



INSTITUTO DE QUÍMICA – CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PRODUÇÃO DE XILANASES POR *Aspergillus niger*
UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL: PURIFICAÇÃO
DE XILANASE

Vinícius Moura Zaneti

Araraquara
2012



INSTITUTO DE QUÍMICA – CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PRODUÇÃO DE XILANASES POR *Aspergillus niger*
UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL: PURIFICAÇÃO
DE XILANASE

Vinícius Moura Zaneti

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rubens Monti

Dissertação apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia do Instituto de
Química, UNESP, Araraquara-
SP, como requisito para
obtenção do Título de
Mestre em Biotecnologia.

Araraquara
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Z28p Zaneti, Vinícius Moura
 Produção de xilanases por *Aspergillus niger* utilizando
planejamento experimental : purificação de xilanase /
Vinícius Moura Zaneti . – Araraquara : [s.n], 2012
 74 f. : il.

 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
 Orientador: Rubens Monti

 1. Biotecnologia. 2. *Aspergillus niger* . 3. Xilanases.
4. Delineamento composto central. I. Título.

VINÍCIUS MOURA ZANETI

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

Araraquara, 24 de outubro de 2012.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rubens Monti (Orientador)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara



Prof.ª Dr.ª Sandra Regina Pombeiro Sponchiado
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof.ª Dr.ª Eleonora Cano Carmona
Instituto de Biociências / UNESP / Rio Claro

AGRADECIMENTOS

Pela conclusão de mais esta importante etapa, agradeço principalmente aos meus pais pelo seu inestimável cuidado e empenho, sempre tendo me apoiado nos momentos mais adversos e nunca tendo deixado de acreditar no meu potencial e na concretização dos meus objetivos, e aos meus irmãos pela melhor amizade que eu poderia desejar. Agradeço também a todos os colegas que pude fazer ao longo do desenvolvimento do presente trabalho e que, direta ou indiretamente, contribuíram para a sua conclusão: Caio, Andrea, Júlio, Juliana, Ozeni, Antônio, Raquel, Ana, que estiveram sempre presentes como amigos e como profissionais e nunca deixaram de ajudar. Agradeço ao Prof. Dr. Cristian Bolner de Lima, pela grande colaboração prestada para o desenvolvimento deste trabalho e pelo aprendizado por mim adquirido sobre planejamento de experimentos através de sua ajuda. Agradeço ao Prof. Rubens Monti, pela paciência, motivação, inspiração e principalmente pela oportunidade em integrar seu grupo de pesquisa e trabalhar sob sua orientação, da qual pude extrair muitos novos conhecimentos e cultivar uma grande admiração pela sua pessoa e pelo seu profissionalismo. Agradeço também à Letícia, pelo companheirismo, afeto, amor e carinho dispensados em todos os momentos, do início ao fim desta etapa. E por fim, agradeço a Deus, pela saúde, pela força, e por todas as circunstâncias que me permitiram chegar até aqui.

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço também à Capes, pela bolsa de estudos concedida pelo programa em Biotecnologia e à Fundunesp e PADC-FCFAR-Araraquara pelo auxílio concedido à pesquisa.

LISTA DE FIGURAS

1. Estrutura da parede celular vegetal	14
2. Esquema da estrutura da xilana e sítios de clivagem das diferentes enzimas envolvidas na degradação completa da xilana	18
3. Algumas estratégias para condução de experimentos	23
4. Representação de um DCC para 3 fatores	24
5. Imagem de microscopia ótica do fungo isolado do fruto de cupuaçu e classificado como <i>Aspergillus niger</i> (FCUP1)	37
6. Curva de calibração para dosagem de proteínas pelo método de Lowry (1972), utilizando soroalbumina bovina como padrão	39
7. Curva de calibração para dosagem de açúcares redutores pelo método de Miller (1959), utilizando xilose como padrão	40
8. Valores preditos em função dos observados, relativo à produção de xilanase	45
9. Superfície de resposta para a atividade enzimática em função do pH e da temperatura	46
10. Superfície de resposta para a atividade enzimática em função do pH e da agitação	47
11. Superfície de resposta para a atividade enzimática em função do pH e da fonte de carbono	48
12. Superfície de resposta para a atividade enzimática em função da agitação e da temperatura	49
13. Superfície de resposta para a atividade enzimática em função da fonte de carbono e da temperatura	50
14. Superfície de resposta para a atividade enzimática em função da fonte de carbono e da agitação	51
15. Filtração em gel de separação Sephadex G-75 do extrato com atividade xilanolítica	57
16. Purificação do extrato de xilanases por cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Trisacryl	59
17. SDS-PAGE da fração obtida na DEAE-Trisacryl	61
18. Cromatografia em Sílica Gel P60 do produto de hidrólise da xilana por ação da xilanase do fungo <i>Aspergillus niger</i>	62

LISTA DE TABELAS

1. Composição de um DCC	24
2. Comparação entre planejamento fatorial completo e DCC para 4 variáveis independentes, quanto ao número total de experimentos	25
3. Valores dos pontos central, fatoriais e axiais para as 4 variáveis independentes do DCC	28
4. Matriz do Planejamento Experimental gerado pelo <i>software</i> STATISTICA® 7.0, com variáveis independentes representadas na forma adimensionalizada	29
5. Matriz do Planejamento Experimental gerado pelo <i>software</i> STATISTICA® 7.0, com variáveis independentes representadas na forma dimensionalizada	30
6. Enzimas fúngicas de importância comercial	38
7. Matriz do planejamento experimental com resultados em atividade específica da enzima xilanase produzida por <i>Aspergillus niger</i>	41
8. Resultados da análise de regressão múltipla para a produção de xilanase .	43
9. Fator de purificação e rendimento com tratamento em caulim e precipitação em acetona	56

LISTA DE ABREVIATURAS

λ – comprimento de onda em nm

μL – microlitros

μm – micrômetros

DCC – delineamento composto central

DCCR – delineamento composto central rotacional

DEAE – Dietilaminoetil

DNS – ácido 3,5'-dinitrosalicílico

kDa – quilodaltons

mg – miligramas

min – minuto

mL – mililitros

MSR – metodologia de superfície de resposta

nm – nanômetros

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

PSA – Persulfato de amônio

SDS - dodecil sulfato de sódio

Sephadex – *Separation Pharmacia Dextran*

TEMED – N,N,N',N'Tetrametiletenodiamina

U - Unidade enzimática

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Enzimas microbianas e sua importância biotecnológica	10
1.2. Materiais lignocelulósicos – composição e distribuição.....	13
1.3. Xilana – estrutura e biodegradação	15
1.4. Aplicação biotecnológica das xilanases	18
1.5. Delineamento Experimental e Metodologia de Superfície de Resposta	21
2. OBJETIVOS	26
2.1. Gerais.....	26
2.2. Específicos	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Micro-organismo.....	27
3.2. Manutenção do micro-organismo	27
3.3. Identificação do micro-organismo	27
3.4. Delineamento experimental.....	27
3.5. Confeção da superfície de resposta	31
3.6. Meio de cultivo.....	31
3.7. Produção dos extratos de xilanólíticos	31
3.8. Determinação do coeficiente de extinção molar da xilose	32
3.9. Curva de calibração de proteínas	32
3.10. Dosagem de proteínas dos extratos de xilanase	33
3.11. Determinação da atividade xilanólítica	33
3.12. Clarificação dos extratos de xilanase com caulim.....	33
3.13. Precipitação com acetona	34
3.14. Purificação da enzima em gel de separação <i>Sephadex</i> ® G-75	34
3.15. Cromatografia de troca iônica em DEAE-Trisacryl.....	35
3.16. Cromatografia em Camada Delgada Sílica-Gel P60	35
3.17. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Identificação do micro-organismo	37
4.2. Curvas de calibração para determinação de açúcares redutores e proteínas	39
4.3 Delineamento composto central	40
4.3.1. Análise de regressão dos resultados obtidos na produção de xilanase a partir das variáveis estudadas	43

4.4. Filtração em caulim e precipitação de proteínas com acetona 3:1 (v/v) a frio	55
4.5. Purificação da enzima em gel de separação <i>Sephadex</i> ® G-75	56
4.6. Cromatografia de troca iônica em DEAE-Trisacryl.....	58
4.7. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	60
4.8. Cromatografia em camada delgada sílica-gel P60.....	62
5. CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	66

RESUMO

Neste trabalho foi utilizada a metodologia de superfície de resposta, por meio de delineamento composto central rotacional para investigar as melhores condições de produção de xilanase pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger*. Este micro-organismo é considerado um bom produtor de enzimas xilanases, sendo que estas enzimas têm a capacidade de hidrolisar xilana em xilooligossacarídeos e xilose. Produtos assim obtidos estão sendo cada vez mais utilizados em rações animais para melhoria da flora intestinal; para a produção de xilitol e também para a produção de álcool de segunda geração. A análise estatística dos resultados obtidos neste trabalho mostrou que as melhores condições de produção da enzima extracelular foram: pH 5,0, temperatura de 37 °C, agitação de 80 rpm, e concentração de fonte de carbono de 2 % (p/v). Após a determinação das condições ideais, o extrato foi clarificado por filtração em caulim, e as proteínas assim obtidas foram precipitadas com acetona ocorrendo uma melhora sensível na atividade específica. Após filtração em Sephadex G-75 foi mostrada a presença de atividade xilanolítica em dois picos, e as frações referentes ao segundo pico foram reunidas e submetidas à coluna de troca iônica DEAE-Trisacryl, na qual se constatou uma fração sendo eluída com 0,06 mol/L de NaCl, contendo atividade de xilanase. A SDS-PAGE da fração majoritária revelou uma única banda protéica com massa molar aparente de 34 kDa. A cromatografia em sílica gel P60 revelou que os produtos de hidrólise foram constituídos de xilooligossacarídeos, após 120 min de hidrólise.

Palavras-chave: Xilanase. *Aspergillus niger*. Delineamento composto central.

ABSTRACT

In the present work, response surface methodology was utilized, through appliance of rotational central composite design to investigate the best conditions of production of xylanase by the filamentous fungus *Aspergillus niger*. This microorganism is considered a good producer of xylanase enzyme, which has the ability to hydrolyze hemicelluloses in xylooligosaccharides and xylose. Products obtained this way are being increasingly utilized in animal feeding to improve the intestinal flora, to produce xylitol and also to produce second generation ethanol. The statistical analysis of the obtained results showed that the best conditions for the extracellular enzyme production were: pH 5.0, 37 °C, 80 rpm shaking, and 2 % (w/v) carbon source concentration. After the determination of the ideal production conditions, the enzyme extract was clarified through filtration in kaolin, and the protein obtained were precipitated with acetone, with a sensitive increase in the specific activity. After molecular exclusion chromatography in Sephadex G-75 the presence of xylanolytic activity was shown in two peaks, and the fractions related to the second peak were collected and submitted to DEAE-Trisacryl ion exchange column, in which were observed fractions showing xylanase activity that was eluted with 0.06 mol/L NaCl. SDS-PAGE of the majority fraction revealed only one proteic band with apparent molar mass of 34 kDa. P60 silica gel chromatography revealed that the product of hydrolysis was constituted of small xylooligosaccharides released after 120 min of hydrolysis.

Key words: Xylanase. *Aspergillus niger*; Central composite design.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enzimas microbianas e sua importância biotecnológica

Enzimas são substâncias orgânicas, de natureza predominantemente proteica (com exceção das ribozimas, de natureza ribonucleica) cuja função é promover e acelerar reações químicas que regulam diversos processos biológicos, através da redução da sua energia de ativação (energia inicial necessária para que uma reação específica qualquer aconteça). As enzimas são capazes de realizar, em poucos minutos ou mesmo segundos, reações químicas que sem sua participação levariam centenas de anos para se processarem (DABLY, 2003; OTTEN; QUAX, 2005).

Presentes em micro-organismos, animais e vegetais, as enzimas têm sido utilizadas direta ou indiretamente pela humanidade há milhares de anos, mas foi a partir de meados do século XIX, quando seu mecanismo de atuação foi cientificamente compreendido, e do século XX em diante, quando o conhecimento sobre enzimas foi expandido, que sua utilização direta se multiplicou e possibilitou seu uso e produção industriais. Elas são amplamente utilizadas em diversos setores, como o de alimentos (na produção de queijos, iogurtes, vinhos, pães, sucos e biscoitos), farmacêutico (antibióticos, anti-inflamatórios e digestivos), papelero, de biocombustíveis, têxtil, cosmético, setor químico de limpeza, e até no tratamento de efluentes e resíduos industriais (MUSSATO et. al., 2007).

Dentre as propriedades desejáveis de enzimas para a aplicação industrial e biotecnológica em geral, podemos citar a sua atividade catalítica de alta especificidade em condições amenas de temperatura e pressão; capacidade de catalisar reações difíceis de serem realizadas por métodos químicos convencionais, como por exemplo, reações de hidrólise enantio-seletivas ou régio-seletivas, ou a adição de grupos quirais (SARROUH et al., 2012). Além disso, são inertes e não afetam propriedades como entalpia e entropia, não afetam o equilíbrio da reação, não sendo consumidas durante a mesma, apresentam menor consumo energético e maior velocidade de reação em relação aos catalisadores químicos, também produzem menor quantidade de resíduos indesejáveis ao final do processo e, por conseguinte, geram um

produto relativamente mais puro comparado aos processos químicos convencionais. Por apresentarem alta especificidade de atuação sobre o substrato, frequentemente se obtém uma melhoria na qualidade final do produto. Essa melhoria no processo reduz os custos de manutenção com maquinário ou laboratorial. Além disso, o emprego de enzimas possibilita a fabricação controlada do produto em pequenas quantidades (MUSSATO et al., 2007).

Uma característica que torna as enzimas interessantes sob o ponto de vista ambiental é o fato de serem biodegradáveis, atóxicas, e derivadas de fontes renováveis. Exemplos em que enzimas foram utilizadas para substituir processos químicos com sucesso significativo podem ser observados em inúmeras aplicações: em sabões em pó, onde fosfatos foram substituídos por enzimas tais como proteases e celulasas, fabricação de pães, onde emulsificadores químicos foram substituídos por lipases, e a indústria têxtil, em que o hidróxido de sódio deu lugar a amilases e pectinases. A lista de aplicações é vasta e crescente, e tal são os benefícios sociais e ambientais trazidos em retorno (CHERRY; FIDANTSEF, 2003).

As enzimas são classificadas em 6 grupos - ou classes - distintos, conforme estabelecido pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) e de acordo o tipo de reação que catalisam. Sendo assim, elas são classificadas em:

- 1) Oxirredutases: todas as enzimas que catalisam reações de oxirredução. O substrato oxidado é considerado o doador de elétrons;
- 2) Transferases: enzimas que catalisam a transferência de grupos entre moléculas;
- 3) Hidrolases: enzimas que catalisam reações de hidrólise (transferem grupos funcionais para a água);
- 4) Liases: enzimas que catalisam adição de grupos para duplas ligações ou formação de ligações duplas por remoção e grupos;
- 5) Isomerases: são enzimas que catalisam transferência de grupos dentro de moléculas para produzir formas isoméricas;

- 6) Ligases: enzimas que catalisam reações de formação de ligações C-C, C-S, C-O, e C-N por reações de condensação acoplado à quebra de ATP.

A maioria das enzimas utilizadas para fins industriais é produzida por fermentação por micro-organismos tais como bactérias, fungos (SARROUH et al, 2012). Os fungos, devido à sua nutrição por absorção, são particularmente interessantes produtores de enzimas. Eles secretam uma ampla variedade de enzimas no meio extracelular, que atuam como pré-digestoras do alimento que em seguida é absorvido pelas células para ser completamente processado e incorporado (BENNET, 1998). A produção de enzimas extracelulares é um fator altamente desejável do ponto de vista industrial, pois esta característica simplifica sua recuperação e purificação em comparação com a produção de enzimas intracelulares, as quais necessitam ser separadas e purificadas dentre milhares de outras proteínas e outros componentes celulares (SARROUH et al, 2012).

As vantagens de se extrair ou produzir enzimas de fontes microbianas, em comparação com fontes animais e vegetais incluem menor custo de produção, possibilidade de produção industrial em larga escala em fermentadores, possibilidade de manipulação genética do micro-organismo para potencialização da expressão da enzima ou expressão de enzimas exógenas, ausência de fatores ligados à sazonalidade, rápido desenvolvimento de cultivo e métodos de manutenção relativamente simples. Tais características tornam as enzimas microbianas biocatalisadores adequados para várias aplicações industriais (HASAN et al, 2006).

Idealmente, para sua utilização em bioprocessos industriais, a escolha do micro-organismo a ser manipulado deve pautar-se em uma série de características preferenciais. Dentre as quais incluem a não patogenicidade - especialmente quando aplicado na indústria alimentícia -, a elevada capacidade de conversão do substrato em produto, a tolerância a altas concentrações de substrato e de produto, ter estabilidade fisiológica, ser pouco exigente quanto às condições de cultivo e não requerer condições operacionais dispendiosas (LEISOLA et al., 2002).

Algumas das enzimas mais utilizadas industrialmente incluem a amilase, a lipase, as proteases, as ligases, as fitases, as celulases e as xilanases

(COWAN, 1996; KIRK et al., 2002; HOWARD et al., 2003; CHERRY; FINDANTSEF, 2003; EIJSINK et al., 2008).

Alguns dos micro-organismos mais utilizados para produção de enzimas incluem os gêneros *Bacillus*, *Trichoderma*, *Saccharomyces*, *Rhizopus*, *Humicola* e *Aspergillus* (TURNER, 1975; BIGELIS, 1985; GODFREY; WEST, 1996; BENNET, 1998).

1.2. Materiais lignocelulósicos – composição e distribuição

Os materiais lignocelulósicos representam a principal proporção da biomassa em plantas terrestres e constituem uma enorme fonte de carbono renovável na natureza (BOUDET et al., 2003). São compostos, principalmente, por quatro polímeros: celulose, hemicelulose, lignina, e pectina, responsáveis por formar um complexo de estrutura rígida.

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza. Possui uma estrutura insolúvel de cadeia linear e homogênea, composto por β -D-glicopiranosídios unidos através de ligações glicosídicas β -1,4, que por sua vez, são interligados por pontes de hidrogênio, formando uma estrutura fibrilar altamente ordenada. Representa cerca de 50% do peso da madeira (MARTINEZ et al, 2005).

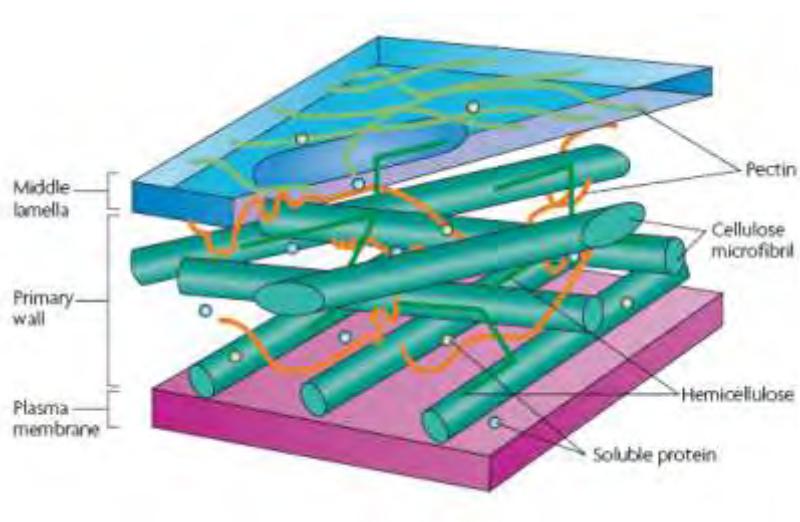
Hemiceluloses são grupos de heteropolissacarídeos de pentoses (D-xilose e L-arabinose), de hexoses (α -D-galactose, β -D-glicose e β -D-manose), e/ou ácidos urônicos (α -D-glucurônico, α -D-4-O-metilgalacturônico e α -D-galacturônico); outros açúcares tais como o α -L-ramnose e α -L-fucose também podem estar presentes em pequenas quantidades. A hemicelulose é encontrada principalmente em associação com a celulose na parede celular de plantas superiores (SAHA, 2003).

A lignina é altamente resistente à degradação química e biológica; é o elemento responsável por conferir a dureza característica da madeira. A lignina situa-se, em maiores concentrações, na lamela média exercendo propriedade coesiva entre as fibras da madeira, mas é também encontrada na parede celular vegetal, principalmente na parede celular secundária, formando, juntamente com a hemicelulose, uma matriz amorfa onde as microfibrilas de celulose estão envoltas e protegidas contra a degradação (MARTINEZ et al.,

2005). A pectina consiste em um grupo de heteropolissacarídeos formados por unidades de ácido-D-galacturônico unidas por ligações α -1,4 (KULKARNI et al., 1999; ARO et al., 2005).

Na Figura 1, observa-se uma representação esquemática da parede celular vegetal.

a



b

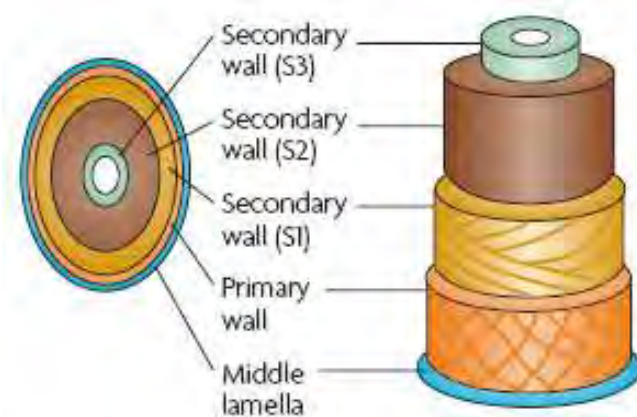


Figura 1. Estrutura da parede celular vegetal. a) Parede celular contendo microfibrilas de celulose, hemicelulose, pectina, lignina e proteínas solúveis. b) Estratos que compõem a parede celular vegetal, a lignificação ocorre nas camadas S1, S2, e S3 (STICKLEN, 2008).

A biomassa lignocelulósica inclui resíduos agrícolas como palhas, cascas, caules, hastes, bagaços, farelos, madeiras decíduas e coníferas, resíduo da indústria de polpa e papel, resíduos de plantas herbáceas, entre outros (SAHA, 2003), sendo utilizados como substratos de baixo custo para induzirem a produção de diversas enzimas, tais como amilases, xilanases e proteases.

1.3. Xilana – estrutura e biodegradação

A xilana é o mais relevante e abundante polissacarídeo componente da hemicelulose, o qual está presente em todas as camadas da parede celular vegetal e na interface entre a celulose e lignina. Quanto à sua disponibilidade, a xilana é a segunda maior fonte renovável de carbono presente na natureza, sendo inferior apenas à celulose (ZANOELO et al., 2004). É uma molécula heterogênea constituída, em sua cadeia principal, por resíduos de xilose unidos por ligações glicosídicas β -1,4, podendo apresentar ramificações contendo arabinose, manose, galactose, glicose e ácidos urônicos. Na natureza, sua degradação e modificação podem ser feitas por diferentes micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos (FERREIRA et al., 1999; MAHESHWARI et al., 2000; ABDEL-SATER; EL-SAID, 2001; LENARTOVICZ, 2003) e sua completa hidrólise se dá pela ação de diversas enzimas do complexo xilanolítico (LEE et al., 2009). As xilanases fazem parte desse complexo, as quais são responsáveis pela hidrólise da xilana. Essas enzimas são principalmente produzidas por micro-organismos e atuam na decomposição das paredes celulares das plantas, que com outras enzimas hidrolisam polissacarídeos, e também digerem a xilana durante a germinação de algumas sementes. As xilanases são também encontradas em algas marinhas, protozoários, lesmas, crustáceos, insetos e sementes de plantas (SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997). Entre as fontes microbianas, fungos filamentosos são importantes, pois estes produzem maior quantidade de xilanases extracelulares em comparação com bactérias e leveduras (HALTRICH et al., 1996; POLIZELI et al., 2005). Tais características tornam enzimas produzidas por fungos uma opção interessante do ponto de vista industrial, uma vez que não é necessária a etapa de rompimento celular para a

obtenção destas enzimas (HALTRICH et al., 1996). Essas enzimas são variadas na estrutura tridimensional. Elas podem ser encontradas em seis famílias de glicosídeo hidrolases (GH): GH5, GH7, GH8, GH10, GH11 e GH43. As famílias se diferem uma das outras quanto às propriedades físico-químicas, estrutura, modo de ação e especificidade do substrato (COLLINS et al., 2005; PUCHART et al., 2007). Devido à estrutura heterogênea da xilana, sua completa degradação demanda a atuação sinérgica de diversas enzimas xilanolíticas (Figura 2). Este conjunto enzimático é particularmente constituído pelas enzimas β -1,4-endoxilanases (1,4- β -D-xilana xilohidrolases; EC 3.2.1.8), β -D-xilosidases (β -D-xilosídeo xilohidrolases; EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidases; EC 3.2.1.55, α -glucuronidases; EC 3.2.1.131, acetilxilana esterases; EC 3.1.1.6, esterase para ácido ferrúlico; 3.1.1.73, e a esterase para ácido *p*-coumárico; EC 3.1.1.x. Este sistema enzimático é composto particularmente pelas enzimas: β -1,4-endoxilanases (1,4- β -D-xilana xilohidrolases; EC 3.2.1.8) que clivam as ligações internas glicosídicas da cadeia principal da heteroxilana, diminuindo o grau de polimerização do substrato. A clivagem do substrato não é ao acaso e as ligações a serem hidrolisadas dependem da natureza do substrato (comprimento e/ou grau de ramificação) e também da presença de substituintes (LI et al., 2000). Inicialmente, os principais produtos da reação são xilooligossacarídeos, mas posteriormente, outras pequenas moléculas de monossacarídeo, dissacarídeo e trissacarídeo de xilose, isto é, xilose, xilobiose e xilotriose podem ser liberados. Assim, as endoxinalases podem ser classificadas em dois tipos de acordo com o produto final da reação: as que catalisam a hidrólise nos pontos de ramificação 1,3- α -1-arabinofuranosil de arabinoxilanas em adição à hidrólise das ligações da cadeia principal, e aquelas que não hidrolisam estes pontos de ramificação (MATSUO et al., 1998; RIZZATTI, 2004; CZJZEK et al., 2005). As β -D-xilosidases (β -D-xilosídeo xilohidrolases; EC 3.2.1.37) são exoglicosidases que hidrolisam xilooligossacarídeos pequenos e xilobiose, a partir da extremidade não redutora, liberando xilose (KUMAR e RAMÓM, 1996; MATSUO et al., 1998; LENARTOVICZ, 2003; RIZZATTI, 2004; CZJZEK et al., 2005). Estas enzimas são capazes de clivar substratos artificiais como *p*-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo (ANDRADE, 2002; RIZZATTI, 2004). Um importante papel é atribuído à essas enzimas, pois as xilanases são inibidas

por altas concentrações de seus produtos e uma das funções das β -D-xilosidases é diminuir esta inibição causada pela concentração de xilooligossacarídeos (ANDRADE et al., 2004; POLIZELI et al., 2005). As β -D-xilosidases têm sido caracterizadas em vários fungos e bactérias, mas pouco se conhece sobre a regulação de sua biossíntese (ANDRADE et al., 2004). Em fungos filamentosos, estas enzimas estão associadas ao micélio podendo ser detectadas também no extrato celular ou durante o crescimento. As β -D-xilosidases apresentam uma massa molecular de 60 a 360 kDa sendo geralmente glicoproteínas. Elas possuem pH ótimo entre 4,0 e 5,0, e as temperaturas ótimas podem variar entre 40 °C a 80 °C, dependendo do micro-organismo estudado (POLIZELI et al., 2005). Outras enzimas microbianas são capazes de afetar a conversão da xilana em seus constituintes. Estas enzimas agem cooperativamente, ocorrendo um sinergismo entre elas, os quais apresentam as seguintes atividades: α -L- arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) removem os resíduos de L-arabinose substituídos no carbono três (C3) das unidades de xilose (KANEKO et al., 1993; RIZZATTI, 2004); α -glucuronidases (EC 3.2.1.131) hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,2 entre o ácido glucurônico ou ácido metil-glucurônico e resíduos de xilose em glucuronoxilano (ANDRADE, 2002; RIZZATTI, 2004); acetilxilana esterases (EC 3.1.1.6) removem grupos O-acetil a partir dos carbonos dois e/ou três (C2 e/ou C3) dos resíduos de xilose na acetilxilana (SHAO e WIEGEL, 1992; CRAUFRIER et al., 2003; RIZZATTI, 2004); e os ácidos fenólicos esterases também podem estar presentes: ácido ferrúlico esterase (3.1.1.73) e o ácido *p*-coumárico esterase (EC 3.1.1.-) clivam na xilana as ligações éster entre resíduos de cadeia lateral de arabinose e ácido ferrúlico ou ácido *p*-coumárico, respectivamente (RIZZATTI, 2004; POLIZELI et al., 2005).

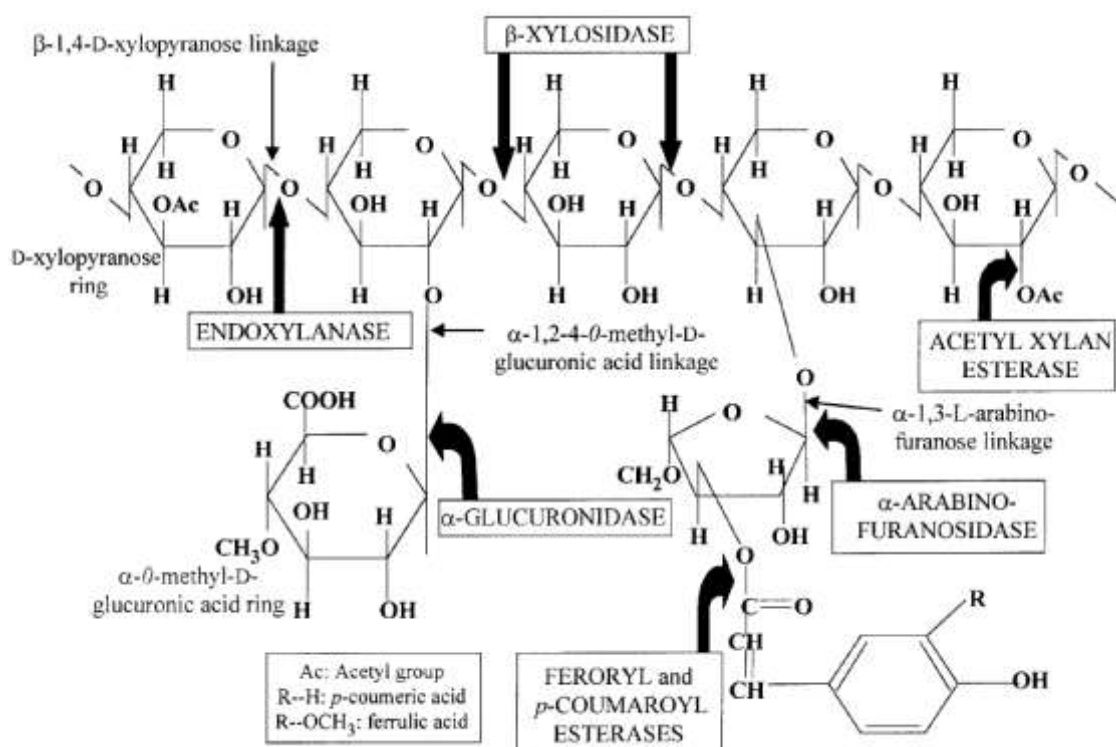


Figura 2. Esquema da estrutura da xilana e sítios de clivagem das diferentes enzimas envolvidas na degradação completa da xilana (BEG et al., 2001).

1.4. Aplicação Biotecnológica das Xilanases

O crescente fortalecimento das políticas ambientais tem gerado um avanço do desenvolvimento tecnológico mundial na direção dos processos biotecnológicos, visando a substituição dos processos químicos convencionais por alternativas mais sustentáveis, como por exemplo, a utilização de processos enzimáticos.

O mercado global de enzimas para aplicação industrial vem crescendo significativamente nos últimos anos. Em 2007, o montante financeiro gerado por este segmento foi equivalente a 2,3 bilhões de dólares (THAKORE, 2008). Segundo publicação da *BBC Research*, este valor passou para 3,3 bilhões em 2010, com estimativa para atingir 4,4 bilhões em 2015 (BBC RESEARCH, 2011).

A hidrólise enzimática apresenta diversas vantagens em relação a processos convencionais de hidrólise química, tais como maior rendimento, maior especificidade de reação, necessidade de menores temperaturas - o que culmina em menor geração de energia durante o processo e,

consequentemente, menor custo de produção -, condições mais brandas de pH durante o processo, já que este não necessita de meios com pH muito baixo (hidrólise ácida) ou elevado (hidrólise alcalina), como ocorre no caso da hidrólise química. Dessa forma, o processo ainda apresenta vantagem de ser conduzido com maior segurança e menores custos de manutenção, pois os equipamentos utilizados estão menos sujeitos à ação da corrosão, como ocorre nos processos químicos convencionais (KHAN, 2010).

Além disso, o mercado global da tecnologia enzimática, adequando-se à norma de reaproveitamento de subprodutos da indústria, demonstra notável interesse em processos que envolvam tecnologia de baixo custo energético, que utilize matérias-primas renováveis e de reduzido impacto ambiental (COELHO et al, 2001). Assim, tanto o mercado tecnológico de enzimas, quando as políticas ambientais contemporâneas convergem para evidenciar a importância do desenvolvimento e aprimoramento da biotecnologia de maneira geral.

A xilana e as enzimas xilanolíticas se inserem neste contexto e têm sido alvo de particular interesse para muitos pesquisadores (KULKARNI et al, 1999), devido ao seu potencial biotecnológico e amplo espectro de aplicação na indústria (COLLINS et al., 2005).

Xilanases têm importância no setor de agronegócios, onde são empregadas na produção de rações animais, juntamente com outras enzimas, como glucanases, pectinases, celulasas, proteases, amilases, fitases, galactosidases e lipases. Elas integram a formulação da ração animal e promovem a quebra de arabinoxilanas presentes na ração, conferindo redução à viscosidade do material bruto, aumentando a sua digestibilidade e elevando a taxa de absorção de nutrientes pelo animal, auxiliando o ganho de peso mais rapidamente. (POLIZELLI, 2005).

Na indústria alimentícia, como por exemplo, na panificação, xilanases podem ser utilizadas em conjunto com a α -amilase, que leva à produção de maltose, conferindo maior maciez e melhor textura da massa e do miolo do pão, bem como aumentando sua vida de prateleira, por manter o pão fresco por mais tempo. (MUSSATO et al, 2007). As xilanases também são empregadas na hidrólise de arabinoxilanas, contidas na farinha de trigo em uma quantidade de aproximadamente 2 a 3% (p/p) e responsáveis por

absorverem 1/3 da água adicionada à massa, impedindo o desenvolvimento do glúten e reduzindo, dessa forma, o volume do pão e qualidade da textura do mesmo. Ao realizar a hidrólise da arabinoxilana, as xilanases promovem a liberação da água retida nas arabinoxilanas, conferindo uma massa de melhor manuseabilidade e permitindo a obtenção de um produto final mais volumoso, com melhor estrutura de miolo e qualidade de textura (KULKARNI et al, 1999; HARBAK; THYGESEN, 2002; CAMACHO; AGUILAR, 2003). Além disso, xilooligossacarídeos em grande quantidade podem ser benéficos à saúde, pois influenciam no bom funcionamento do intestino delgado, melhorando a digestão e absorção de açúcares, na proteção de doenças cardiovasculares, prevenção de câncer do colo retal e auxiliam na regulação da evacuação intestinal periódica por promover o aumento do bolo fecal (MENEZES; DURRANT, 2008). Na indústria de biscoitos, a xilanase também é recomendada na fabricação de *cream-crackers* e *waffers*, por conferir uniformidade, melhoria na palatabilidade e textura do produto final (POLIZELLI et al, 2005).

Ainda na indústria alimentícia, as xilanases são empregadas no processo de clarificação de sucos e vinhos (BIELY, 1985), na mucilagem de café e na liquefação de frutas e vegetais (WONG et al., 1988), promovendo melhorias na estabilização da polpa de fruta, a recuperação de aromas naturais, óleos essenciais, vitaminas, sais minerais, cor, redução da viscosidade e hidrólise de compostos que impedem ou dificultam a clarificação física e química do suco, ou que possam causar o seu escurecimento.

Embora em menor escala, a xilanase é utilizada na indústria farmacêutica. A xilanase foi algumas vezes empregada, junto com um complexo de enzimas (hemicelulases, proteases e outras), em suplementos alimentares, mas poucos produtos medicinais possuem essa formulação (POLIZELLI et al, 2005). Outras aplicações das xilanases incluem a produção de biocombustíveis (etanol) a partir da fermentação do seu produto de hidrólise (xilose); de xilitol, um poliálcool de baixa caloria com poder adoçante comparável ao da sacarose (PARAJÓ, et al., 1998) com aplicações odontológicas e terapêuticas, devido às suas propriedades anticariogênica e remineralizadora, sendo também eficaz no tratamento e prevenção de diabetes

osteoporose e infecções respiratórias (MUSSATO; ROBERTO, 2002); e na indústria têxtil no processamento das fibras dos tecidos (BEG et al, 2001).

No entanto, é na indústria papelreira que as xilanases encontram sua maior e mais significativa aplicação. Ela é empregada no processo de branqueamento da polpa Kraft, constituindo uma importante via alternativa para o uso de compostos organoclorados. O processo de branqueamento convencional da polpa Kraft gera problemas ambientais devido à emissão destes compostos organoclorados nos efluentes, muitos dos quais são tóxicos, mutagênicos, bioacumuladores e persistentes, capazes de acarretarem numerosos desequilíbrios no meio ambiente e em seus sistemas biológicos. O emprego da xilanase ajuda a reduzir em grande parte a utilização de tais compostos ao longo do processo, além de ser uma substância biodegradável, reutilizável e não ofensiva ao meio ambiente. No processo, as xilanases atuam de forma altamente específica na abertura da estrutura da polpa, pela clivagem de ligações entre ligninas e carboidratos nela presentes. Como resultado, as xilanases promovem uma melhoria na pureza e qualidade da textura do papel.

1.5. Delineamento Experimental e Metodologia de Superfície de Resposta

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), é uma técnica de otimização baseada em planejamentos experimentais. A MSR é essencialmente um conjunto de técnicas estatísticas, composta por planejamento e análise de experimentos, que procura relacionar respostas com os níveis de fatores quantitativos (variáveis independentes) e suas interações (CUSTÓDIO, 2000).

Delineamentos experimentais são planejamentos formais desenvolvidos para conduzir experimentos, isto é, são testes elaborados de maneira planejada, onde os fatores (ou variáveis controladas) são alterados a fim de avaliar o seu impacto sobre uma variável resposta. Delineamentos experimentais se tornam opções muito convenientes quando comparados a métodos convencionais de análise tais como, por exemplo, o método de análise univariada, e o da análise total de combinações (fatorial completo).

A análise univariada (figura 4 a) se fundamenta em um procedimento experimental que consiste em fazer mudanças em uma das variáveis

estudadas enquanto mantêm-se todas as demais fixas, a fim de observar sua influência na variável resposta. Este tipo de procedimento possui a desvantagem de impossibilitar a verificação dos efeitos das interações entre as variáveis em estudo, as quais podem influenciar diretamente a variável resposta, o que o torna, além de dispendioso, pouco eficiente especialmente quando as variáveis em estudo são muitas.

A análise total de combinações ou planejamento fatorial completo (figura 4 b) consiste em verificar todas as variações possíveis entre os níveis das variáveis em estudo, investigando todo o espaço experimental em busca do melhor resultado para a variável resposta. Este tipo de procedimento, embora forneça a vantagem de explorar extensivamente o espectro de experimentos, traz a desvantagem de necessitar um grande número de medidas, agregando maior possibilidade de erros causados por variáveis não controladas, ou tornando-o inviável pelo número de ensaios requeridos.

Delineamentos experimentais são ferramentas utilizadas no intuito de promoverem uma boa quantidade e qualidade de informações acerca do processo estudado, sem sacrificar a sua eficiência ou viabilidade de execução. Existem diversas opções de delineamentos a serem escolhidos, cada qual com vantagens e desvantagens intrínsecas, de modo que a escolha e o emprego adequado de um determinado tipo de delineamento dependem, principalmente, da finalidade de sua aplicação e nível de conhecimento preliminar do pesquisador acerca do processo a ser analisado.

Delineamentos compostos centrais (DCC) (figura 4 c) são planejamentos experimentais muito utilizados dentro da metodologia de superfície de resposta. Foram desenvolvidos, inicialmente, por BOX e WILSON (1951) para estudo de funções polinomiais de resposta na indústria, sendo o erro experimental pequeno, e as condições do experimento mais facilmente controláveis (MATEUS et. al., 2001). É uma estratégia experimental que visa reduzir o tempo, o custo e o número de ensaios de um dado estudo - e, por conseguinte, a minimização de erros experimentais - em que se deseja reconhecer uma resposta mínima ou máxima para um determinado número de variáveis combinadas. Geralmente é empregado quando um planejamento fatorial com alto número de fatores e níveis tornaria a execução experimental inviável. Para sanar este problema, os DCC combinam um planejamento fatorial de dois

níveis com um planejamento axial, estruturado em relação a um ponto central, de modo a analisar uma dada região onde se acredita ou se tem indícios prévios de que nela se encontra o ponto ótimo da resposta desejada. Por este motivo, são modelos experimentais considerados bastante adequados para otimizar processos.

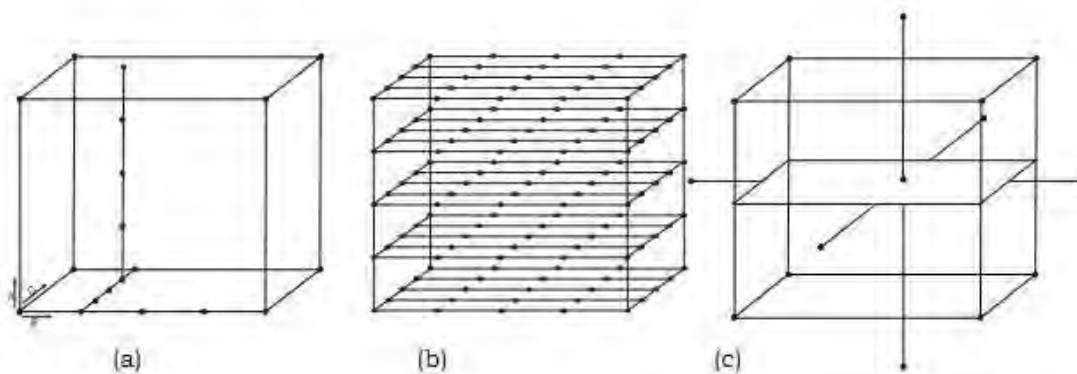


Figura 3. Algumas estratégias para condução de experimentos. a) análise univariada; b) planejamento fatorial completo; c) delineamento composto central (CHAVES, 2008)

Em geral, um planejamento composto central para k fatores, devidamente codificados como $(x_1, \dots, x_k)$, é constituído de três partes:

1. Uma parte chamada de fatorial (ou cúbica), contendo um total de n_{fat} pontos de coordenadas $x_i = -1$ ou $x_i = +1$, para todos os $i = 1, \dots, k$;
2. Uma parte axial (ou em estrela), formada por $n_{ax} = 2k$ pontos com todas as coordenadas nulas, exceto uma, que é igual a um certo valor α (ou $-\alpha$);
3. Um total de n_{centr} ensaios realizados no ponto central, onde $x_1 = \dots = x_k = 0$.

(BARROS NETO, 2001).

A figura 4 ilustra a representação de um delineamento composto central para 3 fatores.

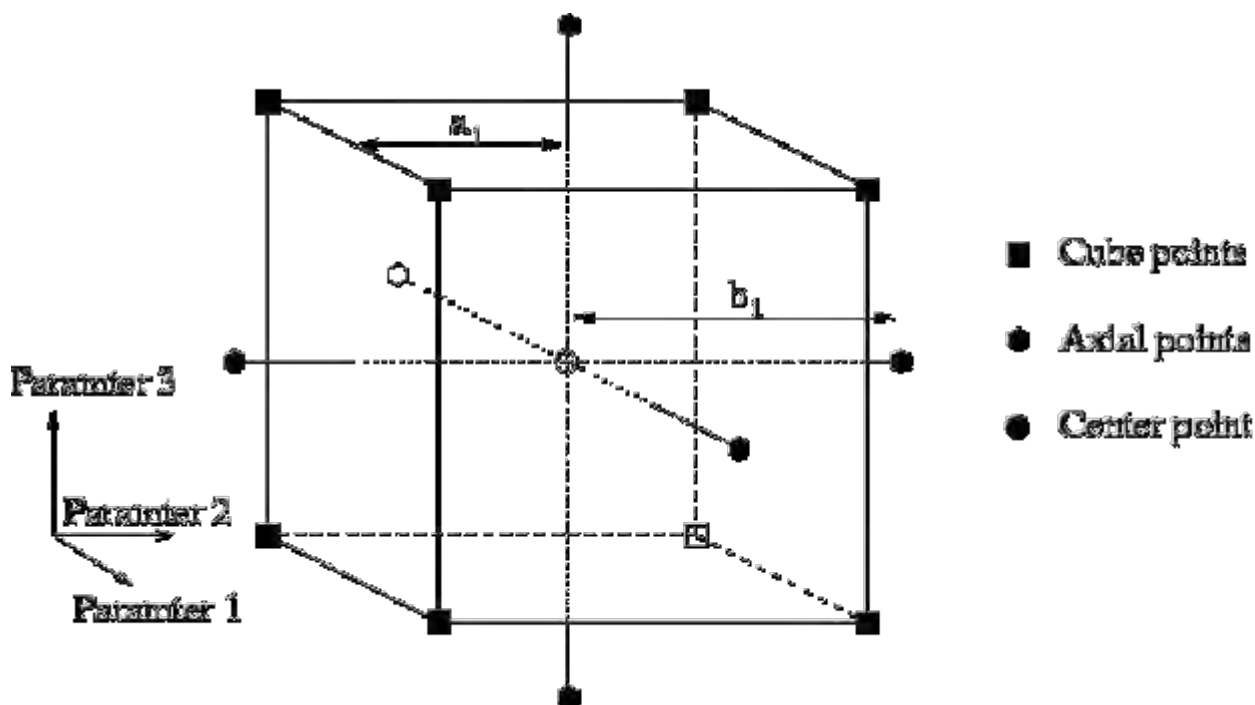


Figura 4. Representação de um DCC para 3 fatores. Pontos quadrados representam a parte cúbica – os ensaios de um fatorial 2^3 . Pontos circulares representam a parte axial. O ponto central é representado inscrito no cubo. a_1 e b_1 são as distâncias dos pontos cúbicos e axiais, respectivamente, em relação ao ponto central (PLASUN, R., 1999).

Neste caso hipotético, para $k = 3$ e três repetições no ponto central, o número total de ensaios do DCC corresponderia a 17, sendo 8 na parte cúbica (2^3), 6 na parte axial (2×3) e as repetições no ponto central.

Os pontos cúbicos são idênticos a um planejamento fatorial de dois níveis, distando +1 ou -1 em relação ao centro do delineamento. Os pontos axiais correspondem a um dado valor α , em geral definido entre 1 e $\sqrt{k}$. O total de níveis distintos num DCC é $n_{fat} + 2k + 1$.

Tabela 1. Composição de um DCC. O ponto central é codificado como 0, pontos fatoriais como -1 e +1, e axiais como $-\alpha$ e $+\alpha$.

n_{ax}	n_{fat}	n_{centr}	n_{fat}	n_{ax}
$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$

A tabela 2 apresenta uma comparação, quanto ao número de ensaios totais, entre a abordagem do planejamento fatorial completo e o delineamento composto central para a análise de um processo envolvendo 4 variáveis (fatores).

Tabela 2. Comparação entre planejamento fatorial completo e DCC para 4 variáveis independentes, quanto ao número total de experimentos.

Tipo de delineamento	Fatores (k)	Número de níveis	Tipo de varredura	Número de ensaios totais
DCC	4	2 + pontos axiais + ponto central	Parcial	$4^2 = 16 + 8 = 24$ +repetições no ponto central
Fatorial Completo	4	5	Completa	$4^5 = 1024$

A rotacionalidade é, por vezes, uma característica adicional atribuída ao delineamento composto central, cuja finalidade é garantir igual precisão na estimativa do valor da variável resposta, independentemente da direção em que a região ótima do processo em estudo se encontra. Ou seja, a rotacionalidade é uma propriedade que assegura que o caminho da resposta estimada é tão acurado quanto possível. Como o objetivo da MSR é justamente a localização de um ponto ótimo desconhecido, um delineamento que providencie precisão equivalente em qualquer direção dentro da região a ser analisada é altamente conveniente.

O conceito de rotacionalidade foi proposto por BOX e HUNTER (1957) como um critério para a escolha do valor de α . De uma maneira geral, para se atribuir rotacionalidade ao delineamento composto central, admite-se um valor de $\alpha = n_{fat}^{(1/4)}$.

2. OBJETIVOS:

2.1. GERAL

O objetivo do presente trabalho foi determinar as melhores condições de cultivo para a produção de enzimas xilanolíticas por *Aspergillus niger* (FCUP1) em sistema de fermentação submerso, através do uso de delineamento experimental do tipo composto central.

2.2. ESPECÍFICOS

- Desenvolver o DCC para as 4 variáveis independentes (pH, agitação, temperatura e fonte de carbono);
- Produzir xilanases através da execução dos ensaios conforme as condições pré-estabelecidas no delineamento experimental;
- Otimizar a produção de xilanases para as variáveis estudadas;
- Clarificar e purificar o filtrado de cultivo otimizado quanto à atividade xilanolítica;
- Analisar os produtos de hidrólise obtidos com a xilanase purificada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Micro-organismo

Como micro-organismo produtor de xilanases, foi utilizado um fungo filamentoso isolado por BENEDETTI (2009) a partir da polpa de cupuaçu em decomposição e estudado como sendo um bom produtor de xilanases. O fungo foi rotulado como FCUP1.

3.2. Manutenção do Micro-organismo

Para cultivo do FCUP1, foram preparados meios de cultura sólidos inclinados, contendo 2% de ágar e 4% de farinha de aveia (p/v), sendo o repique feito com auxílio de uma alça de platina esterilizada por aquecimento ao rubro, em uma câmara de fluxo laminar previamente irradiada com luz ultravioleta e sanitizada com álcool etílico 70% (v/v). Em seguida, o fungo foi incubado a uma temperatura de 37 °C por um período de quatro dias para obtenção de conídios e então foi estocado a 4 °C para posterior utilização na produção do extrato enzimático.

3.3. Identificação do Micro-organismo

Após isolado o fungo FCUP1, foi realizada a sua identificação taxonômica pelo grupo da Dr.^a Derlene Atilli de Angelis, do Centro de Estudo de Insetos Sociais do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro – SP. A identificação foi feita através de observação em microscópio, utilizando método de coloração em azul de lactofenol.

3.4. Delineamento Experimental

O planejamento de experimentos para otimização da produção de xilanases pelo micro-organismo isolado foi desenvolvido com a colaboração do Dr. Cristian Jacques Bolner de Lima, Unesp-Rio Claro. A estratégia escolhida para o processo de otimização foi o Delineamento Composto Central

Rotacional (DCCR), com quatro repetições no ponto central, e para quatro variáveis independentes. As variáveis foram: pH, quantidade de fonte de carbono, temperatura e velocidade de agitação do meio de cultivo. A confecção do delineamento experimental foi realizada através do programa de computador STATISTICA® 7.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). O plano de experimentos incluiu um total de 28 ensaios.

A tabela 3 apresenta os pontos fatoriais, axiais e centrais do DCC e valores correspondentes para cada uma das 4 variáveis independentes

Tabela 3. Valores dos pontos central, fatoriais e axiais para as 4 variáveis independentes do DCC.

DCC – pontos central, fatoriais e axiais					
Fatores	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
x_1 (pH)	5	6	7	8	9
x_2 (temperatura - °C)	27	32	37	42	47
x_3 (agitação – rpm)	80	100	120	140	160
x_4 (fonte de carbono - %)	0	0,5	1	1,5	2

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada, utilizando a seguinte equação (3.4.1) de codificação:

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (3.4.1)$$

Onde X_n é o valor da variável no experimento na forma codificada;

X é o valor real da variável a ser calculado;

X_0 é o valor real da variável no ponto central;

X_{+1} é o valor real da variável no nível superior;

X_{-1} é o valor real da variável no nível inferior.

Na Tabela 4 está ilustrada a matriz do planejamento experimental com o total de ensaios e os níveis das variáveis independentes representados na forma adimensionalizada (codificada).

Tabela 4. Matriz do Planejamento Experimental gerado pelo *software* STATISTICA® 7.0, com variáveis independentes representadas na forma adimensionalizada.

Matriz do Planejamento Experimental - Valores Codificados				
Experimento	x_1	x_2	x_3	x_4
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	1
3	-1	-1	1	-1
4	-1	-1	1	1
5	-1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1
8	-1	1	1	1
9	1	-1	-1	-1
10	1	-1	-1	1
11	1	-1	1	-1
12	1	-1	1	1
13	1	1	-1	-1
14	1	1	-1	1
15	1	1	1	-1
16	1	1	1	1
17	$-\alpha$	0	0	0
18	α	0	0	0
19	0	$-\alpha$	0	0
20	0	α	0	0
21	0	0	$-\alpha$	0
22	0	0	α	0
23	0	0	0	$-\alpha$
24	0	0	0	α
25 (C)	0	0	0	0
26 (C)	0	0	0	0
27 (C)	0	0	0	0
28 (C)	0	0	0	0

x_1 = pH

x_2 = Temperatura (°C)

x_3 = Agitação (rpm)

x_4 = Fonte de carbono (%)

(C) = ponto central

A tabela 5 apresenta a matriz do planejamento experimental com o total de ensaios e os níveis das variáveis independentes representados na sua forma dimensionalizada (valores definidos dentro de grandezas apropriadas para cada uma das variáveis).

Tabela 5. Matriz do Planejamento Experimental gerado pelo *software* STATISTICA® 7.0, com variáveis independentes representadas na forma dimensionalizada.

Matriz do Planejamento Experimental - Valores Reais				
Experimento	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Fonte de carbono (%)
1	6	32	100	0,5
2	6	32	100	1,5
3	6	32	140	0,5
4	6	32	140	1,5
5	6	42	100	0,5
6	6	42	100	1,5
7	6	42	140	0,5
8	6	42	140	1,5
9	8	32	100	0,5
10	8	32	100	1,5
11	8	32	140	0,5
12	8	32	140	1,5
13	8	42	100	0,5
14	8	42	100	1,5
15	8	42	140	0,5
16	8	42	140	1,5
17	5	37	120	1
18	9	37	120	1
19	7	27	120	1
20	7	47	120	1
21	7	37	80	1
22	7	37	160	1
23	7	37	120	0
24	7	37	120	2
25 (C)	7	37	120	1
26 (C)	7	37	120	1
27 (C)	7	37	120	1
28 (C)	7	37	120	1

3.5. Confeção das superfícies de respostas

Após calculada a atividade específica, gráficos de superfície de resposta demonstrando a relação entre as variáveis independentes estudadas e o rendimento na produção de enzimas foram elaborados, os quais ilustram as regiões de ótimo para produção de xilanases pelo fungo FCUP1. Os gráficos de superfície de resposta e a análise estatística dos resultados do delineamento experimental foram desenvolvidos com auxílio do Dr. Cristian Jacques Bolner de Lima com utilização do *software* Statística®.

A partir dos resultados obtidos através do DCCR, um novo extrato enzimático foi preparado, de acordo com os melhores valores observados para as variáveis estudadas para a produção de xilanase pelo *Aspergillus niger* FCUP1. O novo extrato produzido teve sua atividade xilanolítica determinada e foi então utilizado nos ensaios subsequentes deste trabalho.

3.6. Meio de cultivo

O sistema utilizado para o crescimento do fungo e produção de xilanases no presente trabalho foi o de fermentação submersa, cuja composição do meio de cultivo foi estabelecida nos estudos de BENEDETTI (2009). O meio de cultivo utilizado por BENEDETTI foi denominado “M4 modificado”, e composto por CaCO_3 (0,2%), NaCl (0,5%), NH_4Cl (0,1%), água de maceração de milho (0,5%), e sabugo de milho procedente da empresa RASUL-PR, como fonte de carbono (0% - 2%) e água destilada.

3.7. Produção dos extratos xilanolíticos

Para a produção dos extratos enzimáticos, os meios de cultivo foram preparados com valores de pH e concentração de fonte de carbono de acordo com o planejamento de experimentos, e então esterilizados em autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Após a esterilização, os meios de cultivo foram inoculados com uma suspensão de conídios coletada a partir do meio de cultura de manutenção do micro-organismo, e então incubados em mesa incubadora com agitação orbital variando entre 80 e 160 rpm, e temperatura

variando entre 27 °C a 47 °C, dependendo do experimento conduzido no planejamento, sendo o crescimento interrompido após 18 horas. Em seguida, cada meio de cultivo foi filtrado à vácuo em papel Whatman nº1. O filtrado foi utilizado como fonte de enzimas xilanases extracelulares e submetido à determinação de proteína e da atividade enzimática.

3.8. Determinação do coeficiente de extinção molar da xilose

Para dosagem de açúcares redutores liberados na hidrólise do substrato (xilana) pela ação da enzima xilanase, utilizou-se o método de MILLER (1959). Como referência utilizou-se xilose. Para a obtenção da curva de calibração fez-se diluições da xilose (1,0 mg/mL) em água milliQ, e então acrescidas de ácido 3-5'-dinitrossalicílico (DNS), aquecidas por cinco minutos em água fervente, resfriadas, e a seguir foi adicionado 2,5 mL de água e então submetidas à leitura em $\lambda = 540$ nm. A absorvidade molar fornecida pela curva de referência da xilose foi utilizada para calcular a quantidade de açúcares redutores liberados nos ensaios de atividade enzimática dos extratos de xilanolíticos.

3.9. Curva de calibração de proteína

A curva de referência para quantificação de proteínas foi construída utilizando-se o método de LOWRY (1951) modificado por HARTREE (1972), com soroalbumina bovina como padrão. A soroalbumina bovina (1 mg/mL) foi diluída em diversas concentrações em água milliQ. A estas diluições foi adicionada uma solução (solução A) composta de Na_2CO_3 2% (p/v) em NaOH (0,1 mol/L), CuSO_4 1%(p/v) e tartarato de sódio e potássio 1% (p/v) em água milliQ, sendo então agitadas. Após 15 minutos de reação, foi adicionado folin-ciocalteau (1:1 em água miliQ) e, após 30 minutos, foi realizada leitura em $\lambda = 660$ nm. A absorvidade determinada na curva de referência de soroalbumina bovina foi utilizada para calcular a quantidade de proteínas contidas nos extratos xilanolíticos.

3.10. Dosagem de proteínas dos extratos de xilanase

A dosagem de proteína nos filtrados de cultivo foi realizada através da metodologia descrita no item 3.9. Para tanto, diluições em água milliQ do extrato bruto foram preparadas em tubos de ensaio (10 μ L, 20 μ L, e 40 μ L em volume final de 500 μ L) e então acrescidas de 2,5 mL de solução A e agitadas. Após 15 minutos de reação, 250 μ L de folin-ciocalteau 1:1 (v/v) em água miliQ foram acrescidos aos tubos. Estes foram novamente agitados e após 30 minutos de reação, foi realizada a leitura em $\lambda = 660$ nm.

3.11. Determinação da atividade xilanolítica

Para a execução do ensaio de atividade enzimática foram preparadas soluções contendo 27 mg de xilana *birchwood* (Sigma® lote 52H0544) como substrato, 4 mL de solução tampão acetato de sódio 50 milimol/L pH 5,0, e 1 mL de extrato de xilanase, perfazendo um volume final de 5 mL (BIELY, 1985). Os ensaios foram conduzidos a 50 °C, sob agitação constante por 15 minutos, sendo retiradas alíquotas de 250 μ L imediatamente após adição da enzima (branco) e a cada 5 minutos, adicionadas a tubos contendo 250 μ L de DNS. A atividade enzimática da xilanase nos filtrados de cultivo foi determinada por método colorimétrico, utilizando-se o reagente ácido 3,5'-dinitrosalicílico (DNS) para quantificação do produto de hidrólise. Os tubos foram então submetidos a banho de fervura por 5 minutos, resfriados e acrescidos de 2,5 mL de água destilada para verificação da variação de densidade ótica em $\lambda = 540$ nm. Uma unidade (U) de atividade xilanolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 micromol de açúcar redutor por minuto nas condições do ensaio. A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

3.12. Clarificação dos extratos de xilanase com caulim

A clarificação foi realizada com vistas à obtenção de um extrato mais puro, com eliminação de pigmentos e polissacarídeos remanescentes do processo de fermentação da fonte de carbono e produção da enzima.

Ao extrato de xilanase foi adicionado caulim (2 g / 100 mL de extrato), sendo agitado cuidadosamente com uma bagueta. Em seguida, o extrato foi resfriado à temperatura de 4 °C e mantido em repouso por duas horas, centrifugado sob refrigeração a 4 °C a 12.400 x *g* por 20 minutos em centrífuga refrigerada Hitachi HIMAC CR22GII utilizando rotor R13AF. O extrato de enzimas então foi filtrado em papel de filtro, com auxílio de uma bomba a vácuo. O filtrado recolhido foi armazenado em refrigerador para posterior dosagem de proteínas e atividade enzimática.

3.13. Precipitação com acetona

Para a precipitação de proteínas do extrato de xilanase, foi utilizada acetona 3 volumes a frio (4 °C). A solução foi mantida, *overnight*, sob refrigeração. O precipitado então foi coletado e em seguida centrifugado a 12400 x *g* por 20 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e realizou-se a volatilização do excesso de acetona contido no precipitado, vertendo-se os tubos e submetendo o precipitado à ventilação constante, sendo a temperatura mantida baixa durante o processo. Após isto, o precipitado foi ressuspendido no menor volume possível de água milliQ e então congelado para posteriormente ser utilizado para dosagens de proteína e de atividade enzimática.

3.14. Purificação parcial da enzima em Sephadex® G-75

Para a purificação parcial do extrato xilanolítico, após tratamento com caulim e precipitação com acetona 3 volume (v/v) a frio, as proteínas foram submetidas, primeiramente, a uma coluna de 1 cm de diâmetro e 50 cm de altura contendo gel de Sephadex® G-75, previamente tratada com solução de bicarbonato de sódio 20 milimol/L e tampão fosfato de sódio 50 milimol/L pH 6,8. O filtrado foi coletado em coletor automático Pharmacia® LKB-FRAC-200, em frações de 70 gotas por tubo (2,0 mL). As frações foram então submetidas à determinação de presença de proteínas pela análise da absorbância em $\lambda = 280$ nm, e da atividade enzimática. As frações correspondentes ao pico 2 que

apresentaram atividade enzimática e absorbância em 280 nm foram reunidas, dialisadas e liofilizadas.

3.15. Cromatografia de troca iônica em DEAE-Trisacryl

A fração proveniente da filtração foi submetida a uma coluna de 1,5 cm de diâmetro e 15 cm de altura, contendo resina de troca iônica DEAE-Trisacryl, previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 5 milimol/L pH 6,8. Após a eluição foi aplicado um gradiente contínuo de NaCl de 0 - 0,5 mol/L. Novas frações de 2 mL foram então recolhidas e submetidas à determinação qualitativa de proteínas em $\lambda = 280$ nm e à análise de atividade enzimática utilizando xilana como substrato.

3.16. Cromatografia em Camada Delgada Sílica-Gel P60

O produto de hidrólise da xilana birchwood pela ação da xilanase em diferentes tempos de reação foi verificado por cromatografia em camada delgada de sílica-gel P60 (Merck). Foram coletadas frações de 100 μ L em 30, 60 e 90 minutos de um ensaio enzimático conduzido em banho-maria a 37 °C contendo 14 mg de xilana, 1,9mL de solução tampão acetato de sódio 50 milimol/L pH 5,0 e 600 μ L do extrato concentrado e purificado. Estas frações foram aplicadas na cromatofolha juntamente com xilose e xilobiose, que foram utilizados como padrões. O sistema de solvente utilizado foi constituído de acetato de etila / ácido acético / ácido fórmico / água (9:3:1:4 v/v/v/v). A cromatografia foi revelada com orcinol 0,2 % em ácido sulfúrico : metanol (1:9 v/v) e exposição ao calor (100 °C) por 5 minutos, conforme descrito por FONTANA *et al* (1988).

3.17. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O extrato de xilanase purificado foi submetido à eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) de acordo com o método de LAEMMLI (1970) em gel de poliacrilamida em concentração de 12% para a determinação da quantidade de proteínas contidas no extrato e estimativa da massa molecular

das mesmas. O kit "LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis" (Amersham Biosciences, Fairfield, CT, USA) foi utilizado como marcador molecular, contendo as seguintes proteínas como padrões: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). O método de revelação empregado foi por coloração com nitrato de prata, de alta sensibilidade e específico para detecção de proteínas (MERRIL et al, 1984).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação do micro-organismo

O micro-organismo isolado apresentou as seguintes características microscópicas em azul de lactofenol: cabeças conidiais radiadas, vesículas globosas a subglobosas de 40,0-65,0 μm de diâmetro; conidióforos longos e grossos, de parede lisa, acastanhados. Células conidiogênicas bisseriadas. Métulas medindo 11,5-22,5 x 3,25-4,5 μm e fiálides de 7,5-12,0 x 2,5-4,0 μm . Conídios acastanhados, esféricos a sub-esféricos, verrucosos, 4,5-6,0 μm de diâmetro, e presença de célula-pé. Após a identificação, o micro-organismo foi caracterizado como sendo *Aspergillus niger* FCUP1 (figura 5).



Figura 5. Imagem de microscopia ótica do fungo isolado do fruto de cupuaçu e classificado como *Aspergillus niger* (FCUP1).

Além da classificação morfológica, a linhagem denominada FCUP1 foi identificada por taxonomia molecular como *Aspergillus niger* van Tieghem, pela Fundação André Tosello, Campinas, SP (OS 120017).

O resultado da identificação do fungo isolado corrobora com os estudos prévios de BENEDETTI (2009), em que foi concluído que tal fungo era um bom produtor de xilanases. De fato, a espécie *Aspergillus niger* é uma das principais fontes utilizadas na produção de xilanases para aplicação na indústria. Na tabela 6, pode-se observar uma lista das principais enzimas de importância comercial produzidas por fungos e sua fonte produtora correspondente.

Tabela 6 – Enzimas fúngicas de importância comercial. Fonte: HAMLYN, 1998.

Enzima	Principal Fonte
Asparaginase	<i>Aspergillus spp. e Penicillium spp.</i>
Amilase	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>
Catalase	<i>A. niger, Penicillium spp</i>
Celulase	<i>A. niger, Trichoderma reesei, T. viride, Penicillium finiculosum</i>
Dextranase	<i>Penicillium spp.</i>
β -Glucanase	<i>A. niger, Penicillium emersonii, T. reesei, T. viride</i>
Glucoamilase	<i>A. niger, A. oryzae</i>
Glicose oxidase	<i>A. niger, Penicillium spp.</i>
Hemicelulase	<i>A. niger, A. oryzae, T. reesei, T. viride, P. emersonii</i>
Lacase	<i>Pyricularia oryzae</i>
Lipase	Várias espécies, incluindo <i>A. niger, A. oryzae</i>
Pectinase	Várias espécies, incluindo <i>A. niger, Rhizopus oryzae</i>
Protease	Várias espécies, incluindo <i>A. niger, A. oryzae</i>
Renina	<i>Mucor miehei, Endothia parasitica</i>
Tannase	<i>A. niger, A. oryzae</i>
Xilanase	<i>A. niger, T. reesei</i>

O fungo *Aspergillus niger* é um fungo filamentoso ascomiceto mesófilo e termotolerante, de abundante distribuição no meio ambiente, podendo ser encontrado no solo, na serrapilheira, e em dejetos e adubos orgânicos. É um fungo capaz de crescer em um amplo espectro de temperatura (6 °C - 47 °C), com valor de atividade de água (medida, com escala de 0 a 1,0 que indica a disponibilidade de água livre no meio para participação em reações físico-químicas) limite para seu crescimento de 0,88, considerado relativamente alto entre as espécies do gênero *Aspergillus* e bastante elevado em relação à maioria das espécies de bolores. Também é capaz de resistir e crescer em

uma faixa extremamente ampla de pH: 1.4 – 9.8. Tais características, somadas à profusa capacidade de produção de conidiósporos, não apenas conferem ao *Aspergillus niger* uma grande capacidade de adaptação a diversos ambientes, como também um alto potencial de aplicação no setor biotecnológico (SCHUSTER et al., 2002).

4.2. Curvas de calibração para determinação de açúcares redutores e proteínas

As figuras 6 e 7 mostram, respectivamente, as curvas de calibração para dosagem de proteínas e açúcares redutores.

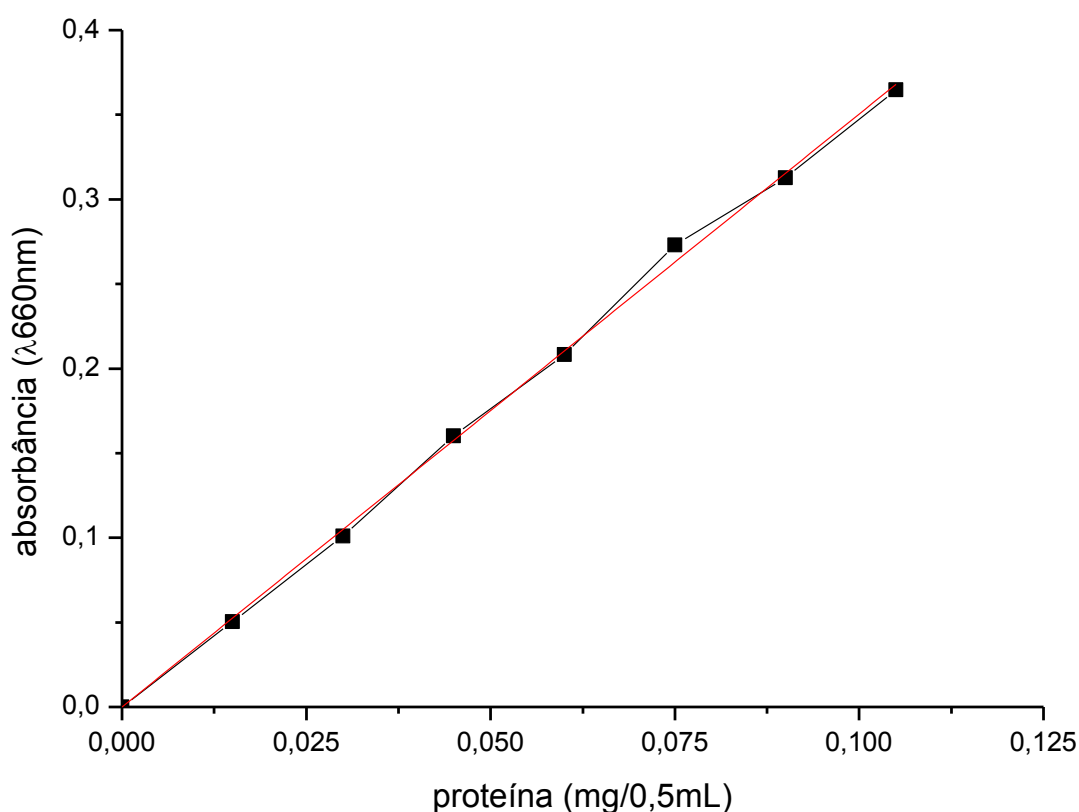


Figura 6 - Curva de calibração para dosagem de proteínas pelo método de Lowry (1972), utilizando soroalbumina bovina como padrão.

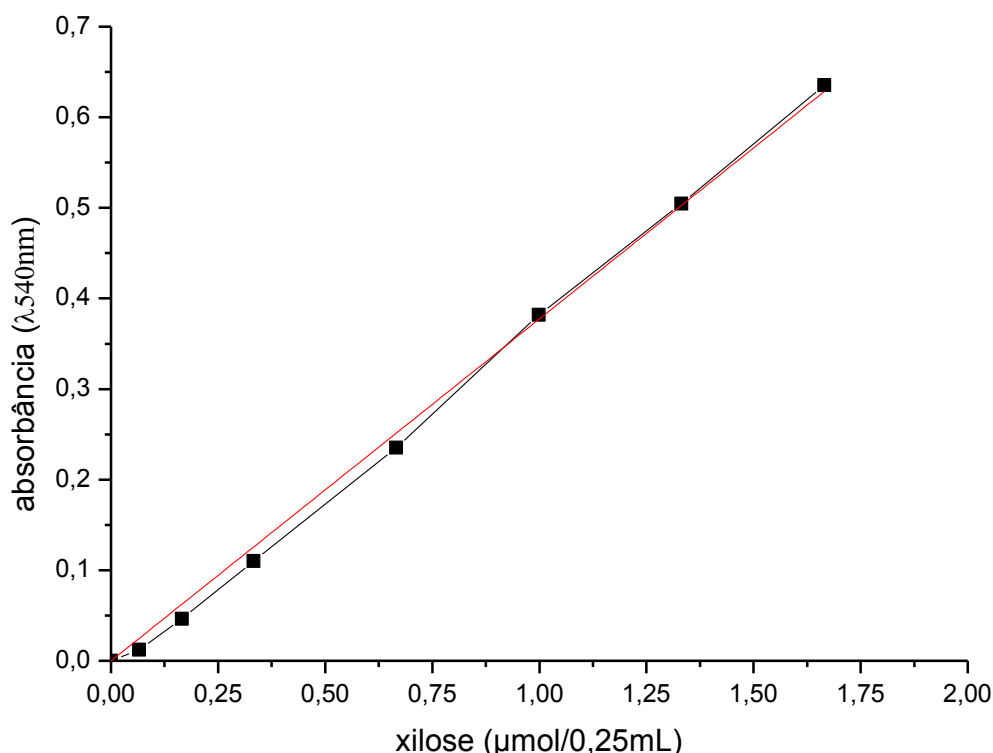


Figura 7 - Curva de calibração para dosagem de açúcares redutores pelo método de Miller (1959), utilizando xilose como padrão.

Pode-se observar, com base nos gráficos, que o coeficiente de correlação de ambas as curvas apresentou um valor bem próximo de 1 (0,998 para xilose e 0,999 para proteínas), tornando-as boas referências para dosagem precisa nos ensaios de determinação de açúcares redutores e dosagem de proteínas dos extratos enzimáticos produzidos. As medidas foram conduzidas em cubetas de 3 mL com 1 cm de diâmetro. A absorvidade (ϵ) apresentada para soroalbumina bovina foi igual a $1,75 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 25°C e a absorvidade molar da xilose foi igual a $94,35 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.3. Delineamento Composto Central

A determinação dos parâmetros significativos foi realizada através de um teste de hipótese utilizando t de Student com nível de significância de 5%, sendo desconsiderado, para o resultado obtido da xilanase (atividade

enzimática) os parâmetros que apresentam nível de significância maior que este valor. O coeficiente de correlação quadrático R^2 e a comparação entre o F_C (Fato calculado) e o F_T (Fator tabelado) foram utilizados também para todas as respostas, a fim de constatar a significância ou não do modelo.

Os resultados obtidos no delineamento composto central rotacional (DCCR) a partir das variáveis estudadas: pH, temperatura (°C), agitação (rpm), e fonte de carbono (%) empregando o fungo isolado *Aspergillus niger*, encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Matriz do planejamento experimental com resultados em atividade específica da enzima xilanase produzida por *Aspergillus niger*.

Experimento	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Fonte de carbono (%)	Ativ. Específica (U/mg prot.)
1	6	32	100	0,5	0,9328
2	6	32	100	1,5	1,1810
3	6	32	140	0,5	0,2826
4	6	32	140	1,5	0,4803
5	6	42	100	0,5	0,1030
6	6	42	100	1,5	1,4632
7	6	42	140	0,5	0,1013
8	6	42	140	1,5	0,1851
9	8	32	100	0,5	0,0270
10	8	32	100	1,5	1,1169
11	8	32	140	0,5	0,0238
12	8	32	140	1,5	0,8921
13	8	42	100	0,5	0,4288
14	8	42	100	1,5	0,1161
15	8	42	140	0,5	0,0691
16	8	42	140	1,5	0,1298
17	5	37	120	1	1,3070
18	9	37	120	1	0,2600
19	7	27	120	1	0,0245
20	7	47	120	1	0,0165
21	7	37	80	1	1,4530
22	7	37	160	1	0,3276
23	7	37	120	0	0,0293
24	7	37	120	2	1,2250
25 (C)	7	37	120	1	0,5094
26 (C)	7	37	120	1	0,5156
27 (C)	7	37	120	1	0,4944
28 (C)	7	37	120	1	0,5175

Com base na interpretação preliminar dos dados da matriz do planejamento experimental, podemos inferir que a quantidade de fonte de carbono exerceu notável influência na produção de xilanase pelo micro-

organismo, apresentando melhor produtividade quando o meio M4 foi provido de maior quantidade de sabugo de milho (experimentos 2, 6, 10, 12, 17, 21 e 24). Quanto ao pH, pôde-se observar que o micro-organismo apresentou melhor produção de xilanases em meios mais ácidos, com valor de pH 5 (experimento 17). Baixas rotações por minuto durante o período de incubação do fungo também resultaram em melhor produção de xilanases pelo fungo (experimentos 2, 6, 10, e 21). O melhor valor da temperatura para a produção de xilanases, individualmente, não foi significativo, pois tal variável apresentou boa produção de enzimas para uma faixa bastante ampla de valores (32 °C a 42 °C); contudo, pôde-se observar que a temperatura apresentou melhores valores diferentes para melhor produção de enzimas quando interagindo com valores das variáveis fonte de carbono e pH, como pode ser observado nos experimentos 1 a 16. Nestes experimentos, quando o pH do meio foi ajustado para 6, valores mais baixos de temperatura (32 °C) se mostraram melhores para produção de xilanases em meios com menor concentração de fonte de carbono (0,5%), já para maiores concentrações (1,5%), a temperatura apresentou valores mais altos como sendo melhores para a produção de enzimas. Comparativamente, quando o pH do meio foi ajustado para 8, o inverso ocorreu, ou seja, maiores valores de temperatura (42 °C) para menores concentrações de fonte de carbono (0,5%), e menores temperaturas (32 °C) para maiores concentrações de fonte de carbono (1,5%) proporcionaram melhores condições para produção de xilanase. Não obstante, pode-se estimar que a temperatura ideal se encontra próxima ao ponto central, isto é, 37 °C, já que valores de temperatura definidos em $-\alpha$ (27 °C) e $+\alpha$ (47 °C) apresentaram produção de xilanases muito baixa (experimentos 19 e 20), e valores compreendidos entre 32 °C e 42 °C demonstraram melhores resultados (experimentos 1 a 16, 17, 21 e 24).

Para melhor compreensão dos resultados observados na tabela 7 e validação estatística, foi realizada uma análise de múltipla regressão, significância, e estudo de interação entre as variáveis independentes através do *software* *Statística 7.0*.

4.3.1. Análise de regressão dos resultados obtidos na produção de xilanase a partir das variáveis estudadas.

Após a realização da regressão múltipla no programa *Statistic 7.0*, obteve-se a seguinte equação geral (4.3.1.1) para a síntese de xilanase.

$$\begin{aligned} \text{Xilanase (U/mL)} = & 0,509225 - 0,167488X_1 - 0,098171X_2 - 0,227313X_3 + \\ & 0,249479X_4 - 0,018244X_1X_2 + 0,128544X_1X_3 - 0,011481X_1X_4 - 0,002931X_2X_3 - \\ & 0,075756X_2X_4 - 0,073444X_3X_4 + 0,050309X_1X_1 - 0,140441X_2X_2 + 0,077009X_3X_3 \\ & + 0,011222X_4X_4 \end{aligned}$$

(4.3.1.1)

Contudo, foram eliminadas as variáveis com nível de significância superior a 5%. Assim, foram desprezadas a variável linear X_2 (Temperatura), as quadráticas X_1X_1 , X_3X_3 e X_4X_4 , e as interações X_1X_2 , X_1X_3 , X_1X_4 , X_2X_3 , X_2X_4 , X_3X_4 .

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos dos efeitos significativos das variáveis estuda, juntamente com o coeficiente de determinação (R^2) e o valor de F da distribuição de Fisher como resposta à produção de xilanase.

Tabela 8 - Resultados da análise de regressão múltipla para a produção de xilanase.

Fator Codificado	Parâmetro	t de student	Nível de significância
Constante β_0	0,6478	0,0776	8,350
X_1	-0,1675	0,0633	-2,644
X_3	-0,2273	0,0633	-3,589
X_4	0,2495	0,0633	3,939
X_2X_2	-0,1635	0,0592	-2,760
$R^2 = 0,7$		$F_c = 10,75$	$F_t(4,23) = 2,80$

Constata-se, na Tabela 8, que as variáveis isoladas X_1 (pH), X_3 (agitação) e X_4 (quantidade de fonte de carbono) influenciaram significativamente no processo, bem como a variável quadrática X_2X_2 , o que demonstra que embora isoladamente a temperatura não tenha exercido

influência significativa, quando em conjunto com as demais variáveis ela se mostra importante no processo. Os sinais dos coeficientes dessas variáveis indicam um ponto de máximo na produção da xilanase.

O coeficiente de correlação (R^2) de 0,7 indica um ajuste satisfatório dos dados experimentais na resposta de produção de xilanase, mostrando que 70% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta. O resultado de F calculado (F_c) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 5%. Tal comparação pode ser interpretada através de um teste de hipótese. A hipótese de nulidade (H_0) diz que o modelo não é significativo, ou seja, todos os parâmetros são iguais a zero. A hipótese alternativa (H_1) afirma que o modelo é significativo. O resultado do teste F mostrou que se pode rejeitar H_0 no nível de significância de 5%, ou seja, tem-se uma confiança de 95% de significância do modelo obtido. Esta análise foi extrapolada para as demais respostas obtidas nos planejamentos experimentais realizados.

Assim, após a eliminação dos parâmetros não significativos, conforme apresentado na Tabela 8, obteve-se a seguinte equação ajustada (4.3.1.2):

$$\text{Xilanase (U/mL)} = 0,647766 - 0,167488X_1 - 0,227313X_3 + 0,249479X_4 - 0,163531X_2X_2 \quad (4.3.1.2)$$

A Figura 8 mostra o gráfico de valores preditos versus observados. Nota-se que os valores observados ficaram próximos dos preditos, levando a uma tendência constante e à distribuição normal dos mesmos.

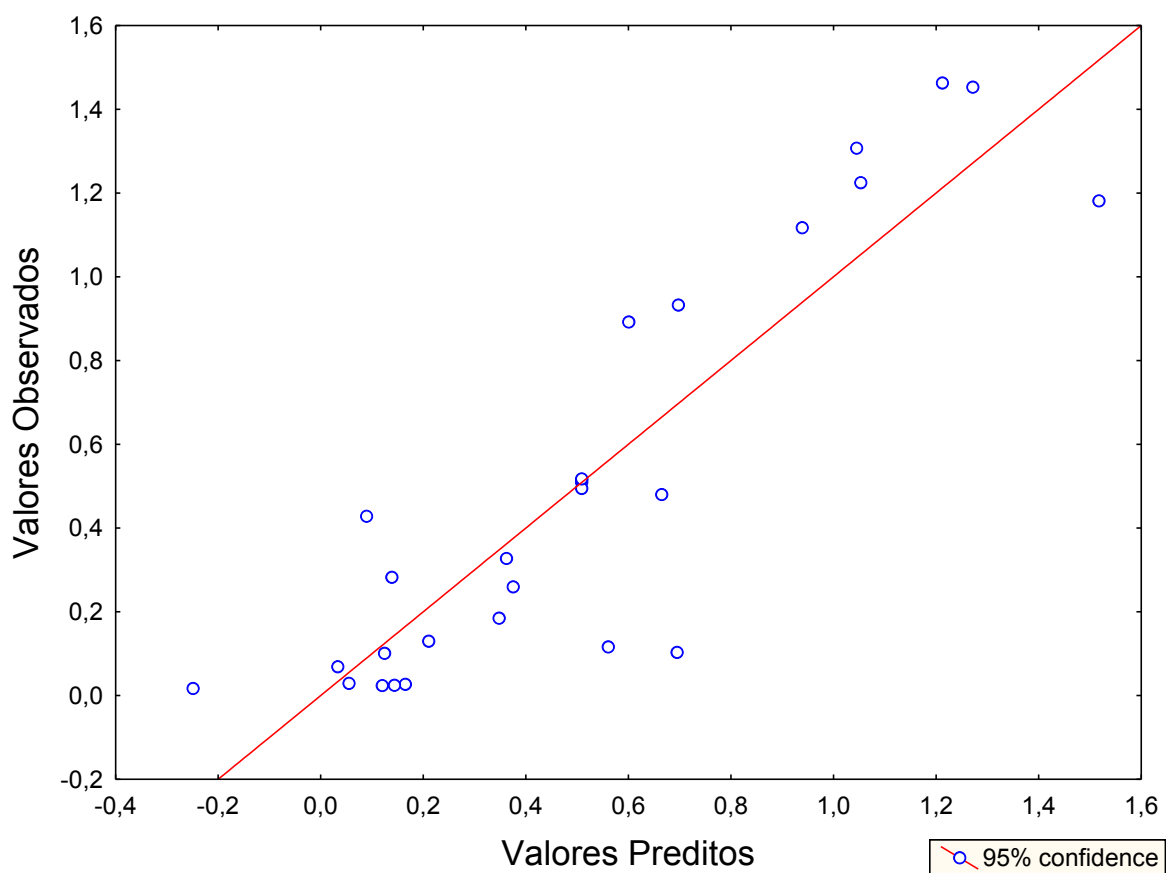


Figura 8. Valores preditos em função dos observados, relativo à produção de xilanase.

Para maior facilidade de visualização do efeito das variáveis independentes (pH, temperatura, agitação e fonte de carbono) sobre a produção da xilanase pelo *Aspergillus niger*, foram construídas superfícies de resposta, que estão ilustradas nas figuras 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

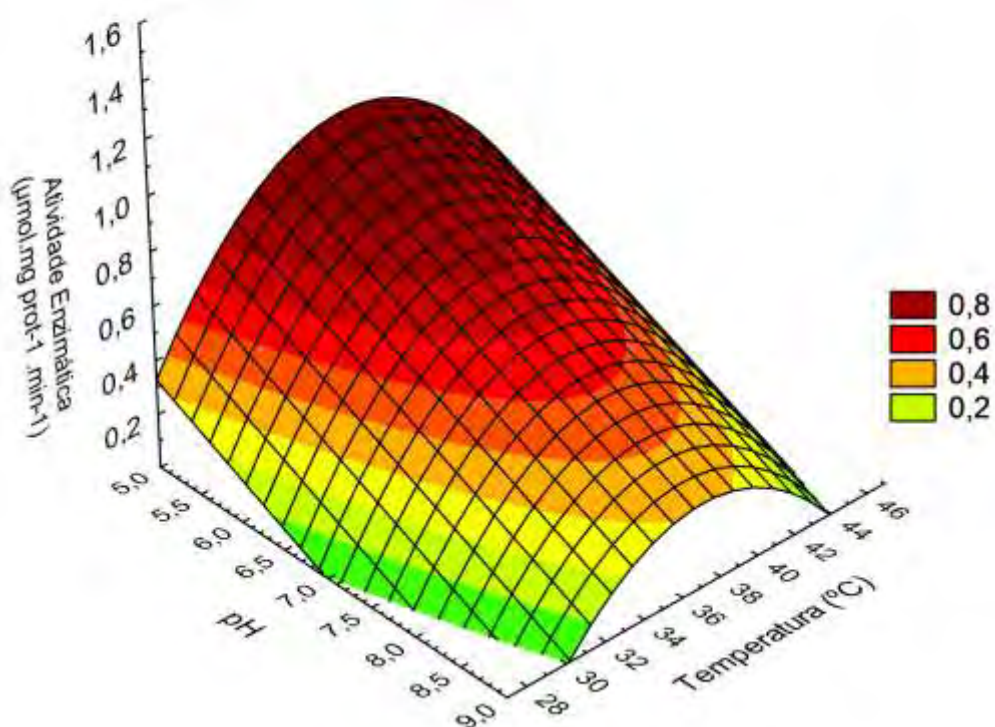


Figura 9. Superfície de resposta para a atividade enzimática em função do pH e da temperatura.

Na Figura 9, observa-se na superfície de resposta uma tendência ao aumento na produção de xilanase nos menores valores de pH (5,0), e temperatura variando entre 32 °C e 42 °C.

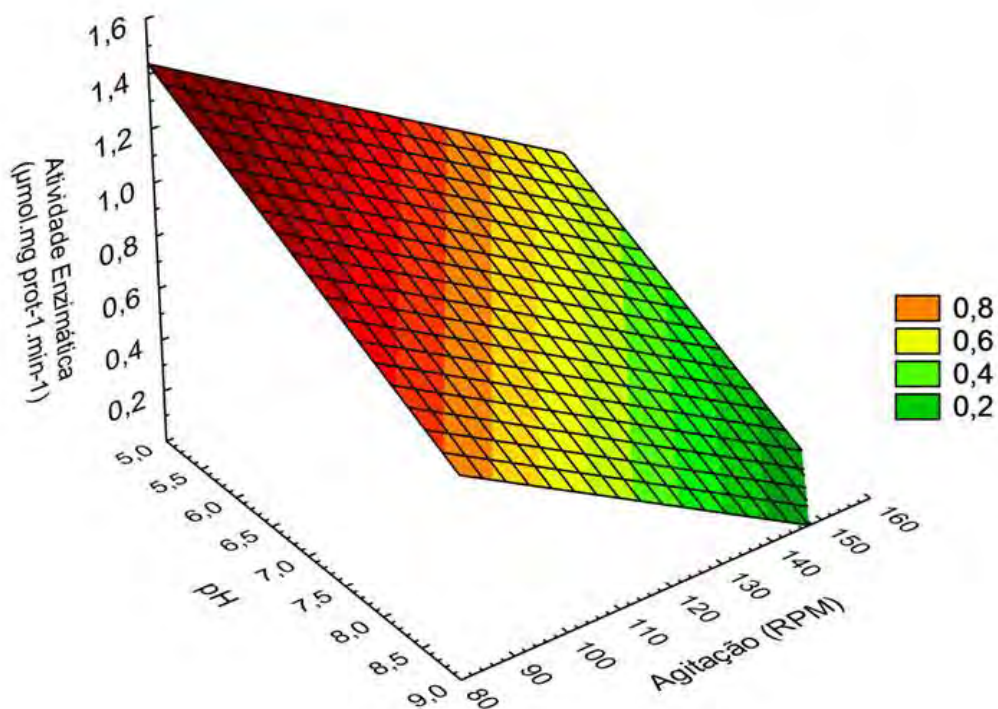


Figura 10. Superfície de resposta para a atividade enzimática em função do pH e da agitação.

Na superfície de resposta obtida para a atividade enzimática em função do pH e da agitação, há uma tendência de aumento na produção de xilanase no sentido dos menores valores de pH (5,0) e na diminuição da agitação (80 rpm).

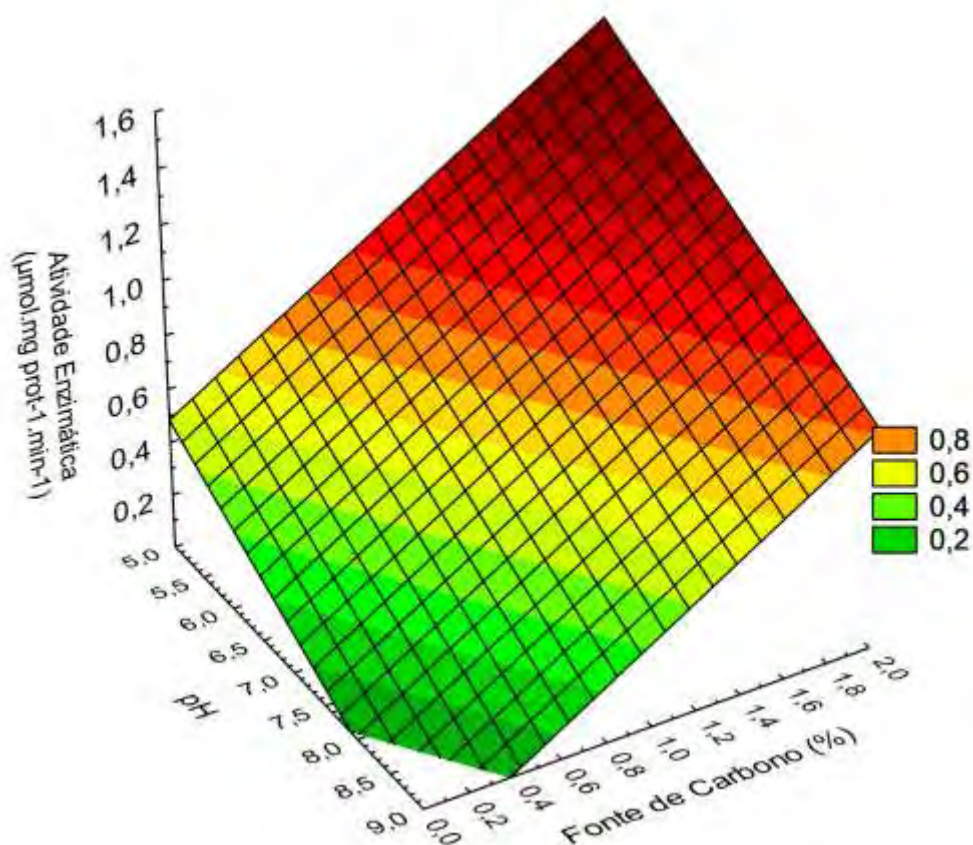


Figura 11. Superfície de resposta para a atividade enzimática em função do pH e da fonte de carbono.

Os melhores valores para a produção de xilanase foram obtidos nos experimentos 6 (1,46 U/mg prot), 21 (1,45 U/mg prot.), 17 (1,3 U/mg prot) e 24 (1,22 U/mg prot), com variação de pH entre 5,0 e 7,0 e fonte de carbono entre 1% e 2%. Tais resultados vão ao encontro dos valores representados pelo gráfico acima (Figura 11), ou seja, a maior produção de xilanase é obtida com aumento da fonte de carbono e diminuição do pH no meio M4 modificado.

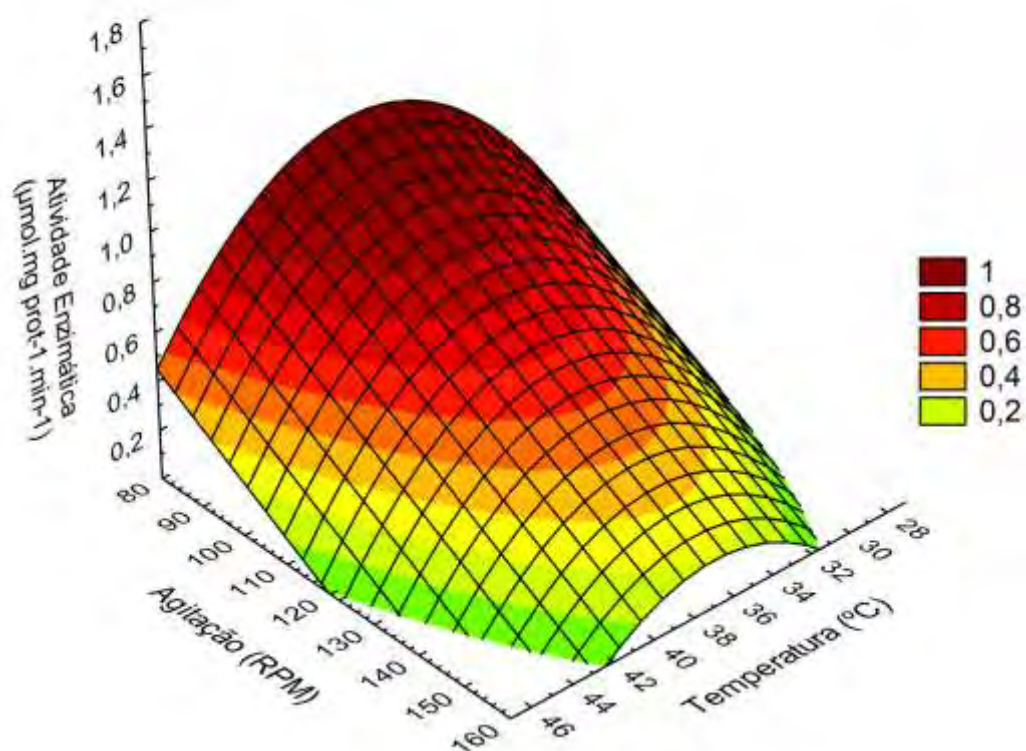


Figura 12. Superfície de resposta para a atividade enzimática em função da agitação e da temperatura.

A superfície de resposta da figura 12 indica a existência de uma região ótima para a atividade enzimática que varia de 32 °C a 42 °C para a temperatura e velocidade de agitação entre 80 a 100 rpm.

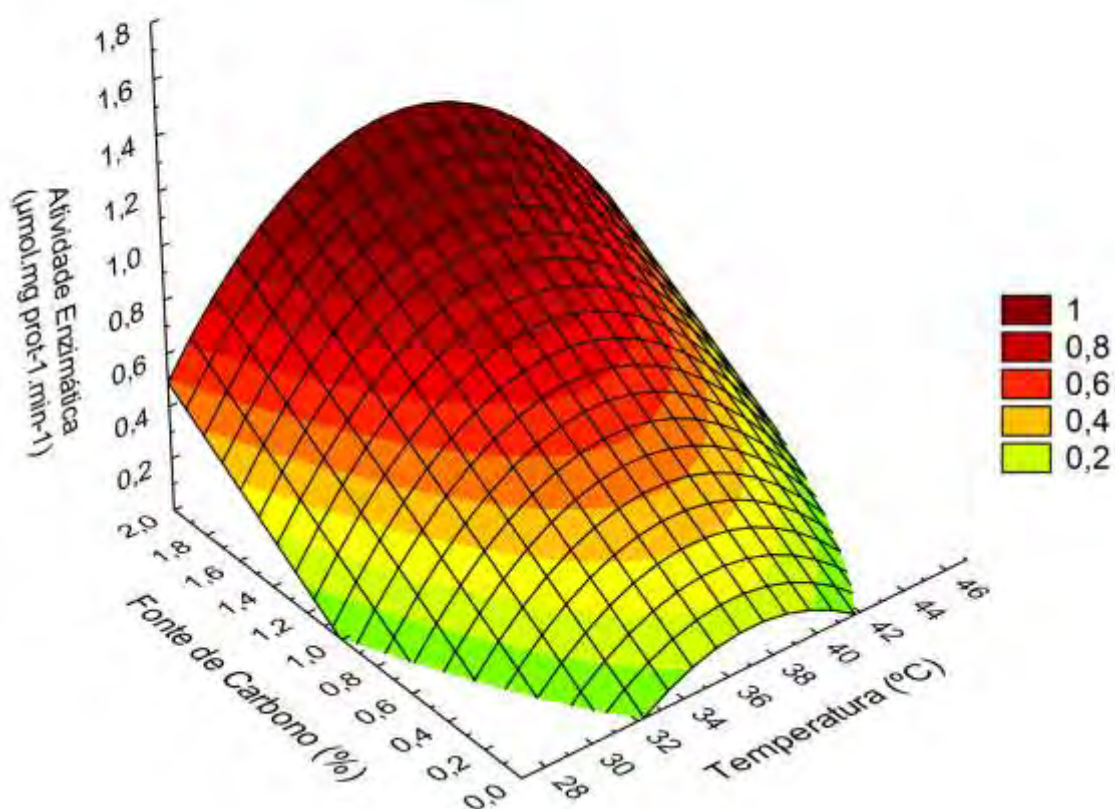


Figura 13. Superfície de resposta para a atividade enzimática em função da fonte de carbono e da temperatura.

Na figura 13, constata-se que o aumento na quantidade de fonte de carbono acarreta em maior produção de xilanase. Nota-se, também, que a máxima produção de xilanase foi obtida em uma faixa de temperatura que variou entre 32 °C e 42 °C.

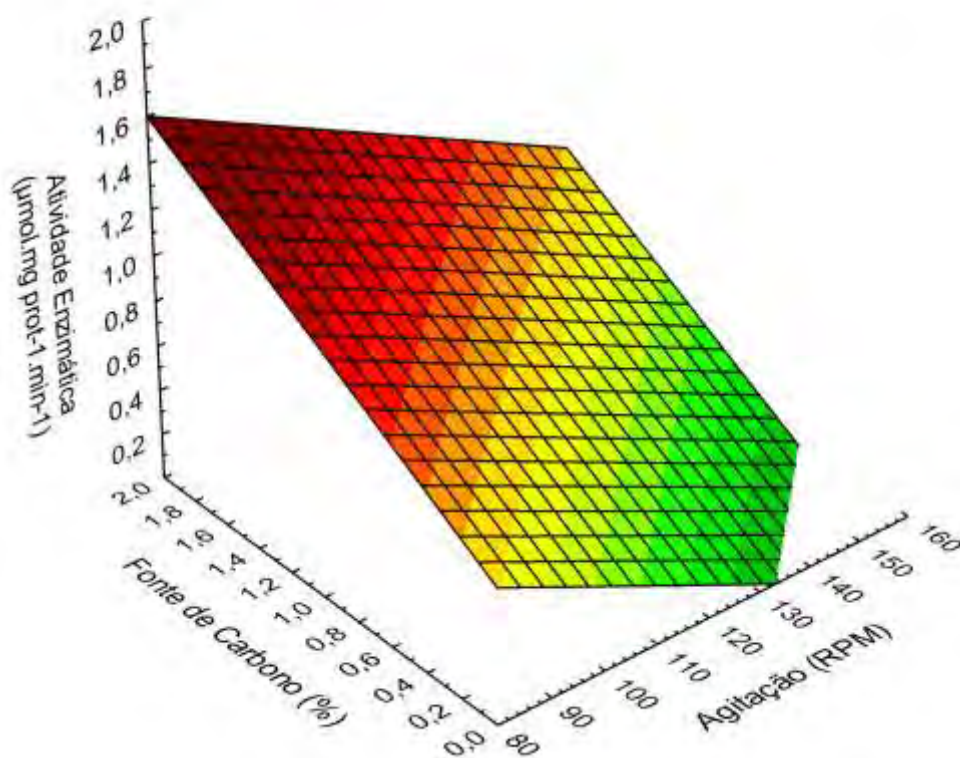


Figura 14. Superfície de resposta para a atividade enzimática em função da fonte de carbono e da agitação.

Na superfície de resposta ilustrada na figura 14, há uma tendência de aumento na produção de xilanase no sentido das maiores concentrações de fonte de carbono, bem como menores valores de agitação.

De acordo com as superfícies de resposta obtidas, os melhores valores examinados no DCCR para a produção de xilanases extracelulares pelo fungo *Aspergillus niger* foram: entre 5,0 e 6,0 para a variável pH, entre 32 °C e 42 °C para a variável temperatura, de 80rpm a 100rpm para a variável agitação, e de 1,5% a 2,0% para a variável fonte de carbono.

Quanto ao efeito do pH inicial no meio de cultivo, os resultados encontrados neste trabalho apresentaram valores semelhantes aos de diversos outros trabalhos na literatura. SOLIMAN et al (2012) estudaram a produtividade

de xilanases extracelulares de diversos micro-organismos em meios de fermentação em estado sólido utilizando cevada como fonte de carbono, tendo obtido o valor de pH inicial 5,5 como ótimo para a produção de xilanase por *Aspergillus niger*. AHMAD et al (2012), estudando o efeito da concentração de sabugo de milho e de outras variáveis, em meios de fermentação submersa, sobre a biossíntese de xilanases por *Aspergillus niger* também mostrou o pH inicial do meio ajustado para 5,5 como valor ótimo para produtividade da enzima (com 3% de concentração de fonte de carbono, e incubação a 30 °C por 72h). Nestas condições os autores determinaram o valor de $60,03 \pm 1,83$ U/mL para a atividade. Outros autores encontraram resultados concordantes com o presente trabalho quanto ao valor de pH ótimo situado entre 5,0 e 6,0 para produção de xilanases por *Aspergillus niger* NRC 107 (ABDEL-NABY; KWON, 1992), *Aspergillus niger* GCBCX-20 (HAQ et al., 2004) e *Aspergillus niger* LPB 326 (MACIEL et al, 2008). Segundo SUBRAMANIYAN; PREMA (2002), é sabido que os fungos em geral, com raras exceções, apresentam valores ótimos de pH inicial de cultivo menores que 7 para produção de xilanases. O pH externo apresenta pouca influência sobre o pH interno das células microbianas, entretanto, o rompimento dos substratos, seu transporte através da parede celular, e a secreção dos produtos celulares são todos afetados pelo valor do pH do ambiente. O pH do meio exerce efeito sobre a estrutura e a permeabilidade da membrana externa (VAZ et al, 2007). Os efeitos do pH inicial na produção de xilanases possuem características tanto sinérgicas quanto antagônicas. Em uma determinada região de valores de pH o micro-organismo é capaz de crescer e desenvolver suas atividades biológicas normalmente. Dentro dessa região, o pH inicial exerce influência na atuação do sistema enzimático e no transporte de enzimas através da membrana celular (POORNA; PREMA, 2007; MOHANA et al., 2008).

A agitação é um fator importante com relação à condução térmica no meio de cultivo, à dissolução de oxigênio, e à disponibilidade de nutriente utilizável pelo micro-organismo (VAZ et al, 2007). A velocidade da agitação também pode influenciar a morfologia do fungo filamentoso durante o processo de fermentação, o que, por sua vez, influencia na formação de produtos pelo mesmo (CUI et al, 1997; EL-ENSHASY et al, 1999; METZ; KOSSEN, 1977; PAPAGIANNI et al, 1998, WONGWICHARN et al, 1999; ZETELAKI; VAS,

1968, SUIJDAM; METZ, 1981, BRAUN; VECHE-LIFSHITZ, 1991). Maiores velocidades de agitação tendem a favorecer a dispersão celular e o desenvolvimento do fungo na forma de micélios livres, enquanto menores velocidades de agitação favorecem a agregação celular e o desenvolvimento do fungo na forma de *pellets*. No presente trabalho, a melhor produtividade da enzima xilanase pelo *Aspergillus niger* foi alcançada com menores velocidades de agitação. Estes resultados são concordantes com os encontrados por BAKRI et al (2011). Segundo CHIPETA et al (2008) uma das causas para a redução na produtividade de xilanase é atribuída ao efeito de tensão hidrodinâmica gerada pela maior intensidade de agitação, o que pode causar a ruptura das hifas e a vazão de compostos intracelulares ao meio. A relação entre a intensidade da agitação e o decréscimo na produção enzimática por alguns fungos filamentosos tem sido documentada na literatura (PALMA, et al., 1996; LENARTOVICZ et al., 2003; TECHAPUN et al., 2003).

A temperatura é uma variável importante em um processo biotecnológico, já que ela exerce influência direta na taxa de crescimento do micro-organismo, bem como na velocidade de todas as outras reações químicas. Quanto à temperatura ótima, os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com o esperado após identificação do micro-organismo isolado como sendo *Aspergillus niger*, já que trata-se de uma espécie de fungo mesófila e termotolerante (SCHUSTER, 2002). Segundo VAZ et al (2007), micro-organismos mesófilos possuem temperatura ótima de crescimento compreendida entre 30 °C e 36 °C. Mesófilos termotolerantes podem, presumivelmente, apresentar maiores temperaturas de crescimento ideal. Contudo, o rendimento máximo de conversão do substrato ocorre a uma temperatura menor que a temperatura ótima de crescimento, pois a temperatura também exerce influência sobre a eficiência em que a fonte de carbono é convertida em energia pelo micro-organismo. Esta informação constitui um ponto particularmente importante no processo de otimização quando se almeja um máximo rendimento, mas não necessariamente um máximo na taxa de crescimento. As reações bioquímicas simultâneas que acontecem no interior das células influenciam no crescimento microbiano e na formação de proteínas enzimáticas, que sofrem rápidas variações de acordo

com a faixa de temperatura. Cada micro-organismo possui uma temperatura ótima para crescimento e para formação de produto (VAZ et al, 2007).

Os resultados observados no presente trabalho para a variável temperatura são concordantes com os de SOLIMAN et al (2012), que obtiveram máxima produção de xilanases por *Aspergillus niger* com valores de temperatura de incubação entre 30 °C e 40 °C, tendo sido encontrado 35 °C como ponto de ótimo. Diversos outros trabalhos também determinaram a temperatura ótima próximas destes valores para produção de xilanases por *Aspergillus niger* (PRASERTSAN et al., 1997; MACIEL et al., 2007; HAQ et al, 2004; AHMAD et al, 2009).

A concentração da fonte de carbono no meio de cultivo exerce um papel decisivo tanto no crescimento quanto na formação de produtos pelo micro-organismo. Baixas concentrações de fonte de carbono podem inibir o crescimento microbiano devido à quantidade reduzida de nutrientes fornecida pelo substrato. Em contrapartida, altas concentrações também podem comprometer o rendimento do processo por aumentar a viscosidade do meio, reduzindo a disponibilidade de oxigênio dissolvido para utilização pelo micro-organismo. Assim sendo, o ideal seria utilizar uma concentração cuja quantidade de nutrientes fosse satisfatória e a viscosidade do meio não compromettesse o desenvolvimento microbiano. Além disso, a alta concentração do produto da hidrólise do substrato fornecido pode acarretar na repressão da síntese da enzima responsável pela conversão substrato-produto pelo micro-organismo. Como exemplo, diversos trabalhos mostraram que a concentração elevada de xilose no meio de cultivo exerceu um efeito fortemente repressor na síntese de xilanase por *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, e *Bacillus* sp. (GESSESSE; MAMO, 1999; ZEILINGER et al, 1993; BATAILLON et al., 1998). No presente trabalho foram testadas as concentrações de 0%, 0,5%, 1%, 1,5% e 2% de farelo de sabugo de milho, que contém alto teor de xilana. A melhor produção de xilanases se deu quando o meio de cultivo foi preparado com 1,5% e 2% de fonte de carbono. No entanto, é possível que maiores concentrações de farelo de sabugo de milho pudessem induzir ainda mais a produção de xilanases. AHMAD et al (2012) testaram diversas concentrações de sabugo de milho como fonte de carbono no meio de cultivo para produção de xilanases por *Aspergillus niger*, tendo concluído que

3% foi a melhor concentração de sabugo de milho para a melhor produção da enzima, obtendo-se o valor de $60,03 \pm 1,83$ U/mL para atividade. Quando utilizada uma concentração acima de 3%, houve decréscimo na produção de xilanase, devido à maior viscosidade do meio de cultivo e, conseqüentemente, à menor disponibilidade de oxigênio no mesmo.

Com os resultados obtidos através do DCCR, um novo extrato enzimático foi preparado, sendo produzido com os melhores valores encontrados para as variáveis pH, temperatura, agitação e fonte de carbono. Sendo assim, foi conduzido o crescimento do *Aspergillus niger* em meio M4 modificado com pH inicial ajustado em 5,0, temperatura a 37 °C, agitação a 80rpm e 2% (p/v) de concentração de fonte de carbono. Foi medida a atividade enzimática do extrato e em seguida, este foi utilizado para os experimentos subsequentes do presente trabalho.

4.4. Filtração em caulim e precipitação de proteínas com acetona 3:1 (v/v) a frio

Após a preparação do extrato xilanolítico de acordo com os melhores valores encontrados para as variáveis estudadas no DCCR, o extrato enzimático produzido foi submetido ao processo de clarificação por filtração em caulim e precipitação de proteínas por meio de uma solução de acetona 3:1 (v/v) a frio, com a finalidade de reduzir os interferentes nas dosagens de proteína e de atividade específica xilanolítica. O caulim é um mineral oriundo da região do Monte de Kaolim na China. Sua utilização neste trabalho teve a finalidade de retirar pigmentos e outras impurezas do extrato xilanolítico.

Uma das técnicas empregadas para se obter uma proteína (enzima) pura consiste na separação por diferença de solubilidade. De acordo com BOYER (1993), os agentes frequentemente utilizados para precipitação de proteínas são os sais inorgânicos (ex: sulfato de amônio), os solventes orgânicos (metanol, etanol e acetona), polietilenoglicol, pH e temperatura. Ele explica que os solventes orgânicos atuam como agentes precipitantes de duas formas. Uma delas é através da desidratação da proteína, e a outra por meio da diminuição da constante dielétrica da solução. Dessa forma, como as

proteínas são solúveis em soluções aquosas, o uso da acetona provoca o rompimento da interação proteína-água, reduzindo assim a sua solubilidade e, conseqüentemente, aumentando a interação proteína-proteína, o que resulta na concentração da proteína no meio. Após o tratamento descrito anteriormente, dosou a quantidade de proteína e determinou a atividade enzimática específica. Os resultados estão apresentados na Tabela 9, onde verificou que embora o rendimento foi baixo, a enzima passou por um processo de purificação, mostrando a eficiência dos métodos utilizados.

Tabela 9. Fator de purificação e rendimento após tratamento do extrato enzimático com caulim e precipitação com acetona.

Passos do tratamento	Volume (mL)	Proteínas totais (mg)	Ativ. Enzimática (U/mL)	Ativ. enz. Específica (U/mg prot.)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	600	900	2,4	1,6	1	100
Caulim	190	247	2,2	1,69	1,05	92
Acetona 3v	73	34	1,25	2,7	1,69	52

Métodos adicionais de separação de proteínas como, por exemplo, cromatografias de troca iônica, por adsorção, por afinidade e por filtração em gel são outros recursos utilizados para aumentar o grau de pureza da proteína de interesse.

4.5. Purificação da enzima em gel de separação *Sephadex*® G-75

A purificação parcial da enzima xilanase produzida pelo *Aspergillus niger* foi realizada através de cromatografia de exclusão molecular em coluna empacotada com gel *Sephadex*® G-75, após o extrato ter sido tratado em

caulim, as proteínas foram precipitadas em acetona 3 volumes (v/v) a frio, e ressuspensa no menor volume possível, e aplicada à coluna.

Após coletar as frações, fez-se leitura, em $\lambda = 280$ nm para verificar o perfil de proteínas. Os resultados obtidos demonstraram a presença de dois picos em que foi evidenciada a presença de proteínas, sendo o primeiro compreendido entre as frações 7 a 15, e o segundo compreendido entre as frações 17 a 32.

Em seguida, determinou-se a atividade xilanolítica em cada fração. Os resultados apresentados na Figura 15 mostram que foi possível evidenciar dois picos principais de atividade, sendo o primeiro entre as frações 15 e 20, e o segundo entre as frações 23 e 27. Um pico com menor quantidade de açúcares redutores liberados também foi observado, localizado entre as frações 10 e 14.

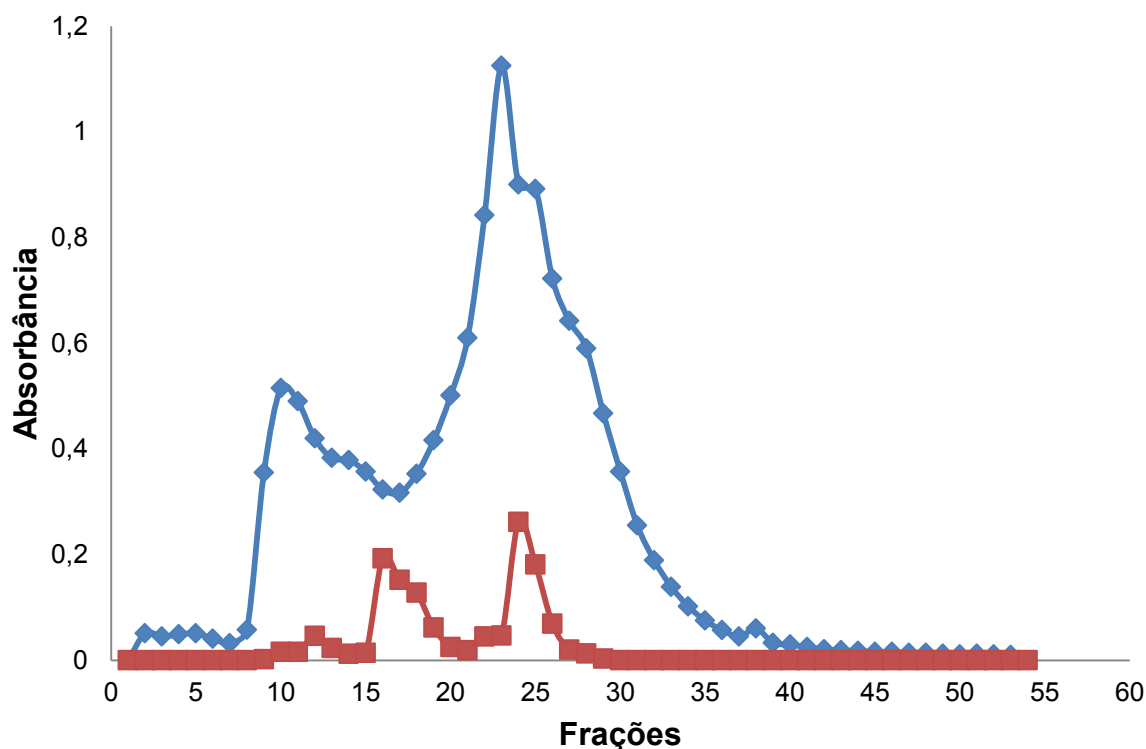


Figura 15. Filtração em gel de separação Sephadex G-75 do extrato com atividade xilanolítica. Determinação qualitativa de proteínas em $\lambda = 280$ nm (♦) e da atividade enzimática em $\lambda = 540$ nm (■).

Através da análise do gráfico, foi possível evidenciar uma convergência entre os picos observados. Os resultados apontam para a possibilidade do extrato parcialmente purificado conter pelo menos duas xilanases distintas produzidas pelo fungo, participando na hidrólise da xilana de forma sinérgica, corroboram com informações encontradas na literatura (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997; SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002). Além disso, os resultados apresentados reforçam a evidência de que muitos micro-organismos produzem múltiplas formas de xilanases (GILBERT et al, 1988; GILBERT; HAZLEWOOD, 1993; YANG et al, 1989). Segundo BIELY et al (1985), o fungo *Aspergillus niger* produz diferentes tipos de xilanases extracelulares.

4.6. Cromatografia de troca iônica em DEAE-Trisacryl

Frações coletadas na cromatografia por exclusão molecular em coluna Sephadex G75 foram submetidas à cromatografia de troca iônica em DEAE-Trisacryl com objetivo de aumentar a pureza da enzima e posteriormente caracterizá-la através da eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. A DEAE-Trisacryl é uma resina sintetizada a partir da copolimerização de um monômero primário, N-acrilolil-2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol, e um monômero acrílico derivativo aniônico ou catiônico. A natureza extremamente hidrofílica da matriz da resina permite a fixação e eluição de proteínas com base tão somente no fenômeno da troca iônica. O monômero primário atua como uma estrutura rígida conferindo estabilidade mecânica à resina, e o monômero funcional pode ser positiva ou negativamente carregado, conferindo, portanto, as propriedades de troca iônica. A presença de três grupos hidroximetil em cada monômero primário confere à resina um alto grau de hidrofília.

As proteínas são ligadas à resina através da afinidade entre as cargas das proteínas e as cargas do monômero funcional. Em seguida, estas são recuperadas através da realização de um gradiente crescente de salinidade pela coluna, que competirá com a resina para interagir com a proteína. Dessa forma, assim que a interação solução salina - proteína se torna mais forte que a interação resina - proteína, as proteínas são liberadas e então recuperadas.

Após coletadas as frações do eluído da coluna, foram realizados testes de atividade xilanolítica para determinar a presença de xilanases.

A figura 16 mostra o gráfico da recuperação das proteínas do extrato xilanolítico já previamente purificado pelos métodos anteriormente descritos neste trabalho.

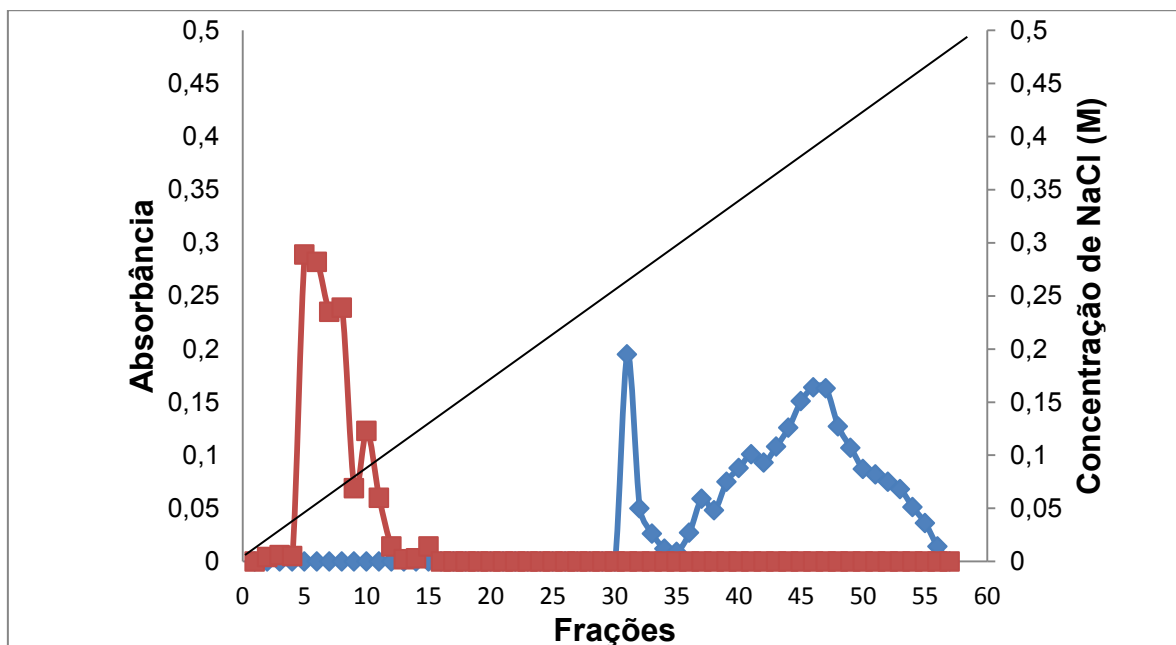


Figura 16. Purificação do extrato de xilanases por cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Trisacryl. Determinação qualitativa de proteínas em $\lambda = 280$ nm (◆) e da atividade enzimática em $\lambda = 540$ nm (■) das frações eluídas da coluna.

Com base no gráfico, podemos observar que as frações 5 a 8 apresentaram um pico de atividade xilanolítica, indicando que a liberação da enzima da coluna DEAE-Trisacryl ocorreu em uma concentração salina de 0,05 mol/L a 0,1 mol/L. As frações 5 a 8 foram então reunidas e submetidas à liofilização, sendo ressuspensas em 1 mL de água miliQ. Após determinação de sua atividade enzimática específica, o liofilizado foi utilizado na SDS PAGE para caracterização da massa molecular das proteínas nele contidas.

4.7. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi utilizada para estimar a massa molecular da enzima coletada na coluna de separação, bem como para verificar a pureza do extrato purificado. Durante o processo, as moléculas foram submetidas a um campo elétrico e percorreram uma matriz porosa de poliacrilamida. A velocidade de migração das amostras analisadas depende de fatores tais como: sua massa molar e forma. Numa SDS-PAGE, uma preparação prévia das amostras permite que apenas a massa molecular se torne característica importante no processo migratório em meio ao gel de poliacrilamida. Essa preparação envolve a desnaturação da proteína pela atuação do dodecil sulfato de sódio, um detergente que possui grupos anfipáticos (polares e apolares), e que quebra oligômeros de proteínas em subunidades, desnaturando-as. Nas cadeias peptídicas abertas, a molécula de SDS se liga e confere a elas uma carga fortemente negativa. Para garantir a totalidade da desnaturação, é adicionado β -mercaptoetanol para romper as pontes dissulfeto das cadeias polipeptídicas das proteínas e a amostra é fervida a 100 °C. Após o processo de migração pelo gel, as amostras foram coradas pelo método de coloração por nitrato de prata (MERRIL et. al., 1984). Os resultados apresentados na figura 17 mostram a identificação de uma única banda protéica, apresentando massa molecular aparente de aproximadamente 34 kDa.

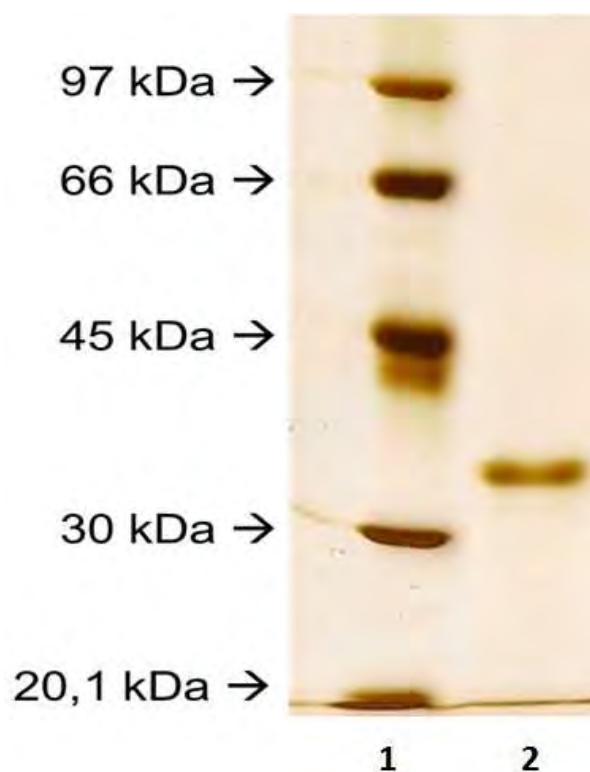


Figura 17. SDS-PAGE da fração obtida na DEAE-Trisacryl. (1) padrão de massa molecular (fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa)), (2) extrato de xilanase purificada.

4.8. Cromatografia em camada delgada sílica-gel P60

Os produtos da hidrólise da xilana em função do tempo pela xilanase produzida pelo *Aspergillus niger* foram analisadas por cromatografia em camada delgada e estão apresentados na figura 18 (FONTANA et. al., 1988)

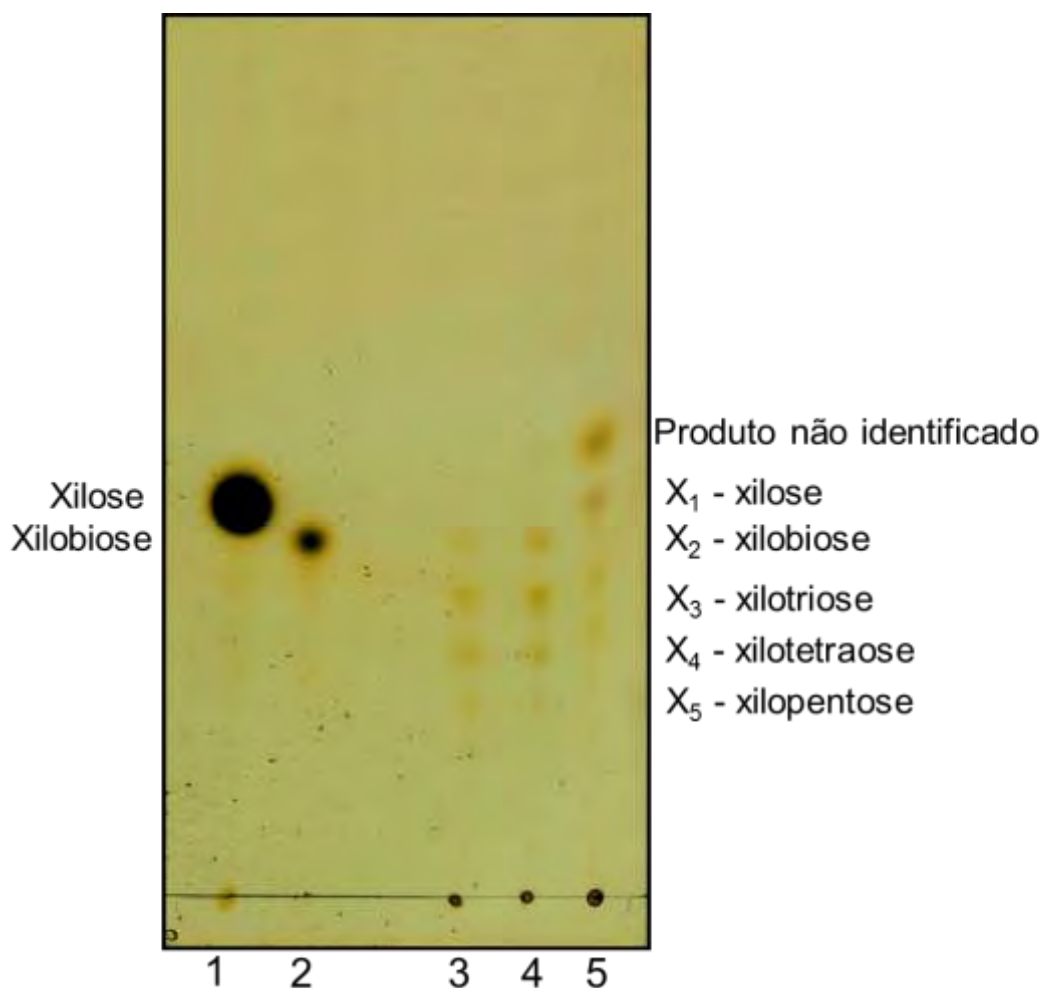


Figura 18. Cromatografia em Sílica Gel P60 do produto de hidrólise da xilana da por ação da xilanase do fungo *Aspergillus niger*. 1- xilose; 2- xilobiose, 3- 30 minutos; 4 – 120 minutos; 5 – 1080 minutos. 1 e 2 foram utilizados como padrões.

Os resultados da cromatografia em camada delgada sílica-gel P60 demonstram a ação da enzima xilanase produzida pelo fungo *Aspergillus niger* sobre xilana *birchwood* em ensaio de cinética enzimática. Alíquotas de 10 μ L do ensaio foram transferidas para a folha cromatográfica em 30, 120 e 1080

minutos de reação. Após a migração e aplicação do revelador, pôde-se observar a formação do produto de hidrólise do substrato pela xilanase, com progressiva liberação de açúcares mais simples. As aplicações 3 (30 minutos) e 4 (120 minutos) apresentaram maior predominância de xilooligossacarídeos, como xilobiose, xilotriose e xilotetraose, sendo a concentração de xilobiose notadamente maior em 4. A última aplicação, em 5 (1080 minutos), apresentou grande queda na prevalência de xilooligossacarídeos, sendo a presença de xilobiose praticamente inexistente; e o surgimento da presença de xilose, caracterizando a ocorrência de hidrólise total do substrato pela enzima xilanase produzida pelo fungo. Os resultados indicam que as enzimas extracelulares produzidas por esta linhagem de *Aspergillus niger* são predominantemente endoxilanasas, realizando a hidrólise da xilana de modo a liberar xilooligossacarídeos que, por sua vez, são submetidos à ação de exoxilanasas, liberando xilose como produto. Provavelmente, no caso do *Aspergillus niger*, a maior parte da formação de xilose se dá intracelularmente, após absorção dos xilooligossacarídeos presentes no meio e atuação de xilosidases intracelulares.

5. CONCLUSÕES

O Delineamento Composto Central Rotacional utilizado no presente trabalho se mostrou uma ferramenta eficiente para definir as melhores condições de produção de xilanase extracelular pelo fungo *Aspergillus niger*, sendo elas: pH 5,0; temperatura entre 37 °C, agitação de 80 rpm e fonte de carbono a 2%. Considerando que alguns valores ótimos obtidos no DCCR estão situados na proximidade dos pontos axiais do delineamento experimental, o emprego de um novo planejamento mais simples ou a condução de novos ensaios isolados poderá determinar com ainda maior exatidão as condições ótimas para a produção de xilanases pelo fungo.

A enzima produzida nas melhores condições predeterminadas foi purificada com sucesso, sendo o produto de sua hidrólise caracterizado por cromatografia em camada delgada, revelando a formação de açúcares progressivamente mais simples (xilooligossacarídeos: xilotriose, xilobiose e xilose).

A cromatografia por exclusão molecular revelou que o extrato enzimático produzido pelo fungo *Aspergillus niger* pode conter, na verdade, duas espécies de xilanases, devido à observação de dois picos de atividade existentes para proteínas de diferentes pesos moleculares presentes no filtrado.

A massa molecular da xilanase produzida foi determinada por SDS-PAGE, sendo esta estimada em 34 kDa. Experimentos adicionais estão sendo conduzidos para verificar se os resultados obtidos na SDS-PAGE correspondem a uma única enzima xilanolítica ou duas enzimas xilanolíticas com massas moleculares próximas.

Os resultados do presente trabalho serão importantes para o desenvolvimento de trabalhos futuros como, por exemplo, a produção de xilanase extracelular utilizando o fungo *Aspergillus niger* em escala piloto industrial, utilizando biorreatores para a condução do processo fermentativo. A determinação da quantidade de xilanases extracelulares diferentes produzidas no extrato enzimático será útil para fornecer informações adicionais para tentativa de imobilização destas enzimas em suportes sólidos alternativos. Estudos com imobilização das xilanases produzidas pelo *Aspergillus niger* já estão sendo conduzidos no Laboratório de Enzimologia Industrial da Unesp –

Araraquara, pelo doutorando Caio Casale Aragon sob orientação do Prof. Dr. Rubens Monti.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-NABY, M. A.; KWON, D. Y. Production of xylanase and β -Xylosidase by *Aspergillus niger* NRC 107. **Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 20, n. 5, p. 543-550, 1992.
- ABDEL-SATER, M. A.; EL-SAID, A. H. M. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 47, p. 15-21, 2001.
- AHMAD, Z.; BUTT, M. S.; ANJUM, F. M.; ASGHER, M. Effect of wheat bran concentration on xylanase biosynthesis by *Aspergillus niger*. **Int. J. Agric. Biol.**, v. 11, p. 571-576, 2009.
- AHMAD, Z.; BUTT, M. S.; ANJUM, F. M.; AWAN, M. S.; RATHORE, H. A.; NADEEM, M. T.; AHMAD, A.; KHALIQ, A. Effect of corn cobs concentration on xylanase biosynthesis by *Aspergillus niger*. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 11, n. 7, p. 1674-1682, 2012.
- ANDRADE, S. V. **Estudos comparativos das β -xylosidases produzidas por *Aspergillus versicolor* cultivado em xilana ou xilose como únicas fontes do carbono**. 2002. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTILLA, N. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, p. 719-739, 2005.
- BAKRI, Y.; MEKAEEL, A.; KOREIH, A. Influence of agitation speeds and aeration rates on the xylanase activity of *Aspergillus niger* SS7. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 54, n. 4, p. 659-664, 2011.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Ed. UNICAMP, 2001.
- BATAILLON, M.; CARDINALI, A. P. N.; DUCHIRON, F. Production of xylanases from a newly isolated alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. **Biotechnol. Lett.**, v. 20, p. 1067-1071, 1998.
- BCC RESEARCH. **Enzymes in industrial applications: global markets**. (Report BIO030F). Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/report/enzymes-industrial-applications-bio030f.html>>. Acesso em: 02 dez. 2011.
- BEG, Q. K.; KAPPOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 56, p. 326-338, 2001.

- BENEDETTI, A. C. E. P. **Isolamento de fungo produtor de enzimas xilanolíticas**: produção e caracterização de xilanase. 2009. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- BENNET, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **J. Biotechnol.**, v. 66, p. 101-107, 1998.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends Biotechnol.**, v. 3, p. 286-290, 1985.
- BIGELIS, R. Primary metabolism and industrial fermentations. **Gene manipulations in fungi**. New York: Academic Press, 1985. p. 357-401.
- BOUDET, A. M.; KAJITA, S.; GRIMA-PETTENATI, J.; GOFFNER, D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis of new and improved uses. **Trends Plant Sci.**, v. 8, p. 576-581, 2003.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S. Multifactor experimental designs for exploring response surfaces. **Ann. Math. Statist.**, v. 28, p. 195-241, 1957.
- BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. **J. R. Stat. Soc. Ser. B. Methodol.**, v. 13, n. 1, p. 1-45, 1951.
- BOYER, R. F. **Modern experimental biochemistry**. Madri: The Benjamin Cummings, 1993. 432 p.
- BRAUN, S.; VECHT-LIFSHITZ, S. E. Mycelial morphology and metabolite production. **Trends Biotechnol.**, v. 9, p. 63-68, 1991.
- CAMACHO, N. A.; AGUILAR, O. G. Production, purification and characterization of a low molecular mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in bakery. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 104, n. 3, p. 159-172, 2003.
- CHAVES, A. T. C. A. **Otimização do processo de produção de biodiesel etílico do óleo de girassol (*Helianthus annuus*) aplicando um delineamento composto central rotacional (DCCR)**. 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.
- CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 14, p. 438-443, 2003.
- CHIPETA, Z. A.; DU-PREEZ, J. C.; CHRISTOPHER, L. Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. **J. Ind. Microbiol. Biot.**, v. 35, p. 587-594, 2008.

- COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. F.; FURTADE, A. A. L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **B.CEPPA**, v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, p. 3-23, 2005.
- COWAN, D. Industrial enzyme technology. **Trends Biotechnol.**, v. 14, p. 177-178, 2006.
- CRAUFRIER, F.; MARTINOU, A.; DUPONT, C.; BOURIOTIS, V. Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. **Carbohydr. Res.**, v. 338, n. 7, p. 687-692, 2003.
- CUI, Y. Q.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; LUYBEN, K. C. A. M. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 55, n. 5, p. 715-726, 1997.
- CUSTÓDIO, T. N.; MORAIS, A. R. de; MUNIZ, J. A. Superfície de resposta em experimento com parcelas subdivididas. **Ciênc. Agrotéc.**, v. 24, p. 1008, 2000.
- CZJZEK, M.; DAVID, A. B.; BRAVMAN, T.; SHOHAM, G.; HENRISSAT, B.; SHOHAM, Y. Enzyme-substrate complex structures of a GH39 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. **J. Mol. Biol.**, v. 353, p. 838-846, 2005.
- DABLY, P. A. Optimizing enzyme function by directed evolution. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 13, p. 500-505, 2003.
- EIJSSINK, V. G. H.; VAAJE-KOLSTAD, G.; VARUM, K. M.; HORN, S. J. Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. **Trends Biotechnol.**, v. 26, p. 228-235, 2008.
- EL-ENSHASY, H. A.; HELLMUTH, K.; RINAS, U. Fungal morphology in submerged cultures and its relation to glucose oxidase excretion by recombinant *Aspergillus niger*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 81, n. 1, p. 1-11, 1999.
- FERREIRA, G.; BOER, C. G.; PERALTA, R. M. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamari* in solid state fermentation. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 173, p. 335-339, 1999.
- FONTANA, I. D.; GEBARA, M.; BLUMEL, M.; SCHNEIDER, H.; MacKENZIE, C. R.; JONHSON, K. G. α -4-O-Methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods in Enzymol.**, v. 160, p. 560-571, 1988.
- GESSESSE, A.; MAMO, G. High-level xylanase production by an alkalophilic *Bacillus sp.* by using solid state fermentation. **Enz. Micro. Technol.**, v. 25, p. 68-72, 1999.

GILBERT, H. J.; HAZLEWOOD, G. P. Bacterial cellulases and xylanases. **J. Gen. Microbiol.**, v. 139, p. 187-194, 1993.

GILBERT, H. J.; SULLIVAN, D. A.; JENKINS, G.; KELLET, L. E.; MINTON, N. P.; HALL, J. Molecular cloning of multiple xylanase genes from *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, n. 12, p. 3239-3247, 1988.

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

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

HAMLYN, P. F. Fungal biotechnology. **British Mycological Society Newsletter**, 1998. Disponível em: <<http://fungus.org.uk/nwfg/fungbiot.htm>>. Acesso em: 17 nov. 2010.

HARBAK, L.; THYGESEN, H. V. Safety evaluation of a xylanase expressed in *Bacillus subtilis*. **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, p. 1-8, 2002.

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

HAQ, I-U.; TASNEEM, M.; RAANA, K.; KHAN, A.; MUKHTAR, H.; JAVED, M. Optimization of cultural conditions for the production of xylanase by chemically mutated strain of *Aspergillus niger* GCBCX-20. **Int. J. Agri. Biol.**, v. 6, n. 6, p. 1115-1118, 2004.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial application of microbial lipase. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; VAN RENSBURG, J. E. L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 2, p. 602-619, 2003.

KANEKO, S.; SHIMASAKI, T.; KUSAKABLE, I. Purification and some properties of intracellular α -L-arabinofuranoside from *Aspergillus niger* 5-16. **Biosc. Biotechnol. Biochem.**, v. 57, p. 1161-1165, 1993.

KHAN, M. A. **Hydrolysis of hemicellulose by commercial enzyme mixtures**. 2010. 28 f. Master Thesis (Chemical Technological) - Department of Chemical Engineering and Geosciences, Lulea University of Technology, Lulea, 2010.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, p. 345-351, 2002.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 23, p. 411-456, 1999.

KUMAR, S.; RAMÓN, D. Purification and regulation of the synthesis of a β -xylosidase activity from *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 135, p. 287-293, 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, J. W.; PARK, J. Y.; KWON, M.; CHOI, I. G. Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. **J. Biosc. Bioeng.**, v. 107, n. 1, p. 33-37, 2009.

LEISOLA, M.; JOKELA, J.; PASTINEN, O.; TURUNEN, O.; SCHOEMAKER, H. Industrial use of enzymes. In: HÄNNINEN, O. O. P.; ATALAY, M. (Ed.). **Encyclopedia of life support systems (EOLSS)**. Oxford: EOLSS, 2002. v. 2, cap. 10, p. 1-25.

LENARTOVICZ, V.; SOUZA, C. G. M.; MOREIRA, F. G.; PERALTA, R. M. Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable β -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochem.**, v. 38, p. 1775-1780, 2003.

LI, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J. S.; ERIKSSON, K. E. L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 27, p. 89-94, 2000.

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

MACIEL, G. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; WINDSON, C.; HAMINIUK, I.; FENDRICH, R. C.; DELLA BIANCA, B. E.; BRANDALIZE, T. Q. S.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Xylanase production by *Aspergillus niger* LPB 326 in solid-state fermentation using statistical experimental designs. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 46, n. 2, p. 183-189, 2008.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.**, v. 64, n. 3, p. 461-488, 2000.

MARTINEZ, A. T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, M. J.; GUTIÉRREZ, A.; RÍO, J. C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **Int. Microbiol.**, v. 8, p. 195-204, 2005.

MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Sci.**, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

- MATSUO, M.; ENDOU, A.; OKADA, T.; YAMAOKA, Y. Purification and characterization of β -xylosidase from *Thermoascus* sp. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 86, n. 4, p. 403-405, 1998.
- MENEZES, C. R.; DURRANT, L. R. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciênc. Rural**, v. 38, n. 2, p. 587-592, 2008.
- MERRIL C. R.; GOLDMAN, D.; VAN KEUREN, M. L. Gel protein stains: silver stain. **Methods Enzymol.**, v. 104, p. 441-447, 1984.
- METZ, B.; KOSSEN, N. W. F. The growth of molds in the form of pellets - a literature review. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 14, p. 781-799, 1977.
- MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MOHANA, C.; SEETA, R.; RAO, M. Production of xylanolytic enzymes in association with cellulolytic activities of *Penicillium funiculosum*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 7, p. 295-299, 1985.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Xilitol: edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 38, n. 4, p. 401-413, 2002.
- MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Ciênc. Hoje**, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.
- OTTEN, L. G.; QUAX, W. J. Directed evolution: selecting today's biocatalysts. **Biomol. Eng.**, v. 22, p. 1-9, 2005.
- PALMA, M. B.; MILAGRES, A. M. F.; PRATA, A. M. R.; DE-MANCILHA, I. M. Influence of aeration and agitation rate on the xylanase activity from *Penicillium janthinellum*. **Process Biochem.**, v. 31, p. 141-145, 1996.
- PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M.; KRISTIANSEN, B. Citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* as functions of the mixing intensity in a stirred tank and a tubular loop bioreactor. **Biochem. Eng. J.**, v. 2, p. 197-205, 1998.
- PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUES, H.; DOMÍNGUES, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 1, interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresour. Technol.**, v. 65, p. 191-201, 1998.
- PLASUN, R. **Optimization of VLSI semiconductor devices**. 1999. 254 f. Dissertation (Doktors der technischen Wissenschaften) - Technischen Universität Wien, Wien, 1999. Disponível em: <<http://www.iue.tuwien.ac.at/phd/plasun>>. Acesso em: 22 dez. 2011.
- POLIZELLI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCE, H.; JORGE, J.; AMORIM, D. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

POORNA, C. A.; PREMA, P. Production of cellulase free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid state fermentation and its application in wastepaper recycling. **Bioresour. Tech.**, v. 98, p. 485-490, 2007.

PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUL, A.; KUNGHAIE, A.; MANEESRI, J.; OI, S. Optimization of xylanase and cellulose production from *Aspergillus niger* ATCC 6275 in palm oil mill wastes and its application. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 13, p. 555-559, 1997.

PUCHART, V.; KATAPODIS, P.; BIELY, P.; KREMnický, L.; CHRISTAKOPOULOS, P.; VRSANSKÁ, M.; KEDOS, D.; MACRIS, B. J.; BHAT, M. K. Production of xylanases, mannases and pectinases by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 17, n. 2, p. 114-118, 1995.

RIZZATTI, A. C. S. **Propriedades regulatórias e funcionais do sistema xilanolítico do fungo *Aspergillus phoenicis***. 2004. 148 f. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

SAHA, B. C. Purification and properties of an extracellular β -xylosidase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Bioresour. Technol.**, v. 90, p. 33-38, 2003.

SARROUH, B.; SANTOS, T. M.; MIYOSHI, A.; DIAS, R.; AZEVEDO, V. Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. **J. Bioproces. Biotech.**, S4:002. DOI:10.4172/2155-9821.S4-002, 2012.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 59, p. 426-435, 2002.

SHAO, W.; WIEGEL, J. Purification and characterization of thermostable β -xylosidase from *Thermoanaerobacter ethnolicus*. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 5848-5853, 1992.

SOLIMAN, H. M.; SHERIEF, A. A-D.; EL-TANASH, A. B. Production of xylanase by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* using some agriculture residues. **Int. J. Agric. Res.**, v. 7, n. 1, p. 46-57, 2012.

STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nat. Rev. Genet.**, v. 9, p. 433-443, 2008.

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

- SUIJDAN J. C.; METZ, B. Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 23, p. 111-148, 1981.
- SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 17, n. 1, p. 39-67, 1997.
- TECHAPUN, C.; POOSARAN, N.; WATANABE, M.; SASAKI, K. Optimization of aeration and agitation rates to improve cellulose-free xylanase production by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106 and repeated fed-batch cultivation using agricultural waste. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 95, p. 298-301, 2003.
- THAKORE, Y. B. **Enzymes for industrial applications**: (Report BIO030E), 2008. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/report/enzymes-industrial-applications-bio030e.html>>. Acesso em: 11 maio 2011.
- TURNER, W. B. Commercially important secondary metabolites. In: SMITH, J. E.; BERRY, D. R. **The filamentous fungi**: industrial mycology. New York: Wiley, 1975. v. 1, p. 122-142.
- VAZ, R. S.; PRADO, M. R. M.; CARVALHO, F. Biotecnologia na indústria farmacêutica – revisão dos principais processos. **Biotecnologia. Ciênc. Desenvol.**, n. 37, p. 36-39, 2007.
- WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SANDDLER, J. N. Multiplicity of -1-4-xylanase in microorganisms, functions and applications. **Microbiol. Rev.**, v. 52, n. 3, p. 305-317, 1988.
- WONGWICHARN, J. M.; HARVEY, L. M.; McNEIL, B. Secretion of heterologous and native proteins, growth and morphology in batch cultures of *Aspergillus niger* B1-D at varying agitation rates. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 74, p. 821-828, 1999.
- YANG, R. C.; MacKENZIE, C. R.; BILOUS, D.; NARANG, S. A. Identification of two distinct *Bacillus circulans* xylanases by molecular cloning of the genes and expression in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 568-572, 1989.
- ZANOELO, F. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; TEREZI, H. F.; JORGE, J. A. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 31, p. 170-176, 2004.
- ZEILINGER, S.; KRISTUFEK, D.; ARISAN-ATAC, I.; HODITS, R.; KUBICEK, C. P. Conditions of formation, purification and characterization of an alpha-galactosidase of *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 1347-1353, 1993.

ZETELAKI, K.; VAS, K. The role of aeration and agitation in the production of glucose oxidase in submerged culture. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 10, p. 45-59, 1968.