

Universidade Estadual Paulista



Júlio de Mesquita Filho

Instituto de Química

Pós-Graduação em Biotecnologia

VALÉRIA CRISTINA SANDRIM

**“Estudo das atividades xilanásicas produzidas pelo
fungo *Aspergillus caespitosus*”**

Orientadora: Maria de Lourdes T. M. Polizeli

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química do *campus* de Araraquara,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Março/2003

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli (Orientadora) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto / USP / Ribeirão Preto.

Profa. Dra. Eleni Gomes – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas / UNESP / São José do Rio Preto.

Profa. Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel Inocentes – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto / USP / Ribeirão Preto.

DADOS CURRICULARES
VALÉRIA CRISTINA SANDRIM

1. DADOS PESSOAIS

- 1.1. Nascimento: 06/12/1977
- 1.2. Nacionalidade: Brasileira
- 1.3. Naturalidade: Ribeirão Preto – SP
- 1.4. Estado Civil: Solteira
- 1.5. Filiação: Pai: Walter Sandrim
Mãe: Aracy Sartori Sandrim
- 1.6. Profissão: Bióloga
- 1.7. Documento de Identidade: 27.370.186-1
- 1.8. Cadastro de Pessoa Física (CIC): 277.091.988-13
- 1.9. Endereço Residencial: Rua México, 1427
Jd Independência
CEP 14076-360
Ribeirão Preto – SP
- 1.10: Endereço Profissional: Av Bandeirantes, 3900
Monte Alegre
CEP 14040-901
Ribeirão Preto – SP

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

- 2.1. Licenciatura em Ciências Biológicas
Curso de Ciências Biológicas, concluído em dezembro de 2000 na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP
- 2.2. Mestrado em Biotecnologia
Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia, concluído em 11 de abril de 2003, no Instituto de Química de Araraquara/UNESP.

3. TRABALHOS CIENTÍFICOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO

Ana Carolina S. Rizzatti, Valéria C. Sandrim, João A. Jorge, Héctor F. Terenzi, Maria de Lourdes T.M. Polizeli. (2003). Influence of temperature on the properties of xylanolytic enzymes of the thermotolerant fungus *Aspergillus phoenicis*. *Microbiological research*.

*Eu quero fazer da minha vida, tudo o que eu possa me orgulhar de mim.
E quando falar sobre minha vida, Eu possa simplesmente dizer:
Minha vida é tudo, não porque é minha vida, mas porque eu faço
com que ela seja mais do que uma simples vida, mais do que
uma vida sem valor ou preconceito. Uma vida que vive
o que tem que ser vivida, sempre a procura de
desafios e objetivos a serem cumpridos.*

*“O mundo é um lugar perigoso de se viver, não por causa daqueles
que fazem mal, mas sim por causa daqueles que observam e
deixam o mal acontecer”.*

Albert Einstein

Dedico este trabalho aos meus pais, Walter e Aracy,
pela luta diária em me proporcionar uma vida melhor.
E a minha querida e amada Andréia, por ter me
mostrado, com suas atitudes, o valor de se
viver em paz a cada dia.

Agradecimentos

À Prof.^a Maria de Lourdes T. M. Polizeli, por sua orientação, carinho, paciência e, principalmente, por estar sempre disposta em me ajudar em diversas ocasiões e ter permitido, durante todo o mestrado, que eu tomasse algumas iniciativas, que com certeza me tornaram mais confiante na vida científica.

Aos professores João Atílio Jorge e Héctor Francisco Terenzi por suas sugestões e colaborações.

À Prof.^a Adriane Milagres da Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL) por me receber em seu laboratório.

Ao Ricardo Fernandes Alarcon por ajudar no funcionamento do laboratório e pelo bom humor e ao Maurício de Oliveira pelo auxílio técnico.

Ao Jorge Betini por ter disponibilizado as polpas de celuloses provenientes da CELPAV.

Aos amigos do laboratório:

À Carol, pela amizade, pelos ensinamentos (“tutora”) e por sempre estar presente quando eu precisava; à Fabiana e a Simone, por estarem sempre estarem ao meu lado; à Ana Carla, por ter me salvado em várias situações; à Karina, Giovana e Michele, pelas opiniões sempre bem vindas; ao Luis e Altino por estarem sempre a disposição em me ajudar. A todos vocês, independente da vida no laboratório, são pessoas maravilhosas e amigas que sei que poderei contar em qualquer etapa da minha vida.

Aos meus pais, Walter e Aracy por sempre me tratarem com carinho e me proporcionarem uma vida digna e repleta de valores; aos meus irmãos, Carlos Alberto e Adilson, pelo carinho sempre presente; à minha cunhada Doris, pelo apoio; à minha cunhada Zi, por ter feito nascer em mim à vontade de conhecer e sempre querer aprender.

Aos meus sobrinhos, Frederico, Beatriz, Júlia e Sofia por tornarem meus dias mais alegres e barulhentos, mesmo naqueles onde eu tinha que devorar um livro de bioquímica.

A todos meus familiares que sempre acreditaram em mim, em especial a Tia Hilda.

À minha amiga Isabela por sempre ter me apoiado e me aturado nos momentos mais difíceis. Ao Thiago, Soraia, Cris Reis, Daniela, Pérola, Sabrina, Lucy, Lili, Paulinha, Mônica, Alessandra, Elisângela (Fia) e Renato, pela amizade cultivada.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

À pós-graduação da Biotecnologia do IQ – UNESP, Araraquara. À Izolina, Vilma e Sandra por estarem sempre dispostas a responder minhas dúvidas durante todo o mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	III
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Biotecnologia.....	1
1.2 Enzimas.....	2
1.3 Parede celular de plantas.....	4
1.4 O sistema xilanolítico.....	8
1.5 Regulação do sistema xilanolítico.....	12
1.6 Importância industrial das enzimas xilanolíticas.....	15
1.7 O microrganismo em estudo.....	20
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 O organismo.....	23
3.2 Manutenção da cepa.....	23
3.3 Condições de cultivo em fermentação submersa.....	23
3.3.1 Fontes de carbono e nitrogênio utilizadas em culturas submersas.....	26
3.3.2 Obtenção das preparações enzimáticas.....	26
3.4 Condições de cultivo em fermentação semi-sólida.....	26
3.4.1 Obtenção das preparações enzimáticas.....	27
3.4.2 Fontes de carbono e nitrogênio utilizadas em culturas semi-sólidas..	27

3.5	Efeito da adição de glicose em culturas submersas e semi-sólidas.....	27
3.6	Análise do crescimento e determinação das atividades enzimáticas.....	28
3.6.1	Análise do crescimento do microrganismo.....	28
3.6.2	Determinação das atividades enzimáticas.....	28
3.6.3	Atividade proteolítica.....	29
3.7	Condições de cultivo para purificação das xilanases.....	29
3.8	Purificação das xilanases secretadas.....	30
3.9	Caracterização enzimática em gel de eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE).....	30
3.10	Caracterização enzimática em gel de eletroforese em condições desnaturantes (SDS- PAGE).....	31
3.11	Gel de atividade.....	31
3.12	Determinação do conteúdo de carboidratos e do ponto isoelétrico.....	32
3.13	Influência da composição de diferentes soluções tampões e seus respectivos pHs sobre as atividades xilanásicas.....	32
3.14	Influência da adição de diferentes íons, EDTA e β -mercaptoetanol sobre as atividades xilanásicas.....	33
3.15	Determinação das constantes cinéticas.....	33
3.16	Biobranqueamento da polpa de celulose.....	33
3.16.1	Polpa.....	33
3.16.2	Consistência das polpas (%).....	33
3.16.3	Tratamento enzimático das polpas.....	34
3.16.4	Determinação do número kappa.....	34
3.16.5	Determinação da viscosidade.....	35

4. RESULTADOS.....	36
4.1 Fermentação submersa.....	36
4.1.1 Determinação do meio de cultivo para produção de xilanases	36
4.1.2 Determinação da temperatura ótima de ensaio.....	37
4.1.3 Influência de diferentes fontes de carbono sobre a atividade xilanásica intracelular e extracelular.....	38
4.1.4 Influência de diferentes fontes de nitrogênio sobre a atividade xilanásica extracelular.....	40
4.1.5 Relação entre o pH inicial de cultivo e a fonte de nitrogênio.....	41
4.1.6 Influência da temperatura e do tempo de cultivo.....	45
4.1.7 Efeito da adição de glicose ao BCA e FT na produção de xilanases.....	45
4.1.8 Caracterização das xilanases em extratos brutos.....	48
4.2 Fermentação semi-sólida.....	53
4.2.1 Substrato de cultivo.....	53
4.2.2 Efeito da umidade do meio.....	54
4.2.3 Efeito da temperatura e do tempo de cultivo.....	54
4.2.4 Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio.....	58
4.2.5 Efeito da adição de sais e da composição de diferentes soluções tampões e seus pHs.....	58
4.2.6 Efeito da adição de glicose.....	62
4.2.7 Efeito de sucessivas extrações enzimáticas.....	63
4.3 Purificação das xilanases extracelulares.....	64
4.3.1 Critério de pureza.....	64
4.3.2 Teor de açúcar na molécula.....	64
4.3.3 Determinação das massas moleculares e dos pIs.....	67

4.3.4	Influência da temperatura e do pH nas atividades xilanásicas extracelulares purificadas.....	68
4.3.5	Estabilidade térmica.....	70
4.3.6	Estabilidade ao pH.....	76
4.3.7	Efeito de íons metálicos, EDTA e β -mercaptoetanol nas atividades xilanásicas extracelulares.....	77
4.3.8	Especificidade aos substratos das xilanases extracelulares purificadas.....	81
4.3.9	Estudo cinético das xilanases extracelulares purificadas.....	82
4.4	Biobranqueamento da polpa de celulose.....	84
5.	DISCUSSÃO.....	88
5.1	Condições mais favoráveis à produção xilanásica em fermentação submersa.....	88
5.2	Condições mais favoráveis à produção xilanásica em fermentação semi-sólida.....	94
5.3	Purificação e caracterização das xilanases.....	96
5.4	Biobranqueamento.....	102
6.	CONCLUSÃO.....	105
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Estrutura esquemática da parede celular de uma fibra de madeira com suas respectivas camadas.....	07
Figura 02 – Estrutura da arabino-metilglucuronoxilana de madeira mole e da acetil-metilglucuronoxilana de madeira dura.....	09
Figura 03 – Enzimas do complexo xilanolítico envolvidas na degradação da xilana e dos oligossacarídeos.....	11
Figura 04 – Regulação da biossíntese de enzimas xilanolíticas.....	14
Figura 05 – Aspecto da polpa de celulose em diferentes etapas da produção de papel.....	17
Figura 06 – Mecanismos propostos de branqueamento da polpa de papel utilizando xilanases.....	19
Figura 07 – Temperatura ótima da atividade xilanásica intracelular e extracelular.....	37
Figura 08 – Efeito da adição de diferentes concentrações de glicose sobre a atividade xilanásica.....	47
Figura 09 - Influência da composição de diferentes tampões e seus respectivos pHs sobre a atividade xilanásica extracelular provenientes de culturas suplementadas com BCA ou FT.....	49
Figura 10 - Estabilidade térmica das xilanases presentes nos extratos brutos provenientes de meios suplementados com BCA ou FT.....	50
Figura 11 – Influência de diferentes íons, EDTA e β - mercaptoetanol sobre a atividade xilanásica.....	51

Figura 12 – Influência de diferentes substratos de cultivo sobre a atividade xilanásica produzida pelo fungo em fermentações semi-sólidas.....	53
Figura 13 – Efeito da adição de água de torneira em SSF suplementadas com FT sobre a atividade xilanásica e proteásica.....	55
Figura 14 – Efeito da adição de água de torneira em SSF suplementadas com BCA sobre a atividade xilanásica e proteásica.....	56
Figura 15 – Influência da temperatura de cultivo sobre a atividade xilanásica e proteásica.....	57
Figura 16 – Efeito da adição de sais na atividade xilanásica produzida pelo fungo em SSF suplementadas com FT ou BCA.....	60
Figura 17 – Influência da composição de diferentes soluções tampões e seus respectivos pHs sobre a atividade xilanásica presente em filtrados extraídos de SSF suplementadas com FT ou BCA.....	61
Figura 18 – Efeito da adição de glicose em diferentes concentrações sobre a atividade xilanásica produzida em SSF suplementadas com FT ou BCA.....	62
Figura 19 – Efeito de sucessivas lavagens do substrato na extração xilanásica.....	63
Figura 20 - Perfil cromatográfico das atividades xilanásicas de <i>Aspergillus caespitosus</i> em coluna Sephadex G-100.....	65
Figura 21 – Perfil eletroforético em PAGE 8,9 das xilanases 1 e 2, géis de atividade da xyl 1 e 2 e SDS-PAGE das duas enzimas.....	66
Figura 22 – Determinação das massas moleculares das xilanases purificadas por cromatografia de filtração.....	67
Figura 23 - Efeito da temperatura nas atividades xilanásicas xyl 1 e xyl 2.....	68

Figura 24 – Efeito do pH e da composição de diferentes tampões sobre as atividades xilanásica 1 e xilanásica 2.....	69
Figura 25 - Estabilidade térmica das xilanases extracelulares presentes no extrato bruto e purificadas.....	72
Figura 26 - Efeito da adição de aditivos na termoestabilidade da xyl 1 a 65°C.....	73
Figura 27 - Efeito da adição de aditivos na termoestabilidade da xyl 2 a 65°C.....	74
Figura 28 – Estabilidades das xilanases ao pH.....	76
Figura 29 – Efeito da adição de íons sobre a atividade xilanásica da xyl 1 e xyl 2.....	79
Figura 30 – Representações gráficas de Lineweaver-Burk para as xilanases purificadas.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Importação e exportação do mercado brasileiro de enzimas no período de 2000 e 2001.....	05
Tabela 02 – Composição química (%) da parede celular de uma fibra de madeira.....	07
Tabela 03 – Composição química de algumas espécies de madeira mole e madeira dura.....	10
Tabela 04 – Propriedades físico-químicas de xilanases produzidas por diferentes microrganismos.....	13
Tabela 05 – Propriedades de algumas xilanases comercializadas.....	21

Tabela 06 – Atividades xilanásicas intracelular e extracelular produzidas pelo fungo <i>Aspergillus caespitosus</i> cultivado em diferentes meios.....	36
Tabela 07 – Efeito de diferentes fontes de carbono (açúcares) sobre o crescimento de <i>Aspergillus caespitosus</i> e a produção xilanásica intracelular e extracelular.....	39
Tabela 08 – Efeito de diferentes fontes de carbono (resíduos industriais e outros compostos) sobre o crescimento de <i>Aspergillus caespitosus</i> e a produção xilanásica intracelular e extracelular.....	39
Tabela 09 – Efeito da adição de diversas fontes de nitrogênio sobre o crescimento e as atividades totais e específicas.....	42
Tabela 10 - Efeito da adição de diferentes concentrações de peptona sobre a atividade xilanásica extracelular.....	43
Tabela 11 – Influência do pH inicial de cultivo sobre a atividade xilanásica extracelular total e específica.....	43
Tabela 12 – Relação entre a fonte de nitrogênio adicional à peptona no Meio SR e o pH inicial de cultivo sobre a produção xilanásica extracelular.....	44
Tabela 13 – Influência da temperatura e do tempo de cultivo sobre a atividade xilanásica extracelular e o crescimento do fungo.....	46
Tabela 14 – Determinação de várias atividades enzimáticas extracelulares produzidas em meios suplementados com BCA e FT.....	52
Tabela 15 – Efeito da adição de fontes de nitrogênio em meios suplementados com FT sobre a atividade xilanásica.....	59
Tabela 16 – Efeito da adição de fontes de nitrogênio em meios suplementados com BCA sobre a atividade xilanásica.....	59
Tabela 17 – Efeito da concentração de peptona adicionada a SSF.....	60

Tabela 18 - Purificação das xilanases extracelulares de <i>Aspergillus caespitosus</i>	65
Tabela 19 – Efeito da presença de aditivos nas termoestabilidades da xyl 1 e da xyl 2, a 65°C.....	75
Tabela 20 – Efeito da adição de íons nas atividades xilanásicas purificadas.....	78
Tabela 21 – Efeito da adição de β -mercaptoetanol e EDTA nas atividades xilanásicas xyl 1 e xyl 2.....	80
Tabela 22 – Especificidade das xilanases purificadas (xyl 1 e 2)	81
Tabela 23 – Constantes cinéticas das xilanases 1 e 2 purificadas.....	82
Tabela 24 – Efeito da adição de xilanases provenientes de FSM no biobranqueamento e na viscosidade de polpas de celulose.....	85
Tabela 25 – Efeito da adição de xilanases provenientes de FSS no biobranqueamento e na viscosidade de polpas de celulose.....	85
Tabela 26 – Efeito da adição de diferentes doses de xilanases por grama de polpa de celulose.....	86
Tabela 27 – Variação do pH e da temperatura das polpas.....	87

RESUMO

A parede celular de planta é constituída por três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina. Entre as hemicelulose, xilana é o heteropolissacarídeo mais comum, e a principal enzima responsável por sua degradação é por *Aspergillus caespitosus* cultivado em fermentações submersa (FSM) ou semi-sólida (FSS). As xilanases foram purificadas, caracterizadas e testadas no branqueamento da polpa de celulose.

Em relação a FSM, o melhor meio de produção xilanásica foi o SR suplementado com 1% de farelo de trigo (FT) ou bagaço de cana-de-açúcar (BCA), mais peptona 0,25% ou 0,1%, respectivamente. As fermentações foram realizadas a 40°C durante 48 horas em meios com pH iniciais de 8,0 (BCA) ou 6,0 (FT). Não houve ativação enzimática com a adição de íons metálicos, principalmente com as amostras obtidas dos meios com BCA. As xilanases obtidas do meio com BCA foram inativadas termicamente a 55°C e 65°C, mais rápido do que as xilanases presentes nos filtrados das culturas com FT. Adição de diferentes concentrações de glicose no meio suplementado com BCA ou FT reduziu a produção de xilanases, mas de diferente modo, considerando que a repressão foi retardada na primeira condição.

FSS foram realizadas também com FT ou BCA, mais 4 ou 8 mL de água por grama de substrato, respectivamente, a 30°C durante 3 ou 6 dias. Os meios contendo FT e BCA foram suplementados com nitrato de amônio ou peptona, respectivamente. Não foi observada repressão catabólica por glicose nessas fermentações.

Duas xilanases, xyl 1 e xyl 2, foram purificadas usando Sephadex G-100. Xyl 2 exibiu maior conteúdo de carboidrato (41%) do que xyl 1 (29%), o que pode explicar sua maior estabilidade a temperatura e pH. Além disso, esta propriedade provavelmente acarretou na interação carboidrato-carboidrato dessa enzima com a matrix da resina, levando a uma estimativa errada da massa molecular, que por este método (filtração em gel) foi de 7,7 kDa, enquanto que por SDS-PAGE foi de 17,7. A massa molecular da xyl 1 foi estimada em 26.3 kDa por filtração em gel e 27.7 kDa por SDS-PAGE. As temperaturas ótimas de ambas as enzimas foi de 50 – 55°C e o pH ótimo de 7,0 – 7,5 para xyl 1 e 5,5 – 6,5 para xyl 2. Vários íons metálicos testados foram ineficientes em estimular as atividades xilanolíticas, sendo que algumas inibições foram observadas principalmente para xyl 1. Adição de EDTA não alterou significativamente essas atividades. Adição de β -mercaptoetanol aumentou as atividades xilanásicas em 59% (xyl 1) e 102% (xyl 2). As enzimas purificadas

hidrolisaram somente xilana. Estudos cinéticos demonstraram diferentes valores entre as xilanases. Para xyl 1, os valores de K_m (mg/mL) e $V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{i}na}^{-1}$) foram de 2,5 e 1679, respectivamente, al\em disso, na presen\ca de β -mercaptoetanol, esses valores foram de 2,9 e 2728, correspondentemente. Para xyl 2, aqueles valores naquela ordem foram de 3,9 e 113 sem e 1,9 e 133 com β -mercaptoetanol.

Avalia\c3o do branqueamento da polpa de celulose por xilanases secretadas por *Aspergillus caespitosus* demonstrou que a a\c3o dessas enzimas foi dependente das caracter\\sticas da polpa. Al\em disso, extratos obtidos das FSM foram mais efetivos, principalmente aqueles obtidos de culturas suplementados com FT. As xilanases purificadas tiveram diferentes efeitos de branqueamento que poderia estar relacionado com diferen\c3as nas propriedades bioqu\\micas, tais como estabilidade \c3 temperatura e pH, e tamanho molecular.

ABSTRACT

The plant cell wall is constituted by three main compounds: cellulose, hemicellulose and lignin. Among the hemicelluloses, xylan is the heteropolysaccharide most common, and the principal enzyme responsible for its degradation is xylanase. This study investigated some optimal culture conditions for xylanase production by the filamentous fungus *Aspergillus caespitosus* cultivated in submerged fermentation (SMF), or solid-state-fermentation (SSF). The xylanases were purified, biochemical characterized and assayed in pulp bleaching.

With regard to SMF, several media were tested, but the best results for xylanase production were obtained with SR medium supplemented with 1% (w/v) wheat bran (WB) or sugar cane bagasse (SCB), and with 0.25% (w/v) or 0.1% (w/v) peptone, respectively. Fermentation was carried out at 40°C, for 48 hours, in media with initial pH of 8.0 (SCB) or 6.0 (WB). There was no enzymatic activation by the addition of metallic ions, mainly for the samples obtained from SCB medium. The xylanase obtained from SCB crude extracts was thermally inactivated at 55°C and 65°C, faster than that of the xylanase obtained from WB culture filtrates. Addition of different glucose concentrations to media supplemented with SCB or WB reduced xylanase production, but in a different way, considering that the repression was retarded in the first condition.

SSF were carried out also with 2 g WB or SCB, plus 4 mL or 8 mL water, respectively, at 30°C for 3 or 6 days. The WB and SCB media were supplemented with ammonium nitrate or peptone, respectively. It was not observed repression by glucose for these fermentations.

Two xylanases, xyl 1 and xyl 2, were purified using Sephadex G-100. Xyl 2 exhibited higher carbohydrate content (41%) than xyl 1 (29%), which might explain its higher stability for temperature and pH. Furthermore, this property probably caused a carbohydrate-carbohydrate interaction of this enzyme with the resin matrix, leading to a wrong estimate of the molecular mass, that by this method (gel filtration) was of 7.7 kDa, while by SDS-PAGE was 17.7 kDa. The molecular mass of xyl 1 was estimated 26.3 kDa by gel filtration, and 27.7 kDa by SDS-PAGE. Optimal temperature was the same for both enzymes (50 - 55°C) and the optimal pH values were 7.0 – 7.5 for xyl 1, and 5.5 – 6.5 for xyl 2. Several metal ions tested were ineffective in stimulating the xylanolytic activities; rather, some inhibition was observed, mainly for xyl 1. Addition of EDTA did not alter significantly these activities. Addition of β -mercaptoethanol increased the xylanase activities 59% (xyl 1) and 102% (xyl 2). The purified enzymes hydrolyzed

only xylan. Kinetics studies demonstrated different values between xylanases. For xyl 1, K_m (mg/mL) and V_{max} ($\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$) values were 2.5 and 1679 respectively, moreover, in the presence of 10 mM β -mercaptoethanol, these values were 2.9 and 2728, correspondingly. For xyl 2, those values in that order were 3.9 and 113 without and 1.9 and 133 with β -mercaptoethanol.

Evaluation of cellulose pulp bleaching by xylanases secreted by *Aspergillus caespitosus* demonstrated that the action of these enzymes was dependent of the pulp characteristics. Furthermore, extracts obtained of SMF were more effective, principally those obtained from cultures supplemented with WB. The purified xylanases had different bleaching effects that might be related with the differences in biochemical properties of each enzyme, such as temperature and pH stabilities, and molecular size.

1. INTRODUÇÃO

1.1 BIOTECNOLOGIA

A biotecnologia passou a ser considerada prioritária há relativamente pouco tempo, no entanto, processos biotecnológicos vêm sendo utilizados na produção de vários bens desde a mais remota antiguidade. O preparo de bebidas fermentadas a partir de cereais, por exemplo, foi realizado na Babilônia e no Egito entre os anos 8.000 a 6.000 a.C., a produção de pão, utilizando fermentos, ocorreu no Egito, 4.000 anos a.C. e a produção de vinhos na Grécia, 2.000 a.C. (Schmidell *et al.*, 2001).

Existem várias propostas definindo o que vem a ser biotecnologia. Segundo o Prof. Antônio Paes de Carvalho, em seu trabalho intitulado “Patentes para a biotecnologia”, apresentada em reunião na Academia Brasileira de Ciências:

“Entende-se por biotecnologia o conjunto de conhecimentos, técnicas e métodos, de base científica ou prática, que permite a utilização de seres vivos como parte integrante e ativa do processo de produção industrial de bens e serviços”.

O Office of Technology Assessment, por sua vez, definiu biotecnologia como sendo:

“O conjunto de processos industriais que englobam processos biológicos”.

Por outro lado, a Union Internationale de Chimie Purê et Appliquée, conceituou biotecnologia como:

“Aplicação da bioquímica, da biologia, da microbiologia e da engenharia química aos processos e produtos industriais (incluindo os produtos relativos à saúde, energia e agricultura) e ao meio ambiente”.

Finalmente, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), em seu programa nacional de biotecnologia, a definiu nos seguintes termos:

“A utilização de sistemas celulares para obtenção de produtos ou desenvolvimento de processos industriais”.

As poucas tentativas de definição aqui transcritas mostram, nitidamente, que a biotecnologia tem por base vários ramos do conhecimento. Trata-se, portanto, de um campo de trabalho tipicamente multidisciplinar, o que torna absolutamente imprescindível à efetiva colaboração e integração de profissionais atuantes em diferentes setores do conhecimento.

Pesquisa realizada em 2001 pela Fundação Biominas e patrocinada pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) revela que o Brasil possui 304 empresas atuando na área de biotecnologia. O estudo apontou uma concentração nas regiões Sul e Sudeste, que detêm 90% das empresas do setor, sendo que São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro abrigam 81% da atividade empresarial. O Norte e o Nordeste possuem menor densidade, respondendo por apenas 3% do conjunto do país. Já o Centro-Oeste detém 5% do parque industrial.

As empresas têm vocações diferenciadas com relação à área da biotecnologia em que atuam. São Paulo tem 57% de seus empreendimentos concentrados nas categorias fornecedores e multinacionais, ou seja, em sua maioria são empresas de grande porte e de capital estrangeiro. Em Minas Gerais predominam as organizações nacionais, sendo 65% voltadas para as áreas de saúde humana e animal, incluindo a biomedicina e biomateriais com aplicações médicas e veterinárias.

Paraná e Brasília destacam-se pela predominância do agronegócio e saúde humana, animal e vegetal. Na capital federal 70% das empresas biotecnológicas atuam nessas áreas e, no Paraná, 37%.

O estudo aponta também a importância do processo de incubação como instrumento de descentralização de empresas para as diversas regiões do país. Das 304 empresas pesquisadas, 58, ou seja, um quinto, são empresas incubadas. Em Brasília e no Nordeste o mecanismo de incubação vem despontando como instrumento de criação e manutenção de empresas de biotecnologia (M.C.T., 2001).

1.2 ENZIMAS

A maioria das enzimas é proteína. Elas apresentam propriedades catalíticas que vêm sendo empregadas em vários ramos da biotecnologia. Sua obtenção se faz a partir de microrganismos, animais e vegetais. Nas aplicações industriais as enzimas microbianas são as mais utilizadas devido às facilidades da obtenção destas em relação às outras, pois é possível: obter uma grande população desses organismos,

selecionar cepas de alta produtividade, a recuperação enzimática é mais simples e o fabricante pode monitorar sua produção em todas as fases.

Dentre os microrganismos mais utilizados industrialmente destacam-se: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor pusillus*, *Trichoderma reesei* e *Saccharomyces cerevisiae*. Os tipos de cultivo de microrganismo mais comuns são a fermentação semi-sólida e a submersa, sendo esta última a mais utilizada, fato este ocorrido a partir da Segunda Guerra Mundial onde era necessário agilizar a produção de compostos, principalmente de penicilina (Hesseltine, 1977). Dessa forma, a partir desse período, as pesquisas se voltaram quase que exclusivamente para este tipo de fermentação. Entretanto, segundo Pandey *et al.* (2000), o uso de fermentação semi-sólida vem crescendo, o qual pode ser evidenciado pelo grande número de publicações (> 1000) durante o período de 1991-1999.

O meio semi-sólido caracteriza-se pelo crescimento e metabolismo do microrganismo sobre sólidos, na ausência ou quase de água livre flutuante. As vantagens deste sistema incluem: economia de espaço necessário à fermentação; simplicidade do meio de fermentação; não há necessidade de maquinarias complexas, equipamentos e sistemas de controle; alta produtividade; baixo gasto energético; custo baixo; e fácil controle da contaminação devido ao baixo conteúdo de água no sistema (Raimbault & Alazard, 1980; Lonsane & Ramesh, 1990; Pandey, 1992; Babu & Satyanarayana, 1995). Além disso, esse modo de cultivo assemelha-se ao modo de vida natural de muitos microrganismos (Ferreira *et al.*, 1999).

Entretanto, este sistema possui algumas limitações, tais como: limite de escolha de microrganismo, já que nem todos são capazes de crescer nestas condições; exaustiva demanda no monitoramento e controle de parâmetros como temperatura, pH, umidade, fluxo de ar, transferência de oxigênio livre, remoção de CO₂ gerado durante a fermentação; e a necessidade de pré-tratamento de certos substratos (Raimbault & Alazard, 1980; Lonsane & Ramesh, 1990; Pandey, 1992).

Fermentação semi-sólida geralmente utiliza resíduos agroindustriais como: palha de trigo, farelo de trigo, palha de arroz, sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar e palha de algodão (Raimbault & Alazard, 1980; Lonsane & Ramesh, 1990; Pandey, 1992; Babu & Satyanarayana, 1995; Ferreira *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2001). Fungos filamentosos são, na maioria das vezes, os microrganismos usados neste tipo de fermentação, pois são capazes de crescer sobre materiais sólidos com baixo conteúdo de água (Lonsane & Ramesh, 1990).

Atualmente, as enzimas são utilizadas em várias aplicações industriais e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas tem crescido rapidamente. Em 1995, o mercado mundial de enzimas superou 1 bilhão de dólares, enquanto espera-se para 2005, a comercialização de 1,7 a 2 bilhões. Cerca de 60% das indústrias que vendem enzimas encontram-se na Europa, as outras 40% estão nos EUA e no Japão (revisto por Bhat, 2000).

A aplicação de celulases e xilanases começou na década de 80, primeiro em rações animais, seguida pela adição em alimentos e posteriormente em indústrias têxtil e de papel. Atualmente, essas enzimas juntamente com as pectinases, são responsáveis por 20% do mercado mundial (revisto por Bhat, 2000).

Os dados do mercado brasileiro de enzimas fornecidos pela Secretaria de Comércio do Banco do Brasil (Tabela 01), indicam que o total de enzimas produzidas nacionalmente é incapaz de suprir este mercado, acarretando na necessidade de se importar uma grande quantidade de enzimas, principalmente α -amilases e proteases. Sendo assim, com o intuito de diminuir o déficit comercial desse setor é estritamente necessário que se desenvolva novas tecnologias permitindo a produção de enzimas em grandes quantidades e com baixo custo, o qual poderia ser alcançado utilizando-se biomassa vegetal, amplamente abundante no Brasil. Além disso, a rica diversidade biológica encontrada neste país amplia a possibilidade de se encontrar linhagens de microrganismos mais eficientes, cujo produto se adeque mais às necessidades brasileiras.

1.3 PAREDE CELULAR DE PLANTAS

Em uma única planta há vários tipos de células, sendo que cada uma possui paredes celulares distintas em sua estrutura e composição. As paredes celulares são compostas de microfibrilas de celulose embebidas em lignina, hemicelulose e pectina (Beguin & Aubert, 1994).

Na Figura 01 pode-se observar a estrutura de uma parede celular de planta. Esta consiste de paredes primárias e secundárias. A primária (P) é formada por uma rede composta principalmente por lignina e pectina, e ocupa de 7 a 14% da parede celular. A parede secundária se divide em três camadas distintas S1, S2 e S3, classificadas segundo a orientação das fibras de celulose, sendo que a camada S1 representa 5 – 11% da parede celular; a S2, 74 – 84%; e a S3, 3 – 4%. Na lamela média, cuja função

é aderir uma célula a outra formando um tecido, a substância predominante é a lignina (Mitchell *et al.*, 1992), polímero de estrutura não uniforme e massa molecular elevada, composto basicamente de unidades de fenil propano.

A composição química de cada camada da parede celular de madeiras está apresentada na Tabela 02, nota-se que a P é composta em sua maioria de lignina, já em S, com exceção de S1, os compostos predominantes são celulose e hemicelulose (Almeida, 1981).

As hemiceluloses podem ser definidas como um grupo de heteropolissacarídeos da parede celular, com exceção da celulose e pectina. Possuem baixa massa molecular (70 a 200 monossacarídeos) e podem ser facilmente extraídos por delignificação do material (Timell, 1967; revisto por Ferreira-Filho, 1994). Além disso, esses polissacarídeos têm propriedades que permitem sua adesão, mediada por interações covalentes com lignina e não-covalentes com celulose que são essenciais para manter a integridade da parede celular (Esaú, 1993). Somando-se a isto, as hemiceluloses são subcomponentes da biomassa sendo responsável por 1/3 de todo o carbono orgânico renovável na Terra. Biomassa é o único recurso natural alternativo às substâncias químicas, com um ciclo curto de reposição capaz de sustentar a demanda no mercado mundial de produtos químicos, bioquímicos e combustíveis. Assim, o desenvolvimento de tecnologias de baixo custo, onde hemicelulose é o substrato principal, é essencial para atingir uma performance do sistema global (Prade, 1995).

Nas plantas terrestres, as hemiceluloses podem ser compostas por uma variedade de monossacarídeos como: D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose, L-arabinofuranose, ácido 4-O-metil-D-glucurônico e ácido galacturônico, sendo classificadas geralmente de acordo com os resíduos de açúcares que as compõem, como: glucuronoxilanas, glucomananas, galactoglucomananas, entre outras (Viikari *et al.*, 1994).

Entre as hemiceluloses, a xilana é o componente mais abundante. A estrutura básica da xilana consiste de uma cadeia principal linear de resíduos β -D-xilopiranosil unidos por ligações glicosídicas β -1,4 (Haltrich *et al.*, 1996). Normalmente, esses resíduos possuem ramificações contendo principalmente grupos acetil, ácido 4-O-metil-D-glucurônico e L-arabinose (Puls & Poutanen, 1989).

As hemiceluloses presentes em gimnospermas (madeira mole) e angiospermas (madeira dura) possuem composições distintas (Saka, 2001). Em madeiras moles (Figura 02 A), a hemicelulose predominante é a O – acetilgalactoglucomananas ($\pm 18\%$),

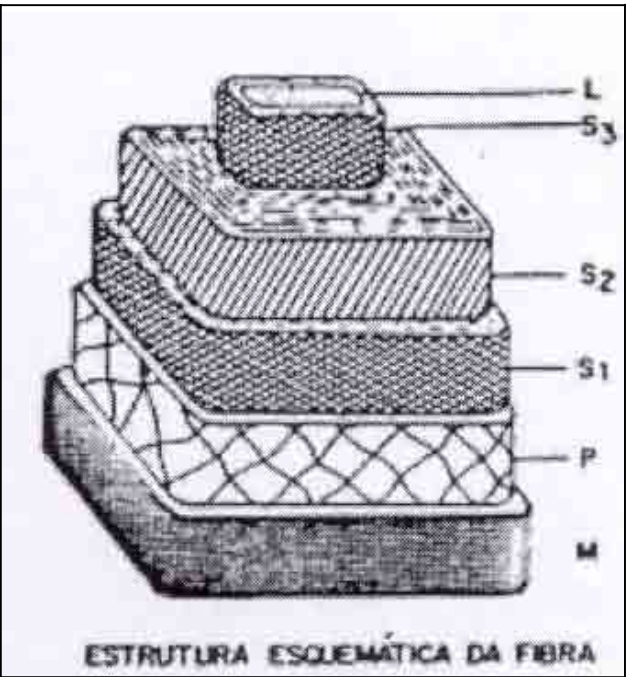


Figura 01 – Estrutura esquemática da parede celular de uma fibra de madeira com suas respectivas camadas (Legenda: M - Lamela média; P - Parede primária; S1, S2 e S3 - Parede Secundária 1, 2 e 3, respectivamente; L - Lúmen). Figura extraída de Almeida (1981).

Tabela 02 – Composição química (%) da parede celular de uma fibra de madeira

	Composição Química (%)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Parede Primária	10	20	70
Parede Secundária			
S1	35	25	40
S2	55	30	15
S3	55	40	5
Lamela Média	0	10	90

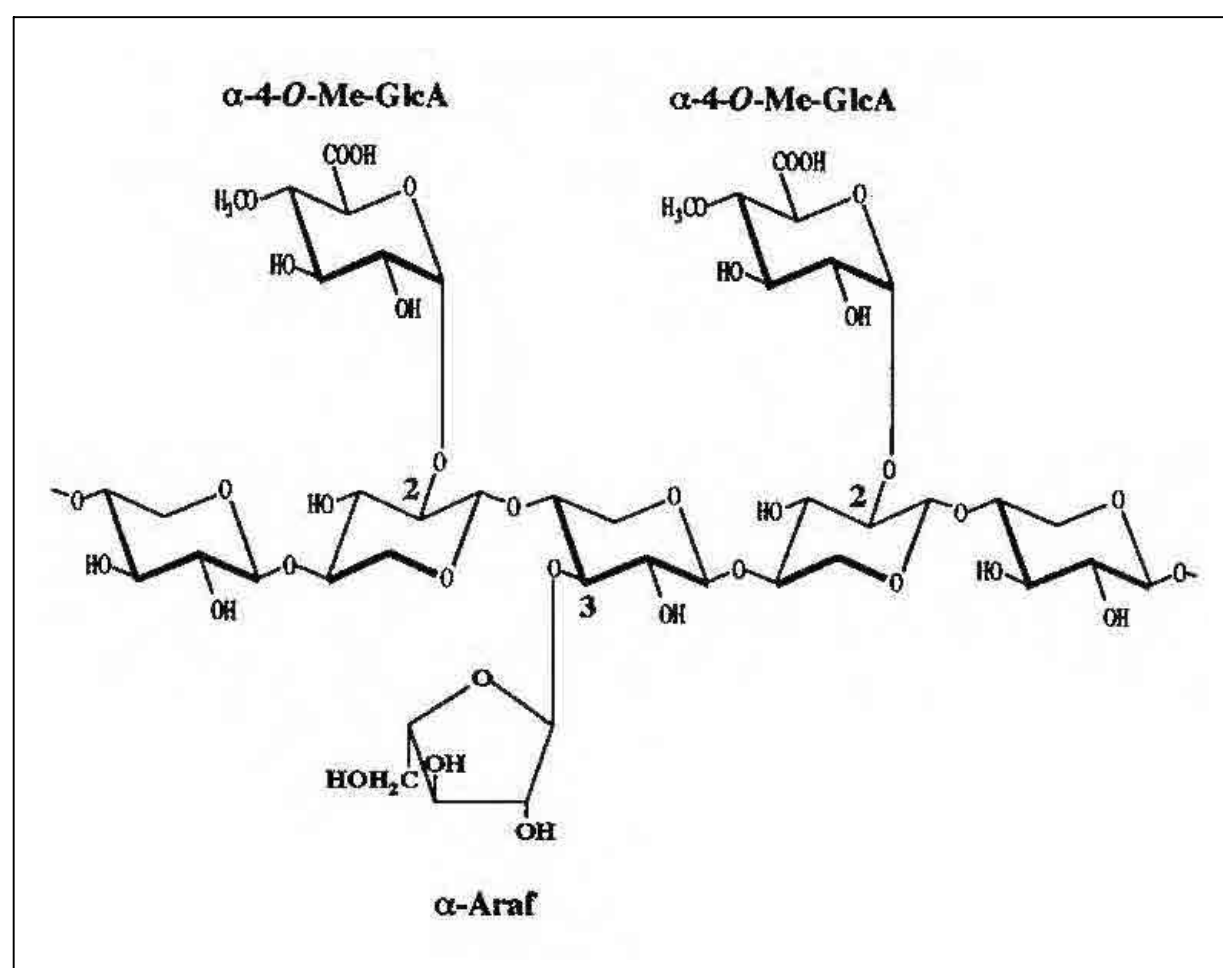
Tabela adaptada de Almeida (1981).

seguida pela arabino-4-O-metilglucuronoxilana ($\pm 10\%$), composta de resíduos de xilose unidos por ligação β -1,4 e grupos arabinofuranosídeos e ácidos metilglucurônicos ligados no C-3 e C-2 da xilose respectivamente (Sunna & Antranikian, 1997). Em madeiras duras, a hemicelulose predominante é a O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana (Figura 02 B) responsável por 20 – 35% das hemiceluloses nesse tipo de madeira. Além dos resíduos de xilose, esse tipo de hemicelulose contém o ácido metilglucurônico no C-2 e grupos acetil principalmente no C-3 da xilose. A presença desses grupos permite a maior solubilidade das hemiceluloses (Sunna & Antranikian, 1997). Na Tabela 03 está apresentada a composição química de quatro espécies de madeira mole e madeira dura, onde pode-se observar algumas variáveis entre as espécies e o tipo de madeira.

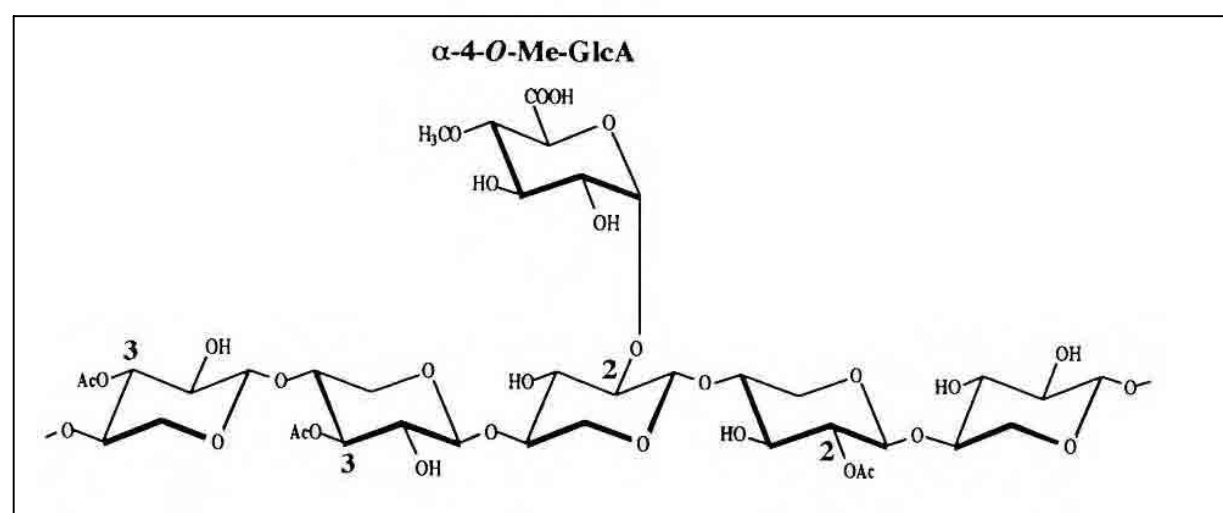
1.4 O SISTEMA XILANOLÍTICO

A presença de diferentes resíduos influencia as propriedades químicas e estruturais das hemiceluloses, além de requerer a ação de várias enzimas a sua degradação total. O sistema enzimático responsável pela degradação total das hemiceluloses (Figura 03), contendo xilana como estrutura principal, é composto principalmente por β -1,4-endoxilanase e β -xilosidase, mas podem estar presentes α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), que remove os resíduos de L-arabinose substituídos no C-3 das unidades de xilose (Kaneko *et al.*, 1993); α -glucuronidase (EC 3.2.1.-), que age hidrolisando as ligações α -1,2 entre ácido glucurônico e resíduos de xilose em glucuroxilano (Puls & Schuseil, 1993); acetilxilana esterase (EC 3.1.1.6), que remove grupamentos O-acetil a partir da posição C-2 e/ou C-3 dos resíduos de xilose (Shao & Wiegel, 1995) e algumas esterases, como o ácido ferrúlico esterase e o ácido p-coumárico esterase que clivam na xilana, respectivamente, as ligações éster entre resíduos de arabinose e ácido ferrúlico ou ácido p-coumárico (Christov & Prior, 1993).

Todas essas enzimas agem cooperativamente permitindo a conversão de xilana em seus açúcares constituintes. Por exemplo, em *Talaromyces emersonii* as xilanases II e III são incapazes de hidrolisar arabinoxilana se esta não foi previamente tratada com arabinofuranosidase, a qual é secretada pelo microrganismo juntamente com as xilanases (Tuohy *et al.*, 1993). No entanto, em *Bacillus subtilis* apenas a ação de xilanases e β -xilosidases foram suficientes para total conversão de xilana em xilose (Nanmori *et al.*, 1990). Entretanto, a presença de todo o complexo enzimático é pouco comum entre bactérias e fungos (Wong *et al.*, 1988; Coughlan & Hazlewood, 1993).



A



B

Figura 02 – Estrutura da arabino-4-O-metilglucuronoxilana de madeira mole (A) e da O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana de madeira dura (B). Os números indicam os átomos de carbono aos quais ligam-se os grupos substituintes. Abreviações: Ac – grupo acetil; α -4-O-Me-GlcA – ácido α -4-O-metilglucurônico; α -Araf – α -arabinofuranose (adaptado de Sunna & Antranikian, 1997).

Tabela 03 – Composição química de algumas espécies de madeira mole e madeira dura

Constituinte da parede celular	Madeira Mole		Madeira Dura	
	<i>Abies balsamea</i>	<i>Pinus strobus</i>	<i>Acer rubrum</i>	<i>Betula papyrifera</i>
Celulose	42	41	45	42
Lignina	29	29	24	19
Glucuronoxilana	9	9	25	35
Glucomanana	18	18	4	3
Pectina, Amido, etc	2	3	2	1

Adaptado de Saka, 2001.

As β -1,4-endoxilanases (1,4- β -D-xilana xilohidrolase; EC 3.2.1.8) são comuns na natureza e têm sido descritas em bactérias terrestres e marinhas, em bactérias presentes no sistema digestivo dos ruminantes, em fungos, algas marinhas, protozoários, caracóis, crustáceos, insetos e sementes de plantas terrestres (Dekker & Richards, 1976). Entre as diferentes funções das xilanases estão a biodegradação que permite o fornecimento de fontes de energia metabolizante, a degradação de componentes da parede celular em interação com outras enzimas que degradam polissacarídeos e digestão dos vegetais da dieta (Sunna & Antranikian, 1997).

As xilanases agem clivando as ligações glicosídicas internas da cadeia principal da heteroxilana, resultando em uma diminuição no grau de polimerização do substrato. As ligações a serem hidrolisadas dependem da natureza do substrato, ou seja, do comprimento e/ou grau de ramificação da xilana, assim como a presença ou não de substituintes. Inicialmente, a clivagem da xilana tem xilooligossacarídeos como produtos formados, mas conforme a hidrólise prossegue, estes podem ser hidrolisados à xilotriose, xilobiose e xilose (Sunna & Antranikian, 1997). As endoxilanases têm sido classificadas de diferentes formas, de acordo com:

- Os produtos finais liberados pela hidrólise da xilana, podendo ser não-ramificadoras ou ramificadoras, sendo que no primeiro caso não há a liberação de arabinose, ao contrário do segundo (Dekker & Richards, 1976);
- Com o ponto isoelétrico e massa molecular. Uma propriedade físico-química das endoxilanases de fungos e bactérias parece ser a forte relação entre os valores das suas massas moleculares e seus pontos isoelétricos. Aproximadamente 70% das endoxilanases ácidas têm massa molecular acima de 30 kDa. Percentuais próximos estão relacionados as endoxilanases básicas que mostram valores de

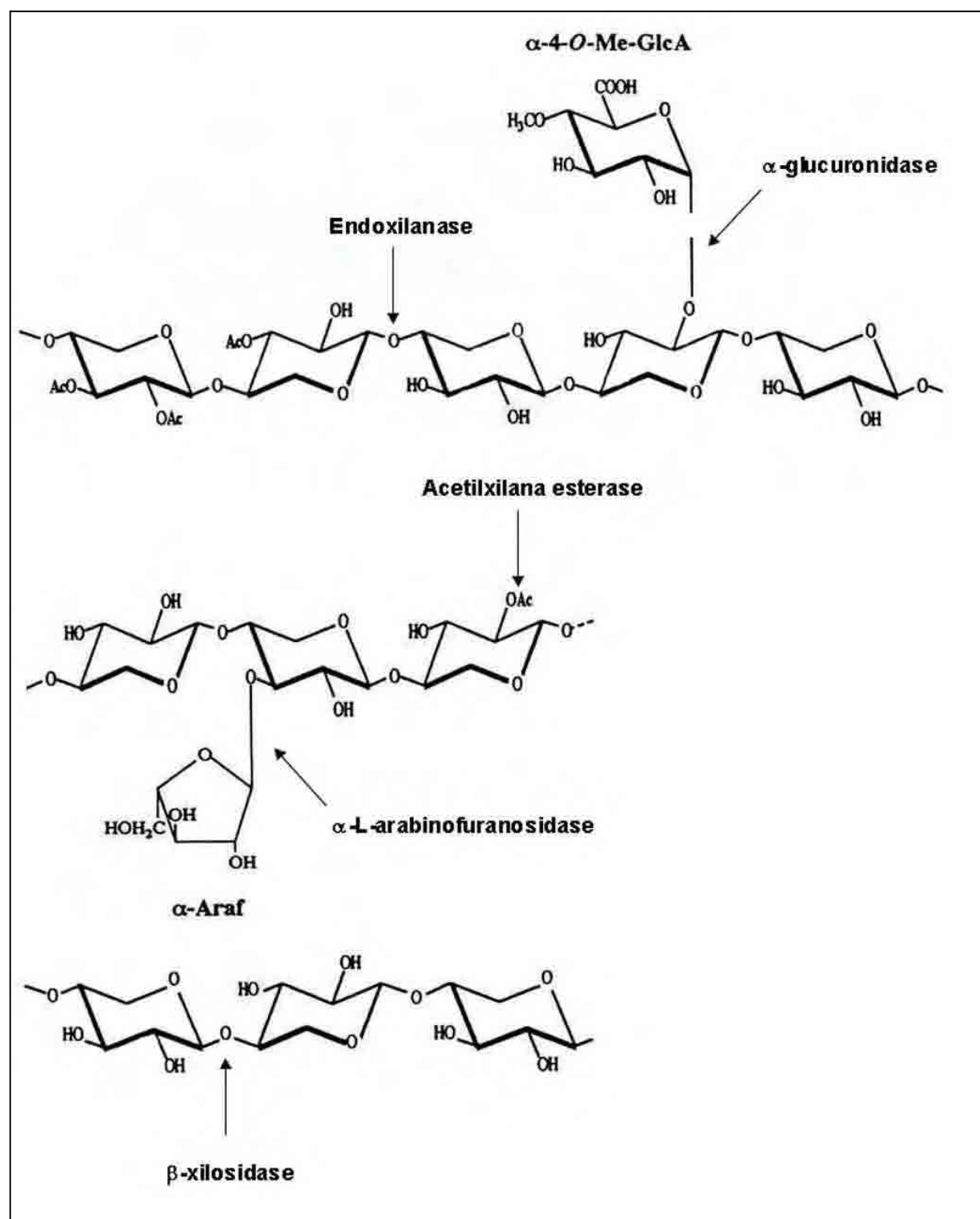


Figura 03 – Enzimas do complexo xilanólítico envolvidas na degradação da xilana e dos oligossacarídeos. Abreviações: Ac – grupo acetil; α -O-Me-GlcA – ácido α -4-O-metilglucurônico; α -Araf - α -arabinofuranose (adaptado de Sunna & Antranikian, 1997).

massas moleculares abaixo de 30 kDa. Entretanto, muitas exceções têm sido descritas, sendo encontradas endoxilanases com baixo ponto isoelétrico e baixa massa molecular ou vice versa (Wong *et al.*, 1988).

Várias xilanases já foram purificadas de diferentes microrganismos. Geralmente a purificação dessas enzimas é difícil, necessitando de várias etapas, sendo que a recuperação na maioria das vezes é baixa (Morales *et al.*, 1995; Bataillon, 2000). Além disso, muitas vezes que se aplicam colunas de filtração nos processos, ocorre interação das xilanases com a resina utilizada, dificultando a estimativa da massa molecular (Gerber *et al.*, 1997).

Na Tabela 04 estão apresentadas algumas características físico-químicas de xilanases purificadas. As xilanases de origem fúngicas têm massas moleculares entre 6 – 83 kDa e são geralmente mais ativas em pHs 3,5 – 6,5 e a 40 – 60°C (Bailey *et al.*, 1991). Em relação às de origem bacteriana, as massas moleculares são maiores, entre 15 a 85 kDa, com poucas exceções. Essas são mais ativas em pHs 5,0 – 8,0 e 50 – 80°C (Sunna & Antranikian, 1997).

A inibição de xilanases por compostos químicos específicos pode fornecer informações sobre a estrutura do sítio ativo. Essas enzimas geralmente são inibidas por íons metálicos como mercúrio, cobre, ferro, zinco e prata.

As β -D-xilosidases (β -D-xilosídeo xilohidrolase; E.C. 3.2.1.37) são exoglicosidases que hidrolisam xilooligossacarídeos pequenos, a partir da extremidade não redutora (Wong *et al.*, 1988). β -xilosidases são capazes de clivar substratos artificiais como o *p*-nitrofenil β -D-xilosídeo (Coughlan & Hazlewood, 1993), como foi demonstrado em *Humicola grisea* var. *thermoidea* (Almeida *et al.*, 1995) e *Aspergillus phoenicis* (Rizzatti *et al.*, 2001).

1.5 REGULAÇÃO DO SISTEMA XILANOLÍTICO

Ainda é necessário desenvolver vários estudos sobre a indução e secreção das xilanases para possíveis aplicações comerciais. Vários trabalhos mostram xilanases sendo induzidas, mas constitutivas em altos níveis são raras. Devido à alta massa molecular da xilana, ela não consegue penetrar na célula e desencadear a síntese das enzimas xilanolíticas. Sendo assim, como pode ser observado na Figura 04, como xilose, xilobiose e xilooligossacarídeos, liberados da xilana pela ação de pequenas quantidades de enzimas produzidas constitutivamente, penetram na célula devido a

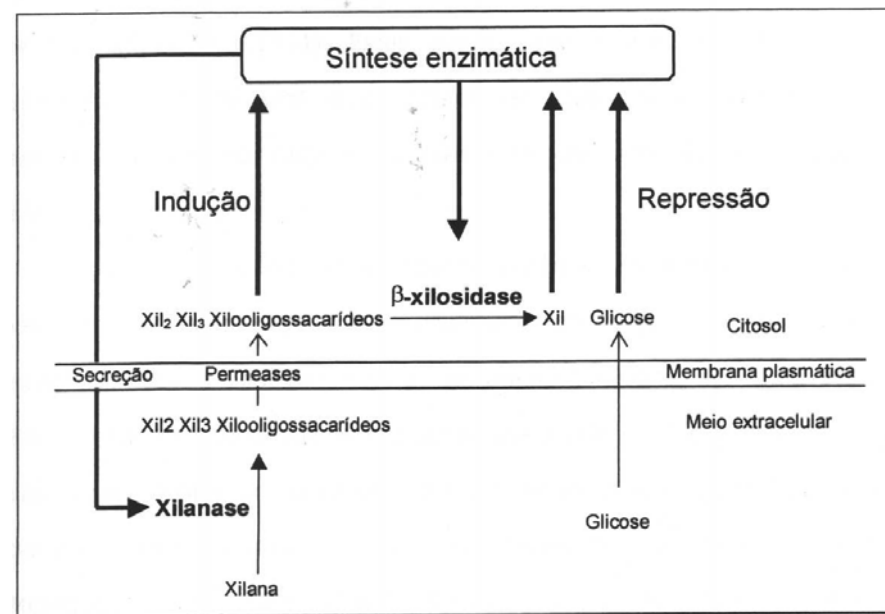


Figura 04 – Regulação da biossíntese de enzimas xilanolíticas. Xilanases constitutivas degradam xilana à xilooligosacarídeos que através da permease entram no citoplasma desencadeando a transcrição de outros genes para a produção de xilanases e β-xilosidases. Legenda: Xil – xilose; Xil₂ – xilobiose; Xil₃ – xilotriose. (Adaptado de Rizzatti, 2000).

presença de uma β -xilosidase permease, desencadeando um mecanismo de sinalização para a expressão de enzimas xilanolíticas. Logo em seguida, devido a ação de β -xilosidases intracelulares, os xilooligossacarídeos são hidrolisados a resíduos de xilose (Biely, 1985).

Pesquisas demonstram que em vários microrganismos a transcrição é induzida por moléculas específicas que sinalizam a presença de substratos extracelulares e reprimida pelo excesso de substratos intracelulares degradados, como xilose e/ou glicose (Gancedo, 1992; Ronne, 1995).

Em *Aspergillus tubigensis* três endoxilanases são codificadas pelos genes, *xlnA*, *xlnB* e *xlnC* (De Graaff *et al.*, 1994). *Streptomyces lividans* apresenta três genes que codificam xilanases (*xlnA*, *xlnB* e *xlnC*). Estes são expressos na presença de xilana e reprimidos na presença de glicose (Chen & Westpheling, 1998).

Em *Trichoderma reesei*, o promotor do gene *xyn1* é ativo em substratos como xilana e xilose, e silenciado na presença de glicose. O promotor do gene *xyn2*, do mesmo organismo, transcreve a proteína em níveis basais, mas é estimulado na presença de xilana e xilobiose (Zeilinger *et al.*, 1996). Em *Aspergillus terreus* (Hrmová *et al.*, 1991), a xilobiose, assim como em *Trichoderma reesei*, induz a expressão de xilanase. Em *Cryptococcus albidus* (Biely, 1985), xilose reprime a síntese de xilanase enquanto que em actinomicetos termofílicos este não tem influência sobre a regulação da expressão xilanásica (McCarthy *et al.*, 1985).

A repressão catabólica por carbono, mediada por CREA (repressora da transcrição), no controle de xilanases tem sido estudada em *Aspergillus nidulans* (Piñaga *et al.*, 1994; Orejas *et al.*, 1999). Mach *et al.* (1996) concluiu estudando a repressão catabólica por carbono em *T. reesei*, que a repressão da transcrição do gene *xyn1* foi mediada pelo repressor Cre1 que “in vivo” liga-se a dois dos quatros sítios consensos (5'-SYG-GRG-3') no promotor *xyn1*. De Graaff *et al.* (1994) demonstraram que em *Aspergillus tubigensis* e *Aspergillus nidulans* a repressão catabólica do gene *xlnA* é controlada em dois níveis: diretamente pela repressão deste gene por CREA e indiretamente pela repressão de ativadores da transcrição.

1.6 IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL DAS ENZIMAS XILANOLÍTICAS

Enzimas que degradam a xilana possuem considerável potencial em várias aplicações biotecnológicas. Estas estão envolvidas na bioconversão da xilana, altamente presente em resíduos agrícolas e em resíduos provenientes de indústrias

alimentícias, em xilose, o qual age como substrato na obtenção de etanol através de processos de fermentação (Chandrakant & Bisaria, 2000) e em xilitol, utilizado como adoçante em vários tipos de alimentos (Parajó *et al.*, 1998).

Recentemente, o interesse em xilanases, aumentou devido ao seu uso em processos de branqueamento da polpa de papel. Atualmente, existem processos de branqueamento que utilizam dióxido de cloro no lugar de cloro elementar e processos totalmente livres de cloro (TFC).

Atualmente, o processo de produção de papel mais utilizado é o “Processo Kraft”, o qual se inicia com o cozimento de cavacos de madeira em uma solução contendo hidróxido de sódio, sulfito e bissulfeto. Nesta etapa, aproximadamente 90 – 95% da lignina, principal responsável pela cor escura do papel, é solubilizada, além disso, neste processo a madeira é degradada em celulose, a qual é posteriormente lavada com oxigênio (Pré-branqueamento). O passo seguinte é o branqueamento, o qual gera uma polpa branca o suficiente para produzir papel. Nesta etapa, são utilizados dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio, oxigênio e hidróxido de sódio os quais agem degradando os anéis da lignina, acarretando na sua solubilização durante o processo (Gellerstedt, 2001). O aspecto da polpa de celulose nas diferentes etapas está apresentado na Figura 05.

No entanto, o uso de produtos com cloro resulta na produção de compostos organoclorados provenientes da combinação de lignina, oriunda da polpa de celulose, e do cloro utilizado. Esses compostos são altamente tóxicos e mutagênicos acarretando na necessidade de se tratar os efluentes originados na produção do papel (Viikari *et al.*, 1994).

Neste contexto, a partir da década de 80 começaram a ser estudadas enzimas que pudessem auxiliar neste branqueamento diminuindo a quantidade de cloro utilizado. As enzimas mais efetivas foram as xilanases, as quais levam a diminuição de 20 – 30% do cloro utilizado e substituição de 5 – 7 Kg de dióxido de cloro por tonelada de polpa kraft e diminuem em média 2 – 4 unidades do número kappa (quantifica lignina presente na polpa de celulose) em relação a polpa não tratada (Milagres, 1994). Além disso, a utilização de xilanases mantém a integridade das fibras de celulose, no entanto esse mecanismo não é bem entendido ainda (Viikari *et al.*, 1994).

Existem algumas teorias que tentam explicar como as xilanases auxiliam no branqueamento da polpa de celulose. Uma delas menciona que o tratamento com xilanases remove a xilana precipitada sobre a lignina no final do cozimento kraft, ou seja, quando o pH da polpa cai. A remoção dessa xilana precipitada provavelmente



Figura 05 – Aspecto da polpa de celulose em diferentes etapas da produção de papel.

aumentaria a exposição da lignina as substâncias utilizadas na etapa de branqueamento como pode ser observado na Figura 06 (A) (Viikari *et al.*, 1994).

A outra teoria está relacionada a propriedade da lignina se ligar a polissacarídeos, como xilana por exemplo. Algumas dessas ligações são alcali-resistentes e não são hidrolisadas durante o cozimento kraft, portanto resquícios de lignina permanecem ligados as hemiceluloses. Sendo assim, a utilização de xilanases clivaria a xilana em pequenos fragmentos, facilitando a remoção desses, juntamente com a lignina nas posteriores lavagens e na etapa de branqueamento da polpa, Figura 06 (B) (Paice *et al.*, 1992).

Entretanto, as xilanases empregadas nesta tecnologia, devem remover a xilana preservando a celulose presente, ou seja, as enzimas celulolíticas devem estar ausentes permitindo a preservação das propriedades da polpa. Além disso, estas xilanases, devem ser ativas em temperaturas altas e em pH alcalinos (Subramaniyan & Prema, 2000).

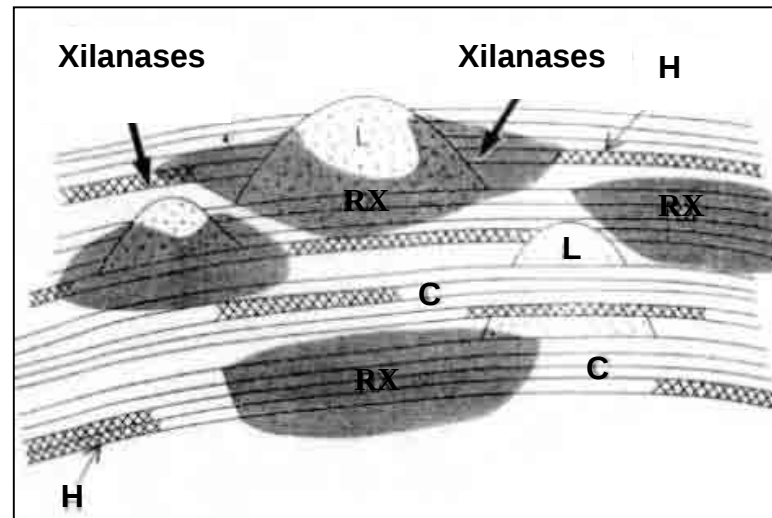
A aplicação de xilanases em indústrias alimentícias é vasta. Por exemplo, essas enzimas são utilizadas, juntamente às celulasas e pectinases, permitindo a hidrólise de componentes da parede celular e diminuição da viscosidade e a clarificação dos sucos de frutas (Wong *et al.*, 1988, 1993).

Em panificações, a aplicação de xilanases é benéfica, entretanto sua ação não é bem entendida. Postula-se que a habilidade das endoxilanases de hidrolisar arabinoxilanas facilita a redistribuição da água na massa, favorecendo seu volume, textura e estabilidade. Além disso, a ação dessas enzimas aumenta o valor nutritivo do alimento (Poutanen *et al.*, 1987).

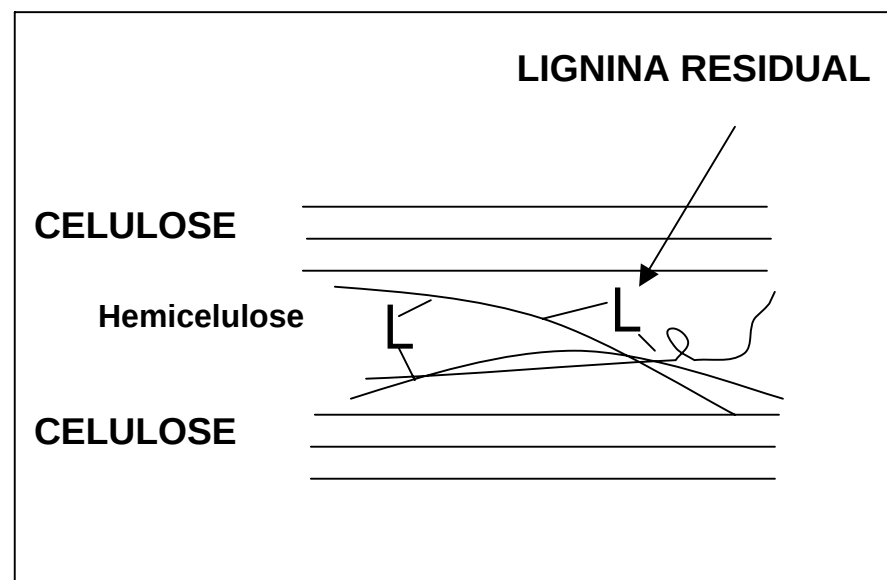
Na produção de vinhos, xilanases são usadas acarretando a hidrólise da parede celular das uvas, facilitando a maceração da casca da uva, a clarificação e aumento da qualidade e estabilidade do vinho (Galante *et al.*, 1998).

Na indústria de rações animais, o uso de xilanases aumenta o valor nutritivo da dieta, pois acarreta em uma melhor digestão e absorção dos componentes das rações (Galante *et al.*, 1998; Graham *et al.*, 1998).

Finalmente, as xilanases são utilizadas no processamento de fibras vegetais, como cânhamo ou o linho na indústria têxtil. Segundo Prade (1995) a incubação de caules de rami secos com xilanases libera fibras de celulose intactas que não necessitam de um branqueamento intensivo.



A



B

Figura 06 – Mecanismos propostos de branqueamento da polpa de papel utilizando xilanases. Em A teoria proposta por Viikari *et al.* (1994) e em B por Paice *et al.* (1992).
 Legenda; L: lignina; H: hemicelulose; RX: xilana precipitada; C: celulose.

Na Tabela 05 estão apresentadas algumas xilanases comercializadas. Observa-se que os microrganismos mais utilizados para obtenção destas enzimas são principalmente dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*, sendo a fermentação submersa a mais utilizada. Algumas propriedades dessas xilanases são: temperaturas ótimas entre 50 – 65°C, sendo suas estabilidades nestas temperaturas de 10 – 30 minutos. Em relação aos pHs ótimos de ensaio, estes variam entre 4,0 – 7,0, entretanto a maioria possui pHs ótimos entre 4,5 – 5,0. Essas xilanases são aplicadas em vários setores industriais, principalmente na alimentação e rações.

1.7 O ORGANISMO EM ESTUDO

O organismo em estudo foi recentemente isolado, no laboratório, a partir de uma placa de Petri contendo meio de batata e mantida na geladeira. O microrganismo foi identificado, segundo a descrição de Raper & Fennel (1965), como *Aspergillus caespitosus*. As colônias deste microrganismo variam distintamente sobre diferentes meios; sobre solução Czapek seu crescimento é lento atingindo diâmetro de 3 a 4 cm, em três semanas, a temperatura ambiente (24 – 26°C), são planas ou enrugadas, micélio amplamente submerso e extremamente forte, dispersando com dificuldade, produz numerosas cabeças colunares verde-escuras, de hemisféricas à livres, no centro da colônia.

O gênero *Aspergillus* é um modelo biológico clássico e em geral tem grande relevância prática, por existirem espécies produtoras de enzimas industriais importantes, ácidos orgânicos, e outros produtos. A produção de xilanases foi descrita em diferentes espécies de *Aspergillus*: *A. awamori* (Adolph *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 1998), *A. fischeri* (Raj & Chandra, 1996), *A. nidulans* (MacCabe *et al.*, 1998), *A. oryzae* (Bakalova *et al.*, 1996; Kitamoto *et al.*, 1999), *A. phoenicis* (Rizzatti *et al.*, 2001), *A. sojae* (Kimura *et al.*, 1995), *A. niger* (Sardar *et al.*, 2000), *A. tamaraii* (Kadowaki *et al.*, 1997), *A. versicolor* (Carmona *et al.*, 1997), entre outros.

Tabela 05 - Propriedades de algumas xilanases comercializadas

Nome Comercial	Empresa	Microorganismo	Fermentação	Temperatura Ótima (°C)	pH Ótimo	Aplicação
<i>Allzym PT</i>	Alltech Inc.	<i>A. niger</i>	FSM	65	5,3	Rações
<i>Amano</i>	Amano Pharmaceutical Co.	<i>A. niger</i>	FSS	50	4,5	Indústria alimentícia e rações
<i>Grindazym PF e GP 5000</i>	Danisco Ingredients	<i>A. niger</i>	FSS e FSM			Rações
<i>Gammazym X4000L</i>	Gamma Chemie GmbH	<i>T. longibrachiatum</i>	FSM	50 - 60	4,5 - 7,0	Panificação
<i>Gammafeed X</i>	Gamma Chemie GmbH	<i>T. reesei</i>	FSS	55	5,5	Panificação
<i>Multifect XL</i>	Genencor International Europe	<i>T. longibrachiatum</i>	FSM	55 - 60	5,0 - 5,5	Indústria Alimentícia
<i>Irgazyme 40</i>	Ciba - Geigy Limited	<i>T. longibrachiatum</i>	FSM	55	5,0 - 7,0	Indústria de Papel
<i>Xylanase 250</i>	Hankyu Bioindustry Co.	<i>T. viride</i>	FSS	60	4,5 - 5,0	Panificação
<i>Hemicellulase 100</i>	Hankyu Bioindustry Co.	<i>A. niger</i>	FSS	50	4,0	Indústria Alimentícia
<i>Xylanase GS35</i>	logen Corp.	<i>T. reesei</i>	FSM	55	5,0 - 6,0	Indústria de Papel
<i>Bio-Feed Plus</i>	Novo Nordisk	<i>Humicola insolens</i>	FSM			Rações
<i>Ecopulp X - 200</i>	Primalco Ltd Biotec	<i>T. reesei</i>	FSM	50 - 55	5,0 - 6,0	Indústria de Papel
<i>Bioxylanase</i>	Quest International Ireland	<i>T. reesei</i>	FSM	55	5,5 - 6,0	Processamento de suco
<i>Sumizyme</i>	Shin Nihon Chemical Co.	<i>T. koningii</i>	FSS	55	5,0	Indústria Alimentícia
<i>Solvay Pentosanase</i>	Solvay Enzymes GmbH & Co.	<i>T. reesei</i>	FSM	55	5,3 - 5,5	Panificação

FSM: Fermentação Submersa

FSS: Fermentação Semi-sólida

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- A) Otimização da produção e atividade xilanólítica sintetizada pelo fungo *Aspergillus caespitosus* em fermentações submersas e caracterização bioquímica dos extratos brutos obtidos;
- B) Otimização da produção e atividade xilanólítica sintetizada pelo fungo *Aspergillus caespitosus* em fermentações semi-sólidas e caracterização bioquímica dos extratos brutos obtidos;
- C) Purificação e caracterização bioquímica de duas xilanases secretadas por *Aspergillus caespitosus*;
- D) Avaliação do efeito da adição de xilanases secretadas por *Aspergillus caespitosus* no biobranqueamento e na viscosidade de polpas de celulose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 O ORGANISMO

Este trabalho utilizou o fungo *Aspergillus caespitosus*, recentemente isolado no laboratório de uma placa a 4°C contendo meio de batata (PDA), previamente autoclavado. O microrganismo foi identificado segundo a descrição de Raper & Fennel (1965), na Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia, Campinas, SP.

3.2 MANUTENÇÃO DA CEPA

As linhagens foram mantidas em meio de batata sólido (PDA), para o qual foram cozidos 300 gramas de batata em pedaços em água destilada. Os pedaços foram macerados em um recipiente, juntamente com a água onde foram fervidos, formando um líquido viscoso. O próximo passo foi filtrar este líquido em uma proveta, com o auxílio de uma gaze que retém os pedaços da batata. Acrescentou-se 20 g de ágar, 20 g de glicose e completou-se o volume com água destilada para 1000 mL. O meio foi autoclavado (1,5 atm, 15 minutos) e colocado em placas de Petri. Após solidificação as placas foram mantidas na geladeira a 4°C até inóculo.

3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Conídios de *Aspergillus caespitosus* foram suspensos em água destilada na concentração de $1,0 \times 10^7$ esporos/mL. Um volume de 1 mL da suspensão de esporos foi inoculado em 25 mL de meio líquido (concentração final de $1,6 \times 10^4$ /mL), contido em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Foram analisados os seguintes meios:

Meio Czapek (Wiseman, 1975)

NaNO ₃	0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
KCl.....	0,05 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,001 g
Glicose.....	2,0 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL
pH ajustado para 6,0	

Meio Vogel (Vogel, 1964)

Solução de sais [50x]

Citrato de Sódio.5 H ₂ O.....	5,0 g
NH ₄ NO ₃	10,0 g
KH ₂ PO ₄	25,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	1,0 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,5 g
Solução de Traços de elementos.....	0,5 mL
Clorofórmio.....	0,2 mL
Água destilada q.s.p.....	100 mL

Solução de Biotina

Biotina.....	0,005 g
Etanol 50%.....	100 mL

Preparação do Meio:

Solução de Sais de Vogel [50x].....	2,0 mL
Solução de Biotina.....	20 µL
Glicose.....	2,0 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL
pH ajustado para 6,0	

Meio SR (Rizzatti *et al.*, 2001)

Solução de sais [20x]

KH ₂ PO ₄	0,3 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,24 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

Preparação do meio:

Solução de sais [20x].....	5,0 mL
Peptona.....	0,02 g
Extrato de Levedura.....	0,45 g
Glicose.....	2,0 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL
pH ajustado para 6,0	

Meio de Khanna (Khanna *et al.*, 1995)

Solução de sais [20x]

NH ₄ NO ₃	2,0 g
KH ₂ PO ₄	1,3 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,362 g
KCl.....	0,098 g
MnSO ₄ .H ₂ O.....	0,0138 g
ZnSO ₄ .H ₂ O.....	0,007 g
Fe ₂ (SO ₄) ₃ .6H ₂ O.....	0,0066 g
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,0062 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

Preparação do meio:

Solução de sais [20x].....	5,0 mL
Extrato de Levedura.....	0,1 g
Glicose.....	2,0 g
Água Destilada q.s.p.....	100 mL
pH ajustado para 6,0	

Meio YG (Cove, 1966)

Solução de sais [20 x]

NaNO ₃	12,0 g
KCl.....	1,04 g
KH ₂ PO ₄	3,04 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	1,04 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

Solução de Traços de elementos pH 6,5-6,8

ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	2,2 g
H ₃ BO ₃	1,1 g
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5 g
CoCl ₂ . 5H ₂ O.....	0,16 g
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,16 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O.....	0,11 g
NaEDTA.....	5,0 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

Preparação do meio:

Solução de sais [20x].....	5,0 mL
Solução de traços de elementos.....	0,1 mL
Glicose.....	1,0 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL
pH ajustado para 6,0	

3.3.1 FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO UTILIZADAS EM CULTURAS SUBMERSAS

Vários compostos foram testados como fonte de carbono para cultivos submersos como: glicose, frutose, celobiose, maltose, avicel, xilose e xilana. Além desses, outros compostos mais complexos e alguns resíduos agroindustriais foram analisados (aveia, bagaço de cana, farelo de trigo, farinha de mandioca, palha de arroz e sabugo de milho triturado). Estas fontes de carbono foram adicionadas ao meio de cultivo na concentração de 1 a 2% (p/v) conforme o experimento.

Os compostos testados como fontes de nitrogênio foram: acetato de amônio, caseína, extrato de levedura, nitrato de amônio, peptona, sulfato de amônio e uréia, em concentrações variando de 0,02 – 1,25% (p/v) conforme especificado em Resultados.

3.3.2 OBTENÇÃO DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS

Após o crescimento sob agitação por períodos pré-determinados conforme o experimento, as culturas foram filtradas a vácuo em funil de Büchner permitindo a obtenção de um filtrado do meio livre de células e um micélio. O filtrado foi dialisado em água destilada e posteriormente usado na dosagem das enzimas extracelulares. O micélio foi macerado, com o auxílio de um pistilo, em gral de porcelana com areia lavada e pré-tratada com solução sulfocrômica, neutralizada com várias lavagens de água destilada, e ressuspenso em 5 mL de água destilada. Posteriormente, este homogenato celular foi centrifugado (10.000 x g, 20 minutos) e o sobrenadante utilizado para a dosagem das enzimas intracelulares e das proteínas.

3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO EM FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

Um volume de 1 mL com aproximadamente 10^7 esporos de *Aspergillus caespitosus* foi inoculado em frascos de 95 mL contendo 2 gramas de farelo de trigo

(FT) ou bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e 4 mL ou 8 mL de água de torneira respectivamente, exceto no experimento onde variou-se o volume de líquido adicionado. Foram comparados também, a adição de sais de Vogel, SR, Khanna ou apenas água destilada neste mesmo volume. Os frascos suplementados com FT ou BCA foram incubados a 30°C durante 5 e 11 dias, respectivamente. Nos experimentos onde algum desses parâmetros foi modificado, o procedimento utilizado está descrito nas legendas.

3.4.1 OBTENÇÃO DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS

Após o período de incubação, adicionou-se aos frascos 30 – 180 mL de água destilada gelada. Os frascos foram mantidos em uma incubadora com agitação orbital a 150 rpm durante 30 minutos, a 4°C. As culturas foram filtradas a vácuo em funil de Büchner permitindo a obtenção de um filtrado do meio livre de células e do substrato. Este filtrado foi dialisado contra água “overnight” e posteriormente utilizado na dosagem de xilanase e protease neutra. O micélio foi descartado.

3.4.2 FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO UTILIZADAS EM CULTURAS SEMI-SÓLIDAS

Além do FT e do BCA, outras fontes de carbono foram testadas: farinha de mandioca, aveia e palha de arroz. Em relação às fontes de nitrogênio foram avaliadas: extrato de levedura, nitrato de amônio, peptona e sulfato de amônio nas concentrações de 0,5 – 30% (p/p).

3.5 EFEITO DA ADIÇÃO DE GLICOSE EM CULTURAS SUBMERSAS E SEMI-SÓLIDAS

Soluções de glicose foram adicionadas nas concentrações de 0,25 a 0,75% (p/v) aos meios líquidos suplementados com 0,25 a 0,75% (p/v) de BCA ou FT, respectivamente. Esses meios foram incubados sob agitação a 100 rpm a 40°C durante 24 – 120 horas. Em fermentação semi-sólida, o açúcar foi adicionado em concentrações de 2 – 10% (p/p), neste caso foi analisado apenas um período de cultivo, sendo 5 e 10 dias para meios suplementados com FT e BCA, respectivamente.

3.6 ANÁLISE DO CRESCIMENTO E DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.6.1 ANÁLISE DO CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO

O crescimento do fungo em meio líquido foi avaliado pela quantificação das proteínas presentes no sobrenadante do homogenato celular (item 3.3.2) pelo método colorimétrico de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), o qual utiliza albumina de soro bovino como padrão.

3.6.2 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

A atividade xilanolítica foi determinada pela formação de açúcares redutores (xilooligossacarídeos) a partir da xilana Birchwood ou Oat spelt (Sigma) pelo Método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS (Miller, 1959). A mistura da reação foi composta de 0,25 mL de solução de substrato 1% (p/v) em água destilada, 0,15 mL de tampão MES 100 mM, pH 6,5 e 0,1 mL da enzima extracelular. A reação foi realizada a 55°C e alíquotas de 0,1 mL foram retiradas em diferentes tempos e adicionadas a 0,1 mL de DNS. Para cada reação enzimática foi determinado um branco, onde imediatamente após a preparação da mistura da reação, 0,1 mL desta foi adicionada a 0,1 mL de DNS.

Em seguida, os tubos foram vedados, fervidos por 5 minutos e posteriormente, adicionou-se nestes 1,0 mL de água destilada. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540 nm, utilizando-se uma curva padrão de xilose (0 – 1 mg/mL). A unidade de atividade xilanásica foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de xiloolissacarídeos (grupos redutores) por minuto. A atividade específica foi expressa em unidade de atividade total por mg de proteínas totais extracelulares (U/mg prot.).

As atividades da CM-celulase, avicelase, amilase, poligalacturonase, invertase e pectinase foram dosadas da mesma forma descrita para xilanase, entretanto utilizando CM-celulose, avicel, amido, ácido poligalacturônico, sacarose e pectina 1% (p/v) como substrato e uma solução de glicose (0 – 1 mg/mL) para obtenção de uma curva padrão, com exceção de quando analisou-se as atividades da poligalacturonase e pectinase, onde utilizou-se ácido monogalacturônico para obtenção da curva padrão.

As atividades β -xilosidásica, arabinofuranásica, glucosidase e galactosidase foram analisadas usando os substratos sintéticos *p*-nitrofenil-xilanopiranosídeo, *p*-nitrofenil-arabinofuranosídeo, *p*-nitrofenil-glucanopiranosídeo e *p*-nitrofenil-galactosídeo. As misturas de reações foram compostas de 0,2 mL de solução de substrato 1% (p/v) em água destilada, 0,2 mL de tampão MES pH 6,5 e 0,1 mL de filtrado. As reações foram conduzidas a 55°C e alíquotas de 0,1 mL foram retiradas em diferentes tempos e interrompidas pela adição de 1 mL de solução saturada de tetraborato de sódio. Para cada reação foi determinado um branco. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 405 nm, utilizando-se uma curva padrão de *p*-nitrofenol. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto.

3.6.3 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A atividade proteolítica foi determinada pela formação de aminoácidos, oligopeptídeos e peptídeos a partir de uma solução de caseína 1% (p/v). A mistura da reação foi composta de 4 mL de caseína 1% (p/v) dissolvida em tampão Tris 0,1M, pH 7,0 mais 1 mL do filtrado das culturas submersas ou semi-sólidas. A reação foi realizada a 35 – 40°C. Alíquotas de 1 mL foram retiradas em diferentes tempos, adicionadas em 1 mL de TCA 10% e depositadas na câmara fria por pelo menos 12 horas. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 3.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante (1 mL) foi utilizado na dosagem de proteínas pelo método de Hagihara *et al.* (1958) utilizando uma curva padrão de tirosina (0 – 0,1 mg/mL). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade capaz de liberar 1 μ g/mL de tirosina por minuto.

3.7 CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA PURIFICAÇÃO DAS XILANASES

Os conídios do *Aspergillus caespitosus* foram suspensos em água destilada na concentração de $1,0 \times 10^7$ esporos/mL. Um volume de 1 mL da suspensão de esporos foi inoculado em 25 mL de meio líquido (concentração final de $4,0 \times 10^5$), contido em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo BCA 1% (p/v), sais SR 5% (v/v) juntamente com sulfato de amônio 0,5% (p/v) e peptona 0,02% (p/v). O pH inicial do meio foi ajustado para 8,0. O microrganismo foi cultivado durante 48 horas, a 40°C, sob agitação a 100 rpm. Após o crescimento, as culturas foram filtradas a vácuo em funil de

Büchner permitindo a obtenção de um filtrado do meio livre de células e um micélio. O filtrado foi dialisado em água destilada e posteriormente usado na dosagem das enzimas extracelulares. O micélio foi descartado.

3.8 PURIFICAÇÃO DAS XILANASES SECRETADAS

O extrato bruto, 150 mL, obtido de culturas submersas, como descrito no item 3.7, foi dialisado contra água destilada por 16 horas aproximadamente, à 4°C, e em seguida, foi liofilizado. A amostra foi dissolvida em 1,0 mL de água destilada e aplicada em uma coluna Sephadex G-100 (52 cm X 1,3 cm), previamente equilibrada em tampão acetato de sódio 10 mM, pH 5,5. O fluxo da coluna foi de 9,0 mL por hora. Foram coletadas frações de 1,07 mL para leitura a 280 nm e dosagem enzimática, sendo que aquelas que continham maior atividade xilanásica foram reunidas em dois “pools” e posteriormente dialisadas. Para determinar as massas moleculares das enzimas foram aplicados na coluna marcadores moleculares (álcool desidrogenase, 150 kDa; albumina de soro bovino, 66 kDa; e anidrase carbônica, 29 kDa), os quais permitiram obter uma reta padrão. O volume “void” (V_o) foi de 23 mL, determinado com Blue Dextran.

3.9 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA EM GEL DE ELETROFORESE EM CONDIÇÕES NÃO DESNATURANTES (PAGE)

As eletroforeses em condições não-desnaturantes foram realizadas segundo a metodologia de Davis (1964), para proteínas ácidas. Os géis utilizados tinham a concentração de 6% de acrilamida e foram polimerizados em placas de vidro (7,2 x 10,2 cm). Amostras obtidas da coluna cromatográfica Sephadex G-100 foram dialisadas contra água destilada, liofilizadas e ressuspensas em tampão de corrida (Tris – HCl 0,05 M e glicina 0,036 M, pH 8,9). As amostras foram diluídas na proporção de 10:1 neste tampão, adicionou-se azul de bromofenol 0,002% (p/v) e glicerol 10% (p/v). Foram aplicados 20 µL desta mistura no gel. As eletroforeses foram realizadas no tampão de corrida durante 1 – 2 horas sob corrente de 70 mA e 120 V.

Após a corrida, os géis foram corados por prata segundo a metodologia descrita por Blum *et al.* (1987). Inicialmente, as proteínas foram fixadas por 1 hora em solução de metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) e formaldeído 0,05% (v/v). Posteriormente, o gel foi tratado com duas soluções de etanol 50% (v/v), uma a cada

20 minutos, e por uma terceira solução de etanol 30% (p/v), por mais 20 minutos. Após lavagem com água destilada, os géis passaram por um tratamento com tiosulfato de sódio 0,02% (p/v) por 1 minuto e, imediatamente, enxaguado com 3 banhos consecutivos de água destilada por 20 segundos cada. Em seguida, os géis foram submetidos a uma impregnação por prata por 20 minutos, com solução contendo nitrato de prata 0,2% (p/v) e formaldeído 0,075% (v/v). Retirou-se o excesso de nitrato de prata com duas lavagens de água destilada por 20 segundos cada. Finalmente, os géis foram revelados em solução de carbonato de sódio 6% (p/v), tiosulfato de sódio 0,0004% (p/v) e formaldeído 0,05% (v/v). A revelação foi parada pela adição de uma solução composta por metanol 50% (v/v) e ácido acético 12% (v/v). Os géis foram mantidos em solução de metanol 50% (v/v) por 30 minutos e posteriormente secos entre folhas de papel celofane natural umedecida com uma solução de metanol 40% (v/v) e glicerol 15% (v/v) para conservação.

3.10 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA EM GEL DE ELETROFORESE EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS – PAGE)

As eletroforeses em condições desnaturantes foram realizadas em gel de poliacrilamida conforme metodologia descrita por Laemmli (1970). Os géis utilizados tinham a concentração de 12% de acrilamida e foram polimerizados em placas de vidro (7,2 x 10,2 cm). As amostras foram preparadas na proporção de 1:1 em tampão de amostra (glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,002% e Tris 0,12 M, pH 6,75) e aquecidas durante 3 minutos em água fervente. As eletroforeses foram realizadas em tampão composto por Tris 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS 0,1%, pH 8,3, durante 1-2 horas sob corrente de 70 mA e 120 V. A coloração dos géis foi realizada utilizando-se Coomassie Blue.

Como marcadores de massa molecular foi utilizado o kit Dalton Mark VII – L (Sigma) composto pelas seguintes proteínas: albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), tripsinogênio (24 kDa) e lactoalbumina (14,2 kDa).

3.11 GEL DE ATIVIDADE

A atividade xilanásica foi determinada utilizando-se o corante Remazol Brilliant Blue R-xylan (RBB-xylan). A revelação foi realizada da seguinte maneira: foi feito um

gel de poliacrilamida (PAGE), como descrito no item 3.9, após corrida, o PAGE foi colocado sobre um gel (“overlay”) constituído de RBB – Xylan (1,5 g), tampão MES 100 mM pH 6,5 (100 mL) e ágar 2%. Os géis foram incubados a 40°C e permaneceram unidos até que se percebesse uma banda incolor.

3.12 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS E DO PONTO ISOELÉTRICO (pI)

Os conteúdos de carboidratos das xilanases extracelulares purificadas foram estimados através da metodologia do fenol-sulfúrico descrita por Dubois *et al.* (1956). Esse experimento foi realizado da seguinte maneira: adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico concentrado em uma mistura composta por 400 µL da enzima xyl 1 ou xyl 2 mais 10 µL de fenol 80% (v/v). Essa mistura foi agitada e colocada em gelo por 10 minutos. Posteriormente, essa foi incubada a 30°C. Percorridos 15 minutos, a mistura foi novamente agitada e procedeu-se a leitura a 490 nm. Foi realizado um branco, onde no lugar da enzima, foi adicionado água destilada. Para determinação da porcentagem de carboidratos utilizou-se uma curva de manose (0 – 0,4 mg/mL) como padrão.

Os pontos isoelétricos das enzimas purificadas foram determinados em gel de disco de poliacrilamida, de acordo com a metodologia proposta por O’Farrel *et al.* (1983), utilizando anfólitos com pHs de 3,0 – 10,0. Após corrida, o gel contendo a amostra foi fatiado, incubado em tampão MES 100 mM, pH 6,0 – 7,0 por 1 hora. Neste período foram realizadas 3 trocas do tampão. Finalmente, dosou-se a atividade xilanásica, como descrito no item 3.6.2, nos tubos contendo as fatias. O gel controle foi fatiado e incubado “overnight” em uma solução de KCl 25 mM, para posterior determinação do pH. Finalmente, determinou-se qual fatia do gel controle era equivalente a maior atividade xilanásica obtida.

3.13 INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DE DIFERENTES SOLUÇÕES TAMPÕES E SEUS RESPECTIVOS pHs SOBRE AS ATIVIDADES XILANÁSICAS

As atividades xilanásicas foram dosadas em diferentes soluções tampões a 100 mM. Os tampões avaliados foram: MES (ácido 2-[N-morfolino]etanosulfônico), fosfato de sódio, acetato de sódio, citrato de sódio, HEPES (ácido N-[2-hidroxietil]piperazino N’- [2 etanosulfônico), BIS- Tris (bis [2-hidroxietil]iminotris metano) e TAPS (ácido N-tris

[hidroxymetil] metil -3-amino propanosulfônico). Foram testados pHs na faixa de 4,0 a 10,0.

3.14 INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES ÍONS, EDTA E β - MERCAPTOETANOL SOBRE AS ATIVIDADES XILANÁSICAS

Testou-se a adição de diferentes íons (HgCl_2 ; NH_4Cl ; CaCl_2 ; ZnCl_2 ; BaCl_2 ; CuSO_4 ; CuSO_4 ; NaCl ; MgSO_4 ; MnCl_2 ; MgCl_2 ; AlCl_3 e CoCl_2), β - Mercaptoetanol e EDTA na concentração final de 1 – 20 mM sobre as atividades xilanásicas extracelulares purificadas.

3.15 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS

As constantes cinéticas (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) das xilanases 1 e 2 foram determinadas conforme os procedimentos gráficos propostos por Lineaweaver & Burk (1934) e Hanes (1932) utilizando-se o programa Enzyplot (Leone *et al.*, 1995). O substrato utilizado foi xilana birchwood nas concentrações de 0,5 – 20,0 mg/mL, na presença ou não de 10 mM de β -mercaptoetanol. As atividades xilanásicas foram determinadas nas condições ótimas de cada enzima, ou seja, para xyl 1 tampão MES 100 mM, pH 7,0, à 55°C e para xyl 2, tampão MES 100 mM, pH 6,0, à 50°C.

3.16 BIOBRANQUEAMENTO DA POLPA DE CELULOSE

3.16.1 POLPA

Foram utilizadas duas polpas de celulose, uma proveniente da Companhia Bahia Sul Celulose e outra da Companhia Celulose Papel Votorantin (CELPAV). A primeira tinha uma coloração mais clara e os grumos de papel eram menores aos observados na polpa da CELPAV.

3.16.2 CONSISTÊNCIA DAS POLPAS (%)

A consistência foi determinada pela relação massa seca/massa úmida. Pesou-se a polpa determinando-se a massa úmida (m.u.), depois colocou-se aproximadamente 1,0 g de m.u. em uma estufa a 75 – 80°C. De tempo em tempo, pesava-se a polpa até a massa estabilizar, resultando no valor de massa seca (m.s.). Para calcular o quanto

de água destilada deveria ser adicionada a polpa para obter uma determinada consistência, foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Volume de água destilada adicionada para uma dada consistência (C)} = \left\{ \frac{\text{m.s.} - \text{m.u.} - \text{vol. de enzima}}{C} \right.$$

Onde, por exemplo:

m.s.= 10 g
m.u.= 26 g
C = 0,1 (10%)
Vol. de enzima = 2,5 mL para 100 U

3.16.3 TRATAMENTO ENZIMÁTICO DAS POLPAS

Para as seqüências do branqueamento foram utilizados 10 g de polpa seca. Os pHs das polpas foram padronizados para 6,0 – 6,5 com uma solução diluída de ácido sulfúrico, com exceção de um experimento onde os pHs das polpas não foram acertados, apenas adicionou-se água destilada. O pH obtido nesta condição foi de 8,0 – 8,15. Posteriormente, foram adicionados às polpas água destilada e xilanases (3 – 12 U/g polpa seca) até atingir consistência de 10% (0,1), utilizando a equação descrita no item 3.16.2. As xilanases adicionadas eram provenientes dos extratos brutos das fermentações submersas e semi-sólidas suplementadas com FT ou BCA. Foram adicionadas também xilanases purificadas. A mistura enzima - polpa foi colocada em sacos de polietileno vedados com seladora e incubada a 55 - 65°C por 120 minutos.

Após este tratamento as polpas foram lavadas exaustivamente e tiveram suas consistências determinadas. Separou-se 5 g de massa seca para a extração alcalina, 0,125 g para a determinação de viscosidade e 0,5 – 1,0 g para determinação do número Kappa. O restante da polpa foi descartado.

A extração alcalina, realizada após o tratamento enzimático, foi feita da seguinte maneira. Adicionou-se, a 5 g de polpa seca, NaOH para concentração final de 2,2%. A consistência foi ajustada para 12% (0,12). As polpas foram mantidas em sacos de polietileno, por 60 minutos a 65°C. Após esta etapa as amostras foram lavadas e colocadas em estufa “overnight”, a 60°C. No dia seguinte colocou-se as amostras em um dessecador com sílica por 60 minutos e pesou-se 0,125 g de m.s. para determinação da viscosidade e 0,5 a 1,0 g para determinação do número Kappa.

3.16.4 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO KAPPA

O número Kappa é um indicador da quantidade de lignina presente na polpa de celulose. A determinação deste parâmetro foi baseada no método T236 da “Technical

Association of the Pulp and Paper Industry” (TAPPI, Atlanta, GA, USA). Primeiramente, separou-se 0,5 a 1,0 g de polpa seca de cada amostra, que foi desintegrada com a mão, em 10 mL de água destilada. Após este processo, as polpas foram transferidas para um Erlenmeyer de 500 mL e adicionou-se 140 mL de água destilada. A temperatura ambiente foi controlada para 25°C. A suspensão foi agitada, a 25°C, com uma barra magnética. Separadamente foram pipetados 25 mL de solução de permanganato de potássio (KMnO_4) 0,1 N $\pm$ 0,0005 em um Erlenmeyer de 125 mL e foram adicionados 25 mL de ácido sulfúrico 4,0 N. Esta solução foi transferida para o Erlenmeyer com a polpa. O Erlenmeyer de 125 mL foi lavado utilizando-se 50 mL de água destilada, que foi adicionado à mistura de reação e cronometrados 10 minutos.

O permanganato oxida a lignina residual, portanto fez-se a titulação para determinar quanto de permanganato foi consumido. Após os 10 minutos a reação foi interrompida pela adição de 5 mL de iodeto de potássio (KI) 1,0 M. O iodo livre na suspensão foi titulado com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1 N $\pm$ 0,0005 até a solução (sempre sob agitação) ficar com uma coloração amarelo claro. Adicionou-se então 0,5 mL de uma solução de amido 1% e titulou-se até a passagem da cor azul para branco. Foi realizada uma determinação do branco sem a polpa, utilizando 150 mL de água destilada (ao invés de 140 mL), usando-se o mesmo procedimento descrito anteriormente. Portanto, quanto maior o conteúdo de lignina da polpa, maior o volume de permanganato de potássio consumido por esta e conseqüentemente menor o volume de tiosulfato de sódio utilizado para titular o iodo formado.

3.16.5 DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE

Foi utilizado exatamente 0,125 g da polpa seca, colocada em um frasco âmbar. Em seguida adicionou-se 12,5 mL de etilenodiamina cúprica acrescentando-se 12,5 mL de água destilada. A mistura foi agitada por 15 minutos e transferida para uma pipeta de viscosidade Fenske-Oswald, previamente aferida com óleo *standard* e utilizada dentro dos limites de viscosidade apropriados. O tempo de escoamento foi cronometrado e o cálculo da viscosidade da celulose em centipoises foi determinado pela equação:

$$V = F \times t,$$

onde: F = fator da pipeta; t = tempo de escoamento (s); e V = viscosidade da celulose (cp).

4. RESULTADOS

4.1 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

4.1.1 DETERMINAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE XILANASES

A variação de diversos parâmetros tais como: composição do meio de cultura, pH inicial, temperatura, tempo de cultivo, fonte de carbono e fonte de nitrogênio podem influenciar positivamente ou negativamente na produção xilanásica e sua posterior secreção pelo microrganismo.

O primeiro parâmetro analisado neste trabalho foi a composição do meio de cultivo mais propício à produção xilanásica. Observa-se na Tabela 06 que a composição dos meios Khanna e SR favoreceram a produção desta enzima. Os valores nestes meios foram próximos e cerca de 38 – 61% maiores que os demais meios. Em relação à atividade intracelular, os meios Vogel e SR apresentaram os maiores valores, sendo que o segundo indicou um valor 24% menor na atividade. Em todos os meios testados, os crescimentos do microrganismo foram próximos, variando de 1,9 – 2,8 mg de proteínas totais. Desta forma, o meio SR foi escolhido por apresentar a maior atividade xilanolítica total (extracelular + intracelular). Além disso, esse meio vem sendo utilizado em outros trabalhos do laboratório.

Tabela 06 – Atividades xilanásicas intracelular e extracelular produzidas pelo fungo *Aspergillus caespitosus* cultivado em diferentes meios

Meio de Cultura	Xilanase Intracelular		Xilanase Extracelular		Crescimento (mg prot. total)
	Unidades Tot.	Específica	Unidades Tot.	Específica	
<i>Czapeck</i>	10	5,2	307	161	1,9
<i>Vogel</i>	37	15,4	190	79	2,4
<i>SR</i>	28	11,2	495	198	2,5
<i>Khanna</i>	9	4,3	497	236	2,1
<i>YG</i>	15	5,3	242	86	2,8

O fungo foi cultivado em meios suplementados com xilana birchwood 1,0% (p/v), pH 6,0, a 40°C durante 72 horas, sob agitação a 100 rpm. Excepcionalmente, neste experimento, a atividade específica foi definida como atividade xilanásica total/mg proteína intracelular total.

4.1.2 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DE ENSAIO

Na Figura 07 está ilustrada a temperatura ótima do ensaio enzimático. A máxima atividade xilanásica intracelular ocorreu a 50°C. Em relação à atividade extracelular, os maiores valores foram detectados na faixa de 50 – 60°C. Sendo assim, padronizou-se os ensaios enzimáticos, tanto da atividade intracelular quanto da extracelular, a 55°C.

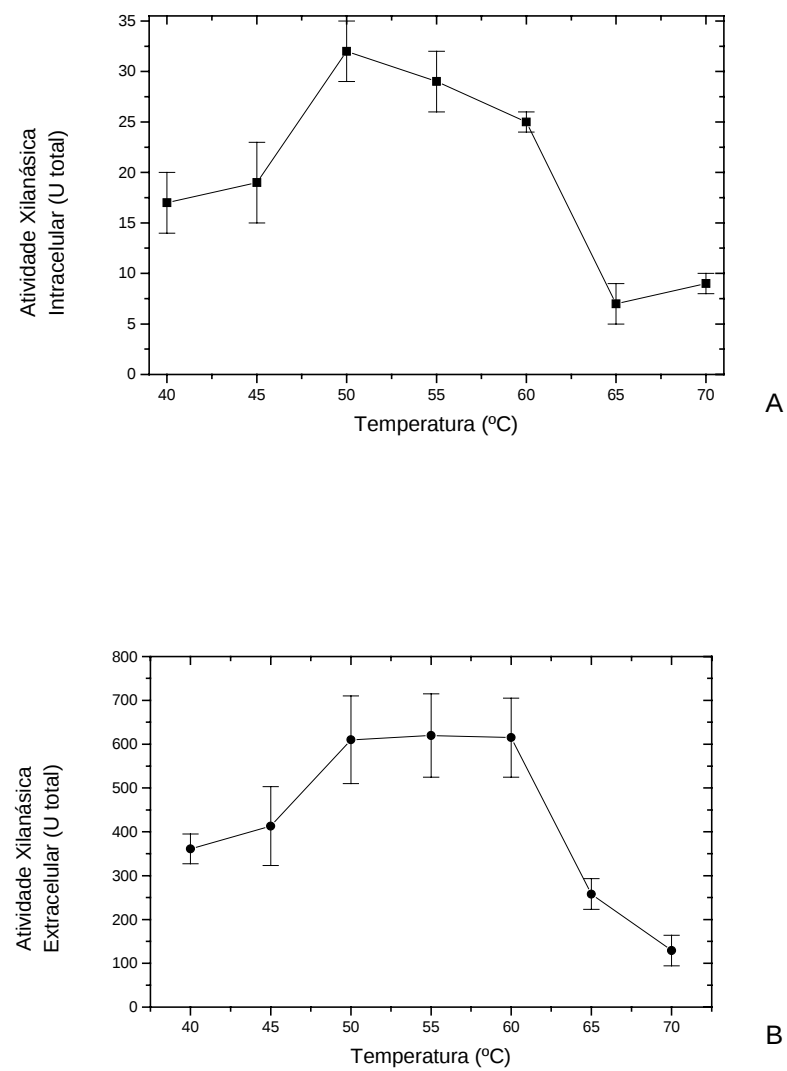


Figura 07 – Temperatura ótima da atividade xilanásica intracelular (A) e extracelular (B). O fungo foi cultivado em Meio SR, suplementado com xilana birchwood 1,0% (p/v), pH 6,0, a 40°C durante 48 horas, sob agitação a 100 rpm.

4.1.3 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE A ATIVIDADE XILANÁSICA INTRACELULAR E EXTRACELULAR

Com a finalidade de determinar o efeito da suplementação de distintas fontes de carbono na produção xilanolítica, o fungo foi cultivado durante 48 horas, a 40°C, em meios suplementados com diversos açúcares e alguns resíduos agroindustriais, como citado em Material e Métodos. Um meio sem fonte de carbono foi usado como controle.

Na Tabela 07 estão apresentados os resultados obtidos quando as fontes de carbono empregadas foram açúcares. Em relação ao crescimento do microrganismo, pode-se observar que suplementação com maltose, celobiose e amido proporcionaram o melhor desenvolvimento. A respeito do pH final do filtrado, os valores mais alcalinos foram detectados no meio sem adição de fonte de carbono e naqueles contendo fontes mais complexas, como avicel e xilana. Verificou-se que a máxima atividade xilanásica extracelular ocorreu na presença de xilana. Em relação à atividade intracelular os maiores níveis foram detectados nos meios com celobiose e frutose, seguidos pelo meio contendo xilana. Foi observada atividade xilanolítica, em níveis baixos, nos meios contendo fonte de carbono facilmente metabolizáveis e no meio controle, ou seja, sem fonte de carbono adicionada, indicando a secreção de níveis constitutivos da enzima.

Além dos açúcares analisados, vários outros compostos mais complexos, entre eles, resíduos agroindustriais, foram avaliados. Na Tabela 08 pode-se observar altos valores dos pHs finais dos filtrados. Em relação ao crescimento do microrganismo observa-se diferença significativa entre os meios, por exemplo, nas culturas suplementadas com aveia, o crescimento do fungo foi aproximadamente 5 vezes maior àquele contendo palha de arroz ou sabugo de milho triturado. É importante citar que nos meios suplementados com substratos sólidos é extremamente difícil dosar, tanto o crescimento do fungo, quanto às atividades intracelulares, pois no processo de maceração é impraticável isolar as células do microrganismo do substrato onde ele foi crescido.

A maior atividade xilanásica intracelular foi detectada no cultivo sobre farinha de mandioca, seguido pelos meios contendo xilana, aveia, farelo de trigo (FT) e bagaço de cana-de-açúcar (BCA). Em relação aos valores extracelulares, os melhores indutores à síntese e secreção da xilanase foram: FT, xilana, BCA e aveia. A partir desta etapa optou-se por trabalhar com meios contendo FT ou BCA, pois são encontrados em grande escala e a baixo custo, além do que, favoreceram a secreção xilanolítica em aproximadamente 95%, em relação a atividade xilanásica total (intra + extracelular).

Tabela 07 – Efeito de diferentes fontes de carbono (açúcares) sobre o crescimento de *Aspergillus caespitosus* e a produção xilanásica intracelular e extracelular

Fonte de Carbono	pH final filtrado	Crescimento (mg prot. Total)	Atividade Xilanásica (U total)	
			Intracelular	Extracelular
<i>Amido</i>	6,3	6,1	2,0	60,0
<i>Avicel</i>	8,3	1,0	3,0	79,0
<i>Celobiose</i>	5,7	6,2	46,0	15,0
<i>Frutose</i>	5,5	4,8	46,0	26,0
<i>Glicose</i>	4,0	3,0	17,0	28,0
<i>Maltose</i>	5,4	7,2	11,0	31,0
<i>Sacarose</i>	4,2	2,1	2,7	3,2
<i>Rafinose</i>	6,8	5,6	2,0	67,0
<i>Xilana</i>	8,6	2,6	40,0	672,0
<i>Xilose</i>	5,6	1,9	7,9	72,0
<i>Sem fonte</i>	8,5	0,9	5,4	20,0

O fungo foi cultivado em Meio SR, pH 6,0 a 40°C durante 48 horas, sob agitação a 100 rpm. O meio foi suplementado com 2% (p/v) das diferentes fontes de carbono testadas, exceto para amido, avicel e xilana onde utilizou-se 1% (p/v).

Tabela 08 – Efeito de diferentes fontes de carbono (resíduos industriais e outros compostos) sobre o crescimento de *Aspergillus caespitosus* e a produção xilanásica intracelular e extracelular

Fonte de Carbono	pH final do filtrado	Crescimento (mg prot. Total)	Atividade Xilanásica (U total)	
			Intracelular	Extracelular
<i>Aveia</i>	7,6	7,4	34,0	538,0
<i>Bagaço de Cana</i>	8,3	2,1	20,0	598,0
<i>Farelo de Trigo</i>	8,5	3,5	33,0	751,0
<i>Farinha de Mandioca</i>	8,4	3,2	48,0	33,0
<i>Palha de Arroz</i>	8,3	1,4	5,4	256,0
<i>Sabugo de Milho</i>	8,4	1,5	3,5	258,0
<i>Xilana</i>	8,6	2,6	36,0	637,0
<i>Sem fonte</i>	8,5	0,9	5,4	15,0

O fungo foi cultivado em meio SR, pH 6,0 a 40°C durante 48 horas. O meio foi suplementado com 1% (p/v) das diferentes fontes de carbono.

4.1.4 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO SOBRE A ATIVIDADE XILANÁSICA EXTRACELULAR

Com objetivo de identificar a fonte de nitrogênio adicional à peptona que induz a maior secreção xilanásica, o fungo foi cultivado durante 48 horas, a 40°C, em meio contendo sais SR suplementado com BCA ou FT 1% (p/v) na presença de fontes de nitrogênio inorgânicas e orgânicas, como descrito em Material e Métodos. As diferentes fontes de nitrogênio foram adicionadas em concentrações de 0,5 e 1,0% (p/v). Como também citado em Material e Métodos, o meio SR contém como fontes de nitrogênio: peptona 0,02% (p/v), extrato de levedura 0,45% (p/v) e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1% (p/v). Portanto, neste experimento avaliou-se outra fonte de nitrogênio, além de extrato de levedura e peptona, que permitisse a maior produção e conseqüente secreção da enzima.

Pode-se observar na Tabela 09 que nos meios, suplementados tanto com BCA quanto FT, a presença de fontes de nitrogênio inorgânicas não alterou significativamente os pHs finais dos filtrados, como observado naqueles suplementados com fontes de nitrogênio orgânicas.

Em relação às atividades xilanásicas foram detectados altos níveis xilanolíticos em todos os meios avaliados, com exceção daqueles suplementados com acetato de amônio e uréia. No entanto, as máximas atividades totais e específicas, principalmente, foram observadas nos cultivos contendo fontes de nitrogênio inorgânicas adicionais à peptona, seguidas pelos meios contendo apenas peptona ou extrato de levedura adicional à peptona (Tabela 09). Sendo assim, como as fontes de nitrogênio adicionais à peptona 0,02% não incrementaram em muito a atividade xilanásica, optou-se por trabalhar apenas com essa fonte.

Na mesma Tabela 09, pode-se certificar a importância da adição de peptona na atividade xilanásica, quando se cultivou o microrganismo em meios sem peptona, contendo apenas como fonte de nitrogênio adicionada, extrato de levedura, nitrato de amônio ou sulfato de amônio em concentração de 0,5%. Para as fermentações suplementadas com BCA, pode-se observar uma diminuição significativa das atividades nos meios contendo apenas as fontes de nitrogênio inorgânicas, sendo os decréscimos das atividades aproximadamente de 20, 44 e 34% para os cultivos suplementados com extrato de levedura, nitrato e sulfato de amônio respectivamente, se comparadas àqueles onde havia somente peptona (controle 1). Em relação aos meios suplementados com FT, na ausência de peptona, as atividades xilanásicas não

sofreram decréscimos significativos e apresentaram valores entre 1,8 – 9,6% menores à atividade xilanolítica detectada no controle 1 (Tabela 09).

Portanto, concluiu-se que a adição de peptona é mais adequada a produção xilanásica principalmente nos meios suplementados com BCA e fonte de nitrogênio inorgânica, além de que, apenas na sua presença altos níveis xilanolíticos são detectados. Sendo assim, o passo seguinte foi avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de peptona (0,02 – 1,0% p/v – Tabela 10) e o pH inicial de cultivo (Tabela 11), na melhor concentração de peptona obtida, sobre a atividade xilanásica produzida pelo microrganismo crescido em meios contendo BCA ou FT durante 48 horas a 40°C. Como apresentado na Tabela 10, as concentrações mais propícias às atividades xilanásicas produzidas pelo fungo crescido em BCA ou FT foram respectivamente 0,1 e 0,25%. Neste experimento as menores atividades, em ambas as fontes de carbono, foram detectadas nos meios contendo peptona 1%. Na avaliação dos pHs iniciais de cultivo, os melhores valores foram 8,0 e 6,0 para BCA e FT, respectivamente (Tabela 11).

4.1.5 RELAÇÃO ENTRE O pH INICIAL DE CULTIVO E A FONTE DE NITROGÊNIO

Este experimento teve como objetivo relacionar o efeito entre o pH inicial de cultivo e a fonte de nitrogênio utilizada sobre a atividade xilanolítica extracelular. Para isto, o fungo foi cultivado a 40°C, durante 48 horas, em meios suplementados com BCA ou FT contendo apenas peptona 0,02% (p/v) ou suplementado com essa fonte mais extrato de levedura, nitrato de amônio ou sulfato de amônio 0,5% (p/v).

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados obtidos. Em relação aos meios suplementados com BCA, pode-se observar que nos cultivos contendo extrato de levedura mais peptona, o pH inicial que induziu a maior secreção xilanásica foi o pH 3,0, sendo que os valores diminuía conforme aumentava-se o pH de cultivo. Nos meios contendo nitrato ou sulfato de amônio associados a peptona, os maiores níveis enzimáticos foram detectados nas culturas com pHs iniciais 7,0. No entanto, a atividade máxima observada neste experimento foi em cultura contendo apenas peptona como fonte de nitrogênio adicionada e pH inicial 7,0.

Em relação aos meios contendo FT, também na Tabela 12, a maior atividade foi detectada naquele suplementado com nitrato de amônio pH 5,0, seguido pelo meio contendo apenas peptona, pH 7,0. De uma maneira geral, pode-se observar nos cultivos suplementados com essa fonte de carbono, que com o aumento do pH inicial

de cultivo houve diminuição do crescimento fúngico e correspondente aumento dos níveis protéicos extracelulares, demonstrado pela diminuição dos valores das atividades específicas, indicando uma possível autólise.

Tabela 10 - Efeito da adição de diferentes concentrações de peptona sobre a atividade xilanásica extracelular

Fonte de Nitrogênio	Concentração (p/v)	pH Final		Ativ. Xilanásica Extracelular	
		BCA	FT	BCA	FT
<i>Peptona</i>	0,02	5,79	6,69	696	808
	0,10	5,40	7,30	877	847
	0,25	5,65	7,65	752	1047
	0,50	6,17	8,17	670	613
	0,75	6,10	8,00	598	623
	1,00	5,30	8,00	428	584

O fungo foi cultivado em meio contendo sais SR suplementado com BCA ou FT 1,0% (p/v), pH inicial 6,0. O cultivo foi realizado a 40°C durante 48 horas.

Tabela 11 – Influência do pH inicial de cultivo sobre a atividade xilanásica extracelular total e específica

pH Inicial	Atividade Xilanásica Extracelular					
	pH Final		Total		Específica	
	BCA	FT	BCA	FT	BCA	FT
5	6,31	7,37	727	964	100	153
6	6,97	7,78	741	1096	125	180
7	7,35	8,25	821	1025	101	126
8	7,78	8,05	933	875	103	87
9	7,65	8,48	533	898	60	89

O fungo foi cultivado em meio contendo sais SR suplementado com BCA ou FT 1,0% (p/v). Nos cultivos com BCA foi adicionado 0,1% de peptona e naqueles contendo FT, 0,25%. O cultivo foi realizado a 40°C durante 48 horas.

Tabela 12 – Relação entre a fonte de nitrogênio adicional à peptona no Meio SR e o pH inicial de cultivo sobre a produção xilanásica extracelular

Fonte de Nitrogênio + Peptona	pH	pH Final		Atividade Xilanásica		Atividade		Crescimento	
				Extracelular		Específica		(mg total)	
		Inicial	BCA	FT	BCA	FT	BCA	FT	BCA
Extrato de Levedura	3	8,31	5,96	785	345	89	44	2,3	4,0
	4	8,20	7,78	722	448	82	59	2,5	4,4
	5	8,50	7,49	728	759	83	67	2,5	2,0
	6	8,30	8,59	530	763	60	70	2,7	1,7
	7	8,33	8,35	226	846	45	74	2,5	2,0
	8	8,10	8,73	216	695	48	58	2,5	1,9
	9	7,91	8,71	176	801	37	70	2,3	2,1
Nitrato de Amônio	3	3,45	5,98	156	744	113	140	1,7	3,1
	4	4,58	5,52	427	848	149	169	2,1	3,3
	5	5,20	5,53	667	918	200	183	2,6	3,1
	6	5,27	5,41	790	765	224	134	2,4	2,3
	7	6,35	6,73	810	750	235	89	2,3	1,6
	8	6,90	7,43	736	748	210	81	2,2	1,9
	9	7,35	7,80	340	744	97	77	2,0	1,9
	10	7,47	8,40	344	805	101	85	1,9	1,8
Sulfato de Amônio	3	3,55	5,27	115	625	52	138	1,9	2,9
	4	5,05	5,54	522	760	321	168	2,1	3,0
	5	5,89	5,52	659	826	301	180	2,3	3,0
	6	6,27	5,08	701	741	305	127	2,2	2,9
	7	5,60	6,78	825	783	313	106	2,0	2,3
	8	6,02	6,78	754	815	127	95,7	2,1	2,1
	9	7,69	7,52	481	703	60	77,1	2,1	1,6
Somente Peptona	3	5,04	5,20	415	320	60	69	1,5	4,3
	4	5,47	5,60	662	421	94	89	1,6	5,0
	5	5,75	5,78	605	528	102	108	1,9	4,7
	6	6,12	6,24	708	623	110	137	2,0	4,2
	7	6,68	7,15	943	836	99	77	1,6	3,7
	8	6,98	7,46	928	730	107	69	1,5	3,9

O fungo foi cultivado em meio contendo sais SR suplementado com BCA ou FT 1,0% (p/v), solução SR, peptona 0,02% (p/v) e fontes de nitrogênio mencionadas a 0,5% (p/v), com exceção de peptona 0,02% (p/v), durante 48 horas a 40°C.

4.1.6 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE CULTIVO

Na Tabela 13 está representada a influência da temperatura e do tempo de cultivo sobre a atividade xilanásica extracelular. Observa-se que não houve grandes variações, na mesma fonte de carbono, entre as diferentes temperaturas e tempos analisados.

Na presença de BCA, as maiores atividades xilanásicas foram detectadas em 48 horas de cultivo, independente da temperatura, com exceção de 35°C. Nos cultivos suplementados com FT, nota-se, de forma geral, que as máximas atividades xilanásicas foram encontradas, em todas as temperaturas testadas, em 48 – 72 horas de cultivo. Portanto, padronizou-se os cultivos a 40°C, 48 horas para as duas fontes de carbono avaliadas, pois nestas condições há altas atividades xilanólíticas em curto período, e provavelmente a esta temperatura a termoestabilidade enzimática é maior.

4.1.7 EFEITO DA ADIÇÃO DE GLICOSE AO BCA E FT NA PRODUÇÃO DE XILANASES

Com intuito de comprovar a repressão catabólica das xilanases por glicose, o fungo foi cultivado nas duas fontes de carbono até agora avaliadas, BCA e FT, na presença de 0,25 – 0,75% (p/v) de glicose durante 24 – 120 horas.

Em relação aos meios com BCA, pode-se observar na Figura 08 (A) que até 48 horas de cultivo, os meios contendo glicose apresentaram repressão catabólica, evidenciada pela baixa atividade xilanásica, comparada ao controle (BCA 1%). Após este período, as atividades xilanásicas nos cultivos avaliados foram maiores, até mesmo que ao controle, nos meios contendo 0,5 e 0,75% de glicose. Em 120 horas de cultivo, as atividades xilanásicas nos meios suplementados com glicose caíram abaixo do meio contendo somente BCA.

Em relação aos meios suplementados com FT (Figura 08 B), em 24 horas de cultivo já são observadas altas atividades xilanásicas no meio contendo 0,25% de glicose. De 48 a 120 horas de cultivo, as atividades xilanólíticas em todos os meios apresentaram valores próximos, com exceção dos cultivos contendo 0,75% de glicose, o qual a partir de 96 horas começou apresentar alta atividade xilanásica.

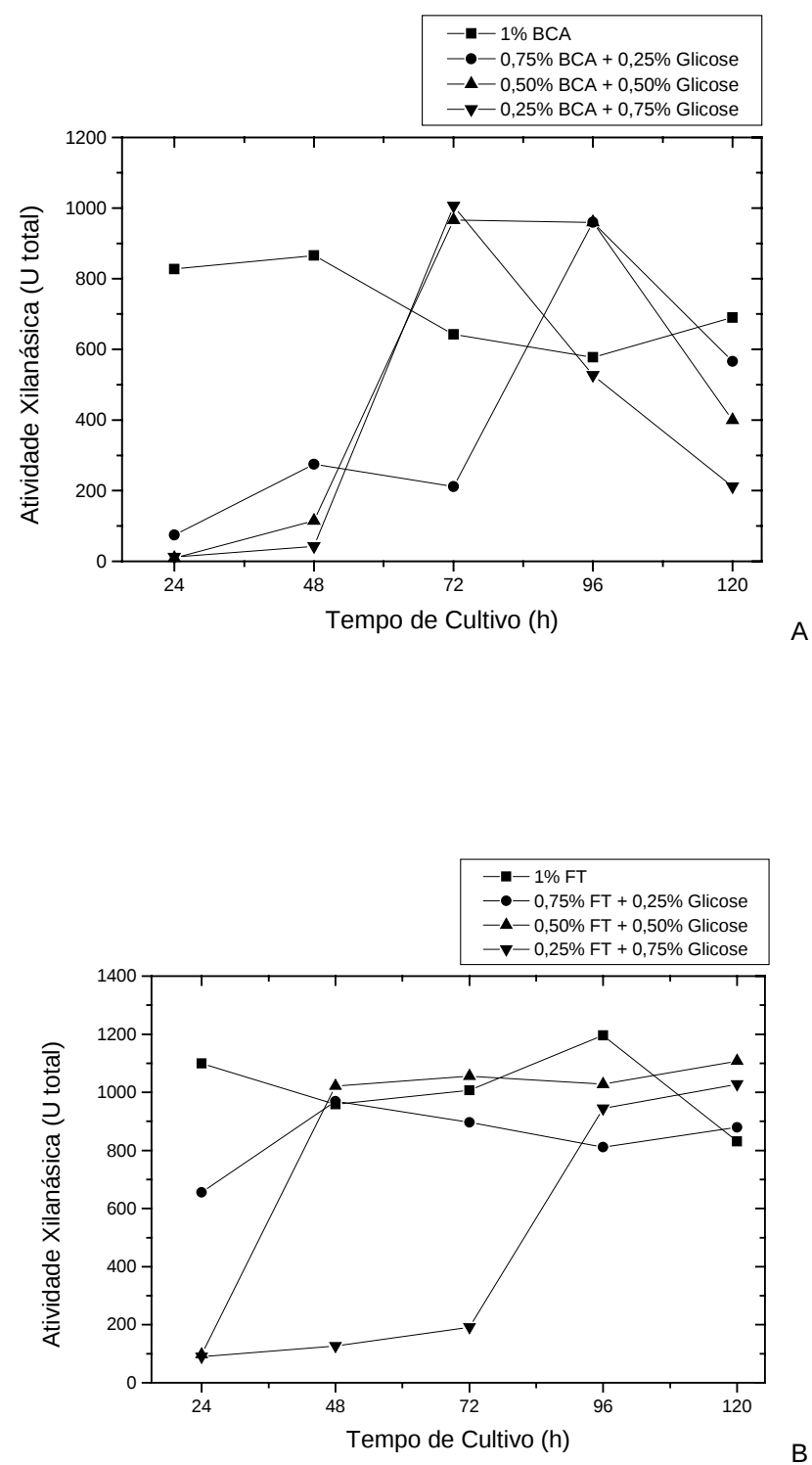


Figura 08 – Efeito da adição de diferentes concentrações de glicose sobre a atividade xilanásica. O fungo foi cultivado em Meio com sais SR, contendo BCA e peptona 0,1% (A) ou FT e peptona 0,25% (B) durante 24 – 120 horas a 40°C, sob agitação a 100 rpm.

4.1.8 CARACTERIZAÇÃO DAS XILANASES EM EXTRATOS BRUTOS

A influência da composição de diferentes soluções tampões e seus respectivos pHs sobre a atividade xilanásica extracelular produzida pelo fungo em meio SR suplementado com BCA e FT estão representados na Figura 09 (A) e (B), respectivamente. Observa-se que as maiores atividades enzimáticas detectadas, nas duas culturas, foram nos ensaios com MES pH 6,5, as quais foram determinadas como 100% (controle). Em tampão HEPES pH 8,0, as atividades relativas das xilanases provenientes de culturas contendo BCA e FT foram respectivamente 30 e 25% menores à atividade xilanásica controle.

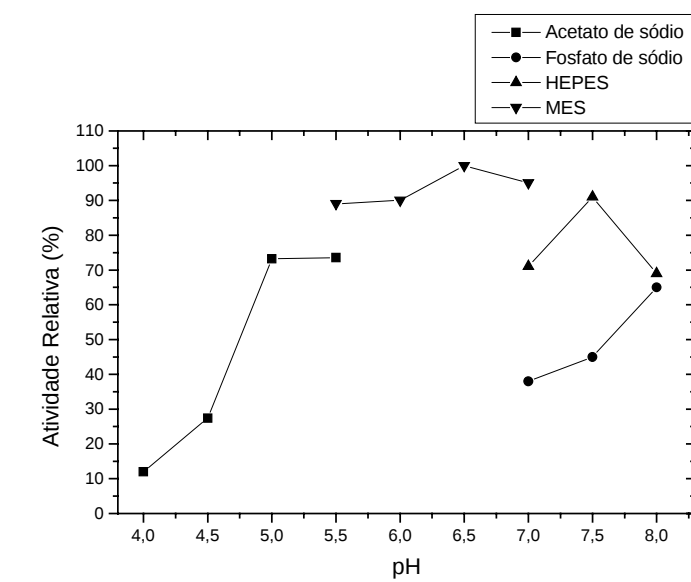
Foi investigada também a termoestabilidade, a 55 e 65°C, das xilanases presentes nos filtrados das culturas suplementadas com BCA ou FT. Em ambas temperaturas avaliadas, as xilanases presentes no filtrado proveniente das culturas contendo FT foram mais estáveis, como pode ser observado na Figura 10 (A) e (B), sendo que a 55°C, a atividade residual foi de 85% para FT e 72,5% para BCA em uma hora de incubação. A 65°C, houve reduções em ambas às atividades, atingindo um valor de T_{50} igual a 13 e 16,5 minutos para BCA e FT, respectivamente.

Na Figura 11 está representado o efeito da adição de várias substâncias, em concentrações finais de 1mM, sobre a atividade xilanásica extracelular presente no extrato bruto extraído de culturas contendo BCA (Figura 11 A) ou FT (Figura 11 B).

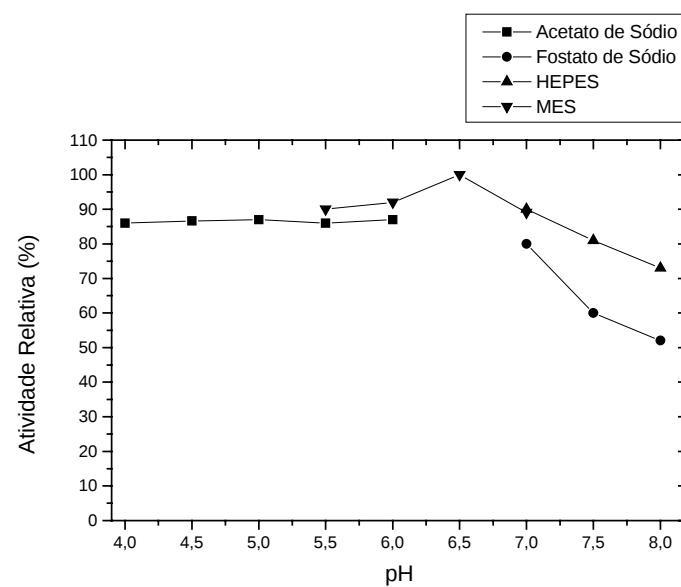
Observa-se que o íon Mn^{2+} ativou a enzima em 10% (Figura 11 A) e 15% (Figura 11 B). A menor atividade relativa observada, em ambas as fontes de carbono, foi na presença de Hg^{2+} , sendo que em relação ao BCA, a atividade relativa apresentou valor 69% menor ao controle e ao FT, 40%. Os outros íons inibiram a atividade em 10 – 40% em BCA e 5 – 22% em FT. A presença de EDTA causou inibição da atividade relativa em 25% e 5% respectivamente em BCA e FT. Em relação à adição de β -mercaptoetanol (1 mM), não houve alteração na atividade xilanásica.

Foi de interesse neste trabalho, determinar as atividades de várias enzimas presentes nos filtrados das culturas suplementadas com BCA ou FT (Tabela 14). Diferenças significativas, com as duas fontes de carbono testadas, foram observadas para pectinase e invertase. Além disso, pode-se observar que no filtrado proveniente da cultura suplementada com FT, as atividades enzimáticas detectadas apresentaram valores mais altos em relação as enzimas procedentes dos meios contendo BCA, no entanto, essas atividades foram baixas, com exceção da invertase, se comparadas a atividade xilanólítica.

B



A



B

Figura 09 - Influência da composição de diferentes tampões e seus respectivos pHs sobre a atividade xilanásica extracelular provenientes de culturas suplementadas com BCA (A) ou FT (B). O tampão MES pH 6,5 foi usado como controle (100%), pois foi nesta condição onde se obteve maior atividade.

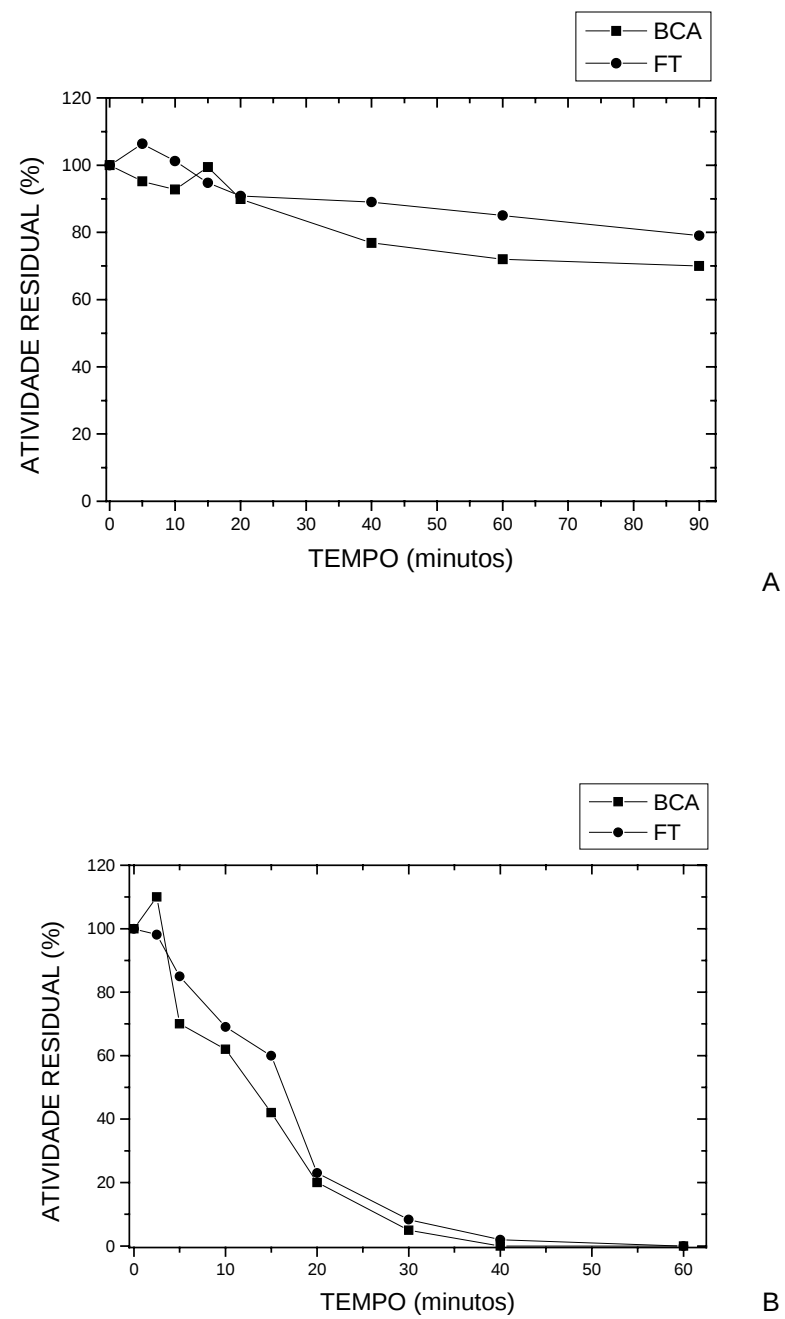


Figura 10 - Estabilidade térmica das xilanases presentes nos extratos brutos provenientes de meios suplementados com BCA ou FT. As amostras foram incubadas a 55°C (A) e 65°C (B) por diferentes períodos. As atividades residuais foram determinadas nas condições ótimas.

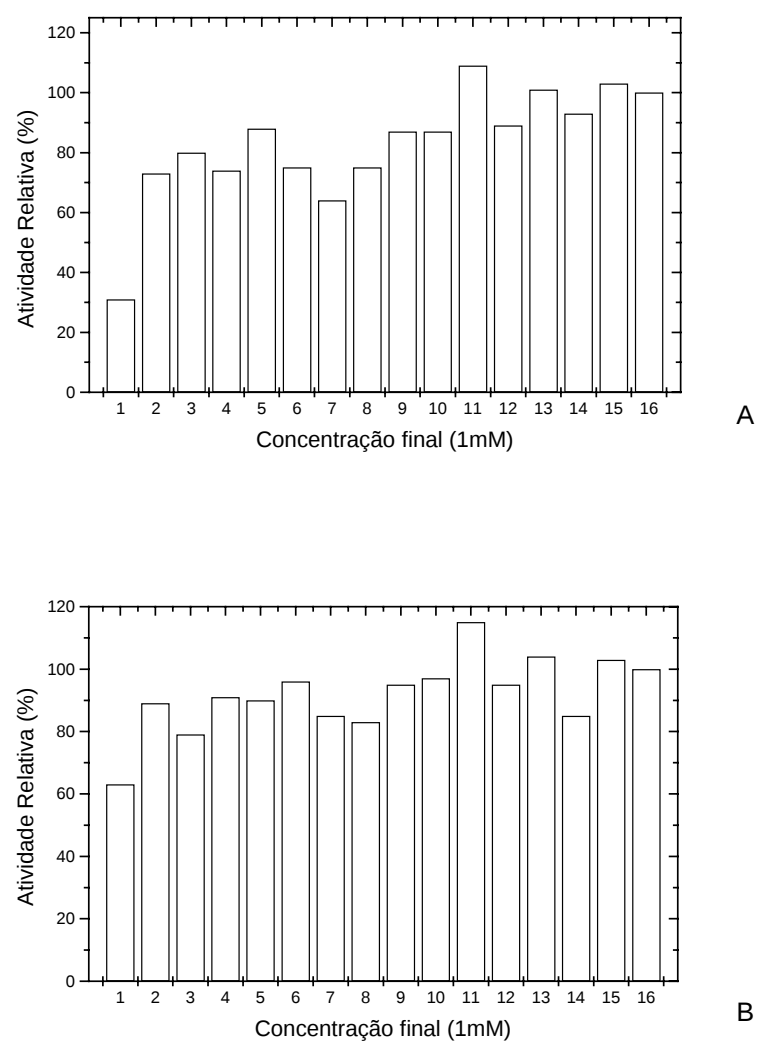


Figura 11 – Influência de diferentes íons, EDTA e β - mercaptoetanol, na concentração final de 1mM, sobre a atividade xilanásica, expressa em % em relação ao controle (sem adição de compostos). O fungo foi cultivado em meios suplementados com BCA (A) ou FT (B).

Legenda: 1- HgCl_2 ; 2- NH_4Cl ; 3- CaCl_2 ; 4- ZnCl_2 ; 5- BaCl_2 ; 6- EDTA; 7- CuSO_4 ; 8- CuSO_4 ; 9- NaCl ; 10- MgSO_4 ; 11- MnCl_2 ; 12- MgCl_2 ; 13- AlCl_3 ; 14- CoCl_2 ; 15- β - mercaptoetanol e 16- Controle

Tabela 14 – Determinação de várias atividades enzimáticas extracelulares produzidas em meios suplementados com BCA e FT

Enzima	BCA (U/mL)	FT (U/mL)
<i>Amilase</i>	0,88	0,84
<i>Avicelase</i>	0,39	0,24
<i>CM-Celulase</i>	0,60	0,76
<i>Poligalacturonase</i>	0,13	2,72
<i>Invertase</i>	1,26	11,0
<i>Pectinase</i>	0,19	1,26
<i>Protease Neutra</i>	ND	0,18
<i>Xilanase</i>	37,3	43,9

ND – Não detectado

O fungo foi cultivado com saís SR, suplementado com BCA e peptona, pH inicial 8,0 ou FT e peptona, pH inicial 6,0 a 40°C durante 48 horas. O ensaio enzimático foi realizado a 55°C em tampão MES pH 6,5. As atividades enzimáticas foram determinadas como descrito Material e Métodos 3.6.2 - 3.

4.2 FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

4.2.1 SUBSTRATO DE CULTIVO

O passo inicial do estudo da produção de xilanases por *Aspergillus caespitosus* cultivado em fermentações semi-sólidas (FSS) foi determinar o substrato de cultivo ideal a atividade xilanólítica (Figura 12). Os substratos avaliados foram: farinha de mandioca, palha de arroz, aveia, farelo de trigo (FT) e bagaço de cana de açúcar (BCA) sendo que, nestes dois últimos foram obtidas as melhores atividades xilanásicas, em média 90% maior dos que as detectadas nos outros cultivos.

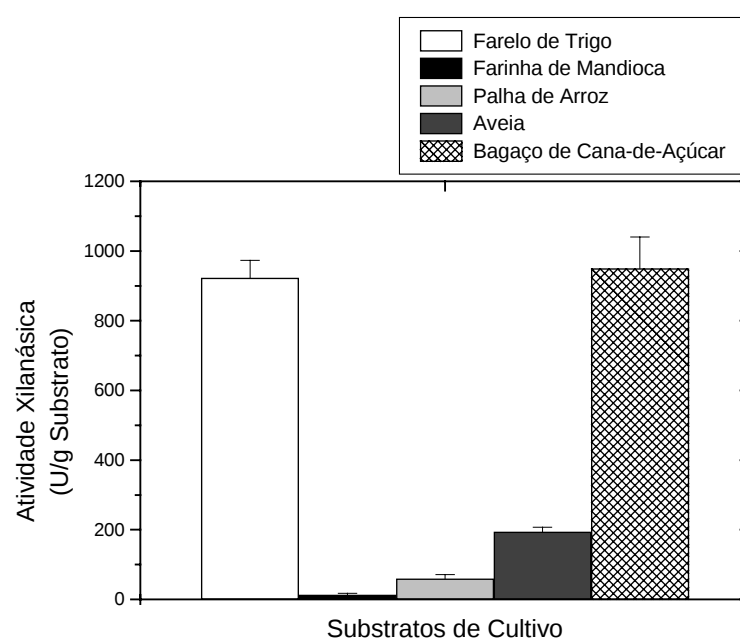


Figura 12 – Influência de diferentes substratos de cultivo sobre a atividade xilanásica produzida pelo fungo em fermentações semi-sólidas. Os meios foram suplementados com 2 g de substrato mais 4 mL de água de torneira. Os meios foram incubados a 30°C por 11 dias. Após este período, foram realizadas extrações enzimáticas utilizando 60 mL de água destilada gelada.

4.2.2 EFEITO DA UMIDADE DO MEIO

Nas Figuras 13 e 14 pode-se observar o efeito da adição de diferentes volumes de água de torneira sobre as atividades xilanásicas e proteásicas em FSS. Foram testados diversos volumes, sendo de 0 – 4,5 mL (Figura 13) para 1 grama de FT e 2 – 8 mL para 1 grama de BCA (Figura 14). As maiores atividades xilanásicas observadas foram nos meios suplementados com 2 mL : 1 grama de FT e 4 mL : 1 grama de BCA.

Em relação às culturas contendo FT, pode-se observar que de 0 – 1,5 mL de água, a produção enzimática foi baixa, sendo em média 64% menor a máxima obtida neste experimento. Nos meios que receberam mais de 2 mL de água por grama de FT, a atividade xilanolítica tendeu a cair (Figura 13 A). Nestes cultivos também, se observa aumento das atividades proteásicas (Figura 13 B) e dos pHs finais dos filtrados (Figura 13 A).

Nas fermentações suplementadas com BCA, as atividades xilanásicas (Figura 14 A) e proteásicas (Figura 14 B) foram próximas entre os meios avaliados. Entre as atividades xilanolíticas, o maior valor foi detectado nas culturas contendo 4 mL : 1 grama de BCA. Em relação as atividades proteásicas detectadas nas FSS contendo BCA, os valores foram aproximadamente cinco vezes menores se comparadas ao meio com FT (2 mL : 1 grama). Como ocorrido com os cultivos contendo FT, o aumento da umidade do meio acarretou na alcalinização do pH final do filtrado (Figura 14 A).

4.2.3 EFEITO DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE CULTIVO

Com o objetivo de analisar o efeito da temperatura sobre a atividade xilanásica, o fungo foi cultivado a 30 e 40°C em FSS tendo FT ou BCA como substratos (Figura 15 A). Tanto para as fermentações contendo FT quanto para os contendo BCA, as máximas atividades xilanásicas foram detectadas nos meios cultivados a 30°C, incubadas por 3 e 6 dias, respectivamente, para FT e BCA. Nestas condições citadas, as atividades foram 31,2 e 69,7% maiores às detectadas nos cultivos a 40°C, incubados pelo mesmo período, suplementados com FT e BCA, respectivamente. Em relação as atividades proteásicas (Figura 15 B), em ambos os substratos os valores são menores a 40°C, entretanto nas FSS suplementadas com BCA as máximas atividades foram obtidas em tempos de cultivo mais longos.

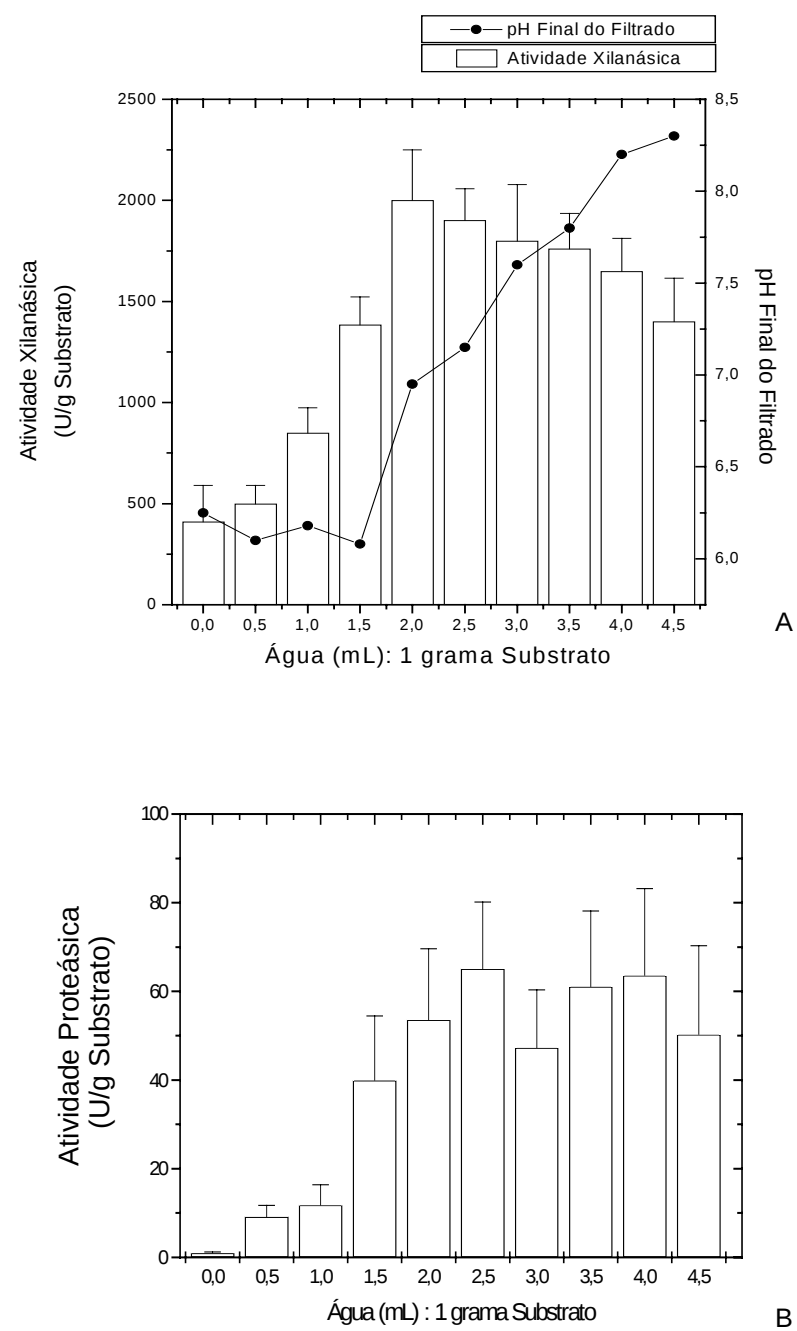
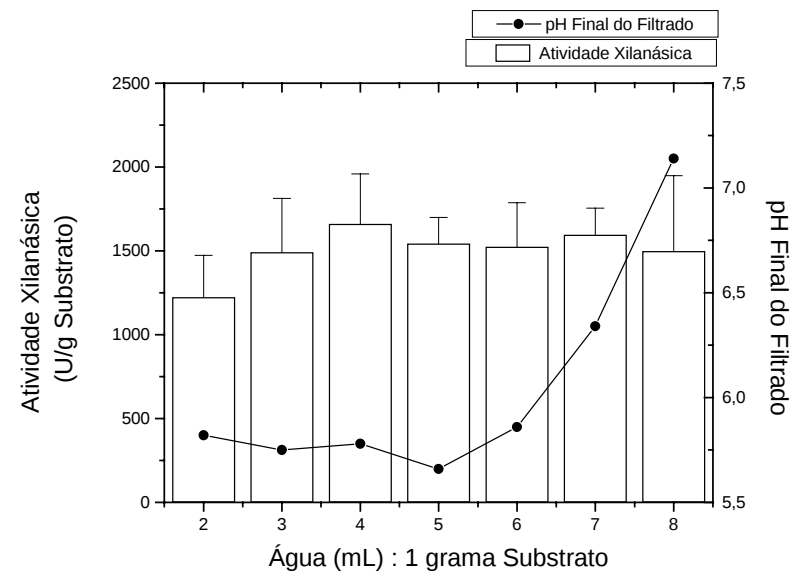
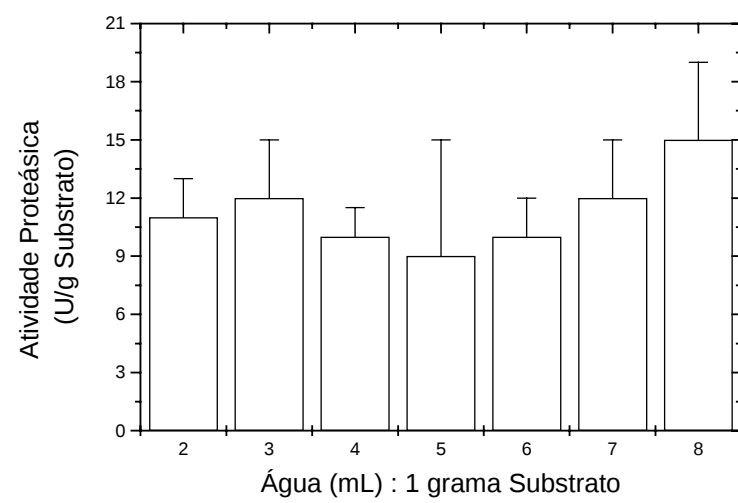


Figura 13 – Efeito da adição de água de torneira em FSS suplementadas com FT sobre a atividade xilanásica (A) e proteásica (B). O fungo foi cultivado a 30°C durante 5 dias contendo 2 mL de água de torneira por grama de FT.



A



B

Figura 14 – Efeito da adição de água de torneira em FSS suplementadas com BCA sobre a atividade xilanásica (A) e proteásica (B). O fungo foi cultivado a 30°C durante 11 dias contendo 4 mL de água de torneira por grama de BCA.

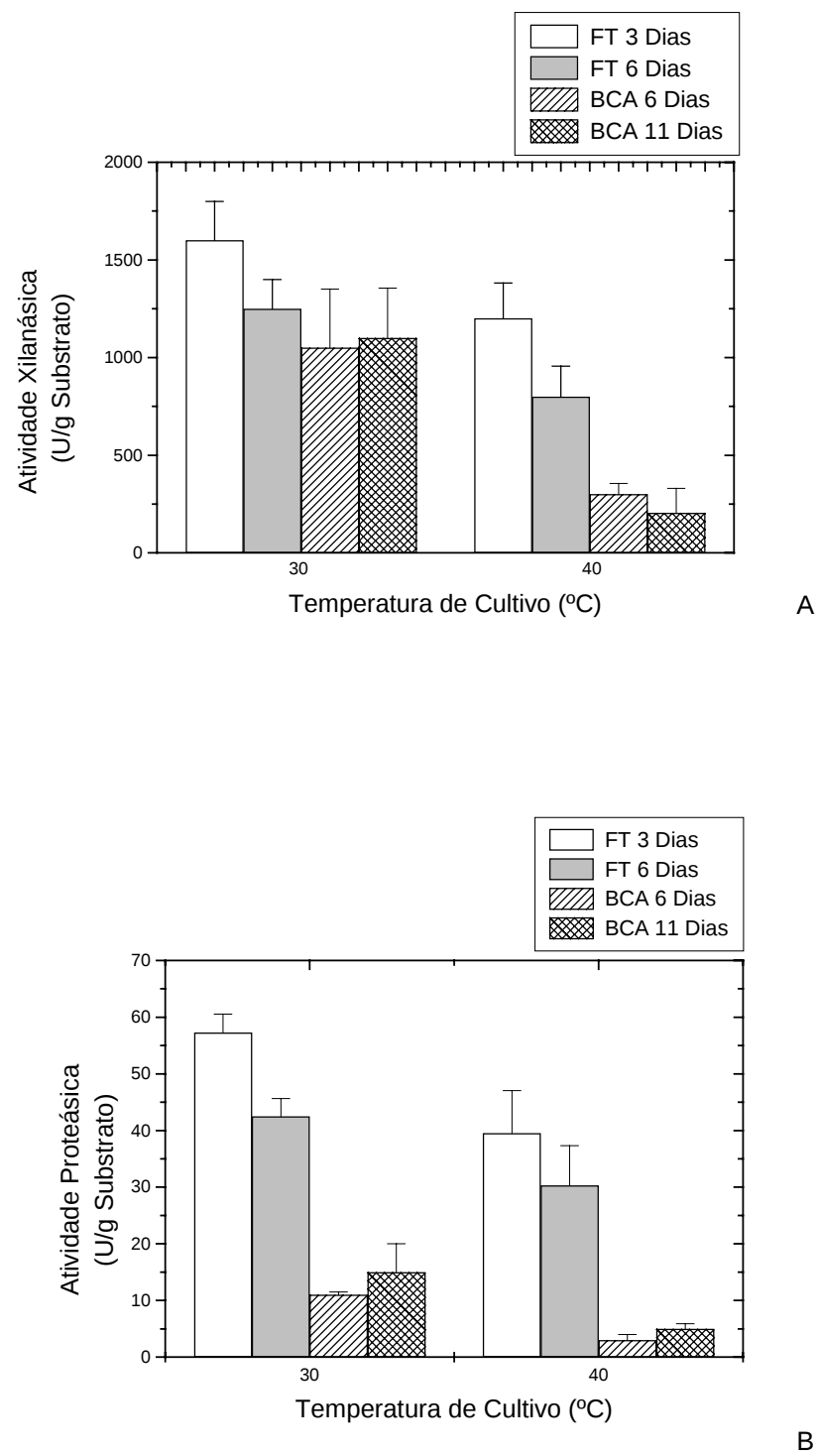


Figura 15 – Influência da temperatura de cultivo sobre a atividade xilanásica (A) e proteásica (B). O fungo foi cultivado em FSS suplementadas com FT (3 e 6 dias) ou BCA (6 e 11 dias), contendo 2 e 4 mL de água de torneira por grama de substrato, respectivamente.

4.2.4 EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

Com o objetivo de analisar o efeito da adição de diversas fontes de nitrogênio sobre a atividade xilanásica, o fungo foi cultivado em FSS tendo FT ou BCA como substratos. Em relação as atividades xilanásicas obtidas das culturas com FT, pode-se observar na Tabela 15 que o valor do pH final do filtrado é independente da fonte de nitrogênio adicionada e da sua concentração. O maior valor da atividade xilanolítica foi detectado nas culturas suplementadas com nitrato de amônio 0,5% (p/p), seguido por peptona 0,5% (p/p) e extrato de levedura 1,0% (p/p). A adição dessas fontes acarretou aumento de aproximadamente 28, 25 e 22% em relação ao controle, respectivamente.

Já nas culturas suplementadas com BCA (Tabela 16), primeiramente foram adicionados aos meios: extrato de levedura, peptona ou sulfato de amônio 10% (p/p). A máxima atividade xilanásica foi obtida no filtrado oriundo da FSS contendo peptona, sendo esta 2,3 vezes maior a atividade obtida no meio sem fonte de nitrogênio adicionada. O próximo passo foi verificar a adição de diferentes concentrações desse composto sobre a atividade xilanásica nesta mesma condição, ou seja, FSS suplementada com BCA cultivada a 30°C (Tabela 17). A máxima atividade xilanásica foi detectada no filtrado obtido das culturas contendo 6% de peptona. No entanto, o valor obtido foi próximo às das culturas contendo mais peptona. Nos meios suplementados com 0,2 e 3% de peptona, as atividades xilanolíticas foram 67 e 44%, respectivamente, menores ao valor obtido com peptona 6%.

4.2.5 EFEITO DA ADIÇÃO DE SAIS E DA COMPOSIÇÃO DE DIFERENTES SOLUÇÕES TAMPÕES E SEUS pHs

O efeito da adição de sais Vogel (5% v/v) ou SR (5% v/v) e de água de torneira ou destilada sobre a atividade xilanásicas em FSS foi avaliado (Figura 16). Para as culturas suplementadas com FT, a adição de água de torneira foi a que mais favoreceu a atividade xilanásica apresentando uma atividade 25% maior a água destilada. Já nas FSS suplementadas com BCA, no meio contendo sais Vogel foi detectada a máxima atividade xilanolítica, sendo esta 30% maior a atividade detectada do meio contendo água destilada.

Tabela 15 – Efeito da adição de fontes de nitrogênio em meios suplementados com FT sobre a atividade xilanásica

Fonte de Nitrogênio	Concentração % (p/p)	pH Final Filtrado	Atividade Xilanásica (U/g Substrato)
<i>Extrato de Levedura</i>	0,5	6,92	1740
	1,0	6,61	1954
	5,0	6,20	1310
<i>Nitrato de Amônio</i>	0,5	6,30	2040
	1,0	6,72	1802
	5,0	5,90	682
<i>Peptona</i>	0,5	6,61	1996
	1,0	6,50	1722
	5,0	6,10	1705
<i>Sulfato de Amônio</i>	0,5	6,80	1771
	1,0	6,80	1781
	5,0	5,20	1544
<i>Controle</i>	-	6,72	1600

O fungo foi cultivado em FSS suplementadas com FT e água de torneira (2 g : 4 mL) durante 5 dias a 30°C.

Tabela 16 – Efeito da adição de fontes de nitrogênio em meios suplementados com BCA sobre a atividade xilanásica

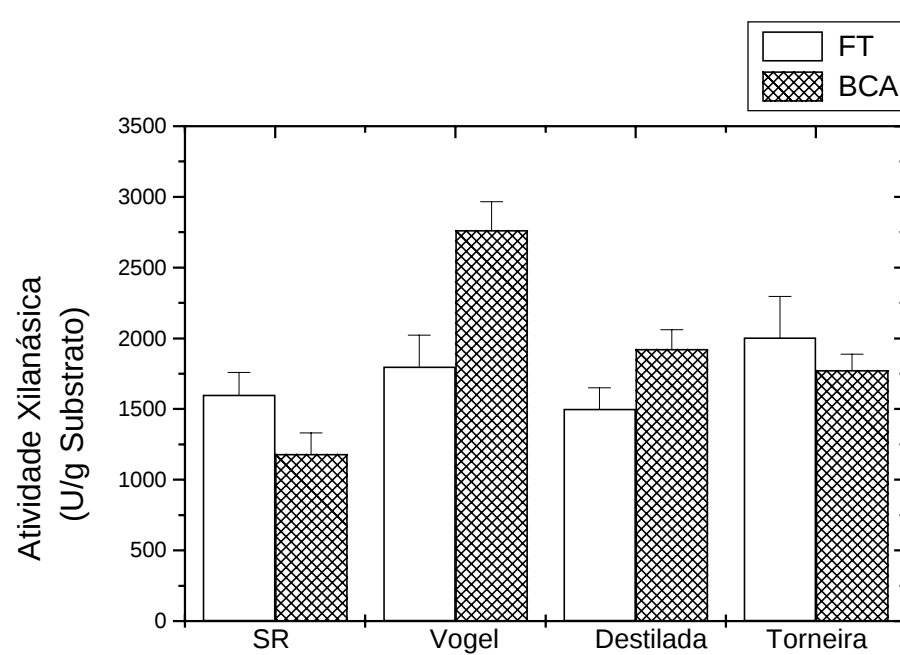
Fonte de Nitrogênio	Concentração % (p/p)	pH Final Filtrado	Atividade Xilanásica (U/g Substrato)
<i>Extrato de Levedura</i>	10,0	6,96	1956
<i>Peptona</i>	10,0	6,90	2230
<i>Sulfato de Amônio</i>	10,0	6,47	1056
<i>Controle</i>	-	6,21	983

O fungo foi cultivado em FSS suplementadas com BCA e água de torneira (1 g : 4 mL) durante 11 dias a 30°C.

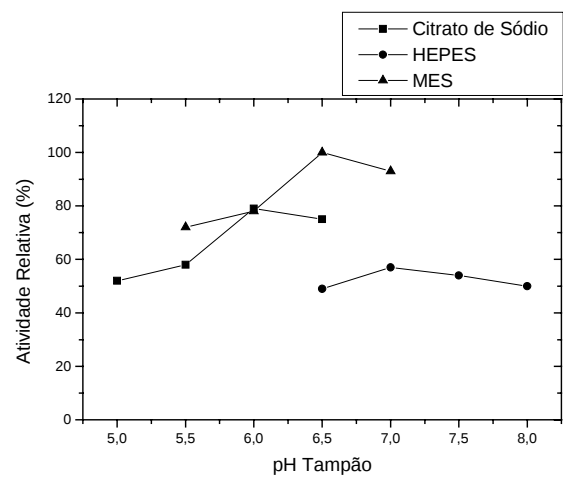
Tabela 17 – Efeito da concentração de peptona adicionada a FSS

Concentração de Peptona (p/p)	Atividade Xilanásica (U/g Substrato)
0,2	909
3,0	1550
6,0	2750
12,0	2232
20,0	2601
30,0	2444

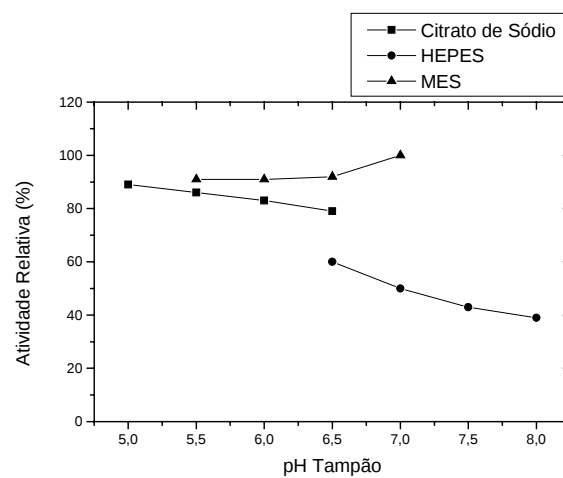
O fungo foi cultivado em FSS suplementadas com BCA e água de torneira (1 g : 4 mL) durante 11 dias a 30°C.

**Figura 16** – Efeito da adição de sais na atividade xilanásica produzida pelo fungo em FSS suplementadas com FT e BCA, tendo 2 e 4 mL de líquido por grama de substrato, respectivamente.

Na Figura 17 pode-se observar a influência da composição de diferentes soluções tampões e seus pHs sobre a atividade xilanásica presentes em extratos extraídos de FSS suplementadas com FT (Figura 17 A) ou BCA (Figura 17 B). As maiores atividades xilanásicas foram detectadas na presença de tampão MES, sendo que para as xilanases presentes no filtrado da FSS suplementada com FT, o pH ótimo foi de 6,5 e para BCA, 7,0.



A



B

Figura 17 – Influência da composição de diferentes soluções tampões e seus respectivos pHs sobre a atividade xilanásica presente em filtrados extraídos de FSS suplementadas com FT (A) ou BCA (B). O tampão MES em ambas condições foi usado com 100% por apresentar a atividade máxima.

4.2.6 EFEITO DA ADIÇÃO DE GLICOSE

O efeito do enriquecimento das FSS com glicose (2 – 10% p/p) sobre a atividade xilanásica foi estudado. Pode-se observar na Figura 18, que em ambas as culturas houve aumento das atividades xilanólíticas em relação à detectada na cultura sem glicose adicionada. Os acréscimos das atividades foram de 30 e 24% nas culturas suplementadas com FT e BCA, respectivamente, ou seja, a presença deste açúcar não acarretou não repressão catabólica dessa enzima.

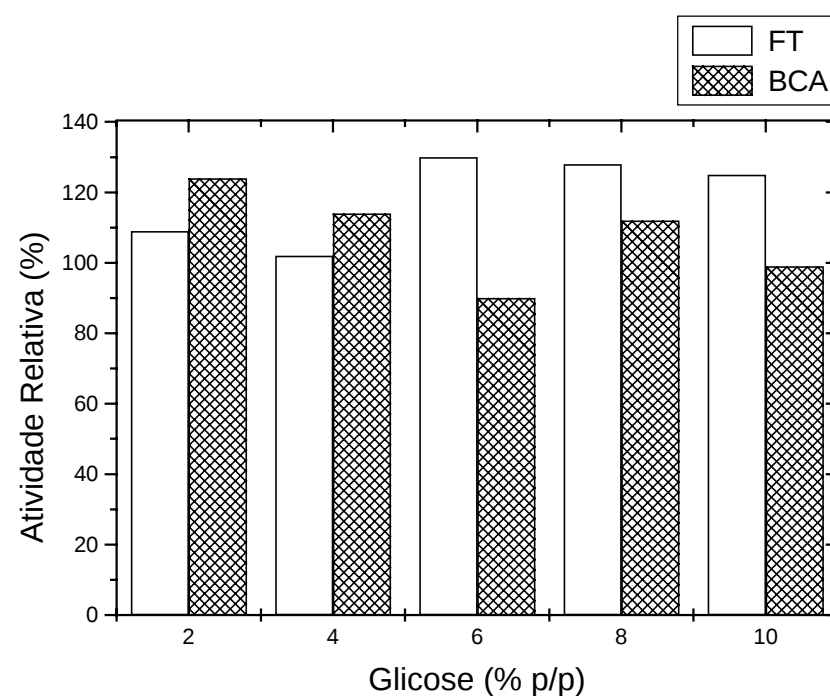


Figura 18 – Efeito da adição de glicose em diferentes concentrações (p/p) sobre a atividade xilanásica produzida em FSS suplementadas com FT ou BCA, tendo 2 e 4 mL de água de líquido por grama de substrato, respectivamente. O fungo foi cultivado no caso das FSS – FT por 5 dias e no caso das FSS – BCA, por 11 dias. As atividades controles (100%), para os respectivos substratos, foram detectadas nos meios sem glicose adicionada.

4.2.7 EFEITO DE SUCESSIVAS EXTRAÇÕES ENZIMÁTICAS

O efeito de sucessivas lavagens dos substratos (FT e BCA) durante o processo de extração enzimática foi investigado visando recuperar a maior quantidade de produto possível. Foram realizadas 3 extrações sucessivas utilizando-se 30, 60 ou 180 mL de água destilada (Figura 19). Considerando-se que após a terceira extração recuperou-se 100% de atividade xilanolítica, pode-se dizer que tanto nas culturas contendo FT quanto nas contendo BCA, mais de 50% de enzima foi extraída na primeira lavagem, com exceção da extração utilizando 30 mL de água destilada.

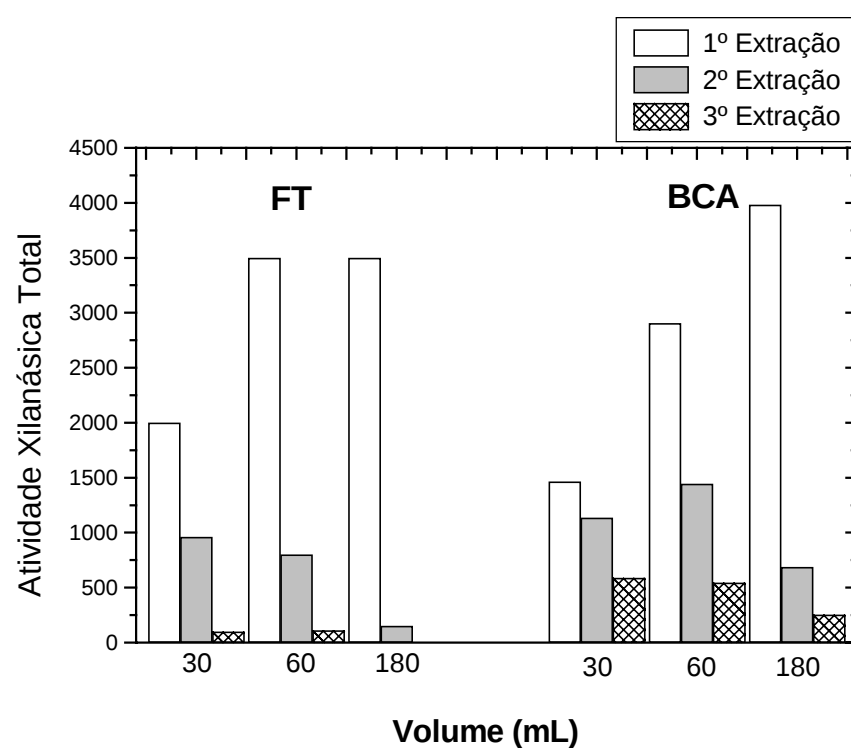


Figura 19 – Efeito de sucessivas lavagens do substrato na extração xilanásica. O fungo foi cultivado em FT ou BCA por 5 e 11 dias respectivamente, a 30°C. Após este período, as enzimas foram extraídas com 30, 60 e 180 mL de água destilada a 4°C.

4.3 PURIFICAÇÃO DAS XILANASES EXTRACELULARES

Para a purificação das xilanases extracelulares optou-se por um meio de cultura que apresentasse alta atividade específica. Sendo assim, foram escolhidos cultivos submersos com composição de sais SR e suplementação de sulfato de amônio e peptona, como fontes de nitrogênio, e BCA, como fonte indutora de xilanases.

Extratos brutos foram dialisados e concentrados por liofilização. A amostra foi aplicada em uma coluna Sephadex G-100. Pode-se observar, na Figura 20, dois picos de atividade xilanolítica (pico I e II). As frações contendo as maiores atividades xilanásicas foram agrupadas, como indicado pelas setas. Este processo resultou em duas enzimas extracelulares purificadas 23,8 e 2,4 vezes e com recuperações de 61,6 e 22,1%, respectivamente. Padronizou-se a xilanase presente no pico I como xyl 1 e a no pico II como xyl 2 (Tabela 18).

4.3.1 CRITÉRIO DE PUREZA

O primeiro critério de pureza utilizado foi a análise eletroforética das enzimas em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes (PAGE 8,9). Conforme está apresentado nas Figuras 21 (A) e 21 (C), as xilanases exibem uma única banda. A fim de comprovar a natureza xilanolítica das proteínas purificadas foram realizados géis de atividades usando o corante RBB-Xylan. Os resultados, apresentados nas Figuras 21 (B) e 21 (D), corroboram com o que foi proposto.

As análises de pureza também foram realizadas em condições desnaturantes (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida, como apresentado na Figura 21 (E).

4.3.2 TEOR DE AÇÚCAR NA MOLÉCULA

Este experimento foi realizado segundo metodologia descrita por Dubois *et al.* (1956), utilizando-se manose como padrão.

Foram estimados valores de 28% (± 6) e 41% (± 2) de açúcares nas massas moleculares de xyl 1 e xyl 2, respectivamente.

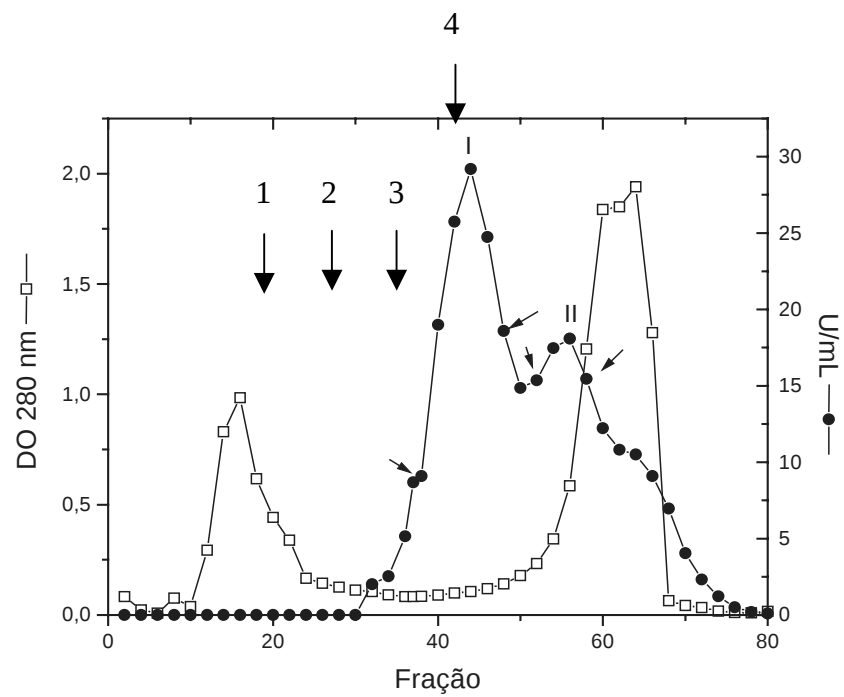


Figura 20 - Perfil cromatográfico das atividades xilanásicas de *Aspergillus caespitosus* em coluna Sephadex G-100. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 10 mM, pH 5,5. Frações de 1,07 mL foram coletadas por tubo. As setas indicam os tubos selecionados para purificação e posterior caracterização. Legenda: 1 – Blue dextran (2x10⁶ kDa); 2 – Álcool desidrogenase (150 kDa); 3 – Albumina bovina (66 kDa) e 4 – Anidrase carbônica (29 kDa).

Tabela 18 - Purificação das xilanases extracelulares de *Aspergillus caespitosus*

	VOLUME TOTAL	ATIVIDADE TOTAL	PROTEÍNA TOTAL	ATIVIDADE ESPECÍFICA	RECUPERAÇÃO	FATOR DE PURIFICAÇÃO
ETAPAS	(mL)	(U)	(mg)	(U/mg)	(%)	(VEZES)
Extrato Bruto	150,0	2772,7	50,2	55,2	100,0	1,0
Liofilizado	1,0	341,8	12,2	28,0	12,3	0,5
Sephadex G-100						
Pico I	12,9	1708,2	1,3	1314,0	61,6	23,8
Pico II	8,6	613,8	4,6	133,4	22,1	2,4

4.3.3 DETERMINAÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES E DOS pIs

Para determinação das massas moleculares das xilanases extracelulares obtidas, padrões foram aplicados na coluna de filtração utilizada, permitindo a obtenção de uma reta padrão na qual poderiam ser estimados as massas moleculares das enzimas obtidas (Figura 22). Desta maneira, os valores das massas moleculares para xyl 1 e xyl 2 foram, respectivamente, de 26.300 Da e 7.700 Da. O valor estimado da massa molecular da xyl 1 por SDS-PAGE foi de 27.700 Da, ou seja, muito próximo do valor obtido em coluna de filtração. Entretanto, por SDS-PAGE, o valor da massa molecular estimado para xyl 2 de 17.700 Da foi muito maior ao valor obtido na coluna de filtração xyl 2 (Figura 21 E).

Os pontos isoeletricos (pI) das duas enzimas foram determinados segundo o método proposto por O'Farrel e colaboradores (1983). Os valores obtidos foram de 6,68 e 5,85 para xyl 1 e xyl 2, respectivamente.

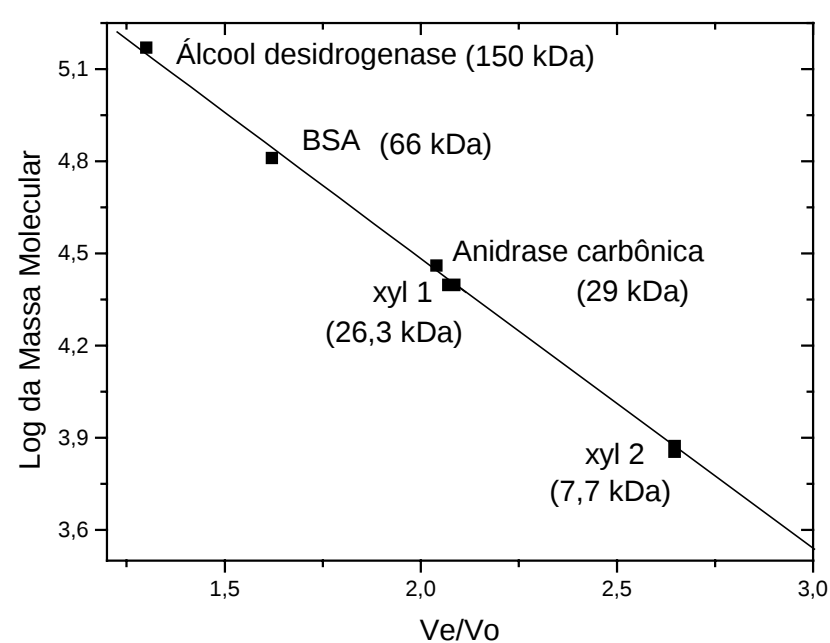


Figura 22 – Determinação das massas moleculares das xilanases purificadas por cromatografia de filtração (Sephadex G-100).

4.3.4 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH NAS ATIVIDADES XILANÁSICAS EXTRACELULARES PURIFICADAS

Como demonstrado na Figura 23, a temperatura ótima das atividades xilanásicas extracelulares purificadas do fungo *Aspergillus caespitosus* foi entre 50 e 55°C para xyl 1 e 50°C para xyl 2. À 60°C, as atividades xilanásicas da xyl 1 e da xyl 2, apresentaram valores 30 e 50% menores aos observados em suas respectivas temperaturas ótimas. Já a 70°C, as reduções das atividades foram de 81 e 79%, respectivamente para xyl 1 e 2.

Em relação ao pH de ensaio foram analisados tampões com pHs entre 4,0 e 8,5. Tanto xyl 1 quanto xyl 2 apresentaram atividades máximas na presença dos tampões MES e HEPES, sendo que para a primeira forma as maiores atividades foram detectadas entre 7,0 – 7,5 (Figura 24 A) e para segunda entre 5,5 – 6,5 (Figura 24 B). Nestes valores de pH, as atividades xilanásicas detectadas na presença do tampão fosfato de sódio apresentaram valores em média 25 – 30% menores aos obtidos com os tampões MES e HEPES. Além disso, pode-se observar que em pHs alcalinos, a atividade xilanásica da xyl 1 apresentou valores altos, em relação a xyl 2, o que confere propriedades biotecnológicas interessantes no biobranqueamento da polpa de celulose.

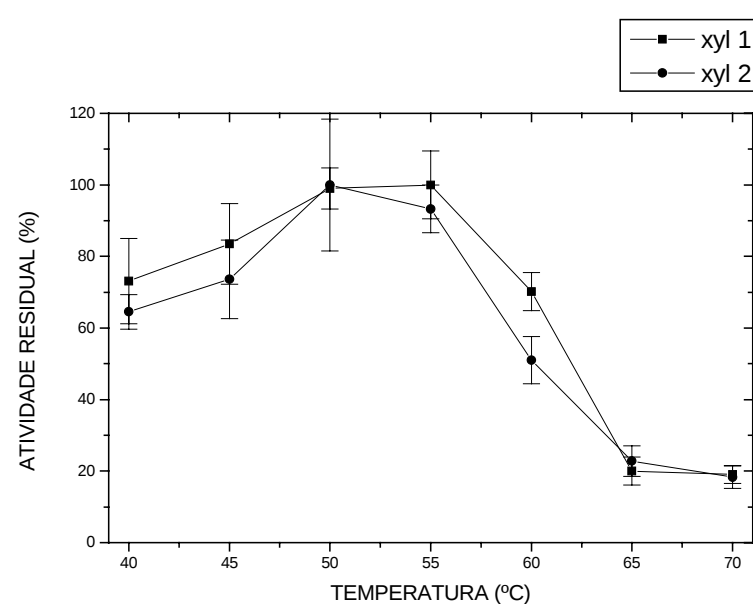
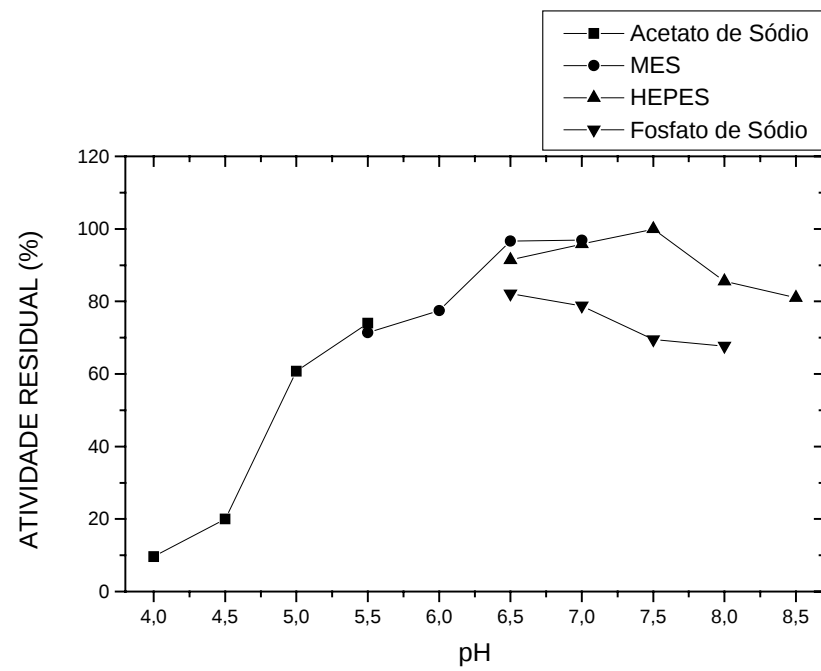
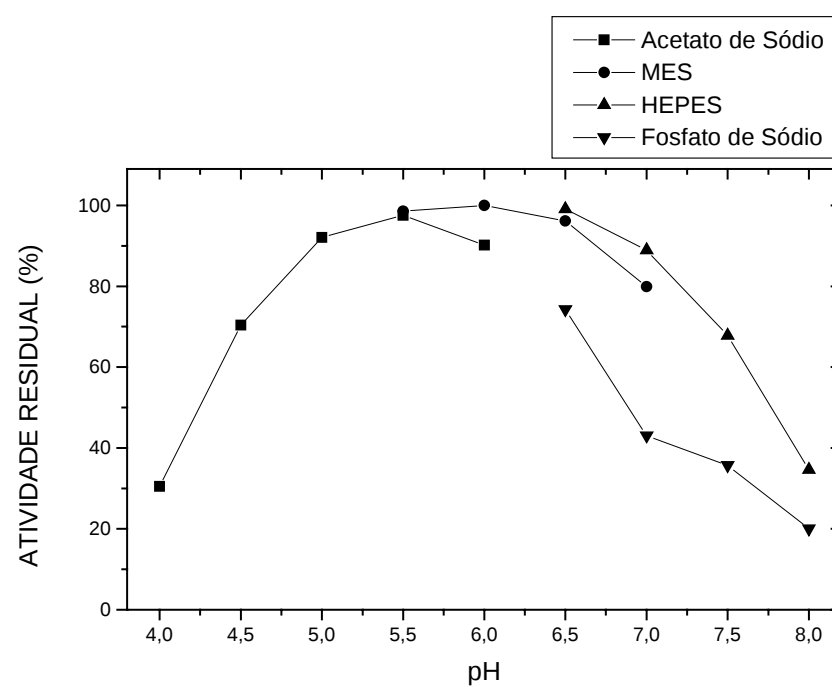


Figura 23 - Efeito da temperatura nas atividades xilanásicas xyl 1 e xyl 2.



A



B

Figura 24 – Efeito do pH e da composição de diferentes tampões sobre as atividades xilanásica 1 (A) e xilanásica 2 (B).

4.3.5 ESTABILIDADE TÉRMICA

Xilanases termoestáveis possuem alto interesse industrial, visto que o branqueamento da polpa de celulose deverá ocorrer em altas temperaturas. Desta forma, analisou-se a termoestabilidade das duas formas enzimáticas purificadas na presença ou não de aditivos que poderiam influenciar na termoestabilidade dessas proteínas. Portanto, estes aditivos foram empregados com o objetivo de aumentar o valor do T_{50} das atividades analisadas. Para isso, as enzimas foram incubadas a 55 e 65°C por vários intervalos de tempo e, após estes períodos, determinaram-se às atividades residuais.

Quando incubadas a 55°C, as atividades xilanolíticas presentes no extrato bruto não atingiram 50% de atividade residual nos períodos analisados, ou seja, até 90 minutos. Neste período, a atividade apresentada sofreu redução de apenas 30% na atividade. À 65°C, o valor T_{50} estimado foi de 18 minutos (Figura 25 A).

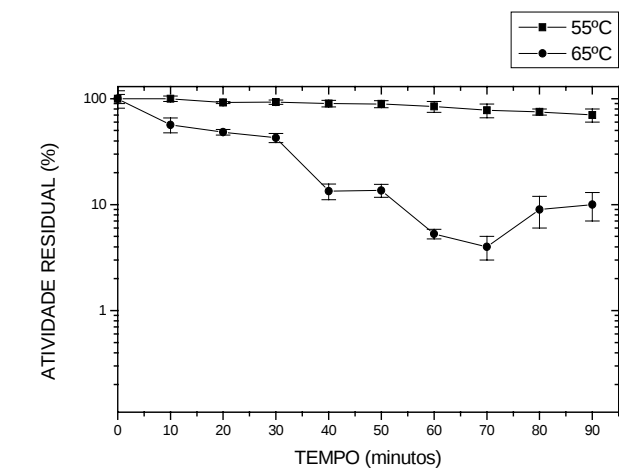
Após a purificação, as duas formas encontradas demonstraram padrões de vida média bem distintos. Pode-se observar na Figura 25 B, que a 55°C a atividade residual da xyl 2 não atinge 50% dentro do período analisado, enquanto que o valor de T_{50} da xyl 1 foi de 27,3 minutos. Na outra temperatura analisada, 65°C, as duas enzimas apresentaram baixa vida média, 2,3 minutos (Figura 25 C).

Como citado acima, a xyl 1 apresentou um valor de T_{50} , a 65°C, de aproximadamente 2,3 minutos. Com a adição de 10% de glicerol, PEG, sorbitol ou trealose houve um aumento de 3,8; 3,6; 2,5 e 1,8 minutos, respectivamente, na vida média desta enzima (Figura 26 A). Além disso, na presença desses compostos a atividade xilanolítica foi prolongada. Sendo glicerol e PEG os melhores protetores, estes foram testados em concentrações mais altas (20 e 30%), como apresentado nas Figuras 26 (B) e 26 (C), respectivamente. Com os dois compostos analisados, pode-se observar que a meia vida da xyl 1 foi maior quando se adicionou 30% de aditivo, onde o valor de T_{50} passou de 2,3, sem aditivo, para 13,2 e 6,7 minutos, na presença de glicerol e PEG, respectivamente.

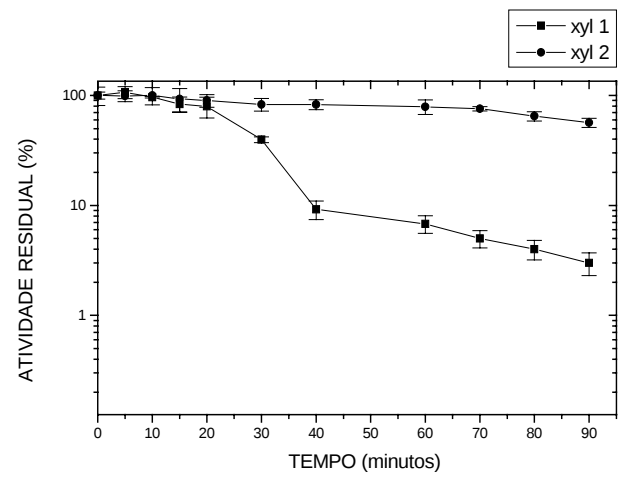
Em relação a xyl 2, as adições de sorbitol e trealose 10% incrementaram em menor valor a termoestabilidade da enzima. Ao contrário do observado com glicerol e PEG, onde houve aumento de 4,6 e 3,5 minutos no valor de T_{50} (Figura 27 A). Sendo assim, testou-se glicerol e PEG em concentrações de 20 e 30% (Figuras 27 B e C). O melhor resultado foi obtido nas reações contendo 30% dos aditivos, sendo que na

presença de glicerol o valor estimado de T_{50} foi de 32,6 e com PEG 21,4 minutos. Os resultados das Figuras 26 e 27 estão resumidos na Tabela 19.

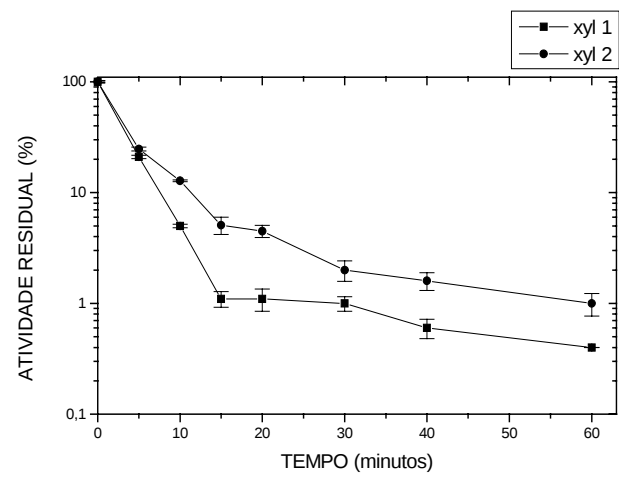
As atividades xilanásicas permaneceram praticamente constantes por 45 dias a temperatura ambiente, além disso, o valor de T_{50} estimado quando as amostras permaneceram na geladeira foi de aproximadamente 4 meses para ambas as enzimas. Foi observado também que não ocorreu diminuição das atividades quando as enzimas foram congeladas.



A



B



C

Figura 25 - Estabilidade térmica das xilanases extracelulares presentes no extrato bruto (A) e purificadas. As amostras purificadas dos picos 1 e 2 foram incubadas a 55°C (B) e 65°C (C) por diferentes períodos. As atividades residuais foram determinadas nas condições ótimas de cada enzima.

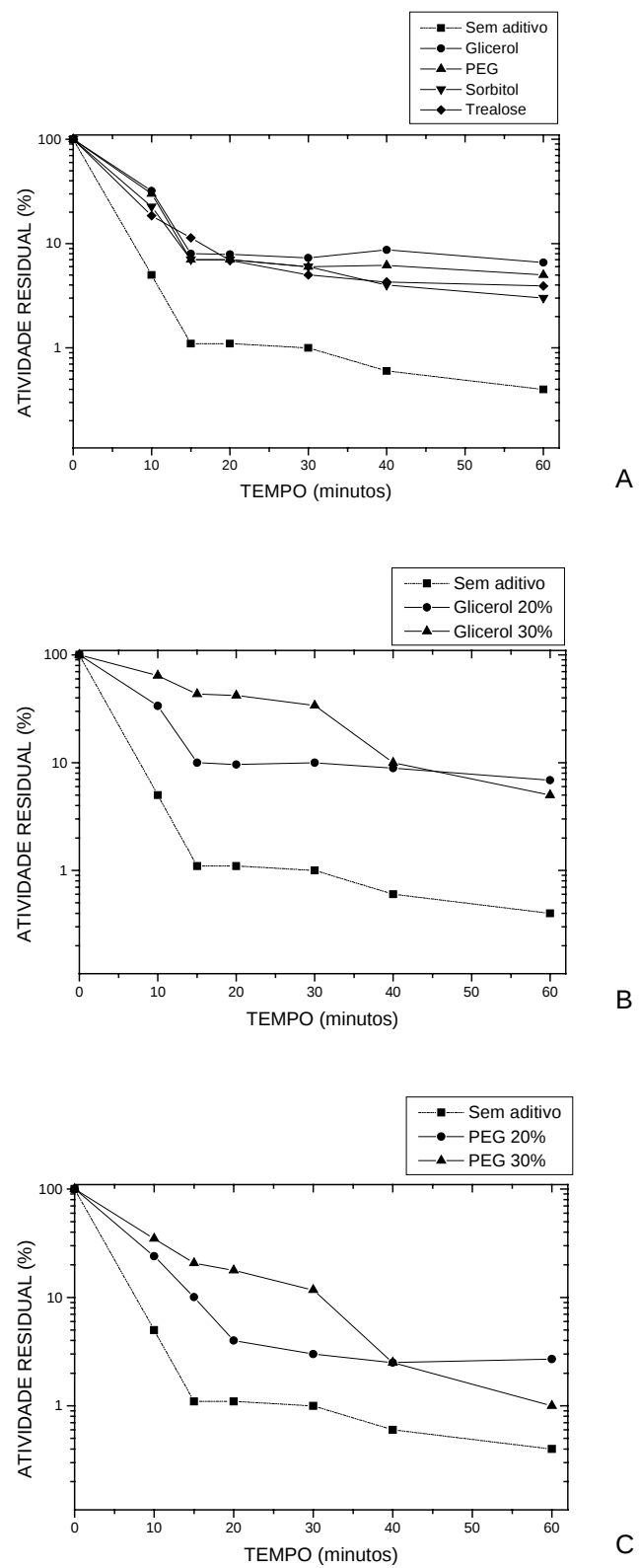


Figura 26 - Efeito da adição de aditivos na termoestabilidade da xyl 1 a 65°C. As atividades residuais foram detectadas em condições ótimas. Em A estão apresentadas as atividades residuais na presença de 4 diferentes aditivos a 10%, em B na presença de glicerol 20 e 30% e, em C, na presença de PEG 20 e 30%.

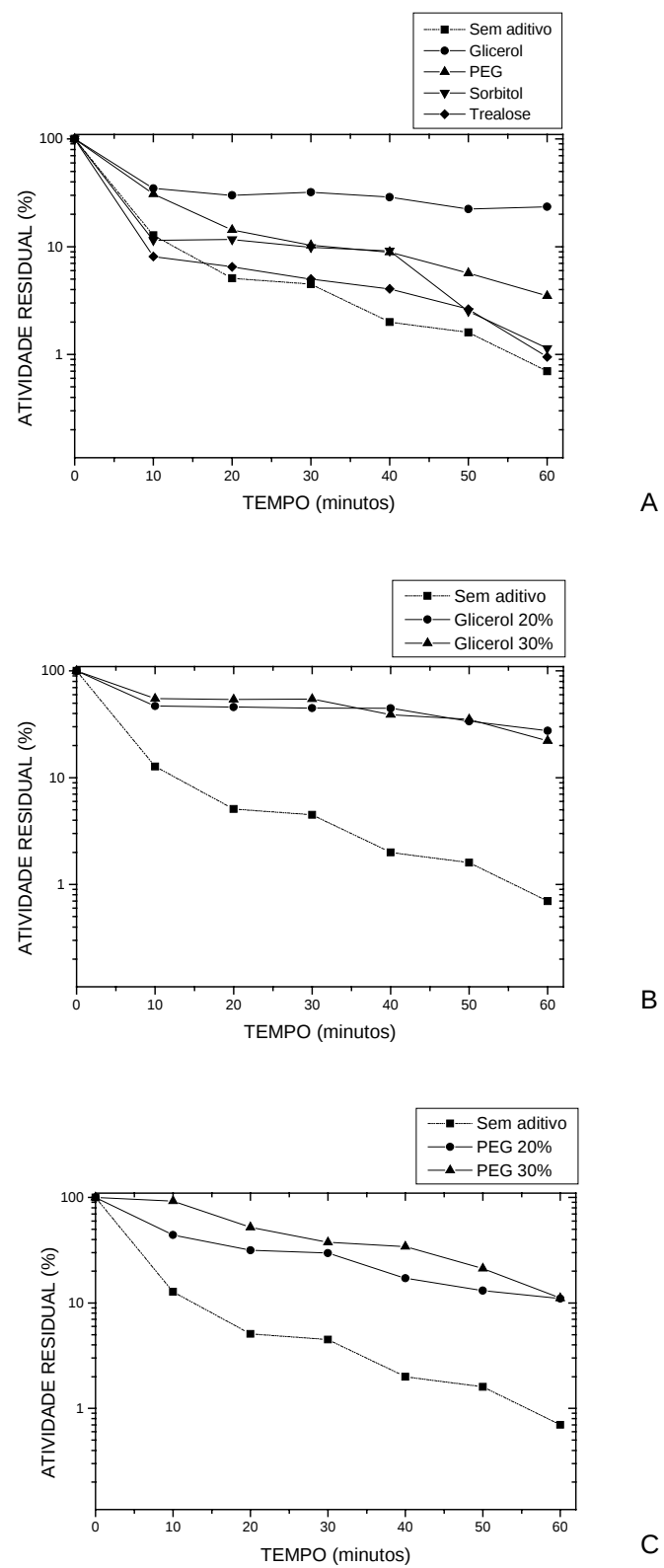


Figura 27 - Efeito da adição de aditivos na termoestabilidade da xyl 2 a 65°C. As atividades residuais foram detectadas em condições ótimas. Em A estão apresentadas as atividades residuais na presença de 4 diferentes aditivos a 10%, em B na presença de glicerol 20 e 30% e, em C, na presença de PEG 20 e 30%.

Tabela 19 – Efeito da presença de aditivos nas termoestabilidades da xyl 1 e da xyl 2, a 65°C

Composto	Concentração (%)	T ₅₀ (minutos)	
		xyl 1	xyl 2
<i>Sem aditivo</i>	-	2,3	2,3
<i>Glicerol</i>	10	6,1	6,9
<i>PEG</i>	10	5,9	5,8
<i>Sorbitol</i>	10	4,8	3,1
<i>Trealose</i>	10	4,1	2,7
<i>Glicerol</i>	20	6,4	9,5
<i>Glicerol</i>	30	13,2	32,6
<i>PEG</i>	20	4,9	8,2
<i>PEG</i>	30	6,7	21,4

As atividades residuais foram detectadas em condições ótimas de cada enzima.

4.3.6 ESTABILIDADE AO pH

Alíquotas das xilanases purificadas 1 e 2 foram adicionadas na proporção de 1:1 em tampões Bis-Tris pHs 8,0, 8,5 e 9,0 e TAPS pH 10,0. As misturas foram incubadas a 55°C por vários intervalos de tempo e após estes períodos determinaram-se as atividades residuais.

Pode-se observar na Figura 28, que o aumento do pH acarreta na diminuição da estabilidade enzimática. Assim como ocorrido com a estabilidade à temperatura, a xyl 2 é mais estável ao pH.

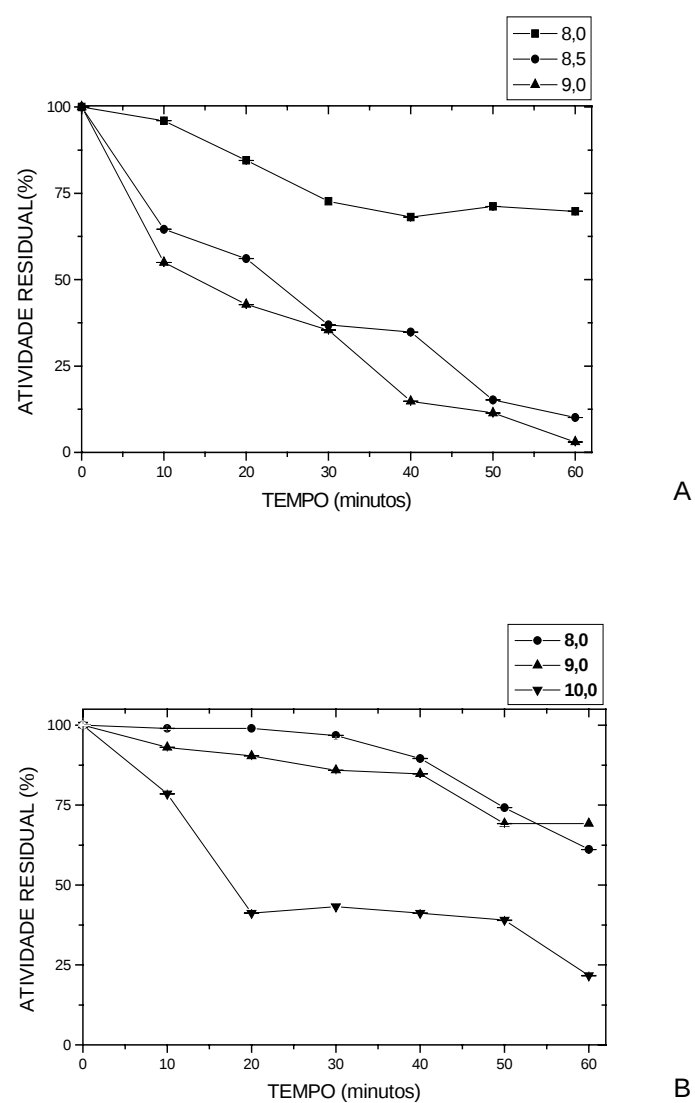


Figura 28 – Estabilidades das xilanases ao pH. Em (A) e (B) estabilidade da xyl 1 e 2, respectivamente.

4.3.7 EFEITO DE ÍONS METÁLICOS, EDTA E β -MERCAPTOETANOL NAS ATIVIDADES XILANÁSICAS EXTRACELULARES

O efeito da adição de íons metálicos, em concentração final de 1mM, sobre as atividades xilanásicas extracelulares foi investigado. Este experimento foi realizado em condições de pH e temperaturas ótimas de cada forma (xyl 1 e xyl 2).

Na Tabela 20 estão apresentadas as atividades residuais observadas. A adição dos compostos HgCl_2 , CuSO_4 , NaCl e MgSO_4 inibiu ambas as atividades xilanólíticas, enquanto que MnCl_2 , MgCl_2 e AlCl_3 inibiram, em média, 20% apenas a xyl 1. Em relação a CaCl_2 , ZnCl_2 , HgCl_2 e CuSO_4 , observou-se uma discrepância entre os valores das atividades residuais da xyl 1 e 2. Com isso, foram analisadas outras concentrações (0,25 – 2,0 mM) desses compostos, com o objetivo de demonstrar os padrões de atividade das duas enzimas frente a esses íons (Figura 29 e Tabela 20).

Na presença de CaCl_2 , ZnCl_2 e CuSO_4 (Figura 29) observou-se grande diferença entre as atividades xilanásicas, como na adição de 2 mM de CaCl_2 onde a atividade da xyl 1 foi inibida em 75% enquanto que não houve inibição significativa na atividade da xyl 2. A presença do íon HgCl_2 (Figura 29 D) afetou, mesmo em baixas concentrações as atividades das duas formas, principalmente da xyl 1. Por exemplo, 0,25 mM deste íon reduziu a atividade da xyl 1 em 96% e da xyl 2 em apenas 30%, demonstrado, além da grande diferença entre as atividades das enzimas, que essas são dependentes da concentração do íon. Além disso, observou-se que após uma certa concentração de íon, as atividades residuais permanecem constantes. Por exemplo, na presença de ZnCl_2 1 mM as atividades residuais da xyl 1 e 2 foram de 28 e 84%, respectivamente, sendo que estas permanecem praticamente constantes até 2 mM.

Nenhum íon avaliado estimulou a atividade xilanásica da xyl 1, a maioria a inibiu, mesmo em baixíssima concentração, sendo o NH_4Cl o único a não alterar sua atividade. Em relação a xyl 2, não houve reduções tão drásticas quanto para xyl 1, além disso, houve estímulo da atividade na presença 1mM de NH_4Cl (33% , Tabela 20) e 0,25 mM de CuSO_4 (8%, Figura 29). A adição de EDTA não afetou significativamente as atividades das enzimas, enquanto que a presença de β -mercaptoetanol estimulou a atividades de ambas as enzimas (Tabela 21). Os aumentos máximos das atividades foram de 59% e 100% para xyl 1 e 2, respectivamente.

Tabela 20 – Efeito da adição de íons nas atividades xilanásicas purificadas (xyl 1 e xyl 2)

Íons (1 mM)	ATIVIDADE RELATIVA (%)	
	xyl 1	xyl 2
<i>HgCl₂</i>	0,0	11,3
<i>NH₄Cl</i>	101,0	133,0
<i>CaCl₂</i>	28,6	91,3
<i>ZnCl₂</i>	29,8	89,5
<i>BaCl₂</i>	51,5	89,0
<i>CuSO₄</i>	14,1	75,7
<i>NaCl</i>	72,1	81,0
<i>MgSO₄</i>	75,9	84,6
<i>MnCl₂</i>	76,6	97,9
<i>MgCl₂</i>	81,8	93,0
<i>AlCl₃</i>	80,7	102,1
<i>CoCl₂</i>	90,9	103,0
<i>Controle</i>	100,0	100,0

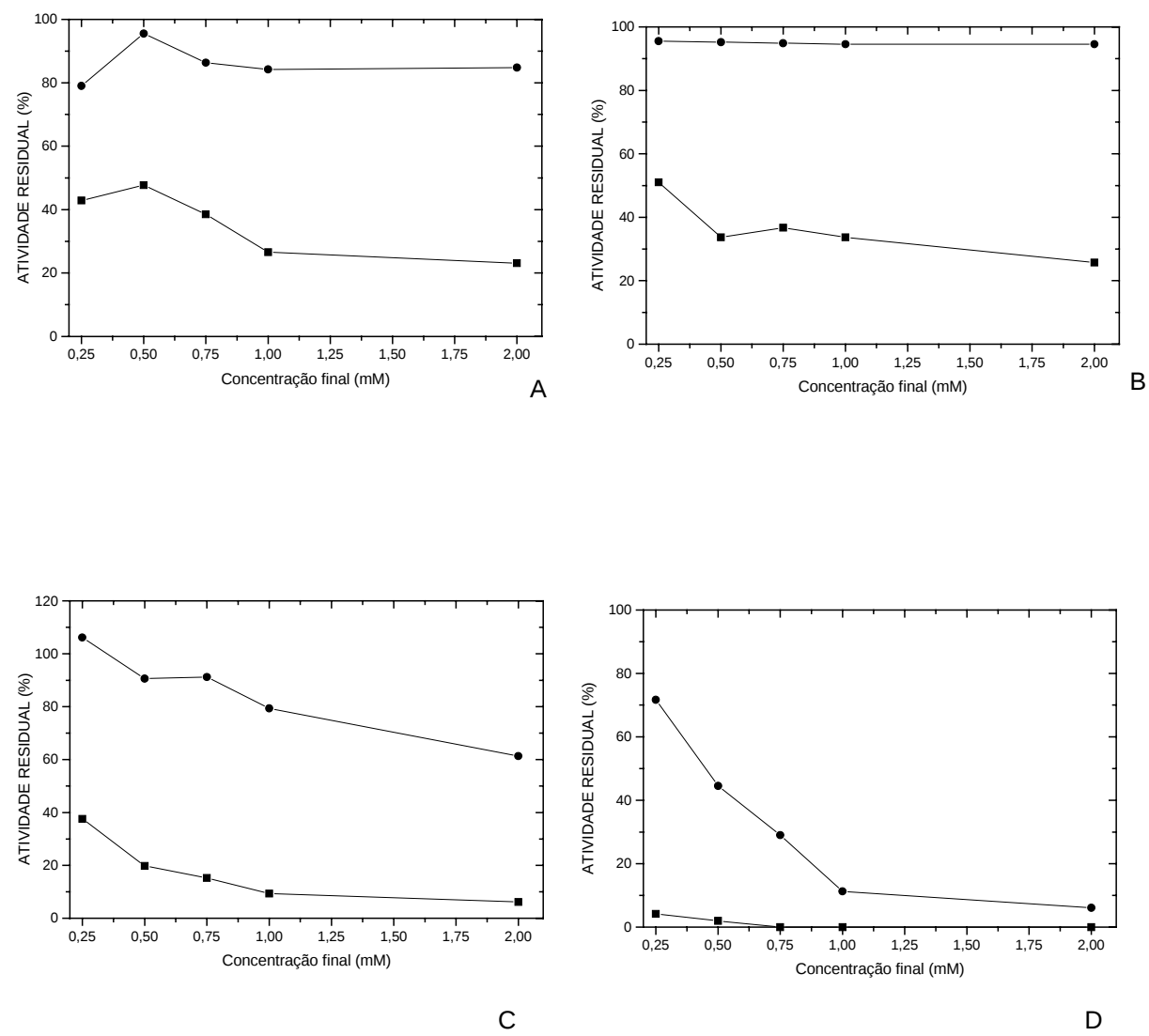


Figura 29 – Efeito da adição de íons sobre a atividade xilanásica da xyl 1 (■) e xyl 2 (●). Em (A) adição de ZnCl₂; (B), CaCl₂; (C), CuSO₄ e em (D), HgCl₂. Como 100% foi considerada a atividade xilanásica obtida no ensaio isento de íons adicionados.

Tabela 21 – Efeito da adição de β -mercaptoetanol e EDTA nas atividades xilanásicas xyl 1 e xyl 2

ATIVIDADE RELATIVA (%)		
β -mercaptoetanol (mM)	xyl 1	xyl 2
0,10	92	136
0,25	108	198
0,50	104	202
0,75	90	174
1,00	100	171
1,25	102	200
1,50	104	197
5,00	117	145
10,0	147	138
15,0	152	162
20,0	159	152
EDTA (mM)		
0,10	99	91
0,25	90	113
0,50	97	115
0,75	96	97
1,00	98	99
1,25	96	114
1,50	95	112
Controle	100	100

As atividades relativas foram analisadas nas condições ótimas de cada enzima.

4.3.8 ESPECIFICIDADE AOS SUBSTRATOS DAS XILANASES EXTRACELULARES PURIFICADAS

A fim de determinar as especificidades das enzimas xyl 1 e xyl 2 foram realizadas reações enzimáticas na presença de diferentes substratos naturais ou sintéticos. Observa-se na Tabela 22, que as enzimas foram capazes de hidrolisar apenas xilana birchwood e oat spelt, os outros substratos compostos por ligações β -1,4, não foram hidrolisados. As atividades específicas da xyl 1 foram 6,6 e 12,1 vezes maiores que as da xyl 2 na presença de xilana oat spelt e birchwood, respectivamente.

Tabela 22 – Especificidade das xilanases purificadas (xyl 1 e 2)

Substrato 1%	Atividade Específica	
	Xyl 1	Xyl 2
<i>Papel Filtro</i>	ND	ND
<i>CM-Celulose</i>	12	ND
<i>Xilana Oat Spelt</i>	806	121
<i>Xilana Birchwood</i>	1236	102
<i>Salicina</i>	ND	ND
<i>PNP-Xil</i>	ND	ND
<i>PNP -Arabinofuranosídeo</i>	ND	ND
<i>PNP-Glu</i>	ND	ND
<i>PNP-Gal</i>	ND	ND

ND – atividade não detectada pelo método utilizado

Substratos: CM-Celulose, carboximetil celulose; PNP – Xil , *p*-nitrofenil-xilopiranosídeo; PNP-Glu, *p*-nitrofenil-glucopiranosídeo; PNP-Gal, *p*-nitrofenil-galactosídeo; e PNP-Arabinofuranosídeo, *p*-nitrofenil-arabinofuranosídeo.

4.3.9 ESTUDO CINÉTICO DAS XILANASES EXTRACELULARES PURIFICADAS

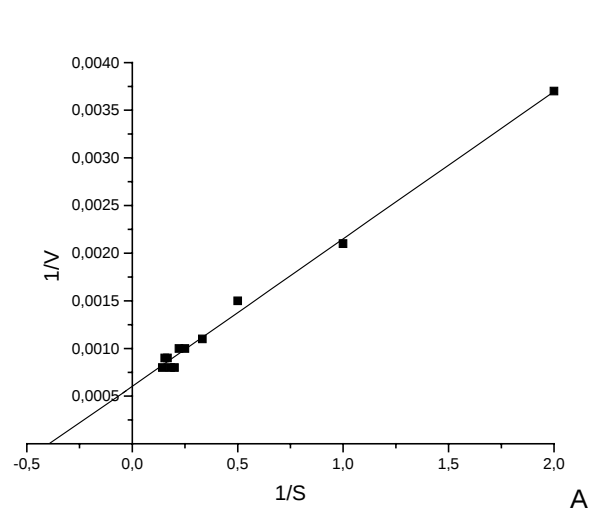
A determinação das constantes cinéticas, K_m (mg/mL) e $V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{i}na}^{-1}$), foram realizadas para as duas formas purificadas na presença de xilana birchwood, com ou sem a adição de β -mercaptoetanol, nas condições ótimas de cada enzima (Tabela 23, Figura 30).

Em relação aos valores de K_m s das enzimas, a xyl 1 apresentou maior afinidade aparente do que a xyl 2, no entanto, quando foi adicionado β -mercaptoetanol, xyl 2 passou a ter maior afinidade. Em todas as condições avaliadas, a xyl 1 apresentou as maiores velocidades máximas, principalmente na presença de β -mercaptoetanol.

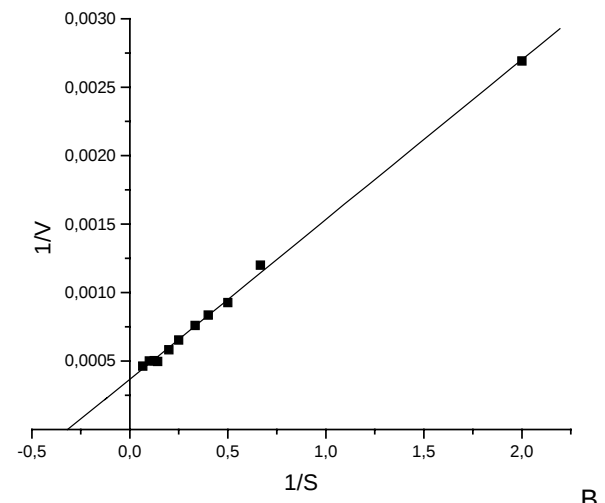
Tabela 23 – Constantes cinéticas das xilanases 1 e 2 purificadas

	Método	Birchwood		Birchwood*	
		Xyl 1	Xyl 2	Xyl 1	Xyl 2
K_m	<i>Lineweaver & Burk</i>	2,5	3,9	2,9	1,9
	<i>Hanes</i>	2,6	3,4	2,6	1,7
$V_{m\acute{a}x}$	<i>Lineweaver & Burk</i>	1679	113	2728	133
	<i>Hanes</i>	1638	93	2657	130
Eficincia Cataltica	<i>Lineweaver & Burk</i>	671,6	29,0	940,0	70,0
	<i>Hanes</i>	630,0	27,3	1021,9	76,5

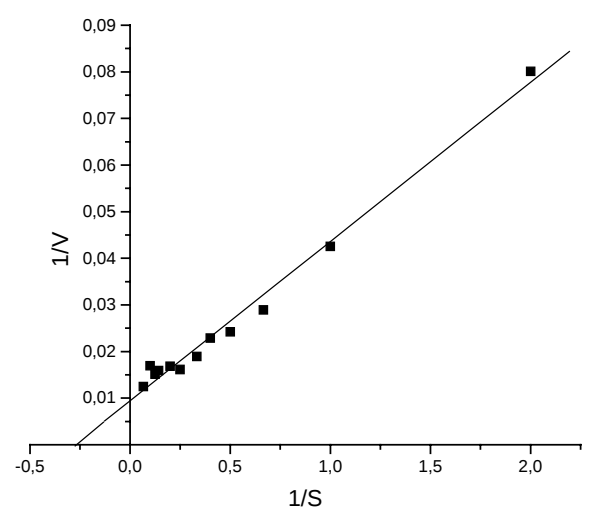
* Adição de 10 mM de β -mercaptoetanol



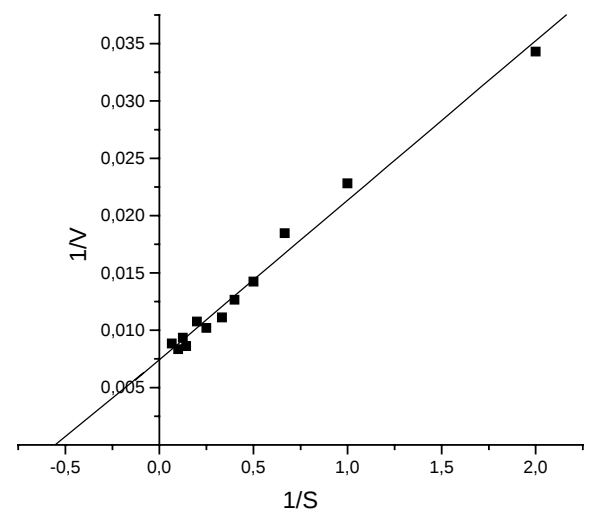
A



B



C



D

Figura 30 - Representações gráficas de Lineweaver-Burk para as xilanases purificadas, xyl 1/xyl 2 sem (A/C) e com (B/D) adição de β -mercaptoetanol.

4.4 BIOBRANQUEAMENTO DA POLPA DE CELULOSE

O objetivo desse experimento foi avaliar o efeito das atividades xilanásicas secretadas por *Aspergillus caespitosus* no biobranqueamento e na viscosidade de polpas de celulose provenientes das Companhias Bahia Sul Celulose e Celulose Papel Votorantin (CELPAV). Também foi estudada a influência de algumas variáveis deste processo, como pH e temperatura das polpas e a quantidade de enzima (U) por grama de polpa.

Os parâmetros avaliados que indicaram o efeito do biobranqueamento da polpa de celulose foram: 1) determinação do número kappa, o qual corresponde ao teor de lignina da polpa; 2) leituras espectrofotométricas, a 237 e 270 nm, dos filtrados obtidos das lavagens das polpas após incubação com a enzima, além da polpa controle (sem adição de xilanases). As absorvâncias obtidas nestes comprimentos de onda indicaram o quanto de cromóforos, proveniente da degradação da lignina e/ou dos carboidratos da polpa, foram removidos; 3) leitura espectrofotométrica dos filtrados a 465 nm. A este comprimento de onda determinou-se o quanto da cor marrom da polpa, provenientes da degradação de carboidratos durante o cozimento Kraft, havia sido removido com a adição das enzimas. Pesquisadores têm assumido que a cor das polpas Kraft é atribuída a lignina residual, entretanto existe uma outra hipótese onde esta cor é originada da degradação dos carboidratos da polpa. Os comprimentos de ondas utilizados foram sugeridos por Patel e colaboradores (1993).

O primeiro passo desse experimento foi testar qual das duas polpas de celulose seria mais susceptível a ação das xilanases presentes nos extratos brutos obtidos de fermentações submersas (FSM) ou semi-sólidas (FSS) suplementadas com BCA ou FT, ou das purificadas, xyl 1 e xyl 2. Como pode ser observado na Tabela 24 – 25, em ambas as polpas os melhores resultados foram obtidos com aquelas que haviam sido tratadas com o extrato bruto proveniente de FSM suplementadas com FT, sendo o melhor resultado, diminuição de 20% do número kappa, com a polpa da Bahia Sul Celulose. Além disso, pode-se observar que o tratamento das polpas com extratos brutos provenientes das FSS não favoreceram o biobranqueamento das polpas. Em relação as duas formas purificadas, o tratamento com xyl 2 apresentou resultado mais satisfatório se comparado ao tratamento com a xyl 1 (Tabela 25).

Na mesma Tabela, nota-se uma relação, não proporcional, entre o aumento das absorvâncias obtidas e a redução do número kappa. Além disso, em todos os casos avaliados houve aumento das viscosidades das polpas em relação à polpa controle.

Tabela 24 – Efeito da adição de xilanases provenientes de FSM no biobranqueamento e na viscosidade de polpas de celulose

Parâmetros	Polpa					
	Bahia Sul Celulose			CELPAV		
	Controle	BCA	FT	Controle	BCA	FT
<i>Nº Kappa</i>	11,64 (10,77) ^a	10,21 (10,16)	9,31 (10,05)	11,95 (11,11)	11,49 (10,75)	10,63 (10,57)
<i>Abs 237</i>	0,0665	0,1046	0,1057	0,0344	0,0665	0,1379
<i>Abs 270</i>	0,5981	0,8104	0,8993	0,3665	0,6711	0,8912
<i>Abs 465</i>	0,0427	0,0657	0,0934	0,0402	0,0682	0,1273
<i>Viscosidade (cP)</i>	32,74	33,23	33,69	26,40	31,72	29,52
<i>Redução (%)</i>		12,3	20,0		3,8	11,0
<i>Nº Kappa</i>		(5,7)	(6,7)		(3,2)	(4,9)

Foram adicionadas, a 10 g de polpa da Bahia Sul Celuloses ou da CELPAV, 100 U de xilanases provenientes de FSM, suplementadas com BCA ou FT, com exceção do controle, onde se adicionou água na lugar da enzima. Esta mistura foi incubada a 55°C, pH 6,0 – 6,5, por 2 horas.

a – Número kappa determinado após extração alcalina.

Tabela 25 – Efeito da adição de xilanases provenientes de FSS no biobranqueamento e na viscosidade de polpas de celulose

Parâmetros	Controle	FSS		Purificadas	
		BCA	FT	Xyl 1	Xyl 2
<i>Nº Kappa</i>	11,9 (12,3) ^a	12,2 (11,7)	11,8 (11,4)	11,7	10,4
<i>Abs 237</i>	0,0665	0,0665	0,0665	0,0723	0,1138
<i>Abs 270</i>	0,4144	0,5361	0,5782	0,6205	0,8016
<i>Abs 465</i>	0,0356	0,0539	0,0563	0,0718	0,0813
<i>Viscosidade (cp)</i>	35,9	37,5	39,5	38,6	42,5
<i>Redução (%)</i>		0	0,84		
<i>Nº Kappa</i>		(4,87)	(7,32)	1,68	12,6

Foram adicionadas, a 10 g de polpa da Bahia Sul Celuloses, 100 U de xilanases provenientes de FSS, suplementadas com BCA ou FT, ou purificadas, com exceção do controle, onde se adicionou água na lugar da enzima. Esta mistura foi incubada a 55°C, pH 6,0 – 6,5, por 2 horas.

a – Número kappa determinado após extração alcalina.

A etapa seguinte foi avaliar a quantidade de enzima, em unidades (U), adicionadas por grama de polpa de celulose. Para isto, foram utilizados a polpa Bahia Sul Celulose e o extrato obtido da FSM contendo FT, pois como já demonstrado (Tabelas 24 – 25) apresentaram os melhores resultados. Além disso, a partir desta etapa, após tratamento com xilanases, não foram mais realizadas extrações alcalinas das polpas, visto que esse processo não acarretou em uma diminuição significativa do número kappa. A extração alcalina foi realizada uma vez que em alguns trabalhos este passo mostrou-se essencial para evidenciar a redução do teor de lignina da polpa.

Primeiramente, pode-se observar, na Tabela 26, que a adição de xilanases, independente da concentração adicionada, acarretou na remoção de compostos aromáticos e da cor da polpa, indicada pelo aumento das absorbâncias a 237-270 e 465 nm, respectivamente. Em relação ao número kappa, o melhor resultado, com diminuição de 21,3%, foi obtido no ensaio no qual foi adicionado 12 U de enzima por g de polpa, seguido pelo ensaio contendo 9 U/g, com redução de 20,2%. Novamente, nota-se a relação entre o aumento das absorbâncias, a redução do número kappa e aumento da viscosidade com a adição das xilanases.

Tabela 26 – Efeito da adição de diferentes doses de xilanases por grama de polpa de celulose

U/g Polpa	Abs 237 nm	Abs 270 nm	Abs 465 nm	Nº Kappa	Viscosidade (cP)
Controle	0,0723	0,5253	0,0492	11,72	35,2
3	0,0869	0,6890	0,0566	10,69	34,2
6	0,0872	1,0812	0,0880	10,18	38,1
9	0,1038	0,8880	0,1157	9,35	37,4
12	0,1258	0,8336	0,1493	9,22	36,4

Foram adicionadas, a 10 g de polpa da Bahia Sul Celuloses, 0 – 120 U de xilanases provenientes de FSM suplementada com FT, com exceção do controle. Esta mistura foi incubada a 55°C, pH 6,0 – 6,5, por 2 horas.

O processo de produção do papel, como já citado, é realizado em altas temperaturas e pH alcalinos. Sendo assim, testou-se o efeito da adição do extrato bruto da FSM suplementada com FT em polpa: incubadas a 55 - 65°C em pHs 6,0 – 6,5 a 8,0 – 8,15 (Tabela 27).

Pode-se observar que em todas as condições avaliadas (Tabela 27), a adição de xilanases provocou diminuição do número kappa das polpas e aumento das absorbâncias a 237-270 e a 465 nm. Nota-se que o aumento da temperatura e do pH acarretou na diminuição das viscosidades, em relação aos respectivos controles, e na maior liberação dos compostos aromáticos e da cor das polpas, entretanto este aumento também foi observado nas polpas controles.

Tabela 27 – Variação do pH e da temperatura das polpas

Variável	Abs 237 nm	Abs 270 nm	Abs 465 nm	Nº Kappa	Viscosidade (cP)
<i>Controle^a</i>					
	0,0719	0,5553	0,0434	11,50	35,2
<i>Tratada</i>					
	0,1157	0,9331	0,0931	9,61	38,1
<i>Controle^b</i>					
	0,1046	0,6628	0,0743	10,67	36,2
<i>Tratada</i>					
	0,1600	1,1445	0,1456	9,13	32,9
<i>Controle^c</i>					
	0,0723	0,7400	0,0775	10,97	37,4
<i>Tratada</i>					
	0,1598	1,0042	0,1235	9,35	36,5

Controles: polpas sem tratamento xilanolítico

Tratadas: polpas com tratamento prévio de 100 U de xilanases provenientes do extrato bruto de FSM suplementadas com FT.

Controles: a – pH da polpa igual a 6,0 e temperatura de incubação a 55°C;

b – pH da polpa igual a 8,0 e temperatura de incubação a 55°C;

c – pH da polpa igual a 6,0 e temperatura de incubação a 65°C.

5. DISCUSSÃO

5.1 CONDIÇÕES MAIS FAVORÁVEIS À PRODUÇÃO XILANÁSICA EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Vários estudos de otimização da produção e atividade xilanásica têm sido realizados. Nestes, variam-se parâmetros como: tempo e temperatura de cultivo, composição do meio, fonte de carbono e pH (Castro *et al.*, 1997; Kadowaki *et al.*, 1997; Levin & Forchiassin, 1998; Damaso *et al.*, 2000).

Inicialmente, foi realizada neste trabalho a padronização das condições de cultivo a fim de otimizar a produção xilanásica pelo fungo *Aspergillus caespitosus*. O primeiro passo foi à seleção do meio de cultivo. Observou-se que os meios SR e Khanna foram os que mais favoreceram a atividade enzimática extracelular, no entanto, o primeiro foi o escolhido por apresentar maior atividade xilanásica total (intracelular e extracelular). Neste trabalho atentou-se mais à atividade extracelular, visto que em processos industriais a necessidade de lise celular para obtenção do produto encarece, em muito, o preço final. Em relação a temperatura ótima de ensaio, a máxima atividade xilanásica extracelular, presente no extrato bruto, foi detectada em uma faixa de 50 – 60°C.

Foram analisados também, os níveis de atividade xilanásicas frente a diferentes fontes de carbono adicionadas ao meio de cultura. Observou-se que a atividade xilanólítica é predominantemente extracelular, visto que os níveis detectados nos filtrados dos meios de culturas foram muitos maiores aos intracelulares. As máximas atividades xilanólíticas foram observadas na presença de xilana, indicando que as xilanases foram induzidas por este substrato.

Esses resultados estão de acordo com Biely (1985). Segundo este autor, a xilana forma uma matriz insolúvel que é muito grande para ser transportada para o interior da célula, necessitando de um sinal extracelular para desencadear a produção de enzimas xilanólíticas. Portanto, endoxilanases no meio extracelular degradariam a xilana em oligossacarídeos e estes entrariam na célula induzindo a síntese de enzimas do complexo xilanolítico. As induções de xilanase por xilana também foram observadas em *Aspergillus terreus* (Hrmová *et al.*, 1989), *Aspergillus tubigensis* (De Graaff *et al.*, 1994) e *Aspergillus nidulans* (Fernández – Espinar *et al.*, 1994).

Além disso, pode-se observar níveis constitutivos da enzima mesmo nos meios contendo fontes de carbono facilmente metabolizáveis, como glicose. A presença de

enzimas constitutivas foi detectada também por Levin & Forchiassin (1998) e Kadowaki *et al.* (1997).

Aproximadamente 30 – 40% dos custos da produção de muitas enzimas industriais deve-se aos dos substratos utilizados nos meios de cultivo. O uso de substratos de baixo custo para produção dessas enzimas permite uma redução significativa no valor desses produtos. Sendo assim, resíduos agroindustriais são freqüentemente empregados.

Com essa finalidade, cultivou-se o microrganismo em vários materiais lignocelulósicos. As máximas atividades foram observadas nas culturas contendo FT ou BCA. Segundo Souza (2001), a composição do FT apresenta em média 30, 37 e 14% de hemicelulose, celulose e proteína respectivamente. Essas mesmas estruturas são responsáveis por aproximadamente 32, 40 e 2% da parede celular do BCA. Em relação à lignina, BCA apresenta em sua composição aproximadamente o dobro do valor encontrado em FT. O cultivo de *Aspergillus ssp* sob BCA foi analisado também por Biswas *et al.* (1988) e Gutierrez – Correa & Tengerdy (1998) e sob FT por Poutanen *et al.* (1987), Bailey & Poutanen (1989), Chandra Raj & Chandra (1995) e Kadowaki *et al.* (1997). Os outros compostos testados, apesar de apresentaram em sua constituição altos níveis de hemiceluloses, não induziram tão bem a atividade xilanásica.

A eficiência da produção enzimática e do crescimento do microrganismo cultivado em substratos complexos, como os testados neste trabalho, deve-se ao efeito de vários fatores que se combinam tais como: acessibilidade ao substrato, quantidade de xilooligossacarídeos e razão na qual a concentração de xilose é liberada, podendo agir estimulando ou, como na maioria das vezes, inibindo a síntese enzimática (Kulkarni, 1999). Em relação ao pH final do filtrado frente as diferentes fontes de carbono, pode-se notar que a presença de compostos complexos ou a ausência de fonte de carbono provocou alcalinização do meio se comparado aos pHs finais dos filtrados obtidos das culturas contendo compostos prontamente fermentáveis, indicando provavelmente que a presença destes reprimem a secreção de compostos pela célula que levam a alcalinização do meio ou estimulou a secreção de compostos ácidos, como o ácido cítrico.

Dessa forma, optou-se por trabalhar com meios contendo FT ou BCA, pois são encontrados em grande escala e a baixos custos. No Brasil, por exemplo, BCA é o maior resíduo da agroindústria, sendo que na safra 99/00 cerca 91,8 milhões de toneladas foram obtidos (S.I.E., 2002). Este resíduo vem sendo utilizado nas próprias

indústrias canavieiras com fonte energética nos processos de aquecimento das caldeiras. Além disso, é utilizado como matéria-prima na indústria do papel, na fabricação de aglomerados e em rações animais. Em relação ao FT, o Brasil consome hoje 7,7 milhões de toneladas de trigo, dos quais 76% (5,85 milhões de toneladas) são transformadas em farinha e 24% (1,84 milhão de toneladas), em farelo (A.B.I.R., 2002).

A fonte de nitrogênio ideal às culturas suplementadas com BCA ou FT foi a peptona, nas concentrações de 0,1 e 0,25% (p/v), respectivamente. Sob estes dois substratos (BCA ou FT), observou-se que nos meios suplementados com fontes de nitrogênio inorgânicas e naqueles meios onde não houve adição de fontes de nitrogênio, os valores dos pHs finais dos filtrados não sofreram alterações como as observadas com as fontes orgânicas. Essa manutenção, ou acidificação em alguns casos, dos pHs finais dos filtrados poderia estar sendo causada por um excesso de prótons intracelulares que foram bombardeados para o meio extracelular. Estes prótons seriam gerados durante a síntese de alguns aminoácidos, visto que o microrganismo deveria sintetizá-los pela ausência destes no meio de cultivo (Silva *et al.*, 2001). Uma explicação para alcalinização dos pHs finais dos filtrados das culturas suplementadas com fontes de nitrogênio orgânicas seria a ação de proteases, induzidas pela presença de proteínas extracelulares, como as encontradas no extrato de levedura, que hidrolisariam essas proteínas, liberando aminoácidos que seriam posteriormente metabolizados levando a formação de amônio.

Em relação ao crescimento do fungo, os maiores valores foram obtidos nas culturas suplementadas com FT, indicando que este substrato proporciona maior desenvolvimento ao fungo, ou que a xilana é mais acessível à ação xilanolítica. No entanto, com esta fonte de carbono ocorre maior secreção de proteínas, indicado pelas atividades xilanásicas específicas, dificultando o processo de purificação enzimática.

Para os dois substratos analisados, tanto as culturas suplementadas com compostos orgânicos quanto com inorgânicos, com exceção de acetato de amônio e uréia, as atividades xilanásicas extracelulares apresentaram valores semelhantes. No entanto, quando analisou-se as atividades xilanásicas específicas, os valores foram muito maiores nas culturas contendo fontes de nitrogênio inorgânicas, pois nestas a secreção de proteínas foi menor. Possivelmente, a presença de fontes de nitrogênio orgânicas induz maior produção e secreção xilanásica pelo fungo, pois auxilia no seu crescimento por se tratar tanto de uma fonte de nitrogênio quanto de carbono, no entanto, provavelmente, nestas culturas a atividade proteolítica é maior, além do mais,

como já citado, o pH final destas é altamente alcalino podendo provocar inativação xilanásica, cujo pH ótimo é 6,5.

O estudo do efeito de fontes de nitrogênio sobre a atividade xilanásica também foi pesquisado por Smith & Wood (1991) e Fernández – Espinar *et al.* (1994). Estes pesquisadores evidenciaram que em muitos fungos, a adição de suplementos de nitrogênio complexos é vantajosa, resultando em uma maior produção xilanásica comparado ao emprego de fontes inorgânicas. Segundo Damaso *et al.* (2000), o uso de fontes inorgânicas como nitrato de sódio, sulfato de amônio, cloreto de amônio, induzem pequenas quantidades de xilanase, enquanto fontes orgânicas levaram a uma alta expressão.

Quando analisou-se a relação entre o pH inicial de cultivo e a fonte de nitrogênio utilizada observou-se padrões de atividade xilanásicos diferentes segundo a fonte de nitrogênio utilizada, sendo que nas culturas suplementadas com BCA e extrato de levedura a atividade máxima xilanásica foi detectada no meio com pH inicial 3,0. Segundo Bailey & Viikari (1993), foi relatado que um pré-requisito para alta produção xilanásica por *Aspergillus fumigatus* foi manter um baixo pH com o intuito de inibir a atividade proteolítica. Altas quantidades de proteases foram formadas durante o crescimento a altos pHs, mas não quando cultivou-se o fungo em pH 3,0. Isto pode explicar o resultado obtido neste trabalho, onde nos meios ácidos a inibição da atividade proteolítica é prolongada, pois apesar destes sofrerem alcalinização, o tempo necessário a esta mudança, e conseqüente indução proteolítica é maior, ou seja, a proteólise enzimática (inativação) é iniciada em um tempo de cultivo maior nestes meios, permitindo uma maior concentração e ação xilanásica.

Em relação à presença de nitrato de amônio, sulfato de amônio ou apenas peptona, o pH inicial mais favorável a atividade xilanásica extracelular foi 7,0, indicando que na presença desses compostos pouca protease é secretada. Nos meios contendo FT, a maior atividade foi detectada naquele suplementado com nitrato de amônio pH 5,0, seguido pelo meio contendo apenas peptona, pH 7,0. De uma maneira geral, pode-se observar nos cultivos suplementados com esse substrato, que com o aumento do pH inicial de cultivo houve diminuição do crescimento fúngico e correspondente aumento dos níveis protéicos extracelulares, indicando uma possível autólise.

O pH inicial de cultivo que proporcionou condições mais favoráveis a atividade xilanásica em culturas suplementadas com BCA e peptona 0,1% (p/v) ou FT e peptona 0,25% (p/v) foram 8,0 e 6,0, respectivamente. O alto pH inicial de cultivo nas culturas contendo BCA deve-se ao fato que muitos fungos quando crescidos em pH não

favoráveis limitam seu crescimento, aumentando os níveis xilanásicos. Segundo proposto por Bailey & Viikari (1993), a produção de xilanase por *Trichoderma reesei* foi favorecida por altos pHs (6,0 - 7,0), apesar do pH de cultivo ótimo ser 4,0. Royer & Nakas (1989) trabalhando com *Trichoderma longibrachiatum*, observaram uma alta produção de xilanase quando o pH inicial do meio foi 7,0. Os autores sugeriram que a este pH, o qual desvia significativamente do pH ótimo da atividade xilanásica, produtos finais de hidrólise são lentamente formados e utilizados. Assim, essas condições resultam em um crescimento limitado, aumentando os níveis de enzimas extracelulares. Uma outra forma de se explicar às altas atividades apresentadas em pHs alcalinos foi apresentado por Purkarthofer *et al.* (1993). Neste trabalho, os pesquisadores demonstraram que mantendo-se o pH 7,5 durante a fermentação de *Thermomyces lanuginosus*, foi vantajoso comparado as culturas com pHs flutuantes ou àquelas com pH controlado a 6,5, correspondente ao pH ótimo da atividade enzimática. Isto foi explicado pela redução na acessibilidade do substrato hemicelulósico. Devido às condições não favoráveis, uma liberação relativamente lenta e a disponibilidade prolongada dos indutores da síntese xilanásicas, prolongam o efeito da indução enzimática.

Os perfis cinéticos das atividades xilanásicas extracelulares em relação à temperatura e tempo de cultivo demonstraram-se diferentes nas culturas suplementadas com BCA ou FT. Nos duas culturas foram detectadas duas fases de atividade, uma em 48 e outra em 120 horas, entretanto em temperaturas de cultivo diferentes.

A presença de duas fases de secreção, com 72 horas de diferença, pode ser explicada de duas formas: i) o declínio entre os dois picos pode ser causado pelo acúmulo de produtos de hidrólise resultando na repressão catabólica da síntese enzimática ou ii) o fungo deve produzir um complexo xilanolítico constituído de dois ou mais componentes. Inicialmente, em 48 horas de cultivo haveria uma síntese máxima xilanásica com hidrólise da xilana, posteriormente a atividade diminui, e o fungo passaria a produzir outros componentes do sistema enzimático. Nesta etapa, pode estar acontecendo ainda à síntese de enzimas proteolíticas, que podem agir inativando a atividade xilanásica. Esses dados sugerem que haja xilanases distintas com diferentes modos de ação, como sugerido por Wong *et al.*, (1988). Essa mesma hipótese, de diferentes tempos de indução para diferentes componentes do sistema xilanolítico, onde os produtos de um, induziriam a síntese do outro, foi utilizada para

interpretar os picos da atividade xilanásica em *Streptomyces cyaneus* (Wong *et al.*, 1993).

Sabe-se que a expressão de xilanases em fungos está sujeita a repressão catabólica, principalmente por glicose. Em culturas submersas, o acúmulo de açúcares redutores tem sido investigado e observa-se um efeito negativo na produção de xilanases (Leathers *et al.*, 1986; Biswas *et al.*, 1988; Ghosh & Nanda, 1994; Kadowaki *et al.*, 1997). Neste trabalho, a adição de glicose nas culturas suplementadas com BCA ou FT apresentaram padrões diferentes de resposta em relação a atividade xilanásica, onde, em relação as culturas suplementadas com BCA ou FT, a repressão, por parte da glicose, foi observada até 48 - 72 horas de cultivo respectivamente, indicando que a glicose adicionada provavelmente tinha sido consumida. Em relação aos cultivos contendo BCA, a adição de açúcar provavelmente permitiu maior desenvolvimento do microrganismo, acarretando na maior secreção xilanásica indicada pela alta atividade enzimática nestes meios após 72 horas de cultivo. Já nos meios suplementados com FT, a adição de glicose não modifica em muito a atividade xilanásica, com exceção do meio contendo 0,75% de glicose, se comparada à condição onde não houve adição de açúcar, provavelmente pelo fato do FT proporcionar maior crescimento do microrganismo, o qual, absorveria a glicose presente no meio de cultura mais rápido, acarretando em uma repressão catabólica mais curta do que a observada com os meios contendo BCA e diferentes concentrações de glicose.

A atividade máxima apresentada pela xilanase presente nos filtrados, tanto das culturas com FT quanto das contendo BCA, foi em tampão MES pH 6,5. Em relação à estabilidade térmica, as xilanases provenientes das culturas suplementadas com FT apresentaram melhores resultados se comparadas as das culturas com BCA, indicando, provavelmente, que exista uma diferenciação na síntese dessas enzimas frente a um substrato específico. Sendo assim, provavelmente, seria mais propícia a utilização no processo de biobranqueamento de xilanases obtidas das fermentações contendo FT, pois como descrito por Ludgren *et al.* (1994) o uso de hemicelulases na designificação em indústrias de papel tem sido retardado pela falta de enzimas disponíveis em larga escala e ativas em pHs acima de 8,0 e temperaturas em torno de 60°C. Como observado na Tabela 05, a maioria das enzimas comerciais utilizadas necessita que a polpa de papel, proveniente do processo industrial, seja previamente neutralizada com ácidos ou resfriada até atingir o pH e a temperatura próxima a ótima de atividade. Portanto, enzimas ativas em altos pHs e temperaturas elevadas são essenciais aos processos industriais.

Em relação ao efeito da adição de íons, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade xilanásica, observa-se que as xilanases presentes no extrato bruto obtido da cultura com FT apresentam menor sensibilidade em relação às encontradas nas culturas com BCA. Observa-se que o íon Mn^{2+} ativou a enzima nos dois extratos brutos. Com exceção de alguns, a adição de íons, principalmente do Hg^{2+} , inibiram a atividade. Em relação ao EDTA, houve uma diminuição da atividade, principalmente da enzima proveniente do meio contendo BCA, indicando que este composto possivelmente quelou alguns íons necessários à atividade enzimática.

Os filtrados obtidos dos cultivos padronizados para BCA e FT não apresentaram atividades celulolíticas altas, sendo esta uma característica positiva e necessária as xilanases utilizadas no biobranqueamento, onde a presença de celulasas acarreta na hidrólise das fibras de celulose que compõem a polpa do papel, como demonstrado por Bajpai *et al.* (1994), Viikari *et al.* (1994), Srinivasan & Rele (1995), Yinbo *et al.* (1996), Christov *et al.* (1999) e Dhillon *et al.* (2000a, b).

5.2 CONDIÇÕES MAIS FAVORÁVEIS À PRODUÇÃO XILANÁSICA EM FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

Uma dificuldade apresentada nesta etapa de trabalho foi à expressão do crescimento do fungo, visto que é impraticável separar o micélio do substrato utilizado. Na maioria das literaturas, observa-se a expressão em Unidades da atividade xilanásica/g de fonte de carbono/substrato ou peso seco, neste trabalho, padronizou-se a expressão em U/g Substrato, conforme apresentado por Gessesse & Mano (1999).

Aspergillus caespitosus produz altos níveis xilanásicos quando crescido em culturas semi-sólidas suplementadas com FT ou BCA. Monitoramento visual das culturas contendo as diversas fontes de carbono avaliadas sugeriram que o maior crescimento do microrganismo foi sobre FT, provavelmente devido ao fato que este contém nutrientes suficientes para tal (Archana & Satyanarayana, 1997). Entretanto, atividades proteolíticas em culturas suplementadas com este substrato são geralmente altas, afetando a estabilidade das enzimas durante o processo de extração e estocagem. Esse problema pode ser minimizado pela adição de inibidores de proteases, no entanto, essa estratégia acarreta no aumento dos custos dos processos (Ferreira *et al.*, 1999; Gessesse & Mamo, 1999).

A umidade do meio tem uma importância crítica nas fermentações semi-sólidas. Neste estudo, a proporção de FT/BCA - água que proporcionou maior atividade foi de

1g : 2 mL e 1g : 4 mL de água, respectivamente. O conteúdo da umidade é um fator crucial que determina o sucesso do processo, pois se a umidade encontra-se em um valor maior ao ótimo ocorre diminuição na porosidade, alterando a estrutura das partículas do substrato e diminuindo a transferência de oxigênio. Ao contrário, umidade abaixo da ótima reduz a solubilidade dos nutrientes do substrato (Raimbault & Alazard, 1980; Archana & Satynarayana, 1997). Além disso, observou-se neste experimento, uma relação entre a umidade, o pH final do filtrado e a atividade proteolítica, sendo que a adição de água nas culturas coincide com aumento tanto do pH final e quanto da atividade proteolítica. Estes resultados poderiam explicar a diminuição da atividade xilanásica como maior desenvolvimento do microrganismo. A relação entre o grau de umidade e atividade proteolítica vai contra o resultado apresentado por Battaglino *et al.* (1991) em *Aspergillus oryzae*. Resultados semelhantes a este foram apresentados por Ferreira *et al.* (1999) em *Aspergillus tamarii*, onde não ocorre aumento significativo da atividade proteolítica com uma maior taxa de umidade.

As produções de xilanases foram máximas a 30°C. A 40°C, a atividade diminuiu, mesmo com baixa atividade proteolítica, indicando, provavelmente, que a água adicionada aos meios sofreu evaporação, devido a alta temperatura, acarretando na diminuição do crescimento do fungo. Este resultado demonstra uma relação entre o maior desenvolvimento do fungo e a atividade proteolítica. Em *Aspergillus tamarii*, maiores atividades proteolíticas foram detectadas com períodos de cultivo mais longos (Ferreira *et al.*, 1999).

Em relação as culturas suplementadas com FT, a adição de compostos nitrogenados, independente da concentração, estimulou a atividade xilanásica produzida pelo fungo, indicando a necessidade de complementação ao FT. Já nas fermentações contendo BCA, a adição de fontes de nitrogênio orgânicas foi essencial a atividade xilanásica, indicando a carência de nutrientes por parte deste substrato, sendo que a adição de peptona, que serve tanto como uma fonte de nitrogênio quanto de carbono, assim como extrato de levedura, proporcionou maior produção xilanásica. Em *Bacillus licheniformis* (Archana & Satyanarayana, 1997) e *Thermoascus aurantiacus* (Kalogeris *et al.*, 1998), a adição de peptona ou extrato de levedura não estimularam a atividade xilanásica. No entanto, neste último o acréscimo de sulfato de amônio favoreceu significativamente a atividade xilanolítica, assim como apresentado em *Aspergillus terreus* por Ghanem *et al.* (2000).

Em relação à adição de sais à cultura, a presença desses na água da torneira é suficiente para estimular a atividade xilanolítica em culturas suplementadas com FT. Já

para os meios contendo BCA, a máxima atividade xilanolítica foi obtida dos meios contendo sais de Vogel.

Não foram observadas, nas culturas semi-sólidas suplementadas com FT ou BCA, repressões catabólica. Dados semelhantes foram apresentados por Souza *et al.* (2001) em *Aspergillus tamarii*, Archana & Satyanarayana (1997) em *Bacillus licheniformis* e Gessesse & Mano (1999) em *Bacillus sp.* Alguns autores, entre eles Lonsane & Ramesh (1990), têm sugerido que a ausência de repressão catabólica em sistema semi-sólidos é devido a vários fatores incluindo o lento e baixo processo de difusão dos nutrientes devido ao baixo teor de água.

Os valores das atividades celulolíticas detectados nos filtrados provenientes das culturas semi-sólidas foram baixos, assim como os apresentados nas culturas submersas. Resultados semelhantes foram demonstrados por Alam *et al.* (1994) no cultivo com *Thermomyces lanuginosus*. Entretanto, no cultivo com *Thermoascus aurantiacus*, os valores das duas atividades foram altos (Kalogeris *et al.*, 1998).

5.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS XILANASES

As enzimas xilanolíticas têm sido isoladas e purificadas por diversos procedimentos. Geralmente, suas purificações são difíceis, necessitando de várias etapas como: precipitação com sulfato de amônio, etanol ou acetona, filtração em gel e cromatografias de trocas iônicas e hidrofóbicas (Düsterhöft *et al.*, 1997; Bataillon *et al.*, 1999). No entanto, em *Aspergillus caespitosus*, a purificação das xilanases foi realizada com apenas uma coluna de filtração, Sephadex G-100, cuja separação se dá entre proteínas globulares de 4 – 150 kDa. Esse processo resultou na obtenção de duas formas xilanolíticas, a xyl 1 e a xyl 2. Pode-se observar, no perfil cromatográfico obtido desta coluna, a eluição no volume “void” de compostos de alta massa molecular. Provavelmente, esses compostos são produtos de degradação do BCA, os quais possuem grupos aromáticos em sua composição, acarretando em uma alta absorbância a 280 nm.

Alguns microrganismos são capazes de produzir mais de um tipo de xilanase. A produção de um sistema enzimático por este, onde cada enzima tem uma função especializada, é uma estratégia usada para se obter uma hidrólise superior da xilana (Wong *et al.*, 1988). A multiplicidade das xilanases pode ser atribuída por diversos fatores como: processamento diferencial do RNAm, proteólise parcial e diferenças nos graus de amidação e glicosilação (Ferreira-Filho, 1994; Kulkarni, 1999). Ou ainda, esta

multiplicidade deve-se a presença de genes distintos, com propriedades distintas (Wong *et al.*, 1988).

As porcentagens de recuperações das duas enzimas foram muito altas (61,6 - xyl 1 e 22,1% -xyl 2) se comparadas a outras xilanases purificadas, como por exemplo de *Aspergillus fumigatus* Fresenius (Silva *et al.*, 1999) e *Aspergillus terreus* (Ghanem *et al.*, 2000), com recuperações de 0,26 e 31,3%, respectivamente. Quando soma-se as duas recuperações, o valor encontrado, 83,7%, é muito próximo a 100%, ou seja, a perda da atividade ao longo do processo é baixa, e deve ser ocasionada no processo de liofilização, onde a recuperação é de 12,3%, indicando que, este procedimento poderia ter levado a desnaturação de parte das proteínas, no entanto como a recuperação das atividades enzimáticas foram altas, após eluição em coluna de filtração, provavelmente, na liofilização, ocorreu acúmulo de açúcares presentes no meio ou por formação de agregados, que inibiram as xilanases.

Em relação ao fator de purificação, novamente altos valores foram encontrados, principalmente por se tratar de um processo de purificação que utiliza apenas uma coluna de filtração, indicando que *Aspergillus caespitosus*, mesmo na presença de substratos heterogêneos, como o BCA, produz altos níveis de xilanases. Monti *et al.* (1991) obtiveram um fator de purificação de 18,7 vezes da xilanase II de *Humicola grisea* var *thermoidea*, já Salles *et al.* (2000), trabalhando com *Acrophialophora nainiana*, o fator obtido foi de apenas 0,98 vezes.

O passo seguinte à purificação foi a caracterização das enzimas. Primeiramente, foram determinadas as massas moleculares da xyl 1 e da xyl 2 através de uma reta padrão de massa molecular obtida da Sephadex G-100. As massas estimadas foram 26.300 Da para xyl 1 e de 7.700 Da, para xyl 2. Em relação a xyl 1, o valor encontrado está dentro de uma faixa conhecida para xilanases, entretanto o valor estimado para xyl 2 é muito baixo, indicando uma provável retenção da enzima durante a eluição devido ao seu alto teor de carboidratos (41%) que provavelmente interagiram com a matriz da coluna, que é constituída de dextrana, ou seja, provavelmente, houve interação carboidrato – carboidrato. O mesmo ocorreu na coluna Sepharose 6B. Essa retenção acarreta em um volume de eluição muito alto, causando uma baixa estimativa da massa molecular da proteína. Huang *et al.* (1991) obteve resultados semelhantes, onde a xilanase foi eluída em um volume (V_e/V_o) igual a 2,7, semelhante ao encontrado para xyl 2 obtida de *Aspergillus caespitosus*. Esse valor é considerado muito alto para enzimas. Vários exemplos da interação xilanase - resina foram descritos por Gerber *et al.* (1997).

A fim de certificar as massas moleculares e esta possível interação, foram aplicados em uma coluna de exclusão Bio-Gel P-60, os dois “pools” obtidos da Sephadex G-100. A matriz dessa coluna é constituída por poliacrilamida, diferentemente das matrizes da Sephadex G-100 e Sepharose 6B, formadas por dextrana e agarose, respectivamente. O perfil cromatográfico obtido apresentou somente um pico de atividade, portanto, neste caso não houve separação das duas xilanases, indicando, primeiro, que a massa molecular estimada para xyl 2 estava errada e, segundo, que a interação com a matriz é essencial para a separação das duas enzimas, nas colunas cromatográficas utilizadas, pois provavelmente as suas massas moleculares são muito próximas, dificultando a separação nas colunas de filtração utilizadas.

O outro método utilizado para estimativa das massas moleculares foi o SDS-PAGE. Neste caso, as massas moleculares foram de 27 kDa e 17,7 kDa para xyl 1 e xyl 2 respectivamente. Este resultado corrobora com o proposto acima, ou seja, a massa molecular estimada para xyl 2 em coluna de filtração estava errada.

A relação entre massa molecular e pI proposta por Wong *et al.* (1988) – massa molecular baixa / pI básico – é mais comumente encontrada em xilanases extraídas de bactérias e não de fungos (Kulkarni *et al.*, 1999). Além disso, essa classificação proposta não é uma regra como pode ser observada nas xilanases obtidas neste trabalho, ou seja, de *Aspergillus caespitosus*, onde a xyl 1 apesar de ter uma massa molecular maior, apresentou o pI mais alto de 6,68, contra o pI de 5,85 encontrado para xyl 2. Portanto, neste caso ambas as enzimas possuem baixa massa molecular (< 30 kDa), mas apresentam pIs ácidos, não se encaixando na classificação citada acima. É interessante notar uma relação entre os pHs ótimos das duas enzimas e seus pIs, sendo que aquela que teve pH ótimo mais elevado (xyl 1, pH 7,5 – xyl 2, 6,0 - 6,5) apresentou o maior pI.

As xilanases extracelulares purificadas, xyl 1 e xyl 2, foram identificadas como glicoproteínas que contêm aproximadamente 28 e 41% de carboidratos, respectivamente. Dey *et al.* (1991) purificaram duas xilanases de *Bacillus* sp, sendo que o conteúdo de carboidrato da primeira forma era de 15% e da segunda, 30%. Nas xilanases purificadas de *Aspergillus versicolor* (Carmona *et al.*, 1998) e *Humicola grisea* var *thermoidea* (Monti *et al.*, 1991) foram estimados valores de 71 e 45% de carboidratos, respectivamente.

As temperaturas ótimas das xilanases purificadas encontraram-se entre 50 – 55°C, coincidindo com o valor obtido no extrato bruto da cultura de *Aspergillus*

caespitosus. Valores semelhantes foram reportados por Morales *et al.* (1995), Ito *et al.* (1992), Salles *et al.* (2000) e Silva *et al.* (1999) para os respectivos microrganismos: *Bacillus polymyxa*, *Aspergillus kawachii*, *Acrophialophora nainiana* e *Aspergillus fumigatus* Frenesius.

Em relação à estabilidade térmica a 55°C, foram observadas diferenças significativas entre as duas formas purificadas de *Aspergillus caespitosus*. Os valores estimados de T₅₀ para xyl 1 e xyl 2, nesta temperatura, foram respectivamente de 27,3 e > 90 minutos. Provavelmente essa diferença está relacionada ao conteúdo de carboidratos das duas enzimas, sendo que geralmente proteínas glicosiladas apresentam maior estabilidade térmica. Esta diferenciação entre a termoestabilidade das duas formas, também foi observado nas duas xilanases purificadas de *Bacillus circulans* AB 16 (Dhillon *et al.*, 2000b). Neste trabalho, a xilanase A retém 75% da atividade a 70°C por 1 hora, enquanto que a xilanase B, apenas 2%.

A 65°C, os valores estimados de T₅₀ para as duas enzimas purificadas de *Aspergillus caespitosus*, caíram drasticamente para 2,3 minutos. Entretanto, no extrato bruto, o valor de T₅₀ foi de 18 minutos, evidenciando que o processo de purificação, provavelmente, eliminou alguns compostos estabilizadores.

De forma geral, as xilanases purificadas de *Aspergillus caespitosus* apresentaram estabilidade térmica baixa se comparadas, por exemplo, com as duas formas de xilanases purificadas de *Thermoascus aurantiacus* (Kalogeris *et al.*, 1998) cujos valores de T₅₀ são, a 80°C, de 88 e 41 minutos, respectivamente. No entanto, se comparadas a xilanase purificada de *Bacillus polymyxa* (Morales, 1995), cujos T₅₀ são a 55°C de 4 minutos e a 45°C de 18 minutos, os valores obtidos foram satisfatórios. Em relação a outras espécies de *Aspergillus*, o resultado apresentado para xyl 2 assemelha-se ao obtido com a xyl II de *A. fumigatus* Frenesius (Silva *et al.*, 1999). Já Ghanem *et al.* (2000), apresentaram em seu trabalho com xilanase purificada de *A. terreus*, valores de T₅₀ iguais a 30 minutos, a 60°C.

Tem sido demonstrado que algumas enzimas são mais termoestáveis em soluções orgânicas que em aquosas (Zaks & Klibanov, 1988). Sendo assim, as xilanases 1 e 2 purificadas foram incubadas na presença de soluções de glicerol, PEG, sorbitol e trealose. Como apresentado nos resultados, os valores de T₅₀ passaram de 2,3 minutos, para a xyl 1 e 2, para 13,2 e 32,6 minutos, respectivamente, na presença de glicerol 30%. O aumento da termoestabilidade de xilanases na presença de aditivos também foi reportada por Simpson *et al.* (1991). Neste trabalho, a presença de sorbitol 90% + xilana 0,5% acarretou no prolongamento da atividade enzimática em 80%.

George *et al.* (2001), também estudaram o efeito da adição de PEG, glicerol e sorbitol sobre a termoestabilidade da xilanase purificada de *Thermomonospora* sp. Todos os aditivos polihidroxílicos tiveram efeito positivo sobre a estabilidade, sendo esse efeito proporcional ao tamanho da molécula adicionada, o que pode ser correlacionado com o número de grupos hidroxil por molécula.

Tem sido sugerido que álcool polihídricos estabilizam as proteínas pela diminuição da atividade da água, devido a formação de fortes pontes de hidrogênio com esta molécula (Gekko & Timasheff, 1981). No entanto, não existe uma relação entre o aditivo adicionado e a estabilidade ocasionada, pois isto depende da natureza da enzima (hidrofóbica ou hidrofílica) e ao grau de interação com o aditivo.

Os pHs ótimos encontrados para xyl 1 e xyl 2 foram 6,5 – 7,5 e 5,5 – 6,5, respectivamente. Como demonstrado na Tabela 04, a maioria das xilanases fúngicas apresentam pHs entre 5,0 – 6,0, com exceção da xilanase purificada de *Acrophialophora nainiana* (Salles *et al.*, 2000), cujo pH ótimo foi de 7,0. Além disso, observou-se perda da atividade xilanásica 1 em pH 8,5 de apenas 17%, enquanto que, para xyl 2, esta perda foi de 82%. Dados semelhantes a estes, foram apresentados por Düsterhöft *et al.* (1997) para xilanases purificadas de *Humicola insolens*, no entanto, neste caso, a perda da atividade da xyl 2 foi de 46%.

Portanto, a xyl 1 secretada por *Aspergillus caespitosus*, possui, entre as literaturas citadas, e principalmente por se tratar de um fungo, um dos pH mais altos e uma das maiores atividades em pHs alcalinos. No entanto, apesar de ter esta característica, a xyl 1 não apresentou altos valores de T_{50} quando avaliou-se a estabilidade ao pH. Novamente, como ocorrido para a termoestabilidade, a xyl 2 apresentou vida média maior, provavelmente devido ao maior número de carboidratos na sua composição.

As xilanases purificadas apresentaram padrões de atividade diferentes na presença de diversos íons. A atividade da xyl 1 reduziu com a adição de todos os íons testados, com exceção do NH_4Cl . Já a atividade da xyl 2 também sofreu redução na presença desses íons, porém em menor grau, sendo que na presença de NH_4Cl houve aumento de 33% da atividade. A menor inibição da xyl 2 em relação a xyl 1 deve-se provavelmente ao alto conteúdo de carboidratos dessa molécula que poderiam agir impedindo a combinação dos íons com o sítio ativo ou outras estruturas da enzima essenciais a sua atividade. Além disso, foi observado que a atividade, em ambas as enzimas, são dependente da concentração dos íons. Düsterhöft *et al.* (1997) também

demonstrou diferenças nas atividades das duas enzimas purificadas de *Humicola insolens* na presença de diversos íons.

Na presença de mercúrio as atividades das duas enzimas diminuíram drasticamente, indicando a presença de grupos tióis no sítio ativo das enzimas.

A adição de β -mercaptoetanol resultou na estimulação das duas enzimas, indicando uma provável relação entre a forma reduzida dos resíduos de cisteína e as atividades das enzimas, como também foi observado na xilanase purificada de *Bacillus* sp (Bataillon *et al.*, 1999).

As xilanases purificadas demonstraram-se altamente específicas, apresentado atividade apenas sobre xilana, não sendo capazes de hidrolisar nenhum outro substrato testado, portanto, essas enzimas não são multifuncionais, ou seja, não hidrolisam mais de um substrato, ao contrário do observado para β -glicosidase de *Humicola grisea* (Peralta *et al.*, 1990). As xilanases purificadas de *Acrophialophora nainiana* (Salles *et al.*, 2000), *Thermoascus aurantiacus* (Kalogeris *et al.*, 1998) e *Humicola insolens* (Düsterhöft *et al.*, 1997) também não exibiram atividade sobre outros substratos além da xilana. Entretanto, algumas xilanases além de atuarem sobre xilana, também hidrolisam celulose (Wong *et al.*, 1988).

A determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ frente ao substrato xilana birchwood demonstrou diferenças significativas entre as duas xilanases purificadas de *Aspergillus caespitosus*. Esses parâmetros foram determinados segundo os métodos propostos por Lineweaver & Burk (1934) e por Hanes (1932). Como representação gráfica foi escolhido o modelo proposto por Lineweaver & Burk, que apesar de ser muito questionado, pois os pontos que se referem às altas concentrações de substratos, se concentram no início da reta obtida no gráfico dos duplos-recíprocos, ou seja, os pontos não se distribuem homogeneamente sobre a reta, ele, além de permitir melhor visualização dos resultados, também é o mais clássico. Além disso, os valores analisados pelo método de Hanes foram semelhantes aos encontrados por Lineweaver & Burk, não exigindo, portanto, a representação gráfica de ambos os métodos.

Os valores cinéticos obtidos indicaram que a xyl 1 tem maior afinidade a xilana birchwood, além de apresentar alta velocidade máxima se comparada a xyl 2. Entretanto, na presença de β -mercaptoetanol, a xyl 2 passou a ter maior afinidade a xilana birchwood que a xyl 1, demonstrando que a presença deste composto provocou mudanças na conformação da enzima expondo mais o seu sítio ativo. Além disso, nesta condição, a $V_{m\acute{a}x}$ da xyl 1 quase dobrou de valor, enquanto que o K_m continuou praticamente o mesmo.

Diferenças de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ entre xilanases produzidas pelo mesmo microrganismo foram relatadas por Dhillon *et al.* (2000b) trabalhando com *Bacillus circulans* AB 16. Neste trabalho, os K_m das xilanases A e B foram de 4,0 e 25,0 mg/mL, respectivamente. Os valores apresentados para as $V_{m\acute{a}x}$ foram de 2666 IU/mg para xyl A e de 20×10^5 IU/mg para xyl B.

5.4 BIOBRANQUEAMENTO

Atualmente, a aplicação de xilanases no processo de branqueamento da polpa de celulose vem sendo amplamente estudada principalmente pelo fato, que o uso dessas enzimas, além de levar a redução dos níveis de compostos organoclorados formados durante este processo, também aumenta a alvura e a resistência das fibras (Viikari *et al.*, 1994).

De uma forma geral, os parâmetros avaliados neste trabalho - número kappa (teor de lignina), absorbâncias a 237 – 270 (remoção de lignina da polpa) e 465 (remoção da cor) - corroboram entre si, ou seja, quanto maior a redução do número kappa obtida maior foram as absorbâncias observadas, em relação a uma mesma polpa (Bahia Sul Celulose ou CELPAV). A relação entre absorbância e número kappa foi utilizada em vários trabalhos (Garg *et al.*, 1996; Christov *et al.*, 1999; Silveira *et al.*, 1999 e Beg *et al.*, 2000).

Os resultados apresentados indicaram que a ação das xilanases secretadas de *Aspergillus caespitosus* é dependente da origem das polpas, visto que os resultados, utilizando o mesmo extrato bruto, foram diferentes frente as duas polpas testadas (Bahia Sul Celulose ou CELPAV), indicando que as características da polpa, como tamanho do poros e acessibilidade da hemicelulose, é essencial a ação xilanolítica.

Os extratos brutos provenientes de FSM foram mais efetivos no biobranqueamento do que os da FSS, indicando, provavelmente, que as xilanases secretadas nesta condição possuem diferenças, possivelmente pós-traducionais, que dificultam suas ações sob a xilana da polpa, ou que essas enzimas ficam adsorvidas no substrato fermentado dificultando tanto sua hidrólise quanto sua entrada nos poros das fibras. Entre os extratos brutos das culturas submersas, aquele obtido de fermentação suplementada com FT foi mais efetivo na redução do número kappa de ambas as polpas, se comparado ao BCA. Este resultado está provavelmente relacionado a maior termoestabilidade e atividade em pH alcalino das xilanases presentes nos filtrados dessa cultura, como pode ser observado nas Figuras 09 - 10.

Os resultados apresentados em relação ao efeito da adição de xilanases purificadas, xyl 1 e xyl 2, no branqueamento da polpa sugerem ações distintas entre as duas enzimas, uma vez que a atividade da xyl 2 acarretou na redução do número kappa em 12,6% e a xyl 1, em apenas 1,68%. Provavelmente, o melhor resultado foi obtido com a xyl 2 devido as propriedades bioquímicas desta enzima, como maior estabilidade a temperatura (Tabela 19) e ao pH (Figura 28), essenciais ao biobranqueamento, e a menor massa molecular (Figuras 21 – 22). Esta última propriedade facilita a entrada das enzimas nos poros das fibras de celulose, como discutido por Viikari *et al.* (1994). Uma outra propriedade que auxilia a ação de xilanases sob as fibras da polpa é o alto ponto isoelétrico (pI). No caso das duas formas purificadas, ambas possuem pIs ácidos, portanto, as outras propriedades bioquímicas da xyl 2 é que permitiram seu maior desempenho.

Georis *et al.* (2000) também avaliaram o efeito da adição de xilanases purificadas de *Streptomyces* sp no branqueamento da polpa de celulose. Foram purificadas três formas (xyl 1, 2 e 3), sendo que a forma 1 pertence ao grupo baixa massa molecular/alto pI (família 11) e as formas 2 e 3, ao outro grupo (família 10), como proposto por Wong *et al.* (1988). Eles observaram que a atividade da xyl 1 foi mais efetiva no biobranqueamento, o que confirma a hipótese que as xilanases pertencentes a família 11 são mais eficazes neste processo, como proposto por Rixon *et al.* (1996) e Morris *et al.* (1998).

As xilanases presentes no extrato bruto do FT foram avaliadas também em relação ao pH (6,0 – 6,5, 8,0 – 8,15) e a temperatura (55 – 65°C) da polpa. Nestas condições novamente foram observadas reduções do número kappa, indicando que essas enzimas são possíveis de serem utilizadas em processos industriais.

Entre as condições testadas, as maiores reduções de número kappa foram de 20,2 e 21,3%, onde para cada grama de polpa seca (Bahia Sul Celulose) foram adicionadas respectivamente, 9 e 12 Unidades de xilanases presentes no filtrado de culturas submersas suplementadas com FT. Silveira *et al.* (1999) trabalhando com a mesma polpa, porém utilizando 2 U/g seca e 3 horas de incubação a 50°C, pH 5 – 6, obtiveram uma redução do numero kappa de 4,7%. Beg e colaboradores (2000) demonstraram que a adição de 6 U de xilanases de *Streptomyces* sp QG – 11 – 3 por grama de polpa seca, pH 8,5 – 9,0, incubada a 50°C por 2 horas, acarretou na redução do número kappa em 22,4%.

Araújo *et al.* (1999) investigaram o efeito da adição de duas xilanases comercializadas, Pulpzyme HC (Novo Nordisk) e Cartazyme NS – 10 (Sandoz/Clariant),

no branqueamento de polpa Kraft deslignificadas com oxigênio. Estas foram incubadas a 60 – 65°C durante 180 minutos com 0,5 U/g de polpa, como recomendado pelas empresas. As reduções do número kappa observadas foram de 11,4 e 10,5% para as polpas incubadas com Pulpzyme e Cartazyme, respectivamente.

Na maioria dos casos avaliados não foi observada redução da viscosidade da polpa em relação a controle, indicando que a hemicelulose (xilana) presente nas fibras da polpa foi hidrolisada, uma vez que o complexo hemicelulose – celulose é menos viscoso que a celulose apenas.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos se pode concluir que o trabalho apresentado tem relevância científica uma vez que:

- 1) Não foi encontrada, nas literaturas pesquisadas hidrolases produzidas ou purificadas de *Aspergillus caespitosus*;
- 2) O fungo mostrou-se ser excelente produtor de xilanases, tanto em fermentações líquidas quanto semi-sólidas, utilizando, como fontes de carbono, resíduos agroindustriais encontrado em larga escala e a baixo custo;
- 3) As xilanases purificadas apresentaram características favoráveis a aplicação biotecnológica, como estabilidade ao pH e temperatura;
- 4) As xilanases, presentes nos extratos brutos de fermentações líquidas suplementadas com FT ou BCA, demonstraram possibilidades de aplicação no biobranqueamento da polpa de papel e celulose, uma vez que acarretaram na diminuição do número kappa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADOLPH, S.; MÜLER, S.; SIEDENBERG, D.; JÄGER, K.; LEHMANN, H.; SCHÜGERL, K.; GIUSEPPIN, M. Cultivation of *Aspergillus awamori* on wheat bran: Ultrastructural description of growth and localization of xylanase by immunogold labeling. **J. Biotechnol.**, v. 46, p. 221-234, 1996.
- ALAM, M.; GOMES, I.; MOHIUDDIN, G.; MOZAMMEL, H. Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, p. 298-302, 1994.
- ALMEIDA, E.M.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENCEI, H.F.; JORGE, J.A. Purification and biochemical characterization of β -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 130, p. 171-176, 1995.
- ALMEIDA, M. L. O. Composição química da madeira. In: **Celulose e Papel – Tecnologia da fabricação da pasta de celulose**. SENAI, São Paulo, 1981. p. 43-98.
- ARAÚJO, J. H. B.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Bleaching of Kraft pulp with commercial xylanases. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 77-79, p. 713-722, 1999.
- ARCHANA, A. & SATYANARAYANA, T. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 21, p. 12-17, 1997.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PANIFICAÇÃO E CONFEITARIA. Disponível em: <<http://www.abip.org.br/conheca/moinhos.htm>>. Acesso em: fev. 2002.
- BABU, K. R. & SATYANARAYANA, T. α -Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid-state fermentation. **Process Biochem.**, v. 30, p. 305-309, 1995.

- BAILEY, M. J. & POUTANEN, K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 30, p. 5-10, 1989.
- BAILEY, M. J. & VIKARI, L. Production of xylanase by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylan-based media. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 9, p. 80-84, 1993.
- BAILEY, M. J.; PULS, J.; POUTANEN, K. Purification and properties of two xylanases from *Aspergillus oryzae*. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 13, p. 380-389, 1991.
- BAJPAI, P.; BNARDWAJ, N.K.; BAJPAI, P.K.; JAUHARI, M.B. The impact of xylanases on bleaching of eucalyptus Kraft pulp. **J. Biotechnol.**, v. 38, p. 1-6, 1994.
- BAKALOVA, N.; PETROVA, S.; KOLEV, D. Separation of enzymes from polyenzymes mixtures used in medicine and pharmacy. I. Isolation characterization of xylanase from *Aspergillus oryzae*. **Pharmazie**, v. 51, p. 761-764, 1996.
- BATAILLON, M.; CARDINALI, N. A. P.; CASTILLON, N.; DUCHIRON, F. Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase form *Bacillus* sp. strain SPS-0. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 26, p. 187-192, 2000.
- BATTAGLINO, R. A.; HUERGO, M.; PILOSOFF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 35, p. 292-296, 1991.
- BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; KAPOOR, M.; HOONDAL, G. S. Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG – 11 – 3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 27, p. 459-466, 2000.
- BEGUIN, P. & AUBERT, J-P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 25-28, 1994.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv.**, v. 18, p. 355-383, 2000.

- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends Biotechnol.**, v. 3, p. 286-290, 1985.
- BISWAS, S. R.; MISHRA, A. K.; NANDA, G. Xylanase and beta glucosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 31, p. 613-616, 1988.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** v.81, p. 93-99, 1987.
- CARMONA, E. C.; BROCHETO-BRAGA, M. R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; JORGE, J. A. Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 166, p. 311-315, 1998.
- CARMONA, E.C.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; MONTEIRO, R.T.R.; JORGE, J.A. Xylanase production by *Aspergillus versicolor*. **J. Basic Microbiol.**, v. 37, p. 387-394, 1997.
- CASTRO, L. P. M.; TREJO – AGUILAR, B. A.; OSORIO, G. A. Thermostable xylanase produced at 37°C and 45°C by a thermotolerant *Aspergillus* strain. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 146, p. 97–120, 1997.
- CHANDRA RAJ, K. & CHANDRA, T. S. A cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1. **Biotechnol. Lett.**, v. 17, p. 309-314, 1995.
- CHANDRAKANT, P. & BISARIA, V.S. Simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of xylose isomerase. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 301-309, 2000.
- CHEN, C.; CHEN, J. L.; LIN, T. Y. Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 21, p. 91-96, 1997.
- CHEN, C.C. & WESTPHELING, J. Partial characterization of the *Streptomyces lividans* *xlnB* promoter and its use for expression of a thermostable xylanase from *Thermotoga maritima*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 4212-4225, 1998.

- CHRISTOV, L.P. & PRIOR, B.A. Esterases of xylan-degrading microorganisms: production, properties and significance. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 15, p. 460-475, 1993.
- CHRISTOV, L.P.; SZAKACS, G.; BALAKRISHNAN, H. Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanase in pulp bleaching. **Process Biochem.**, v. 34, p. 511-517, 1999.
- COUGHLAN, M.P. & HAZLEWOOD, G.P. β -1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology and application. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 17, p. 259-289, 1993.
- COVE, D.J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochim Biophys Acta.**, v. 113, p. 51-56, 1996.
- DAMASO, M. C. T.; ANDRADE, C. M. M.; PEREIRA Jr, N. Use of corn cob for endoxylanase production by *Thermomyces lanuginosus* IOC – 4145. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 84 – 86, p. 821–834, 2000.
- DAVIS, B. J. Disk Electrophoresis. **Am. N. Y. Acad. Sci.**, v. 121, p. 404-427, 1964.
- DE GRAAFF, L.H.; BROECK, H.C. van den; OOIJEN, A.J.J. Regulation of the xylanase-encoding *xlnA* gene of *Aspergillus tubigensis*. **Mol. Microbiol.**, v. 12, p. 479-490, 1994.
- DEKKER, R. F. H. & RICHARDS, G. N. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 32, p. 277-352, 1976.
- DEY, D.; HINGE, J.; SHENDYE, A.; RAO, M. Purification and properties of extracellular endoxylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. **Can. J. Microbiol.**, v. 38, p. 436-442, 1991.

- DHILLON, A.; GUPTA, J. K.; JAUHARI, B. M.; KHANNA, S. A cellulase-poor, thermostable, alkali tolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. **Biores. Technol.**, v. 73, p. 273-277, 2000 a.
- DHILLON, A.; GUPTA, J. K.; KHANNA, S. Enhanced production, purification and characterization of a novel cellulase-poor thermostable, alkalitolerant xylanase from *Bacillus circulans* AB 16. **Process Biochem.**, v. 35, p. 849-856, 2000 b.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- DÜSTERHÖFT, E. M.; LINSEN, V. A. J. M.; VORAGEN, A. G. J.; BELDMAN, G. Purification, characterization and properties of two xylanases from *Humicola insolens*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 20, p. 437-445, 1997.
- ESAÚ, K. **Anatomia das Plantas com Sementes**. Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 1993.
- FERNÁNDEZ – ESPINAR, M. T.; RAMÓN, D.; PIÑAGA, F.; VALLÉS, S. Xylanase production by *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 91, p. 91-96, 1994.
- FERREIRA, G.; BOER, C. G.; PERALTA, R. M. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamarii* in solid-state fermentation. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 173, p. 335-339, 1999.
- FERREIRA-FILHO, E.X. The xylan-degrading enzyme system. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 1093-1109, 1994.
- GALANTE, Y. M.; DE CONTI, A.; MONTEVERDI, R. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries In: Harman, G. F.; Kubicek, CP (Ed), ***Trichoderma & Gliocladium – Enzymes, biological control and commercial applications***. Taylor & Francis, London, 1998. p. 311-342.

- GANCEDO, C. Carbon catabolite repression in yeast. **Eur. J. Biochem.**, v. 206, p. 297-313, 1992.
- GARG, A. P.; MCCARTHY, A. J.; ROBERTS, J. C. Biobleaching effect of *Streptomyces thermoviolaceus* xylanase preparations on birchwood kraft pulp. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 18, p. 261-267, 1996.
- GEKKO, K. & TIMASHEFF, S. N. Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol – water mixtures. **Biochem.**, v. 20, p. 4677-4686, 1981.
- GELLERSTEDT, G. Chemical composition and distribution. In: Hon, D. N. S. e Sheraishi, N., (Eds), **Wood and cellulose chemistry**. Marcel Dekker, New York, 2001. p. 859-905.
- GEORGE, S. P.; AHMAD, A.; RAO, M. B. A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp: influence of additives on thermostability. **Bioresc. Technol.**, v. 78, p. 221-224, 2001.
- GEORIS, J.; GIANNOTTA, F.; BUYL, E.; GRANIER, B.; FRÈRE, J-M. Purification and properties of three endo- β -1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S-38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 26, p. 178-186, 2000.
- GERBER, P. J.; HEITMANN, J. A.; JOYCE, T. W. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma*. **Bioresc. Technol.**, v. 61, p. 127-140, 1997.
- GESSESSE, A. & MAMO G. High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid-state fermentation. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 25, p. 68-72, 1999.
- GHANEM, N. B.; YUSEF, H. H.; MAHROUSE, H. K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. **Bioresc. Technol.**, v. 74, p. 113-121, 2000.

- GHOSH, M & NANDA, G. Physiological studies of xylose induction and glucose repression of xylanolytic enzymes from *Aspergillus sydowii* MG 49. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 117, p. 151-156, 1994.
- GRAHAM, H.; LOWGREN, W.; PETTERSSON, D.; AMAN, P. Effect of enzyme supplementation on digestion of a barley/pollard based pig feed. **Nutrition Report International**, v. 38, p. 1073-1079, 1998.
- GUTIERREZ – CORREA, M. & TENDERDY, R. P. Xylanase production by fungal mixed culture solid state fermentation on sugar cane bagasse. **Biotechnol. Lett.**, v. 20, p. 45-47, 1998.
- HAGIHARA, B.; MATSUBARA, H.; NAKAI, M.; OKUNUKI, K. Crystalline bacterial proteinase. **J. Biochem.**, v. 45, p. 185-194, 1958.
- HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K.D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Biores. Technol.**, v. 58, p. 137-161, 1996.
- HANES, C. S. The effect of starch concentration upon the velocity of hidrolisis by the amylase of germinated barley. **Biochem. J.**, v. 26, p. 1406-1421, 1932.
- HESELTIME, C. W. Solid state fermentation – part 1. **Process Biochem.**, v. 12, p. 24-27, 1977.
- HRMOVÁ, M.; BIELY, P.; VRSANKÁ, M. Cellulose and xylan – degrading enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 11, p. 610-616, 1989.
- HRMOVÁ, M.; PETRAKOVA, E.; BIELY, P. Induction of cellulose and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo and hetero-disaccharides composed of glucose and xylose. **J. Gen. Microbiol**, v. 137, p. 541-547, 1991.
- HUANG, L.; HSEU, T. H.; WEY, T.T. Purification and characterization of an endoxylanase from *Trichoderma koningii* G-39. **Biochem. J.**, v. 278, p. 329-333, 1991.

- ITO, K.; OGASAWARA, H.; SUGIMOTO, T.; ISHIKAWA, T. Purification and properties of stable xylanases from *Aspergillus kawachii*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 56, p. 547-550, 1992.
- JOHN, M.; SCHIMIDT, B.; SCHIMIDT, J Purification and some properties of five endo- β -xylanase and a β -D-xylosidase produced by strain of *Aspergillus niger*. **Can. Biochem.**, v. 57, p. 125-134, 1988.
- KADOWAKI, M.K.; SOUZA, C.G.M.; SIMÃO, R.C.G.; PERALTA, R.M. Xylanase production by *Aspergillus tamarii*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 66, p. 97-106, 1997.
- KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases form *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isoenzymes. **J. Biotechnol.**, v. 60, p. 155-163, 1998.
- KANEKO, S.; SHIMASAKI, T.; KUSAKABLE, I. Purification and some properties of intracellular α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* 5-16. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 57, p. 1161-1165, 1993.
- KHANNA, P.; SUNDARI, S.S.; KUMAR, N.J. Production, isolation and partial purification of xylanase from an *Aspergillus* sp. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 11, p. 242-243, 1995.
- KIMURA, I.; SASAHARA, H.; TAJIMA, S. Purification and characterization of two xylanase and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. **J. Ferm. Bioeng.**, v. 80, p. 334-339, 1995.
- KITAMOTO, N.; YOSHINO, S.; OHMIYA, K.; TSUKAGOSHI, N. Purification and characterization of the overexpressed *Aspergillus oryzae* xylanase, *XynF1*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 63, p. 1791-1794, 1999.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 23, p. 411-456, 1999.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEATHERS, T. D.; DETROY, R. W.; BOTHAST, R. J. Induction and glucose repression of xylanase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnol. Lett.**, v. 8, p. 867-872, 1986.
- LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; CIANCAGLINI, P. Enzyplot: a microcomputer assistant program for teaching enzymes kinetics. **Biochem. Educ.**, v. 23, p. 35-37, 1995.
- LEVIN, L. & FORCHIASSIN, F. Influence of growth conditions on the production of xylanolytic enzymes by *Trametes trogii*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 14, p. 443-446, 1998.
- LIN, J.; NDLOVU, L. M.; SINGH, S.; BALAKRISHNA, P. Purification and biochemical characteristics of β -D-xylanase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 30, p. 73-79, 1999.
- LINEAWEAVER, H. & BURK, D. The determination of the enzymes dissociation. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 56, p. 658 – 666, 1934.
- LONSANE, B. K. & RAMESH, M. V. Production of bacterial thermostable alfa-amylase by solid-state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolyses. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 35, p. 1-56, 1990.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUDGREN, K. R.; BERGKVIST, L.; HOGMAN, S.; JOVES, H.; ERIKSSON, G.; BARTFAI, T.; LAAN, J.; ROSENBERG, E.; SHOHAM, Y. TCF mill trial on soft wood pulp with Korsnas thermostable and alkaline stable xylanase T6. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 365-368, 1994.

- MACCABE, A.P.; OREJAS, M.; PEREZ-GONZALEZ, J.A.; RAMON, D. Opposite patterns of two expression *Aspergillus nidulans* xylanase genes with respect to ambient pH. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 1331-1333, 1998.
- MACH, R.L.; STRAUSS, J.; ZEILINGER, S.; SCHINDLER, M.; KUBICEK, C. P. Carbon catabolite repression of xylanase I (*xyn1*) gene expression in *Trichoderma reesei*. **Mol. Microbiol.**, v. 21, p. 1273-1281, 1996.
- McCARTHY, A.J.; PEACE, E.; BRODA, P. Studies on the extracellular xylanase activity of some thermophilic actinomycetes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 21, p. 238-244, 1985.
- MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Temas**. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/temas/biotec/parque_nacional.pdf>. Acesso em: fev. 2002.
- MILAGRES, A. M. F. **Produção de xilanases por *Penicillium janthinellum* e aplicação das enzimas no branqueamento de polpa kraft**. 1994. 137 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MITCHELL, A. D.; DOELLE, H. W.; ROLS, C. E. **Solid Substrate Cultivation**. Ed. Elsevier Applied Science, London e New York, 1992.
- MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. Purification and properties of an extracellular xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Can. J. Microbiol.**, v. 37, p. 675-681, 1991.
- MORALES, P.; MADARRO, A.; FLORES, A.; SENDRA, J. M.; PÉREZ – GONZALEZ, J. A. Purification and characterization of a xylanase and an arabinofuranosidase from *Bacillus polymyxa*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 17, p. 424-429, 1995.

- MORRIS, D.D.; GIBBS, M. D.; CHIN, C. W.; KOH, M. H.; WONG, K.K.Y.; ALLISON, R. W.; NELSON, P. J.; BERGQUIST, P. L. Cloning of the *xynB* gene from *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1 and action of the gene product on kraft pulp. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 1759-1765, 1998.
- NANMORI, T.; WATANABE, T.; SHINKE, R.; KOHNO, A.; KAWAMURA, Y. Purification and properties of thermostable xylanase and β -xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 6669-6672, 1990.
- O'FARREL, P. Z.; GOODMAN, H. H.; O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well acidic proteins. **Cell**, v. 12, p. 1133-1142, 1983.
- OREJAS, M.; MACCABE, A.P.; PEREZ-GONZALEZ, J.A.; KUMAR, S.; RAMON, D. Carbon catabolite repression of the *Aspergillus nidulans xlnA* gene. **Mol. Microbiol.**, v. 31, p. 177-184, 1999.
- PAICE, M. G.; GURNAGUL, N.; PAGE, D. H.; JURASEK, L. Mechanism of hemicellulose directed prebleaching of Kraft pulp. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 14, p. 272-276, 1992.
- PANDEY, A. Recent process development in solid-state fermentation. **Process Biochem.**, v. 27, p. 109-117, 1992.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochem.**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.
- PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresc. Technol.**, v. 65, p. 191-201, 1998.

- PATEL, R. N.; GRABSKI, A. C.; JEFFRIES, T. W. Chromophore release from kraft pulp by purified *Streptomyces roseiscleroticus* xylanases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 39, p. 405-412, 1993.
- PERALTA, R. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. β -D-Glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1033, p. 243-249, 1990.
- PIÑAGA, F.; FERNANDEZ-ESPINAR, M. T.; VALLES, S.; RAMON, D. Xylanase production in *Aspergillus nidulans*: induction and carbon catabolite repression. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 115, p. 319-324, 1994.
- POUTANEN, K.; RÄTTÖ, M.; PULS, J.; VIIKARI, L. Evaluation of different microbial xylanolytic systems. **J. Biotechnol.**, v. 6, p. 49-60, 1987.
- PRADE, R.A. Xylanases: From biology to biotechnology. **Biotechnol. Gen. Eng. Rev.**, v. 13, p. 101-131, 1995.
- PULS, J. & SCHUSEIL, J. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicelluloses structure and enzyme required for hydrolysis. In: Coughlan, M.P. & Hazlewood, G.P. (Eds), **Hemicelluloses and hemicellulases**. Portland Press, London, 1993. p. 1-27.
- PULS, J. & POUTANEN, K. Mechanisms of enzymatic hydrolysis of hemicelluloses (xylans) and procedures for determination of the enzyme activities involved. In: Ericksson, K.E.E. & Ander, P. (Eds), **Proc. 3rd Int. Conf. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry**. STFI, Stockholm, 1989. p. 93-95.
- PURKARTHOFFER, H.; SINNER, M.; STEINER, W. Effect of shear rate and culture pH on the production of xylanase by *Thermomyces lanuginosus*. **Biotechnol. Lett.**, v. 15, p. 405-410, 1993.
- RAIMBAULT, M. & ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 60, p. 199-209, 1980.

- RAJ, K.C. & CHANDRA, T.S. Purification and characterization of xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 145, p. 457-461, 1996.
- RAPER, K.B. & FENNEL, D.I. **The genus *Aspergillus***. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1965.
- RIXON, J. E.; CLARKE, J.H.; HAZLEWOOD, G. P.; HOYLAND, R. W.; MCCARTHY, A. J.; GLIBERT, H. J. Do the non-catalytic polysaccharide-binding domains and linker regions enhance the biobleaching properties of modular xylanases?. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 46, p. 514-520, 1996.
- RIZZATTI, A.C.S. **Estudo das atividades xilanásica e β -xilosidásica produzida pelo fungo termotolerante *Aspergillus phoenicis***. 2000. 108 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – FMRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- RIZZATTI, A.C.S.; JORGE, J.A.; TERENCE, H.F.; RECHIA, C.G.V.; POLIZELI, M.L.T.M. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 26, p. 156-160, 2001.
- ROGALSKI, J.; OLESZEK, M.; TOKARZEWSKA-ZADORA, J. Purification and characterization of two endo-1,4-beta-xylanases and a 3-xylosidase from *Phlebia radiata*. **Acta Microbiol Pol.**, v. 50, p. 117-128, 2001.
- RONNE, H. Glucose repression in fungi. **Trends Genet.**, v. 11, p. 12-17, 1995.
- ROYER, J. C. & NAKAS, J. P. Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. **Enzyme. Microb. Technol.**, v. 11, p. 405-410, 1989.
- SAKA, S. Chemical composition and distribution. In: Hon, D. N. S. & Sheraishi, N. (Eds), **Wood and cellulose chemistry**. Marcel Dekker, New York, 2001. p. 51-72.
- SALLES, B. C.; CUNHA, R. B.; FONTES, W.; SOUZA, M. V.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **J. Biotechnol.**, v. 81, p. 199-204, 2000.

- SARDAR, M.; ROY, I.; GUPTA, M.N. Simultaneous purification and immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on the reversibly soluble polymer Eugragit TM L-100. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 27, p. 672-627, 2000.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**, Edgar Blücher, Brasil, 2001.
- SHAO, W. & WIEGEL, J. Purification and characterization of two thermostable β -xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 5848-5853, 1995.
- SILVA, C. H. C.; PULS, J.; SOUSA, M. V.; FERREIRA – FILHO, E. X. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* fresenius. **Rev. Microbiol.**, v. 30, p. 114-119, 1999.
- SILVA, M. C.; BERTOLINI, M. C.; ERNANDES, J. R. Biomass production and secretion of hydrolytic enzymes are influenced by the structural complexity of the nitrogen source in *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus nidulans*. **J. Basic Microbiol.**, v. 41, p. 269-280, 2001.
- SILVEIRA, F. Q. P.; XIMENES, F. A.; CACAIS, A. O. G.; MILAGRES, A. M. F.; MEDEIROS, C. L.; PULS, J.; FILHO, E. X. F. Hydrolysis of xylans by enzyme systems from solid cultures of *Trichoderma harzianum* strains. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 947-952, 1999.
- SIMPSON, H. D.; HAUFLER, U. R.; DANIEL, R. M. An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga*. **Biochem. J.**, v. 277, p. 413-417, 1991.
- SISTEMA DE INFORMAÇÃO ENERGÉTICAS. **Biomassa, cana-de-açúcar no Brasil**. Disponível em: <http://infoener.iee.usp.br/scripts/biomassa/br_cana.asp>. Acesso em: fev. 2002.

- SMITH, D. C. & WOOD, T. M. Xylanase production by *Aspergillus awamori*. Development of a medium and optimization of the fermentation parameters for the production of extracellular xylanase and β -xylosidase while maintaining low protease production. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 38, p. 883-890, 1991.
- SOUZA, D. F.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamaraii* in solid-state fermentation. **Process Biochem.**, v. 36, p. 835-838, 2001.
- SOUZA, O. **Tratamento de subprodutos e resíduos agropecuários com solução de uréia**. Livraria e Editora Agropecuária, Rio Grande do Sul, 2001.
- SRINIVASAN, M. C. & RELE, M. V. Cellulase-free xylanase from microorganisms and their application in pulp and paper biotechnology: an overview. **Ind. J. Microbiol.**, v. 35, p. 93-101, 1995.
- SUBRAMANIYAN, S. & PREMA, P. Celulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 183, p. 1-7, 2000.
- SUNNA, A. & ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 17, p. 39-67, 1997.
- TIMELL, T. E. Recent progress in the chemistry of wood hemicellulose. **Wood Sc. Technol.**, v. 1, p. 45-70, 1967.
- TUOHY, M.G.; PULS, J.; CLAEYSSSENS, M.; VRSANSKA, M.; COUGHLAN, M.P. The xylan-degrading enzyme system of *Talaromyces emersonii*: novel enzymes with activity against aryl beta-D-xylosides and unsubstituted xylans. **Biochem J.**, v. 290, p. 515-523, 1993.
- VERBRUGGEN, M.A.; SPRONK, B.A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.; THOMAS, J.R.; KAMERLING, J.P.; SCHOLS, H.A.; VLIEGENTHART, J.F. Structures of enzymically derived oligosaccharides from sorghum glucuronoarabinoxylan. **Carbohydr. Res.**, v. 306, p. 265-74, 1998.

- VIIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J; LINKO, M. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 335-350, 1994.
- VOGEL, H. F. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implication. **American Naturalist.**, v. 98, p. 435-446, 1964.
- WISEMAN, A. **Handbook of enzyme biotechnology**. Ellis Horwood Ltd John Wiley & Sons (Ed), 1975. p. 148.
- WONG, K.K.Y. & SADDLER, J.N. Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries. In: Coughlan, M.P. & Hazlewood, G.P. (Eds). **Hemicelluloses and Hemicellulases**. Portland Press, London, 1993. p. 127-143.
- WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SADDLER, J.N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in Microorganisms: functions and applications. **Microbiol. Rev.**, v. 52, p. 305-317, 1988.
- YINBO, Q.; PEIJI, G.; DONG, WANG.; XIN, Z.; XIAO, ZHANG. Production, characterization and application of the cellulase-free xylanase from *Aspergillus niger*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 57-58, p. 375-381, 1996.
- ZAKS, A. & KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. **Science**, v. 224, p. 1249-1251, 1984.
- ZEILINGER, S.; MACH, R.L.; SCHINDLER, M.; HERZOG, P.; KUBICEK, C.P. Different inducibility of expression of the two xylanase genes *xyn1* and *xyn2* in *Trichoderma reesei*. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 25624-25629, 1996.