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

XILANASES, β -XILOSIDASES DE *Penicillium janczewskii*:
PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NO
BRANQUEAMENTO DA POLPA CELULÓSICA
E PARA RAÇÃO ANIMAL

CÉSAR RAFAEL FANCHINI TERRASAN

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

Julho - 2011

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

XILANASES, β -XILOSIDASES DE *Penicillium janczewskii*:
PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NO
BRANQUEAMENTO DA POLPA CELULÓSICA
E PARA RAÇÃO ANIMAL

CÉSAR RAFAEL FANCHINI TERRASAN

Orientadora: PROFA. DRA. ELEONORA CANO CARMONA

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

Rio Claro

2011

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

AGRADECIMENTOS

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

À Profa. Dra. Sâmia M. Tauk-Tornisielo pela doação do micro-organismo estudado.

À Carmem Silvia Casonato de Souza pela assistência técnica e também aos demais técnicos do Departamento de Bioquímica Microbiologia.

À cervejaria Baungartner pela doação do bagaço de malte, e à Ariane C. D. Bertoletti pela ajuda na obtenção deste resíduo.

Ao professor Dr. Eduardo Cilli do Departamento de Química da UNESP de Araraquara pela contribuição na análise de aminoácidos.

Ao professor Dr. Francides Gomes da Silva Júnior pela contribuição nas análises de bio-branqueamento da polpa.

À Dra. Aline Zorzetto L. Gonçalves pela contribuição nas análises do material fermentado e discussão dos resultados.

Aos amigos de jornada no laboratório de Bioquímica de Micro-organismos Adriana Knob, Alex Fernando de Almeida, Danielle Bísaro Pedrolli, Beatriz Temer, Cárol Terrone, Diogo, Thabatha e Daniela Turati, por toda a ajuda, pelos ensinamentos e pelo agradável convívio diário.

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

A todos os amigos que aqui não cito, mas que me acompanham e são essenciais na minha vida.

Aos coordenadores do Programa de pós-graduação em Microbiologia Aplicada Profa. Dra. Sandra Mara Martins Franchetti e Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca.

Aos representantes discentes do Programa de pós-graduação em Microbiologia Aplicada Roberta de Barros Lovaglio, Paulo Renato Matos Lopes e Kate C. Blanco.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, da Biblioteca e demais setores da UNESP e aos demais docentes e colegas do Programa de Pós-

graduação em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada, que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa, no início do meu doutoramento, e dos auxílios.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Matéria vegetal, hemicelulose e xilana	17
1.2 Complexo xilanolítico e seus componentes	19
1.3 Enzimas xilanolíticas: produção e propriedades gerais	21
1.4 O gênero <i>Penicillium</i> e a espécie <i>Penicillium janczewskii</i>	23
1.5 Produção e propriedades bioquímicas das xilanases e β -xilosidases produzidas por espécies de <i>Penicillium</i>	28
1.6 Fermentação em estado sólido (FES) e produção de enzimas xilanolíticas por <i>Penicillium</i>	37
2. OBJETIVOS	49
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.1 Linhagem, cultivo e manutenção.....	50
3.2 Meio de Vogel	51
3.3 Determinação das atividades enzimáticas	52
3.4 Determinação de proteínas.....	52
3.5 Purificação das principais xilanase e β -xilosidase produzidas por <i>P. janczewskii</i>	52
3.5.1 Meio de cultura para produção enzimática	53
3.5.2 Meio de cultura para produção enzimática	53
3.5.3 Condições de cultivo para produção enzimática	53
3.5.4 Obtenção do filtrado de cultura	53
3.5.5 Purificação da principal xilanase produzida por <i>P. janczewskii</i>	53
3.5.6 Purificação da principal β -xilosidase produzida por <i>P. janczewskii</i>	54
3.5.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio – SDS-PAGE	56
3.6 Caracterização das principais xilanase e β -xilosidase produzidas por <i>P. janczewskii</i>	56
3.6.1 Determinação da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular	56
3.6.2 Determinação da massa molecular por SDS-PAGE	57
3.6.3 Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade	57

3.6.4 Estabilidade térmica e estabilidade ao pH	57
3.6.5 Efeito de substâncias e íons metálicos	58
3.6.6 Cinética enzimática	58
3.6.7 Determinação de carboidratos totais.....	59
3.6.8 Especificidade da β -xilosidase por substratos	59
3.7 Produção de xilanases e β -xilosidases por <i>P. janczewskii</i> por fermentação em estado sólido com bagaço de malte (BSG) e análise do material fermentado.....	59
3.7.1 Linhagem: cultivo, manutenção e preparo do inóculo	59
3.7.2 Cultivos sólidos	59
3.7.2 Obtenção das preparações enzimáticas	60
3.7.3 Efeito da umidade do substrato na produção de xilanases e β -xilosidases	60
3.7.4 Cinética de produção de xilanases e β -xilosidases.....	60
3.7.5 Efeito da temperatura de cultivo na produção de xilanases e β -xilosidases	60
3.7.6 Efeito da adição de palha de arroz na produção de xilanases e β -xilosidases	60
3.7.8 Análise bromatológica.....	61
3.7.9 Análise da composição em aminoácidos	61
3.7.10 Análise de micotoxinas	61
3.8 Aplicação do filtrado de cultura de <i>P. janczewskii</i> no biobranqueamento de polpa <i>kraft</i>	61
3.8.1 Produção das enzimas xilanolíticas	61
3.8.2 Determinação do rendimento	62
3.8.3 Polpa.....	62
3.8.4 Tratamento enzimático da polpa.....	62
3.8.5 Viscosidade.....	62
3.8.6 Determinação do número kappa.....	62

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 62

4.1 Cultivo para produção de xilanases e β -xilosidases por <i>P. janczewskii</i>	62
4.2 Purificação da principal xilanase de <i>P. janczewskii</i>	63
4.3 Purificação da principal β -xilosidase de <i>P. janczewskii</i>	66
4.4 Caracterização das principais xilanase e β -xilosidase purificadas de <i>P. janczewskii</i>	71
4.4.1 Determinação da massa molecular (MM)	71
4.4.2 Determinação do pH ótimo.....	72
4.4.3 Determinação da temperatura ótima.....	73

4.4.4 Estabilidade ao pH	75
4.4.5 Termoestabilidade.....	78
4.4.6 Efeito de substâncias e íons metálicos	80
4.4.7 Cinética enzimática	82
4.4.8 Determinação de carboidratos totais.....	85
4.4.9 Especificidade da β -xilosidase por substratos	86
4.5 Produção de xilanases e β -xilosidases por <i>P. janczweskii</i> em cultivo sólido com bagaço de malte e análise do material fermentado.....	86
4.5.1 Efeito da umidade inicial do substrato.....	86
4.5.2 Cinética de produção enzimática	88
4.5.3 Efeito da temperatura de cultivo.....	89
4.5.4 Análise do material fermentado.....	91
4.6 Biobranqueamento de polpa <i>kraft</i>	94
5. CONCLUSÕES	98
6. REFERÊNCIAS	100

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Esquema representativo da parede celular vegetal com seus principais constituintes.....	17
Figura 2 - Xilana de uma planta hipotética e enzimas requeridas para hidrólise	19
Figura 3 - Representação de um conidióforo hipotético encontrado em espécies de <i>Penicillium</i>	24
Figura 4 - Perfil cromatográfico de eluição das xilanases de <i>P. janczewskii</i> em DEAE Sephadex A-50 equilibrada em tampão imidazol 0,05 M pH 6,0.	64
Figura 5 - Perfil cromatográfico da eluição da xilanase de <i>P. janczewskii</i> em Sephadex G-75 equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,8	65
Figura 6 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE (8-18%) da principal xilanase de <i>P. janczewskii</i>	66
Figura 7 - Perfil cromatográfico de eluição das β -xilosidases de <i>P. janczewskii</i> em CM Sephadex C-50 equilibrada em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0	68
Figura 8 - Perfil cromatográfico da eluição da β -xilosidase de <i>P. janczewskii</i> em fenil agarose equilibrada em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,3.	69
Figura 9 - Perfil cromatográfico da eluição da β -xilosidase de <i>P. janczewskii</i> em Sephadex G-200 equilibrada com tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,8	70
Figura 10 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE (8-18%) da principal β -xilosidase de <i>P. janczewskii</i>	70
Figura 11 - Efeito do pH na atividade da xilanase (a) e β -xilosidase (b) purificadas de <i>P. janczewskii</i>	74
Figura 12 - Efeito da temperatura na atividade da xilanase (a) e da β -xilosidase (b) purificadas de <i>P. janczewskii</i>	76
Figura 13 - Estabilidade da xilanase (a) e da β -xilosidase (b) purificadas de <i>P. janczewskii</i> em diferentes pH	78

Figura 14 - Termoestabilidade da xilanase (a) e da β -xilosidase (b) purificadas de <i>P. janczewskii</i>	80
Figura 15 - Cinética enzimática da xilanase purificada de <i>P. janczewskii</i> em xilana de bétula (a) em xilana de aveia (b)	85
Figura 16 - Cinética enzimática da β -xilosidase purificada de <i>P. janczewskii</i> em p-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo	86
Figura 17 - Cinética de produção de xilanases (a) e β -xilosidases (b) por <i>P. janczewskii</i> em cultivo sólido com bagaço de malte	90
Figura 18 - Efeito do tempo e da carga enzimática no número kappa da polpa <i>kraft</i> de eucalipto no tratamento com filtrado de cultura de <i>P. janczewskii</i>	96
Figura 19 - Efeito do tempo e da carga enzimática na viscosidade da polpa <i>kraft</i> de eucalipto no tratamento com filtrado de cultura de <i>P. janczewskii</i>	97

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Limites máximos tolerados (LMT) para grãos de cevada e cevada malteada estabelecidos pela ANVISA.	26
Tabela 2 - Propriedades das xilanases produzidas por espécies de <i>Penicillium</i>	29
Tabela 3 - Propriedades das β -xilosidases fúngicas	33
Tabela 4 - Produção de xilanases e β -xilosidases por fermentação em estados sólido por espécies de <i>Penicillium</i>	40
Tabela 5 - Purificação da principal xilanase produzida por <i>P. janczewskii</i>	66
Tabela 6 - -Purificação da principal β -xilosidase produzida por <i>P. janczewskii</i>	71
Tabela 7 - Efeito de substâncias sobre a atividade das principais xilanase e β -xilosidase purificadas de <i>P. janczewskii</i>	82
Tabela 8 - Constantes cinéticas da xilanase purificada de <i>P. janczewskii</i>	85
Tabela 9 - Produção de xilanases e β -xilosidases por <i>P. janczewskii</i> em cultivo sólido com bagaço de malte, com diferentes teores de umidade fornecidos por solução de sais de Vogel, água destilada ou água de torneira.....	88
Tabela 10 - Produção de xilanases e β -xilosidases por <i>P. janczewskii</i> em cultivo sólido com bagaço de malte em diferentes temperaturas.....	91
Tabela 11 - Avaliação da composição química do bagaço de malte não fermentado e do bioproduto	92
Tabela 12 - Avaliação da composição em aminoácido do bagaço de malte não fermentado e do bioproduto	93
Tabela 13 - Análise de micotoxinas no bagaço de malte não fermentado e no bioproduto.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico

BSG – bagaço de malte ou cevada (*brewer's spent grain*)

CM – carboximetil

DEAE - dietilaminoetil

DTT – 1,4-ditiotreitol

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

g – força gravitacional ($9,8 \text{ m/s}^2$)

h - hora

kDa – kilo Dalton

M – molar

mL - mililitro

MM – massa molar ou massa molecular

min – minutos

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida (*polyacrilamide gel eletrophoresis*)

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfônico

PNPX – p-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

Tris – tris (hidroximetil) aminometano

RESUMO

Xilanases e β -xilosidases são as principais enzimas responsáveis pela degradação da xilana, o segundo principal constituinte da parede celular vegetal. Tanto a produção destas enzimas por micro-organismos, quanto a caracterização bioquímica das mesmas têm sido amplamente estudadas devido às suas inúmeras aplicações biotecnológicas. Neste trabalho, as principais xilanase e β -xilosidase produzidas por uma linhagem de *Penicillium janczewskii* em meio de cultura líquido foram purificadas por métodos clássicos de purificação de proteínas, sendo, posteriormente, caracterizadas bioquimicamente. A xilanase apresentou atividade ótima em pH 6,0 e a 65 °C e a β -xilosidase em pH 5,0 e a 75 °C. Ambas as enzimas apresentaram características interessantes principalmente com relação à atividade ótima de ambas as enzimas em elevadas temperaturas, a prolongada estabilidade da β -xilosidase a 60 °C, e a estabilidade da xilanase em pH mais alcalinos, considerando-se algumas de suas possíveis aplicações. Visando uma futura aplicação, a produção destas enzimas foi avaliada em cultivos sólidos utilizando-se como substrato o bagaço de malte, resíduo da indústria cervejeira. As melhores

condições para produção enzimática foram: utilização da umidade inicial do substrato de 50% fornecida com solução de sais de Vogel, tempo de cultivo de sete dias a 25 °C para produção de xilanases e a 20 °C para produção de β -xilosidases. O material fermentado apresentou aumento no teor protéico, na quantidade de alguns aminoácidos essenciais e ausência de micotoxinas. Ainda com um enfoque ambiental o filtrado de cultura de *P. janczewskii*, produzido em condições anteriormente selecionadas, foi aplicado no biobranqueamento de uma polpa *kraft* de eucalipto pré-branqueada com oxigênio, sendo realizados ensaios para seleção da concentração de xilanases e do tempo de reação. Os resultados mostraram-se bastantes promissores, sendo obtida redução de 3,3 unidades no número kappa utilizando-se 4 U/g polpa e 1 h de reação.

Palavras-chave: Xilanase. β -xilosidase. *Penicillium janczewskii*. Purificação de enzimas. Caracterização de enzimas. Aplicação de enzimas.

ABSTRACT

Xylanases and β -xylosidases are the main enzymes responsible for the degradation of xylan, the second main constituent of plant cell walls. The production of these enzymes by microorganisms, and their biochemical characterization has been extensively studied due to their wide range of biotechnological applications. In this work, the main xylanase and β -xylosidase produced in liquid cultures by a *Penicillium janczewskii* strain were purified by classical methods of protein purification, and further biochemically characterized. The xylanase showed optimal activity at pH 6.0 and 65 °C and β -xylosidases at pH 5.0 and 75 °C. Considering some possibilities of applications, the enzymes presented interesting characteristics especially in relation to the optimal activity at high temperatures, the prolonged stability of the β -xylosidase at 60 °C, and the stability of the xylanase in alkaline pH. Aiming at a future application, the production of these enzymes was investigated in solid state fermentation using brewer's spent grain, a residue of the brewing industry, as substrate. The optimized conditions were: 50% initial substrate moisture supplied by Vogel's salt solution, culturing for 7 days at 25 °C for xylanase production and at 20 °C for β -xylosidase production. The fermented substrate showed increase in

protein content, in the amount of some essential amino acids, and absence of mycotoxins. Maintaining the environmental focus, the *P. janczewskii* crude filtrate, produced under previously selected conditions, was applied in the biobleaching of eucalyptus kraft pulp pre-bleached with oxygen. Trials were conducted for the selection of xylanase concentration and reaction time. The results were quite promising, being observed 3.3 units reduction of the kappa number using 4 U/g pulp and 1 h reaction.

Key words: Xylanase. β -xylosidase. *Penicillium janczewskii*. Enzyme purification. Enzyme characterization. Enzyme application.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Matéria vegetal, hemicelulose e xilana

Os materiais lignocelulósicos representam mais da metade da matéria vegetal produzida pela fotossíntese (SÁNCHEZ, 2009) - podem, assim, ser considerados como o principal recurso renovável formado a partir do processo de fixação do gás carbônico (BIELY, 2003). Eles são formados principalmente por polímeros como celulose, hemicelulose e pectina que, juntamente com proteínas e lignina, formam um complexo de estrutura rígida (**Figura 1**). A celulose é o polissacarídeo mais abundante, apresentando 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, sendo o segundo mais abundante na natureza, correspondendo a 20-35% da biomassa vegetal (SAHA, 2003a).

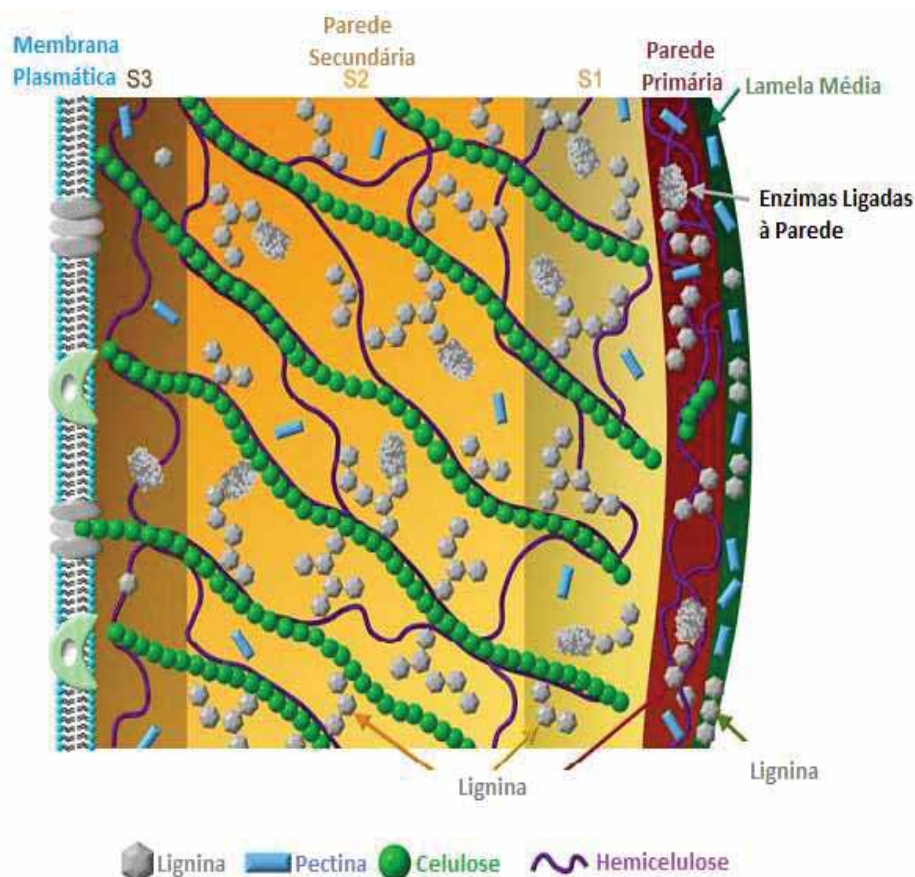


Figura 1 – Esquema representativo da parede celular vegetal e seus principais constituintes (Adaptado de ACHYUTAN et al., 2010).

Quimicamente, o grupo das hemiceluloses é constituído por um complexo de heteropolímeros formados por diferentes resíduos de açúcares como D-xilose, D-manose, L-arabinose, D-galactose e D-glicose, dentre outros, e por seus ácidos urônicos. Os nomes dos polímeros deste grupo são atribuídos de acordo com os resíduos de açúcares que estão presentes em maior quantidade na cadeia (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 L-arabinose (SHALLON e SHOHAM, 2003).

A xilana é uma das principais hemiceluloses e está presente em todas as camadas da parede celular vegetal concentrando-se, majoritariamente, na parede primária, principalmente em monocotiledôneas, e secundária (WONG et al., 1988), localizando-se na interface entre a celulose e a lignina. Entre esses três elementos 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 celulasas (PRADE, 1995; UFFEN, 1997; BEG et al., 2001). A xilana apresenta grande variabilidade química e molecular, a qual é dependente da espécie vegetal em que se encontra, e está relacionada à sua função na planta (EBRINGEROVÁ e HEINZE, 2000). A sua estrutura pode variar desde um homopolissacarídeo linear de β -1,4-polixilose até heteropolissacarídeos altamente ramificados com cadeia principal de xilose (BIELY, 1985; BIELY, 1993; SUBRAMANYAN e PREMA, 2001). Os substituintes mais comuns dessa 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 representa de 15 a 30% da parede celular e existe como O-acetil-4-O-glucuranoxilana com grau de polimerização de 150 a 200. Já nas madeiras macias das gimnospermas, compostas de arabino-4-O-metilglucuranoxilana, esse heteropolissacarídeo apresenta grau de polimerização entre 70 e 130 e representa de 7 a 10% do conteúdo da parede celular (WOODWARD, 1984; PRADE, 1995; KULKARNI et al., 1999). A xilana de muitas madeiras, principalmente madeiras duras, é acetilada, sendo que, quanto maior o grau de acetilação, maior a solubilidade em água (BIELY, 1985).

1.2 Complexo xilanolítico e seus componentes

Como parte do ciclo do carbono, esses três constituintes da parede celular vegetal não se acumulam no planeta, uma vez que são degradados por sistemas enzimáticos especializados de micro-organismos (BIELY, 1993; BIELY, 2003). No entanto, uma hidrólise eficiente e completa da xilana, devido a sua heterogeneidade e complexidade, só é alcançada quando diversas enzimas (**Figura 2**) atuam em sinergia, o que é conhecido como complexo ou sistema xilanolítico (BAJPAI, 1997; SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997; UFFEN, 1997; POLIZELI et al., 2005).

As endo-β-1,4-xilanases (1,4-β-D-xilana xilanohidrolase EC 3.2.1.8) são as principais enzimas deste complexo que atuam no processo de despolimerização da xilana. Segundo Biely (2003), as xilanases atacam a cadeia principal mais fácil e mais rapidamente em regiões não substituídas, gerando oligossacarídeos não substituídos e ramificados ou esterificados. Já segundo de Vries e Visser (2001), elas apresentam diferentes especificidades pelo substrato: enquanto algumas enzimas quebram aleatoriamente entre resíduos de xilose não substituídos, outras dependem fortemente dos substituintes próximos aos resíduos de xilose atacados.

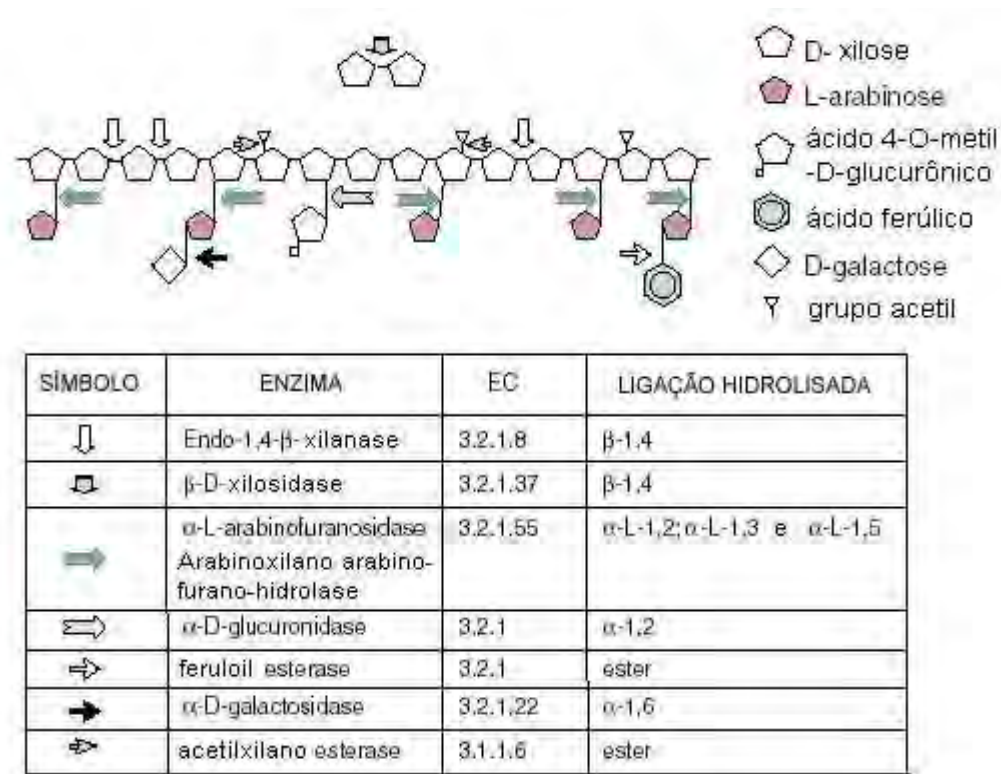


Figura 2 - Xilana de uma planta hipotética e enzimas requeridas para hidrólise completa (ARO et al., 2005).

As β-xilosidases (1,4-β-D-xilana xilohidrolase EC 3.2.1.37) são exoglicosidades que hidrolisam xilooligossacarídeos pequenos, produtos da ação das xilanases e também xilobiose, liberando xilose. A especificidade por xilooligossacarídeos é inversamente proporcional ao grau de polimerização destes (POLIZELI et al., 2005), assim sendo, a especificidade dessas enzimas por pequenos oligossacarídeos de xilose é alta (REILLY, 1981; SUNNA e

ANTRANIKIAN, 1997). Segundo de Vries e Visser (2001), estas 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 desramificantes e atuam em sinergia com as xilanases e β -xilosidases no processo de despolimerização da xilana. Elas são fundamentais na degradação da matéria vegetal, pois, muitas vezes, a presença de grupos laterais restringe a hidrólise da cadeia principal do polímero. Nesse grupo de enzimas estão incluídas as α -L-arabinofuranosidases, que removem resíduos de arabinose; as α -glucuronidases, que liberam ácido glucurônico; as acetilxilanaesterases, que hidrolizam ligações acetil-éster; e as esterases do ácido ferúlico e do ácido p-cumárico, que hidrolisam, respectivamente, ligações feruloil-éster e p-cumaroil-éster (PRADE, 1995; KULKARNI et al., 1999; SAHA, 2000; ARO et al., 2005; NUMA e BHOSLE, 2006; WONG, 2006; TOPAKAS et al., 2007). Algumas delas 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).

1.3 Enzimas xilanolíticas: produção e propriedades gerais

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

Micro-organismos produtores de enzimas do complexo xilanolítico ocorrem em diversos *habitat*, principalmente naqueles onde há grande 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, facilitando 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; RAHMAN et al., 2003).

Fungos, especialmente os 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 enzimática maiores do que aqueles obtidos com culturas bacterianas ou de leveduras (POLIZELI et al., 2005). Muitas vezes ainda é observada a produção de um sistema xilanolítico completo, pois várias enzimas auxiliares também são produzidas (HALTRICH et al., 1996). Apesar de suas muitas vantagens, as xilanases produzidas por fungos, geralmente, atuam em pH ácido e são produzidas juntamente com enzimas celulolíticas. Além disso, geralmente apresentam menor estabilidade do que aquelas produzidas por bactérias (KULKARNI et al., 1999).

Muitas bactérias, incluindo os actinomicetos também são produtores de xilanases, sendo a maior produção observada quando se encontram em pH neutro ou próximo à neutralidade (BALL e MCCARTHY, 1989). Normalmente, as bactérias apresentam menores níveis de produção enzimática do que os fungos, e estas enzimas normalmente se encontram 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 necessariamente ocorre no meio intracelular. Como resultado dessa estratégia, os produtos finais da degradação não estão facilmente acessíveis aos micro-organismos competidores (SHALLON e SHOHAM, 2003).

Enquanto a maioria das xilanases é encontrada extracelularmente, as β -xilosidases podem apresentar localização celular variável dependendo do micro-organismo produtor: em várias espécies de bactérias elas são estritamente intracelulares, em outros, como na levedura *Aerobasidium pullulans*, ela pode ser encontrada tanto intra, quanto extracelularmente. Já, em culturas fúngicas, essas

enzimas geralmente permanecem associadas ao micélio nos estágios iniciais de crescimento, podendo então ser liberadas, posteriormente, no meio, por secreção ou devido à lise celular (BIELY, 1985; POLIZELI et al., 2005).

Poucos são os micro-organismos produtores de um único tipo de xilanase, sendo a ocorrência de múltiplas xilanases freqüentemente relatada. Este fenômeno não é considerado uma redundância na fisiologia dos micro-organismos, 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). Wong et al. (1988) também sugeriram este mesmo mecanismo para as β -xilosidases microbianas, no qual diferentes enzimas apresentam funções especializadas, sendo a multiplicidade dessas enzimas detectada em diversos micro-organismos como *Aspergillus niger* (RODIONOVA et al., 1977), *Trichoderma harzianum* (WONG et al., 1986) e *Penicillium wortmanni* IFO 737 (MATSUO et al., 1987). Ito et al. (2003) purificaram duas β -xilosidases de *Penicillium herquei* com características bastante diferentes. Diferentes enzimas podem ser mais efetivas na hidrólise de xilobiose ou de xilooligossacarídeos substituídos por xilosil, ou oligossacarídeos constituídos por xilosil e outros resíduos. Essas diferentes isozimas poderiam também apresentar características diferentes para interagir com as xilanases na hidrólise da xilana (WONG et al., 1988).

1.4 O gênero *Penicillium* e a espécie *Penicillium janczewskii*

Na natureza, fungos do gênero *Penicillium* estão em quase toda parte, ou seja, são ubíquos. Algumas espécies se encontram no solo, outras, na matéria orgânica em decomposição, e 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 e serem patogênicos, causando alergias ou infecções. Algumas espécies são benéficas, produzindo

antibióticos ou outros produtos de interesse e também podem participar no processamento de alimentos e ração (GAMS et al., 1985; PITT, 2000).

O tamanho do gênero, a quantidade de espécies aparentemente semelhantes, e mesmo a grande variabilidade interespecífica tornam complicada a identificação das espécies de *Penicillium*. A taxonomia moderna ou polifásica envolve tanto aspectos morfológicos, fisiológicos, especialmente o diâmetro da colônia, e também 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 quatro 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 direta quanto indiretamente, 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 (**Figura 3**). O critério para a divisão entre os quatro 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).

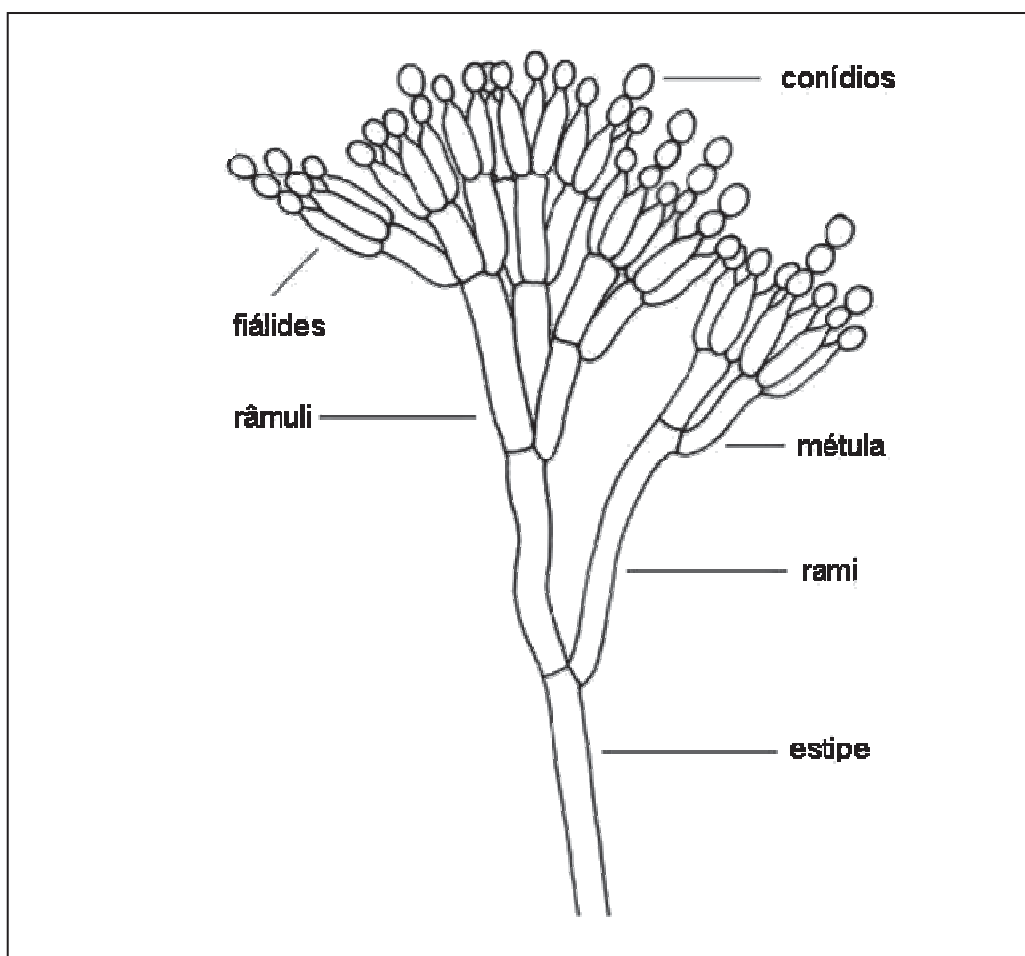


Figura 3 – Representação de um conidióforo encontrado em espécies de *Penicillium* (Adaptado de PITT, 2000).

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). A colônia pode apresentar coloração de acinzentada a verde oliva escura, profunda, densa a moderadamente floculosa, com micélio geralmente branco e 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 é produtora de griseofulvina, penitreno A (PITT, 2000) e inulinases extracelulares (PESSONI et al., 1999). He et al. (2005) isolaram

alcalóides de uma linhagem de *P. janczewskii*, sendo que um destes apresentou atividade citotóxica em células tumorais. O gene de uma α -galactosidase produzida por uma linhagem deste fungo foi expresso em *Pichia pastoris* e apresentou características interessantes mostrando potencial aplicabilidade industrial (ZHANG et al., 2011). Este fungo também mostrou-se indutor de resistência sistêmica adquirida em plantas de melão e algodão contra *Rhizoctonia solani* (MADI e KATAN, 1998).

Juntamente com fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium*, os *Penicillium* são os principais fungos micotoxigênicos presentes na cadeia alimentar humana, sendo que dentre as espécies consideradas toxigênicas, uma gama de micotoxinas muito maior é verificada nestes últimos do que aquela verificada em qualquer outro gênero fúngico (SWEENEY e DOBSON, 1998). Pitt e Leistner (1991) listaram ao menos 27 micotoxinas de elevada toxicidade as quais foram produzidas por 32 espécies de *Penicillium*. Dentre as mais importantes micotoxinas produzidas por *Penicillium* podem ser destacadas a ocratoxina A (OTA) produzida especialmente por *Penicillium verrucosum*, a patulina produzida especialmente por *Penicillium expansum* e citrinina produzida por essas mesmas espécies e também por *Penicillium citrinum* (SWEENEY e DOBSON, 1998; KOKKONEN et al., 2005; ZHELIFONOVA et al., 2010). Pitt (1997) classificou as micotoxinas de *Penicillium* em dois grupos baseando-se no efeito apresentado por cada uma delas: aquelas que afetam fígado e rim; e aquelas que apresentam efeito neurotóxico.

Quase não existem relatos sobre a produção de micotoxinas por *P. janczewskii*, sendo encontrado na literatura somente o trabalho de Kozlovskii et al. (1997) que estudaram a produção de metabólitos secundários por diversas linhagens dessa espécie. Os autores verificaram a produção de alguns compostos tóxicos, com destaque para produção de patulina por algumas das linhagens avaliadas. A patulina é uma micotoxina bastante conhecida e, diversos países, recentemente o Brasil, já possuem legislação regulamentando e especificando o limite máximo desta micotoxina permitido em alimentos.

No Brasil a regulamentação sobre os limites máximos de micotoxinas é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo até o momento regulamentados os limites máximos de aflatoxinas no leite, no amendoim e no milho pela Resolução – RDC n° 274, de 15 de outubro de 2002, que alterou parcialmente a Resolução CNNPA n° 34, de 1977 (BRASIL, 2002). Mais recentemente, a

Resolução – RDC n° 7, de 18 de fevereiro de 2011 dispôs os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. O Regulamento Técnico aprovado nesta Resolução estabelece os limites máximos para aflatoxinas, ocratoxina A, desoxinivalenol (DON), fumosinas, patulina e zearalenona admissíveis tanto em alimentos prontos para oferta ao consumidor, quanto em matérias-primas (BRASIL, 2011). Dentre outras especificações, este regulamento estabelece os limites máximos permitidos para algumas micotoxinas em grãos de cevada e na cevada malteada, importantes no contexto deste trabalho (**Tabela 1**). Ainda segundo este regulamento, os limites máximos para patulina, estabelecidos somente para sucos e polpas de maçã, é de 50 g/kg de produto.

Tabela 1 - Limites máximos tolerados (LMT) para grãos de cevada e cevada malteada estabelecidos pela ANVISA.

Alimento	Micotoxina	LMT
Grãos de cevada	Aflatoxina (B1, B2, G1, G2)	-
	Ocratoxina A	20 g/kg***
	Desoxinivalenol	2000 µg/kg**; 1750 µg/kg***; 1000 µg/kg****
	Zearalenona	-
Cevada malteada	Aflatoxina (B1, B2, G1, G2)	5 g/kg*
	Ocratoxina A	10 g/kg*
	Desoxinivalenol	1750 µg/kg**; 1250 µg/kg***; 750 µg/kg****
	Zearalenona	200 µg/kg**; 100 µg/kg****

Aplicação: *Imediata; **janeiro/2012; *** janeiro/2014; ****janeiro/2016

1.5 Produção e propriedades bioquímicas das xilanases e β -xilosidases produzidas por espécies de *Penicillium*

Muitas espécies de *Penicillium*, isoladas dos mais diferentes *habitats*, têm sido estudadas e relatadas como boas produtoras de enzimas xilanolíticas, evidenciando o potencial deste gênero na produção de enzimas desse complexo. Dentre os trabalhos que avaliaram e otimizaram a produção de xilanases, podem ser destacados o de Bradner et al. (1999) que estudaram a produção de xilanases por fungos isolados em áreas de colônias de pingüins da Antártica, verificando que dentre as linhagens estudadas estavam as de *P. expansum*, *P. hirsutum* e *P. commune*. Krogh et al. (2004) avaliaram 12 isolados de *Penicillium* quanto a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas, sendo que os melhores produtores de xilanases foram *P. persicinum*, *P. funiculosum*, e duas linhagens de *P. simplicissimum*. Medeiros et al. (2003) isolaram e identificaram fungos da Floresta Amazônica e, ao avaliarem a produção de xilanases, verificaram que três dos melhores produtores pertenciam ao gênero *Penicillium*, sendo a linhagem de *P. corylophilum* selecionada como melhor a produtora. Muthezhilian et al. (2007) isolaram micro-organismos de uma região de mangue na Índia. Dentre as 69 linhagens isoladas, *Penicillium oxalicum* foi selecionado como o melhor produtor de xilanase, sendo que as melhores condições para produção enzimática foram verificadas utilizando-se meio de cultura suplementado com farelo de trigo como fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio, pH 8,0, 3% de NaCl e cultivo de seis dias a 45 °C. Visando ainda ao aumento da produção enzimática, destaca-se o trabalho de Solov'eva et al. (2005) que realizaram mutagênese clássica de *P. verruculosum* com radiação ultravioleta, e, após sucessivas etapas de mutação, obtiveram mutantes com produção de xilanases e celulasas três vezes maior. Dwivedi et al. (2009) também obtiveram um mutante de *P. oxalicum*, utilizando radiação UV e brometo de etídio com capacidade de produção de xilanases 87% maior do que a linhagem original, sendo utilizada *Parthenium* sp., planta herbácea da Índia, como substrato abundante e de baixo custo para produção de enzimas.

Dentre as xilanases purificadas de espécies de *Penicillium*, observam-se características bioquímicas bastante distintas (**Tabela 2**). Considerando as propriedades relacionadas nesta tabela, pode-se verificar que a massa molecular das xilanases isoladas deste gênero variam de 19,3 a 38 kDa, o *pI* apresenta desde

valores inferiores a 3,0 até superiores a 9,0; o pH ótimo variando de 2,0 a 8,5 e a temperatura ótima entre 25 e 60 °C. Dentre os estudos recentes acerca destas enzimas, podem ser destacados o de Kimura et al. (2000), que purificaram uma xilanase da linhagem *Penicillium* sp 40 com atividade ótima em pH 2,0 e também o de Dutta et al. (2007) que purificaram uma xilanase de *P. citrinum* com atividade ótima em pH 8,5.

Considerando o grande número de espécies produtoras e a crescente importância das enzimas xilanolíticas de *Penicillium*, Chávez et al. (2006) realizaram uma extensa revisão sobre o sistema xilanolítico produzido por fungos desse gênero, na qual abordaram as propriedades, a regulação da expressão, a classificação e as aplicações biotecnológicas dessas enzimas.

Tabela 2 – Propriedades das xilanases produzidas por espécies de *Penicillium*.

ESPÉCIE	LOCALIZAÇÃO		FORMA NATIVA	MM (kDa)	GLICOSILAÇÃO (%)	pI	ATIVIDADE ÓTIMA		REFERÊNCIA
							pH	TEMPERATURA (°C)	
<i>P. brasilianum</i> IBT 20888	-	Extracelular	Monomérica	31	-	> 9	-	-	JØRGENSEN et al., 2003
<i>P. canescens</i> PCA-10	Xyl31	-	-	31	-	8,2-9,3	5,9	55	SINITSYNA et al., 2003
	XynA	Extracelular	Monomérica	28,5	58,5	5,0-5,2	4,0	47-48	
<i>P. capsulatum</i> CMI 291669	XynB	Extracelular	Monomérica	29,5	33,4	5,0-5,2	4,0	47-48	FILHO et al., 1993
	XynC	Extracelular	Monomérica	22	Não glicosilada	2,8	3,8	48	RYAN et al., 2003
<i>P. chrysogenum</i> FS010	XYL	^a	Monomérica	38	-	4,97	5,5	25	HOU et al., 2006
<i>P. chrysogenum</i> Q 176	-	Extracelular	Monomérica	35	Não glicosilada	4,2	6,0	40	HAAS et al., 1992
<i>P. citrinum</i> FERM P-15944	-	Extracelular	Monomérica	20	Provavelmente não glicosilada	< 3,5	5,0	55	TANAKA et al., 2005
<i>P. citrinum</i> MTCC 6489	-	Extracelular	Monomérica	22 – 25	-	3,6	8,5	50	DUTTA et al., 2007
<i>P. expansum</i> ^b	-	Extracelular	-	-	-	-	5,5	40	QUERIDO et al., 2006
	XYNA	-	-	48	-	3,6	3,7-5,2	-	ALCOCER et al., 2003
<i>P. funiculosum</i> IMI-134756	XYNB	-	-	22	-	5,0	3,7-4,7	-	
	XYNC	-	-	23,6	-	3,7	5,0	55	FURNISS et al., 2002
	XYND	-	-	36	-	4,6	4,2-5,2	-	FURNISS et al., 2005

<i>P. funiculosum</i> IMI 378536 ^c	-	Extracelular	-	-	-	-	3,5	50	KARBOUNE et al., 2009
<i>P. herquei</i>	-	Extracelular	Dimérica	11,0 + 8,3	-	5,1	3,0	50	FUNAGUMA et al., 1991
<i>P. lagena</i>	-	Extracelular	-	-	-	3,5/4,5	-	-	GHATORA et al., 2006
<i>P. purpurogenum</i>	XynA	Extracelular	Monomérica	33	-	8,6	7,0	60	BELANCIC et al., 1995
	XynB	Extracelular	Monomérica	23	-	5,9	3,5	50	
<i>P. sclerotiorum</i>	Xylana se I	Extracelular	Monomérica	23,9	14,8	-	2,5	50	KNOB E CARMONA, 2010
	Xylana se II	Extracelular	Monomérica	33,1	65,1	-	4,5	55	
<i>P. simplicissimum</i> BT 2246	-	-	-	32,6	-	8,0	5,6	67	SCHMIDT et al., 1998
<i>Penicillium</i> sp. AHT1	-	Extracelular	Monomérica	21	-	-	6,0	50	RAHMAN et al., 2003
<i>Penicillium</i> sp.40	Xyn A	Extracelular	Monomérica	25	-	4,7	2,0	50	KIMURA et al., 2000
<i>Penicillium</i> sp. CGMCC 1669 ^d	-	-	-	20	-	-	4,5	40	LIU et al., 2010

^a Expressada em *E. coli*

^b Parcialmente purificada

^c Não purificada

^d Expressada em *Pichia pastoris*

Dentre os trabalhos de isolamento de produtores de β -xilosidases, destaca-se o de Reese et al. (1973) no qual foram avaliados mais de 250 micro-organismos, dentre fungos e bactérias, sendo que destes, a maior produção foi apresentada por 11 linhagens fúngicas, principalmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, dentre os quais, finalmente, foram selecionados *A. niger* QM877 e *P. wortmanni* QM7322 como os melhores produtores desta enzima.

Apesar da importância das β -xilosidases dentro do complexo xilanolítico, estas enzimas certamente vêm recebendo menos atenção que as xilanases. Assim, nosso grupo de pesquisa (KNOB et al., 2010) realizou uma extensa revisão acerca das β -xilosidases fúngicas, a qual inclui aquelas produzidas por espécies do gênero *Penicillium*. Neste trabalho, foram revisados desde as características bioquímicas básicas, mecanismo de ação, especificidade por substratos (**Tabela 3**), até a regulação a nível molecular, clonagem, classificação e aplicações industriais destas enzimas.

Assim como as xilanases, as β -xilosidases fúngicas apresentam características bioquímicas bastante variáveis, mas, de um modo geral, a massa molecular encontra-se acima de 100 kDa, correspondendo a dímeros ou trímeros protéicos, entretanto, algumas apresentam massas menores. Atividade ótima é observada entre 30 e 70°C e na faixa de pH entre 4,0 e 6,0 e o pI situa-se entre 4,0 e 5,0.

A localização celular das β -xilosidases fúngicas é variável, dependendo do micro-organismo em estudo e das condições de cultivo utilizadas, podendo tanto ser recuperadas do meio extracelular como em *Termitomyces clypeatus* (BHATTACHARYYA et al., 1997), *Aspergillus carbonarius* (KISS e KISS 2000), *Aspergillus phoenicis* (RIZZATTI et al., 2001), *Fusarium verticillioides* (SAHA, 2001), *Aspergillus fumigatus* (LENARTOVICZ et al., 2003) e *Paecilomyces thermophila* (YAN et al., 2008), quanto podem ser encontradas associadas ao micélio, como em *Sporotrichum thermophile* (KATAPODIS et al., 2006), *Aspergillus nidulans* (KUMAR e RAMÓN 1996), *Penicillium herquei* (ITO et al., 2003), *Humicola grisea* var. *thermoidea* (IEMBO et al., 2006) e *P. sclerotiorum* (KNOB e CARMONA, 2009), necessitando de tratamento prévio para sua recuperação. Segundo Wong e Saddler (1992), estas enzimas permanecem associadas ao micélio durante o estágio inicial de crescimento e, posteriormente, são secretadas no meio, ou se desprendem do micélio como resultado da lise celular. Hashimoto et al. (1999) ao estudarem uma

linhagem de *Aspergillus oryzae* em diferentes tipos de cultivo verificaram que em meio sólido a β -xilosidase pode ser facilmente extraída com tampão contendo 0,5% de NaCl e agitação, entretanto, em cultivo líquido, a maior porção da enzima se encontrava associada ao micélio fúngico, sendo esta três vezes maior que aquela encontrada no filtrado de cultura. Estes mesmos autores conseguiram recuperar grande parte da enzima ao tratarem o micélio de *A. oryzae*, cultivado em meio líquido, com Yatalase™ (Takara, Kioto), um produto enzimático comercial com atividade quitinase, quitobiase e β -1,3-glucanase, comprovando que a β -xilosidase estava associada ao micélio, e sua localização junto à parede celular do fungo.

Tabela 3 – Propriedades das β -xilosidases fúngicas (adaptado e modificado de KNOB et al., 2010).

ESPÉCIE	LOCALIZAÇÃO	FORMA NATIVA	MM (kDa)	GLICOSILAÇÃO (%)	pI	ATIVIDADE ÓTIMA		ESPECIFICIDADE POR SUBSTRATO	INIBIÇÃO POR XILOSE (mM)	REFERÊNCIA
						pH	TEMPERATURA (°C)			
<i>Aspergillus awamori</i> K4	Micelial	Monomérica	117	-	-	4,0	70	-	-	KURAKAKE et al., 2005
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Extracelular	-	-	-	-	5,0	75	-	-	PEDERSEN et al., 2007
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Micelial	Monomérica	100	-	4,4	4,0	60	PNPX, PNPAra	1,9	KISS e KISS, 2000
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Extracelular	Monomérica	72,5	-	-	5,4	70	ONPX	-	LENARTOVICZ et al., 2003
<i>Aspergillus japonicus</i>	Extracelular	Monomérica	113,2	27,6	-	4,0	70	PNPX, PNPAra, PNPGlu	-	WAKIYAMA et al., 2008
<i>Aspergillus japonicus</i>	-	Monomérica	120	-	-	4,0	70	PNPX, PNPAra	-	SEMENOVA et al., 2009
<i>Aspergillus nidulans</i>	Micelial	Provavelmente dimérica	180	-	3,4	5,0	50	-	25	KUMAR e RAMÓN, 1996
<i>Aspergillus niger</i>	Extracelular	Monomérica	78	-	-	6,5	42	-	-	JOHN et al., 1979
<i>Aspergillus niger</i>	Extracelular	-	-	-	-	5,0	75	-	-	PEDERSEN et al., 2007
<i>Aspergillus oryzae</i>	Extracelular	Monomérica	110	-	-	4,0	60	PNPX, PNPAra	-	KITAMOTO et al., 1999
<i>Aspergillus oryzae</i> ^a	XylB Extracelular	-	37,4	-	4,81	7,0	30	PNPX	-	SUZUKI et al., 2010
<i>Aspergillus phoenicis</i>	Extracelular	Monomérica	132	43,5	3,7	4,0-4,5	75	-	-	RIZZATTI et al., 2001
<i>Aspergillus pulverulentus</i>	Xyl I	^b Trimérica	180	4,2	4,7	2,5-3,5	60	-	-	SULISTYO et al., 1995
	Xyl II	Dimérica	190	4,6	3,5	4,0-5,0	60	-	-	
<i>Aspergillus versicolor</i>	I ^c Micelial	-	60	21	5,6	6,0	40	PNPX, PNPGal, PNPGlu, PNPAra	5,3	ANDRADE et al., 2004
	II ^d	-	100	47	6,5	6,0	45	-	2,0	
<i>Cochliobolus carbonum</i>	Extracelular	Monomérica	42	Glicosilada	-	5,5-	37	PNPX, PNPAra	-	RANSOM e

						6,5					WALTON, 1997
<i>Fusarium proliferatum</i>		Extracelular	Monomérica	91.2	-	7,8	4,5	60	PNPX	5	SAHA et al., 2003b
<i>Fusarium verticillioides</i>		Extracelular	Monomérica	94,5	-	7,8	4,5	65	PNPX	6	SAHA et al., 2001
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>		Micelial	Monomérica	43	Não glicosilada	-	5,0	60	PNPX	-	de ALMEIDA et al., 1995
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>		Micelial	Monomérica	50	-	-	6,5	55	PNPX	Tolerância sugerida	LEMBO et al., 2006
<i>Humicola insolensc</i>		-	Dimérica	85	-	-	5,5	70	Sem atividade sobre PNPAra	-	MOZOLOWSKI e CONNERTON, 2009
<i>Neocallimastix frontalis</i>		Extracelular	Dimérica	180	-	4,35	6,5	35	-	-	HEBRAUD e FEVRE, 1990
<i>Paecilomyces thermophila</i>		Extracelular	Monomérica	53,5	61,5	4,8	6,5	55	PNPX, PNPAra	139	YAN et al., 2008
<i>Penicillium funiculosum</i>		Extracelular	-	-	-	-	4,0	70	-	-	KARBOUNE et al., 2009
<i>Penicillium herquei</i> IFO 4674	S1	Micelial	Monoméricas	103,7	-	-	4,0	50	PNPX, PNPGluc	-	ITO et al., 2003
	S2			37,5			6,5	30	PNPX		
<i>Penicillium sclerotiorum</i>		Micelial	-	139	-	-	2,5	60	PNPX, PNPAra	28,7	KNOB e CARMONA, 2011
<i>Penicillium</i> sp. AHT-1		Extracelular	-	-	-	-	6,0	50	-	-	RAHMAN et al., 2003
<i>Penicillium verruculosum</i>		Extracelular	Dimérica	200	-		4,0	70	-	10	CHO e KIM, 1992
<i>Penicillium wortmanni</i> QM 7322		Extracelular	Monomérica	96-102	23	5,0	3,3-4,0	-	PNPX, PNPAra	-	DELEYN et al., 1978
<i>Penicillium wortmanni</i> IFO 7237	I	Extracelular	Monomérica	110	-	3,7	3,0-4,5	55-65	-	-	MATSUO et al., 1987
	II		Provavelmente diméricas	195	-		4,3				
<i>Scytalidium thermophilum</i>	III		Provavelmente diméricas	210	-	4,6					
	IV	Micelial	Monomérica	180	-	4,8	5,0	60	PNPX, PNPGluc	>200	ZANOELO et al., 2004
				45	12	7,1					
<i>Sporotrichum thermophile</i>		Micelial	Monomérica	45	-	4,2	7,0	50	PNPX, PNPAra	-	KATAPODIS et al., 2006

<i>Talaromyces emersonii</i> ^d	Extracelular	-	86,9-100	Muito glicosilada	-	3,0-3,5	60	-	1,3	RASMUSSEM et al., 2006
<i>Talaromyces thermophilus</i>	Extracelular	Monomérica	97	-	-	7,0	50	-	-	GUERFALI et al., 2008
<i>Termitomyces clypeatus</i>	Extracelular	Monomérica	94	-	-	5,0	60	PNPX	> 2,3	BHATTACHARYYA et al., 1997
<i>Trichoderma harzianum</i>	Extracelular	Monomérica	60	Pouco glicosilada		4,0-4,5	70	PNPX, PNPAra	-	XIMENES et al., 1996
<i>Trichoderma koningii</i> G-39	Extracelular	Monomérica	104	Glicosilada	4,6	3,5-4,0	55-60	PNPX, PNPAra	5,0	Li et al., 2000
<i>Trichoderma reesei</i>	Extracelular	Monomérica	100	Glicosilada	4,7	4,0	60	PNPX, PNPAra	2,3	POUTANEN e PULS, 1988
<i>Trichoderma reesei</i> ^e	Extracelular	-	87,6-102	Muito glicosilada	-	3,0-3,5	60	-	2,4	RASMUSSEM et al., 2006
<i>Trichoderma reesei</i> ^e	-	Monomérica	80	-	-	3,5	60	PNPX, PNPAra	-	SEMENOVA et al., 2009

ONPX = o-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo; PNPX = p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo; PNPAra = p-nitrofenil-α-L-arabinopiranosídeo; PNPGlu = p-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo; PNPGal = p-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo.

^a Expressa em *Escherichia coli*

^b Purificadas a partir de preparações enzimáticas comerciais

^c Induzida por xilose

^d Induzida por xilana

^e Não purificada

^f Expressa em *Aspergillus oryzae*

1.6 Fermentação em estado sólido (FES) e produção de enzimas xilanolíticas por *Penicillium*

A produção de enzimas em escala industrial tem sido feita principalmente em fermentação submersa, por ser um processo mais facilmente controlado, entretanto, nos últimos anos a fermentação em estado sólido (FES) vem assumindo, inclusive no Brasil, posição de destaque.

O cultivo de micro-organismos em meio sólido pode ser definido de diversas maneiras ligeiramente diferentes entre si, mas de um modo geral, pode-se afirmar que a FES é o processo que envolve o crescimento de micro-organismos em partículas sólidas úmidas, na ausência de água em estado líquido, visível entre estas partículas (MITCHELL et al., 2000; PANDEY, 2003). Ainda pode ser definida como a técnica de crescimento de micro-organismos em meio com ausência de água livre, simulando os processos biológicos que ocorrem na natureza (LONSANE, et al., 1992; RAMANA MURTHY et al., 1993).

Geralmente, fungos e leveduras são considerados mais adequados para realização deste tipo de cultivo, considerando a baixa atividade de água na qual este é realizado e as características fisiológicas intrínsecas do micro-organismo. A colonização ocorre tanto na superfície, quanto internamente às partículas do substrato, o que facilita o acesso aos nutrientes, uma vez que as hifas, ao penetrarem nos tecidos vegetais, permitem acesso ao conteúdo celular, indisponível para outros micro-organismos do ambiente (MITCHEL et al., 2000).

A matriz sólida utilizada para o desenvolvimento do cultivo pode ser considerada apenas um suporte no qual ocorrerá o desenvolvimento do micro-organismo e, neste caso, o acréscimo de nutrientes deve ser realizado, ou ainda, pode ser considerada, simultaneamente, suporte e substrato para o micro-organismo (PÉREZ-GUERRA et al., 2003). Neste sentido, a seleção do substrato adequado (natureza, disponibilidade, custo, etc), bem como da umidade a ser empregada são considerados os mais importantes fatores que afetam o processo (SHINGANIA et al., 2009).

No Brasil, o descarte de resíduos agrícolas e/ou agroindustriais muitas vezes se constitui um problema, especialmente quando se trata daqueles gerados em grande quantidade, os quais não são adequadamente descartados. A FES, ao reproduzir processos microbiológicos naturais como compostagem e ensilagem, permite a utilização desses resíduos, disponíveis em grandes quantidades e a baixo

custo, tornando o processo fermentativo economicamente viável. Por outro lado, resolve o problema do descarte desses resíduos que, muitas vezes, podem causar poluição ambiental (SOCCOL e VANDENBERGH, 2003; SHINGANIA et al., 2009). Além disso, o próprio substrato fermentado geralmente pode ser aproveitado para ração animal, uma vez que apresenta maior digestibilidade e valor nutricional, especialmente quanto ao nível proteico (GRAMINHA et al., 2008).

As vantagens apontadas para utilização da FES são: maior produtividade, menores custos operacionais, menor espaço necessário, simplicidade de equipamento e facilidade de escalonamento (PANDEY et al., 2000; PANDEY, 2003; HOLKER e LENZ, 2004). Contudo, apesar das atrativas vantagens, a FES apresenta algumas desvantagens, principalmente em relação ao aumento da escala de produção, ao controle dos parâmetros do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade, crescimento celular e contaminação por bactérias), à baixa homogeneidade e à necessidade de grandes volumes de inóculo. O principal problema associado ao escalonamento na FES diz respeito à dificuldade de remoção do calor gerado pela atividade metabólica dos micro-organismos. Estas altas temperaturas atingidas no interior do meio fermentativo podem comprometer o crescimento microbiano e desnaturar as enzimas produzidas, sendo o controle desta variável fundamental para obtenção de produtividade elevada e estabilidade do produto (SHINGANIA et al., 2009). A implantação de sistemas de aeração e/ou remoção de calor muitas vezes é necessária, entretanto não devem encarecer sobremaneira o custo de produção.

Considerando que o interesse pela utilização de enzimas vem crescendo significativamente no mundo, principalmente por seu uso crescente na indústria, a produção de enzimas por este processo, associado ao aproveitamento de resíduos, e ainda, à possibilidade de se utilizar posteriormente o material fermentado, torna esta técnica bastante vantajosa dos pontos de vista econômico e ambiental. Para países em desenvolvimento, como o Brasil, esta é uma oportunidade a ser especialmente considerada.

A seleção de micro-organismos, bem como o posterior estabelecimento da relação entre a fisiologia de cada um deles com os fatores físico-químicos que afetam a produção de enzimas é a meta principal para o desenvolvimento de modelos apropriados (SHINGANIA et al., 2009). Neste sentido, Nair et al. (2008)

realizaram o isolamento de micro-organismos de solo da Índia, sendo que os do gênero *Penicillium* foram o segundo mais prevalente, correspondendo a 27% das linhagens isoladas. Estes se mostraram bons produtores de enzimas xilanolíticas, quando cultivados em FES, especialmente linhagens de *P. citrinum* e *P. janthinellum*. Já Muthezhilan et al. (2007), selecionaram uma linhagem de *P. oxalicum*, dentre 69 linhagens isoladas de mangue na Índia, que apresentou elevados níveis de xilanase, como anteriormente citado, sendo as condições de produção posteriormente otimizadas por FES. Simões et al. (2009) avaliaram a produção de xilanases por 17 linhagens de fungos filamentosos isolados de solo de uma área de caatinga, no nordeste brasileiro, sendo que dentre eles, duas linhagens de *Penicillium*, *P. implicatum* e *P. commune*, se destacaram como os melhores produtores dessas enzimas em cultivo sólido com farelo de trigo.

A FES tem sido investigada em trabalhos que visam avaliar o efeito de fatores químicos e físicos sobre a produção de enzimas xilanolíticas, visando otimizar esse processo. O substrato e a fonte de nitrogênio, a atividade de água e a umidade do meio, pH, temperatura de cultivo e a aeração constituem as principais variáveis que influenciam a produção enzimática, sendo descritas em muitos trabalhos (HALTRICH et al., 1996). A utilização da FES para produção de enzimas xilanolíticas tem sido proposta utilizando-se diferentes resíduos sólidos agrícolas e agroindustriais como substrato, sendo que dentre estes pode-se destacar: farelo de trigo, bagaço de cana de açúcar, casca de mandioca, torta de soja e bagaço de laranja, entre outros (PANDEY et al., 2000; SOCCOL et al., 2003).

O bagaço de malte, também conhecido como bagaço de cevada, cevada malteada ou seu termo em inglês *brewer's spent grain* (BSG) é um dos subprodutos mais importantes gerados na indústria cervejeira, correspondendo a aproximadamente 85% do total produzido (MUSSATO e ROBERTO, 2006). Ele está disponível a baixo ou a nenhum custo durante todo o ano, sendo produzido em grande quantidade não somente pelas grandes, mas também pelas pequenas e micro-cervejarias (PANAGIOTOU et al., 2006). Cabe ainda ressaltar que o Brasil ocupa, segundo dados apresentados por Berto (2003), a quarta posição no *ranking* dos países que mais produzem essa bebida, produzindo 8,5 bilhões de litros ao ano, resultando na geração de 1,7 milhões de toneladas de bagaço por ano. Sua composição é bastante variável, dependente da variedade da cevada utilizada, do

tempo de colheita, das características do lúpulo e de outros aditivos e da tecnologia empregada (SANTOS et al., 2003), mas genericamente pode-se dizer que é composto principalmente por arabinoxilana (28%), lignina (28%) e celulose (17%) (MUSSATTO et al., 2006). Apesar da grande quantidade de resíduo gerado anualmente, o BSG tem recebido pouca atenção como um subproduto de baixo custo e seu uso tem sido investigado na produção de tijolos com propriedades térmicas isolantes, adsorção de metais e corantes, imobilização de leveduras, extração de ácidos fenólicos considerados antioxidantes naturais e para produção de bioetanol, ácido láctico, xilitol e pululana. Contudo, sua utilização prática em grande escala atualmente ainda é restrita, principalmente, à alimentação animal (MUSSATO e ROBERTO, 2006; ALIYU e BALA, 2011). Muitos estudos têm avaliado o potencial deste subproduto na alimentação de ruminantes, entretanto, não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliaram as características do BSG ou seu emprego com esta finalidade, após tratamento com enzimas ou algum processamento microbiológico. Neste sentido, apenas um trabalho (DENSTALDI et al., 2010) verificou o efeito do tamanho da partícula e de dois tratamentos diferentes do BSG com xilanases exógenas no desenvolvimento de frangos de corte alimentados com este sub-produto. Estes autores concluíram que, apesar do grande potencial de aplicação dessas enzimas verificados em outros estudos com outros tipos de ração, a aplicação das xilanases não resultou efeitos benéficos (DENSTALDI et al., 2010). Assim, pode-se concluir que o estudo da aplicação de xilanases em BSG ainda é bastante incipiente, mostrando-se um campo muito aberto que necessita ainda de muito investimento para melhorar o emprego no setor de ração animal.

Outra interessante utilização deste sub-produto tem sido a incorporação do BSG como componente de meio de cultura para micro-organismos visando, especialmente, à produção de enzimas xilanolíticas, sendo que elevados níveis destas enzimas foram verificados com sua utilização (NASCIMENTO et al., 2002; PANAGIOTOU et al., 2006, 2007; MANDALARI et al., 2008), inclusive pelo nosso grupo de pesquisa (TERRASAN et al., 2010), mostrando seu uso potencial com esta finalidade.

Muitos fungos têm sido avaliados na produção de enzimas xilanolíticas por FES com destaque, principalmente, para linhagens de *Aspergillus*, *Thermomyces*, *Thermoascus* e *Myceliophthora* (CAMASSOLA e DILLON, 2007).

Algumas linhagens de *Penicillium* também já foram estudadas em cultivos sólidos, mostrando-se promissoras em relação à produção de xilanases e β -xilosidases. Estas linhagens, bem como algumas das condições empregadas para produção dessas enzimas estão apresentadas na **Tabela 4**. Dentre estas, podemos destacar o trabalho de Panagiotou et al. (2006) que investigou a produção de diversas enzimas do complexo xilanolítico por *P. brasilianum* cultivado com BSG por fermentação em estado sólido. As condições ótimas definidas pelos autores para produção de xilanases foram 80% de umidade do substrato, pH 6,0, temperatura de 26,5 °C e cultivo por 4,5 dias.

Tabela 4 - Produção de xilanases e β -xilosidases por fermentação em estado sólido por espécies de *Penicillium*.

ESPÉCIE	ENZIMA	CONDIÇÕES CULTIVO		REFERÊNCIA
		SUBSTRATO	OUTRAS	
<i>P. brasilianum</i>	Xilanase	Bagaço de malte	80% umidade; pH 6,0; 26,5 °C	PANAGIOTOU et al., 2006
<i>P. canescens</i> 10-10c	Xilanase	Torta de soja	80% umidade; 30 °C, 7 dias	ASSAMOI et al., 2008; ASSAMOI et al., 2010
<i>P. canescens</i> 10-10c	Xilanase	Palha de trigo	83% umidade; 30 °C; 12 dias	BAKRI et al., 2003
<i>P. capsulatum</i>	Xilanases	Polpa de beterraba e Farelo de trigo	60-75% umidade; pH 4,5; 30 °C	CONSIDINE et al., 1987; FILHO et al., 1993
<i>P. citrinum</i>	Xilanase	Farelo de trigo	30 °C; 5 dias	DUTTA et al., 2007
<i>P. decumbens</i>	Xilanase	Casca de laranja	90% umidade; pH 7,0	MAMMA et al., 2007
	β -xilosidase		-	
<i>P. echinulatum</i>	Xilanase	Bagaço de cana pré- tratado e Farelo de trigo	67% umidade; 28 °C; 5 dias	CAMASSOLA e DILLON, 2007
<i>P. oxalicum</i>	Xilanase	Farelo de trigo	pH 8,0; 45 °C; 6 dias	MUTHEZILAN et al., 2007

1.7 Panorama político atual, mercado de enzimas e aplicação biotecnológica das enzimas xilanolíticas

Estima-se que, seguindo um crescimento anual previsto de 4 a 5%, o mercado mundial de enzimas movimentará, em 2014, valores da ordem de US\$ 4 bilhões, segundo dados do grupo de consultoria Business Communication Company, Inc. (SÁ-PEREIRA et al., 2008). Em 2005, o mercado brasileiro foi responsável por apenas 3,7% das movimentações desse mercado, sendo que dos R\$ 147,2 milhões movimentados no Brasil, 86% corresponderam às importações. A pequena contribuição brasileira no mercado internacional e a predominância das importações indicam uma situação de desvantagem tecnológica e estratégica em termos de produção e uso destes catalisadores no país (BON et al., 2008). A partir de 2007, pelo decreto presidencial nº 6.041, ficou instituída a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia que tem por objetivo “o estabelecimento de ambiente adequado para o desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos inovadores, o estímulo à maior eficiência da estrutura produtiva nacional, o aumento da capacidade de inovação das empresas brasileiras, a absorção de tecnologias, a geração de negócios e a expansão das exportações”, sendo que as enzimas industriais estão dentro do grupo considerado como “Áreas prioritizadas” nas diretrizes estabelecidas por esta política. Naquele mesmo ano, aproximadamente R\$ 19 milhões foram investidos pelo Ministério da Ciência e Tecnologia para o desenvolvimento de pesquisas no setor de Biotecnologia. A instituição de políticas públicas e a ocorrência de maciços investimentos são importantes tanto para o desenvolvimento científico e tecnológico brasileiro, quanto para a formação de recursos humanos capacitados nesta área, na tentativa de alterar a situação brasileira em relação à tecnologia enzimática.

A utilização de enzimas do complexo xilanolítico iniciou-se na década de 80, e deste então, seu uso vêm atraindo grande interesse geral, o que as fez assumir lugar bastante expressivo dentre as principais enzimas produzidas industrialmente. Este fato pode ser comprovado pela existência de, no ano de 2005, 468 patentes com referência às xilanases e, além disso, estas enzimas representavam 20% do mercado mundial de enzimas nesse ano (COLLINS et al., 2005; POLIZELLI et al., 2006).

Biely (1985) dividiu os processos industriais que empregavam xilanases em dois tipos: aqueles nos quais somente as xilanases devem atuar, e aqueles nos quais elas atuam em conjunto com outras enzimas.

A mais importante aplicação industrial de enzimas xilanolíticas livre de celulases é na indústria de polpa e papel. De fato, a utilização destas enzimas num estágio de (pré)-branqueamento de polpas *kraft* tem grande potencial de aplicação tanto por ser considerada segura e benéfica do ponto de vista ambiental, quanto por apresentar-se economicamente viável em curto período de tempo (BEG et al., 2001).

A idéia básica do branqueamento enzimático foi publicada pela primeira vez em 1986, tendo sido desenvolvida na Finlândia pelo “VTT Biotechnological Laboratory” em cooperação com o “Finnish Pulp and Paper Research Institute” (VIIKARI et al., 1986), sendo que, posteriormente, a utilização específica de xilanases foi amplamente divulgada pelo trabalho de Viikari e colaboradores (VIIKARI et al., 1994). Os mecanismos pelos quais as xilanases atuam neste processo ainda não estão completamente esclarecidos, mas é consenso que a aplicação destas enzimas aumenta a exposição das fibras vegetais, favorecendo subsequente a remoção da lignina, responsável pela coloração escura da polpa. Em uma primeira hipótese, as xilanases, ao remover a xilana, atuam simplesmente eliminando este composto que é responsável pela ligação entre a celulose e a lignina, facilitando assim a remoção posterior desta última. Já uma segunda hipótese, leva em consideração o fato de que durante o processo *kraft*, parte da xilana, que havia se solubilizado durante o cozimento alcalino, é re-depositada sobre a superfície das fibras de celulose, constituindo uma barreira física contra o ataque dos reagentes utilizados na etapa de branqueamento. Acredita-se, assim, que a hidrólise enzimática desta xilana re-precipitada aumente a permeabilidade das fibras. Ambas as hipóteses explicam a redução na quantidade de cloro empregada nas etapas de branqueamento e da conseqüente liberação posterior de seus derivados tóxicos no ambiente (VIIKARI et al., 1994; SUBRAMANIAN e PREMA, 2002; TECHAPUN et al., 2003; ZHAO et al., 2006; RONCERO et al., 2000).

De um modo geral, a experiência industrial tem mostrado que o pré-tratamento com xilanases resulta em economia de 20 a 30% de produtos químicos

usados no branqueamento para que seja atingida uma determinada alvura da polpa, com conseqüente redução na emissão de poluentes e também dos custos do processo. Além deste, outros benefícios do pré-tratamento enzimático podem ser incluídos como: custos operacionais reduzidos, melhoria do brilho e alvura, aumento da viscosidade da polpa, redução do número kappa e aumento do rendimento do processo (DURAN et al., 2008).

O emprego de ligninases neste processo também tem sido investigado, apresentando potencialidade de aplicação, especialmente após o tratamento com hemicelulases (BAJPAI e BAJPAI, 1992; IBARRA et al., 2006; MOLDES e VIDAL, 2008), entretanto, sua utilização prática mostrou-se extremamente difícil dada a ausência de controle dos mecanismos de degradação enzimática da lignina residual (DURAN et al., 2008). Outros autores têm estudado a utilização de enzimas hidrolíticas como pectinases, mananases, galactosidases e lipases (AHLAWAT et al., 2007; NGUYEN et al., 2008; KAUR et al., 2010); e, mais recentemente, ligninases em conjunto com as xilanases têm sido investigadas com as mesmas finalidades (VALLS e RONCERO, 2009; 2010).

Os principais fatores que afetam a eficiência destes tratamentos com xilanases incluem pH, temperatura, dosagem enzimática, consistência de polpa e tempo de reação (BAJPAI, 1999). Em geral, no processo *kraft*, a polpa é processada em elevadas temperaturas (80 – 90 °C) e meio alcalino (pH entre 9,0 e 10,0), sendo assim, considera-se como enzimas ideais aquelas que atuem nessas condições, as quais são, por outro lado, consideradas demasiado severas para aplicação de moléculas biológicas, até mesmo para aquelas produzidas por micro-organismos extremófilos (NIEHAUS et al., 1999). Desta maneira, nos ensaios em escala laboratorial, muitas vezes tem-se previamente ajustado o pH e arrefecido a temperatura, buscando-se assim condições mais amenas e próximas àquelas nas quais as enzimas possam atuar. Em escala industrial, a diminuição do pH não é considerada problemática (BAJPAI, 1999), mas o abaixamento da temperatura sim, uma vez que seriam necessários grandes volumes de água, resultando em elevados custos financeiros e ambientais. Ainda outros fatores que devem ser otimizados em escala laboratorial são: quantidade de enzima e consistência da polpa, os quais são variáveis para cada tipo de polpa, e a posterior seqüência de branqueamento (SUURNÄKKI et al., 1997; BEG et al., 2001).

Muitos trabalhos têm demonstrado a eficácia do pré-tratamento com xilanases para o branqueamento de polpas com diminuição do uso de agentes químicos. A grande maioria dos trabalhos tem investigado o emprego de xilanases bacterianas, consideradas mais apropriadas para esta aplicação uma vez que apresentam mais comumente atividade em meio alcalino (DHILLON et al., 2000; RONCERO et al., 2000; BOCCHINI et al., 2003; DAMIANO et al., 2003; SINDHU et al., 2006), sendo que algumas destas já estavam disponíveis comercialmente (VICUÑA et al., 1995). Contudo, muitas xilanases fúngicas também têm sido avaliadas com esta mesma finalidade, como aquelas produzidas por linhagens de *Aspergillus niger* (MAXIMO et al., 1998; RAGHUKMAR et al., 2004; MEDEIROS et al., 2007; BETTINI et al., 2009), *Aspergillus nidulans* (TANEJA et al., 2002), *Acrophialophora nainiana* e *Humicola grisea* var. *thermoidea* (MEDEIROS et al., 2002; SALLES et al., 2005), *Trichoderma longibrachiatum* (MEDEIROS et al., 2007), *Aspergillus niveus* e *Aspergillus fumigatus* (BETTINI et al., 2009; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2009), *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus* (MICHELIN et al., 2010), *Aspergillus sydowii* (NAIR et al., 2010), *Thermomyces lanuginosus* (MADLALA et al., 2001), *Aspergillus oryzae* (SZENDEFY et al., 2006). Dentre as espécies de *Penicillium*, apenas *Penicillium corylophilum* teve sua xilanase estudada nesta aplicação (MEDEIROS et al., 2007). É importante ressaltar que as linhagens avaliadas não são produtoras de celulasas, e que as enzimas avaliadas, geralmente, apresentam atividade em temperatura relativamente elevada.

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 o aproveitamento desses resíduos tem recebido muita atenção, principalmente por terem grande potencial para serem convertidos em produtos de interesse comercial (HOWARD et al., 2003). A hidrólise da xilana pode ser realizada com a utilização de ácidos ou de enzimas (BIELEY, 1985). Industrialmente, a hidrólise ácida antecedeu a hidrólise enzimática por ser um processo rápido e simples, entretanto não é obtida uma quebra específica do substrato, e condições rigorosas são requeridas para obtenção do produto desejado (REILLY, 1981). Além disso, muitas vezes ocorre a formação de subprodutos tóxicos, que podem impedir fermentações subseqüentes (BIELEY, 1985). A hidrólise

enzimática ocorre sob condições brandas e é um processo mais específico, no qual o produto final é obtido sem a presença de subprodutos (REILLY, 1981; POLIZELI et al., 2006). Os monossacarídeos resultantes da hidrólise de materiais lignocelulósicos podem ser convertidos, por processos fermentativos, em aditivos alimentares (MOURE et al., 2006), biocombustíveis, produtos químicos, ou ainda serem utilizados como fontes alternativas de energia (WOODWARD, 1984; HOWARD et al., 2003; KUMAR et al., 2008). Atualmente, o principal produto resultante da fermentação da xilose é o xitol (KULKARNI et al., 1999), com destaque também para a produção do álcool combustível e do 2,3-butenodiol (SAHA, 2003; NAIK et al., 2010; BALAT, 2011).

No processamento de fibras vegetais, xilanases e pectinases atuam no processo de lavagem removendo material vegetal ligado às fibras de linho, juta e rami (BIELY, 1985; ZHENG et al., 2001). Mais recentemente estas enzimas também têm sido avaliadas nos processos de lavagem, desengomagem e no branqueamento de fibras de algodão (TZANOV et al., 2001; BATTAN et al., 2011)

Na indústria de alimentos, xilanases em conjunto com celulasas 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; DHIMAN et al., 2010). Na indústria de vinhos, hemicelulasas em conjunto com pectinases e β -glucanases, quando usadas no clareamento, melhoram a cor final e aumentam a estabilidade do produto (BHAT, 2000). Essas enzimas também são aplicadas na extração e produção de café solúvel (COLLINS et al., 2005), bem como na preparação de cerveja (KULKARNI et al., 1999). Recentemente, Das et al. (2008) relataram o desenvolvimento de uma nova tecnologia para o processamento do arroz: a aplicação de enzimas hidrolíticas, incluindo as xilanases, na etapa de polimento dos grãos, visando minimizar a quebra dos mesmos durante seu processamento, manter seu valor nutricional e melhorar a qualidade de cozimento.

As xilanases têm sido largamente utilizadas como aditivos nas indústrias de panificação por facilitarem o processamento e melhorarem a qualidade do produto final (COLLINS et al., 2006). Quando usadas em conjunto com amilases, elas

aumentam a qualidade e o volume da massa, e melhoram as qualidades organolépticas e o tempo de prateleira dos pães (BHAT, 2000).

As xilanases juntamente com outras enzimas também são de interesse nas indústrias de detergentes, farmacêutica, para produção de polissacarídeos 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; KIM et al., 2005).

No setor de alimentação animal, podem ser utilizadas em conjunto com glucanases, pectinases, celulasas, proteases, amilases, fitases, galactosidases e lipases. Atualmente, estas enzimas são incorporadas principalmente na dieta de monogástricos, sendo que, dentre outras, sua função principal é a de reduzir a viscosidade da digesta (BRUFAU et al., 2006). Estudos envolvendo a aplicação de enzimas exógenas na alimentação dos ruminantes têm sido cada vez mais explorados, uma vez que seu emprego poderia potencializar a degradação dos polissacarídeos estruturais juntamente com as enzimas produzidas pelos micro-organismos do rúmen, estimulando a taxa de degradação da fibra (BEAUCHEMIN et al., 1999; HRISTOV et al., 2000). Beauchemin et al. (1995) verificaram que o pré-tratamento com um preparado enzimático de celulasas, hemicelulasas e pectinases aumenta a qualidade nutritiva da forragem fornecida a ruminantes, resultando num ganho de peso superior a 35%, enquanto que Yang et al. (2001) verificaram que a utilização dessas enzimas na dieta resulta em maior produtividade de leite.

Finalmente, 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, 2003a).

Dentre 80 linhagens fúngicas isoladas de solo da Mata Atlântica da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP, uma linhagem de *Penicillium janczewskii* Zaleski destacou-se como boa produtora de xilanases (RUEGGER, 2001; TAUKTORNISIELO et al., 2005), despertando interesse no estudo das enzimas de seu complexo xilanolítico. A linhagem foi cultivada em meio líquido com carboidratos puros ou resíduos naturais como fonte de carbono, sendo observada elevada produção de xilanases, β -xilosidases e α -L-arabinofuranosidases nos cultivos com algumas destas fontes de carbono. Além disso, somente baixíssimos níveis de

celulases foram observados, mesmo nos meios que continham fontes celulósicas, característica que é fundamental em algumas aplicações industriais dessas enzimas (TERRASAN et al., 2010). A produção de xilanases e β -xilosidases por essa linhagem foi anteriormente estudada em meio líquido de cultura contendo xilana de aveia, visando tanto à otimização das condições de cultivo quanto a um conhecimento prévio de algumas características bioquímicas destas enzimas. Em condições ótimas obteve-se atividade xilanásica de 24,38 U/mL e β -xilosidásica de 0,74 U/mL (TERRASAN, 2007),

Desta maneira, o progresso geral já obtido no estudo das enzimas xilanolíticas, o grande potencial biotecnológico, e suas interessantes aplicações motivaram estudos mais detalhados acerca das xilanases e β -xilosidases produzidas por esse micro-organismo ainda pouco estudado, visando um maior conhecimento das enzimas deste complexo enzimático e a possibilidade de se avaliar a contribuição de cada uma delas na hidrólise da xilana. Além disso, este trabalho se insere num contexto maior de preocupação com a poluição ambiental, avaliando o efeito da aplicação dessas enzimas no processo de branqueamento da polpa celulósica, e também avaliando a possibilidade de conferir um destino mais nobre ao bagaço de malte e a obtenção de um produto de maior valor nutricional para ração animal. Tais conhecimentos podem resultar em processos mais eficientes, comercialmente mais competitivos e menos poluentes.

2. OBJETIVOS

- Purificar e caracterizar bioquimicamente as principais xilanase e β -xilosidase produzidas por *P. janczewskii*
- Otimizar a produção de xilanases e β -xilosidases por *P. janczewskii* em cultivos sólidos utilizando o bagaço de malte como substrato e analisar o substrato fermentado quanto a composição bromatológica; composição protéica e em aminoácidos e também presença de micotoxinas.
- Aplicar o filtrado de cultura de *P. janczewskii* no branqueamento de polpa celulósica

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 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 das culturas foram realizados periodicamente, sendo estas então incubadas por sete dias a 28 °C. Após este período, a linhagem foi utilizada ou armazenada a 4 °C.

3.2 Meio de Vogel

a) Solução de elementos-traço

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.....	100,0 mL

b) Solução de biotina

Biotina.....	5,0 mg
Água estilada qsp.....	50,0 mL

c) A solução de sais de Vogel (VOGEL, 1956) foi preparada pela dissolução dos sais, da solução de biotina e da solução de elementos-traço abaixo relacionados.

Citrato de sódio . 5H ₂ O	15,0 g
KH ₂ PO ₄	25,0 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.....	0,5 mL
Solução de elementos-traço.....	0,5 mL
Água destilada qsp.....	100,0 mL

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

d) O meio de cultura sólido foi preparado com uma solução de sais de Vogel diluída 50 vezes em água destilada (v/v) e suplementada com glicose e ágar, ambos

a 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.

3.3 Determinação das atividades enzimáticas

A atividade xilanolítica foi determinada a partir da incubação da amostra com xilana de bétula em meio tamponado com tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 ou tampão imidazol 0,05 M pH 6,0. Em intervalos de tempos adequados, alíquotas foram retiradas e a reação foi interrompida pela adição de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS), sendo então realizada a determinação de açúcares redutores (MILLER, 1959), utilizando-se xilose como padrão. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm. Os ensaios foram realizados em duplicata.

A atividade β -xilosidásica foi determinada utilizando-se o substrato sintético p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (PNPX) conforme descrito por Biely (2003). Inicialmente a atividade foi realizada em tampão McIlvaine pH 4,0 e, posteriormente, neste mesmo tampão em pH 5,0. Em intervalos de tempos adequados, alíquotas foram retiradas e a reação foi interrompida pela adição de uma solução saturada de tetraborato de sódio. O p-nitrofenol liberado foi determinado por leitura em espectrofotômetro a 405 nm. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.4 Determinação de proteínas

Durante a purificação das enzimas, a determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951) e, nos cultivos sólidos, pelo método de Bradford modificado (SEDMACK e GROSSBERG, 1977), ambos utilizando soroalbumina bovina como padrão. Nas frações das etapas cromatográficas, os níveis de proteínas totais foram estimados pela medida da absorbância a 280 nm.

3.5 Purificação das principais xilanase e β -xilosidase produzidas por *P. janczewskii*

3.5.1 Inóculo

Conídios da linhagem de *P. janczewskii*, cultivados em meio sólido de Vogel por sete dias, foram suspensos em água destilada esterilizada, sendo a suspensão filtrada com gaze para remoção de segmentos de hifas, e sua concentração

ajustada em Câmara de Neubauer para 10^7 conídios/mL. Um mililitro dessa suspensão foi inoculado no meio em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio nos quais foram realizados os cultivos.

3.5.2 Meio de cultura para produção enzimática

Para preparação do meio líquido de Vogel, utilizou-se a solução de sais de Vogel diluída conforme **item 3.2**, contendo xilana de aveia (*oat spelts xylan*, Sigma) a 1% (m/v). O pH do meio foi ajustado para pH 6,5 para produção de xilanases e para pH 5,0 para produção de β -xilosidases.

3.5.3 Condições de cultivo para produção enzimática

O cultivo foi realizado por sete dias a 30 °C para produção de xilanases e por oito dias a 25 °C para produção de β -xilosidases, ambos em condição estacionária.

3.5.4 Obtenção do filtrado de cultura

Após o crescimento, o micélio foi separado do meio por filtração a vácuo. Este filtrado foi centrifugado (10000g, 20 min) e o sobrenadante foi utilizado como preparação de proteínas e enzima extracelular.

3.5.5 Purificação da principal xilanase produzida por *P. janczewskii*

O filtrado de cultura foi dialisado contra tampão imidazol 0,05 M pH 6,0 por 8 h, sendo realizadas trocas deste tampão a cada 2 h. Após a diálise, o material foi cromatografado em coluna de DEAE-Sephadex A-50 (17,0 x 1,4 cm) equilibrada no mesmo tampão. As proteínas não adsorvidas foram eluídas nesse mesmo tampão a um fluxo médio de 70 mL/h, sendo coletadas frações de 3,5 mL. Após a lavagem da coluna com esse tampão, eluiu-se a mesma com 100 mL de um gradiente de força iônica crescente de 0,0 a 1,0 M de NaCl no mesmo tampão. As frações com atividade enzimática foram separadamente reunidas, originando duas amostras, correspondentes às frações adsorvidas e não adsorvidas, as quais foram então dialisadas contra tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,8.

A amostra correspondente às frações não adsorvidas com atividade enzimática foi liofilizada, re-suspendida, posteriormente, em 4 mL de tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,8 e aplicada em coluna de Sephadex G-75 (1,25 x 64,0 cm)

equilibrada no mesmo tampão. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão a um fluxo médio de 18 mL/h, sendo coletadas frações de 3,0 mL. As frações que apresentaram atividade foram reunidas.

Todas as etapas de purificação foram realizadas a 4 °C e, ao final de cada uma delas, procedeu-se a determinação de proteínas e da atividade enzimática da amostra resultante, sendo que alíquotas das mesmas foram reservadas, dialisadas contra tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,8, liofilizadas e utilizadas para caracterização eletroforética.

3.5.6 Purificação da principal β -xilosidase produzida por *P. janczewskii*

O filtrado de cultura foi precipitado com sulfato de amônio, sendo o sobrenadante de 55% de saturação dialisado contra tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,5 por 8 h, realizando-se trocas a cada 2 h. Após a diálise, o material foi cromatografado em coluna de CM Sephadex C-50 (1,4 x 17,0 cm) equilibrada no mesmo tampão. As proteínas não adsorvidas foram eluídas com esse mesmo tampão, a um fluxo médio de 70 mL/h, sendo coletadas frações de 3,5 mL. Após a lavagem da coluna com esse tampão, eluiu-se a mesma com 100 mL de um gradiente de pH crescente de 4,5 a 5,7, o qual foi realizado utilizando-se tampão acetato de sódio 0,05 M. As frações com elevada atividade β -xilosidásica foram reunidas e dialisadas contra tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,3.

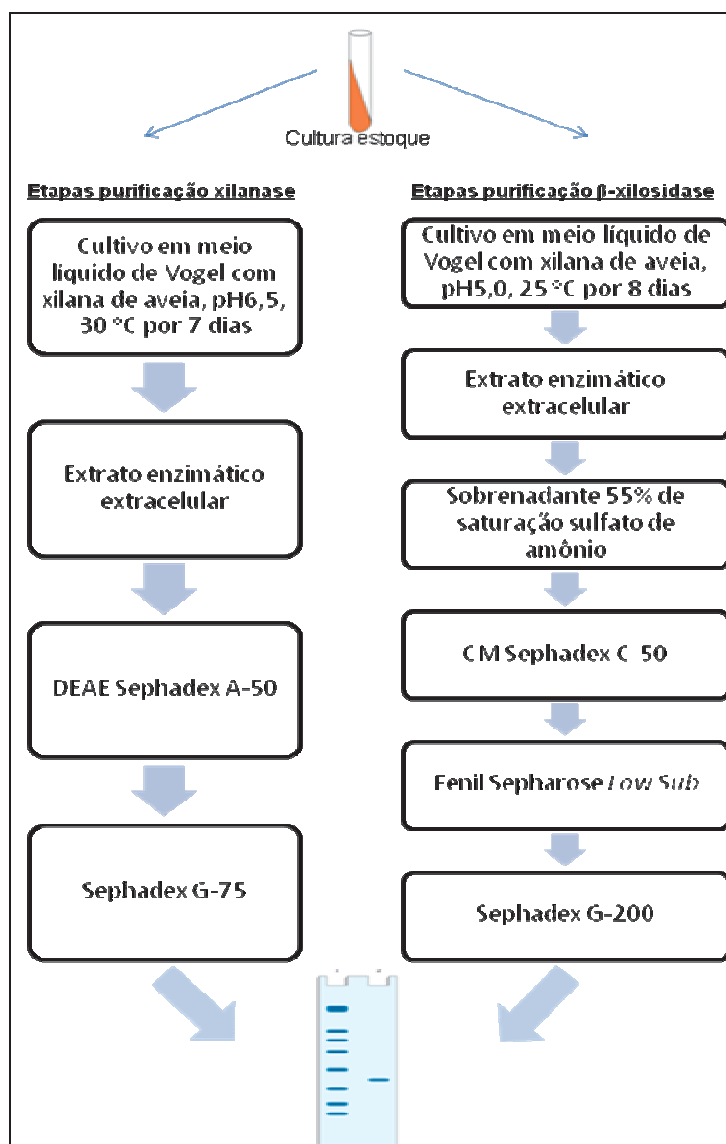
A essa amostra foi adicionado sulfato de amônio pulverizado na concentração 1,5 M, sendo esta então aplicada na coluna (1,6 x 10,0 cm) pré-empacotada de fenil agarose (HiprepTM 16/10 Phenyl FF *low sub*, GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,3 contendo 1,5 M de sulfato de amônio, sendo coletadas frações de 3,0 mL a um fluxo médio de 5,0 mL/min. Após a lavagem da coluna neste mesmo tampão, as proteínas adsorvidas foram eluídas com 100 mL de um gradiente linear decrescente de 1,5 a 0,5 M de sulfato de amônio em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,3. As frações com elevada atividade β -xilosidásica foram reunidas.

Esta amostra foi então dialisada contra tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,8, liofilizada, ressuspensa em 4 mL do mesmo e aplicada em coluna de Sephadex G-200 (2,5 x 64,0 cm) equilibrada no mesmo tampão. As proteínas foram eluídas

com o mesmo tampão a um fluxo médio de 18 mL/h, sendo coletadas frações de 3,0 mL. As frações que apresentaram elevada atividade foram reunidas.

Todas as etapas de purificação foram realizadas a 4 °C e, ao final de cada uma delas, procedeu-se a determinação de proteínas e da atividade enzimática da amostra resultante, sendo que alíquotas das mesmas foram reservadas, dialisadas contra tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,8, liofilizadas e utilizadas para caracterização eletroforética.

O **Quadro 1** apresenta a sequência de etapas realizadas para purificação das principais xilanase e β -xilosidase produzidas por *P. janczewskii*.



Quadro 1 – Etapas de purificação das principais xilanase (esquerda) e β -xilosidase (direita) produzidas por *P. janczewskii*.

3.5.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio – SDS-PAGE

A metodologia de eletroforese em sistema denaturante descrita por Laemli (1970) foi utilizada para a verificação do estado de pureza da enzima, bem como para determinação da massa molecular da mesma, utilizando-se géis de concentração crescente de poliacrilamida (8-18%). As amostras foram preparadas na proporção de 1:1 em tampão de amostra (glicerol 17,5%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,1% e Tris 0,12 M, pH 6,8) na presença de 10% de β -mercaptoetanol e aquecidas por 5 min em água fervente. As eletroforeses foram realizadas em tampão Tris 0,025 M glicina-NaOH 0,19 M pH 8,3 com SDS 0,1% (m/v), durante aproximadamente 3 h, sob corrente de 100 V. Após a corrida, procedeu-se a coloração de proteínas com *coomassie brilliant blue* R-250 0,1% (m/v) em metanol/ácido acético/água (4/1/5 v/v/v) por um período de 2h. Posteriormente, o gel foi descorado com solução de metanol/ácido acético/água (3/1/6 v/v/v) até a visualização das bandas de proteínas

3.6 Caracterização das principais xilanase e β -xilosidase produzidas por *P. janczewskii*

3.6.1 Determinação da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular

A determinação da massa da xilanase purificada foi realizada utilizando-se uma coluna de Sephadex G-75 (1,25 x 64,0 cm) equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,8. As proteínas soroalbumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), quimotripsinogênio (25 kDa) e ribonuclease (13,7 kDa) foram utilizadas como padrões. A determinação da massa da β -xilosidase foi realizada utilizando-se uma coluna de Sephadex G-200 (2,5 x 64,0 cm) equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,8. As proteínas β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e citocromo c (12,4 kDa) foram utilizadas como padrão.

A eluição foi efetuada com o mesmo tampão a um fluxo de 18,0 mL/h, sendo coletadas frações de 3,0 mL. Os volumes de eluição de cada proteína (V_e) e do *blue dextran* (V_o) foram medidos, sendo calculada a relação V_e/V_o . A massa molar da

enzima foi estimada a partir do gráfico logaritmo da massa molecular contra V_e/V_0 das proteínas padrão (ANDREWS, 1964).

3.6.2 Determinação da massa molecular por SDS-PAGE

A massa molecular das enzimas purificadas foi estimada a partir do gráfico do logaritmo da massa molecular das proteínas padrão contra suas respectivas mobilidades relativas em relação ao azul de bromofenol. Os padrões α -lactoalbumina (14,2 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovoalbumina (45 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa) e fosforilase b (97 kDa) foram utilizados para a xilanase, e os padrões miosina (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), desidrogenase glutâmica (55 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36 kDa) foram utilizados para a β -xilosidase.

3.6.3 Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade

Para determinação do pH ótimo de atividade, os ensaios de atividade foram realizados em uma faixa de pH, sendo utilizados diferentes tampões para comporem uma faixa para a xilanase e outra diferente para a β -xilosidase. Os mesmos tampões foram utilizados tanto para o preparo do substrato enzimático, quanto para completar o volume de reação. Os ensaios da xilanase foram realizados a 65 °C, com os tampões acetato de sódio 0,05 M de 4,0 a 5,5; imidazol 0,05 M de 6,0 a 7,0; Tris-HCl 0,05 M de 7,0 a 9,0; Sorensen (glicina-NaCl-NaOH) de 9,0 a 10,0. Os ensaios da β -xilosidase foram realizados a 75 °C, com tampão McIlvaine na faixa de pH de 2,5 a 7,0.

A temperatura ótima de atividade da xilanase foi determinada dosando-se as atividades nas temperaturas de 20 a 70 °C, com intervalos de 5 °C, em tampão imidazol 0,05 M pH 6,0. A temperatura ótima de atividade da β -xilosidase foi determinada dosando-se as atividades nas temperaturas de 60 a 90 °C, com intervalos de 5 °C, em tampão McIlvaine pH 5,0.

3.6.4 Estabilidade térmica e estabilidade ao pH

A estabilidade térmica foi avaliada após a incubação em banho-maria das enzimas purificadas sem a presença do substrato. Alíquotas foram retiradas em

intervalos de tempo variados para determinação da atividade residual, que foi ensaiada nas condições anteriormente citadas. A partir dos resultados obtidos, estimou-se o valor de T_{50} . A xilanase foi incubada a 40, 50 e 60 °C, e a β -xilosidase a 60, 70 e 75 °C

Para determinação da estabilidade em diferentes valores de pH, incubou-se uma alíquota das enzimas purificadas com diferentes tampões na proporção de 1:2 (v/v), que compuseram a faixa de pH avaliada (**item 3.6.3**). O procedimento foi realizado a 4 °C, e, após 24 h, determinou-se a atividade enzimática residual. A dosagem da atividade xilanolítica foi realizada em tampão imidazol 0,05 M pH 6,0 a 65 °C e a atividade β -xilosidásica foi realizada em tampão McIlvaine pH 5,0 a 75 °C.

3.6.5 Efeito de substâncias e íons metálicos

O efeito de algumas substâncias sobre a atividade das enzimas purificadas foi avaliado individualmente pela adição das mesmas às misturas de reação, realizando-se o cálculo das atividades em relação ao controle (ausência de substância).

Foram avaliados: 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 fenilmetilsulfonil (PMSF), 1,4-ditiotreitol (DTT) e β -mercaptoetanol, nas concentrações de 2 e 10 mM.

A dosagem da atividade xilanolítica foi realizada em tampão imidazol 0,05 M pH 6,0 a 65 °C e a atividade β -xilosidásica foi realizada em tampão McIlvaine pH 5,0 a 75 °C.

3.6.6 Cinética enzimática

As constantes cinéticas K_m e V_{max} foram determinadas conforme representação gráfica proposta por Lineweaver-Burk (LINEWEAVER e BURK, 1934). A dosagem da atividade xilanolítica foi realizada utilizando-se diferentes concentrações dos substratos xilana de bétula e xilana de aveia em tampão imidazol 0,05 M pH 6,0 a 65 °C. A dosagem da atividade β -xilosidásica foi realizada

utilizando-se diferentes concentrações do substrato p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo em tampão McIlvaine pH 5,0 a 75 °C.

3.6.7 Determinação de carboidratos totais

A determinação de carboidratos totais nas enzimas purificadas foi realizada pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), utilizando-se glicose como padrão. As leituras das absorbâncias foram realizadas a 495 nm.

3.6.8 Especificidade da β -xilosidase por substratos

Especificidade da β -xilosidase purificada foi avaliada utilizando-se os substratos sintéticos o-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo, p-nitrofenil α -L-arabinofuranosídeo, p-nitrofenil α -D-galactopiranosídeo, p-nitrofenil β -D-glucopiranosídeo os quais foram avaliados na concentração final de 0,04 M em tampão McIlvaine pH 5,0 a 75 °C. Os resultados foram expressos em relação à atividade observada com o substrato p-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo.

3.7 Produção de xilanases e β -xilosidases por *P. janczewskii* por fermentação em estado sólido com bagaço de malte (BSG) e análise do material fermentado

3.7.1 Linhagem: cultivo, manutenção e preparo do inóculo

A linhagem foi mantida em laboratório conforme descrito no **item 3.1**, e o inóculo foi preparado conforme descrito no **item 3.5.1**. Os conídios da linhagem foram suspensos em água destilada esterilizada, água de torneira esterilizada ou em solução de sais de Vogel, sendo a concentração ajustada para 10^7 esporos/mL. Um mililitro dessa suspensão foi utilizado para inocular os cultivos realizados em estado sólido.

3.7.2 Cultivos sólidos

Os cultivos sólidos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de bagaço de malte (BSG) seco. Este bagaço foi gentilmente cedido pela cervejaria Baungartner de Ipeúna/SP, sendo previamente lavado em água destilada e seco em estufa a 80 °C.

3.7.2 Obtenção das preparações enzimáticas

A extração das enzimas foi realizada adicionando-se 50 mL (ou 100 mL nos cultivos aos quais foram adicionados palha de arroz) de água destilada gelada ao meio fermentado o qual foi, posteriormente, submetido à agitação orbital (200 rpm, 30 min.), sob refrigeração. Esta suspensão foi filtrada a vácuo, e o filtrado foi utilizado como preparação de proteínas e enzimas extracelulares.

3.7.3 Efeito da umidade do substrato na produção de xilanases e β -xilosidases

Para realização destes experimentos, umidades de 20, 30, 40 e 50% (v/m), foram estabelecidas com água destilada, água de torneira ou solução de sais de Vogel (**item 3.2**). O meio foi então inoculado com uma suspensão de conídios, preparada conforme descrito anteriormente, sendo que para avaliação da influência de cada uma delas, os conídios também foram suspensos em água destilada, água de torneira ou solução de sais de Vogel. O cultivo foi realizado por sete dias a 28 °C.

3.7.4 Cinética de produção de xilanases e β -xilosidases

A produção de xilanases e β -xilosidases foi acompanhada por 15 dias de crescimento do fungo. A umidade do meio foi de 50% (v/m) estabelecida com solução de sais de Vogel e o cultivo realizado a 28 °C.

3.7.5 Efeito da temperatura de cultivo na produção de xilanases e β -xilosidases

O efeito da temperatura foi verificado realizando-se cultivos a 20, 25, 30 e 35 °C. A umidade do meio foi de 50% (v/m) estabelecida com solução de sais de Vogel e o tempo de cultivo foi de sete dias.

3.7.6 Efeito da adição de palha de arroz na produção de xilanases e β -xilosidases

Palha de arroz lavada e seca foi adicionada aos cultivos sólidos que continham BSG nas proporções 5:1, 5:2, 5:3, 5:4 e 5:5 (m/m). A umidade do meio foi de 50% (v/m) estabelecida com solução de sais de Vogel e o tempo de cultivo foi de sete dias a 30 °C.

3.7.8 Análise bromatológica

O BSG não fermentado e BSG fermentado foram realizadas pela Biobell Technologies, Mirassol, SP, sendo estas analisadas quanto às frações protéicas e para composição da parede celular. As amostras, preparadas nas mesmas condições, foram pré-secas e utilizadas na determinação do conteúdo de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) de acordo com AOAC (1990), e fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), segundo VAN SOEST et al. (1994).

3.7.9 Análise da composição em aminoácidos

A análise da composição em aminoácidos foi realizada no Departamento de Química da Unesp/Araraquara pelo Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli, pelo método da derivatização pós-coluna utilizando orto-phtalaldeído (OPA) em um analisador automático Shimadzu SCL-10Avp, acoplado a um detector de fluorescência RF-10Axl, utilizando uma coluna de troca iônica SHIM-PACK Amino-Na 6 mm x 100 mm (FOUNTOULAKIS e LAHM, 1998). As amostras (5 mg), do BSG não fermentado e do BSG fermentado, preparadas nas mesmas condições, foram hidrolisados com 1 mL de HCl 6 mol/L, na presença de 0,08 mL de fenol a 5% em H₂O, a 110°C por 72 h em atmosfera de N₂. Após a hidrólise, o material foi concentrado a vácuo, dissolvido em tampão de diluição NaS, pH 2,2 e filtrado em unidade filtrante GV Millex - Millipore previamente à injeção. Para o cálculo da proporção relativa dos aminoácidos da amostra, determinou-se a relação entre as suas concentrações unitárias e a média (FOUNTOULAKIS e LAHM, 1998).

3.7.10 Análise de micotoxinas

A análise de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2), ocratoxina A, desoxinivalenol, zearelenona e patulina no BSG lavado apenas e no material fermentado foi realizada pela Eurofins do Brasil Análise de Alimentos Ltda, de acordo com métodos internos estabelecidos pela empresa.

3.8 Aplicação do filtrado de cultura de *P. janczewskii* no biobranqueamento de polpa *kraft*

3.8.1 Produção das enzimas xilanolíticas

O extrato enzimático foi obtido a partir do cultivo da linhagem de *P. janczewskii* cultivado em meio líquido de Vogel com xilana de aveia pH 6,5 a 30 °C. Após sete dias de cultivo o meio foi filtrado e centrifugado, sendo este sobrenadante utilizado como fonte enzimática.

3.8.2 Determinação do rendimento

O peso seco da polpa foi determinado antes e após o tratamento enzimático a partir do qual foi calculado o rendimento.

3.8.3 Polpa

A polpa *kraft* de eucalipto foi produzida no Laboratório de Química e Celulose do Depto. de Ciências Florestais (Esalq/USP) sob responsabilidade do Prof. Dr. Francides Gomes da Silva Jr. Esta polpa foi pré-branqueada com oxigênio apresentando número kappa inicial de 8,5 unidades.

3.8.4 Tratamento enzimático da polpa

O extrato enzimático foi aplicado à aplicada à polpa, baseando-se na atividade xilanolítica, sendo empregadas cargas enzimáticas de 2, 4, 8, 18 e 32 U/g de polpa seca, sendo a dosagem da atividade realizada conforme **item 3.3**. Os experimentos foram realizados em sacos de polietileno por 1 e 2 h, ambos com consistência da polpa de 10% em pH $5,5 \pm 0,2$ a 50 °C. Após o tratamento, a polpa foi lavada com H₂O destilada e filtrada. Controles foram preparados utilizando-se apenas água destilada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.8.5 Viscosidade

A viscosidade da polpa foi determinada com viscosímetro capilar utilizando-se etilenodiamina cúprica, de acordo com metodologia padrão (TAPPI T-230 om-94; NBR 7730:1998).

3.8.6 Determinação do número kappa

O número kappa das polpas foi determinado pela oxidação do permanganato de potássio e titulação com tiosulfato de sódio, de acordo com metodologia padrão (TAPPI,1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivo para produção de xilanases e β -xilosidases por *P. janczewskii*

Após o crescimento das culturas em condições previamente determinadas como sendo aquelas nas quais se obteve alta atividade específica para cada enzima (TERRASAN, 2007), o meio líquido de cultura foi separado da colônia, centrifugado e utilizado como fonte extracelular das enzimas estudadas. Cabe ressaltar que ambas as enzimas foram encontradas no meio de cultura. As xilanases fúngicas são sempre encontradas extracelularmente, entretanto, as β -xilosidases podem ser tanto encontradas extracelularmente, quanto associada ao micélio. No caso da β -xilosidase produzida por *P. janczewskii*, a maior porção da enzima é encontrada no meio de cultura, já em culturas de *P. herquei* (ITO et al., 2003) e *P. sclerotiorum*

(KNOB e CARMONA, 2009) esta enzima encontra-se associada ao micélio fúngico. A localização extracelular destas enzimas é bastante interessante, pois, facilita o processo de extração, diminuindo os custos de purificação.

4.2 Purificação da principal xilanase de *P. janczewskii*

A primeira etapa de purificação da xilanase foi a cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE Sephadex A-50 equilibrada em tampão imidazol 0,05 M pH 6,0. Após a realização desta cromatografia (**Figura 4**), verificou-se atividade xilanolítica tanto na fração adsorvida, quanto na não adsorvida na resina cromatográfica. Tal fato indica a existência de mais de uma xilanase produzida por este fungo. Conforme mencionado, a presença de múltiplas xilanases produzidas por micro-organismos é bastante comum. Essas xilanases se diferenciam em suas propriedades físico-químicas, mecanismos de ação, estruturas e especificidade por substratos (COLLINS et al., 2005). Belancic et al. (1995) purificaram duas xilanases, XynA e XynB, de *P. purpurogenum* que apresentaram pH ótimo de atividade bastante diferente. Filho et al. (1993) e Ryan et al. (2003) purificaram três xilanases, XynA, XynB e XynC, de *P. capsulatum*, enquanto que quatro xilanases, XYNA, XYNB, XYNC e XYND, com propriedades bastante distintas foram purificadas do filtrado de cultura de *P. funiculosum* (FURNISS et al., 2002; ALCOCER et al., 2003; FURNISS et al., 2005).

As frações não adsorvidas bem como as adsorvidas que apresentaram atividade foram separadamente reunidas, sendo então verificada maior atividade xilanolítica na fração não adsorvida, correspondendo a 90% da atividade inicial. Assim, prosseguiu-se a purificação com a enzima presente nesta fração, por se tratar da principal xilanase produzida pelo fungo.

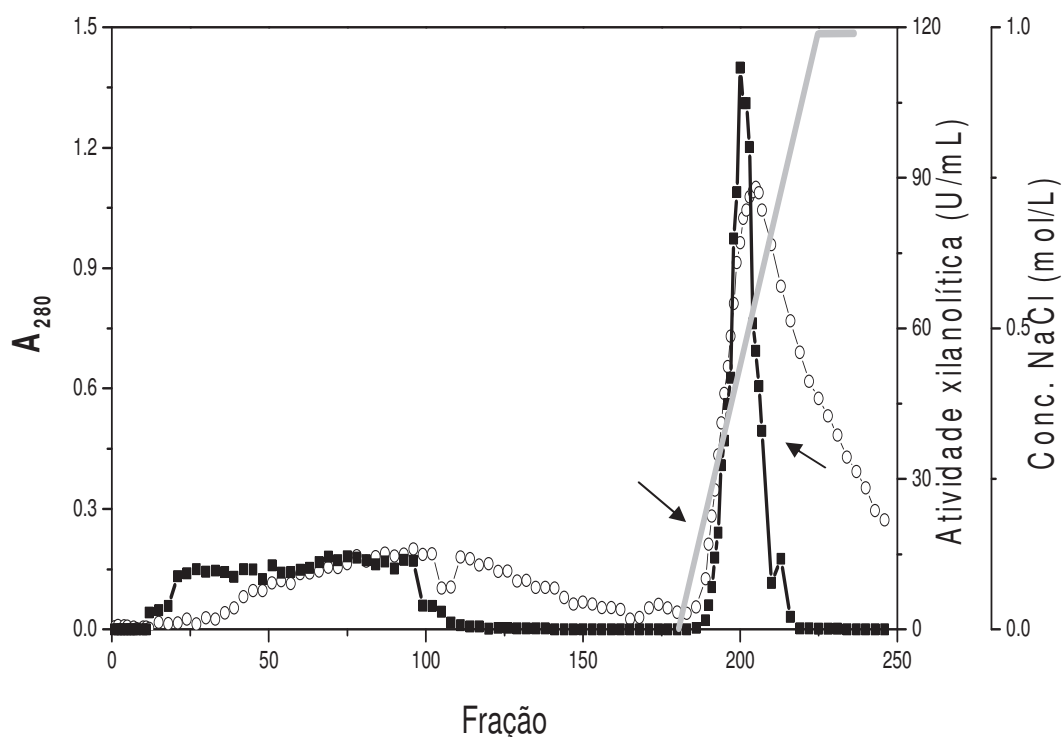


Figura 4 - Perfil cromatográfico de eluição das xilanases de *P. janczewskii* em DEAE Sephadex A-50 equilibrada em tampão imidazol 0,05 M pH 6,0. (○) A_{280} ; (■) atividade xilanólica (U/mL); (—) gradiente de NaCl; flechas indicam as frações reunidas.

A amostra constituída pelas frações não adsorvidas foi dialisada contra tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,8 e, posteriormente, liofilizada. Após liofilização, a amostra foi suspensa no mesmo tampão e submetida à cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75, que correspondeu à segunda etapa na estratégia de purificação desta proteína. Conforme apresentado na **Figura 5**, a enzima foi eluída em um único pico de atividade, indicando a presença de apenas uma xilanase nesta amostra. As frações com elevada atividade foram reunidas, sendo que um volume desta amostra foi liofilizado e utilizado para aplicação em eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.

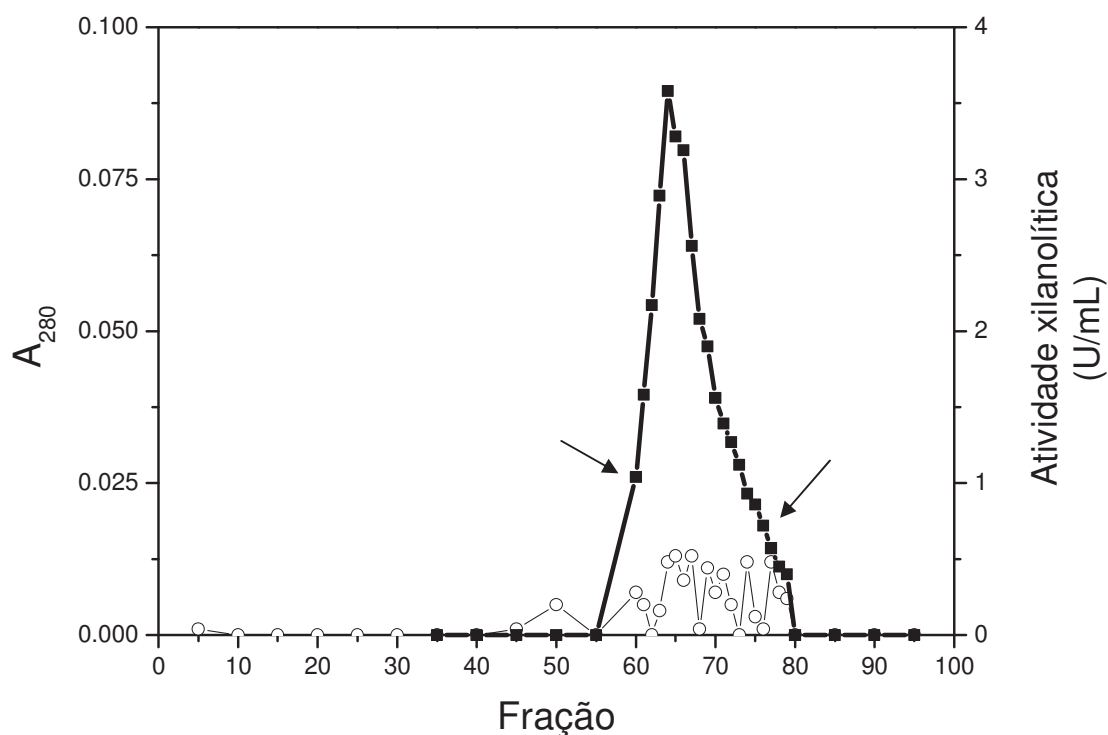


Figura 5 - Perfil cromatográfico da eluição da xilanase de *P. janczewskii* em Sephadex G-75 equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,8. (○) A_{280} ; (■) atividade xilanolítica (U/mL); flechas indicam as frações reunidas.

A partir da análise do perfil eletroforético da amostra em SDS-PAGE, verificou-se que após as duas etapas de purificação realizadas, a xilanase foi purificada, pois apresentou homogeneidade eletroforética (**Figura 6**).

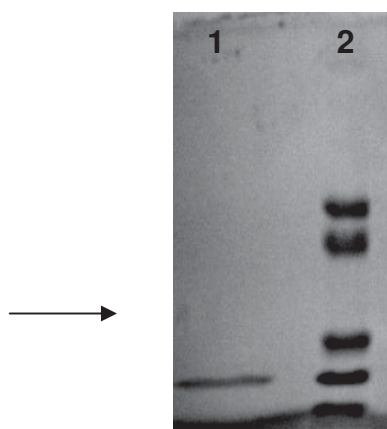


Figura 6 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE (8-18%) da principal xilanase de *P. janczewskii*. **Coluna 1:** amostra; **coluna 2:** fosforilase b (50 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa).

A **Tabela 5** resume as etapas utilizadas nesta estratégia de purificação da principal xilanase produzida por *P. janczewskii*. Ao final do processo, a purificação alcançada foi de 5,4 vezes e a recuperação obtida foi de 28,4%. A segunda etapa, provavelmente por ser uma etapa mais lenta e requerer a liofilização da amostra, foi crítica no desenvolvimento do processo, respondendo por grande parte da atividade perdida no processo.

Tabela 5 - Purificação da principal xilanase produzida por *P. janczewskii*.

Etapa	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg prot.)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Filtrado de cultura	9967,8	66,0	150,3	100,0	1,0
DEAE Sephadex A-50	8966,3	25,5	351,6	90,0	2,3
Sephadex G-75	2834,2	3,5	809,8	28,4	5,4

A atividade foi determinada em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 a 50 °C.

4.3 Purificação da principal β -xilosidase de *P. janczewskii*

A primeira etapa do processo de purificação da principal β -xilosidase produzida por *P. janczewskii* consistiu na precipitação de proteínas com sulfato de amônio. Verificou-se que 30% da atividade se encontrava na faixa de precipitação de 0-35%, menos de 5% na segunda faixa (35-55%), enquanto que a maior porção da enzima (66%) permaneceu no sobrenadante de 55% de saturação. A presença da enzima em distintas faixas de precipitação, provavelmente, indica que, da mesma maneira como ocorrido com as xilanases, ao menos duas β -xilosidases são produzidas por este fungo. A ocorrência de multiplicidade para β -xilosidases é bem menos relatado na literatura do que para xilanases, sendo, até o momento, verificado somente nos fungos *P. herquei* (ITO et al., 2003), *A. pulverulentus* (SULISTYO et al., 1995), os quais produziram duas β -xilosidases, e em *P. wortmanni*, que produziu quatro β -xilosidases (MATSUO et al., 1987), as quais foram purificadas e apresentaram propriedades bioquímicas distintas. Ou ainda,

como no caso de *P. sclerotiorum* que produziu duas xilanases (KNOB e CARMONA, 2010) e apenas uma β -xilosidase (KNOB e CARMONA, 2009), sugerindo que multiplicidade de β -xilosidases ocorra com menor frequência do que a de xilanases.

Apesar do baixo fator de purificação observado, a precipitação com sulfato de amônio foi utilizada como etapa inicial do processo de purificação da enzima em estudo, uma vez que houve boa recuperação da enzima e principalmente, por separar em frações distintas duas β -xilosidases produzidas por este fungo. O sobrenadante de 55% de saturação de sulfato de amônio, por apresentar a maior porção da enzima, foi então utilizado para a etapa subsequente de purificação.

O sobrenadante de 55% de saturação de sulfato de amônio foi dialisado contra tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,5 e aplicada em coluna de CM Sephadex C-50, sendo a desorção da enzima realizada pela aplicação de um gradiente crescente de pH de 4,5 a 5,7 neste mesmo tampão (**Figura 7**). Após a eluição, as frações que apresentaram atividade foram reunidas, constituindo a amostra para a próxima etapa de purificação.

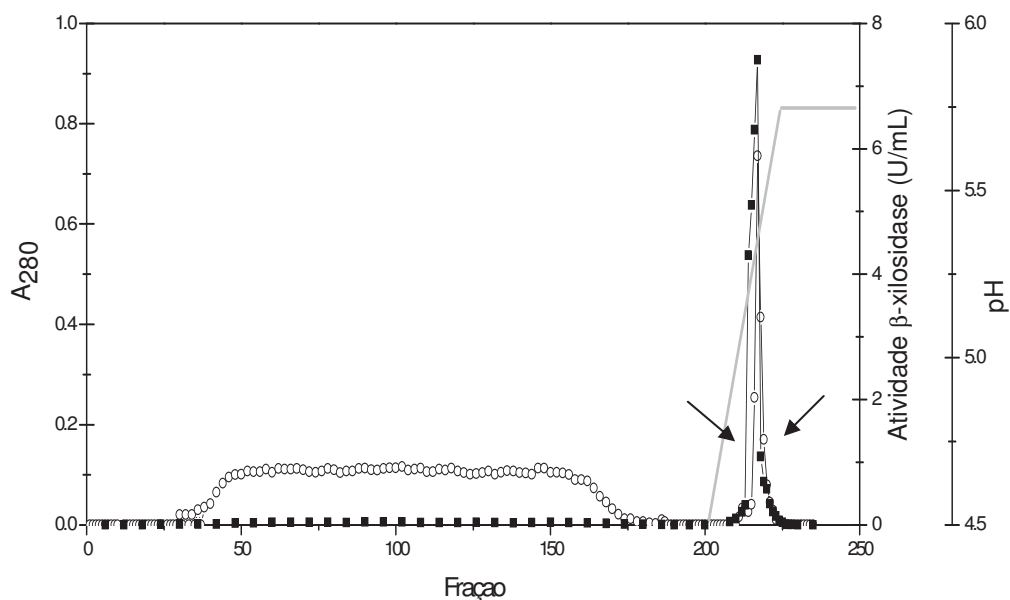


Figura 7 - Perfil cromatográfico de eluição das β -xilosidases de *P. janczewskii* em CM Sephadex C-50 equilibrada em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0. ($\circ$) A_{280} ; ($\blacksquare$) atividade β -xilosidásica (U/mL); (—) gradiente de pH; flechas indicam as frações reunidas.

Esta amostra teve seu pH aferido em pHmetro, apresentando o valor de 5,3. A ela foi adicionado sulfato de amônio 1,5 M, sendo então aplicada em coluna de interação hidrofóbica previamente equilibrada em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,3 com sulfato de amônio 1,5 M. A coluna foi lavada e, posteriormente, as proteínas ligadas foram desorvidas pela aplicação de um gradiente decrescente do sal, de 1,5 a 0,5 M (**Figura 8**). Neste cromatograma pode-se verificar que o pico de atividade não coincidiu com o de A_{280} , indicando a presença de outras proteínas com hidrofobicidade levemente diferente, mas as quais apresentam características acido-base similares, pois foram eluídas juntas na coluna de CM Sephadex anterior (**Figura 7**).

As frações desorvidas pela passagem do gradiente que apresentaram atividade foram reunidas constituindo a amostra utilizada na etapa seguinte de purificação. Após esta etapa, o processo apresentou rendimento de 15,81% e fator de purificação de 16,71.

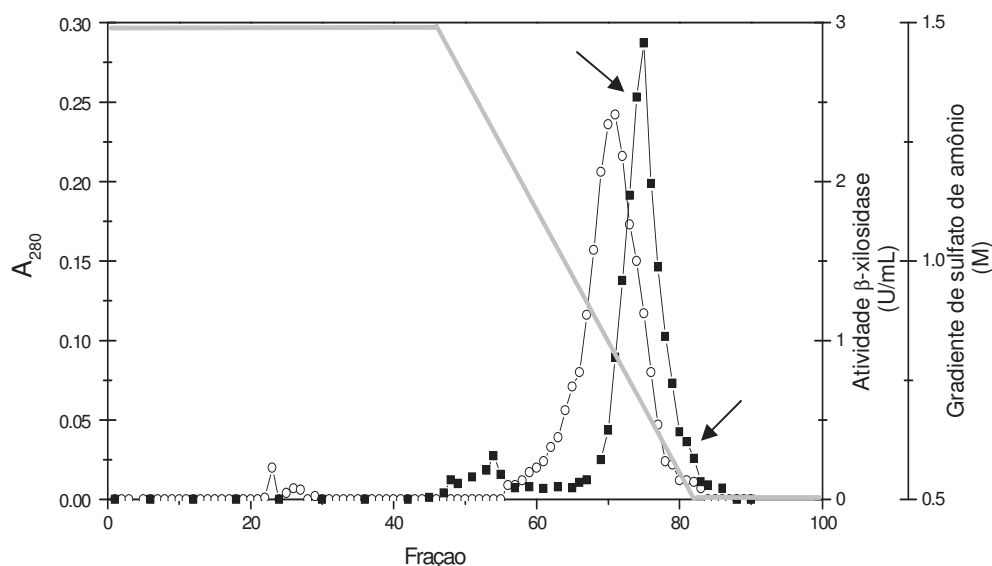


Figura 8 - Perfil cromatográfico de eluição da β-xilosidase de *P. janczewskii* em fenil agarose equilibrada em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,3. (○) A_{280} ; (■) atividade β-xilosidásica (U/mL); (—) gradiente de sulfato de amônio; flechas indicam as frações reunidas.

A amostra proveniente da cromatografia de interação hidrofóbica foi então dialisada contra tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,8, liofilizada, ressuspensa em 4 mL deste mesmo tampão e aplicada em coluna de filtração em gel Sephadex G-200 (**Figura 9**), adequada para separar proteínas com massa molar de 5 a 600 kDa, o que correspondeu à quarta etapa na estratégia de purificação desta proteína. A amostra foi eluída num único pico de atividade, e aqueles com elevada atividade foram reunidos, sendo uma amostra submetida à análise por SDS-PAGE.

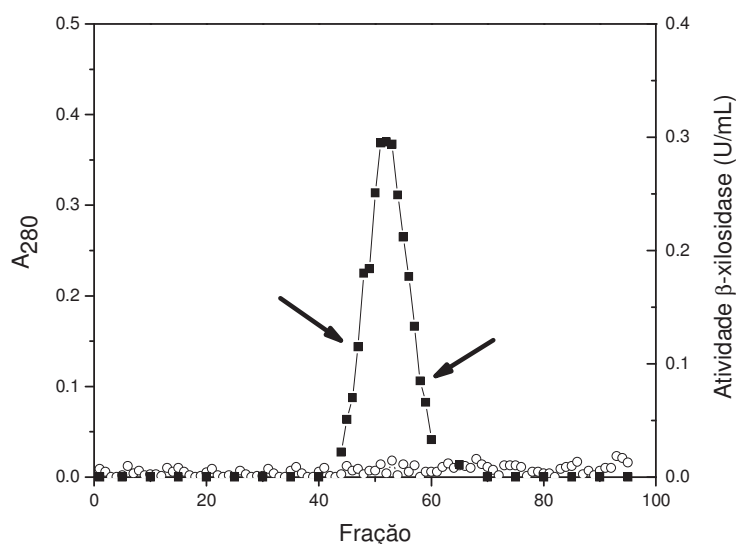


Figura 9 - Perfil cromatográfico da eluição da β -xilosidase de *P. janczewskii* em Sephadex G-200 equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,8. (○) A_{280} ; (■) atividade β -xilosidásica (U/mL); flechas indicam as frações reunidas.

A partir da análise do perfil eletroforético da amostra em SDS-PAGE (**Figura 10**), verificou-se que após as quatro etapas de purificação, a enzima estava purificada, pois apresentou homogeneidade eletroforética.



Figura 10 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE (8-18%) da principal β -xilosidase de *P. janczewskii*. **Coluna 1:** amostra; **coluna 2:** miosina (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), desidrogenase glutâmica (55 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36 kDa).

A **Tabela 6** resume as etapas utilizadas nesta estratégia de purificação da β -xilosidase produzida por *P. janczewskii*. O processo de purificação apresentou rendimento de 6,15%, sendo recuperadas 10,58 U ao final do processo.

As duas etapas finais apresentaram menor rendimento, entretanto, mostraram-se importantes, aumentando em muito o fator de purificação da enzima. Além disso, cabe ressaltar que estas etapas foram necessárias para a separação de outras proteínas que apresentavam características bastante semelhantes às da β -xilosidase purificada.

Verificada a homogeneidade eletroforética, esta amostra foi utilizada para os estudos de caracterização físico-química e cinética enzimática.

Tabela 6 - Purificação da principal β -xilosidase de *P. janczewskii*.

Etapa	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg prot.)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Filtrado de cultura	172,15	93,28	1,85	100,00	1,00
Sobrenadante 55% saturação sulfato de amônio	110,36	62,13	1,78	64,11	1,04
CM Sephadex C-50 pH 5,0	65,38	29,13	2,24	37,98	1,21
Fenil agarose	27,21	0,88	30,92	15,81	16,71
Sephadex G-200	10,58	0,01	1058,00	6,15	571,89

A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 75 °C.

4.4 Caracterização das principais xilanase e β -xilosidase purificadas de *P. janczewskii*

4.4.1 Determinação da massa molecular (MM)

Para determinação da massa molar das enzimas purificadas foram empregadas duas técnicas: PAGE-SDS que fornece essa informação a partir da proteína desnaturada; e a cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel, que permite a estimativa da massa molar da proteína na sua forma nativa, ambas utilizando proteínas padrão adequadas para cada uma delas. Para estimativa da MM da xilanase por filtração em gel foi utilizada uma coluna de Sephadex G-75, recomendada para proteínas globulares de MM entre 3 e 70 kDa, calibrada com proteínas de baixo peso molecular e, para a estimativa da MM da β -xilosidase, foi utilizada uma coluna de Sephadex G-200, recomendada para proteínas globulares na faixa de massa molar entre 5 e 600 kDa, calibrada com proteínas padrão de alto peso molecular.

A massa molecular da xilanase purificada de *P. janczewskii* estimada por SDS-PAGE e por filtração em gel foi de 30,4 e 23,6 kDa, respectivamente.

Conforme pode ser verificado com os dados reunidos na **Tabela 2**, a MM da xilanase de *P. jancezewskii* é semelhante às verificadas para as xilanases de outras espécies de *Penicillium*. A diferença de valores verificada entre as técnicas pode estar relacionada à diferença na estrutura terciária que a enzima apresenta ou até mesmo à interação da proteína com a resina Sephadex. Já a MM da β -xilosidase purificada foi de 100 e 200 kDa, estimada por SDS-PAGE e filtração em gel, respectivamente. Tal resultado indica que a enzima purificada é um dímero, sendo suas subunidades de mesma massa, uma vez que apenas uma banda foi observada por SDS-PAGE. Comparando-se com os dados apresentados na **Tabela 3**, a massa da β -xilosidase de *P. jancezewskii* é semelhante à da maioria das β -xilosidases fúngicas, que normalmente apresentam massa molecular acima de 100 kDa. Muitas podem ser ainda maiores, com massa ao redor de 200 kDa, geralmente correspondendo a dímeros ou trímeros protéicos, sendo que estes dímeros podem apresentar duas subunidades iguais (HEBRAUD e FEVRE, 1990; SULISTYO et al., 1995) ou diferentes, correspondendo a enzimas heterodiméricas como é o caso da β -xilosidase de *H. insolens* que apresenta uma subunidade com 17 e outra com 68 kDa (MOZOŁOWSKI e CONNERTON, 2009) e o da β -xilosidase de *P. sclerotiorum* com subunidades de 42 e 97 kDa (KNOB e CARMONA, 2010)

4.4.2 Determinação do pH ótimo

A xilanase purificada apresentou atividade elevada na faixa de pH entre 6,0 e 7,0, sendo que a atividade ótima foi verificada no pH 6,0 (**Figura 11a**). Entre pH 4,5 e 5,5, bem como entre 7,5 a 9,5 a atividade diminui para níveis inferiores. Este pH ótimo é o mesmo daqueles observados para as xilanases de *P. chrysogenum* (HAAS et al., 1992) e da linhagem *Penicillium. sp* AHT1 (RAHMAN et al., 2003).

A β -xilosidase purificada apresentou atividade elevada na faixa de pH entre 3,0 e 5,0, sendo a atividade máxima verificada no pH 5,0 (**Figura 11b**), e em pH fora desta faixa, a atividade diminui a níveis muitos inferiores. Este pH ótimo é semelhante ao da maioria das β -xilosidases fúngicas, que apresentam atividade ótima na faixa de 3,0 a 6,0. Contudo, algumas exceções já foram relatadas, destacando-se, dentre elas, a de *P. sclerotiorum* com atividade ótima em pH 2,5 (KNOB e CARMONA, 2010) e as de *T. thermophilus* (GUERFALI et al., 2008) e *S. thermophile* (KATAPODIS et al., 2006) com atividade ótima em pH 7,0.

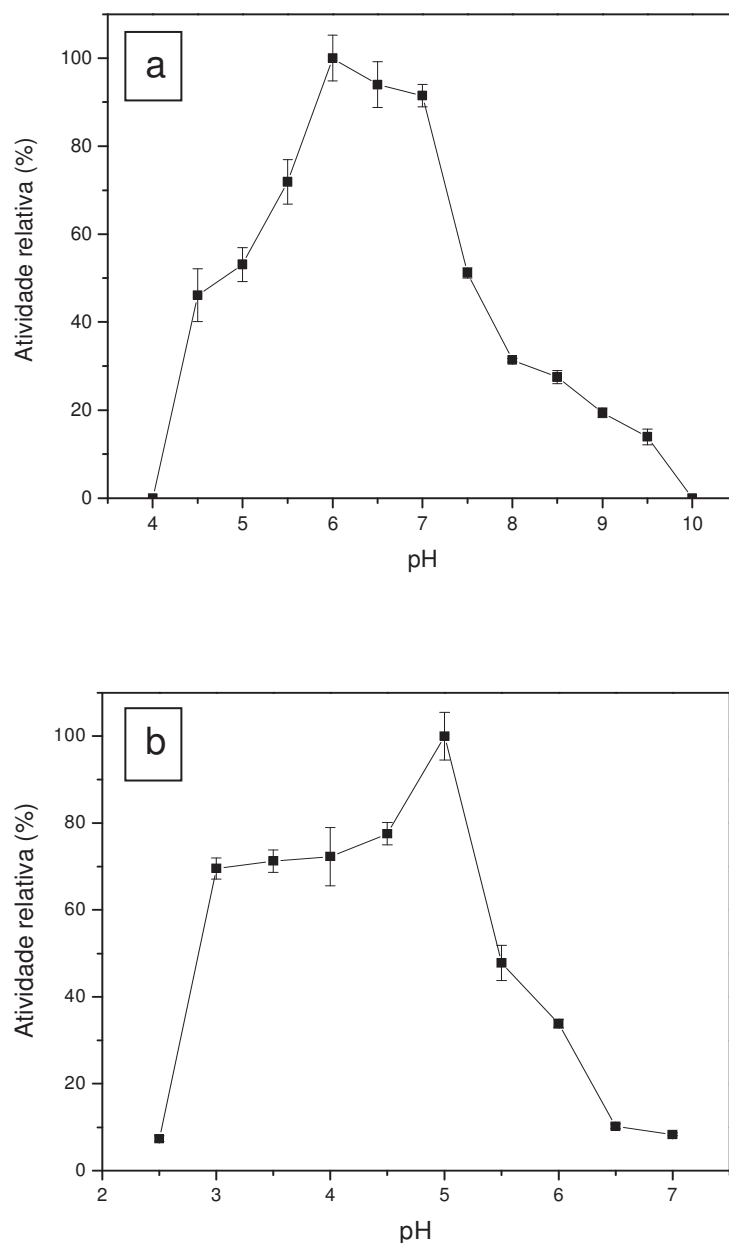


Figura 11 – Efeito do pH sobre a atividade das xilanase **(a)** e β -xilosidase **(b)** purificadas de *P. janczewskii*. **(a)** A atividade foi determinada em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 3,5 a 5,5; imidazol 0,05 M de pH 6,0 a 7,0, Tris-HCl 0,05 M pH de 7,5 a 8,5; Sorensen (Glicina-NaCl-NaOH) de 9,0 a 10,0, a 50 °C. **(b)** A atividade foi determinada em tampão McIlvaine de pH 2,5 a 7,0 a 75 °C.

4.4.3 Determinação da temperatura ótima

A temperatura ótima de atividade da xilanase foi observada a 65 °C (**Figura 12a**), sendo interessante notar que em temperaturas mais baixas a atividade foi

inferior a 60% da máxima observada. Atividade ótima em temperaturas elevadas foi observada somente para xilanase de *P. simplicissimum*, que apresentou atividade ótima a 67 °C (SCHMIDT et al., 1998). Já a 70 °C, a atividade foi 70% da máxima e a 75 °C apenas 10% dela foi observada.

A temperatura ótima de atividade da β -xilosidase foi observada a 75 °C, sendo que entre 70 e 80 °C a atividade também foi bastante elevada, não inferior a 80% da máxima observada. Abaixo de 70 °C, a atividade diminuiu para níveis inferiores a 60%, enquanto que a 85 °C a atividade foi 70% da máxima e a 90 °C apenas 30% dela foi observada (**Figura 12b**).

Assim como observado para a xilanase, a β -xilosidase produzida por este fungo também apresentou temperatura ótima de atividade elevada, ainda maior que a da xilanase. Atividade ótima em temperaturas elevadas não foi relatada para as β -xilosidases de outras espécies de *Penicillium*, somente em fungos do gênero *Aspergillus*, como *A. phoenicis* (RIZZATTI et al., 2001), *A. japonicus* (WAKIYAMA et al., 2008) e *A. fumigatus* (LENARTOVICZ et al., 2003) a qual foi verificada entre 70 e 75 °C. Esta característica apresentada pelas enzimas é muito interessante, especialmente considerando-se o caráter mesofílico do fungo. Tal característica é de fundamental importância, principalmente para uma futura aplicação desta enzima em processos nos quais elevadas temperaturas são requeridas, como na indústria de panificação e de polpa e papel, dentre outros.

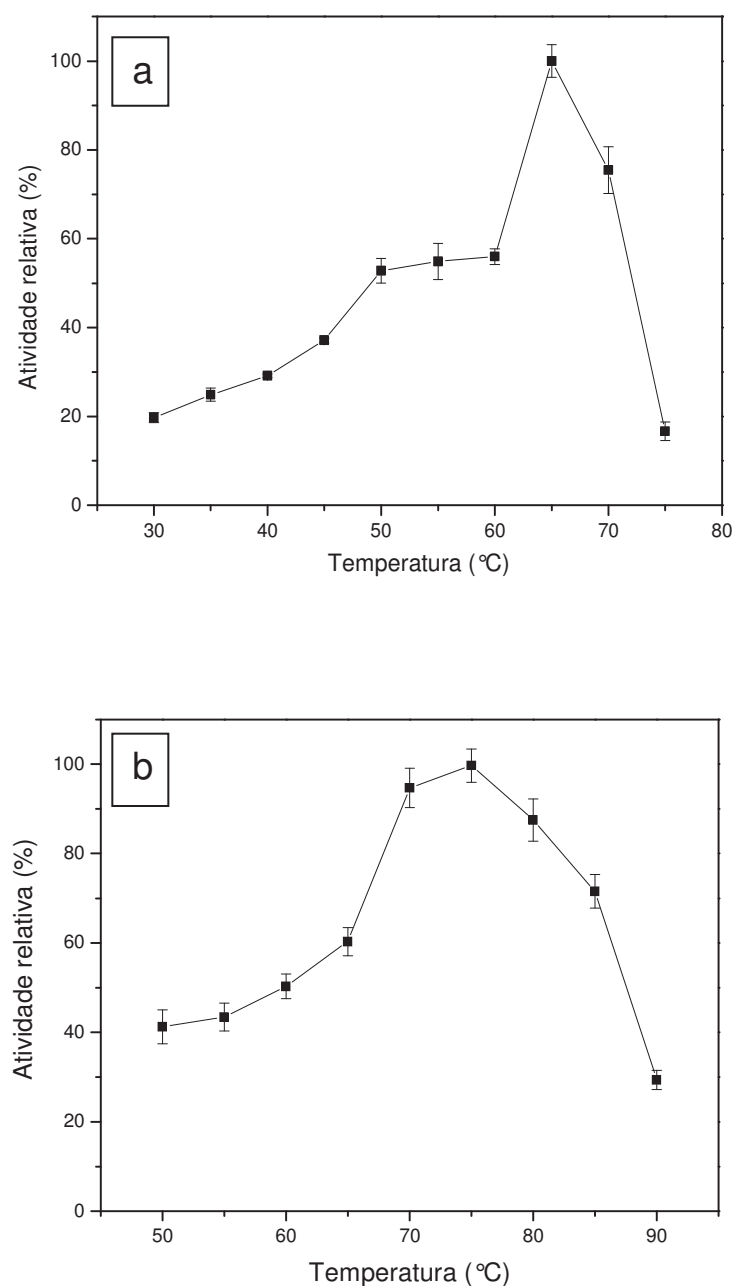


Figura 12 – Efeito da temperatura sobre atividade das xilanase **(a)** e β -xilosidase **(b)** purificadas de *P. janczewskii*. **(a)** A atividade foi determinada em tampão imidazol 0,05 M pH 6,0. **(b)** A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 5,0.

4.4.4 Estabilidade ao pH

Para verificação da estabilidade ao pH, incubou-se cada uma das enzimas purificadas em tampões de diferente pH, por um período de 24 h, à temperatura de 4 °C. De acordo com os resultados apresentados na **Figura 13a**, a xilanase

permaneceu com estabilidade acima de 50% numa ampla faixa de pH, de 2,5 a 10,0. Entretanto, nos pH 1,6 e 2,0 a enzima perdeu completamente sua atividade. Resultados semelhantes foram observados por Tanaka et al. (2005), que relataram que a xilanase de *P. citrinum* manteve mais de 80% da atividade na faixa de pH de 2,0 a 10,0 quando incubada por 3 h a temperatura ambiente.

Os resultados apresentados na **Figura 13b** mostram que a β -xilosidase foi mais estável em pH de 3,5 a 8,5, mantendo mais de 70% da atividade nesta faixa. Já em pH 3,0 a atividade foi reduzida em aproximadamente 50%, enquanto que em pH 2,5 esta redução foi de 60%. Em pH superior a 8,5 a atividade diminuiu, sendo esta redução na faixa de 60 a 70%.

A ampla faixa de pH na qual a enzima foi estável é interessante, principalmente quando se considera a faixa entre 3,0 e 5,0, na qual a β -xilosidase além de apresentar atividade elevada, também é bastante estável, possibilitando sua aplicação por um longo período em diferentes processos, que ocorrem nesse intervalo de pH.

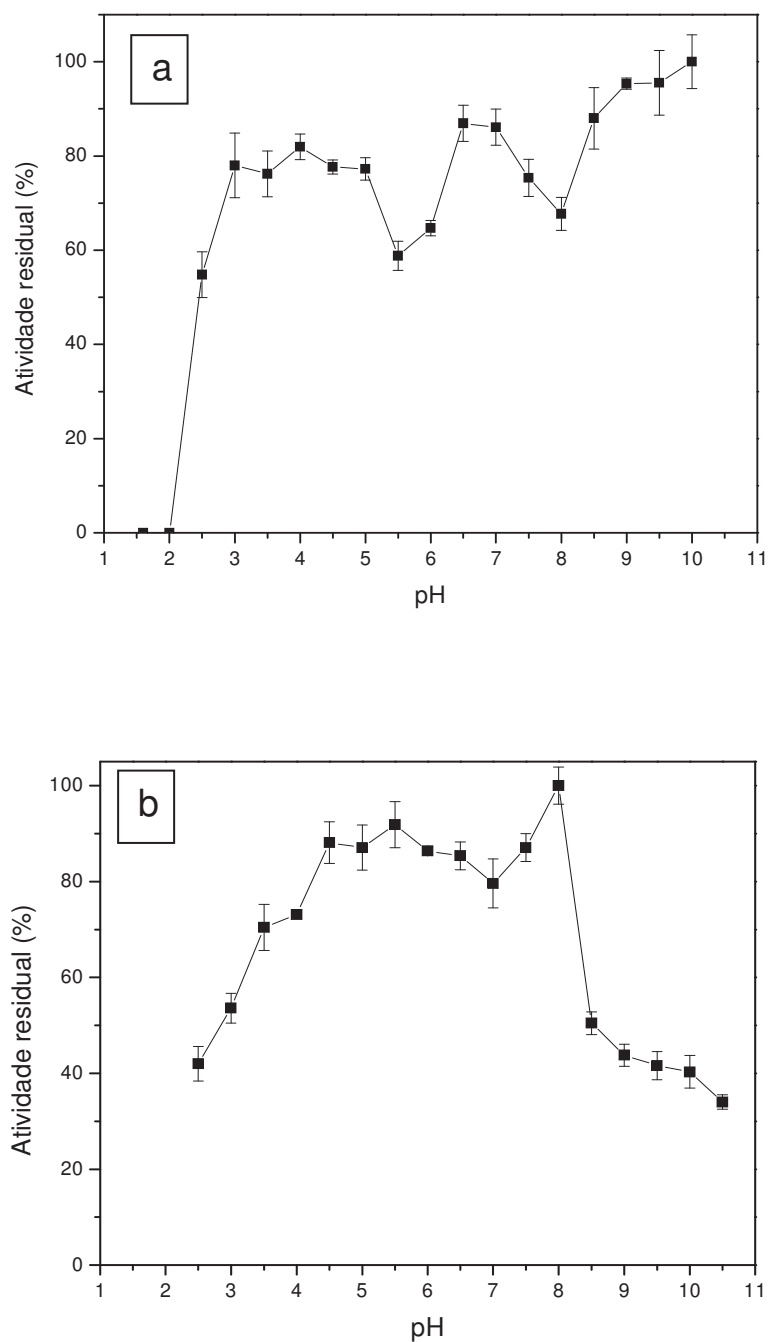


Figura 13 - Estabilidade da xilanase **(a)** e da β -xilosidase **(b)** purificadas de *P. janczewskii* em diferentes pH. A incubação das enzimas foi realizada por 24 h, a 4 °C. **(a)** A xilanase foi incubada nos tampões Sorensen (Glicina-NaCl-HCl) pH de 1,6 a 3,0; acetato de sódio 0,05 M de 3,5 a 5,5; imidazol 0,05 M de 6,0 a 7,0, Tris-HCl 0,05 M de 7,5 a 8,5; Sorensen (Glicina-NaCl-NaOH) de 9,0 a 10,0. A atividade foi determinada em tampão imidazol 0,05 M pH 6,0 a 65 °C. **(b)** A β -xilosidase foi incubada nos tampões Mcllvaine em pH de 2,5 a 8,0 e glicina-NaOH de 8,6 a 10,5. A atividade foi determinada em tampão Mcllvaine pH 5,0 a 75 °C.

4.4.5 Termoestabilidade

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 termoestabilidade da xilanase, a enzima purificada foi incubada sem substrato em meio tamponado sob diferentes temperaturas. O aumento da temperatura levou à diminuição do tempo necessário para que ocorresse desnaturação e conseqüente perda de atividade. Os valores estimados de meia-vida a 55, 60 e 65 °C foram, respectivamente, de 125, 16 e 6 min (**Figura 14a**).

Os resultados obtidos são bastante semelhantes àqueles observados por Li et al. (2007) que relataram que a xilanase de *P. oxalicum* reteve aproximadamente 80% da atividade após 1 h de incubação a 50 e 55 °C. Entretanto, a 60 °C, a xilanase de *P. janczewskii* foi menos estável que as de *P. purpurogenum* que perderam aproximadamente 40% da atividade quando incubadas por 3 h a 60 °C (BELANCIC et al., 1995) e a de uma linhagem de *Penicillium* que apresentou meia vida de 48 min (DURAND et al., 1984). Estas propriedades enzimáticas da xilanase purificada indicam uma possível aplicação nos processos que requerem temperaturas moderadas, ou moderadamente elevadas 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 para sua maior aplicabilidade (KUMAR et al., 2000; SRIPRANG et al., 2006).

Cabe ainda ressaltar que, quando comparada à atividade enzimática do filtrado de cultura, verificou-se que a enzima pura foi mais estável, uma vez que o valor de T_{50} na temperatura de 60 °C para a enzima no filtrado de cultura foi de apenas 2 min (TERRASAN, 2007). A menor estabilidade da enzima no filtrado de cultura provavelmente não se deve ao fator temperatura e sim à ação de enzimas proteolíticas, ou mesmo presença de inibidores.

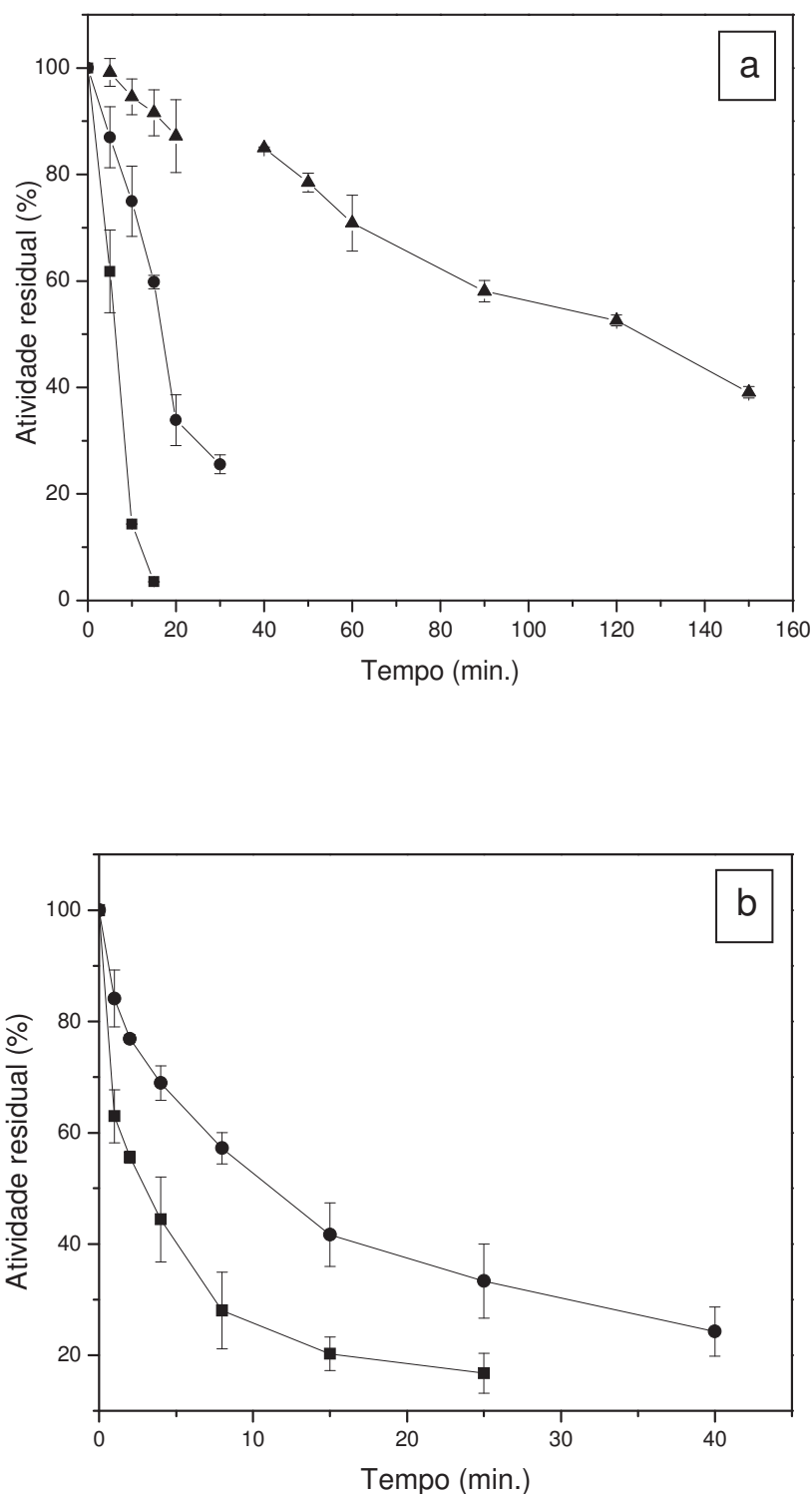


Figura 14 - Termoestabilidade das xilanase **(a)** e β -xilosidase **(b)** purificadas de *P. janczewskii*. A incubação da xilanase foi realizada a (▲) 55, (●) 60 e (■) 65 °C e a atividade foi determinada em tampão imidazol 0,05 M pH 6,0 a 65 °C. A incubação da β -xilosidase foi realizada a (●) 70 e (■) 75 °C e a atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 5,0 a 75 °C.

Comparando-se os resultados obtidos nas diferentes temperaturas 60, 70 e a 75 °C de incubação, verificou-se valores de meia-vida de 3 e 11 min para a β -xilosidase (**Figura 14b**). Já a 60 °C, a enzima não sofreu alteração, mantendo praticamente 100% de sua atividade ao longo das 6 h nas quais foi realizado este estudo. A elevada estabilidade térmica nesta temperatura também é importante, uma vez que a enzima apresenta além de estabilidade, elevada atividade nessas condições. Valores de meia-vida semelhantes (~5 e 15 min) foram obtidos para a β -xilosidase purificada do fungo termotolerante *A. phoenicis* nestas mesmas temperaturas, enquanto que a 60 °C esta enzima permaneceu sem perda de atividade por até 4 h.

4.4.6 Efeito de substâncias e íons metálicos

A **Tabela 7** apresenta o efeito de várias substâncias sobre a atividade das enzimas purificadas.

Os íons NH_4^+ e Na^+ foram os únicos a apresentar algum efeito ativador sobre a atividade da xilanase. Além destes, tanto DTT a 10 mM, quanto β -mercaptoetanol, em ambas as concentrações, estimularam a atividade da xilanase, o que pode ser explicado pela prevenção da oxidação dos grupos sulfidril na presença desses agentes, ou pela redução de pontes dissulfeto formadas, restaurando a conformação nativa da enzima, de alguma região específica ou mesmo do sítio catalítico. Esse efeito ativador do DTT também foi observado para as xilanases A e B de *P. capsulatum* (FILHO et al., 1993), entretanto, não foi verificado para a xilanase C deste mesmo fungo (RYAN et al., 2003) nem para a xilanase de *P. corylophilum* (MEDEIROS et al., 2003). Em relação à β -xilosidase, nenhum dos íons ou outras substâncias avaliados apresentou forte efeito ativador sobre a atividade enzimática, considerando o erro experimental.

Tabela 7 - Efeito de substâncias sobre a atividade (%) da xilanase e da β -xilosidase purificadas de *P. janczewskii*.

Enzima	Xilanase		β-xilosidase	
Substância	Concentração (mM)			
	2	10	2	10
Controle	100	100	100	100
CuCl ₂	ND	ND	78,3 ± 3,1	88,9 ± 8,4
ZnSO ₄	84,6 ± 5,5	83,1 ± 9,2	90,2 ± 9,5	87,3 ± 10,8
MnSO ₄	63,3 ± 8,7	49,4 ± 4,0	83,2 ± 4,4	89,3 ± 11,1
BaCl ₂	90,4 ± 7,4	108,4 ± 4,6	96,3 ± 8,7	111,9 ± 9,6
CaCl ₂	116,2 ± 9,4	100,3 ± 4,4	78,7 ± 9,0	84,43 ± 6,6
NH ₄ Cl	116,9 ± 11,8	131,3 ± 3,7	71,7 ± 9,6	91,8 ± 9,6
NaCl	131,9 ± 10,1	115,7 ± 10,1	78,7 ± 8,2	85,25 ± 4,9
SDS	ND	ND	56,6 ± 1,7	26,64 ± 1,6
PMSF	124,9 ± 23,1	55,5 ± 6,9	88,5 ± 9,9	97,95 ± 9,5
MgSO ₄	95,9 ± 3,1	104,7 ± 10,4	83,6 ± 6,2	108,6 ± 10,2
Citrato Na	120,9 ± 6,5	120,7 ± 6,4	74,2 ± 3,3	80,3 ± 3,3
DTT	97,5 ± 2,7	127,5 ± 2,0	56,6 ± 2,9	74,6 ± 10,9
CoCl ₂	115,4 ± 9,3	83,5 ± 8,2	88,1 ± 4,1	101,6 ± 8,8
HgCl ₂	85,6 ± 3,9	46,2 ± 3,4	ND	ND
Pb(CH ₃ COO) ₂	83,3 ± 3,1	26,7 ± 1,1	106,2 ± 6,2	107,8 ± 6,0
EDTA	119,9 ± 5,7	58,3 ± 2,7	65,2 ± 10,1	81,97± 9,9
β-mercaptoetanol	129,3 ± 4,1	138,5 ± 5,5	82,8 ± 4,1	75,0 ± 10,6

Os ensaios para atividade xilanolítica foram realizados em tampão imidazol 0,05 M pH 6,0 a 65 °C; e para atividade β -xilosidásica em tampão McIlvaine pH 5,0 a 75 °C.

ND: Atividade não detectada nas condições de ensaio.

A xilanase de *P. jancezewskii* foi apenas parcialmente inibida pelo íon Hg^{2+} . A inibição por Hg^{2+} parece ser uma propriedade geral das xilanases, sugerindo a presença de grupos tiol de cisteína no sítio ativo da enzima ou próximo a ele (BASTAWDE, 1992), sendo observada em *P. chrysogenum* (HAAS et al., 1992), *P. capsulatum* (RYAN et al., 2003), *Penicillium* sp AHT-1 (RAHMAN et al. 2003) e *P. citrinum* (DUTTA et al., 2006). Contudo, a inibição observada para a xilanase de *P. jancezewskii* não foi completa, mas apenas parcial. Já a β -xilosidase produzida foi completamente inibida por Hg^{2+} , no entanto, o que parece ser uma propriedade geral das xilanases, com exceção da xilanase purificada neste trabalho, não é observada para todas β -xilosidases fúngicas, sendo este efeito observado para as quatro β -xilosidases purificadas de *P. wortmanni* (MATSUO et al., 1987) e para aquela de *A. nidulans* (KUMAR e RAMÓN, 1996) mas não para a de *P. sclerotiorum* (KNOB e CARMONA, 2009).

O íon Cu^{2+} inibiu completamente a xilanase, mas apresentou apenas um efeito inibidor moderado na β -xilosidase. O íon Pb^{2+} apresentou forte efeito inibitório a 10 mM sobre a xilanase, mas nenhum efeito foi observado para a β -xilosidase deste fungo.

Os íons Zn^{2+} , Mn^{2+} também apresentaram efeito inibitório moderado e intermediário, respectivamente, na atividade da xilanase, mas praticamente não inibiram a atividade da β -xilosidase. Os íons Ca^{2+} , Ba^{2+} e Co^{2+} praticamente não apresentaram efeito sobre a atividade das enzimas.

A inibição com EDTA verificada em ambas as enzimas, e mais acentuadamente para a xilanase com esta substância a 10 mM sugere que as enzimas devem requerer algum íon metálico como cofator.

A β -xilosidase foi fortemente inibida, enquanto que xilanase foi completamente inibida por SDS indicando a importância das interações hidrofóbicas para manutenção da estrutura tridimensional das enzimas.

PMSF apresentou efeito inibidor somente para a xilanase e apenas na concentração de 10 mM.

4.4.7 Cinética enzimática

As constantes cinéticas da xilanase purificada de *P. jancezewskii* foram estudadas tanto em xilana de aveia, uma arabinoxilana ramificada, quanto em xilana

de bétula, uma xilana com poucas ramificações e aproximadamente 94% de xilose. A enzima apresentou típico comportamento michaelieliano para ambos os substratos, e, a partir da linearização dos resultados, apresentados nos gráficos duplo-recíprocos (**Figura 15**), pode-se calcular os respectivos valores de K_m , V_{max} , k_{cat} e k_{cat}/K_m (**Tabela 8**).

O valor de K_m foi menor para a xilana de aveia, e, considerando os valores obtidos, a afinidade por este substrato ramificado é maior que por xilana de bétula. Estes valores são semelhantes aos obtidos para as xilanases de *P. chrysogenum* (HAAS et al., 1991) e *Penicillium sp* 40 (KIMURA et al., 2000), entretanto a xilanase de *P. chrysogenum* apresentou praticamente a mesma afinidade para ambos substratos (K_m 4,1 e 4,2). O valor de V_{max} foi maior para xilana de bétula, um substrato mais solúvel que a xilana de aveia. Contudo, os valores de k_{cat} , ou melhor, as relações k_{cat}/K_m são mais indicadas para avaliação da eficiência catalítica. Assim, apesar de o número de renovação (k_{cat}) ser maior com a xilana de bétula, o menor valor de K_m obtido com a xilana de aveia implica numa maior eficiência catalítica na degradação deste substrato.

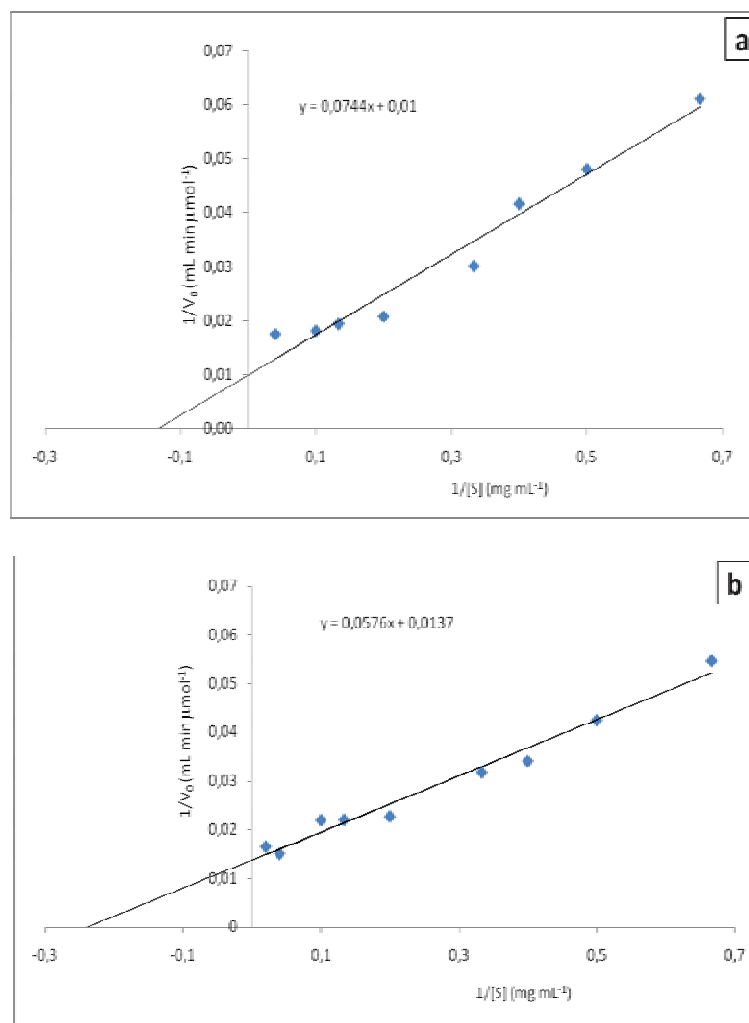


Figura 15 - Cinética enzimática da xilanase purificada de *P. janczewskii* em xilana de bétula (a) em xilana de aveia (b).

Tabela 8 – Constantes cinéticas da xilanase purificada de *P. janczewskii*.

Substrato	Constante cinética			
	K_m	V_{max}	k_{cat}	k_{cat}/K_m
	(mg mL $^{-1}$)	($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$)	(s $^{-1}$)	(mM $^{-1} \text{s}^{-1}$)
Xilana de bétula	7,5	100,0	925,9	18,5
Xilana de aveia	4,2	73,0	675,8	22,5

As constantes cinéticas da β -xilosidase purificada de *P. janczewskii* foram determinadas com o substrato p-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo. A enzima apresentou típico comportamento michaeliano e, a partir da linearização dos resultados, apresentados nos gráficos duplo-recíprocos (**Figura 16**), pode-se calcular os valores de K_m , V_{max} , k_{cat} e k_{cat}/K_m , sendo eles, respectivamente, de 3,41 mM; 33,21 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$; 110,67 s^{-1} e 32,42 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$.

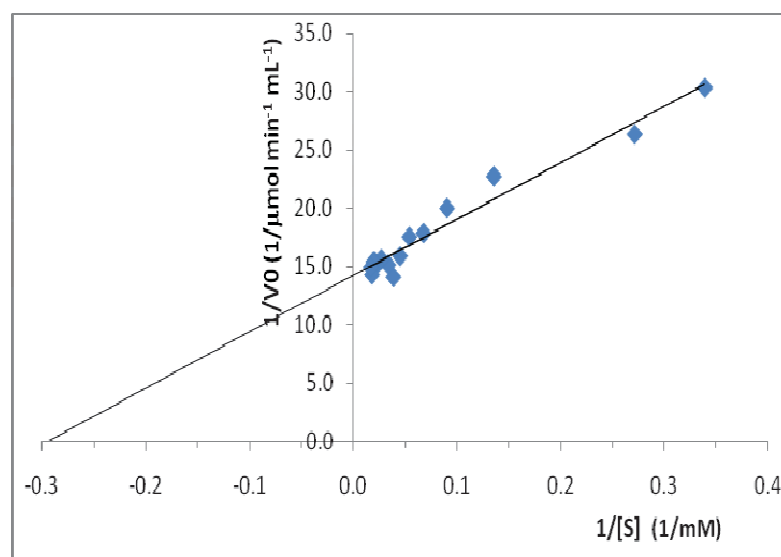


Figura 16 - Cinética enzimática da β -xilosidase purificada de *P. janczewskii* em p-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 5,0 a 75 °C.

4.4.8 Determinação de carboidratos totais

A análise de carboidratos revelou que ambas as enzimas são glicoproteínas. A glicosilação tem um papel fundamental em uma série de eventos celulares, sendo que, em geral, sua função é a de ajudar no dobramento do polipeptídeo nascente e na estabilização conformacional da proteína madura (WANG et al., 1996; MITRA et al., 2006). Somera et al. (2009) verificaram diferenças nas propriedades bioquímicas das β -xilosidases de *A. versicolor* após sofrerem deglicosilação, e uma significativa diminuição na estabilidade térmica dessa enzimas. Além disso, a glicosilação parece atuar protegendo as enzimas do ataque de proteases (van de VYVERA et al., 2004), o que é importante considerando-se as características intrínsecas de alguns processos nos quais as enzimas xilanolíticas podem ser aplicadas.

Para a xilanase purificada, foi verificada a proporção de 78,3% de carboidratos. Esta proporção é superior àquela observada para as xilanases I e II de *P. capsulatum* com glicosilação de 58,5 e 33,4%, respectivamente (FILHO et al., 1993), mas semelhante à da xilanase I de *Aspergillus versicolor* de 71% (CARMONA et al., 1998) e inferior à observada em *Scytalidium thermophilum* de 90% (ZANOELO et al., 2004).

Já a β -xilosidase apresentou 10,5% de carboidratos, porcentagem bastante semelhante à verificada para a β -xilosidase de *S. thermophilum* (ZANOELO et al., 2004), mas inferior aos 56,4% verificados para a de *P. sclerotiorum* (KNOB e CARMONA, 2011).

4.4.9 Especificidade da β -xilosidase por substratos

A β -xilosidase purificada não apresentou atividade sobre os substratos p-nitrofenil α -L-arabinofuranosídeo, p-nitrofenil α -D-galactopiranosídeo, p-nitrofenil β -D-glucopiranosídeo, sendo esta verificada somente sobre o-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo, correspondendo somente a 22% da atividade verificada sobre p-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo. Atividade sobre diversos substratos sintéticos (KNOB et al., 2010), especialmente p-nitrofenil α -L-arabinofuranosídeo, é verificada em muitas β -xilosidase fúngicas (KNOB e CARMONA, 2011) e se deve principalmente à similaridade espacial entre D-xilose e L-arabinose (LI et al., 2000; MAI et al., 2000), sendo assim, a β -xilosidase de *P. janczewskii* pode ser considerada altamente específica.

4.5 Produção de xilanases e β -xilosidases por *P. janczewskii* em cultivo sólido com bagaço de malte e análise do material fermentado

4.5.1 Efeito da umidade inicial do substrato

O efeito da umidade inicial do substrato é um dos fatores chave que influenciam a produção enzimática em cultivo sólido. Verificou-se uma produção crescente de enzimas com o aumento da umidade, com maior produção nos cultivos de 50%, sendo obtidos valores estatisticamente menores em condições de menor umidade (**Tabela 9**). Muitos trabalhos relataram efeitos similares com a utilização de teores intermediários ou elevados de umidade favorecendo a produção dessas enzimas xilanolíticas (NARANG et al., 2001; BAKRI et al., 2003; PANAGIOTOU et

al., 2006; YANG et al., 2006; MAMMA et al., 2007; MACIEL et al., 2008; XIROS et al., 2008a; b).

Tabela 9 - Produção de xilanases e β -xilosidases por *P. janczewskii* em cultivo em meio sólido de BSG, com diferentes teores de umidade fornecidos por solução de sais de Vogel, água destilada ou água de torneira.

	Umidade (%)	Atividade			
		Xilanase		β -xilosidase	
		(U/g BSG)	(U/mg prot.)	(U/g BSG)	(U/mg prot.)
Solução Vogel	20	22,8 $\pm$ 2,3	38,6 $\pm$ 2,1	0,020 $\pm$ 0,010	0,028 $\pm$ 0,020
	30	145,7 $\pm$ 13,1	102,8 $\pm$ 11,2	0,098 $\pm$ 0,011	0,071 $\pm$ 0,009
	40	209,2 $\pm$ 6,4	134,4 $\pm$ 4,0	0,170 $\pm$ 0,005	0,109 $\pm$ 0,003
	50	370,0 $\pm$ 30,1	159,3 $\pm$ 8,9	0,246 $\pm$ 0,015	0,106 $\pm$ 0,009
Água destilada	20	19,5 $\pm$ 1,9	2190,2 $\pm$ 75,9	0,021 $\pm$ 0,002	2,586 $\pm$ 0,126
	30	80,8 $\pm$ 2,1	4474,3 $\pm$ 318,6	0,102 $\pm$ 0,006	5,603 $\pm$ 0,149
	40	165,6 $\pm$ 7,4	5853,3 $\pm$ 382,7	0,188 $\pm$ 0,006	6,642 $\pm$ 0,238
	50	263,9 $\pm$ 7,0	7889,2 $\pm$ 407,1	0,246 $\pm$ 0,016	7,341 $\pm$ 0,565
Água torneira	20	12,8 $\pm$ 0,4	1858,3 $\pm$ 112,9	0,015 $\pm$ 0,001	2,136 $\pm$ 0,025
	30	53,2 $\pm$ 2,7	3641,8 $\pm$ 138,5	0,055 $\pm$ 0,002	3,736 $\pm$ 0,080
	40	136,7 $\pm$ 10,4	5419,3 $\pm$ 337,0	0,134 $\pm$ 0,007	5,466 $\pm$ 0,419
	50	169,7 $\pm$ 4,8	4954,7 $\pm$ 149,4	0,181 $\pm$ 0,016	5,283 $\pm$ 0,489

Além disso, cabe ressaltar que a maior produção de xilanases foi verificada quando a umidade foi fornecida por solução de sais de Vogel, quando comparada com os valores obtidos pela utilização de água destilada ou água de torneira. Já no caso da produção de β -xilosidases, valores similares foram obtidos tanto com a utilização da solução de sais, quanto com água destilada. Tais resultados sugerem que, além da umidade, os diferentes sais presentes nesta solução favoreceram o crescimento do fungo, bem como a maior produção de xilanases; entretanto, não tiveram efeito na produção de β -xilosidases.

Este efeito pode ser atribuído ao crescimento mais rápido do micro-organismo com a utilização de maior umidade, favorecendo a maior produção de enzimas (KALOGERIS et al., 1998).

4.5.2 Cinética de produção enzimática

O estudo cinético foi realizado a fim de se selecionar o melhor tempo de cultivo para obtenção da maior produção de xilanases e β -xilosidases.

Conforme observado na **Figura 17a**, a produção de xilanases foi crescente até o sétimo dia, no qual foi máxima, correspondendo a 239,2 U/g BSG, decaindo no oitavo, a partir do qual se manteve estável até o 11º dia, decaindo lentamente nos dias posteriores. Os maiores valores de atividade específica foram verificados do quinto ao sétimo dia (112,4 U/mg prot.), e valores menores fora desse período.

Dentro do erro experimental, a produção de β -xilosidases foi crescente até o oitavo dia, correspondendo a 0,285 U/g BSG e decaindo a partir deste. Os maiores valores de atividade específica foram verificados do quarto ao sexto dia, correspondendo a 0,141 U/mg prot (**Figura 17b**).

Os resultados obtidos neste trabalho em relação ao tempo de cultivo são semelhantes aos obtidos por outras linhagens fúngicas: Yang et al. (2006) observaram maior produção de xilanases por *Paecilomyces thermophila* com oito dias de cultivo em meio sólido com farelo de trigo; Panagiotou et al. (2006) cultivando *P. brasilianum* em meio sólido com BSG observaram maior produção de xilanase, arabinofuranosidase e ferruloil esterase com 96, 108 e 196 h (4, 4,5 e 8,17 dias) de cultivo, e Xiros et al. (2008a) observaram maior produção de praticamente todas as enzimas xilanolíticas por *Fusarium oxysporum* com 144 h (seis dias) de cultivo, utilizando FES em reator com uma mistura de BSG e sabugo de milho. Esses resultados são coerentes, uma vez que a ação da β -xilosidase é requerida após a ação inicial da xilanase sobre o substrato.

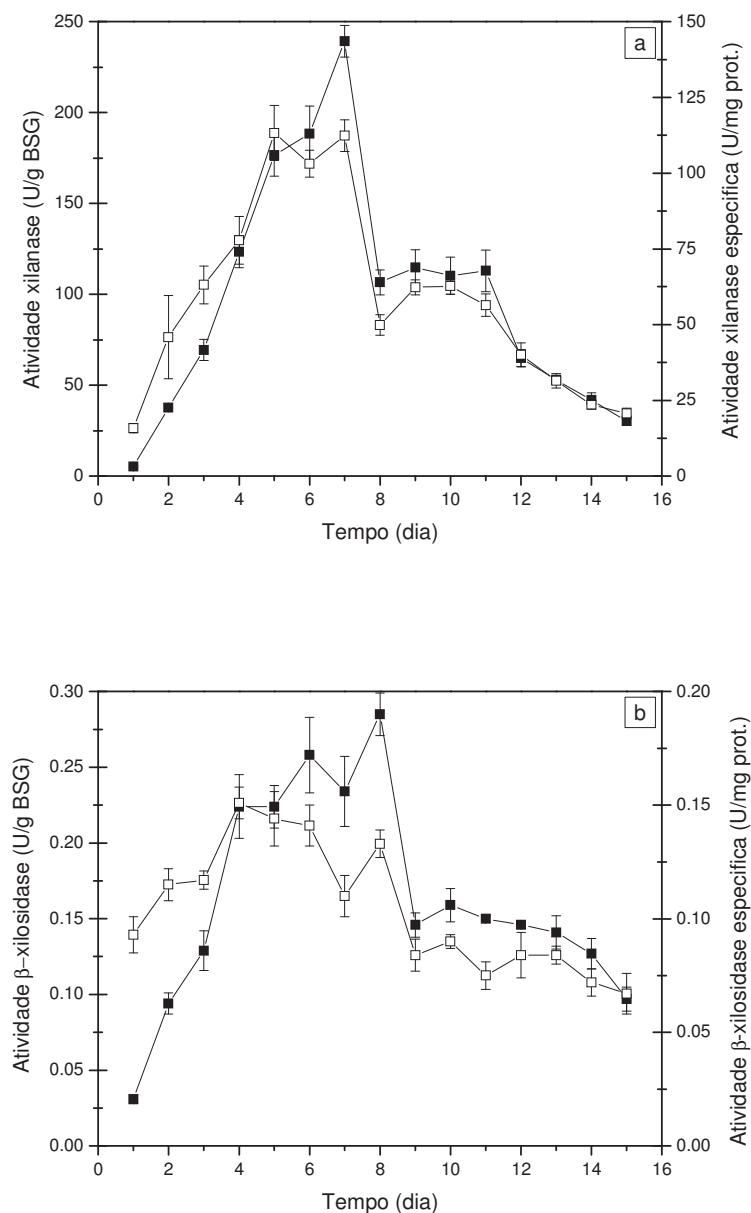


Figura 17 - Cinética de produção de xilanases (a) e β -xiliosidases (b) por *P. janczewskii* em cultivo em estado sólido com bagaço de malte. Condições de cultivo: umidade inicial do substrato de 50% (m/v), fornecida pela adição de solução de sais de Vogel; cultivo realizado a 28 °C. Atividade por grama de BSG seco (■); Atividade específica (□).

4.5.3 Efeito da temperatura de cultivo

A temperatura é um, dentre outros fatores ambientais importantes, que, além de afetar a taxa de crescimento do micro-organismo, afeta intensamente o nível de enzimas produzidas (HALTRICH et al., 1996). Desse modo, nessa etapa foram

verificados os efeitos da variação da temperatura sobre a produção de xilanases e β -xilosidases por *P. janczewskii* realizando cultivos a 20, 25, 30 e 35 °C.

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 10**, pode-se observar que a maior produção xilanases ocorreu a 25 °C, enquanto a de β -xilosidases ocorreu a 20 °C, entretanto este valor não se diferenciou daqueles obtidos a 25 e 30 °C. Panagiotou et al. (2006) também verificaram maior produção de xilanases, arabinofuranosidase e ferruloil esterase por *P. brasilianum* em temperaturas entre 25 e 30 °C.

Tabela 10- Produção de xilanases e β -xilosidases por *P. janczewskii* em cultivo em estado sólido com bagaço de malte em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Atividade			
	Xilanase		β -xilosidase	
	U/g BSG	U/mg prot.	U/g BSG	U/mg prot.
20	82,5 $\pm$ 5,8	41,1 $\pm$ 3,9	0,246 $\pm$ 0,011	0,124 $\pm$ 0,010
25	132,2 $\pm$ 10,7	57,3 $\pm$ 4,6	0,225 $\pm$ 0,006	0,097 $\pm$ 0,003
30	113,9 $\pm$ 6,6	50,0 $\pm$ 1,9	0,210 $\pm$ 0,011	0,092 $\pm$ 0,009
35	0,3 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,0	ND	ND

ND: atividade não detectada nas condições de ensaio

Considerando os resultados obtidos nestes experimentos, a utilização de BSG como substrato nos cultivos em estado sólido mostrou-se promissora para a produção de enzimas xilanolíticas por *P. janczewskii*, como já tinham verificado outros autores, utilizando outros fungos (PANAGIOTOU et al., 2006; XIROS et al., 2008a; b), especialmente quando se procura substituir o farelo de trigo, atualmente muito empregado na alimentação humana e animal, e que já não pode ser mais considerado um substrato de baixo custo.

Ainda neste sentido, as condições selecionadas para a produção e secreção de xilanases e β -xilosidases por esta linhagem de *P. janczewskii* em cultivos sólidos com este resíduo foram: utilização da umidade inicial do substrato de 100%

fornecida com solução de sais de Vogel, tempo de cultivo de sete dias a 25 °C para xilanases e 20 °C para β -xilosidases.

4.5.4 Análise do material fermentado

A **Tabela 11** apresenta os dados da composição bromatológica do BSG não fermentado e do BSG após crescimento de *P. janczewskii*. Tais dados são importantes, pois permitem a análise inicial da composição do produto que será fundamental para definir seu valor nutritivo.

Tabela 11 - Avaliação da composição química do BSG não fermentado e do BSG fermentado. Os resultados foram expressos em % de matéria seca.

Análise	BSG não fermentado	BSG fermentado
Matéria seca	96,44	95,89
Extrato etéreo	2,79	3,23
Matéria mineral	3,92	4,46
Proteína bruta	17,53	19,95
FDN	72,07	72,27
FDA	39,27	42,69
Celulose	22,32	23,01
Hemicelulose	32,81	29,59
Lignina	16,94	19,68
NDT	43,83	40,80

FDN: Fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido; NDT: nutrientes digestíveis totais (WEISS et al., 1992)

Após o crescimento do fungo pode-se verificar mudanças na composição do material principalmente com relação à fração hemicelulósica. Enquanto que a celulose permaneceu inalterada, sugerindo, uma vez mais, a baixa, senão ausente, atividade celulolítica, houve uma redução de mais de 3% na fração hemicelulose que está associada à produção de enzimas xilanolíticas pelo fungo. O aumento da lignina em relação à matéria seca total se deve provavelmente a diminuição da hemicelulose. Além disso, também se observou aumento da proteína bruta no BSG fermentado, relacionado com o crescimento e colonização da biomassa microbiana no substrato sólido. A diminuição de NDT durante o crescimento do fungo não é

interessante para a aplicação como componente de rações. O aumento da matéria mineral se deve, provavelmente, ao acréscimo da solução de sais de Vogel para realização do cultivo.

A análise da composição em aminoácidos do BSG não fermentado e do BSG fermentado também foi realizada (**Tabela 12**), pois enquanto a análise de proteína bruta inclui também a porção de nitrogênio não protéico, como o de ácidos nucleicos, que não apresentam valor nutricional, essa é uma análise mais realística do teor protéico.

Tabela 12 - Avaliação da composição em aminoácido do BSG não fermentado e do BSG fermentado.

Aminoácido	BSG não fermentado		BSG fermentado	
	g/100g BSG	% massa total	g/100g BSG	% massa total
Asp	1.44	8.93	1.10	6.43
Thr	0.73	4.57	0.80	4.72
Ser	0.66	4.13	0.70	4.09
Glu	2.59	16.10	2.91	17.09
Pro*	0.81	5.04	0.58	3.42
Gly	0.93	5.78	1.03	6.06
Ala*	1.00	6.21	1.22	7.17
Cys	0.00	0.00	0.00	0.00
Val	1.15	7.17	1.23	7.20
Met	0.25	1.55	0.29	1.69
Ile	0.82	5.07	0.85	5.00
Leu	1.52	9.43	1.70	9.97
Tyr	0.65	4.06	0.61	3.60
Phe	0.94	5.83	1.01	5.94
His*	0.79	4.89	1.64	9.63
Lys*	0.82	5.13	0.42	2.44
Arg	0.98	6.12	0.95	5.56
Total	16.09		17.05	

* Médias estatisticamente diferentes pelo Teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Alterações na composição foram observadas apenas para a concentração de alanina, histidina, prolina e lisina, sendo que a concentração dos dois primeiros foi significativa maior no BSG fermentado em relação ao BSG não fermentado e a concentração dos dois últimos diminuiu significativamente no material fermentado. Tais resultados são importantes para que se possa futuramente trabalhar no balanceamento de aminoácidos na formulação de um produto voltado para nutrição animal, pois histidina e lisina são aminoácidos essenciais para monogástricos e ruminantes (ALVES, 2004). O processamento deste material por FES também resultou em um aumento no teor total de aminoácidos.

A análise de micotoxinas mostrou que não houve produção delas pelo fungo durante este cultivo, sendo observada, inclusive, diminuição na concentração de desoxinivalenol e zearelenona já presentes no BSG, mas em concentrações menores que os estabelecidos pela ANVISA (**Tabela 1**).

Tabela 13 - Análise de micotoxinas no BSG não fermentado e no BSG fermentado. Os valores foram expressos em µg/kg.

Micotoxina		BSG não fermentado	BSG fermentado
Aflatoxina	B1	< 0,1*	< 0,1*
	B2	< 0,1*	< 0,1*
	G1	< 0,1*	< 0,1*
	G2	< 0,1*	< 0,1*
Ocratoxina A		< 0,2*	< 0,2*
Desoxinivalenol		95	71
Zearelenona		125	48
Patulina		< 5*	< 5*

*Menor que o limite de quantificação.

A partir destes resultados iniciais, pode-se inferir que o tratamento do BSG com o fungo *P. janczewskii* é uma alternativa interessante para melhorar a

qualidade nutricional e agregar valor a este subproduto da indústria cervejeira. Futuramente, o BSG fermentado pode vir a ser usado para compor a dieta de animais, como um alimento de maior teor protéico, que, ademais, contém enzimas xilanolíticas que podem vir melhorar sua digestibilidade pelos animais e apresenta níveis de micotoxinas abaixo do estabelecido pela legislação brasileira.

4.6 Biobranqueamento de polpa *kraft*

Os resultados do branqueamento da polpa com o filtrado de cultura da *P. janczewskii* estão apresentados na **Figura 18**. Por razões práticas, o tratamento foi realizado baseando-se quantificação da atividade xilanolítica, contudo, outras enzimas xilanolíticas como β -xilosidases e α -L-arabinofuranosidases também são produzidas por este fungo, conforme verificado anteriormente (TERRASAN et al., 2010), podendo estar atuando cooperativamente com as xilanases. O tratamento da polpa com 2 e 4 U/g polpa por 1 h promoveu a redução de 3 e 3,3 unidades no número kappa, respectivamente, sendo que cargas maiores de enzima não implicaram maiores reduções do número kappa. Os tratamentos por 2 h apresentaram o mesmo padrão nos resultados, sendo os valores obtidos apenas pouco inferiores àqueles referentes a 1 h de tratamento.

O número kappa é um indicativo da lignina residual da polpa, e sua redução após o tratamento enzimático indica uma redução na quantidade de cloro a ser empregada posteriormente nas etapas de branqueamento. A comparação dos resultados obtidos neste estudo, em termos de eficiência kappa, em relação àqueles obtidos com outras xilanases é difícil dada às diferenças na origem da polpa e suas características, diferenças no pré-tratamento da polpa e das diferentes condições de tratamento e carga da enzima aplicada. Em geral, os resultados apresentados são semelhantes àqueles obtidos em outros estudos os quais verificaram redução entre 0,9 e 4,6 unidades no número kappa (MAXIMO et al., 1998; MADLALA et al., 2001; NAIR et al., 2010; TANEJA et al., 2002; BETTINI et al., 2009; MEDEIROS et al., 2007; MICHELIN et al., 2010; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2009). Apenas um trabalho relata redução maior, de 10,0 unidades no número kappa, aplicando as xilanases produzidas por uma linhagem de *A. niger* isoladas de ambiente marinho no branqueamento de uma polpa alternativa preparada com bagaço de cana (RAGHUKUMAR et al., 2004).

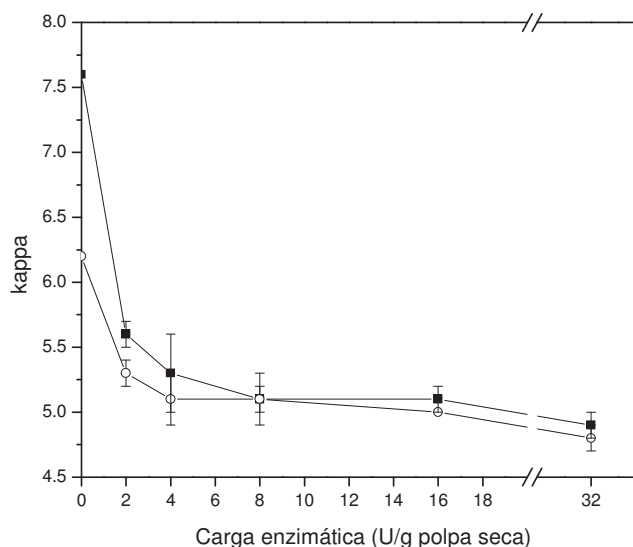


Figura 18 – Efeito do tempo e da carga enzimática no número kappa da polpa *kraft* de eucalipto no tratamento com filtrado de cultura de *P. janczewskii*. (■) Tratamento por 1h; (○) tratamento por 2h.

Segundo SUURNÄKKI et al. (1997), embora o grau de hidrólise aumente em função da dose de enzima empregada, acima de certa quantidade apenas um benefício adicional muito pequeno no branqueamento é observado. Os resultados aqui obtidos também indicaram que o prolongamento no tempo de tratamento não resultou em benefícios adicionais em termos de redução do número kappa. Outros autores também verificaram que, acima de um limiar, maiores quantidades de enzima ou maiores períodos de incubação, não resultaram em melhoria no branqueamento: no tratamento com as xilanases de *Streptomyces* sp. foram selecionados 3,5 U/g polpa e 2 h de reação (BEG et al. 2000), no caso das xilanases de *Aspergillus nidulans* K99 foram selecionados 1 U/g polpa e 1 h (TANEJA et al., 2002) e no tratamento com as xilanases produzidas por *Aspergillus niger* as condições selecionadas foram 835 nkat/g polpa e 3 h de tratamento (MAXIMO et al., 1998).

Além destes resultados, observou-se que o tratamento não afetou a viscosidade da polpa, sendo verificado aumento na sua viscosidade após o tratamento, principalmente nos tratamentos por 2 h (**Figura 19**). Estes resultados, somado ao fato de que o rendimento do processo foi de 100% (dados não

apresentados), confirmam a ausência de enzimas celulolíticas neste extrato, conforme verificado anteriormente (TERRASAN et al., 2010). Este aspecto é crucial para uma futura aplicação da enzima, pois a presença desta enzima poderia causar danos às fibras, resultando em perda de resistência e rendimento. Manutenção da viscosidade da polpa ou mesmo o aumento desta tem sido verificado com a aplicação de xilanases em outros trabalhos (MEDEIROS et al., 2007; BETTINI et al., 2009), e pode ser atribuído à remoção seletiva da hemicelulose que, por apresentar menor grau de polimerização que a celulose, interfere na viscosidade global da polpa (SUURNÄKKI et al., 1997).

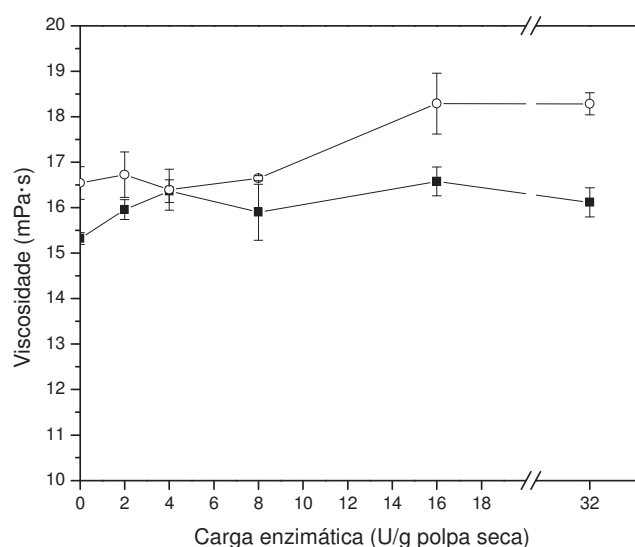


Figura 19 - Efeito do tempo e da carga enzimática na viscosidade da polpa *kraft* de eucalipto no tratamento com filtrado de cultura de *P. janczewskii*. (■) Tratamento por 1h; (○) tratamento por 2h.

5. CONCLUSÕES

A primeira etapa deste trabalho consistiu na purificação das principais xilanase e β -xilosidase produzidas por *Penicillium janczewskii* quando cultivado em meio líquido com xilana de aveia como fonte de carbono. A estratégia estabelecida, constituída por duas etapas, sendo uma cromatografia de troca iônica seguida de uma cromatografia de exclusão molecular, mostrou-se adequada para purificação da principal xilanase produzida pelo fungo. Ao final do processo, a purificação alcançada foi de 5,4 vezes e a recuperação foi de 28,4%. A estratégia de purificação da β -xilosidase, constituída pelas etapas de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, interação hidrofóbica e exclusão molecular, apesar de apresentar baixa recuperação, também mostrou-se adequada, pois ao final do processo também foi verificada homogeneidade eletroforética da amostra. A purificação alcançada foi de 572 vezes e a recuperação foi de 6,0 %.

Ambas as enzimas purificadas foram caracterizadas bioquimicamente, apresentando propriedades bastante interessantes do ponto de vista biotecnológico principalmente com relação à temperatura ótima de atividade das enzimas em elevadas temperaturas, permitindo a aplicação em processos que ocorram em temperaturas elevadas como na panificação e na indústria de polpa e papel. A β -xilosidase, além da atividade ótima em elevadas temperaturas, também mostrou prolongada estabilidade especialmente a 60 °C, o que é bastante interessante permitindo sua aplicação por longos períodos.

As enzimas xilanolíticas, bem como o cultivo do fungo em substrato sólido também mostraram potencial aplicabilidade. A produção de xilanases e β -xilosidases em cultivos sólidos foi avaliada utilizando-se bagaço de malte, resíduo da indústria cervejeira, como substrato. Os parâmetros efeito da umidade, do tempo e da temperatura de cultivo e da adição de palha de arroz sobre a produção enzimática foram otimizados. O resíduo mostrou-se promissor para ser utilizado na produção de enzimas xilanolíticas por este fungo. Além disso, o material fermentado foi analisado apresentando maior teor protéico, aumento no teor de alguns aminoácidos essenciais e ausência de micotoxinas, devendo ainda ser melhor estudado visando emprego na nutrição animal.

Ao serem empregadas no biobranqueamento de polpa kraft, as enzimas também mostraram-se promissoras sendo observadas reduções de até 3,3 unidades no número kappa de uma polpa de eucalipto pré-branqueada com oxigênio.

Dessa maneira, este trabalho contribuiu para o avanço do conhecimento acerca das enzimas xilanolíticas, uma vez que foram estudadas as características da xilanase e da β -xilosidase produzidas por *P. janczewskii*, uma linhagem ainda pouco estudada, e também duas potenciais aplicações dessas enzimas ou do referido fungo.

6. REFERÊNCIAS

ACHYUTHAN, K.E.; ACHYUTHAN, A.M.; ADAMS, P.D.; DIRK ,S.M.; HARPER, J.C.; SIMMONS, B.A.; SINGH, A.K. Supramolecular self-assembled chaos: polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels. **Molecules**, 15, p.8641-8688, 2010.

AHLAWAT. S.; BATTAN. B.; DHIMAN. S.S.; SHARMA. J.; MANDHAN. R.P. Production of thermostable pectinase and xylanase for their potential application in bleaching of kraft pulp. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 34, p.763-770, 2007.

ALCOCER, M.J.C.; FURNISS, C.S.M.; KROON, P.A.; CAMPBELL, M.; ARCHER, D.B. Comparison of modular and non-modular xylanases as carrier proteins for the efficient secretion of heterologous proteins from *Penicillium funiculosum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 60, p.726-732, 2003.

ALIYU, S.; BALA, M. Brewer's spent grain: a review of its potentials applications. **African Journal of Biotechnology**, 10, p.324-331, 2011.

- ALVES, D.D. Nutrição aminoácídica de bovinos. **Revista Brasileira de Agrociência**, 10, p.265-271, 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 Biochemistry**, 39, p.1931-1938, 2004.
- ANDREWS, P. Estimation of molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. **Journal of Biochemistry**, 91, p. 222-233, 1964.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, 29, p.719-739, 2005.
- ASSAMOI, A.A.; DELVIGNE, F; ALDRIC, J.M.; DESTAIN, J.; THONART, P. Improvement of xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid-state fermentation. **Biotechnology and Agronomy Society Environment**, 12, p.111-118, 2008.
- ASSAMOI, A.A.; DESTAIN, J.; THONART, P. Xylanase production by *Penicillium canescens* on soya oil cake in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 160, p.50-62, 2010.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 12 ed. Washington, 1990. 1098 p.
- BAJPAI, P. Application of enzymes in the pulp and paper industry. **Biotechnology Progress**, 15, p.147-157, 1999.
- BAJPAI, P. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, 43, p.141-189, 1997.
- BAJPAI, P.; BAJPAI, P.K. Biobleaching of kraft pulp. **Process Biochemistry**, 27, p.319-325, 1992.
- BAKRI, Y.; JACQUES, P.; THONART, P. Xylanase production by *Penicillium canescens* 10–10c in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 108, p.737-748, 2003.
- BALAT, M. Production of biotethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, 52, p.858-875, 2011.
- BALL, A. S.; MCCARTHY, A .J. Production and properties of xylanases from actinomycetes. **Journal of Applied Bacteriology**, 66, p.439-444, 1989.
- BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnolog.**, 8, p.353-368, 1992.
- BATTAN, B.; DHIMAN, S.S.; AHLAWAT, S.; MAHAJAN, R.; SHARMA, J. Application of thermostable xylanase of *Bacillus pumilus* in textile processing. **Indian Journal of Microbiology** (in press).
- BEAUCHEMIN, K. A., W. Z. YANG, AND L. M. RODE. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 82, p.378-390, 1999.

- BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M.; SEWALT, V.J.H. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Canadian Journal of Animal Sciences**, 75, p.641-644, 1995.
- BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 56, p.326-338, 2001.
- 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. **Journal of Biotechnology**, 41, p. 71-79, 1995.
- BERTO, D. Panorama do mercado de bebidas. Cerveja, a bebida mais alcoólica mais consumida no país. **Food Ingredients**, 23, p.36-39, 2003.
- BETINI, J.H.A.; MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; JORGE, J.A.; TERENCE, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced by solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess Biosystem and Bioengineering**, 32, p.819-824, 2009.
- BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, 18, p.355-383, 2000.
- BHATTACHARYYA, S.; KHOWALA, S.; KUMAR, A.; SENGUPTA, S. Purification and characterization of an extracellular β -xylosidase of *Termitomyces clypeatus*. **Biotechnology Progress**, 13, p.822-827, 1997.
- BIELY, P. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. (Coord). **Hemicelluloses and Hemicellulases**. Portland, p.29-51, 1993.
- BIELY, P. Diversity of microbial endo- β -1,4-xylanases. In: MANSFIELD, S.D.; SADDLER, J.N. (Eds.). **Applications of enzymes to lignocellulosics**. American Chemical Society, p.361-380, 2003.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, 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**. Marcel Dekker, Inc. New York, p.879-916, 2003.
- BOCCHINI, D.A.; DAMIANO, V.B.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Effect of *Bacillus circulans* D1 thermostable xylanase on biobleaching of eucalyptus kraft pulp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 105 -108, p.393-402, 2003.
- BON, E.P.S.; COSTA, R.B.; DA SILVA, M.V.A.; FERREIRA-LEITÃO, V.S.; FREITAS, S.P.; FERRARA, M.A. Mercado e perspectivas de uso de enzimas industriais e especiais no Brasil. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. Interciência Ltda: Rio de Janeiro, 2008.
- BRADNER, J.R.; SIDHU, R.K.; GILLINGS, M.; NEVALEIN, K.M.H. Hemicellulase activity of Antarctic microfungi. **Journal of Applied Microbiology**, 87, p. 366-370, 1999.

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução – RDC nº 274, 2002
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução – RDC nº 07, 2011
- BRUFAU, J.; FRANCESCH, M.; PÉREZ-VENDRELL, A.M. The use of enzymes to improve cereal diets for animal feeding. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 86, p.1705-1713, 2006.
- BUCHERT, J.; TANKANEN, M.; KANTELINEN, A.; VIIKARI, L. Application of xylanases in the pulp and paper industry. **Bioresource Technology**, 50, p.65-72, 1994.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, 103, p.2196-2204, 2007.
- CARMONA, E.C.; BROCHETTO-BRAGA, M.R.; KLEINER, A.A.P.; JORGE, J.A. Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*. **FEMS Microbiology Letters**, 166, p.311-315, 1998.
- CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, 123, p.413-433, 2006.
- CHO, N.C.; KIM, K. Purification and characterization of β -xylosidase from *Penicillium verruculosum*. **Korean Biochemistry Journal**, 25, p.631-635, 1992.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, 29, p.3-23, 2005.
- COLLINS, T.; HOYOUX, A.; DUTRON, A.; GEORIS, J.; GENOT, B.; DAUVRIN, T.; ARNAUT, F.; GERDAY, C.; FELLER, G.B Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking. **Journal of Cereal Sciences**, 43, p. 79-84, 2006.
- CONSIDINE P.J.; HACKETT, T.J.; COUGHLAN, M.P. Solid-state cultivation of *Penicillium capsulatum* on beet pulp. **Biotechnology Letters**, 9, p.131-134, 1987.
- DAMIANO, V.B.; BOCCHINI, D.A.; GOMES, E.; da SILVA, R. Application of crude xylanase from *Bacillus licheniformes* 77-2 to the bleaching of eucalyptus kraft pulp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 19, p.139-144, 2003.
- DAS, M.; GUPTA, S.; KAPOOR, V.; BANERJEE, R.; BAL, S. Enzymatic polishing of rice - a new processing technology. **Food Science and Technology**, 41, p.2079-2084, 2008.
- de ALMEIDA, E.M.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A. Purification and biochemical characterization of β -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **FEMS Microbiology Letters**, 130, p.171-176, 1995.
- de VRIES, R.P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 65, p.497-522, 2001.
- DEKKER, R. F. H.; RICHARDS, G. N. Hemicellulases, their occurrence, purification, properties and mode of action. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, New York, v. 32, p. 277-352, 1976.

- DELEYN, F.; CLAEYSSENS, M. Purification and properties of β -xylosidase from *Penicillium wortmanni*. **Canadian Journal of Biochemistry**, 56, p.43-50, 1977.
- DENSTALDI, V.; WESTERENG, B.; BINIYAM, H.G.; BALLANCE, S.; KNUTSEN, S.H.; SVIHUS, B. Effects of structure and xylanase treatment of brewer's spent grain on performance and nutrient availability in broiler chickens. **British Poultry Science**, 51, p.419-426, 2010.
- DHILLON, A.; GUPTA, J.K.; JAUHARI, B.M.; KHANNA, S. A cellulase-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. **Bioresource Technology**, 73, p.273-277, 2000.
- DHIMAN, S.S.; GARG, G.; SHARMA, J.; MAHAJAN, R.; METHOXY. Characterization of statistically produced xylanase for enrichment of fruit juice clarification process. **New Biotechnology** (in press).
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, 1993, v. 1, 859 p.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, D. F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 29, pp. 350–356, 1956.
- DURAN, N.; MARQUES, S.; SALLES, B.C.; MEDIROS, R.G; FILHO, E.X.F. Enzimas na indústria de polpa e papel. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. Interciência Ltda: Rio de Janeiro, 2008.
- 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 and Microbial Technology**, 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. **Letters in Applied Microbiology**, 44, p. 206-211, 2007.
- DWIVEDI, P.; VIVEKANAND, V.; GANGULY, R.; SINGH, R.P. *Parthenium* sp. as a plant biomass for the production of alkalitolerant xylanase from mutant *Penicillium oxalicum* SAU_E-3.510 in submerged fermentation. **Biomass and Bioenergy**, 33, p. 581-588, 2009.
- EBRINGEROVÁ, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties. 1. Naturally occurring xylans structures, isolation, procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, 21, p.542-556, 2000.
- FILHO, E. X. F.; PULS, J.; COUGHLAN, M. P. Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. **Journal of Industrial Microbiology**, 11, p.171-180, 1993.
- FOUNTOULAKIS, M.; LAHM, H-W. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. **Journal of Chromatography A**, 826, p.109-134, 1998.

- FUNAGUMA, T.; NAITO, S.; MORITA, M.; OKUMURA, M.; SUGIURA, M.; HARA, A. Purification and some properties of xylanase from *Penicillium herquei* Banier and Sartory. **Agricultural Biology and Chemistry**, 55, p.1163-1165, 1991.
- FURNISS, C.S.M.; BELSHAW, N.J. A.; ALCOCER, M.J.C.; WILLIAMSON, G. B.; ELLIOTT, G.O.; A. GEBRUERS, K.; HAIGH, N.P.; FISH, N.M.D.; KROON, P.A. A family 11 xylanase from *Penicillium funiculosum* is strongly inhibited by three wheat xylanase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1598, p.24-29, 2002.
- 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. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 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 Couse of Mycology**. 3. ed. Baarn: Centraalbureau voor Schmmeltcultures, 1987, 136 p.
- 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. **BioResources**, 1, p.18-33, 2006.
- GILBERT, H. J.; HAZLEWOOD, G. P. Bacterial cellulases and xylanases. **Journal of Genetic Microbiology**, 139, p.187-194, 1993.
- GRAMINHA, E.B.N.; GONCALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; da SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed and Technology**, 144, p.1-22, 2008.
- GUERFALI, M.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. *Talaromyces thermophilus* β -D-xylosidase: purification, characterization and xylobiose synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 150, p.267-279, 2008.
- HAAS, H.; HERFURTH, E.; STÖFFLER, G.; REDL, B. Purification, characterization and partial amino acid sequences of a xylanase produced by *Penicillium chrysogenum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1117, p.279-286, 1992.
- HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K.D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, 58, p.137-161, 1996.
- HASHIMOTO, T.; MORISHITA, M.; IWASHITA, K.; SHIMOI, H.; NAKATA, Y.; TSUJI, Y.; ITO, K. Production and some properties of salt-tolerant β -xylosidases from a Shoyu Koji mold, *Aspergillus oryzae* in solid and liquid cultures. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 88, p.479-483, 1999.
- HE, J.; LION, U.; SATTLER, I.; GOLLMICK, F.A.; GRABLEY S.; CAI J.; MEINERS, M.; SCHU "NKE H.;SCHAUMANN K.;DECHERT, U.; KROHN, M. Diastereomeric Quinolinone Alkaloids from the Marine-Derived Fungus *Penicillium janczewskii*. **Journal of Natural Products**, 68, p.1397-1399, 2005.
- HEBRAUD, M.; FEVRE, M. Purification and characterization of an extracellular beta-xylosidase from the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. **FEMS Microbiology Letters**, 60, p.11-16, 1990.
- HOLKER, U.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 64, p.175-186, 2004.

- HOU, Y-H.; WANG, T-H.; LONG, H.; ZHU, H-Y. Novel cold-adaptive *Penicillium* strain FS010 secreting thermo-labile xylanase isolated from Yellow Sea. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 38, p.142–149, 2006.
- HOWARD, R.L.; ABOTSI, E.; JANSEN van RENSBURG, E.L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, 12, p.602-619, 2003.
- HRISTOV, A.N.; MCALLISTER, T.A.; CHENG, K.J. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: Effects on nutrient digestion in cattle fed a barley grain diet. **Journal of Animal Science**, 78, p.477-487, 2000.
- IBARRA, D.; ROMERO, J.; MARTÍNEZ, M.J.; MARTÍNZEZ, A.T.; CAMARERO, S. Exploring the enzymatic parameters for optimal delignification of eucalypt pulp by laccase-mediator. **Enzyme and Microbial Technology**, 39, p.1319-1327, 2006.
- IEMBO, T.; AZEVEDO, M.O.; BLOCH, J.R.C.; FERREIRA-FILHO, E.X. Purification and partial characterization of a new β -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 22, p.475-479, 2006.
- 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. **Journal of Biosciences and Bioengineering**, 96,354-359, 2003.
- JOHN, M.; SCHMIDT, B.; SCHMIDT, J. Purification and some properties of five endo-1,4- β -xylanases and a β -D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Biochemistry**, 57, p.125-134, 1979.
- 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 Microbiology and Technology**, 32, p.851-861, 2003.
- KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: characterization of two isozymes. **Journal of Biotechnology**, 60, p.155-163, 1998.
- KARBOUNE, S.; L'HOCINE, L.; ANTHONI, J.; GERAERT, P-A.; KERMASHA, S. Properties of selected hemicellulases of a multi-enzymatic system from *Penicillium funiculosum*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 73, p.1286-1292, 2009.
- KATAPODIS, P.; NERINCKX, W.; CLAEYSENS, M.; CHRISTAKOPOULOS, P. Purification and characterization of a thermostable intracellular β -xylosidase from thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. **Process Biochemistry**, 41, p.2402-2409, 2006.
- KAUR, A.; MAHAJAN, R.; SINGH, A.; GARG, G.; SHARMA, J. Application of cellulose-free xylano-pectinolytic enzymes from the same bacterial isolate in biobleaching of kraft pulp. **Bioresource Technology**, 101, p. 9150-9155, 2010.

- KIM, D.H.; KIM, J.E.; BAE, S.E.; SEO, J.H.; OH, T.K.; LEE, C.H. Enhancement of natural pigment extraction using *Bacillus* species xylanase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, p.2541-2545, 2005.
- 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. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 64, p.1230-1237, 2000.
- KISS, T.; KISS, L. Purification and characterization of an extracellular β -D-xylosidase from *Aspergillus carbonarius*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 16, p.465-470, 2000.
- KITAMOTO, N.; YOSHINO, S.; OHMIYA, K.; TSUKAGOSHI, N. Sequence analysis, overexpression, and antisense inhibition of a β -xylosidase gene, *xyIA*, from *Aspergillus oryzae* KBN616. **Applied and Environmental Microbiology** 65, p.20-24, 1999.
- KNOB, A.; CARMONA, E.C. Cell-associated β -xylosidase production by *Penicillium sclerotiorum*. **New Biotechnology**, 26, p.60-67, 2009.
- KNOB, A.; CARMONA, E.C. Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: a novel acidophilic xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 162, p.429-443, 2010.
- KNOB, A.; CARMONA, E.C. Purification and properties of an acid β -xylosidase from *Penicillium sclerotiorum*. **Annals of Microbiology**, 2011. (in press)
- KNOB, A.; TERRASAN, C.R.F.; CARMONA, E.C. β -xylosidases from filamentous fungi: an overview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 26, p.389-407, 2010.
- KOKKONEN, M.; JESTOI, M.; RIZZO, A. The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, 99, p. 207-214, 2005.
- KOZLOVSKII, A.G.; VINOKURA, N.G.; ZHELIFONOVA, V.P.; ADANIN, V.M. Secondary metabolites of fungi belonging to the species *Penicillium janczewskii*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 33, p.70-74, 1997.
- KROGH, K.B.R.; MØRKEBERG, A.; JØRGENSEN, H.; FRISVAD, J.C., OLSSON, L. Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 113-116, p. 389-401, 2004.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, 23, p.411-456, 1999.
- KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 35, p.377-391, 2008.
- KUMAR, S.; RAMÓN, D. Purification and regulation of the synthesis of a β -xylosidase from *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology Letters**, 135, p.287-293, 1996.
- KUMAR, S.; TSAI, C.J.; NUSSINOV, R. Factor enhancing protein thermostability. **Protein Engineering**, 13, p.179-191, 2000.

- KURAKAKE, M.; FUJII, T.; YATA, M.; OKAZAKI, T.; KOMAKI, T. Characteristics of transxylosylation by β -xylosidase from *Aspergillus awamori* K4. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1726, p.272 – 279, 2005.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, p.680-685, 1970.
- LENARTOVICZ, V.; De SOUZA, C.G.M.; MOREIRA, F.G.; PERALTA, R.M. Temperature and carbon source affect the production and secretion of thermostable β -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, 38, p.1775-1780, 2003.
- LI, Y.K.; YAO, H.J.; CHO, Y.T. Effective induction, purification, and characterization of *Trichoderma koningii* G-39 β -xylosidase with high transferase activity. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 31, p.119-125, 2000.
- 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. **Biochemical Engineering Journal**, 34 p.82–86, 2007.
- LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of the enzyme dissociation. **Journal of the American Chemistry Society**, 56, p.658-666, 1934.
- LIU, W.; SHI, P.; CHEN, Q.; YANG, P.; WANG, G.; WANG, Y.; LUO, H.; YAO, B. Gene cloning, overexpression, and characterization of a xylanase from *Penicillium* sp. CGMCC 1669. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 162, p.1-12, 2010.
- LONSANE, B.K.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; GHILDYAL, N.P.; RAMAKRISHNA, M.; KRISHNAIAH, M.M. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. **Process Biochemistry**, 27, p.259-273, 1992.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the Follin phenol reagent. **Journal of Biology and Chemistry**, 193, p.265-275, 1951.
- MACIEL, G.M.; VANDENBERGHE, L.P.S.; HAMINIUK, C.W.I.; FENDRICH, R.C.; BIANCA, E.D.; BRANDALIZE, T.Q.S.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Xylanase production by *Aspergillus niger* LPB 326 in solid-state fermentation using statistical experimental design. **Food Technology and Biotechnology**, 46, p.183-189, 2008.
- MADI, L.; KATAN, J. *Penicillium janczewskii* and its metabolites, applied to leaves, elicit systemic acquired resistance to stem rot caused by *Rhizoctonia solani*. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, 53, p.163-175, 1998.
- MADLALA, A.M.; BISSOON, S.; SINGH, S.; CHRISTOV, L. Xylanase-induced reduction of chlorine dioxide consumption during elemental chlorine-free bleaching of different pulp types. **Biotechnology Letters**, 23, p.345-351, 2001.
- MAI, V.; WIEGEL, J.; LORENZ, W.W. Cloning, sequencing, and characterization of the bifunctional xylosidase-arabinosidase from the anaerobic thermophile *Thermoanaerobacter ethanolicus*. **Gene**, 247, p.137-143, 2000.
- MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. **Bioresource Technology**, 99, p.2373-2383, 2007.

- MANDALARI, G.; BISIGNANO, G.; Lo CURTO, R.B.; WALDRON, K.W.; FAULDS, C.B. Production of feruloyl estersases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on industrial food processing by-products. **Bioresource Technology**, 99, p.5130-5133, 2008.
- MATSUO, M.; FUJIE, A.; WIN, M.; YASUI, T. Four types of β -xylosidases from *Penicillium wortmanni* IFO 7237. **Agricultural and Biological Chemistry**, 51, p.2367-2379, 1987.
- MAXIMO, C.; COSTA-FERREIRA, M.; DUARTE, J. Some properties of eucalyptus kraft pulp treated with xylanase from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 14, p.365-367, 1998.
- MEDEIROS, R.G.; SILVA Jr, F.G.; BAÓ, S.N.; HANADA, R.; FILHO, E.X.F. Application of xylanases from Amazon Forest fungal species in bleaching of eucalyptus kraft pulps. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2, p.231-238, 2007.
- MEDEIROS, R.G.; HANADA, R.; FILHO, E.X.F. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon Forest fungal species. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 52, p.97-100, 2003.
- MEDEIROS, R.G.; SILVA Jr; F.G.; SALLES, B.C.; ESTELLES, R.S.; FILHO, E.X.F. The performance of fungal xylan-degrading enzyme preparations in elemental chlorine-free bleaching for *Eucalyptus* pulp. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 28, p.204-206, 2002.
- MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; BETINI, J.H.A.; da SILVA, T.M.; JORGE, J.A.; TERENCE, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Production and properties of xylanases from *Aspergillus ochraceus* and their use in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and Biosystem Engineering**, 33, p.813-821, 2010.
- MILLER, G.H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31, p.426-429, 1959.
- MITCHEL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state fermentation. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 68, p.61-138, 2000.
- MITRA, N.; SINHA, S.; RAMYA, T.N.C.; SUROLIA, A. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding. form and function. **Trends in Biochemical Sciences**, 31, p.156-163, 2006.
- MOLDES, D.; VIDAL, T. Laccase-HBT bleaching of eucalyptus kraft pulp: influence of the operating conditions. **Bioresource Technology**, 99, p.8565-8570, 2008.
- MOURE, A.; GULLÓN, P.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J.C. Advances in the manufacture, purification, and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochemistry**, 41, p.1913-1923, 2006.
- MOZOŁOWSKI, G.A.; CONNERTON, I.F. Characterization of a highly efficient heterodimeric xylosidase from *Humicola insolens*. **Enzyme and Microbial Technology**, 45, p.436-442, 2009.
- MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 81, p.268-274, 2006.

- MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I.C. Brewer's spent grain: generation, characteristics and potential application. **Journal of Cereal Science**, 43, p.1-14, 2006.
- MUTHEZHILAN, R.; ASHOK, R.; JAYALAKSHMI, S. Production and optimization of thermostable alkaline xylanase by *Penicillium oxalicum* in solid state fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, 1, p.20-28, 2007.
- NAIKA, S.N.; GOUD, V.V.; PRASANT, K.R.; DALAI, A.K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 14, p.578-597, 2010.
- NAIR, S.; SINDHU, R.; SHASHIDHAR, S. Enzymatic bleaching of kraft pulp by xylanase from *Aspergillus sydowii* SBS 45. **Indian Journal of Microbiology**, 50, p.332-338, 2010.
- NAIR, S.G.; SINDHU, R.; SHASHIDHAR, S. Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. **African Journal of Microbiology Research**, 2, p.82-86, 2008.
- NARANG, S.; SAHAI, V.; BISARIA, V.S. Optimization of xylanase production by *Melanocarpus albomyces* IS68 in solid state fermentation using response surface methodology. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 91, p.425-427, 2001.
- NASCIMENTO, R.P.; COELHO, R.R.R.; MARQUES, S.; ALVES, L.; GÍRIO, F.M.; BON, E.P.S.; AMARAL-COLLAÇO, M.T. Production and partial characterization of xylanase from *Streptomyces* sp strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, 31, p.549-555, 2002.
- NBR 7730 - Pasta celulósica - Determinação da viscosidade em solução de cuproetilenodiamina (CUEN) com viscosímetro do tipo capilar.
- NGUYEN, D.; ZHANG, X.; JIANG, Z-H.; AUDET, A.; PAICE, M.G.; RENAUD, S.R.; TSANG, A. Bleaching of kraft pulp by a commercial lipase: accessory enzymes degrade hexenuronic acids. **Enzyme and Microbial Technology**, 43, p.130-136, 2008.
- NIEHAUS, F.; BERTOLDO, C. KÄHLER, M. ANTRANIKIAN, G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 51, p.711-729, 1999.
- NUMAN, M.Th.; BHOSLE, N.B. α -L-arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 33, p.247-260, 2006.
- PANAGIOTOU, G.; GRANOUILLET, P.; OLSSON, L. Production and partial characterization of arabinoxylan-degrading enzymes by *Penicillium brasilianum* under solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 72, p.1117-1124, 2006.
- PANAGIOTOU, G.; OLAVARRIA, R.; OLSSON, L. *Penicillium brasilianum* as an enzyme factory, the essential role of feruloyl esterases for the hydrolysis of the plant cell wall. **Journal of Biotechnology**, 130, p.219-228, 2007.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 3636, p.1-4, 2003.

- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHEL, D. New developments in solid state fermentation: I – Bioprocess and products. **Process Biochemistry**, 35, p.1153-1169, 2000.
- PEDERSEN, M.; LAURITZEN, H.K.; FRISVAD, J.C.; MEYER, A.S. Identification of thermostable β -xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, 29, p.743-748, 2007.
- PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; MICHELIN, M.; BETINI, J.H.A.; JORGE, J.A.; TERENCE, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Production of xylanase by Aspergilli using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 36, p.149-155, 2009.
- PÉREZ-GUERRA, N.; TORRADO-AGRASAR, A.; LÓPEZ-MACIAS, C.; PASTRANA, L. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, 2, p.343-350, 2003.
- 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). **Journal of Applied Microbiology**, 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.
- PITT, J.I.; LEISTNER L. Toxigenic *Penicillium* species. In: SMITH, J.E.; HENDERSON, R.S. (Ed). *Mycotoxins and Animal Foods*, CRC Press, Boca Raton, Florida, p.81-99, 1991.
- POLIZELI, M.L.T.; RIZZATTI, A.C.S.; MONTI, R.; TERENCE, H.F.; JORGE, H.F.; AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 67, p.577-591, 2005.
- POUTANEN, K.; PULLS, J. Characteristics of *Trichoderma reesei* β -xylosidase and its use in hydrolysis of solubilized xylans. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 28, p.425-432, 1988.
- PRADE, R.A. Xylanases: From Biology to Biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, 13, p.100-131, 1995.
- QUERIDO, A.L.S.; COELHO, J.L.C.; ARAÚJO, E.F.; CHAVES-ALVES, V.M. Partial purification of xylanase produced by *Penicillium expansum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 49, p.475-480, 2006.
- RAGHUKUMAR, C.; MURALEEDHARAN, U.; GAUD, V.R.; MISHRA, R. Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 31, p.433-441, 2004.
- RAHMAN, A.K.M.S.; SUGITANI, N.; HATSU, M.; TAKAMIZAWA, K. A role of xylanase. α -L-arabinofuranosidase. and xylosidase in xylan degradation. **Canadian Journal of Microbiology**, 49, p.58-64, 2003.
- RAMANA MURTHY, M.V.; THAKUR, M.S.; KARANTH, N.G. Monitoring of biomass in solid state fermentation using light reflectance. **Biosensors and Bioelectronics**, 8, p.59-63, 1993.

- RANSOM, R.F.; WALTON, J.D. Purification and characterization of extracellular β -xylosidase and α -arabinosidase from the plant pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. **Carbohydrate Research**, 297, p.357-364, 1997.
- RASMUSSEM, L.E.; SORENSEN, H.R.; VIND, J.; VIKSO-NIELSEN, A. Mode of action and properties of the β -xylosidase from *Talaromyces emersonni* and *Trichoderma reesei*. **Biotechnology and Bioengineering**, 94, p.869-876, 2006.
- REESE, E.T.; MAGUIRE, A.; PARRISH, F.W. Production of β -D-xylopiranosidases by fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, 19, p.1065-1074, 1973.
- REILLY, P.J. Xylanases: Structure and function. **Basic Life Sciences**, 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 -xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 26, p.1-5, 2001.
- 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*. **Biochemistry**, v. 42, p. 505-516, 1977.
- RONCERO, M.B.; TORRES, A.L.; COLOM, J.F.; VIDAL, T. Effects of xylanase treatment on fibre morphology in totally chlorine free bleaching (TCF) of *Eucalyptus* pulp. **Process Biochemistry**, 36, p.45-50, 2000.
- RUEGGER, M.J.S. Atividade enzimática e produção de ácido linoleico por fungos filamentosos isolados do solo. da Região do Banhado Grande, na Estação Ecológica Juréia-Itatins. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro – SP. XXp. 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. **Applied and Environmental Microbiology**, 61, 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 Microbiology and Technology**, 33, p.775-785, 2003.
- SAHA, B.C. Purification and characterization of an extracellular β -xylosidase from a newly isolated *Fusarium verticillioides*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 27, p.241-245, 2001.
- SAHA, B.C. Purification and properties of an extracellular beta-xylosidase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Bioresource Technology**, 90, p.33-38, 2003b.
- SAHA, B.C. α -L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, 18, p.403-423, 2000.
- SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 30, p.279-291, 2003a.

- SALLES, B.C.; MEDEIROS, R.G.; BÁO, S.N.; SILVA Jr.; F.G.; FILHO, E.X.F. Effect of cellulase-free xylanases from *Acrophialophora nainiana* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on eucalyptus kraft pulp. **Process Biochemistry**, 40, p.343-349, 2005.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, 27, p.185-194, 2009.
- SANTOS, M.; JIMÉNEZA, J.J.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; DEL NOZALA, M. J. Variability of brewer's spent grain within a brewery. **Food Chemistry**, 80, p.17-21, 2003.
- SÁ-PEREIRA, P.; DUARTE, J.C.; FERRARA, M.A.; LACERDA, P.S.B.; ALVES, F.C. Biocatálise: Estratégias de inovação e criação de mercados. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. Interciência Ltda: Rio de Janeiro, 2008.
- SCHMIDT, A.; SCHLACHER, A.; STEINER, W.; SCHWAB, H.; KRATKY, C. Structure of the xylanase from *Penicillium simplicissimum*. **Protein Science**, 7, p.72081-2088, 1998.
- SEDMAK, J.J.; GROSSBERG, S.E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. **Analytical Biochemistry**, 78, p.544-552, 1977.
- SEMENOVA, M.V.; DRACHEVSKAYA, M.I.; SINITSYNA, O.A.; GUSAKOV, A. V.; SINITSYN, A.P. Isolation and properties of extracellular β -xylosidases from fungi *Aspergillus japonicus* and *Trichoderma reesei*. **Biochemistry (Moscow)**, 74, p.1002-1008, 2009.
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, 6, p.219-228, 2003.
- SIGOILLOT, C.; CAMARERO, S.; VIDAL, T.; RECORDA, E.; ASTHER, M.; PÉREZ-BOADA, MARTÍNEZ, M.J.; SIGOILLOT, J.C.; ASTHER, M.; COLOM, J.F.; MARTÍNEZ, A.T. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. **Journal of Biotechnology**, 115, p.333-343, 2005.
- SIMÕES, M.L.G.; TAU-K-TORNISIELO, S.M.; TAPIA, M.T. Screening of culture condition for xylanase production by filamentous fungi. **African Journal of Biotechnology**, 8, p.6317-6326, 2009.
- SINDHU, I.; CHIBBER, S.; CAPALASH, N.; SHARMA, P. Production of cellulose-free xylanase from *Bacillus megaterium* by solid state fermentation for biobleaching of pulp. **Current Microbiology**, 53, p.167-172, 2006.
- 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.
- SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 44, p.13-18, 2009.
- 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*. **Biochemistry (Moscow)**, 68, p.1631-1638, 2003.
- SOCCOL, C.R.; VANDENBERGH, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, 13, p.205-218, 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. **Microbiology (Moscow)**, 74, p.141-146, 2005.
- SOMERA, A.F.; PEREIRA, M.G.; GUIMARÃES, L.H.S.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENCE, H.F.; FURRIEL, R.P.M.; JORGE, J.A. Effect of glycosilation on the biochemical properties of β -xylosidases from *Aspergillus versicolor*. **The Journal of Microbiology**, 47, p.270-276, 2009.
- SRIPRANG, R.; ASANO, K.; GOBSUK, J.; TANPONGPIPAT, S.; CHAMPREDA, V.; EURWILAICHITR, L. Improvement of thermostability of fungal xylanase by using site-directed mutagenesis. **Journal of Biotechnology**, 126, p.454-462, 2006.
- SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, 22, p.33-64, 2002.
- SULISTYO, J.; KAMIYAMA, Y.; YASUI, T. Purification and some properties of *Aspergillus pulverulentus* β -xylosidase with transxylosylation capacity. **Journal of Fermentation Bioengineering**, 79, p.17-22, 1995.
- SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, 17, p.39-67, 1997.
- SUURNÄKKI, A.; TENKANEN, M.; BUCHERT, J.; VIHKARI, L. Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps. **Advances in Biochemistry Engineering and Biotechnology**, 57, p.261-287, 1997.
- SUZUKI, S.; FUKUOKA, M.; OOKUCHI, H.; SANO, M.; OZEKI, K.; NAGAYOSHI, E.; TAKII, Y.; MATSUSHITA, M.; TADA, S.; KUSUMOTO, K.; KASHIWAGI, Y. Characterization of *Aspergillus oryzae* glycoside hydrolase family 43 β -xylosidase expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 109, p.115-117, 2010.
- SWEENEY, M.J.; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, 43, p.141-158, 1998.
- SZENDEFY, J.; SZAKACS, G.; CHRISTOPHER, L. Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, 39, p.1354-1360, 2006.
- 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. **Journal of Biosciences and Bioengineering**, 100, p.623-630, 2005.
- TANEJA, K.; GUPTA, S.; KUHAD, R.C. Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99. **Bioresource Technology**, 85, p.39-42, 2002.
- TAPPI Methods T-236cm-85, 1998.
- TAPPI Viscosity of pulp (capillary viscometer method), Test Method T 230 om-08.

- TAUK-TORNISIELO, S.M.; GARLIPP, A.; RUEGGER, M.; ATTILI, D.S.; MALAGUTTI, E. Soilborne filamentous fungi in Brazil. **Journal of Basic Microbiology**, 45, 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 bioprocess: a review. **Process Biochemistry**, 38, p.1327-1340, 2003.
- TERRASAN, C.R.F. Produção e caracterização do complexo xilanolítico de *Penicillium janczeskii*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro – SP. 68p., 2007.
- TERRASAN, C.R.F.; TEMER, B.; DUARTE, M.C.T.; CARMONA, E.C. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresource Technology**, 101, p.4139-4143, 2010.
- TOPAKAS, E.; VAFIADI, C.; CHRISTAKOPOULOS, P. Microbial production. characterization and applications of feruloyl esterases. **Process Biochemistry**, 42, p.497-509, 2007.
- TZANOV, T.; CALAFELL, M.; GUEBITZ, G.M.; CAVACO-PAULO, A. Bio-preparation of cotton fabrics. **Enzyme and Microbial Technology**, 29, p.357-362, 2001.
- UFFEN, R.L. Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 19, p.1-6, 1997.
- VALLS, C.; RONCERO, M.B. Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. **Bioresource Technology**, 100, p.2032–2039, 2009.
- VALLS, C.; VIDAL, T.; RONCERO, M.B. The role of xylanases and laccases on hexenuronic acid and lignin removal. **Process Biochemistry**, 45, p.425-430, 2010.
- van de VYVERA, W.F.J.; DAWSON, B.K.A.; CASEYA, N.H.; TRICARICOB, J.M. Effect of glycosylation on the stability of fungal xylanase exposed to proteases or rumen fluid in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, 116, p.259–269, 2004.
- VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed. New York: Cornell University, 1994. 476p.
- VICUÑA, R.; OYARZÚN, E.; OSSES, M. Assesment of various commercial enzymes in the bleaching of radiate pine *kraft* pulps. **Journal of Microbiology**, 40, p.163-168, 1995.
- VIIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDWUIST, J.; LINKO, M. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. **FEMS Microbiological Reviews**, 13, p.335-350, 1994.
- VIIKARI, L.; RANUA, M.; KANTELINEN, A.; SUNDWUIST, J.; LINKO, M. Bleaching with enzymes. Proceedings of the 3rd Conference on Biotechnology for the pulp and paper industry, p.67-69, 1986.
- VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microbiology and Genetic Bulletin**, 13, p.42-43, 1956.
- WAKIYAMA, M.; YOSHIHARA, K.; HAYASHI, S.; OHTA, K. Purification and properties of an extracellular β -xylosidase from *Aspergillus japonicus* and sequence analysis of the encoding gene. **Journal of Biosciences and Bioengineering**, 106, p.398-404, 2008.

- WANG, C.; EUFEMI, M.; TURANO, C.; GIARTOSIO, A. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. **Biochemistry**, 35, p.7299-307, 1996.
- WEISS, W.P.; CONRAD, H.R.; ST. PIERRE, N.R. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Animal Feed Science Technology**, 39, p.95-110, 1992.
- WONG, D.W.S. Feruloyl esterase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 133, p.87-112, 2006.
- WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N.; YAGUCHI, M. Purification of a third distinct xylanase from the xylonolytic system of *Trichoderma harzianum*. **Can. J. Microbiol**, 32, p.570-576, 1986.
- WONG, K.K.Y.; SADDLER, J.N. *Trichoderma* xylanases, their properties and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, 12, p.413-435, 1992.
- WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SADDLER, J.N. Multiplicity of β -1.4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological Reviews**, 52, p.305-317, 1988.
- WOODWARD, J. Xylanases: functions, properties and applications. **Topics in Enzyme Fermentation and Biotechnology**, 8, p.9-30, 1984.
- XIMENES, F.A.; SILVEIRA, F.Q.P.; FILHO, E.X.F. Production of β -xylosidase activity by *Trichoderma harzianum* strains. **Current Microbiology**, 33, p.71-76, 1996.
- XIROS, C.; TOPAKAS, E.; KATAPODIS, P.; CHRISTAKOPOULOS, P. Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production. **Industrial Crops and Products**, 28, p.213-224, 2008a.
- XIROS, C.; TOPAKAS, E.; KATAPODIS, P.; CHRISTAKOPOULOS, P. Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. **Bioresource Technology**, 99, p.5427-5435, 2008b.
- YAN, Q.J.; WANG, L.; JIANG, Z.Q.; YANG, S.Q.; ZHU, H.F.; LI, L.T. A xylose-tolerant β -xylosidase from *Paecilomyces thermophila*: characterization and its co-action with the endogenous xylanase. **Bioresource Technology**, 99, p.5402-5410, 2008.
- YANG, S.Q.; YAN, Q.J.; JIANG, Z.Q.; LI, L.T.; TIAN, H.M.; WANG, Y.Z. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, 97, p.1794-1800, 2006.
- YANG, X.; CHEN, H.; GAO, H.; LI, Z. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, 78, p. 277-280, 2001.
- ZANOELO, F.F.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 31, p.170-176, 2004.

-
- ZHANG, B.; CHEN, Y.; LI, Z.; LU, W.; CAO, Y. Cloning and functional expression of α -galactosidase cDNA from *Penicillium janczewskii* Zaleski. **Biologia**, 66, p.205-212, 2011.
- ZHAO, J.; LI, X.; QU, Y. Application of enzymes in producing bleached pulp from wheat straw. **Bioresource Technology**, 97, p.1470-1476, 2006.
- ZHELIFONOVA, V.P.; ANTIPOVA, T.V.; KOZLOVSKY, A.G. Secondary metabolites in Taxonomy of the *Penicillium* fungi. **Microbiology (Moscow)**, 79, p.277-286, 2010.
- ZHENG, L.; DU, Y.; ZHANG, J. Degumming of ramie fibers by alkalophilic bacteria and their polysaccharide-degradig enzymes. **Bioresource Technology**, 78, p.89-94, 2001.