), após isolarem e identificarem fungos da Floresta Amazônica, avaliaram a capacidade de produção de xilanases, sendo que três dos produtores pertenciam ao gênero *Penicillium* (*P. roquerfortti* Thom, *P. sp.*, *Penicillium corylophilum* Dierckx), e a linhagem selecionada como melhor produtora foi *P. corylophilum*. Bradner et al. (1999) avaliaram a produção de xilanases por fungos isolados em áreas de colônias de pingüins da Antártica. Dentre as linhagens estudadas estavam *Penicillium expansum*, *P. hirsutum* e *P. commune*. Krogh et al. (2004)

avaliaram doze *Penicillia* quanto a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas, sendo que se destacaram como bons produtores de xilanases *P. persicinum*, *P. funiculosum*, e duas linhagens de *P. simplicissimum*. Abdel-Sater e Said (2001), ao isolarem fungos de resíduos agrícolas e agroindustriais, encontraram, dentre os melhores produtores, diversas espécies de *Penicillium*. Dentre os fungos encontrados *P. chrysogenum*, *P. corylophilum*, *P. funiculosum*, *P. oxalicum* foram prevalentes. Recentemente, considerando o grande número de espécies produtoras e a crescente importância das enzimas xilanolíticas de *Penicillia*, Chávez et al. (2006) realizaram uma revisão sobre o sistema xilanolítico desse gênero, na qual abordaram as propriedades, a regulação da expressão, a genética e as aplicações biotecnológicas dessas enzimas.

As tabelas abaixo apresentam as condições de produção e características de algumas xilanases (**Tab. 1**) e β -xilosidases (**Tab. 2**) de espécies do gênero *Penicillium*.

Tabela 1 - Condições de cultivo e propriedades de xilanases produzidas por *Penicillia*.

ESPÉCIE	CONDIÇÃO	FONTE DE CARBONO	PESO MOLECULAR (Da)	pI	ATIVIDADE ÓTIMA		REFERÊNCIA
					pH	TEMPERATURA (°C)	
<i>P. brasilianum</i> IBT 20888	fermentador 5 L agitado	celulose + xilana de aveia	31.000	maior que 9	-	-	Jorgensen et al., 2003
<i>P. brasilianum</i>	estado sólido	bagaço de cevada	-	-	-	33,5	Panagiotou et al., 2006
<i>P. canescens</i> 1010c*	fed batch	farelo de soja e palha de trigo	-	-	4,6-5,0	55-60	Gaspar et al., 1997
<i>P. capsulatum</i> CMI 291669	estado sólido	polpa beet + farelo de trigo	XynA 28.500 XynB 29.500	5,0-5,2	4	47-48	Filho et al., 1993
<i>P. chrysogenum</i> Q 176	submersa agitada	xilana de vidoeiro	XynC 22.000	2,8	3,8	48	Ryan et al., 2003
<i>P. citrinum</i> FERM P-15944	submersa agitada	xilana de aveia	35.000	4,2	6	40	Haas et al., 1992
<i>P. commune</i>	submersa agitada	xilana de vidoeiro	20.000	abaixo 3,5	5	55	Tanaka et al., 2005
<i>P. corylophilum</i>	submersa agitada	avicel + farinha de soja	-	-	-	-	Bradner et al., 1999
<i>P. expansum</i>	submersa agitada	xilana de aveia	-	-	4,5-5,5	45	Medeiros et al., 2003
<i>P. expansum</i>	submersa agitada	avicel + farinha de soja	-	-	-	-	Bradner et al., 1999
<i>P. expansum</i>	submersa agitada	farelo de trigo	-	-	5,5	40	Querido et al., 2006
<i>P. funiculosum</i>	submersa agitada	celulose + farelo de trigo	-	-	4	55-60	Mishra et al., 1985

<i>P. funiculosum</i> IBT 5816	submersa agitada	xilana de aveia	-	-	-	-	-	-	Krogh et al., 2004
<i>P. herquei</i>	-	xilana	11000/8300	5,1	3	50	-	-	Funaguma et al., 1991
<i>P. hirsutum</i>	submersa agitada	avicel + farinha de soja	-	-	-	-	-	-	Bradner et al., 1999
<i>P. janthinellum</i>	submersa agitada	xilana	-	-	5,5	40	-	-	Milagres et al., 1993
<i>P. lagena</i>	submersa agitada	sabugo milho + xilana de aveia	-	3,5/4,5	-	-	-	-	Ghatora et al., 2006
<i>P. persicinum</i>	submersa agitada	xilana de aveia	-	-	-	-	-	-	Krogh et al., 2004
<i>P. pinophilum</i> NTG III/6	submersa, bioreator 16 L	fontes celulósicas	-	-	-	-	-	-	Anne Brown et al., 1987
<i>P. purpurogenum</i>	submersa agitada	palha de trigo	-	-	-	-	-	-	Steiner et al., 1994
<i>P. purpurogenum</i> NG-737	submersa agitada	-	-	-	-	-	-	-	Steiner et al., 1998
<i>P. sp</i> AHT1	submersa agitada	xilana de aveia	21.000	-	6	50	-	-	Shofiqur Rahman et al., 2003
<i>P. sp.40</i>	submersa agitada	metil-β-D-xilopiranosídeo	Xyl A 25 000	4,7	2	50	-	-	Kimura et al., 2000
<i>P. simplicissimum</i> IBT 13237/15303	submersa agitada	xilana de aveia	-	-	-	-	-	-	Krogh et al., 2004
<i>P. verruculosum</i> 28K	submersa agitada	celulose	-	-	-	-	-	-	Solov'eva et al., 2005

Tabela 2 - Condições de cultivo e propriedades de β -xilosidases produzidas por *Penicillia*.

ESPÉCIE	CONDIÇÃO	FONTE DE CARBONO	PESO MOLECULAR (Da)	pI	ATIVIDADE ÓTIMA		REFERÊNCIA
					pH	TEMPERATURA (°C)	
<i>P. herquei</i>	submersa agitada	xilana de aveia	S1 103.700	-	S1 4,0	S1 50	Ito et al., 2003
			S2 37.460		S2 6,5	S2 30	
<i>P. purpurogenum</i>	submersa agitada	xilana de vidoeiro	-	-	-	-	Steiner et al., 1998
<i>P. purpurogenum</i> UV-64	submersa agitada	xilana de vidoeiro	-	-	-	-	Steiner et al., 1998
<i>P. sp. AHT-1</i>	submersa agitada	xilana de aveia	-	-	6	50	Shofiqur Rahman et al., 2003
<i>P. wortmanni</i> IFO 7237	submersa agitada	xilana insolúvel	1 - 110000	-	3,7	55-65	Matsuo et al., 1987
			2 - 195000		4,28		
			3 - 210000		4,6		
			4 - 180000		4,8		
<i>P. wortmanni</i> QM 7322	submersa agitada e fermentador ² L	xilana + indutores	100000	5	3,3-4,0	-	Reese et al, 1973; Deleyn et al., 1978

Ruegger (2001) realizou experimentos sobre a produção das enzimas xilanase e carboximetilcelulase com 80 linhagens fúngicas isoladas de solo da Mata Atlântica da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP. *Penicillium janczewskii* Zaleski destacou-se, como bom produtor de xilanases, despertando interesse de novos estudos sobre a produção do complexo xilanolítico por esta linhagem.

Desta maneira, considerando o progresso geral já obtido no estudo dessas enzimas, o grande potencial biotecnológico, e suas interessantes aplicações, pretendeu-se estudar o sistema xilanolítico produzido por essa espécie, na qual ele ainda não foi descrito. O objetivo desse trabalho foi verificar a influência dos fatores químicos e físicos sobre a produção de xilanases e β -xilosidases, a fim de se conhecer as melhores condições de produção, bem como caracterizar bioquimicamente as enzimas produzidas no extrato de cultura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Linhagem, cultivo e manutenção

Neste trabalho foi utilizada uma linhagem de *Penicillium janczewskii* isolada por Ruegger (2001), de solo da Mata Atlântica, região do Banhado Grande, Estação Ecológica de Juréia-Itatins, estado de São Paulo, Brasil. A linhagem pertence à coleção de cultura do Centro de Estudos Ambientais – CEA/UNESP. O referido fungo foi mantido em laboratório, em meio sólido de Vogel contendo glicose como fonte de carbono, na concentração de 1,5 % (m/v). Repiques periódicos das culturas foram realizados, sendo estas então incubadas por 7 dias a 28 °C. Após esse período a linhagem foi utilizada ou armazenada a 4 °C.

2.2 Meios de cultura

2.2.1 Meio sólido de Vogel (VOGEL, 1956)

Para a preparação do meio, utilizou-se uma solução de elementos traços em água destilada. A esta solução, acrescentou-se 1,0 mL de clorofórmio como agente antimicrobiano.

Solução de elementos traços:

Ácido cítrico . H ₂ O.....	5,00 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O.....	5,00 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ . 6H ₂ O.....	1,00 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O.....	0,25 g
MnSO ₄ . H ₂ O.....	0,005 g
H ₃ BO ₃	0,005 g
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O.....	0,005 g
Água estilada qsp.....	100 mL

A solução de sais de Vogel foi preparada pela dissolução dos sais abaixo relacionados, em água destilada.

Citrato de sódio . 5H ₂ O	15 g
KH ₂ PO ₄	25 g
NH ₄ NO ₃	10,0 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O.....	1,0 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O.....	0,5 g
Solução de biotina (0,1 mg/mL).....	0,5 mL
Solução de traços de elementos.....	0,5 mL
Água destilada qsp.....	100 mL

Em seguida foram adicionados 0,2-0,3 mL de clorofórmio como agente antimicrobiano, e a solução foi estocada a 4 °C.

Para a preparação do meio de cultura sólido a solução de sais de Vogel foi diluída 50 vezes com água destilada (v/v) e suplementada com glicose na concentração de 1,5 % (m/v) como fonte de carbono e ágar 1,5 % (m/v). Após a distribuição em tubos de cultura e esterilização (20 min, 120 °C, 1 atm), estes foram inclinados e deixados em repouso à temperatura ambiente.

2.2.2 Meio líquido de Vogel

Para preparação do meio líquido de Vogel, utilizou-se a solução de sais de Vogel diluída conforme item 2.2.1, acrescido de 1% (m/v) da fonte de carbono indicada.

2.3 Inóculo

Conídios da linhagem de *P. janczewskii*, cultivados em meio sólido de Vogel por 7 dias, foram suspensos em água destilada esterilizada, sendo a suspensão filtrada em lã de vidro para remoção de segmentos de hifas, e sua concentração ajustada para 10^7 esporos/mL. Um volume de 1,0 mL dessa suspensão foi inoculado em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio líquido de Vogel.

2.4 Obtenção do filtrado de cultura

A cultura foi filtrada a vácuo e o filtrado centrifugado a 3900 g, por 20 min., a 4 °C. O filtrado de cultura foi congelado e posteriormente utilizado para dosagens das atividades enzimáticas e de proteínas extracelulares. Nos cultivos em que foram utilizados como fonte de carbono resíduos agrícolas ou agroindustriais, o filtrado foi dialisado *overnight* contra solução tampão de acetato de amônio 25 mM, pH 6,8 antes das determinações quantitativas.

2.5 Extração do conteúdo intracelular

O micélio úmido congelado foi triturado em almofariz com 3 partes de areia lavada (m/m). A seguir, foram adicionadas 15 partes (v/m) de tampão

de McIlvaine pH 4,0, para uma parte de micélio (v/m). A mistura foi centrifugada a 3900 g, por 20 min., a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para quantificação de proteínas intracelulares e para dosagem da atividade β -xilosidásica intracelular.

2.6 Atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas extracelulares foram expressas em unidades por volume (U/mL) do filtrado de cultura e a atividade específica em unidades por miligrama de proteína (U/mg prot.) presente nesse filtrado. As atividades enzimáticas intracelulares foram expressas em unidades totais (U) e específicas como unidades por miligrama de proteína intracelular (U/mg prot.) presentes no micélio. Atividades relativas, expressas em percentagens, foram calculadas em relação à atividade máxima obtida em cada caso.

2.6.1 Determinação da atividade xilanásica

A atividade xilanásica foi determinada utilizando-se uma modificação do método proposto por Bailey et al. (1992): A 750 μ L de uma suspensão de xilano de videiro (birchwood xylan) 1% (m/v) em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 ou acetato de sódio 50 mM pH 5,5 como substrato, adicionou-se o mesmo tampão e o filtrado de cultura, de modo a se completar o volume a 1250 μ L. Incubou-se esta mistura de reação em banho-maria a 50 °C e, em intervalos apropriados, retirou-se alíquotas de 250 μ L. Foi realizada a determinação de açúcares redutores (Miller, 1959), adicionando-se as alíquotas retiradas a 250 μ L do reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS), sendo essa solução aquecida em banho-maria de água fervente por 5 min. Após o resfriamento, a solução foi diluída com 2,5 mL de água destilada e homogeneizada, sendo realizada a leitura da absorbância a 540 nm, contra branco apropriado. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de grupos redutores equivalentes a xilose por mililitro, por minuto, nas condições de ensaio. Os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicata.

2.6.2 Determinação da atividade β -xilosidásica

A atividade β -xilosidásica foi determinada utilizando-se 200 μ L de uma solução 0,25 % (m/v) de p -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo em tampão McIlvaine pH 4,0, conforme descrito por Kersters-Hilderson et al. (1982). A esta solução adicionou-se o mesmo tampão e o filtrado de cultura de modo a se completar o volume a 500 μ L. A mistura de reação foi incubada a 50 °C, e em intervalos adequados, alíquotas foram retiradas e a reação interrompida pela adição de 1,0 mL de uma solução saturada de tetraborato de sódio. O p -nitrofenol liberado foi determinado pela leitura da absorbância a 405 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de p -nitrofenol por mililitro por minuto de reação. Os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicata.

2.6.3 Determinação das atividades celulolíticas

A atividade exoglucanase (avicelase) foi determinada utilizando-se celulose microcristalina tipo avicel, como substrato enzimático. Já para a determinação da atividade endoglucanásica (CMCase) utilizou-se carboximetilcelulose (CMC) como substrato enzimático, conforme descrito por Rodrigues (1987). Foram utilizados 50 mg de substrato, em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 e o filtrado de cultura de modo a se completar o volume a 5,0 mL. A mistura de reação foi incubada em banho-maria a 50 °C, e em intervalos apropriados, a reação foi interrompida com 1,0 mL de ADNS. O substrato não hidrolisado foi separado da mistura por centrifugação e, em seguida, foi realizada a determinação de açúcares redutores (MILLER, 1959), utilizando-se glicose como padrão. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de grupos redutores, equivalentes a glicose, por minuto, nas condições de ensaio.

2.7 Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando-se soro albumina bovina como padrão. Todas as dosagens foram realizadas em duplicata, utilizando-se brancos apropriados.

2.8 Influência das fontes de carbono sobre a produção do complexo xilanolítico

Para o estabelecimento do substrato indutor mais apropriado para a produção de xilanase e β -xilosidases, a linhagem estudada foi cultivada a 28 °C, por 7 dias, em frascos de Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio líquido de Vogel, pH 6,5, contendo 1 % (m/v) de cada um dos substratos relacionados, como única fonte de carbono. Alguns desses substratos foram carboidratos puros como glicose, xilose, maltose, lactose, sacarose, avicel, carboximetilcelulose (CMC), xilano de aveia e pectina de citrus, enquanto outros foram fontes naturais de carboidratos como bagaço de cana, bagaço de milho, farelo de aveia e farelo de trigo, farelo de soja e casca de mandioca. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

2.9 Cinética de produção do complexo xilanolítico

A cinética da produção do complexo xilanolítico foi estudada de forma estacionária e agitada (120 rpm), em meio líquido de Vogel, utilizando-se xilano de aveia como fonte de carbono, para verificar a influência do tempo de cultivo e da agitação nesse processo. O crescimento foi avaliado pela dosagem do teor protéico intracelular. A produção enzimática foi avaliada pela determinação das atividades xilanásica extracelular e β -xilosidásica intra e extracelulares.

2.10 Influência do pH e da temperatura sobre a produção do complexo xilanolítico

A determinação da influência do pH sobre a produção das enzimas foi verificada pelo cultivo do microrganismo em meio líquido de Vogel contendo 1 % (m/v) de xilano de aveia como fonte de carbono, a 28 °C, por 7 dias para a produção de xilanases, e por 8 dias para a produção de β -xilosidases extracelulares. Os meios de cultura tiveram seus pH ajustados com soluções de hidróxido de sódio (1 mol/L) ou ácido clorídrico (1 mol/L) para uma faixa de 3,0 a 9,0, com variações de 0,5 unidade.

Para o estabelecimento da temperatura mais apropriada para a produção de xilanases, a linhagem foi cultivada em meio líquido de Vogel contendo 1% (m/v) de xilano de aveia em pH 6,5. Já, para a produção das β -xilosidases extracelulares, utilizou-se o mesmo meio e a mesma fonte de carbono, porém em pH 5,0. Os cultivos foram realizados em temperaturas específicas de 15 a 35 °C, com intervalos de 5 °C.

2.11 Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade

Definidas as condições ótimas de cultivo, os efeitos desses parâmetros foram avaliados no meio de reação. As atividades enzimáticas foram dosadas a 50 °C, conforme descrito nos itens **2.6.1** e **2.6.2**, utilizando-se tampões de diferentes valores pH, tanto para o preparo do substrato enzimático quanto para completar o volume de reação. Para determinação da atividade xilanásica foram utilizados os tampões: Sorensen (Glicina-NaCl-HCl ou Glicina-NaCl-NaOH) para determinação das atividades nas faixas de pH 1,6-3,5 e 9,0-10,0; tampão acetato de sódio 50 mM de 3,5 a 5,5; tampão imidazol 50 mM de 6,0 a 7,0 e de 7,0 a 9,0 Tris-HCl 50 mM. Já para determinação da atividade β -xilosidásica foram utilizados os tampões de McIlvaine para a região de 3,0 a 7,5 e Glicina-HCl 50mM para a de 1,6 a 3,0.

A temperatura ótima de atividade foi determinada dosando-se as atividades, em diferentes temperaturas, em intervalos de 5 °C. Para a determinação da temperatura ótima para as xilanases dosou-se a atividade

com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 no intervalo de 20-70 °C e para as β -xilosidases determinou-se a atividade em tampão McIlvaine, pH 4,0 na região de 30 a 90 °C.

2.12 Estabilidade térmica e em diferentes valores de pH

A estabilidade térmica das atividades xilanásica e β -xilosidásica foram avaliadas nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C, e 50, 65 e 75 °C, respectivamente. Após a incubação do filtrado de cultura sem substrato, foram retiradas alíquotas, em intervalos de tempo variados, para determinação das atividades residuais. A atividade xilanásica foi determinada em pH 5,5 a 50 °C e a atividade β -xilosidásica em pH 4,0 a 70 °C. A partir dos resultados obtidos, estimou-se o valor de T_{50} .

Para determinação da estabilidade em diferentes valores de pH, incubou-se o filtrado de cultura a 4 °C em diferentes tampões na proporção de 1:2 (v/v). Foram utilizados diferentes tampões para comporem as faixas de pH adequadas a cada atividade enzimática (**item 2.11**). Após 24 h., determinou-se a atividade residual, conforme descrito anteriormente.

2.13 Efeito de substâncias sobre as atividades xilanásica e β -xilosidásica

O efeito de algumas substâncias sobre as atividades enzimáticas foi avaliado pela adição de soluções aquosas das mesmas às misturas de reação, realizando-se o cálculo das atividades em relação ao controle.

Foram utilizadas as seguintes substâncias: cloreto de cobre II, sulfato de zinco, sulfato de manganês II, cloreto de bário, cloreto de cálcio, cloreto de amônia, cloreto de sódio, acetato de chumbo, sulfato de magnésio, cloreto de cobalto II, cloreto de mercúrio II, citrato de sódio, dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), fluoreto de fenil metil sulfônico (PMSF), ditioneitol (DTT) e β -mercaptoetanol, nas concentrações de 2 e 10 mM.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Influência da fonte de carbono sobre a produção de xilanases, β -xilosidases e celulasas por *Penicillium janczewskii*

O custo das enzimas é o principal fator que determina a viabilidade econômica de um processo biocatalítico. Assim, o conhecimento dos mecanismos regulatórios de produção enzimática e das condições ótimas para obtenção do produto é necessário para que se possa dar um enfoque racional na produção, com redução de custos (BAJPAI, 1997).

A escolha de um substrato apropriado, geralmente, constitui o primeiro passo na otimização de um processo e é de grande importância para obtenção de elevada produção enzimática. O substrato, além de ser fonte de carbono, fornece para o microrganismo diversos compostos indutores, que agem por um prolongado período, propiciando uma extensão da fase de produção que pode resultar num aumento da produtividade do processo (HALTRICH et al., 1996; KULKARNI et al., 1999).

A primeira etapa deste trabalho, portanto, consistiu no estabelecimento da melhor fonte de carbono para a indução, síntese e liberação das enzimas do complexo xilanolítico de *Penicillium janczewskii*. Para tanto, determinou-se os níveis de produção de xilanases e β -xilosidases em cultivo submerso estacionário, a 28 °C, por 7 dias em meio líquido de Vogel, pH 6,5 contendo 1,0 % (m/v) de diferentes fontes de carbonos. Foram avaliados carboidratos puros e também diversos resíduos agrícolas ou agroindustriais (item 2.8).

Foram dosadas as atividades xilanásica extracelular e β -xilosidásicas intra e extracelular. A atividade xilanásica intracelular não foi dosada, pois estudos preliminares mostraram baixos níveis dessa enzima intracelularmente.

Diversas fontes de carbono como xilana de aveia, bagaço de cana, farelo de trigo, sabugo de milho e celulose têm sido avaliadas e utilizadas para a produção de enzimas xilanolíticas por espécies de *Penicillium* em cultivo submerso, conforme apresentado nas Tabelas 1 e 2. As produções enzimáticas obtidas por *Penicillium janczewskii* cultivado na presença das diferentes fontes de carbono estão dispostas nos gráficos apresentados nas **Figuras 4 e 5**.

Os maiores níveis de atividade foram verificados nos cultivos com a xilana de aveia como fonte de carbono. A xilana de aveia tem sido freqüentemente utilizada como fonte de carbono na maioria dos estudos, seja por resultar em maior atividade enzimática para otimizar a produção, seja por resultar em maior atividade específica para purificação enzimática. Na presença dessa fonte, foram obtidas atividades xilanásicas de 30,39 U/mL e 117,79 U/mg prot (**Fig. 4**).

O segundo melhor indutor desta atividade enzimática foi o farelo de trigo que produziu metade da atividade por unidade de volume (15,38 U/mL) mas apenas um quinto da atividade específica (21,45 U/mg de proteína) obtida com a xilana de aveia. Ainda, sabugo de milho e bagaço de cana resultaram em maior atividade específica que farelo de trigo e farelo de aveia (**Fig. 4**).

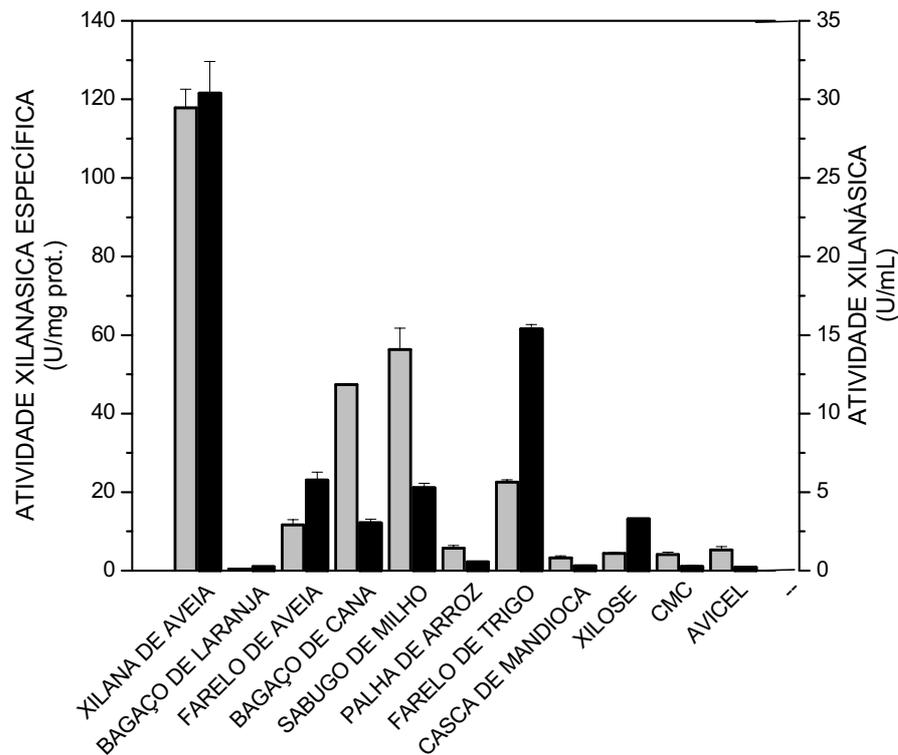


Figura 4 – Produção de xilanases extracelulares por *P. janczewskii* em diferentes fontes de carbono. O cultivo foi realizado em condição estacionária, por 7 dias, em meio líquido de Vogel, pH 6,5, a 28 °C. (■) Atividade por unidade de volume (U/mL); (▒) atividade específica (U/mg prot.).

Assim como no caso da atividade xilanásica, as maiores atividades β -xilosidásicas, tanto extra, quanto intracelulares foram verificadas nos cultivos com xilana de aveia. Os resultados indicaram que esta atividade foi, sobretudo encontrada no filtrado de cultura (0,2 U/mL [5 U] e 0,79 U/mg prot. (**Fig. 5a**), sendo a atividade relacionada ao micélio aproximadamente 3 vezes inferior (1,79 U e 0,28 U/mg prot.) (**Fig. 5b**). Essa localização, majoritariamente extracelular, é interessante do ponto de vista industrial, pois elimina a necessidade de lise celular para recuperação do produto, o que poderia encarecer o processo. Isso também foi verificado em linhagens de *P. wortmanni* (DELEYN et al., 1978; MATSUO et al., 1987); já em *P. herquei* (ITO et al., 2003) esta enzima permanece associada ao micélio. Níveis

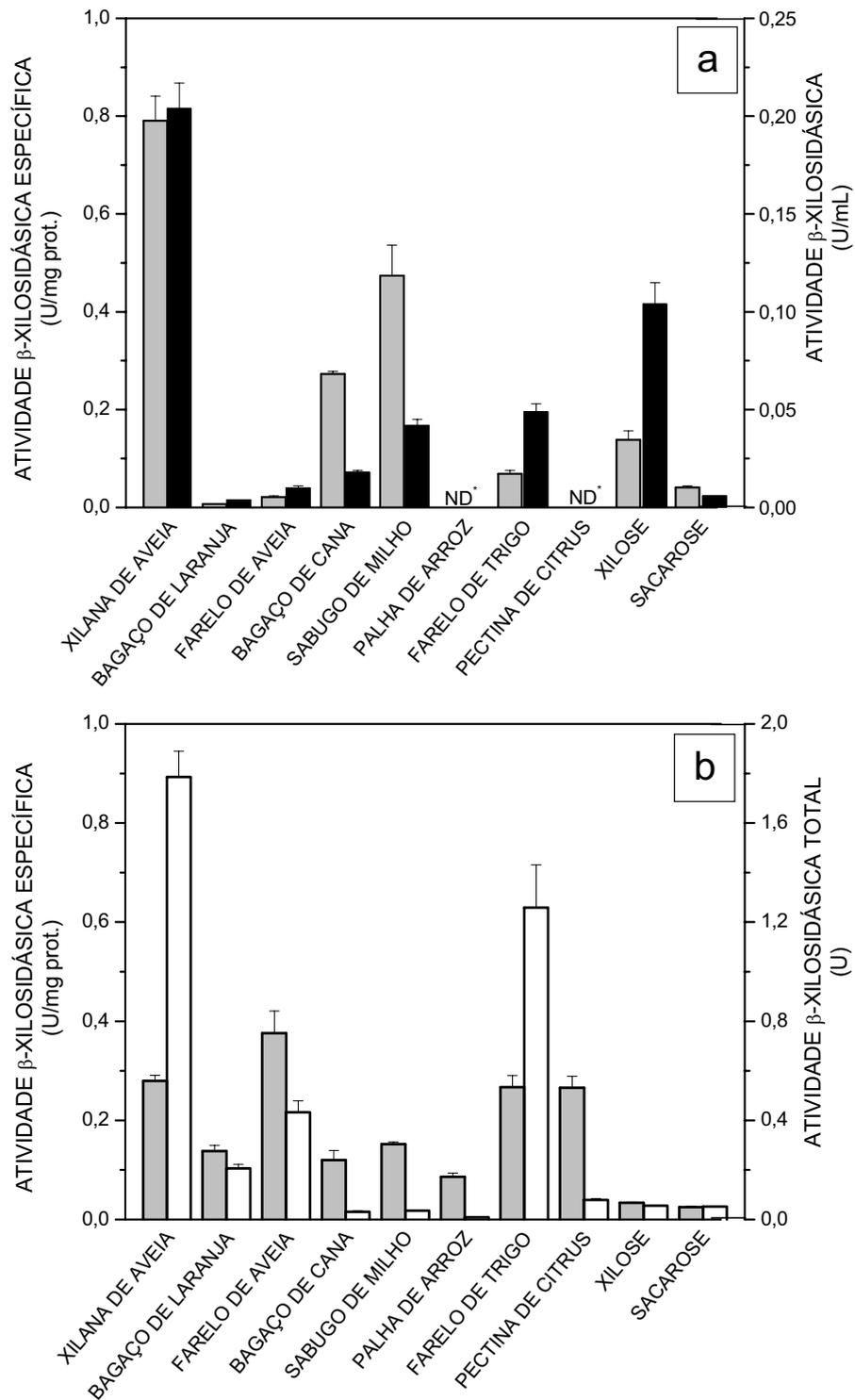


Figura 5 - Produção de β -xilosidases extracelulares (a) e intracelulares (b) por *P. janczewskii* em diferentes fontes de carbono. O cultivo foi realizado em condição estacionária por 7 dias em meio líquido de Vogel, pH 6,5, a 28 °C. (■) Atividade por unidade de volume (U/mL); (▒) atividade específica (U/mg prot.); (□) atividade total (U). ND, não detectada.

intermediários de β -xilosidases extracelulares (U/mL) foram verificados nos cultivos com xilose, enquanto farelo de trigo e sabugo de milho induziram níveis menores. A atividade específica, contudo, foi maior em sabugode milho, bagaço de cana e xilose, respectivamente (**Fig. 5a**).

Para as β -xilosidases intracelulares, farelo de trigo e farelo de aveia induziram, nessa ordem, níveis intermediários de atividade total. Entretanto, a maior atividade específica foi obtida em farelo de aveia, seguida de farelo de trigo e pectina de citrus, que apresentaram os mesmos valores, apenas levemente inferiores àqueles observados com xilano como fonte de carbono (**Fig. 5b**).

As demais fontes apresentadas nos gráficos induziram menor produção destas enzimas, e aquelas não apresentadas não induziram suficientemente a produção para ser detectada nas condições de ensaio utilizadas.

É importante salientar que o pH final do meio não foi determinado, mas o mesmo pode ter-se alterado durante o cultivo nas diferentes fontes de carbono, como observado por Guimarães et al. (2003), o que também afeta a produção e secreção de enzimas.

Estas enzimas possivelmente estão sujeitas à repressão catabólica pela glicose, bem como pelos demais monossacarídeos testados, com exceção da xilose, no caso das β -xilosidases extracelulares. Jørgensen et al. (2004) observaram que *P. pinophilum*, *P. persicinum* e *P. brasilianum* foram estimulados quanto à produção de xilanases e β -xilosidases na presença de xilose como fonte de carbono, e que glicose agia como um repressor. Verificaram também que a xilana induzia a produção de xilanases nesses microrganismos, mas a magnitude das respostas obtidas era diferente entre as espécies.

Os resultados obtidos indicaram que, como em outros microrganismos, a atividade xilanásica é indutível e provavelmente substratos derivados da xilana, como xilooligossacarídeos e mesmo a xilose, possuem importante papel na indução da produção dessas enzimas, como citado por Kulkarni et al. (1999).

Diversas fontes naturais complexas, como resíduos agrícolas e agroindustriais, têm sido utilizadas na indução dessas atividades enzimáticas, mesmo quando produzem níveis menores de atividade, pois possuem a vantagem de serem encontradas abundantemente e em baixo custo. Nos estudos com *Penicillium janthinellum* maiores atividades xilanolíticas também foram obtidas com a xilana de aveia, porém atividades elevadas também foram verificadas com fontes naturais como sabugo de milho e casca de aveia. Para esta espécie, o bagaço de cana e a palha de milho (23,8 U/mL) também induziram a produção de xilanases, porém num menor nível (OLIVEIRA et al., 2005).

Nesse trabalho, não foi observada produção de β -xilosidase e apenas baixa produção de xilanase em farelo de mandioca. Oliveira et al. (2005) associaram a produção de xilanases à porcentagem de hemiceluloses nos substratos utilizados. Assim, observaram que a casca de mandioca, que possui apenas 11% de hemiceluloses, não induziu a produção de xilanases, já substratos naturais com maiores porcentagens desses polissacarídeos como bagaço de cana (23%), casca de aveia (31,0 - 38,4%), sabugo de milho (42,5%) e palha de milho (44,5%) resultaram em maior produção destas enzimas por *P. janthinellum*.

Apesar desta linhagem fúngica ter sido classificada como não celulolítica (TAUK-TORNISIELO et al., 2005) também foram dosadas as atividades endoglucanase (CMCase) e exoglucanase (Avicelase) obtidas nos cultivos com as diferentes fontes de carbono. Apenas baixos níveis das atividades celulásicas foram encontrados nos cultivos com farelo de trigo (0,13 U/mL e 0,2 U/mg prot), farelo de aveia (0,12 U/mL e 0,2 U/mg prot) e lactose (0,11 U/mL e 0,44 U/mg prot.), e nos demais cultivos, nem mesmo naqueles com avicel ou carboximetilcelulose, houve produção destas enzimas (**Tab. 3**).

A partir destes resultados pode-se afirmar que *P. janczewskii* é bom produtor de xilanases e β -xilosidases, principalmente ao se utilizar a xilana de aveia como fonte de carbono. Também se pode indicar este microrganismo e suas enzimas xilanolíticas para aplicações em processos nos quais as celulasas são indesejáveis.

Como a xilana de aveia foi a fonte de carbono que resultou em maiores atividades por unidade de volume na produção das enzimas xilanolíticas em estudo, optou-se pela sua utilização nos experimentos subsequentes.

Tabela 3 - Produção de CMCase e avicelase extracelulares por *P. janczewskii*.

FONTE DE CARBONO 1 % (m/v)	Atividade CMCCase		Atividade Avicelase	
	U/mL	U/mg prot.	U/mL	U/mg prot.
Xilana de aveia	0,03 ± 0,00	0,1 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,06 ± 0,01
Bagaço de laranja	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Farelo de aveia	0,12 ± 0,00	0,2 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Bagaço de cana	ND	ND	ND	ND
Sabugo de milho	ND	ND	ND	ND
Palha de arroz	ND	ND	ND	ND
Farelo de trigo	0,13 ± 0,00	0,18 ± 0,03	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Pectina de citrus	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Xilose	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Sacarose	0,02 ± 0,00	0,13 ± 0,02	ND	ND
CMC	ND	ND	ND	ND
Avicel	ND	ND	ND	ND
Lactose	0,11 ± 0,00	0,44 ± 0,09	0,01 ± 0,00	0,06 ± 0,01
Maltose	0,01 ± 0,00	0,05 ± 0,00	ND	ND
Glicose	0,01 ± 0,00	0,05 ± 0,00	ND	ND

O fungo foi cultivado em condição estacionária por 7 dias, em meio líquido de Vogel, pH 6,5, a 28 °C. ND, não detectada.

3.2 Cinética da produção de xilanases e β-xilosidases por *Penicillium janczewskii*

Estudos cinéticos foram realizados a fim de se selecionar a melhor condição, estacionária ou agitada, e também o tempo de cultivo para obtenção da maior produção de xilanases e β-xilosidases por *P. janczewskii*. Foram realizados cultivos, por 15 dias em condições estacionárias, e por 7,5 dias, em condição agitada, em meio líquido de Vogel com xilana de aveia como fonte de carbono, pH 6,5, a 28 °C.

Conforme observado na **Figura 6a**, a atividade xilanásica por unidade de volume foi crescente até o 7° dia, no qual foi máxima (29,17 U/mL), e, a partir deste, diminuiu levemente.

A atividade específica apresentou-se alta a partir do 4° dia permanecendo elevada até o 10°, no qual foi máxima (235,75 U/mg prot.), diminuindo a partir de então.

Em condição agitada, a atividade por unidade de volume apresentou dois picos, um aos 2,5 dias e outro aos 5,5 dias, nos quais foi máxima (24,91 e 23,77 U/mL, respectivamente). A atividade permaneceu estável do 3° ao 5° dia e diminuiu a partir do 6°. A atividade específica foi máxima com 1,5 dias de cultivo (129,18 U/mg prot.), a partir do qual diminuiu gradativamente (**Fig. 6b**).

Os resultados obtidos em relação ao tempo de cultivo estão de acordo com os obtidos por outras linhagens de *Penicillium*. Com relação à produtividade, os resultados obtidos foram melhores que algumas linhagens avaliadas. A principal diferença notada entre esse e os demais trabalhos foi que praticamente todos os estudos utilizaram agitação, e aqui, comparando-se os resultados obtidos nas duas condições de cultivo observou-se maiores níveis de atividade em condição estacionária. Mishra et al. (1985) cultivaram *P. funiculosum* por 10 dias, sob agitação, e obtiveram atividade de 16,0 U/mL; Brown et al. (1987) cultivaram *P. pinophilum* em fermentador de 12 L, por 10 dias, e obtiveram atividade xilanolítica 27,3 U/mL; Steiner et al. (1994) cultivaram *P. purpurogenum* por 12 dias, em condição agitada, e verificaram 10,4 U/mL; Funaguma et al. (1991) cultivaram *P. herquei* por 7 dias, sob agitação, e obtiveram 3,5 U/mL; *P. kloeckeri* foi cultivado por 5 dias, sob agitação, produzindo 12,2 U/mL de atividade (HALTRICH et al., 1996); Palma et al. (1996) cultivaram *P. janthinellum* em meio com bagaço de cana em condição agitada, por 4 dias, e obtiveram 89,5 U/mL, sendo que Oliveira et al. (2005) cultivando essa mesma espécie com sabugo de milho e palha de aveia, obtiveram 55,3 e 54,8 U/mL de atividade xilanásica, com 5,5 e 6 dias de cultivo agitado, respectivamente.

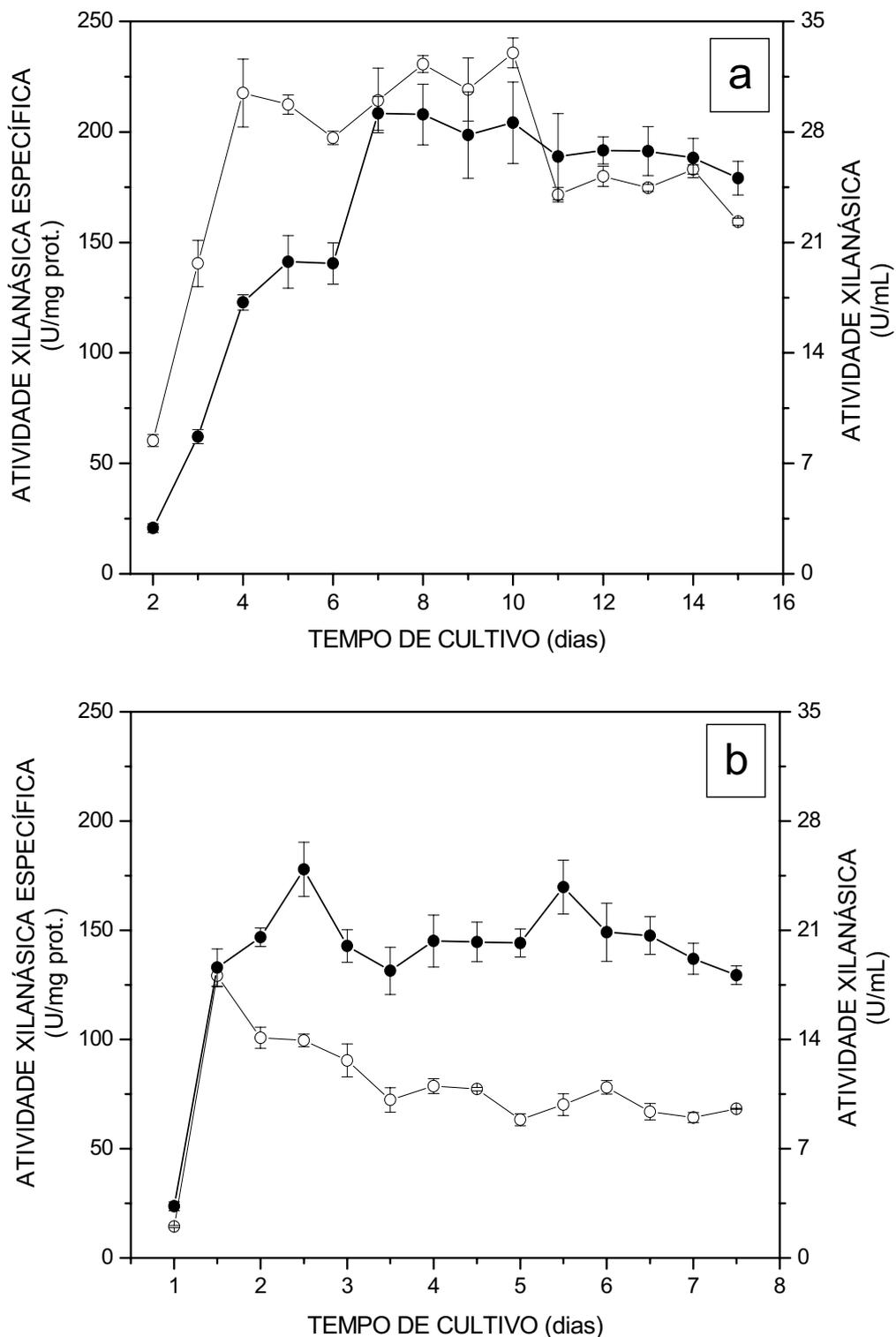


Figura 6 - Perfil da produção de xilanases extracelulares por *P. janczewskii* em condição estacionária **(a)** e sob agitação de 120 rpm **(b)**. Os cultivos foram realizados em meio líquido de Vogel contendo 1 % (m/v) de xilana de aveia como fonte de carbono, pH 6,5, a 28 °C. (●) Atividade por unidade de volume (U/mL); (○) atividade específica (U/mg prot.).

Como esta linhagem de *P. janczewskii* produzia β -xilosidases intracelulares e extracelulares foi necessário padronizar a apresentação dos resultados de produção para que seus valores pudessem ser comparados. Dessa maneira, os resultados das atividades intra e extracelulares, nas duas condições de cultivo, foram dispostos em gráficos em unidades por miligrama de proteína (U/mg prot.) e em unidades totais (U).

Em condição estacionária (**Fig. 7a**), as atividades β -xilosidásicas extracelulares total e específica foram crescentes durante os dias de cultivo apresentando-se máximas com 15 dias de cultivo (16,44 U e 5,52 U/mg prot.). As atividades intracelulares total e específica foram crescentes até o 5º dia de cultivo, quando apresentaram-se máximas (2,9 U e 2,24 U/mg prot.), e então diminuíram até o 7º dia. A partir deste dia a atividade intracelular total aumentou suavemente até o 9º dia, e a atividade intracelular específica até o 12º dia, a partir dos quais diminuíram gradativamente.

Em condição agitada (**Fig. 7b**), a atividade extracelular total apresentou-se máxima com 2,5, 3,5 e 5,5 dias de cultivo, correspondendo aos valores de 8,07, 8,63 e 8,91 U, respectivamente. Atividades específicas tanto extra quanto intracelulares apresentaram-se máximas com 1,5 dia de cultivo (2,1 e 2,2 U/mg prot.), diminuíram até os 6,5 dias e aumentaram levemente até o 9º dia. A atividade intracelular total foi máxima em cultivos de 2 dias de idade (3,04 U), sofreu uma queda com 2,5 dias de cultivo, aumentou levemente a partir de 3,5 dias, permanecendo estável até o 6º dia, quando então diminuiu.

A **Figura 8** mostra o perfil de crescimento da colônia de *P. janczewskii* durante os cultivos estacionário e agitado, estimado pela quantificação de proteínas intracelulares. Em condição estacionária (**Fig. 8a**) a cultura atingiu teor protéico intracelular máximo aos 7 dias de cultivo, o que coincidiu com o pico de atividade xilanásica. No 8º dia, período escolhido para produção de β -xilosidases, já apresentava menor teor protéico, pois estava entrando na fase de declínio. Em condição agitada (**Fig. 8b**), a colônia cresceu em fase logarítmica até o 2º dia de cultivo, permanecendo em fase estacionária dos 2,5 aos 7 dias, quando entrou em fase de declínio.

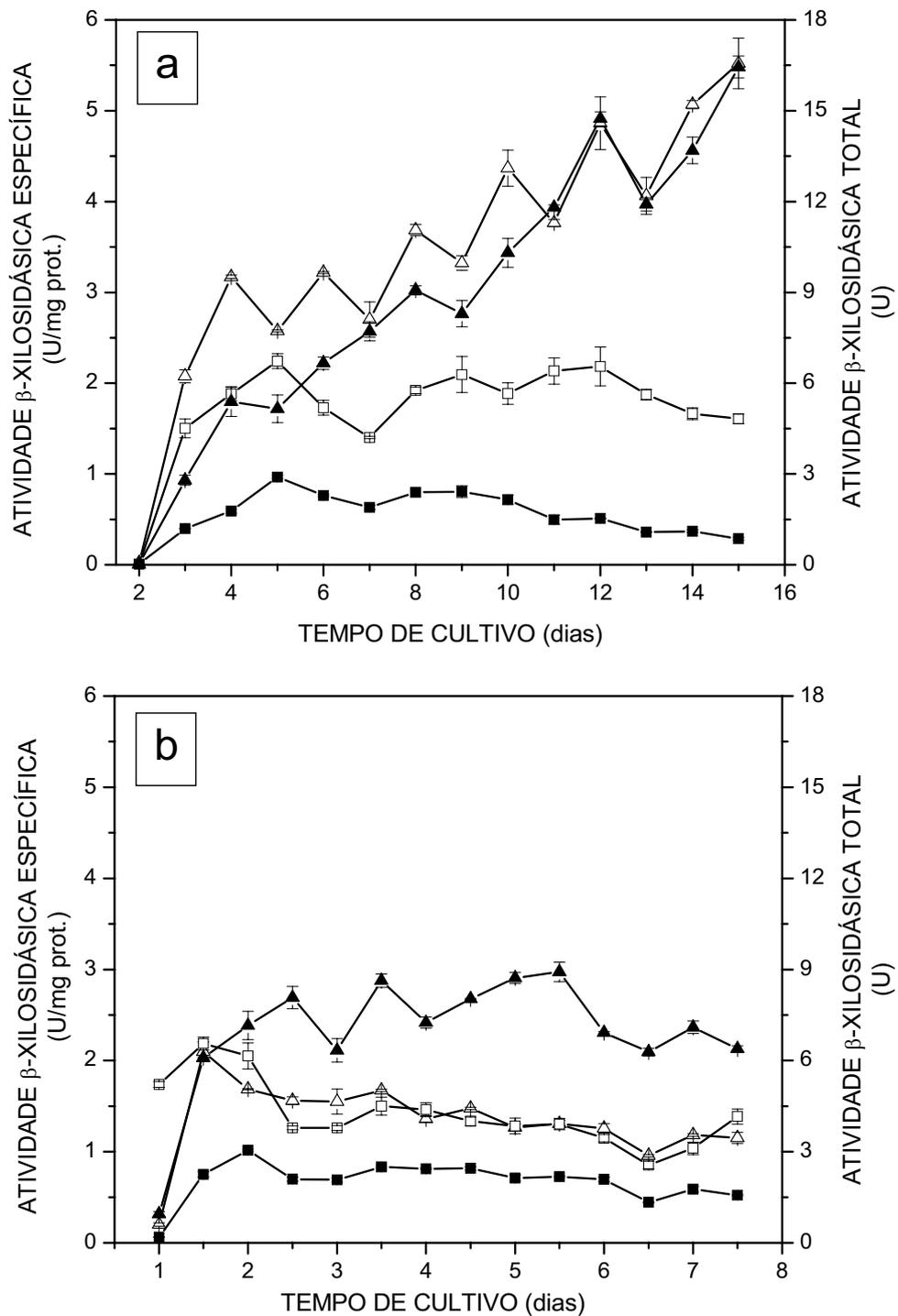


Figura 7 – Perfil da produção de β -xilosidases por *P. janczewskii* em condição estacionária (a) e sob agitação de 120 rpm (b). Os cultivos foram realizados em meio líquido de Vogel contendo 1 % (m/v) de xilana de aveia como fonte de carbono, pH 6,5, a 28 °C. (\blacktriangle) Atividade extracelular total (U); (\triangle) atividade extracelular específica (U/mg prot.); (\blacksquare) atividade intracelular total (U); (\square) atividade intracelular específica (U/mg prot.).

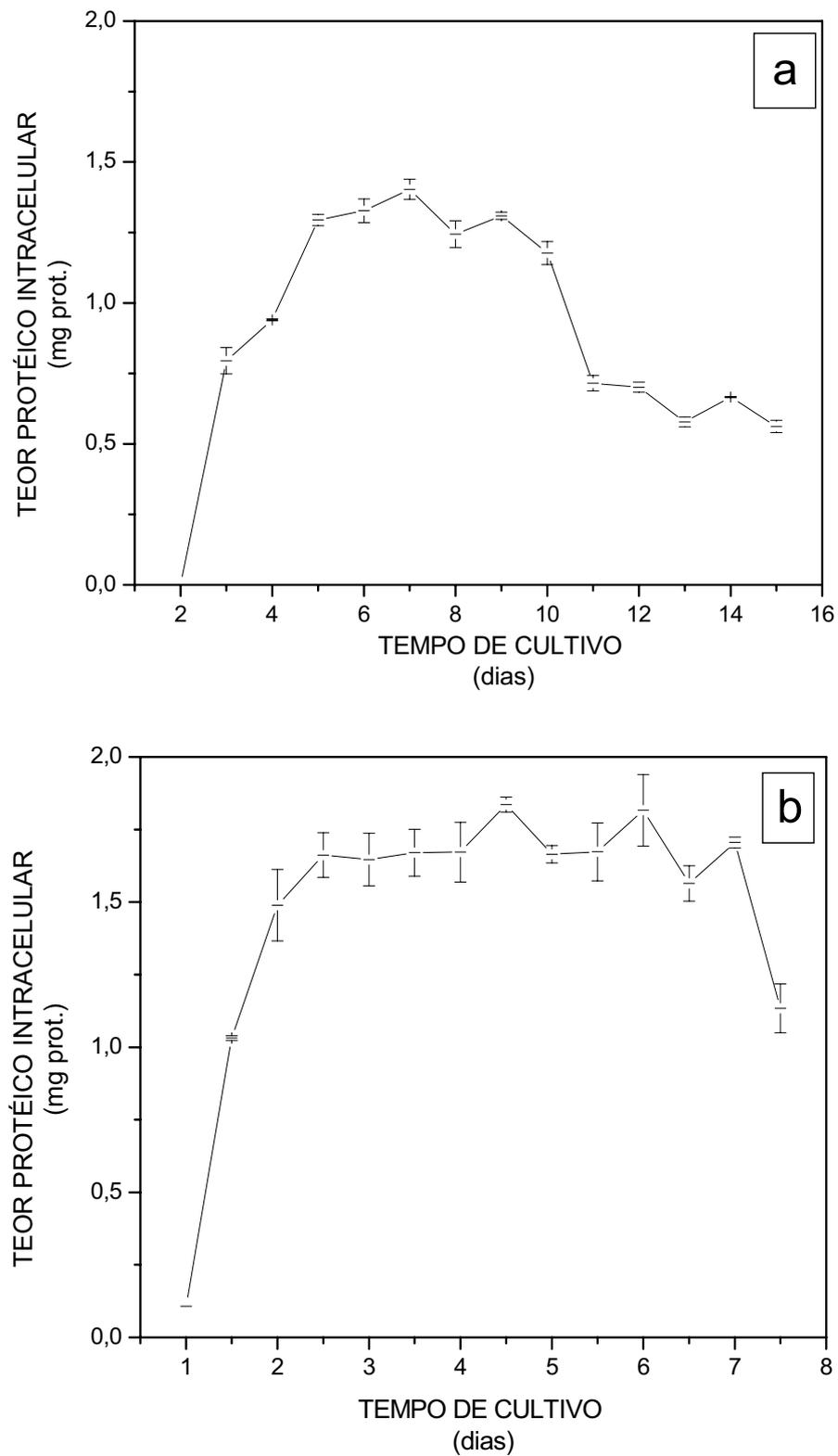


Figura 8 – Curva de proteínas intracelulares de *P. janczewskii* em condição estacionária (a) e sob agitação de 120 rpm (b). Os cultivos foram realizados em meio líquido de Vogel contendo 1 % (m/v) de xilana de aveia como fonte de carbono, pH 6,5, a 28 °C.

Comparando-se as duas condições de cultivo, foi observado maior teor protéico intracelular na condição agitada do que na estacionária. Como se obteve maior produção no cultivo estacionário, esta condição foi utilizada para prosseguimento dos experimentos de otimização da produção enzimática.

Para produção de xilanase, o tempo determinado para cultivo de *P. janczewskii* foi de 7 dias, pois resultara em maior atividade por unidade de volume. Para otimização da produção de β -xilosidase extracelular, a maior atividade por unidade de volume, que também representa maior unidade total, foi obtida no 15º dia. Ao se selecionar a β -xilosidase extracelular como objeto de estudo foi necessário escolher um período de cultivo que correspondesse, no filtrado de cultura, a quantidade da enzima que realmente tivesse sido secretada pelo microrganismo, e não uma quantidade adicional dessa enzima que estivesse presente no filtrado, devido à lise celular. Deste modo, optou-se, para a continuidade dos estudos, por 8 dias de cultivo, período que apresentava alta atividade extracelular total, uma quantidade ainda elevada dessa enzima intracelularmente, e no qual o microrganismo ainda não havia entrado na fase de declínio, não apresentando assim taxa de lise elevada.

3.3 Efeito do pH e da temperatura sobre a produção de xilanase e β -xilosidase por *Penicillium janczewskii*

Temperatura e pH são fatores ambientais importantes, que, além de afetarem a taxa de crescimento do microrganismo, afetam intensamente o nível de xilanases produzidas (HALTRICH et al., 1996). Desse modo, nessa etapa foram verificados os efeitos da variação do pH e da temperatura sobre a produção de xilanases e β -xilosidases extracelulares e o crescimento do microrganismo.

Foram realizados cultivos em meio líquido de Vogel, com pH ajustados numa faixa de 3,0 a 9,0, em condição estacionária, por 7 e 8 dias para avaliação da produção de xilanases e β -xilosidases, respectivamente, de acordo com o **item 3.2**.

Atividades xilanásicas (**Fig. 9a**) elevadas foram observadas nos cultivos com pH entre 5,0 e 6,5, sendo que tanto a atividade por unidade de volume quanto a específica foram máximas em pH 6,5 (29,17 U/mL e 179,09 U/mg prot.). Este pH está dentro da faixa normalmente utilizada nos estudos das xilanases de *Penicillia*. Palma et al. (1996) e Oliveira et al. (2005) utilizam o pH 5,5 para o meio de cultura de *P. janthinellum*, Steiner et al. (1994) utilizam 5,5 para *P. purpurogenum* e Mishra et al. (1985) utilizam o pH 5,0 para *P. funiculosum*.

Já a atividade β -xilosidásica extracelular por unidade de volume (**Fig. 9b**) foi máxima em pH 5,0 (0,76 U/mL) e a atividade específica foi máxima em pH 6,5 (1,46 U/mg prot.). As atividades diminuíram gradativamente quando o pH se afastou desses valores. Estes resultados também estão dentro da faixa utilizada para cultivo de *Penicillia* para produção de β -xilosidases. Deleyn et al. (1978) utilizaram o pH 5,1 para cultivo de *P. wortmanni* QM 7322 e Matsuo et al. (1987) utilizaram o pH 5,4 para *P. wortmanni* IFO 7237.

Pode-se verificar que *P. janczewskii* conseguiu se desenvolver na ampla faixa de pH, de 3,0 a 9,0, em que foi cultivado (**Fig. 10**). A partir da análise dos gráficos pode-se observar maiores teores protéicos intracelulares, em culturas de 7 dias de idade, na faixa de pH entre 4,0 e 6,5, sendo que no pH 4,0 obteve-se a massa mais elevada, valor observado como o melhor para o crescimento desta linhagem, nas condições estudadas (**Fig. 10a**). Este pH de crescimento máximo do microrganismo foi inferior àqueles que resultaram em máxima produção enzimática. Na maior parte dos pHs estudados também pode ser observada uma diminuição da massa micelial fúngica do 7º para o 8º dia (**Fig. 10a e 10b**). Esta diminuição indica que, conforme já verificado no gráfico de crescimento em condição estacionária (**Fig. 8a**), nesse período de cultivo o fungo se encontra em fase de declínio. Nos cultivos em pHs mais elevados verifica-se a manutenção ou aumento dos teores protéicos, sugerindo que em pHs alcalinos, de modo geral, a colônia apresentou um crescimento mais lento.

Ainda, da análise dos gráficos da **Figura 10**, verifica-se, decorrido o período de cultura, a manutenção do pH inicial do meio nos valores de 3,0 a 4,0. Nos valores de 4,5 a 7,0 é observada uma tendência à alcalinização do

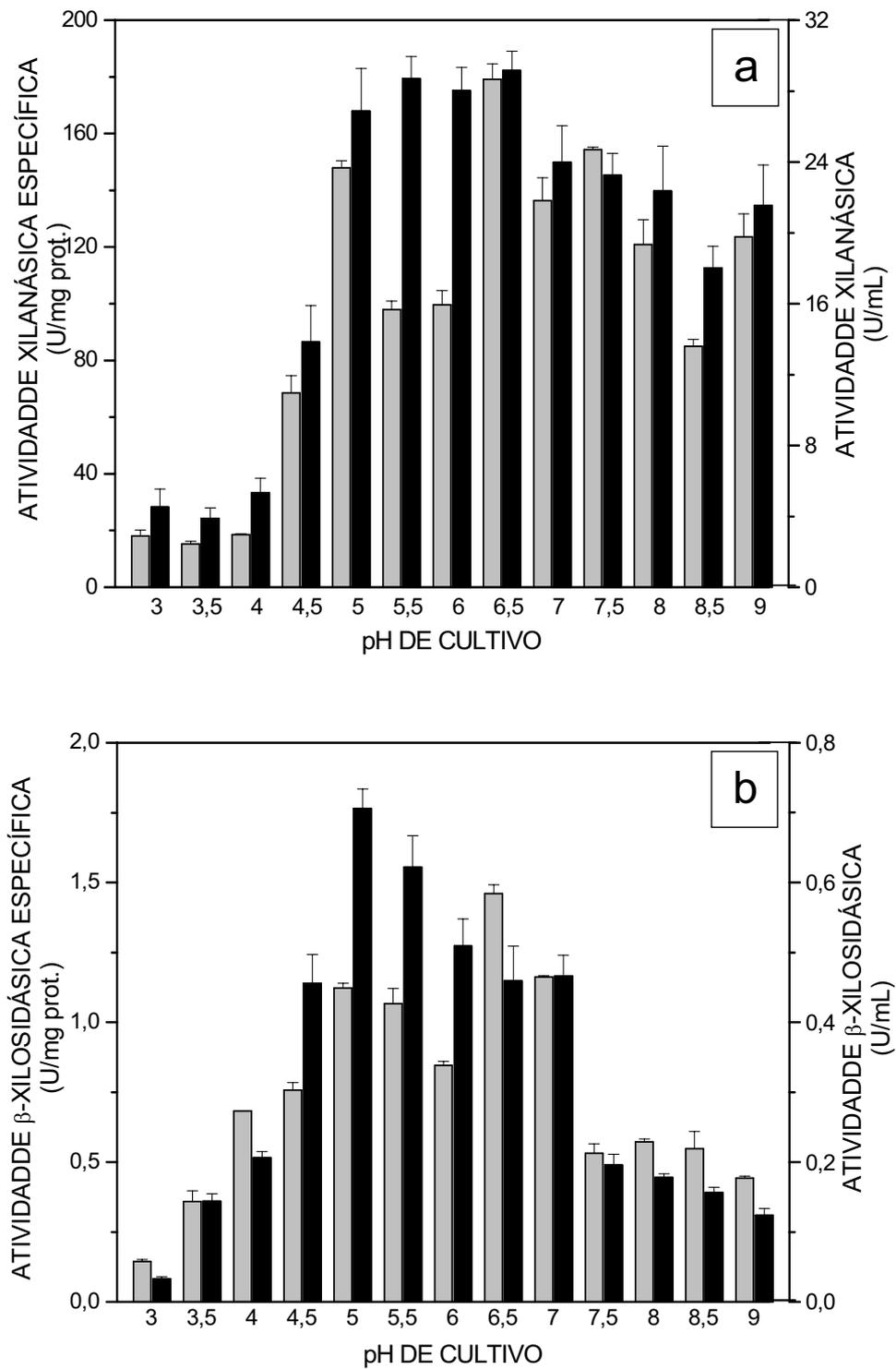


Figura 9 – Perfil da produção de xilanases (a) e β -xilosidases (b) por *P. janczewskii* em diferentes pHs. Os cultivos foram realizados por 7 e 8 dias, respectivamente, em meio líquido de Vogel contendo 1 % (m/v) de xilana de aveia como fonte de carbono, a 28 °C. (■) Atividade por unidades de volume (U/mL); (▒) atividade específica (U/mg prot.).

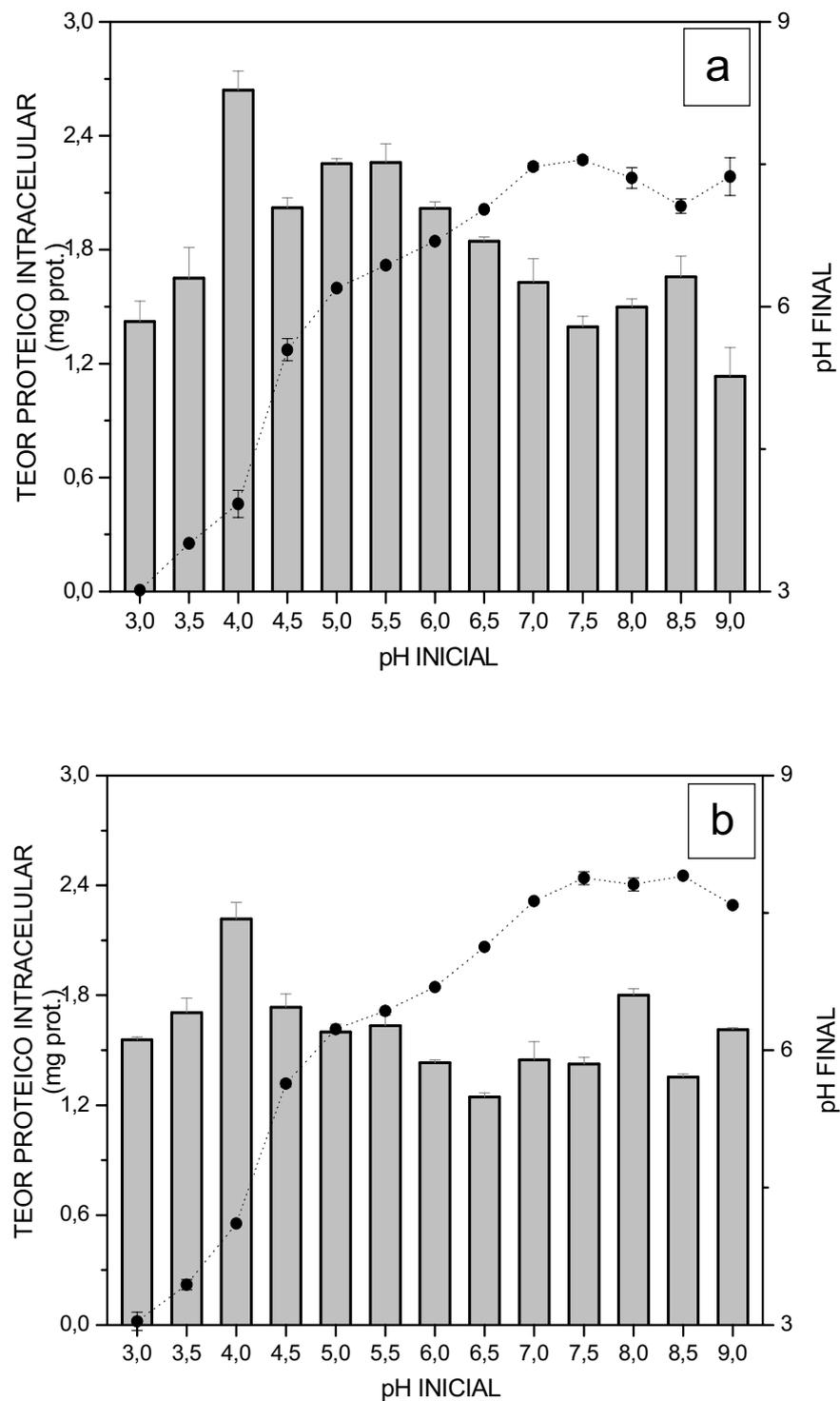


Figura 10 – Perfil de proteínas intracelulares de *P. janczewskii* em diferentes pHs em culturas de 7 (a) e 8 (b) dias de idade. Os cultivos foram realizados em meio líquido de Vogel contendo 1 % (m/v) de xilana de aveia como fonte de carbono, a 28 °C. (■) Teor proteico intracelular (mg prot.); (●) pH final de cultivo.

meio, que então não foi mais observada nos cultivos de pHs iniciais de 7,5 a 9,0, cujos pHs finais ficaram entre 7,0 e 8,0.

Após a seleção do pH de cultivo, foram realizados estudos para verificação da influência da temperatura sobre a produção das enzimas em estudo. Para tanto, a linhagem foi cultivada em meio líquido de Vogel por 7 dias em pH 6,5 para produção de xilanases, e por 8 dias em pH 5,0 para produção de β -xilosidases, de acordo com os resultados anteriores.

A partir dos resultados apresentados na **Figura 11**, pode-se observar a influência da temperatura de cultivo sobre a produção enzimática.

A atividade xilanásica foi elevada nas temperaturas entre 25 e 30 °C, sendo a temperatura ótima determinada nestes estudos de 30 °C (24,4 U/mL). A atividade específica se relacionou diretamente com a temperatura na faixa analisada, pois foi crescente com o aumento desta, sendo máxima a 35 °C, correspondendo ao valor de 90,05 U/mg prot. (**Fig. 11a**).

A produção de β -xilosidases mostrou-se mais susceptível a variações de temperatura, apresentando produção ótima a 25 °C (0,74 U/mL e 2,00 U/mg prot.) e diminuindo em temperaturas que se afastaram deste valor. Ainda, verificou-se atividade β -xilosidásica específica elevada a 20 °C (**Fig. 11b**).

Da análise da **Figura 12** pode-se confirmar que *P. janczewskii* é um microrganismo mesofílico, pois se desenvolveu melhor em temperaturas entre 20 e 30 °C, apresentando maiores massas protéicas intracelulares nestas temperaturas, tanto em culturas realizadas em pH 6,5 por 7 dias, quanto em pH 5,0 por 8 dias.

Considerando os resultados obtidos nestes estudos, as condições mais favoráveis para a produção e secreção das enzimas por *P. janczewskii* foram pH 6,5 e 30 °C para xilanases e pH 5,0 e 25 °C para β -xilosidases.

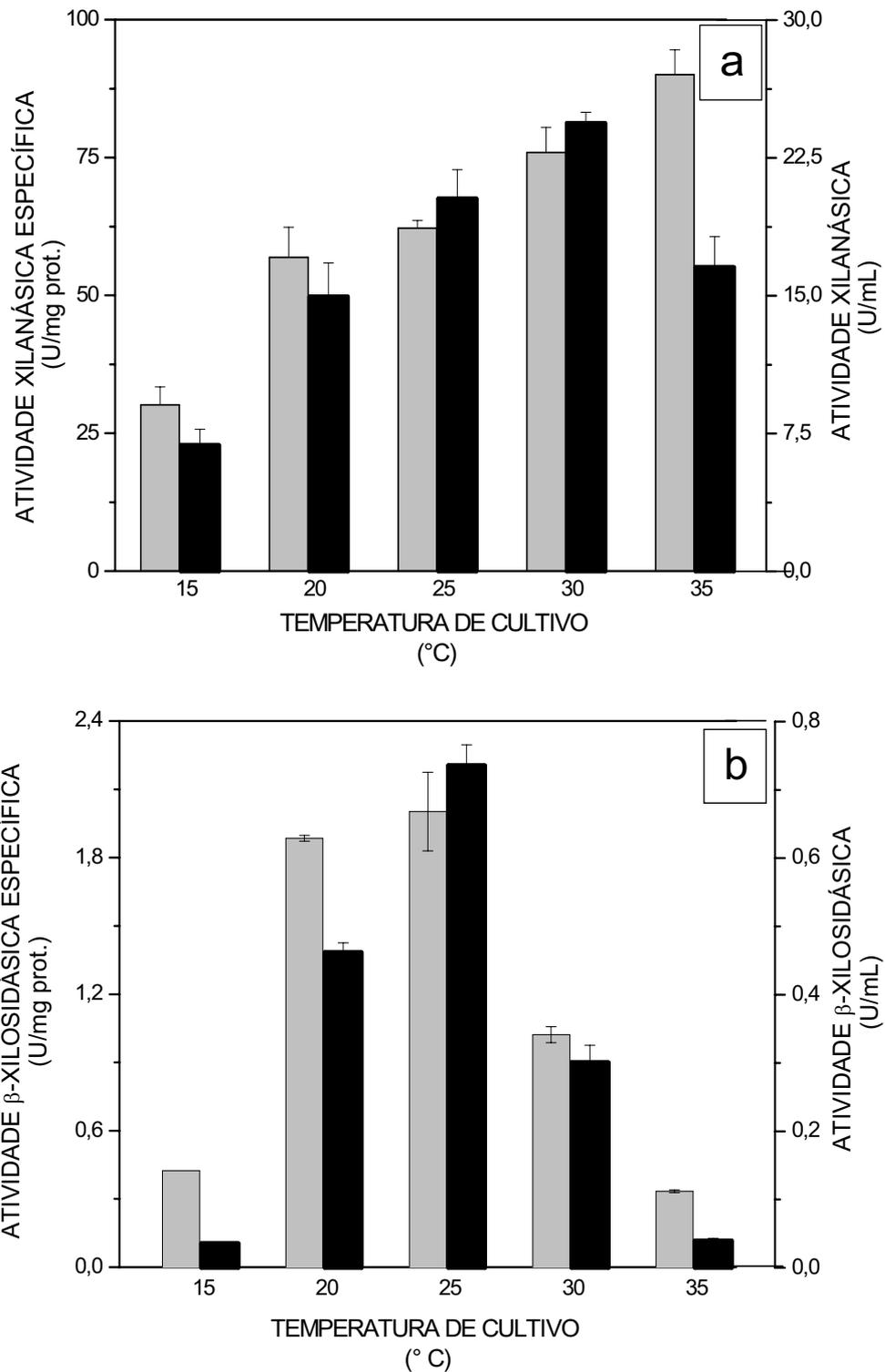


Figura 11 – Perfil da produção de xilanases (a) e β -xilosidases (b) por *P. janczewskii* em diferentes temperaturas. Os cultivos foram realizados por 7 e 8 dias em meio líquido de Vogel contendo 1 % (m/v) de xilana de aveia como fonte de carbono e pH 6,5 e 5,0, respectivamente. (■) Atividade por unidade de volume (U/mL); (■) atividade específica (U/mg prot.).

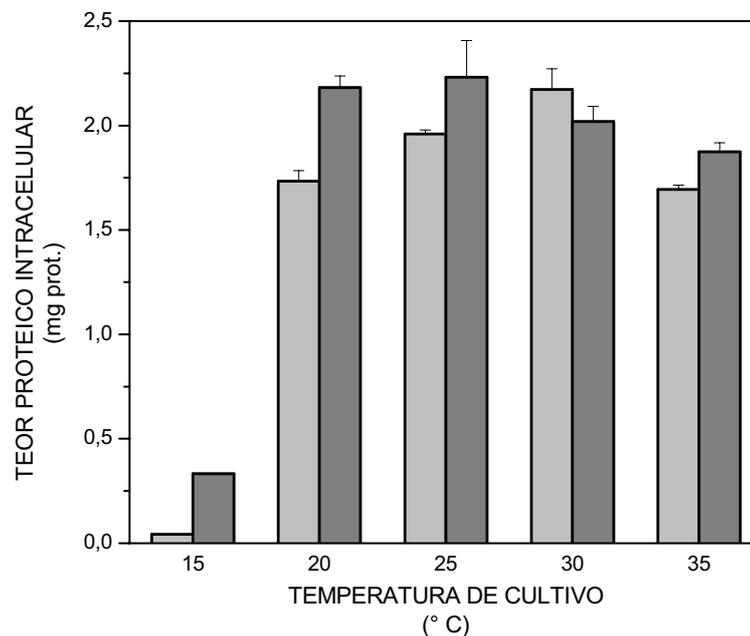


Figura 12 – Perfil de proteínas intracelulares de *P. janczewskii* em diferentes temperaturas. Os cultivos foram realizados em meio líquido de Vogel contendo 1 % (m/v) de xilana de aveia. (■) Teor proteico (mg prot.) intracelular com 7 dias de cultivo em pH 6,5; (■) teor proteico (mg prot.) intracelular com 8 dias de cultivo em pH 5,0.

3.4 Efeito do pH e da temperatura sobre as atividades xilanásica e β -xilosidásica de *Penicillium janczewskii*

Após otimização das condições de cultivo, avaliou-se o efeito do pH e da temperatura sobre as reações enzimáticas. Para seleção das condições ótimas de atividade, utilizaram-se os filtrados de cultura obtidos nas melhores condições de cultivo anteriormente selecionadas, para cada atividade enzimática.

Inicialmente, para verificação do efeito do pH sobre atividade xilanásica utilizou-se tampão McIlvaine pH 6,5. Entretanto, foi observada a interferência desse tampão na reação enzimática, provavelmente devido à complexação de cátions pelo íon citrato, pois houve queda de 50 % da atividade, quando comparada à atividade em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5. A partir dessa verificação utilizou-se diferentes tampões de pH 1,5 a 10 para dosagem das atividades (**Item 2.11**).

A **Figura 13a** apresenta as atividades enzimáticas relativas em função da variação de pH. A atividade xilanolítica manteve-se alta numa ampla faixa de pH que variou de 2,0 a 7,0, apresentando um pico de atividade máxima no pH 5,0, e dois outros picos em pH 3,5 e 6,5 com atividade elevada. Provavelmente, esses picos devem ser resultantes de diversas isozimas atuantes em diferentes valores de pH. A presença de diversas xilanases com diferentes propriedades físico-químicas é reconhecida, e, independente do mecanismo pelo qual atuam, relaciona-se com a heterogeneidade do substrato e sua acessibilidade, favorecendo o desenvolvimento do microrganismo em diferentes condições (WONG et al., 1988). Comparando-se os resultados obtidos percebe-se que esses três pHs de atividade elevada estão dentro da faixa de 2,0 a 7,0, verificada nos estudos com outras espécies de *Penicillium* (**Tab. 1**).

A atividade β -xilosidásica apresentou um pico de atividade ótima no pH 4,0, sendo que a atividade permaneceu acima de 60 % em pHs próximos do ótimo, diminuindo em pHs mais ácidos e naqueles próximos do neutro. Esse pH ótimo é semelhante ao das β -xilosidases de *P. herquei* (ITO et al., 2003) e de *P. wortmanni* QM 7322, que se encontra entre 3,3 e 4,0 (DELEYN et al., 1978), e das 4 β -xilosidases de *P. wortmanni* IFO 7237, que apresentam pH ótimo entre 3,0 e 4,5 (MATSUO et al., 1987).

Para *P. janczewskii*, as enzimas apresentaram diferentes valores de pH ótimos de atividade: para a atividade xilanásica o pH ótimo determinado foi 5,0 e para a β -xilosidase foi 4,0. Esses resultados mostram a ocorrência de um padrão diferente daquele observado em *P. funiculosum*, que apresentou o mesmo pH ótimo (4,0) para essas enzimas (MISHRA et al., 1985). Em *Aspergillus versicolor* também se observou pH ótimo semelhante para as xilanases e β -xilosidases (CARMONA et al., 2005; ANDRADE et al., 2004; CARMONA et al., 1997).

A temperatura ótima de catálise dessas enzimas foi determinada realizando-se a atividade no pH anteriormente selecionado numa faixa de temperatura que variou de 20 a 70 °C para xilanases e de 30 a 95 °C para β -

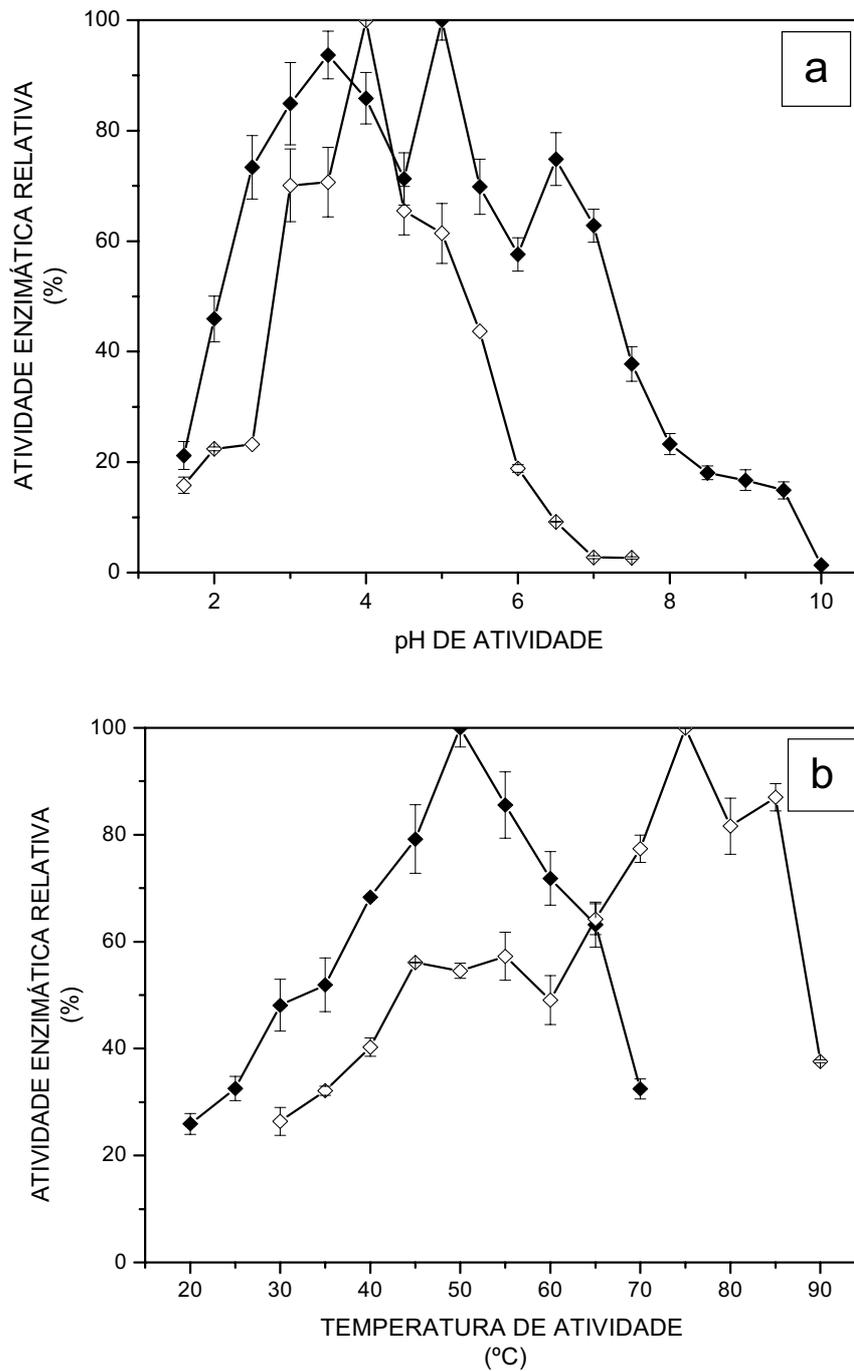


Figura 13 – Influência do pH (a) e da temperatura (b) sobre as atividades xilanásica e β -xilósídica de *P. janczewskii*. Em (a), as reações foram realizadas a 50 °C e nos tampões: Sorensen nas regiões de 1,6 a 3,5 e de 9,0 a 10,0; acetato de sódio 50 mM de 4,0 a 5,5; imidazol 50 mM de 6,0 a 7,0; Tris-HCl 50 mM de 7,0 a 9,0, para determinação da atividade xilanásica; e glicina-HCl 50mM de 1,6 a 3,0; Mcllvaine de 3,0 a 7,5, para determinação da atividade β -xilósídica. Em (b), as reações enzimáticas foram realizadas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 para determinação da atividade xilanásica e em tampão Mcllvaine pH 4,0 para a β -xilósídica. (◆) Atividade xilanásica relativa; (◇) atividade β -xilósídica relativa.

xilosidases (**Fig. 13b**). Foram obtidas duas curvas, nas quais a atividade xilanásica máxima foi a 50 °C e a atividade β -xilosidásica foi máxima a 75 °C. A atividade xilanásica permaneceu acima de 60 % na faixa de 40 a 60 °C, e a atividade β -xilosidásica permaneceu acima de 80 % até 85 °C

Novamente, as duas enzimas apresentaram-se diferentes, agora em relação à temperatura ótima de atividade. Em *P. funiculosum* as enzimas apresentaram temperaturas ótimas de atividade semelhante, entre 55 e 60 °C (MISHRA et al., 1985).

A temperatura ótima da xilanase corresponde ao usualmente encontrado na literatura para as linhagens de *Penicillium* estudadas (**Tab. 1**). Entretanto, a temperatura ótima de atividade β -xilosidase foi muita elevada considerando-se que o microrganismo em estudo é mesofílico. Dentre as β -xilosidases de linhagens de *Penicillium* a temperatura ótima permanece entre 30 e 55 °C, com exceção das de *P. wortmanni* IFO 7237 cujas β -xilosidases purificadas 2, 3 e 4 apresentam temperatura ótima entre 60 e 65 °C (MATSUO et al., 1987). A temperatura ótima da β -xilosidase de *P. janczewskii* foi semelhante às β -xilosidases purificadas de microrganismos termofílicos como a de *Scytalidium thermophilum*, que apresentou temperatura ótima de 60 °C (ZANOELO et al., 2004) ou às de termotolerantes como *Aspergillus phoenicis* (RIZZATTI et al., 2001), *Aspergillus fumigatus* (LENARTOVICZ et al., 2003) e *A. niger* e *A. brasiliensis* (PEDERSEN et al., 2007) com temperatura ótima entre 70 e 75 °C. Essa característica pode ser melhor estudada com a enzima purificada, verificando-se também a influência da temperatura sobre sua estabilidade, o que é muito interessante do ponto de vista aplicado.

3.5 Estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura da xilanase e β -xilosidase de *Penicillium janczewskii*

Para verificação da estabilidade das enzimas ao pH, incubou-se o filtrado de cultura em diferentes tampões de pH variável, por um período de 24 h.

Os resultados apresentados na **Figura 14** mostram que as enzimas permaneceram estáveis numa ampla faixa de pH. A atividade β -xilosidásica foi mais estável em pH ácido, mantendo quase 100 % da atividade na faixa de 1,6 a 5,5, e em valores de pH maiores a atividade caiu 40 %. A faixa de estabilidade apresentada por *P. janczewskii* é diferente daquela apresentada por *P. wortmanni*, cuja β -xilosidase foi mais estável na faixa de pH entre 5,0 e 7,0 (DELEYN et al., 1978).

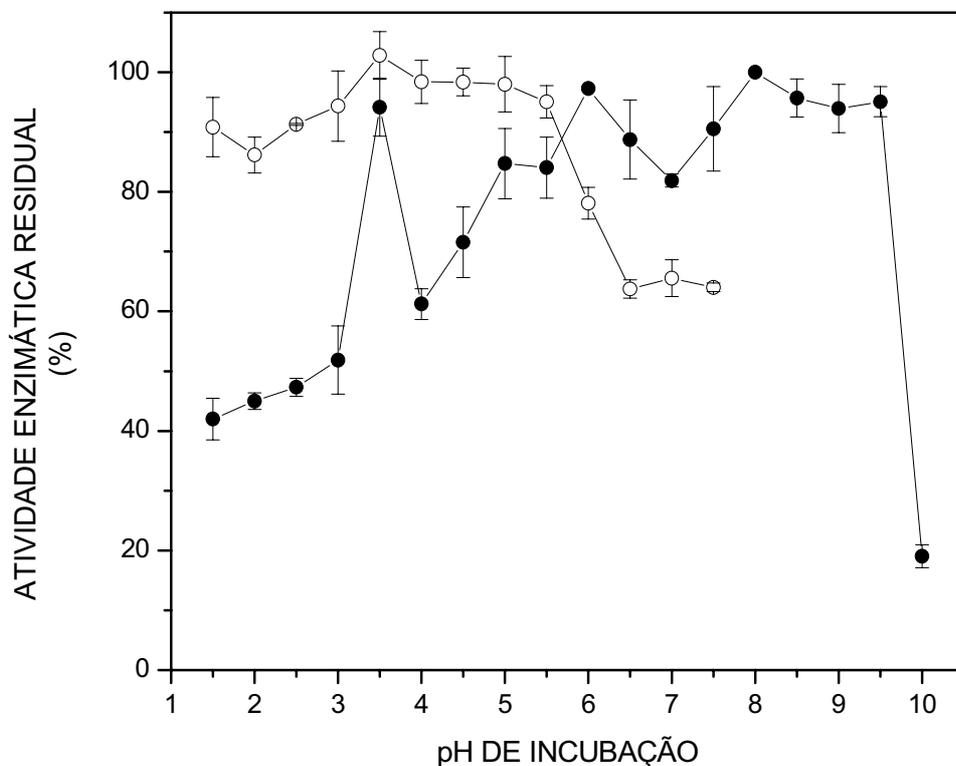


Figura 14 – Estabilidade das atividades xilanásica e β -xilosidásica de *P. janczewskii* em diferentes pHs. O filtrado de cultura foi incubado com os tampões: Sorensen nas regiões de 1,6 a 3,5 e de 9,0 a 10,0; acetato de sódio 50 mM de 4,0 a 5,5; imidazol 50 mM de 6,0 a 7,0; Tris-HCl 50 mM de 7,0 a 9,0, e as reações foram realizadas a 50 °C em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 para determinação da atividade xilanásica; e glicina-HCl 50mM de 1,6 a 3,0; Mcllvaine de 3,0 a 7,5, e as reações foram realizadas a 75 °C em tampão Mcllvaine pH 4,0 para determinação da atividade β -xilosidásica. (●) Atividade xilanásica residual; (○) atividade β -xilosidásica residual.

De um modo geral a atividade xilanásica foi mais estável em pH alcalino, apresentando picos de alta estabilidade nos pHs 3,5, 6,0 e 8,0. Em pHs mais ácidos ela permaneceu com 40 % da atividade máxima. A maior estabilidade da atividade xilanásica em pH alcalino indica potencial aplicabilidade em alguns processos industriais, que requerem essa condição.

Milagres et al. (1993) verificaram até 80 % da estabilidade na atividade xilanólítica de *P. janthinellum*, na faixa de pH 5,0 a 6,5, sendo que a atividade diminuía abruptamente em valores que se afastaram desse intervalo.

A estabilidade térmica é um aspecto muito importante nos processos enzimáticos, e a utilização de enzimas em processos industriais, muitas vezes fica impossibilitada por problemas de inativação térmica. Para avaliação da estabilidade térmica das enzimas produzidas por *P. janczewskii*, o filtrado de cultura foi incubado nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C, para a xilanase, e a 50, 65 e 75 °C para a β -xilosidase.

Conforme pode ser observado na **Figura 15**, o aumento da temperatura causou desnaturação das proteínas, fazendo com que as enzimas perdessem sua atividade.

A atividade xilanásica foi mais estável a 40 °C com T_{50} estimado de 183 min. A 50 °C o T_{50} foi de 15 min, sendo que após 190 min de incubação restava pouco menos de 40 % da atividade inicial. A 60 °C o T_{50} foi de 2,8 min, sendo que com 5 min de incubação restava apenas 10 % da atividade e, decorridos 10 min, a atividade estava próxima de 5 % (**Fig. 15a**). Li et al. (2007) relataram que a xilanase de *P. oxalicun* reteve aproximadamente 80 % da atividade após 1 h de incubação a 50 e 55 °C. Belancic et al. (1995) reportaram que as xilanases de *P. purpurogenum* perderam aproximadamente 40 % da atividade quando incubadas por 3 h a 60 °C. Sinitsyna et al. (2003) observaram propriedades semelhantes para as xilanases de *P. canescens*. Durand et al. (1984) relataram meia vida de 0,8 h para a xilanase de uma linhagem de *Penicillium* incubada a 60 °C.

A atividade β -xilosidásica apresentou-se mais estável a 50 °C com T_{50} estimado em 144 min. A 65 °C apresentou T_{50} de 7,6 min, sendo que após

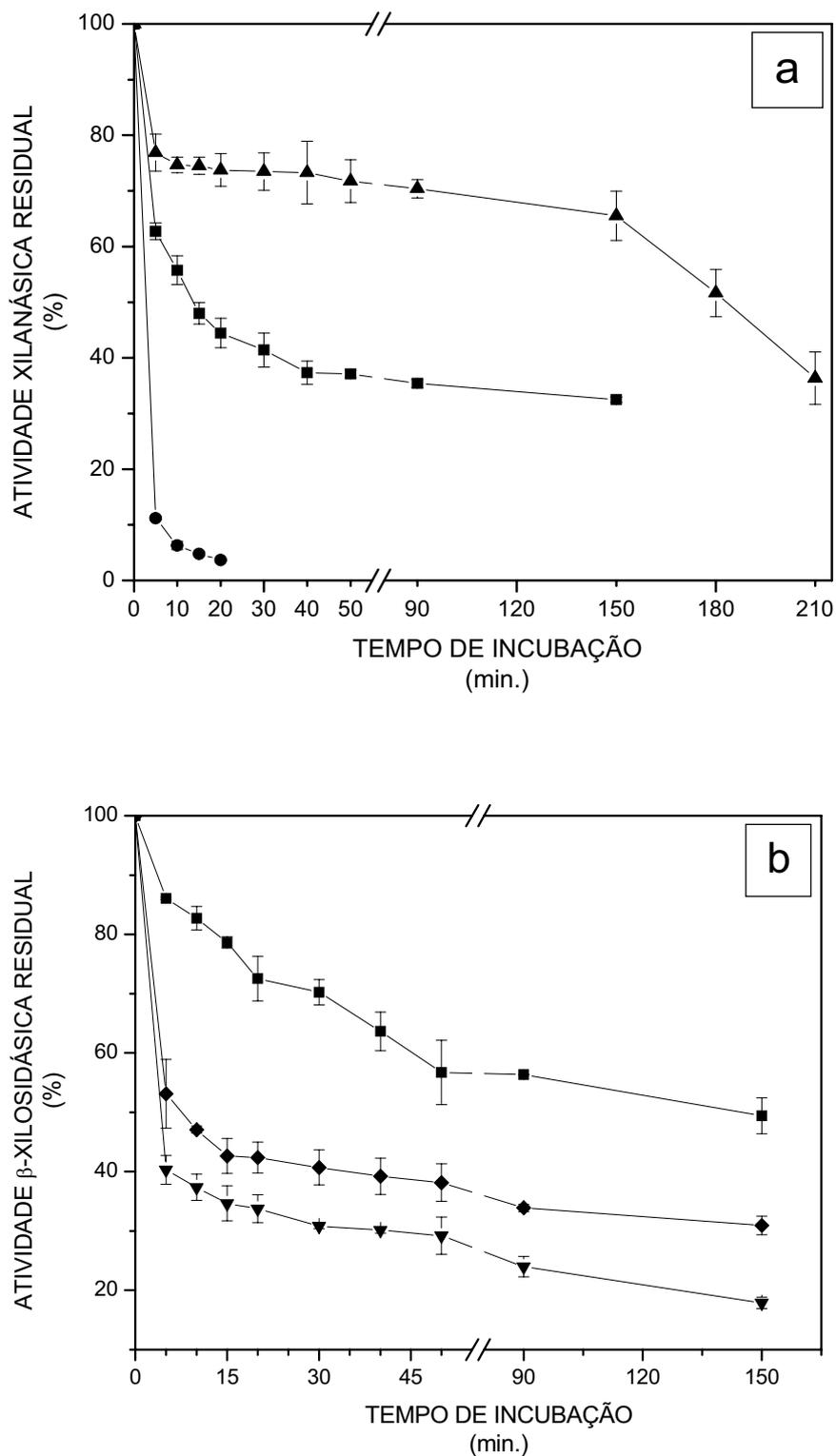


Figura 15 - Termoestabilidade das atividades xilanásica **(a)** e β -xilósídásica **(b)** de *P. janczewskii*. A reação foi realizada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 e a 50 °C para determinação da atividade xilanásica e em tampão de Mcllvaine, pH 4,0 e a 75 °C para determinação da atividade xilósídásica. Incubação realizada a (▲) 40, (■) 50, (●) 60, (◆) 65, (▼) 75 °C.

190 min restava pouco mais de 30 % da atividade inicial. A 75 °C o T_{50} foi 4,2 min e transcorridos 190 min restava menos de 20 % da atividade inicial (Fig. 15b). Durand et al. (1984) relataram meia vida de 0,6 h para a β -xilosidase de uma linhagem de *Penicillium* incubada a 60 °C.

Comparando as termoestabilidades a 50 °C, pode-se verificar que a β -xilosidase é menos susceptível à desnaturação pelo calor, apresentando um T_{50} aproximadamente 10 vezes maior que o da xilanase.

Estas propriedades enzimáticas, verificadas no extrato bruto de cultura indicam uma possível aplicação nos processos que requerem temperaturas moderadas como na panificação e na indústria cervejeira. Pode-se, ainda aumentar a termoestabilidade dessas enzimas pela utilização de substâncias termoprotetoras, pela imobilização enzimática ou por modificação na estrutura primária via mutagênese sítio dirigida (SRIPRANG et al., 2006; KUMAR et al., 2000).

3.6 Efeito de substâncias sobre as atividades xilanase e β -xilosidase de *Penicillium janczewskii*

Várias substâncias tiveram seu efeito testado sobre as atividades enzimáticas, como pode ser observado a partir dos resultados de atividade relativa dispostos na **Tabela 4**.

Em relação à xilanase, β -mercaptoetanol e DTT estimularam a atividade, o que pode ser explicado pela prevenção da oxidação dos grupos sulfidrila na presença desses agentes, ou pela redução de pontes dissulfeto formadas, restaurando a conformação nativa da enzima, ou de alguma região específica do sítio catalítico. Esse efeito do DTT foi também observado para as xilanases I e II de *A. giganteus* (FIALHO e CARMONA, 2004), para as xilanases A e B de *P. capsulatum* (FILHO et al., 1993) e para a xilanase C de *P. capsulatum* (RYAN et al., 2003), mas não foi verificado para a xilanase de *P. corylophilum* (MEDEIROS et al., 2003).

O íon Hg^{2+} e SDS a 10 mM inibiram completamente a atividade xilanolítica. O íons Cu^{2+} , Pb^{2+} e PMSF apresentaram moderado efeito inibitório

na concentração de 2 mM e um efeito mais acentuado a 10 mM. Co^{2+} e EDTA apresentaram leve efeito inibitório a 2 e 10 mM. Ademais, Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , Na^+ , Mg^{2+} e citrato mostraram algum efeito inibidor somente na concentração de 10 mM.

A inibição por Hg^{2+} parece ser uma propriedade geral das xilanases, o que sugere a presença de grupos tiol de cisteína no ou próximo do sítio ativo da enzima (BASTAWDE, 1992), e foi observada em *P. capsulatum* (RYAN et al., 2003), *Penicillium* sp AHT-1 (SHOFIQR RAHMAN et al. 2003) e *P. citrinum* (DUTTA et al., 2006). Shofiqur Rahman et al. (2003) observaram que EDTA não possui efeito na atividade xilanásica de *Penicillium* sp AHT-1.

Com relação à β -xilosidase, apenas Ca^{2+} se apresentou como ativador desta atividade. A ativação foi crescente com o aumento da concentração da substância, sugerindo a necessidade desse cátion para a atividade dessa enzima. Todos os demais íons e substâncias avaliadas inibiram, em diferentes graus, a atividade enzimática: os íons Ba^{2+} , Mg^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , além de DTT e PMSF a 2 mM foram fracos a moderados inibidores desta enzima reduzindo sua atividade em não mais que 40 %, enquanto os íons Cu^{2+} , NH_4^+ , citrato, Zn^{2+} , Na^+ e Co^{2+} , além de EDTA, β -mercaptoetanol e PMSF na concentração de 10 mM se mostraram inibidores de moderados a fortes, reduzindo a atividade em 50 % ou mais. SDS, contudo, apresentou forte inibição tanto a 2 quanto a 10 mM.

Matsuo et al. (1987) observaram forte efeito inibidor das 4 β -xilosidases purificadas de *P. wortmanni* IFO 7237 por Hg^+ , enquanto Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} e SDS não influenciaram essa atividade enzimática, e Mn^{2+} apresentou apenas algum efeito ativador.

O efeito dos íons e substâncias não é o mesmo entre essas duas enzimas: enquanto Hg^{2+} age como inibidor total da atividade xilanásica, ele age apenas como fraco inibidor da atividade β -xilosidásica; β -mercaptoetanol age como estimulante da atividade xilanásica, porém para a atividade β -xilosidásica ele age como forte inibidor; Ca^{2+} atuou ativando a atividade da β -xilosidase e inibindo a xilanase.

A inibição de ambas as atividades por SDS indica a importância das interações hidrofóbicas para manutenção de suas estruturas tridimensionais.

A inibição verificada com EDTA sugere que, tanto a xilanase quanto a β -xilosidase devem requerer algum íon metálico como cofator. Para as 2 β -xilosidases purificadas (S1 e S2) de *P. herquei*, Ito et al. (2003) observaram que S2 era inibida em 30 %, enquanto S1 não era inibida por esse quelante.

Tabela 4 - Efeito de diferentes substâncias sobre as atividades xilanásica e β -xilosidásica de *P. janczewskii*.

Substância	Atividade xilanase relativa (%)		Atividade β -xilosidase relativa (%)	
	Concentração		Concentração	
	2 mM	10 mM	2 mM	10 mM
Controle	100,0	100,0	100,0	100,0
CuCl ₂	71,0 ± 6,1	12,4 ± 1,9	28,6 ± 1,1	26,4 ± 1,7
ZnSO ₄	96,1 ± 2,5	84,7 ± 4,0	50,2 ± 1,4	32,9 ± 0,0
MnSO ₄	95,8 ± 1,4	77,1 ± 4,3	58,6 ± 0,6	48,3 ± 0,9
BaCl ₂	100,7 ± 3,2	105,5 ± 6,1	64,5 ± 4,1	79,6 ± 1,1
CaCl ₂	99,4 ± 3,7	76,8 ± 3,9	106,3 ± 2,1	117,2 ± 1,5
NH ₄ Cl	98,4 ± 1,5	73,7 ± 6,4	28,8 ± 3,7	26,1 ± 1,8
NaCl	94,8 ± 3,2	89,2 ± 3,5	54,3 ± 0,7	54,2 ± 1,0
MgSO ₄	93,5 ± 6,0	82,2 ± 5,4	96,9 ± 1,2	80,5 ± 2,0
Citrato de sódio	93,4 ± 4,2	78,4 ± 3,8	26,7 ± 2,0	19,9 ± 1,6
CoCl ₂	89,6 ± 1,3	76,0 ± 2,8	49,8 ± 1,8	46,6 ± 2,7
HgCl ₂	ND	ND	85,0 ± 1,2	70,4 ± 3,0
Pb(CH ₃ COO) ₂	83,7 ± 5,2	49,9 ± 3,4	63,4 ± 4,6	60,9 ± 0,9
EDTA	80,7 ± 5,4	70,3 ± 2,0	43,2 ± 0,9	36,6 ± 0,9
SDS	26,0 ± 3,3	ND	5,6 ± 0,2	ND
PMSF	79,0 ± 1,6	52,8 ± 7,9	61,0 ± 5,4	22,5 ± 0,4
DTT	95,1 ± 8,1	123,7 ± 2,4	90,4 ± 3,3	75,9 ± 2,7
β -mercaptoetanol	126,0 ± 4,0	127,8 ± 2,4	32,6 ± 0,1	33,8 ± 1,3

A reação foi realizada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 e a 50 °C, para determinação da atividade xilanásica e em tampão de McIlvaine, pH 4,0 e a 75 °C, para determinação da atividade β -xilosidásica. ND, não detectada.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da produção de xilanases e β -xilosidases pelo fungo *Penicillium janczewskii* foi importante pela otimização da produção dessas enzimas e determinação de suas características no filtrado de cultura em um microrganismo ainda não estudado. Ademais, estes estudos oferecem subsídios para trabalhos posteriores de purificação e caracterização dessas enzimas.

Penicillium janczewskii mostrou-se um bom produtor de xilanases e β -xilosidases livres ou com baixos níveis de celulases, característica importante em alguns processos industriais. A β -xilosidase produzida pelo fungo foi encontrada tanto extra, quanto intracelularmente, o que possibilita o estudo comparativo destas enzimas.

A fonte de carbono que induziu maiores atividades xilanolíticas foi xilana de aveia. Em cultivo estacionário, as melhores condições para produção de xilanases, em meio líquido de Vogel, foram 7 dias de cultivo, em pH 6,5 e 30

°C, e para a produção de β -xilosidases extracelulares foram 8 dias de cultivo, em pH 5,0 e 25 °C.

A atividade xilanásica do filtrado de cultura apresentou temperatura ótima de 50 °C, pH ótimo de 6,5 e meias-vidas de 183, 15, 2,8 min, a 40, 50 e 60 °C, respectivamente. Já, a β -xilosidase bruta apresentou temperatura ótima de 75 °C, pH ótimo de 4,0, e valores de T_{50} a 50, 65 e 75 °C de 144, 7,6 e 4,2 min, respectivamente. A temperatura ótima de atividade xilanásica é semelhante àquelas normalmente encontradas na literatura para xilanases de outras espécies de *Penicillium*, entretanto, a temperatura ótima da β -xilosidase foi bastante elevada, sendo, aparentemente o primeiro relato de tal valor para uma enzima de *Penicillium*, considerando seu caráter mesofílico. As estabilidades térmicas indicam que essas enzimas podem ser aplicadas em processos nos quais temperaturas moderadas são utilizadas, como em algumas indústrias alimentícias, em cervejaria e na panificação. Contudo, a elevada temperatura ótima e estabilidade térmica da β -xilosidase permitem sua aplicação em processos que requeiram temperaturas mais altas.

A atividade β -xilosidásica mostrou-se mais estável em pHs ácidos na faixa que variou de 1,6 a 5,5, enquanto que a atividade xilanásica mostrou-se mais estável em pHs entre 6,0 e 9,5.

DTT e β -mercaptoetanol mostraram-se estimuladores da atividade xilanásica, o que indica a importância de resíduos de cisteína para sua atividade, sendo que o íon Ca^{2+} mostrou-se ativador da atividade β -xilosidásica, sugerindo uma possível necessidade deste íon como cofator. Hg^{2+} inibiu completamente a atividade da xilanase e SDS foi forte inibidor de ambas as atividades enzimáticas.

5 REFERÊNCIAS

ABDEL-SATER, M. A.; EL-SAID, A. H. M. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, Barking, v. 47, p. 15-21, 2001.

ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SHAIKH, H.; SINGH, R.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 62, p. 6-10, 2005.

ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. Polyssaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 57, p. 67-72, 2004.

ANDRADE, S. V.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. Effect of carbon source on the biochemical properties of β -xylosidases produced by *Aspergillus versicolor*. **Process Biochem.**, London, 39, p. 1931-1938, 2004.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, N. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 29, p. 719-739, 2005.

- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay xylanase activity. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 23, p. 257-270, 1992.
- BAILEY, J. B.; POUTANEN, K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 30, p. 5-10, 1989.
- BAJPAI, P. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. **Adv. Appl. Microbiol.**, San Diego, v. 43, p. 141-189, 1997.
- BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Oxford, v. 8, p. 353-368, 1992.
- BALL, A. S.; MCCARTHY, A. J. Production and properties of xylanases from actinomycetes. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 66, p. 439-444, 1989.
- BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; SEWALT, V. J. H. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Can. J. Anim. Sci.**, Ottawa, v. 75, p. 641-644, 1995.
- BELANCIC A.; SCARPA, J.; PEIRANO, A.; DIAZ, R.; STEINER, J.; EYZAYUIRRE, J. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 41, p. 71-79, 1995.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 56, p. 326-338, 2001.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotech. Adv.**, New York, v. 18, p. 355-383, 2000.
- BIELY, P. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases, In: COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. (Coord.). **Hemicelluloses and Hemicellulases**, London: Portland Press, 1993, p. 29-51.
- BIELY, P. Diversity of microbial endo- β -1,4-xylanases. In: MANSFIELD, S. D.; SADDLER, J. N. (Ed.). **Applications of enzymes to lignocellulosics**. Oxford: Oxford University Press, 2003, p. 361-380.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v. 3, p. 286-290, 1985.
- BIELY, P. Xylanolytic enzymes. In: WHITAKER, J. R., VORAGEN, A. G. J., WONG, D. W. S. (Eds.) **Handbook of Food Enzymology**, New York: Marcel Dekker, 2003, p. 879-916.

- BRADNER, J. R.; SIDHU, R. K.; GILLINGS, M.; NEVALEIN, K. M. H. Hemicellulase activity of Antarctic microfungi. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 87, p. 366-370, 1999.
- BROWN, J. A.; COLLIN, S. A.; WOOD, T. M. Development of a medium for high cellulase, xylanase and β -glucosidase production by a mutant strain (NTG III/6) of the cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum*. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v. 9, p. 355-360, 1987.
- CARMONA E. C.; FIALHO, M. B.; BUCHGNANI, E. B.; COELHO, G. D.; BROCHETO-BRAGA, M. R.; JORGE, J. A. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Process Biochem.**, London, v. 40, p. 359-364, 2005.
- CARMONA, E. C.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; MONTEIRO, R. T. R.; JORGE, J. A. Xylanase production by *Aspergillus versicolor*. **J. Basic Microbiol.**, Berlin, v. 37, p. 387-394, 1997.
- CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 123, n. 4, p. 413-433, 2006.
- CHRISTOV, L. P.; SZAKACS, G.; RELE, M. V.; BALKRISHNAN, H. Screening of cellulose-free and evaluation of their performance on sulfite dissolving pulp. **Biotechnol. Tech.**, Kew, v. 13, p. 313-316, 1999.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 29, p. 3-23, 2005.
- COUGHLAN, M. P.; TUOHY, M. G.; FILHO, E. X. F.; PULS, J.; CLAEYSSSENS, M.; VRSANSKÁ, M.; HUGHES, M. M. Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems, In: COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. (Coord.). **Hemicelluloses and Hemicellulases**, London: Portland Press, 1993, p. 29-51.
- CUROTTO, E.; CONCHA, M.; CAMPOS, V.; MILAGRES, A. M. F.; DURAN, N. Production of extracellular xylanases by *Penicillium janthinellum*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Clifton, v. 48, p. 107-116, 1994.
- DARLING, D. **Internet Encyclopedia of Science**. Disponível em: <<http://daviddarling.info/encyclopedia/C/cellwall.html>>. Acesso em: 3 set. 2007, 14:06:30.
- DELEYN, F.; CLAEYSSSENS, M.; van BEEUMEN, J.; BRUYNE, C. K. Purification and properties of β -xylosidase from *Penicillium wortmanni*. **Can. J. Biochem.**, Ottawa, v. 56, p. 43-50, 1978.

- de VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, New York, v. 65, n. 4, p. 497-522, 2001.
- DEKKER, R. F. H.; RICHARDS, G. N. Hemicellulases, their occurrence, purification, properties and mode of action. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, New York, v. 32, p. 277-352, 1976.
- DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v. 18, p. 26-31, 2000.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, 1993, v. 1, 859 p.
- DURAND, H.; SOUCAILLE, P.; TIRABY, G. Comparative study of cellulases and hemicellulases from four fungi: mesophiles *Trichoderma reesei* and *Penicillium* sp. and thermophiles *Thielavia terrestris* and *Sporotrichum cellulophilum*. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v. 6, p. 175-180, 1984.
- DUTTA, T.; SENGUPTA, R.; SAHOO, R.; SINHA RAY, S.; BHATTACHARJEE, A.; GOSH, S. A novel cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citrinum*: production, purification and characterization. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 44, p. 206-211, 2007.
- EBRINGEROVÁ, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromol. Rapid Commun.**, Basel, v. 21, p. 542-556, 2000.
- FIALHO, M. B.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Aspergillus giganteus*. **Folia Microbiol.**, Praha, v. 49, n. 1, p. 13-18, 2004.
- FILHO, E. X. F.; PULS, J.; COUGHLAN, M. P. Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. **J. Ind. Microbiol.**, Amsterdam, v. 11, p. 171-180, 1993.
- FUNAGUMA, T.; NAITO, S.; MORITA, M.; OKUMURA, M.; SUGIURA, M.; HARA, A. Purification and some properties of xylanase from *Penicillium herquei* Banier and Sartory. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v. 55, n. 4, p. 1163-1165, 1991.
- FURNISS, C. S. M.; WILLIAMSON, G.; KROON, P. A. The substrate specificity and susceptibility to wheat inhibitor proteins of *Penicillium funiculosum* xylanases from a commercial enzyme preparation. **J. Sci. Food Agric.**, London, v. 85, p. 574-582, 2005.
- GAMS, W.; van der AA, H. A.; van der PLAATS-N ITERINK, A. J.; SAMSON, R. A.; STALPERS, J. A. **CBS Cause of Mycology**. 3. ed. Baarn: Centraalbureau voor Schimmeltcultures, 1987, 136 p.

- GASPAR, A.; COSSON, T.; ROQUES, C.; THONART, P. H. Study on the production of a xylanolytic complex from *Penicillium canescens* 10-10c. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Clifton, v. 67, p. 45-58, 1997.
- GHATORA, S. K.; CHADHA, B. S.; BADHAN, A. K.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Identification and characterization of diverse xylanases from thermophilic and thermotolerant fungi. **BioRes.**, Raleigh, v. 1, n. 1, p.18-33, 2006.
- GILBERT, H. J.; HAZLEWOOD, G. P. Bacterial cellulases and xylanases. **J. Gen. Microbiol.**, London, v. 139, p.187-194, 1993.
- GUIMARÃES, L.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C.; POLIZELI, M. L. T. M. Effect of carbon source on alkaline phosphatase production and excretion in *Aspergillus caespitosus*. **J. Basic Microbiol.**, Berlin, v. 43, n. 3, p. 210-217, 2003.
- HAAS, H.; HERFURTH, E.; STÖFFLER, G.; REDL, B. Purification, characterization and partial amino acid sequences of a xylanase produced by *Penicillium chrysogenum*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1117, p. 279-286, 1992.
- HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresour. Technol.**, Essex, v. 58, p. 137-161, 1996.
- HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN van RENSBURG, E. L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African J. Biotechnol.**, Nairobi, v. 12, n. 2, p. 602-619, 2003.
- ITO, T.; YOKOYAMA, E.; SATO, H.; UJITA, M.; FUNAGUMA, T.; FURUKAWA, K.; HARA, A. Xylosidases associated with the cell surface of *Penicillium herquei* IFO 4674. **J. Biosci. Bioeng.**, Osaka, v. 96, n. 4, p. 354-359, 2003.
- JØRGENSEN, H.; ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F.; OLSSON, L. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v. 32, p. 851-861, 2003.
- JØRGENSEN, H.; MØRKEBERG, A.; KROGH, K. B. R.; OLSSON, L. Growth and enzyme production by three *Penicillium* species on monossacharides. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 109, p. 295-299, 2004.
- JØRGENSEN, H.; MØRKEBERG, A.; KROGH, K. B. R.; OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v. 36, p. 42-48, 2005.

-
- KERSTERS-HILDERSON, H.; CLAEYSSSENS, M.; DOORSLAER, E. V.; SNA, E.; BRUYNE, C. K. β -D-xylosidase from *Bacillus pumilus*. **Methods Enzymol.**, New York, v. 83, p. 631-639, 1982.
- KIMURA, T.; ITO, J., KAWANO, A.; MAKINO, T.; KONDO, H.; KARITA, S.; SAKKA, K.; OHMIYA, K. Purification, characterization, and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium* sp.40. **Biosci., Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v. 64, n. 6, p. 1230-1237, 2000.
- KROGH, K. B. R.; MØRKEBERG, A.; JØRGENSEN, H.; FRISVAD, J. C.; OLSSON L. Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Clifton, v. 113-116, p. 389-401, 2004.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 23, p. 411-456, 1999.
- KUMAR, S.; TSAI, C. J. NUSSINOV, R. Factor enhancing protein thermostability. **Protein Eng.**, Oxford, v. 13, p. 179-191, 2000.
- LENARTOVICZ, V.; SOUZA, C. G. M.; MOREIRA, F. G.; PERALTA, R. M. Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable β -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochem.**, London, v. 38, p. 1775-1780, 2003.
- LI, Y; LIU, Z.; ZHAO, H.; XU, Y.; CUI, F. Statistical optimization of xylanase production from new isolated *Penicillium oxalicum* ZH-30 in submerged fermentation. **Biochem. Eng. J.**, Amsterdam, v. 34, p. 82-86, 2007.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the Follin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MADI, L.; KATAN, J. *Penicillium janczewskii* and its metabolites, applied to leaves, elicit systemic acquired resistance to stem rot caused by *Rhizoctonia solani*. **Phys. Mol. Plant Pathol**, London, v. 53, n. 3, p.163-175, 1998.
- MATSUO, M.; FUJIE, A.; WIN, M.; YASU, T. Four types of β -xylosidases from *Penicillium wortmanni* IFO 7237. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v. 51, n. 9, p. 2367-2379, 1987.
- MEDEIROS, R. G.; HANADA, R.; FILHO, E. X. F. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon Forest fungal species. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, Barking, v. 52, p. 97-100, 2003.

- MILAGRES, A. M. F.; LACIS, L. S. Efficient screening of process variables in *Penicillium janthinellum* fermentations. **Biotechnol. Lett.**, Dordrecht, v. 13, n. 2, p. 113-118, 1991.
- MILAGRES, A. M. F.; LACIS, L. S.; PRADE, R. A. Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum*. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v. 15, p. 248-253, 1993.
- MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, Washington, v. 31, p. 426-429, 1959.
- MISHRA, C.; SEETA, R.; RAO, M. Production of xylanolytic enzymes in association with the cellulolytic activities of *Penicillium funiculosum*. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v. 7, p. 295-299, 1985.
- MOURE, A.; GULLÓN, P.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochem.**, London, 41, p. 1913-1923, 2006.
- OLIVEIRA, L. A.; PORTO, A. L. F.; TAMBOURGI, E. B. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. **Bioresour. Technol.**, Essex, v. 97, p. 862-867, 2005.
- PALMA, M. B.; MILAGRES, A. M. F.; PRATA, A. M. R.; MANCILHA, I. M. Influence of aeration and agitation on the xylanase activity from *Penicillium janthinellum*. **Process Biochem.**, London, v. 31, p. 141-145, 1996.
- PANAGIOTOU, G.; FRANOUILLET, P.; OLSSON, L. Production and partial characterization of arabinoxylan-degrading enzymes by *Penicillium brasilianum* under solid-state fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 72, p. 1117-1124, 2006.
- PEDERSEN, M.; LAURITZEN, H. K.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S. Identification of thermostable β -xylosidase by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Lett.**, Dordrecht, v. 29, p. 743-749, 2007.
- PESSONI, R. A. B.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; BRAGA, M. R. Extracellular inulinases from *Penicillium janczewskii*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbaceae* (Asteraceae). **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 87, p. 141-147, 1999.
- PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. 3. ed. North Ryde: Food Science Australia, 2000, 62 p.
- POLIZELI, M. L. T.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TEREZI, H. F.; JORGE, H. F.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 67, p. 577-591, 2005.

- PRADE, R. A. Xylanases: from biology to biotechnology. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.**, New Castle, v. 13, p. 101-131, 1995.
- QUERIDO, A. L. S.; COELHO, J. L. C.; ARAÚJO, E. F.; CHAVES-ALVES, V. M. Partial purification of xylanase produced by *Penicillium expansum*. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, Curitiba, v. 49, n. 3, p. 475-480, 2006.
- REESE, E. T.; MAGUIRE, A.; PARRISH, F. W.; Production of β -D-xylopiranosidases by fungi. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 19, p. 1065-1074, 1973.
- REILLY, P. J. Xylanases: Structure and function. **Basic Life Sci.**, New York, v. 18, p. 111-129, 1981.
- RIZZATTI, A. C. S.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** Hampshire, v. 26, p. 156-160, 2001.
- RODRIGUES, E. C. **Caracterização citogenética e bioquímica do fungo celulolítico *Humicola* sp.** 1987. _f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1987.
- RODIONOVA, N. A.; GORBACHEVA, I. V.; BUIVID, V. A. Fractionation and purification of endo-1,4- β -xylanases and exo-1,4- β -xylosidases of *Aspergillus niger*. **Biochem.**, Moscow, v. 42, p. 505-516, 1977.
- RUEGGER, M. J. S. **Atividade enzimática e produção de ácido γ -linoleico por fungos filamentosos isolados do solo da Região do Banhado Grande, na Estação Ecológica Juréia-Itatins.** 2001. 82 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.
- RUIZ-ARRIBAS A.; FERNANDEZ-ABALOS J. M.; SANCHEZ P.; GARDA A. L.; SANTAMARIA R. I. Overproduction, purification, and biochemical characterization of a xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 61, n. 6, p. 2414-2419, 1995.
- RYAN, S.E.; NOLAN, K.; THOMPSON, R.; GUBITZ, G.M.; SAVAGE, A.V.; TUOHY, M.G. Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v. 33, p. 775-785, 2003.
- SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, Hampshire, v. 30, p. 279-291, 2003.
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v. 6, p. 219-228, 2003.

SHOFIQR RAHMAN, A. K. M. S.; SUGITANI, N.; HATSU, M.; TAKAMIZAWA, K. A role of xylanase, α -L-arabinofuranosidase, and xylosidase in xylan degradation. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 49, p. 58-64, 2003.

SINGH, N. Effect of pH on the tolerance of *Penicillium nigricans* to copper and other heavy metals. **Mycologia**, New York, v. 69, p. 750-755, 1977.

SINITSYNA, O. A.; GUSAKOV, A. V.; OKUNEV, O. N.; SEREBRYANY, V. A.; SEREBRYANI, E. A.; VINETSKI, Y. P., SINITSYNA, A. P. Recombinant endo- β -1,4-xylanase from *Penicillium canescens*. **Biochem.**, Moscow, v. 68, p. 1631-1638, 2003.

SOLOV'EVA, I. V.; OKUNEV, O. N.; VEL'KOV, V. V.; KOSHLEV, A. V.; BUBNOVA, T. V.; KONDRAT'EVA, E. G.; SKOMAROVSKII, A. A.; SINITSYN, A. P. The selection and properties of *Penicillium verruculosum* mutants with enhanced production of cellulases and xylanases. **Microbiol.**, Moscow, v. 74, n. 2, p. 141-146, 2005.

SRIPRANG, R.; ASANO, K.; GOBSUK, J.; TANPONGPIPAT, S.; CHAMPREDA, V.; EURWILAICHITR, L. Improvement of thermostability of fungal xylanase by using site-directed mutagenesis. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 126, p. 454-462, 2006.

STEINER, J.; CARMONA, P.; PONCE, C.; BERTI, M.; EYZAGUIRRE, J. Isolation of mutants of *Penicillium purpurogenum* with enhanced xylanase and β -xylosidase production. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Oxford, v. 14, p. 589-590, 1998.

STEINER, W.; LAFFERTY, R. M.; GOMES, I.; ESTERBAUER, H. Studies on wild type strains *Schizophyllum commune*: cellulase and xylanase production and formation of the extracellular polysaccharide Schizophyllan. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v. 30, p. 169-178, 1987.

STEINER, J.; SOCHA, C.; EYZAGUIRRE, J. Culture conditions for enhanced cellulase production by a native strain of *Penicillium purpurogenum*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Oxford, v. 10, p. 280-284, 1994.

STROH, W. H. Industrial enzymes market. **Genet. Eng. News**, New York, v. 18, p. 11-38, 1998.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Crit. Rev. Biotechnol.**, Boca Raton, v. 22, n. 1, p. 33-64, 2002.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.**, Boca Raton, v. 17 n. 1, p. 39-67, 1997.

- SZAKACS, G.; TENGEDY, R. P. Lignocellulytic enzyme production on pretreated poplar wood by filamentous fungi. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Oxford, v. 13, p. 487-490, 1997.
- TANAKA, H.; NAKAMURA, T.; HAYASHI, S.; OHTA, K. Purification and properties of an extracellular endo-1,4- β -xylanase from *Penicillium citrinum* and characterization of the encoding gene. **J. Biosci. Bioeng.**, Osaka, v. 100, n. 6, p. 623-630, 2005.
- TAUK-TORNISIELO, S. M.; GARLIPP, A.; RUEGGER, M.; ATTILI, D. S.; MALAGUTTI, E. Soilborne filamentous fungi in Brazil. **J. Basic Microbiol.**, Berlin, v. 45, n. 1, p. 72-82, 2005.
- TECHAPUN, C.; POOSARAN, N.; WATANABE, M.; SASAKI, K. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulose-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching process: a review. **Process Biochem.**, London, v. 38, p. 1327-1340, 2003.
- THYGESEN, A.; THOMSEN, A. B.; SHCMIDT, A. S.; JØRGENSEN, H.; AHRING, B. K.; OLSSON, L. Production of cellulose and hemicellulose-degrading enzymes by filamentous fungi cultivated on wet-oxidised wheat straw. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v. 32, p. 606-615, 2003.
- UFFEN, R. L. Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, Hampshire, v. 19, p. 1-6, 1997.
- VAVILOVA E. A.; ANTONOVA, S. V.; BARSUKOV, E. D.; VINETSKII, Y. P. Mechanism of overproduction of secreted enzymes in the mycelial fungus *Penicillium canescens*. **Appl. Biochem. Microbiol.**, Berlin, v. 39, p. 249-256, 2003.
- VAVILOVA, E.A.; VINETSKII, Y.P. Induction of the synthesis of endo-1,4- β -xylanase and β -galactosidase in original and recombinant strains of the fungus *Penicillium canescens*. **Appl. Biochem. Microbiol.**, Berlin, v. 39, p. 147-151, 2003.
- VIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 13, p. 335-350, 1994.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microb. Genet. Bull.**, Columbus, v. 13, p. 42-43, 1956.
- ZANOELO, F. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; TEREZI, H. F.; JORGE, J. A. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, Hampshire, v. 31, p. 170-176, 2004.

ZHAO, J.; LI, X.; QU, Y. Application of enzymes in producing bleached pulp from wheat straw. **Bioresour. Technol.**, Essex, v. 97, p. 1470-1476, 2006.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiol. Rev.**, Oxford, v. 52, p. 305-317, 1988.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N.; YAGUCHI, M. Purification of a third distinct xylanase from the xylanolytic system of *Trichoderma harzianum*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 32, p. 570-576, 1986.

WOODWARD, J. Xylanases: functions, properties and applications. **Top. Enzyme Ferment. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 8, p. 9-30, 1984.