

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS NOTURNO

---

**BEATRIZ TEMER**

**Produção e caracterização de  
 $\alpha$ -L-arabinofuranosidase de  
*Penicillium janckzweskii***



Rio Claro  
2011

BEATRIZ TEMER

Produção e caracterização de  
 $\alpha$ -L-arabinofuranosidase de  
*Penicillium janczewskii*

Orientadora: PROFA. DRA. ELEONORA CANO CARMONA

Co-orientador: PROF.DR. CÉSAR RAFAEL FANCHINI TERRASAN

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Biociências da Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -  
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau  
de bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2011

589.2    Temer, Beatriz  
T279p        Produção de alpha-L-arabinofuranosidase de *Penicillium*  
janczewskii / Beatriz Temer. - Rio Claro : [s.n.], 2011  
53 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências  
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Biociências de Rio Claro

Orientador: Eleonora Cano Carmona

Co-Orientador: César Rafael Fanchini Terrasan

1. Fungos. 2. Produção e caracterização enzimática. 3.  
Enzimas microbianas. 4. Complexo xilanolítico. 5.  
Biotecnologia. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer:

À Prof. Dra. Eleonora Cano Carmona, pela orientação, dedicação e atenção durante toda a minha iniciação científica, obrigada.

Ao meu co-orientador César Rafael Fanchini Terrasan, por todos os ensinamentos, por toda ajuda, paciência e amizade, sua ajuda foi fundamental na minha formação acadêmica, muito obrigada.

Aos meus amigos de laboratório: Carmen Silvia Casonato de Souza, Adriana Knob, Alex Fernando de Almeida, Cárol Terrone, Fabiana, Daniela e Diogo por terem me ajudado todas as vezes que eu precisei e pela companhia divertida durante todo o tempo.

A minha família, em especial meus pais Leda e Marco Temer e a minha irmã Thais Temer, por todo o apoio, carinho, atenção, dedicação, paciência e por todo amor, não apenas durante a faculdade, mas também durante toda minha vida, tudo que sou hoje é graças a vocês, amo vocês mais que tudo.

Ao meu namorado Bruno Benite, por todo companheirismo durante esses anos, pela paciência, compreensão, ajuda, amor e carinho, seu apoio foi fundamental em todos os momentos, obrigada, te amo.

A todos os meus colegas e amigos de classe, obrigada por fazer desses anos de faculdade os melhores que eles poderiam ser.

As minhas amigas de todos os dias, Amanda Corradini, Anna Carolina Bressan, Imaira Bertolini, Isabela Ceron de Oliveira e Mariana Spagnol, vocês fizeram minha vida em Rio Claro ficar mais fácil e divertida, agradeço por cada momento que passamos juntas, e vou levar comigo pra sempre, tudo que aprendi com cada uma de vocês, amo vocês amigas.

A todas as pessoas que não mencionei mas que ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho e da minha vida acadêmica, obrigada.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                         | 7  |
| 1.1 Parede celular vegetal, hemicelulose e xilana.....                                                     | 7  |
| 1.2 Enzimas do complexo xilanolítico: características e produção.....                                      | 9  |
| 1.3 $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase: características bioquímicas.....                                      | 12 |
| 1.4 Aplicação biotecnológica das $\alpha$ -L-arabinofuranosidases.....                                     | 13 |
| 1.5 <i>Penicillium janczewskii</i> : a linhagem no contexto do trabalho.....                               | 15 |
| 2. OBJETIVOS.....                                                                                          | 17 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                 | 18 |
| 3.1 Linhagem: cultivo e manutenção.....                                                                    | 18 |
| 3.2 Produção de $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por <i>P. janczewskii</i> .....                            | 18 |
| 3.2.1 Influência da fonte de carbono.....                                                                  | 18 |
| 3.2.2 Influência da concentração das melhores fontes de carbono.....                                       | 19 |
| 3.2.3 Influência da temperatura de cultivo.....                                                            | 19 |
| 3.2.4 Influência do pH do meio de cultivo.....                                                             | 19 |
| 3.2.5 Cinética de crescimento de <i>P. janczewskii</i> e produção da $\alpha$ -L-arabinofuranosidase.....  | 19 |
| 3.3 Caracterização bioquímica da $\alpha$ -L-arabinofuranosidase produzida por <i>P. janczewskii</i> ..... | 20 |
| 3.3.1 Determinação do pH ótimo de atividade.....                                                           | 20 |
| 3.3.2 Determinação da temperatura ótima.....                                                               | 20 |
| 3.3.3 Estabilidade em diferentes pH.....                                                                   | 20 |
| 3.3.4 Estabilidade térmica.....                                                                            | 21 |
| 3.3.5 Influência de íons e outras substâncias.....                                                         | 21 |
| 3.4 Métodos Analíticos.....                                                                                | 21 |
| 3.4.1 Determinação da atividade $\alpha$ -L-arabinofuranosidase.....                                       | 21 |
| 3.4.2 Determinação de proteínas.....                                                                       | 22 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                             | 23 |
| 4.1 Otimização da produção de $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por <i>P. janczewskii</i> .....              | 23 |
| 4.1.1 Influência das fontes de carbono.....                                                                | 23 |
| 4.1.2 Influência da concentração das melhores fontes de carbono.....                                       | 25 |

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.3 Influência da temperatura de cultivo.....                                                             | 28 |
| 4.1.4 Influência do pH do meio de cultivo.....                                                              | 30 |
| 4.1.5 Cinética de crescimento de <i>P. janczeswskii</i> e produção da $\alpha$ -L-arabinofuranosidase.....  | 31 |
| 4.2 Caracterização bioquímica da $\alpha$ -L-arabinofuranosidase produzida por <i>P. janczeswskii</i> ..... | 36 |
| 4.2.1 Determinação do pH ótimo de atividade e estabilidade em diferentes pHs.....                           | 36 |
| 4.2.2 Determinação da temperatura ótima e estabilidade térmica.....                                         | 39 |
| 4.2.3 Influência de íons e outras substâncias.....                                                          | 41 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....                                                                                | 45 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                          | 46 |

## RESUMO

A xilana, o segundo principal componente da parede celular vegetal, pertence ao grupo das hemiceluloses, sendo composta por diferentes carboidratos, principalmente xilose e arabinose. Na natureza, devido a sua heterogeneidade estrutural, este complexo polissacarídeo é completamente hidrolisado pela ação sinérgica de diferentes enzimas, incluindo xilanases e  $\beta$ -xilosidases, responsáveis pela degradação da sua cadeia principal e outras enzimas chamadas auxiliares ou desramificantes, importantes para remoção dos grupos laterais. Dentre estas últimas, destacam-se as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases, enzimas responsáveis pela remoção de resíduos L-arabinofuranosil do polímero.

As arabinofuranosidases podem ser produzidas por micro-organismos, como bactérias e fungos, sendo essencialmente enzimas extracelulares. Fungos, especialmente os de solo e madeira, têm sido utilizados para produção de enzimas xilanolíticas, sendo particularmente interessantes do ponto de vista industrial, pelo fato de secretarem suas enzimas diretamente no meio em que se encontram não necessitando de ruptura celular para a liberação das mesmas. Além disso, apresentam níveis de produção mais elevados que os obtidos em culturas bacterianas ou de leveduras.

A crescente preocupação com a escassez dos recursos naturais e com a degradação ambiental tem levado à busca por tecnologias mais eficientes, mais competitivas e menos poluentes. Atualmente, muitos processos industriais empregam enzimas microbianas, apresentando inúmeras vantagens em relação às técnicas convencionais. As  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases podem ser utilizadas individualmente ou em combinação com outras enzimas, representando uma ferramenta promissora para aplicação em diversos processos biotecnológicos como no branqueamento da polpa celulósica, na síntese de oligossacarídeos, na produção de etanol de segunda geração, ou ainda, no setor alimentício como nas indústrias de pães, de suco e de vinho.

A produção de enzimas por micro-organismos é influenciada por diversos fatores, sendo que, dentre eles, fonte de carbono, pH e temperatura são considerados os principais a serem avaliados, uma vez que o substrato não é somente fonte de carbono e energia, mas também fornece ao micro-organismo compostos indutores da produção enzimática. Neste sentido, a utilização de

resíduos agrícolas ou agroindustriais com este propósito é muito vantajosa, pois estes geralmente estão disponíveis em grandes quantidades e a baixo custo.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as melhores condições de produção e caracterizar a atividade arabinofuranosidase de uma linhagem de *Penicillium janczewskii*, isolada de solo da região da Mata Atlântica, previamente caracterizada como boa produtora de enzimas xilanolíticas. Os cultivos foram realizados em escala laboratorial em meio de cultura líquido. Inicialmente foram avaliados diferentes substratos, sendo selecionada a mistura de bagaço de cevada (BSG) e bagaço de laranja (BL) a 2% (1:1; m/m) que resultou na maior produção enzimática. Os efeitos do pH do meio, da temperatura e do tempo de cultivo tanto em condição estacionária, quanto sob agitação também foram avaliados visando encontrar os melhores parâmetros para produção enzimática. As melhores condições para produção da  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por este fungo foram cultivo em pH 5,0 a 25°C, sendo que o crescimento e a produção enzimática foram maiores em condição agitada, apresentando picos no 10º dia.

A enzima presente no filtrado de cultura, obtido nas condições selecionadas, foi caracterizada quanto ao pH e temperatura ótimos, apresentando atividade ótima a 60°C e em pH 4,0. A enzima se manteve estável em uma ampla faixa de pH, sendo que foi mantida 90% da atividade de pH 2,0 a 8,0. A atividade arabinofuranosidase apresentou alta estabilidade a 40°C, mantendo sua atividade acima de 90% durante o período de 1h, no qual o ensaio foi realizado. O valor estimado de meia-vida da enzima a 50°C foi de 10 min., e a 60 e 70°C foi de 5 min.

O efeito de diferentes substâncias sobre a atividade enzimática também foi avaliado, indicando que esta enzima é ativada na presença de alguns íons como  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , enquanto outros afetaram negativamente sua atividade ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ). Substâncias como PMSF, DTT,  $\beta$ -mercaptoetanol, EDTA e SDS também afetaram negativamente a atividade enzimática. Tais conhecimentos são fundamentais para aplicação adequada desta enzima em processos biotecnológicos.

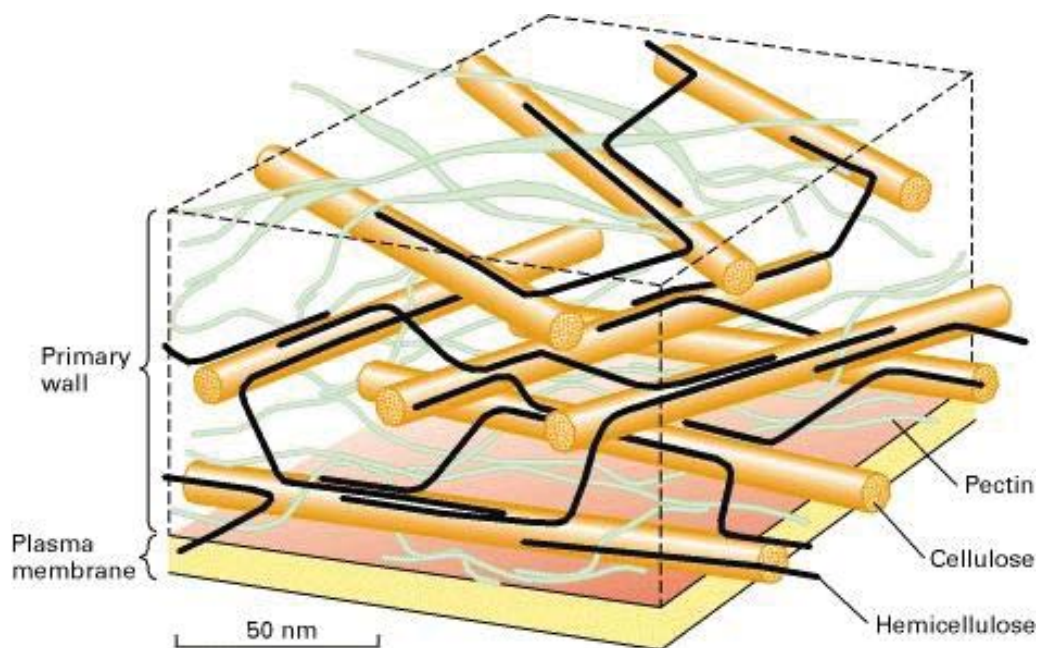
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Parede celular vegetal, hemicelulose e xilana

A parede celular vegetal pode ser considerada o principal recurso renovável formado a partir do processo de fixação fotossintética do gás carbônico (BIELEY, 2003). Além das funções biológicas de proteção, determinação da forma e regulação do volume celular, a parede celular vegetal tem importância em diversas atividades humanas e, como um produto natural, pode ser processada e, posteriormente, comercializada sob forma de papel, manufaturas têxteis, fibras, carvão e madeira para construção civil entre outras utilidades (RAVEN et al., 2007).

A rigidez da parede celular se deve ao entrelaçamento de uma rede de microfibrilas de celulose com uma matriz de polissacarídeos, os quais são formados principalmente por celulosas, hemiceluloses e pectinas, além das proteínas, como representado na **Figura 1** (UHLIG e BEDNAR, 1998). As hemiceluloses respondem por cerca de 20 a 35% da composição da parede celular vegetal (WARD e MOO-YOUNG, 1989). Elas são polímeros heterogêneos, pois, apresentam em sua composição diferentes açúcares como pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-manose, D-glicose, D-galactose) e seus ácidos urônicos.

As xilanas são os polímeros predominantes no grupo das hemiceluloses, sendo, geralmente, polissacarídeos heterogêneos, que constituem uma rede na qual as microfibrilas de celulose e as proteínas estruturais da parede estão inseridas que, ao se unirem, formam uma rede insolúvel (HOOD et al., 1991). Além da xilose, as xilanas apresentam outros componentes, que variam de acordo com a sua fonte, sendo a arabinose um deles (ASPINALL, 1980).



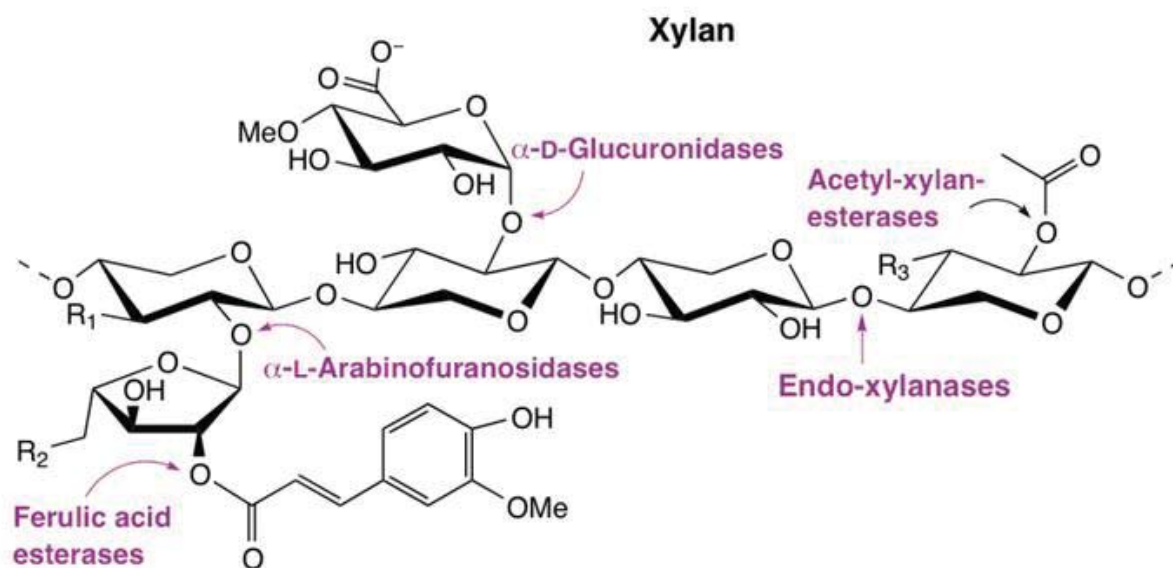
**Figura 1:** Esquema da parede celular vegetal de cebola, indicando os principais constituintes da mesma (LODISH et al., 2000).

Resíduos arabinosil são amplamente distribuídos nas cadeias laterais de algumas hemiceluloses, especialmente as arabinoxilanas. Apesar da estrutura da xilana ser mais complexa que a da celulose, esse polissacarídeo não forma uma estrutura fortemente condensada e cristalina como a da celulose, sendo assim mais acessível a hidrólise enzimática (GILBERT e HAZLEWOOD, 1993). Contudo, muitas vezes a presença de cadeias laterais restringe a hidrólise enzimática das hemiceluloses e também das pectinas (SAHA e BOTHAST, 1998), impedindo a degradação completa desses polímeros (SAHA, 2000; SHALLOM et al., 2002).

A arabinose também pode constituir outros polímeros como as arabinanas, que são polímeros neutros unidos por ligação  $\alpha$ -1,5 (BELDMAN et al., 1993), ocorrendo em diversos tecidos vegetais e proporcionando estabilidade aos grandes complexos pécticos da parede celular. Uma das funções desse polímero parece estar relacionada ao grau de polaridade da parede celular (KERBAUY, 2004).

Xilanas, por sua heterogeneidade e complexidade, requerem um sistema enzimático completo, conhecido como complexo xilanolítico, para que possam ser hidrolisadas completa e eficientemente (POLIZELI et al., 2005) (**Figura 2**). A hidrólise completa requer sinergia tanto de enzimas que degradam a cadeia principal, quanto daquelas que atuam sobre as cadeias laterais do polímero

(COUGHLAN, 1990). As endo- $\beta$ -1,4-xilanases são enzimas responsáveis pela quebra da cadeia principal do polímero, as  $\beta$ -xilosidases hidrolisam xilobiose e xilooligossacarídeos resultantes da ação das xilanases à xilose, enquanto que outro grupo de enzimas, conhecidas como auxiliares ou desramificantes, removem resíduos substituintes específicos da cadeia principal e atuam em sinergia com as primeiras na degradação completa do polímero (BIELY, 2003).



**Figura 2:** Esquema representando uma xilana hipotética e as enzimas responsáveis pela sua degradação (DeBOY et al., 2008).

## 1.2. Enzimas do complexo xilanolítico: características e produção

No grupo de enzimas auxiliares ou desramificantes, além das  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases ( $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo arabinofuranohidrolase EC 3.2.1.55), que liberam arabinose, também estão incluídas as  $\alpha$ -glucuronidases, as acetilxilanaesterases e as esterases do ácido ferúlico e do ácido p-cumárico (KULKARNI et al., 1999; SAHA, 2000; NUMAN e BHOSLE, 2006).

Tanto as enzimas que degradam a cadeia principal, quanto as que degradam cadeias laterais, devem atuar conjuntamente, pois muitas vezes a remoção das cadeias laterais é importante para que a estrutura principal do polímero possa ser completamente hidrolisada (LEE e FORSBERG, 1987). Ainda, observa-se que diversas enzimas acessórias removem cadeias laterais apenas de

xilooligossacarídeos, requerendo, assim, uma hidrólise parcial prévia da xilana, antes das ramificações laterais serem clivadas (POUTANEN et al., 1991).

A produção de arabinofuranosídes pode ser observada tanto em extratos obtidos de micro-organismos, como bactérias e fungos, bem como a partir de diversas plantas (HASHIMOTO e NAKATA, 2003; LEE et al., 2003; RAHMAN et al., 2003). As  $\alpha$ -L-arabinofuranosídes microbianas são enzimas extracelulares, secretadas no meio de cultura, para degradar polissacarídeos (MATSUO et al., 2000).

A produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosídes por micro-organismos é influenciada pela fonte de carbono e composição do meio de cultura, sendo que várias dessas fontes, incluindo açúcares monoméricos e polissacarídeos complexos, têm sido avaliadas para a produção e indução dessas enzimas (NUMAN e BOHSLE, 2006). Resíduos agrícolas ou agroindustriais apresentam potencial para serem utilizados como matéria-prima na produção de combustíveis e produtos químicos em larga escala (GAN et al., 2002). A utilização desses resíduos para composição de meios de cultura microbianos é uma estratégia muito interessante tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental, uma vez que estes estão disponíveis em grandes quantidades e a baixo custo. Isso também é interessante pois ao serem empregados em bioprocessos esses resíduos não serão descartados no ambiente, diminuindo a poluição causada pelos mesmos.

Muitos fungos têm sido avaliados quanto a produção de enzimas xilanolíticas, especialmente pelos elevados níveis de produção enzimática, muitas vezes maiores que os observados em bactérias ou leveduras, e também pelo fato de secretarem suas enzimas diretamente no meio em que se encontram não necessitando de ruptura celular prévia para a liberação das mesmas (POLIZELI et al., 2005; SHOFIQR-RAHMAN et al., 2003).

Dentre a grande diversidade de fungos produtores de  $\alpha$ -L-arabinofuranosídes, naqueles do gênero *Penicillium*, a produção de arabinofuranosídes já foi estudada em *P. capsulatum*, *P. canescens*, *P. purpurogenum*, *P. brasilianum*, *P. funiculosum* (DE IOANNES et al., 2000; FILHO et al., 1996; GUAIS et al., 2010; PANAGIOTOU et al., 2006; SAKAMOTO E KAWASAKI, 2003). Comumente, os substratos utilizados são resíduos de processos industriais e agroindustriais, como bagaço de malte (BSG), bagaço de laranja (BL),

farelo de trigo, polpa de beterraba e milhocina. O pH do meio de cultura, nesses casos, variou entre 4,5 e 7,0 e os cultivos foram realizados entre 25 e 30°C, indicando que as espécies estudadas até o momento são todas mesofílicas. A **Tabela 1** apresenta as espécies de *Penicillium* já estudadas quanto à produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, bem como maior detalhamento das condições de cultivo dos substratos utilizados.

**Tabela 1** – Produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por espécies de *Penicillium*.

| Espécie                | Substrato                                        | Cultivo                                         | pH<br>ótimo | Temperatura   | Referência                                   |
|------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------|---------------|----------------------------------------------|
|                        |                                                  |                                                 |             | ótima<br>(°C) |                                              |
| <i>P. capsulatum</i>   | Polpa de beterraba, farelo de trigo e milhocina. | Cultivo em estado sólido.                       | 4,5         | 30            | Filho et al. (1996); Considine et al. (1987) |
| <i>P. purpurogenum</i> | Xilana de aveia.                                 | Cultivo agitado, 96h.                           | -           | 28            | De Ioannes et al. (2000)                     |
| <i>P. chrysogenum</i>  | Glicose e polpa de beterraba.                    | Cultivo estacionário, Erlenmeyer de 5L, 288h.   | 5,0         | 30            | Sakamoto e Thibault (2001)                   |
| <i>P. brasilianum</i>  | Bagaço de malte                                  | Cultivo estacionário, Erlenmeyer de 100mL, 96h. | 6,0         | 26,5          | Panagiotou et al. (2006)                     |
| <i>P. funiculosum</i>  | Fibra de soja, milhocina, farinha de soja.       | Cultivo agitado (180 rpm), Erlenmeyer, 56h.     | 6,0         | 30            | Guais et al. (2010)                          |

### 1.3. $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase: características bioquímicas

As  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas hidrolisam extremidades não redutoras de  $\alpha$ -L-1,2-,  $\alpha$ -L-1,3 e  $\alpha$ -L-1,5-arabinofuranosídeo de diferentes oligo e polissacarídeos (SAHA e BOTHAST, 1998; SAHA, 2000; SOZZI et al., 2002), sendo, portanto, importantes na degradação de polímeros, como a arabinoxilana, que contém grande quantidade de arabinose (SAHA, 2000; TAKAO et al., 2002). A ação dessas enzimas acelera a hidrólise de ligações glicosídicas mais de  $10^{17}$  vezes, constituindo um dos catalisadores conhecidos mais eficientes (RYE e WITHERS, 2000; SHALLOM et al., 2002).

Beldman et al. (1997) classificou as arabinofuranosidasas de acordo com sua especificidade pelo substrato, definindo assim três grupos: 1) arabinofuranosidasas sem atividade sobre polímeros; 2) arabinofuranosidasas ativas sobre polímeros; 3) arabinofuranosidasas específicas para arabinoxilana. Já, a partir da análise da similaridade na sequência de aminoácidos, das regiões hidrofóbicas, elas foram então agrupadas em cinco famílias das glicosil-hidrolases: GH3, GH43, GH51, GH54, e GH62 (CANTAREL et al., 2009; HENRRISAT e DAVIES, 2000).

Arabinofuranosidasas produzidas por diferentes micro-organismos apresentam grande variação em relação ao pH e temperatura ótimos de atividade, sendo estes verificados entre pH 3,0 e 7,0 e temperaturas de 25 a 75°C (BEZALEL et al., 1993; FERNANDEZ-ESPINAR et al., 1994; FILHO et al., 1996; KAJI, 1984; LEE e FORSBERG, 1987; SAHA e BOTHAST, 1998; PANAGIOTOU et al., 2006).

As características bioquímicas das  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas de *Penicillium* foram estudadas nas seguintes espécies: *P. capsulatum*, *P. canescen*, *P. purpurogenum*, *P. brasilianum*, *P. funiculosum* e *P. chrysogenum*. As enzimas de todas as espécies estudadas foram purificadas, exceto a de *P. brasilianum*. De um modo geral, apresentam massa molecular entre 50 e 70 kDa, com exceção da enzima AFQ1 de *P. chrysogenum* que apresentou massa molecular de 79 kDa. O ponto isoelétrico dessas varia de 3,8 a 7,6, a temperatura ótima de 50 a 70°C, e o pH ótimo foi verificado entre 3,0 e 6,5, com exceção da enzima de *P. funiculosum* que apresenta atividade ótima em pH 2,6 (**Tabela 2**).

**Tabela 2** – Propriedades bioquímicas das  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases produzidas por diferentes espécies de *Penicillium*.

| Espécie                 | Enzima  | MM<br>(kDa) | pI      | pH<br>ótimo | Temperatura<br>ótima<br>(°C) | Referência               |
|-------------------------|---------|-------------|---------|-------------|------------------------------|--------------------------|
| <i>P. capsulatum</i>    | Ara I   | 64,5        | 4,15    | 4,0         | 60                           | Filho et al.             |
|                         | Ara II  | 62,7        | 4,54    | 4,0         | 55                           | (1996)                   |
| <i>P. purpurogenum</i>  | ABF1    | 58,0        | 6,50    | 4,0         | 50                           | De Ioannes et al. (2000) |
| <i>P. canescens</i>     | AF-60   | 60,0        | 7,60    | 4,7         | 70                           | Sinitsyna et al.         |
|                         | AF-70   | 70,0        | 3,8-4,0 | 5,5         | 70                           | (2003)                   |
| <i>P. chrysogenum</i>   | AFQ1    | 79,0        | -       | 4,0-6,5     | 50                           | Sakamoto e               |
|                         | AFS1    | 52,0        | -       | 3,3-5,0     | 50                           | Kawasaki (2003)          |
| <i>P. brasilianum</i> * | -       | -           | -       | 6,0         | 50                           | Panagiotou et al. (2006) |
| <i>P. funiculosum</i>   | PfabfB1 | 65,0        | -       | 3,4         | 60                           | Guais et al.             |
|                         | PfabfB2 | 54,0        | -       | 2,6         | 50                           | (2010)                   |

\* Não purificada.

#### 1.4. Aplicação biotecnológica das $\alpha$ -L-arabinofuranosidases

A utilização de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases isoladamente ou em conjunto com outras enzimas que degradam hemiceluloses representa uma ferramenta promissora em diversos processos biotecnológicos (AYRON et al., 1997; SAHA, 2000). Dentre estes processos, destaca-se a produção de compostos medicinais como agentes anti-glicêmicos e anti-carcinogênicos, melhoramento do sabor do vinho, aumento da qualidade do pão, tratamento de polpas vegetais, clarificação de sucos, aumento da qualidade de rações, produção de bioetanol e síntese de oligossacarídeos (NUMAN e BHOSLE, 2006).

Recentemente tem aumentado o interesse por L-arabinose como um possível aditivo alimentício, uma vez que esta apresenta sabor doce e ao mesmo tempo baixa absorção pelo corpo humano. A presença desse composto no intestino, inibe

a ação da sacarase, enzima que hidrolisa a sacarose em glicose e frutose, diminuindo, portanto, a resposta glicêmica à sacarose (MATSUO et al., 2000; SERI et al., 1996).

Na vinicultura, o tratamento com  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases e outras glicosidases pode acentuar o sabor do vinho (NUMAN e BHOSLE, 2006). A utilização dessas enzimas na panificação, juntamente com outras pentosanases resulta em aumento considerável da qualidade geral do produto: o tratamento enzimático atrasa o processo de envelhecimento e aumenta a vida de prateleira, fornecendo, portanto, benefícios econômicos para esta indústria (GOBBETTI et al., 2000; JIMÉNEZ e MARTINEZ-ANAYA, 1999; MARTINEZ-ANAYA, 1999).

O tratamento da polpa de papel envolve a utilização de diversos compostos organoclorados, que são tóxicos, não recicláveis e resistentes à biodegradação; portanto, devido ao alto grau de poluição, tecnologias alternativas para o tratamento da polpa tem sido desenvolvidos e utilizados (SAID e PIETRO, 2004). Desta maneira, as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases podem ser aplicadas, juntamente com outras enzimas xilanolíticas, no tratamento de polpas celulósicas, uma vez que facilitam a deslignificação da polpa, removendo cadeias laterais de arabinose que retardam a ação das outras enzimas que atuam na hidrólise do polímero (BEZALEL et al., 1993; GÜBITZ et al., 1997).

No Brasil a produção de alimentos balanceados para animais é uma das maiores do mundo sendo que, a utilização de enzimas extracelulares é muito comum neste processo, com a finalidade de complementar as enzimas que não são produzidas pelos animais, ou que são produzidas em quantidades inferiores às necessárias (BON et al., 2008). As hemiceluloses representam de 30 a 40% do total de carboidratos da forragem ingerida por ruminantes, os quais não são capazes de digerir completamente, não aproveitando boa parte desse alimento. (COEN e DEHORITY, 1970; DEHORITY, 1967; GREVE et al., 1984; HESPELL e O'BRYAN, 1992; KORMELINK e VORAGEN, 1993; WEAVER et al., 1992).

No caso de animais monogástricos, polissacarídeos não amiláceos, como arabinoxilana, estão presentes na parede celular dos grãos, aumentando a viscosidade da ingesta, diminuindo a capacidade digestiva e a absorção de outros nutrientes, o que favorece o aparecimento de fezes úmidas e pegajosas. O tratamento prévio desses grãos com arabinofuranosidases contribui para a

remoção de fatores antinutricionais, resultando em maior capacidade de absorção dos nutrientes e no consequente aumento do peso do animal (DENSTADLI et al., 2010; BON et al., 2008; UFFEN, 1997).

### 1.5. *Penicillium janczewskii*: a linhagem no contexto do trabalho

Uma linhagem fúngica de *Penicillium janczewskii* **Zaleski**, isolada de solo da região da Mata Atlântica (Estação Ecológica Juréia-Itatins/SP) (**Figura 3**), destacou-se como boa produtora de xilanases (TAUK-TORNISIELO et al., 2005), despertando interesse no estudo das suas enzimas xilanolíticas. Este fungo apresenta um micélio geralmente branco, mas quando está esporulando muda para verde acinzentada, que se intensifica de acordo com a quantidade de conídios (PITT, 1985). Recentemente, foram realizados estudos sobre a produção de xilanases e  $\beta$ -xilosidases por esta mesma linhagem (TERRASAN, 2007; TERRASAN et al., 2010).



**Figura 3:** Conidióforos de *Penicillium janczewskii* crescidos em meio de Vogel, com glicose, a 28°C durante 7 dias. Imagem obtida em microscópio ótico, aumento: 400x.

Contudo, pouco ainda se sabe sobre a produção e os mecanismos de regulação da produção dessas enzimas, principalmente das  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases, certamente menos estudadas, mas não menos importantes dentro desse complexo enzimático. Assim, o estudo desta enzima produzida por esta linhagem fúngica ainda pouco estudada, visando à seleção das condições ótimas de produção e o conhecimento de algumas de suas propriedades bioquímicas são essenciais para futura aplicação desta enzima, deste complexo enzimático, ou mesmo do referido fungo em processos biotecnológicos.

## 2. OBJETIVOS

1. Verificar a influência de fatores químicos e físicos sobre a produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases pelo fungo *Penicillium janczewskii* em meio de cultura líquido, selecionando as melhores condições para a produção dessa enzima por este fungo.
2. Caracterizar bioquimicamente a atividade  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase produzida por *P. janczewskii*, presente no filtrado de cultura obtido nas melhores condições anteriormente estabelecidas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Linhagem: cultivo e manutenção

A linhagem do fungo *P. janczewskii* foi mantida em laboratório em meio sólido de Vogel (VOGEL, 1956), suplementado com glicose como fonte de carbono. Os meios foram preparados, autoclavados (1,5 atm, 15 min.), distribuídos em tubos de ensaio e inclinados. Os repiques foram realizados periodicamente, sendo mantidos a 28°C durante uma semana e, posteriormente utilizados ou armazenados a 4 °C.

Os conídios da linhagem crescida por 7 dias foram suspensos em água destilada esterilizada e a concentração, estimada com auxílio da Câmara de Neubauer, foi ajustada para  $10^7$  conídios/mL. Um mililitro dessa suspensão foi utilizado como inóculo para os cultivos líquidos.

#### 3.2. Produção de $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por *P. janczewskii*

Para estabelecer as condições ideais para a produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por este fungo, foi realizada uma otimização passo a passo, na qual foram selecionadas as melhores condições de cultivo.

##### 3.2.1. Influência da fonte de carbono

A linhagem foi cultivada em frascos de Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio líquido de Vogel, contendo 1% (m/v) de um dos seguintes substratos como única fonte de carbono: casca de arroz, farelo de aveia, casca de mandioca, farelo de trigo, bagaço de malte (BSG), bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja (BL), sabugo de milho, xilano de aveia, xilose, arabinose, sacarose, maltose, lactose, glicose, CMC, avicel e pectina de citrus. O pH do meio foi ajustado para 6,5 e os cultivos foram realizados por 7 dias a 28°C. Todos os cultivos foram realizados em duplicata.

### **3.2.2 Influência da concentração das melhores fontes de carbono**

A linhagem foi cultivada no meio líquido de Vogel com o substrato selecionado em **3.2.1** em diferentes concentrações: 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 3% e 5% (m/v). O pH foi ajustado para 6,5 e os cultivos foram realizados por 7 dias a 28°C e em duplicata.

### **3.2.3 Influência da temperatura de cultivo**

O cultivo foi realizado utilizando-se o substrato e concentração conforme selecionados nos itens **3.2.1** e **3.2.2**, sob temperaturas de 20°C a 35°C com intervalos de 5°C. O pH foi ajustado para 6,5 e os cultivos foram realizados por 7 dias e em triplicata.

### **3.2.4 Influência do pH do meio de cultivo**

A linhagem foi cultivada nas condições selecionadas anteriormente (item **3.2.1**, **3.2.2** e **3.2.3**), sendo o pH do meio ajustado para valores de 3,0 a 8,0 com variação de 1,0 unidade. O ajuste do pH do meio foi realizado com NaOH ou HCl 1M. Todos os cultivos foram realizados por 7 dias e em triplicata.

### **3.2.5 Cinética de crescimento de *P. janczeswskii* e produção da $\alpha$ -L-arabinofuranosidase**

A cinética de crescimento da linhagem foi estudada de forma estacionária e sob agitação (120 rpm), nas condições previamente selecionadas (itens **3.2.1**, **3.2.2** e **3.2.3** e **3.2.4**), para verificar tanto a influência do tempo de cultivo, quanto da agitação no crescimento fúngico e na produção enzimática. O crescimento foi avaliado indiretamente pela determinação do teor de proteína intracelular.

### **3.3. Caracterização bioquímica da $\alpha$ -L-arabinofuranosidase produzida por *P. janczeswskii***

Após estabelecimento das condições ideais para produção enzimática, a  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase presente no filtrado de cultura, obtida após cultivo nessas condições em meio líquido de Vogel, a enzima foi bioquimicamente caracterizada.

#### **3.3.1 Determinação do pH ótimo de atividade**

A influência do pH na atividade da enzima foi definida utilizando-se os seguintes tampões: Tris-HCl 0,05 M para pH 2,0, 2,5 e 3,0 e Mcllvaine para pH de 3,0 a 8,0, para compor a faixa de pH na qual foi quantificada a atividade enzimática. Os mesmos tampões foram utilizados tanto para o preparo do substrato, quanto para completar o volume de reação.

#### **3.3.2 Determinação da temperatura ótima**

A temperatura ótima de atividade foi determinada pela incubação da enzima no pH ótimo, numa faixa de temperatura que variou de 30 a 90°C, com intervalos de 5°C.

#### **3.3.3 Estabilidade em diferentes pH**

Para determinação da estabilidade em diferentes valores de pH, o filtrado de cultura foi incubado em diferentes tampões, GlyHCl de pH 2,0 a 3,0, Mcllvaine de pH 3,0 a 8,0 e Tris-HCl 0,05 M de pH 8,0 a 9,0, sendo avaliada a atividade residual após 24 h de incubação a 4°C. O filtrado foi incubado na proporção de 2:1 (v/v).

#### **3.3.4 Estabilidade térmica**

A estabilidade térmica da enzima foi avaliada a 40, 50, 60 e 70°C. Após a incubação do filtrado de cultura, sem substrato, foram retiradas alíquotas, as quais foram colocadas em banho de gelo, em intervalos de tempo variados, sendo

posteriormente determinada a atividade residual. A partir destes resultados foi feita uma estimativa da meia-vida ( $T_{50}$ ) da enzima em cada uma das temperaturas avaliadas.

### **3.3.5 Influência de íons e outras substâncias**

O efeito de algumas substâncias sobre a atividade enzimática foi avaliado pela adição de soluções aquosas das mesmas às misturas de reação, realizando-se o cálculo da atividade em relação ao controle, sem a presença da substância.

Foram utilizadas as seguintes substâncias: cloreto de cobre II, sulfato de zinco, sulfato de manganês II, cloreto de bário, cloreto de cálcio, cloreto de amônia, cloreto de sódio, acetato de chumbo, sulfato de magnésio, cloreto de cobalto II, cloreto de mercúrio II, citrato de sódio, dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), fluoreto de fenil metil sulfônico (PMSF), 1,4-ditiotreitol (DTT) e  $\beta$ -mercaptoetanol, nas concentrações finais de 2 e 10 mM.

## **3.4 Métodos analíticos**

### **3.4.1 Determinação da atividade $\alpha$ -L-arabinofuranosidase**

A atividade  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase foi determinada, utilizando-se o substrato sintético *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (Sigma), conforme descrito por Biely (2003), a amostra contendo enzima foi incubada em banho-maria com tampão e substrato, após 0, 5 e 10 minutos a atividade foi interrompida com 1mL de solução saturada de Tetraborato de Na. O *p*-nitrofenol liberado foi determinado pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 405 nm. O valor da absortividade molar do *p*-nitrofenol nessas condições foi de  $17.198 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ .

### **3.4.2 Determinação de proteínas**

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando-se soroalbumina bovina como padrão.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Otimização da produção de $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por *P. janczewskii*

#### 4.1.1. Influência da fonte de carbono

A escolha de um substrato apropriado, geralmente, constitui o primeiro passo na otimização de um processo, sendo de grande importância para aumento da produção enzimática. O substrato, além de ser fonte de carbono, fornece ao micro-organismo diversos compostos indutores, os quais propiciam extensão da fase de produção, o que pode resultar em aumento da produtividade (HALTRICH et al., 1996; KULKARNI et al., 1999).

Dessa maneira, na primeira etapa, diversos resíduos agrícolas ou agroindustriais foram individualmente adicionados ao meio de cultura afim de se verificar os respectivos efeitos de cada um deles na produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases pela linhagem de *P. janczewskii*. A atividade enzimática foi determinada no filtrado de cultura, obtido após sete dias de cultivo, em condição estacionária.

Conforme observado na **Tabela 3** e **4**, maiores níveis de atividade por unidade de volume, e atividade específica foram verificados nos cultivos contendo bagaço de malte (BSG) (0,19 U/mL e 0,62 U/mg prot.), bagaço de laranja (BL) (0,21 U/mL e 0,18 U/mg prot.), xilano de aveia (0,80 U/mL e 3,83 U/mg prot.) e arabinose (0,73 U/mL e 2,13 U/mg prot.). O uso de farelo de trigo, xilose e pectina de citrus resultou na produção de níveis intermediários de atividade, 0,10, 0,13 e 0,09 U/mL, respectivamente, enquanto que, com bagaço de cana de açúcar, sabugo de milho e farelo de aveia, somente baixos níveis de atividade foram observados (0,02, 0,05, 0,04 U/mL, respectivamente). Contudo, a atividade específica obtida com BL foi inferior àquela verificada com xilose e pectina de citrus, e igual àquela observada em meio com sabugo de milho. Nos meios com casca de arroz, casca de mandioca, CMC, Avicel, glicose, sacarose, maltose e lactose, a atividade enzimática não foi detectada.

**Tabela 3** - Produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases por *Penicillium janczewskii* cultivado em meio líquido com diferentes resíduos agrícolas ou agroindustriais.

| Fonte de carbono         | Atividade $\alpha$ -L-arabinofuranosidásica |                 |
|--------------------------|---------------------------------------------|-----------------|
|                          | U/mL                                        | U/mg prot.      |
| Bagaço de cana de açúcar | 0,02 $\pm$ 0,002                            | 0,15 $\pm$ 0,01 |
| Farelo de aveia          | 0,04 $\pm$ 0,01                             | 0,07 $\pm$ 0,02 |
| Farelo de trigo          | 0,10 $\pm$ 0,01                             | 0,17 $\pm$ 0,02 |
| Bagaço de malte          | 0,19 $\pm$ 0,02                             | 0,62 $\pm$ 0,08 |
| Sabugo de milho          | 0,05 $\pm$ 0,005                            | 0,18 $\pm$ 0,00 |
| Casca de arroz           | ND                                          | ND              |
| Casca de mandioca        | ND                                          | ND              |
| Bagaço de laranja        | 0,21 $\pm$ 0,02                             | 0,18 $\pm$ 0,02 |

ND = Atividade não detectada nas condições de ensaio.

**Tabela 4** – Produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por *Penicillium janczewskii* cultivado em meio líquido com diferentes fontes de carbono puras.

| Fonte de Carbono  | Atividade $\alpha$ -L-arabinofuranosidase |                 |
|-------------------|-------------------------------------------|-----------------|
|                   | U/mL                                      | U/ mg prot.     |
| Xilano de aveia   | 0,80 $\pm$ 0,06                           | 3,83 $\pm$ 0,18 |
| Pectina de citrus | 0,09 $\pm$ 0,01                           | 0,20 $\pm$ 0,02 |
| Arabinose         | 0,73 $\pm$ 0,03                           | 2,13 $\pm$ 0,20 |
| Xilose            | 0,13 $\pm$ 0,01                           | 0,33 $\pm$ 0,02 |

ND = Atividade não detectada nas condições de ensaio.

Os resultados obtidos estão de acordo com aqueles verificados na literatura para outras linhagens de *Penicillium*. A utilização de BSG resultou em níveis de produção enzimática similares à produção obtida com *Penicillium persicinum*, *Penicillium funiculosum* e *Penicillium simplicissimum*, na presença de xilana de aveia (KROGH et al., 2004). Entretanto, maiores valores de produção enzimática

foram obtidos com *Penicillium purpurogenum*, na presença de L-arabitol (1,0 U/mL), xilana de aveia (0,7 U/mL) (De IOANNES et al., 2000).

O crescimento dos fungos em geral, quando na presença de polissacarídeos, requer a síntese de polissacarases/polissacaridasas, como as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas, que são extracelulares. As hemiceluloses são compostas por uma mistura complexa de diversos polissacarídeos, constituídos de diferentes monossacarídeos, incluindo glicose, galactose, manose, arabinose, xilose entre outros (GRIFFIN, 1994). Desta maneira, não ocorreu a síntese de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas quando foram fornecidos glicose, sacarose, maltose e lactose, uma vez que estes açúcares estavam disponíveis em uma forma que pôde ser prontamente utilizada para o desenvolvimento do fungo, não ocorrendo a indução da produção de enzimas que degradam esses componentes da parede celular vegetal.

A produção enzimática na presença dessas fontes poliméricas é portanto esperada, para que ocorra a degradação extracelular, e, posterior consumo das mesmas. Essas enzimas são indutíveis e também sujeitas à repressão catabólica. A ausência das mesmas não necessariamente indica que o fungo é incapaz de utilizar a substância em questão, como no caso da casca de arroz e da casca de mandioca, podendo existir alguns outros fatores relacionados ao cultivo ou às características estruturais destes materiais, que interferem na produção enzimática (GRIFFIN, 1994).

Apesar da produção enzimática mais elevada ter ocorrido na presença das fontes de carbono puras, especialmente do xilano de aveia, este apresenta alto custo, que pode ser desvantajoso para produções em larga escala. Desta maneira, foram selecionadas as fontes BSG e BL para dar continuidade aos estudos.

#### **4.1.2. Influência da concentração das melhores fontes de carbono**

As fontes de carbono naturais nas quais o fungo apresentou maior produção enzimática foram BL e BSG, correspondendo aos valores de 0,21 e 0,19 U/mL, respectivamente. Panagiotou et al. (2007) também verificaram elevada produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por *Penicillium brasilianum* utilizando este mesmo substrato. Outros estudos com fungos do gênero *Penicillium* também apresentaram

elevada produção enzimática utilizando outras fontes de carbono naturais, como *P. capsulatum* e *P. funiculosum* cultivados em meio com milhocina, e *P. chrysogenum* com polpa de beterraba (FILHO et al., 1996; CONSIDINE et al., 1987; GUAIS et al., 2010; SAKAMOTO e THIBAUT, 2001).

A composição do BSG varia dependendo do tipo da cevada, do tempo de colheita, das condições de maltagem e maceração, bem como da qualidade e tipos de outros aditivos utilizados no processo. Sua composição básica é composta principalmente por hemiceluloses na forma de arabinoxilanos, que representam de 22 a 28% do total (HUIGE, 2006; MUSSATO e ROBERTO, 2006; SANTOS et al., 2003). Outra característica importante é que tanto este resíduo, como o BL, também empregado neste estudo estão disponíveis à baixo custo, e são produzidos ao longo de todo o ano em larga escala (PANAGIOTOU et al., 2006).

Dessa maneira, BSG e BL, foram utilizados na composição de meios de cultura para produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por *Penicillium janczewskii*. Diversas concentrações de cada um destes substratos foram avaliadas, bem como uma mistura de ambos, a fim de se verificar seus respectivos efeitos na indução da produção enzimática.

Conforme observado na **Tabela 5**, a maior produção enzimática foi observada empregando-se a mistura de BSG e BL a 2% (0,69 U/mL). Os cultivos com BSG a 3% e 5% também apresentaram resultados elevados de produção enzimática, 0,63 e 0,64 U/mL, respectivamente. Os cultivos com BL nas concentrações de 1,5%, 2% e 3% também apresentaram elevada produção, em torno de 0,60 U/mL. Tanto os cultivos com BL, quanto aqueles com a mistura de BSG e BL a 5% apresentaram produção inferior com relação as demais concentrações (0,15 e 0,11 U/mL respectivamente), enquanto que nos cultivos com BSG a 5% a produção manteve-se elevada. Considerando-se a maior produção nos cultivos com a mistura de BSG e BL na concentração de 2%, esta, foi selecionada para dar continuidade aos experimentos.

**Tabela 5** – Produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por *Penicillium janczewskii* cultivado em meio líquido com fontes de carbono em diferentes concentrações.

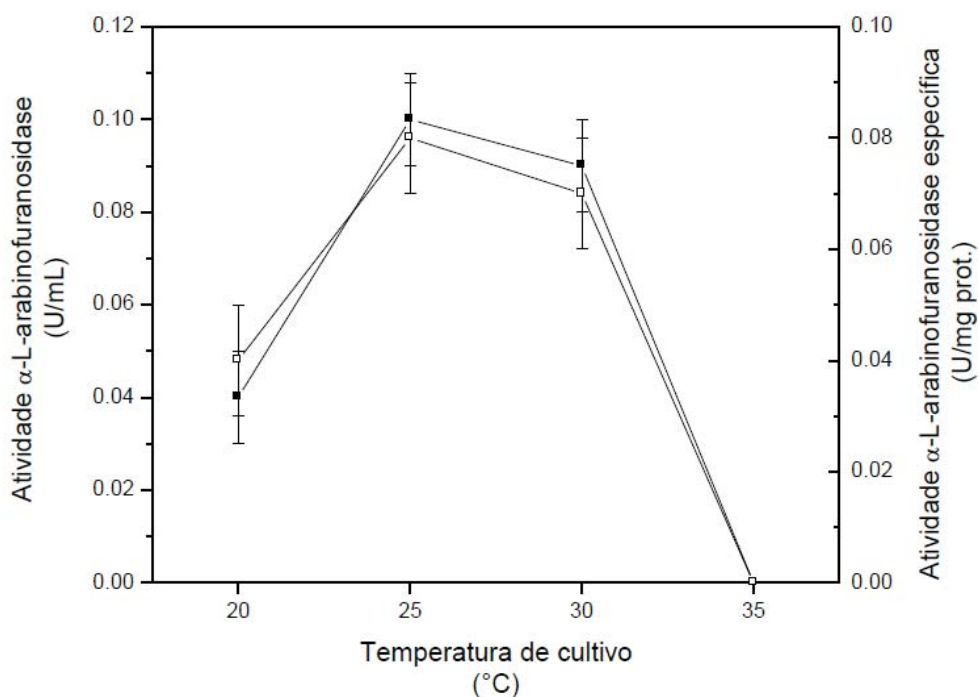
| Fonte de Carbono       | Concentração (%) | A-L-arabinofuranosidase |                 |
|------------------------|------------------|-------------------------|-----------------|
|                        |                  | U/mL                    | U/mg prot.      |
| Bagaço de cevada (BSG) | 0,5              | 0,05 $\pm$ 0,01         | 0,29 $\pm$ 0,02 |
|                        | 1,0              | 0,20 $\pm$ 0,01         | 0,69 $\pm$ 0,03 |
|                        | 1,5              | 0,34 $\pm$ 0,00         | 0,75 $\pm$ 0,04 |
|                        | 2,0              | 0,48 $\pm$ 0,03         | 0,86 $\pm$ 0,03 |
|                        | 3,0              | 0,63 $\pm$ 0,02         | 0,94 $\pm$ 0,06 |
|                        | 5,0              | 0,64 $\pm$ 0,04         | 0,67 $\pm$ 0,04 |
| Bagaço de laranja (BL) | 0,5              | 0,19 $\pm$ 0,02         | 0,28 $\pm$ 0,02 |
|                        | 1,0              | 0,18 $\pm$ 0,02         | 0,15 $\pm$ 0,01 |
|                        | 1,5              | 0,60 $\pm$ 0,01         | 0,31 $\pm$ 0,01 |
|                        | 2,0              | 0,61 $\pm$ 0,01         | 0,28 $\pm$ 0,00 |
|                        | 3,0              | 0,61 $\pm$ 0,04         | 0,21 $\pm$ 0,01 |
|                        | 5,0              | 0,15 $\pm$ 0,01         | 0,04 $\pm$ 0,00 |
| BSG + BL               | 0,5              | 0,25 $\pm$ 0,01         | 0,45 $\pm$ 0,01 |
|                        | 1,0              | 0,34 $\pm$ 0,01         | 0,40 $\pm$ 0,01 |
|                        | 2,0              | 0,69 $\pm$ 0,03         | 0,43 $\pm$ 0,01 |
|                        | 3,0              | 0,51 $\pm$ 0,00         | 0,27 $\pm$ 0,00 |
|                        | 5,0              | 0,11 $\pm$ 0,00         | 0,04 $\pm$ 0,00 |

Com relação à atividade específica, os melhores resultados foram observados nos cultivos realizados apenas com BSG nas concentrações 2% e 3%, com valores de 0,86 e 0,94 U/mg prot., respectivamente. Os valores de atividade específica nos cultivos com BL e com a mistura de BSG e BL foram muito inferiores, sendo os maiores valores observados com BL 1,5% e BSG e BL 0,5%, os quais corresponderam a 0,31 e 0,45 U/mg prot., respectivamente. Tais valores são importantes no caso de uma posterior purificação da enzima.

#### 4.1.3. Influência da temperatura de cultivo

A temperatura de cultivo pode ser considerada um fator de grande relevância para o crescimento dos micro-organismos. Tanto as altas temperaturas quanto as baixas podem inibir o crescimento fúngico, influenciando negativamente a síntese enzimática. Com o aumento da temperatura, o micro-organismo tende a aumentar sua atividade metabólica até certo limite, quando ocorre desnaturação protéica, sendo que acima deste limite as funções celulares diminuem. Já os mecanismos que levam um micro-organismo a perder sua função biológica em baixas temperaturas não são muito bem compreendidos (RAHMAN et al., 2003; MADIGAN et al., 2010).

Dessa maneira, a influência da temperatura de cultivo na produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por *P. janczewskii* também foi avaliada. A partir dos resultados apresentados na **Figura 4** é possível constatar que a maior produção ocorreu nos cultivos realizados a 25°C (0,10 U/mL). A 20 e 30°C também puderam ser observadas produções elevadas (0,04 e 0,09 U/mL, respectivamente), porém inferiores àquela dos cultivos a 25°C. Já a 35°C não foi detectada atividade enzimática. A atividade específica seguiu o mesmo padrão, sendo o maior valor observado a 25°C (0,08 U/mg prot.), uma vez que a influência da temperatura sobre o crescimento do fungo, avaliado pela determinação do teor de proteínas intracelulares, seguiu o mesmo perfil da produção enzimática. Essa temperatura de crescimento indica ainda que o fungo em estudo trata-se de um mesófilo típico.



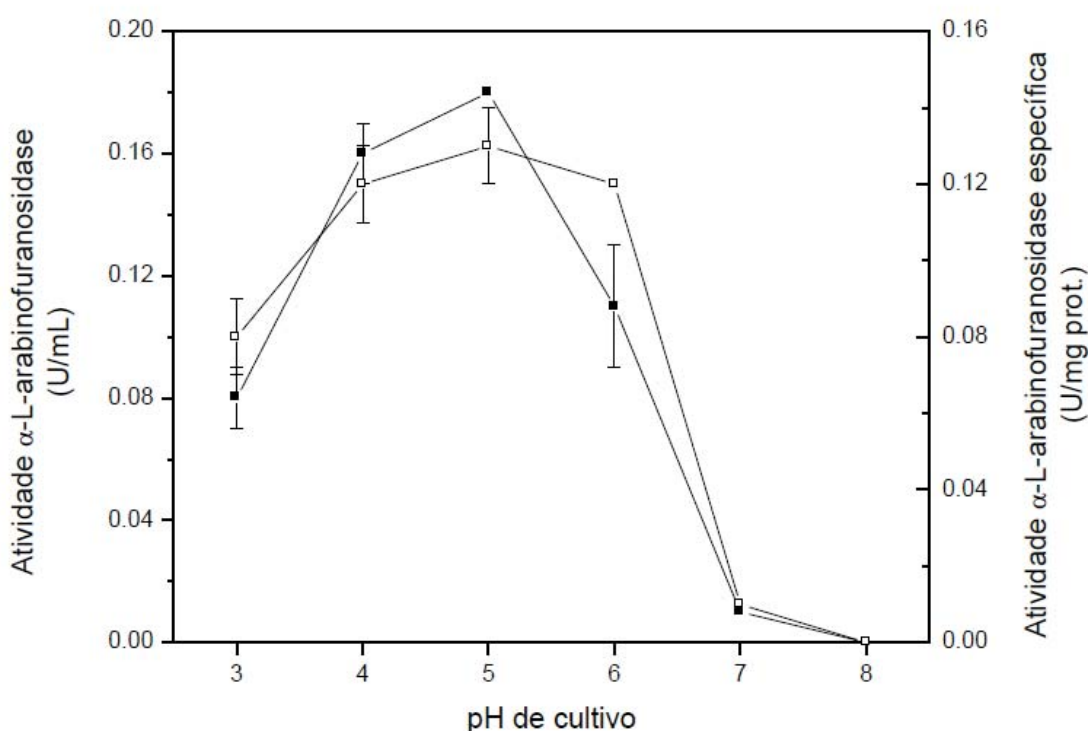
**Figura 4** – Produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por *P. janczewskii* em diferentes temperaturas de cultivo. Condições de cultivo: meio líquido de Vogel, pH 6,5 por 7 dias em condição estacionária. (■) Atividade  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (U/mL); (□) Atividade  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase específica (U/mg prot.).

A melhor temperatura de produção foi similar àquelas apresentadas na literatura para produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por *P. brasilianum* e *P. purpurogenum*, 27 e 28°C, respectivamente. Nestes estudos, a produção enzimática por *P. brasilianum* também apresentou uma redução significativa em temperaturas acima de 36°C (DE IOANNES et al., 2000; PANAGIOTOU et al., 2007). Alguns outros fungos do gênero *Penicillium* apresentaram temperatura ótima de produção enzimática um pouco mais elevadas, como é o caso de *P. capsulatum*, *P. chrysogenum* e *P. funiculosum*, a qual foi de 30°C. (FILHO et al., 1996; GUAIS et al., 2010; SAKAMOTO e THIBAUT, 2001). Sendo assim, os cultivos posteriores foram realizados a 25°C.

#### 4.1.4. Influência do pH do meio de cultivo

O pH também é uma variável que deve ser considerada, especialmente em cultivos líquidos de micro-organismos. No caso dos fungos, o pH afeta diretamente

as propriedades da superfície dos esporos, determinando sua dispersão e germinação, interferindo, conseqüentemente, na formação de produtos (WAINWRIGHT et al., 1993). A **Figura 5** apresenta os resultados obtidos nos cultivos de *P. janczewskii* realizados em meios com diferentes valores de pH. A maior atividade enzimática foi verificada em pH 5,0 (0,18 U/mL), sendo que em pH 4,0 e 6,0 também foram observadas atividades elevadas (0,16 e 0,11 U/mL, respectivamente), porém inferiores àquela observada em pH 5,0.



**Figura 5** – Produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por *P. janczewskii* em diferentes pHs. Condições de cultivo: meio líquido de Vogel, 25 °C por 7 dias em condição estacionária. (■) Atividade  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (U/mL); (□) Atividade  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase específica (U/mg prot.).

A atividade sofreu queda significativa em pH 3,0, intensa diminuição em pH 7,0 (0,01 U/mL), e não foi detectada em pH 8,0. A atividade específica seguiu o mesmo padrão, apresentando maior valor em pH 5,0 (0,13 U/mg prot.), sendo que de pH 4,0 a 6,0 a variação foi ainda menor.

Os resultados são similares àqueles encontrados na literatura para outras  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase de espécies de *Penicillium*, que também apresentaram maior produção em meios levemente ácidos. Maior produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase

por *P. capsulatum* e *P. chrysogenum* foi verificada em pH 4,5, e 5,0 respectivamente, e para *P. brasilianum* e *P. funiculosum* esta foi observada em pH 6,0 (FILHO et al., 1996; GUAIS et al., 2010; PANAGIOTOU et al., 2007; SAKAMOTO e KAWASAKI, 2003).

A maioria dos micro-organismos apresenta uma faixa de pH ótima para o crescimento que varia de duas a três unidades, sendo que condições mais favoráveis para a produção de enzimas xilanolíticas por fungos filamentosos encontra-se em geral em região levemente ácida, variando, geralmente, de pH 5,0 a 6,5 (BAJPAI, 1997). Quando o pH das culturas é levado à neutralidade, as membranas citoplasmáticas de fungos são prejudicadas, podendo ocorrer lise celular (MADIGAN et al., 2010). Desta maneira, a maior produção na faixa de pH entre 4,0 e 6,0, bem como sua diminuição significativa em pH 7,0 e 8,0, como verificado neste trabalho, segue este comportamento geral.

#### **4.1.5. Cinética de crescimento de *P. janczewskii* e produção da $\alpha$ -L-arabinofuranosidase**

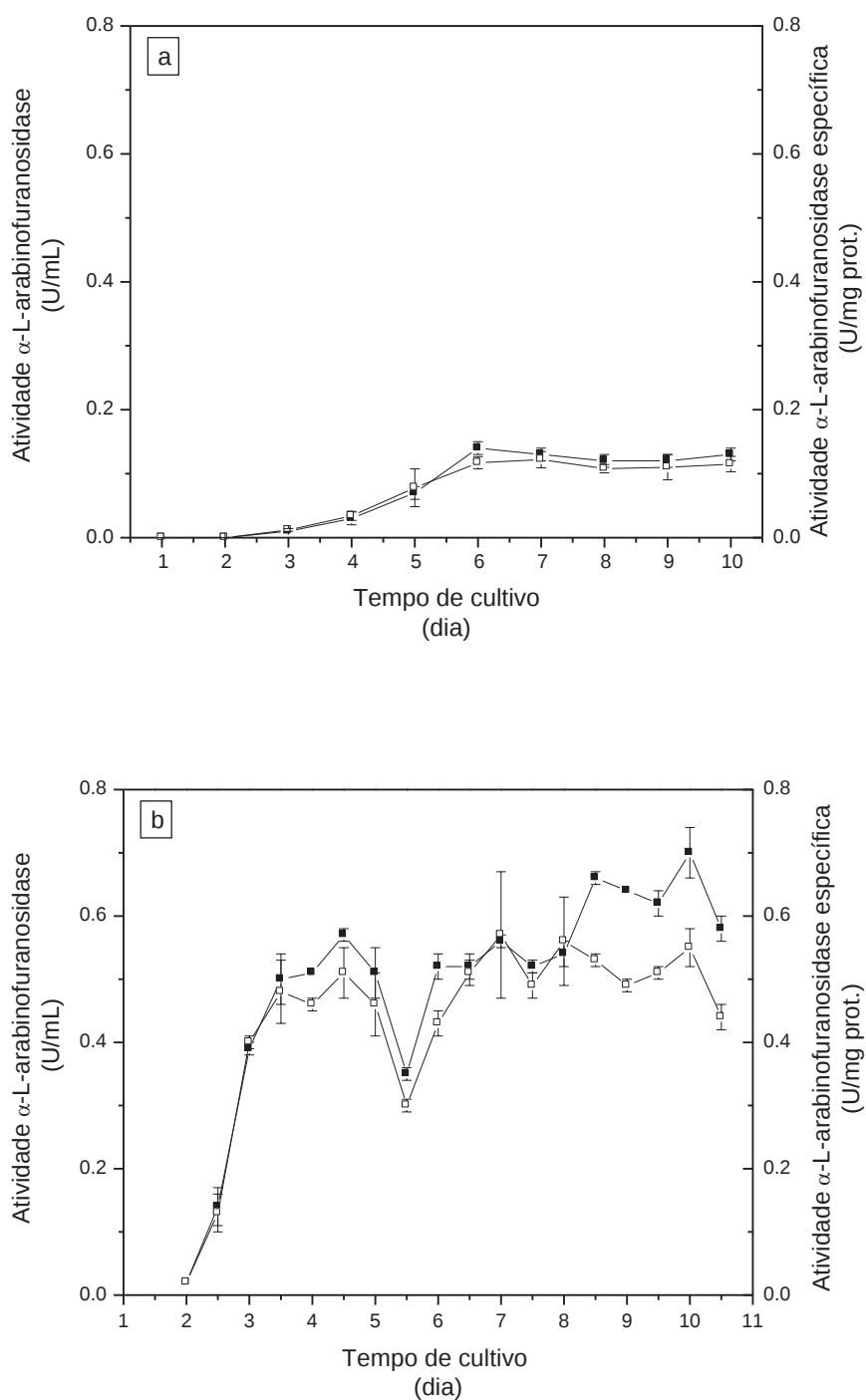
Os cultivos foram desenvolvidos em batelada, de tal forma que o crescimento exponencial dos micro-organismos não pode continuar indefinidamente. Nesses casos, observa-se uma curva típica de crescimento que descreve um ciclo completo, que inclui uma fase lag (fase de adaptação ao meio), uma fase exponencial ou fase log (fase de multiplicação celular), uma fase estacionária, na qual a quantidade de células se mantém estável, e uma fase de declínio ou morte. O crescimento de uma população microbiana pode ser medido pela análise do número de células, a partir de alterações na concentração de algum componente celular, proteínas, ácidos nucléicos, ou ainda quantificando-se o peso seco das próprias células (MADIGAN et al., 2010).

Para se determinar o melhor período de cultivo, bem como a melhor condição, estacionária ou agitada, para produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por *P. janczewskii*, foram realizados cultivos por 10 dias tanto em condição estacionária quanto em condição agitada. Em condição estacionária, o crescimento e a produção enzimática foram avaliados a cada 24 horas e, em condição agitada, a cada 12

horas. É importante ressaltar que a análise do crescimento foi realizada de maneira indireta, estimada a partir da quantificação de proteínas intra-celulares.

Na **Figura 6a** pode-se observar os resultados obtidos com relação à produção em condição estacionária. A produção enzimática foi crescente do 3º (0,01 U/mL) ao 6º dia (0,14 U/mL), no qual apresentou pico. A atividade diminuiu levemente no 7º dia (0,13 U/mL), mantendo-se estável a partir desse período. A atividade específica apresentou um padrão ligeiramente diferente, com pico no 7º dia (0,12 U/mg prot.), e, a partir deste, diminuiu levemente até o 10º dia (0,11 U/mg prot.).

Já em condição agitada (**Figura 6b**) pode-se observar produção elevada a partir dos 3,5 dias de cultivo com o maior pico de atividade no dia 10 (0,7 U/mL) e atividades elevadas nos dias 8,5, 9,0 e 9,5 dias (0,66, 0,64 e 0,62 U/mL respectivamente). A atividade específica neste caso seguiu um mesmo padrão, sendo que os resultados do 7º e 10º foram bastante semelhantes (0,57 e 0,55 U/mg prot., respectivamente). Em outros trabalhos, fungos como *Penicillium* sp. e *Talaromyces thermophilus*, avaliados para a produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, apresentaram uma produção elevada em torno do 7º (0,5 U/mL) e 6º dias (0,26 U/mL), respectivamente, quando cultivados sob agitação (GUERFALI et al., 2010; RAHMAN et al., 2003).



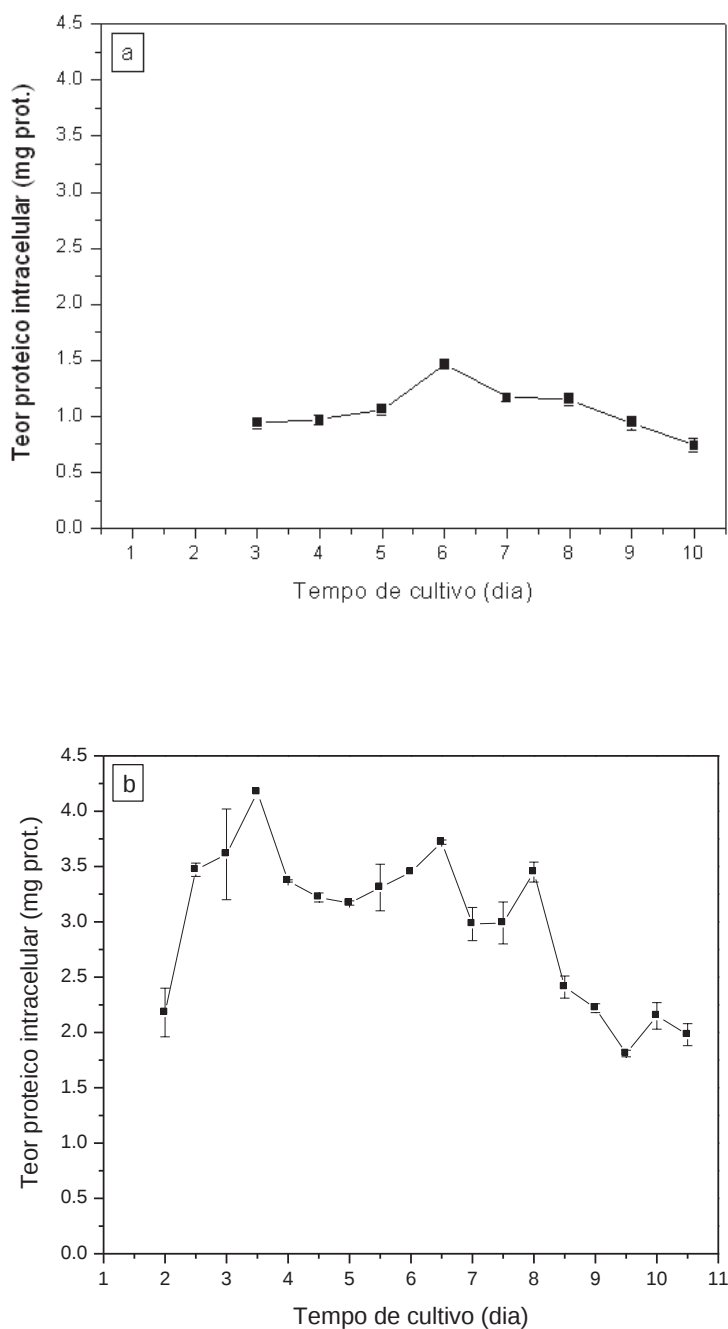
**Figura 6** – Cinética de produção da  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por *P. janczewskii* em condição estacionária **(a)** e agitada (120 rpm) **(b)**. Condições de cultivo: meio líquido de Vogel, pH 5,0 e 25°C. (■) Atividade  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (U/mL); (□) Atividade  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase específica (U/mg prot.).

Comparando-se os resultados apresentados na **Figura 6a e 6b**, verifica-se que a produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por *P. janczewskii* nos cultivos agitados foi substancialmente maior do que nos cultivos estacionários. Em contraposição, Terrasan (2007) constatou que a produção de xilanase e  $\beta$ -xilosidase, enzimas do sistema xilanolítico, produzidas por este mesmo fungo foi maior quando o mesmo foi cultivado em condição estacionária.

Em estudos com outras linhagens foi verificada maior produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases tanto em cultivos estacionários, como é o caso em *P. chrysogenum* e *P. brasilianum* (PANAGIOTOU et al., 2006; SAKAMOTO e THIBAUT, 2001), quanto sob agitação como em *P. purpurogenum* e *P. funiculosum* (DE IOANNES et al., 2000; GUAIS et al., 2010).

Durante os cultivos realizados nas duas condições, diferenças foram observadas na morfologia do micélio de *P. janczewskii*. No cultivo estacionário foi observada a formação de um micélio filamentosos cobrindo toda a superfície do meio, enquanto que sob agitação notou-se a presença de “pellets” miceliais imersos no meio (dados não apresentados).

Geralmente, o cultivo estacionário induz ao crescimento de um micélio filamentosos heterogêneo, no qual as camadas superficiais estão em contato constante com oxigênio, mas apresentam pouco contato com o meio de cultura. Já as regiões mais inferiores do micélio estão em contato constante com o meio, porém tem menor disponibilidade de oxigênio. Dependendo das características intrínsecas de cada micro-organismo, essa situação pode resultar em inibição do crescimento ou em produção aumentada de metabólitos secundários (GRIFFIN, 1994). Em cultivo sob agitação, obtêm-se um sistema mais homogêneo com crescimento submerso, o qual favorece a formação de “pellets” miceliais, que em alguns casos são pré-requisitos para a produção bem sucedida de metabólitos secundários ou enzimas (GRIFFIN, 1994; BRAUN e VECHT-LIFSHITZ, 1991), sendo este, aparentemente, o caso de *P. janczewskii* em relação à produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase.



**Figura 7** – Cinética de crescimento de *P. janczewskii* em condição estacionária **(a)** e agitada (120 rpm) **(b)**. Condições de cultivo: meio líquido de Vogel, pH 5,0 e 25°C. (■) Teor protéico intracelular (mg prot.).

Na **Figura 7a** pode-se observar a cinética de crescimento de *P. janczewskii* sob condição estacionária. O padrão de desenvolvimento do fungo está de acordo com o esperado, e o aparecimento de um pico no 6º dia de cultivo (1,5 mg prot.), indica que o fungo teve seu crescimento máximo neste dia.

Na **Figura 7b** pode-se observar a cinética de crescimento de *P. janczewskii* em condição agitada, que apresentou um aumento da massa proteica nos primeiros dias, atingindo seu pico de crescimento aos 3,5 dias de cultivo (4,17 mg prot.) e uma tendência a diminuir no decorrer dos dez dias seguintes. Na literatura, resultados semelhantes foram verificados com *P. sclerotiorum* em cultivo agitado, que apresentou crescimento elevado logo nos primeiros dias de cultivo, com um pico em 3,5 dias e diminuição nos dias posteriores (KNOB e CARMONA, 2009).

No cultivo estacionário, tanto a produção enzimática quanto a cinética de crescimento, apresentaram características semelhantes. O ápice de crescimento do fungo, que corresponde ao início da fase estacionária, foi também onde se observou maior produção enzimática. Já no cultivo agitado, a maior concentração enzimática no meio extracelular foi observada no 10º dia, fase de declínio ou morte do fungo, enquanto o pico de crescimento fungico ocorreu após 3,5 dias.

Devido a notável diferença, tanto no crescimento do fungo quanto na produção enzimática, entre o cultivo estacionário e agitado, o segundo, que apresentou melhores resultados, foi selecionado para dar continuidade aos estudos, de tal forma que os cultivos seguintes foram realizados sob agitação (120 rpm), durante 10 dias.

## **4.2. Caracterização bioquímica da $\alpha$ -L-arabinofuranosidase produzida por *P. janczewskii***

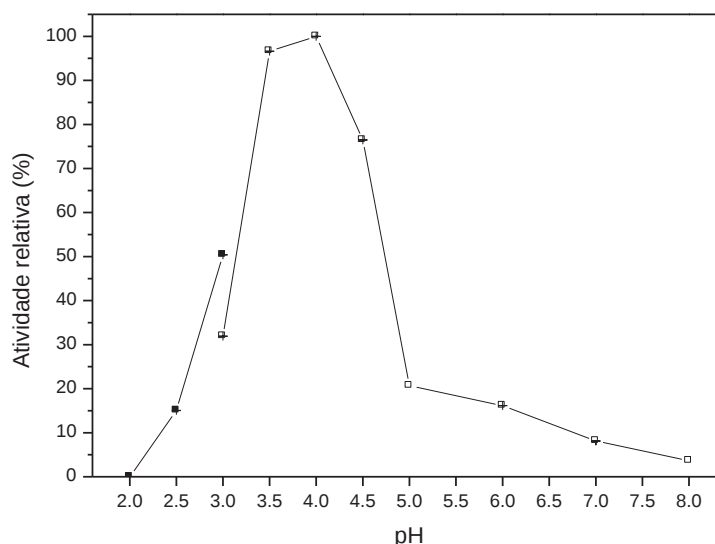
### **4.2.1. Determinação do pH ótimo de atividade e estabilidade em diferentes pHs**

As enzimas são capazes de atuar em determinados ambientes, de tal forma que alterações nestes podem resultar em mudanças estruturais: extremos de pH, por exemplo, alteram a carga líquida de proteínas, causando uma repulsão eletrostática e o rompimento de ligações de hidrogênio (NELSON e COX, 2011). Desta maneira, o pH ótimo de atividade de uma enzima bem como sua estabilidade em meios com diferentes valores de pH são características que devem ser muito bem conhecidas para melhor atuação e consequente utilização das mesmas.

Na **Figura 8** é possível observar que a  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase apresentou atividade ótima em pH 4,0, sendo que a atividade foi praticamente a mesma em pH

3,5 e manteve-se em aproximadamente 80% da máxima em pH 4,5. Em pH 5,0 a atividade sofreu grande diminuição, restando apenas 20% do total, e, a partir deste, diminuiu gradativamente até pH 8,0 quando foi quase nula.

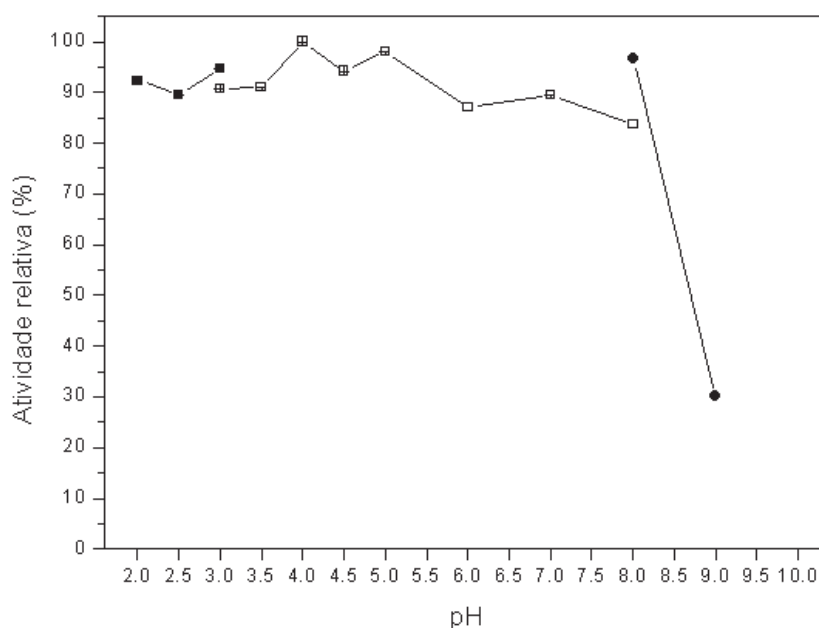
Resultados semelhantes podem ser encontrados em estudos realizados com outras linhagens fúngicas. As  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases purificadas de *P. capsulatum*, *P. purpurogen*, e *P. chrysogenum* apresentam pH ótimo de atividade em torno de 4,0 (CONSIDINE et al., 1987; FILHO et al., 1996; De IOANNES et al., 2000; SAKAMOTO e KAWASAKI, 2003). A  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase de *P. canescens* apresentou atividade ótima na faixa de pH de 8,3 a 8,8 quando os ensaios foram realizados com o extrato bruto, já nos ensaios com a enzima purificada, a atividade ótima foi verificada no pH 4,0, o que foi atribuído à presença de alguma substância no meio, ou no ensaio para dosagem enzimática, ou ainda a presença de mais de uma enzima, interferindo em sua atividade (SINITSYNA et al., 2003). Fungos de outros gêneros também apresentam  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases com pH ótimo dentro de uma faixa ácida, como por exemplo, *Fusarium oxisporum* com pH 6,0 e os fungos do gênero *Aspergillus*, que em sua maioria apresentam um pH ótimo entre 3,3 e 5,5 (CUROTTO et al., 1998; LOUNTERI, 1998; PANAGIOTOU et al., 2006).



**Figura 8** – Influência do pH sobre a atividade  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase de *P. janczewskii*. Atividade em tampão Tris-HCl 0,5M (■) e em tampão McIlvaine (□). Condições de cultivo: meio líquido de Vogel, pH 5,0 por 10 dias em condição agitada (120 rpm) a 25°C.

Na **Figura 9** pode-se observar que a  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase foi estável em uma faixa ampla de pH, após incubação por 24h a 4°C, mantendo mais de 90% da atividade em pH de 2,0 a 8,0. Já, no caso da incubação em pH 9,0, a atividade residual foi de apenas 21,6% em tampão Tris-HCl.

As arabinofuranosidases produzidas por outros micro-organismos em geral também apresentam uma ampla faixa de estabilidade em diferentes pHs. *P. brasilianum*, produz uma arabinofuranosidase que manteve mais de 80% de sua atividade total após 6 horas de incubação a 10°C na faixa de pH de 3,0 a 11,0 (PANAGIOTOU et al., 2003). Já, a arabinofuranosidase de *P. chrysogenum* manteve mais de 80% de sua atividade em uma faixa de pH de 3,0 a 8,0, após incubação por 16 h a 30°C (SAKAMOTO e THIBAUT, 2001).



**Figura 9** – Estabilidade da  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase de *P. janczewskii* em diferentes pHs. Atividade em tampão Gly-HCl (■), em McIlvaine (□) e em Tris-HCl 0,05 M (●). Condições de cultivo: meio líquido de Vogel, pH 5,0 por 10 dias em condição agitada (120 rpm) a 25°C.

A arabinofuranosidase produzida por *Fusarium oxysporum* também apresentou-se estável em uma faixa de pH ampla, 5,0 a 8,0 (PANAGIOTOU et al., 2003). Esta mesma enzima produzida por bactérias como *Arthrobacter* sp. e

*Thermobacillus xylanilyticus* apresentaram faixas de estabilidade de pH 5,0 a 9,0 e 4,0 a 11,0, respectivamente (KHANDEPARKER et al., 2008; DEBECHE et al., 2000).

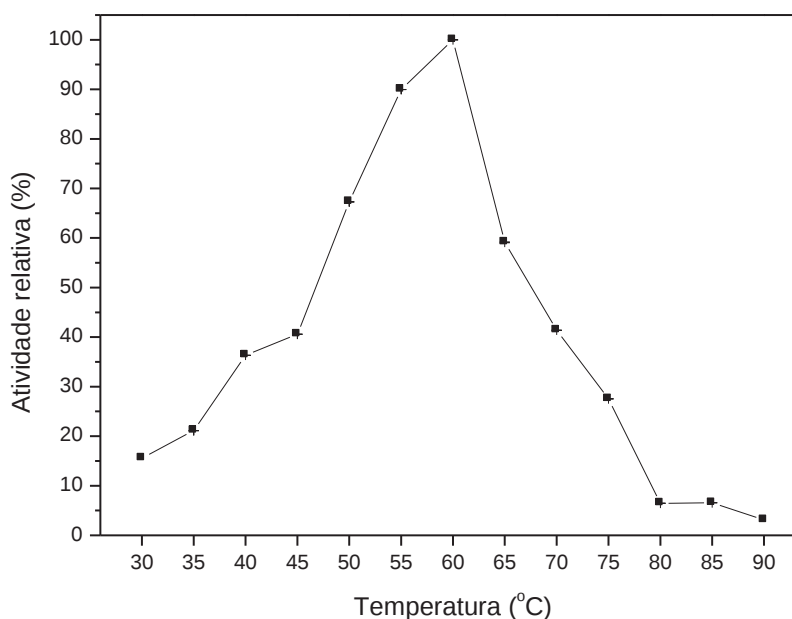
A ampla faixa de pH na qual a  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase de *P. janczewskii* se manteve estável é muito interessante do ponto de vista industrial, pois pode ser empregada em diferentes processos, os quais são realizados em diferentes valores de pH e podendo também resistir a variações de pH em processos industriais, nos quais este não é controlado.

#### 4.2.2. Determinação da temperatura ótima e estabilidade térmica

A estrutura nativa das proteínas é preservada por um balanço de forças não covalentes (ligações de hidrogênio, iônicas, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals), a variação da temperatura, principalmente o aumento da mesma, pode causar a quebra dessas interações, e consequentemente um desdobramento das proteínas (GOMES et al., 2007; NELSON E COX, 2011). Desta maneira, a determinação da temperatura ótima de atividade de uma enzima, bem como sua estabilidade em diferentes temperaturas, é muito importante para uma futura aplicação da mesma em processos industriais.

Conforme apresentado na **Figura 10**, a  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase de *P. janczewskii* apresenta atividade ótima a 60°C. A 55°C a atividade também foi elevada, 89,9% da máxima; já, a 50 e 65°C houve redução da atividade chegando a aproximadamente 60%. Em todas as demais temperaturas avaliadas, a atividade residual foi inferior a 50%, e a 90°C ela foi praticamente nula (3,1%).

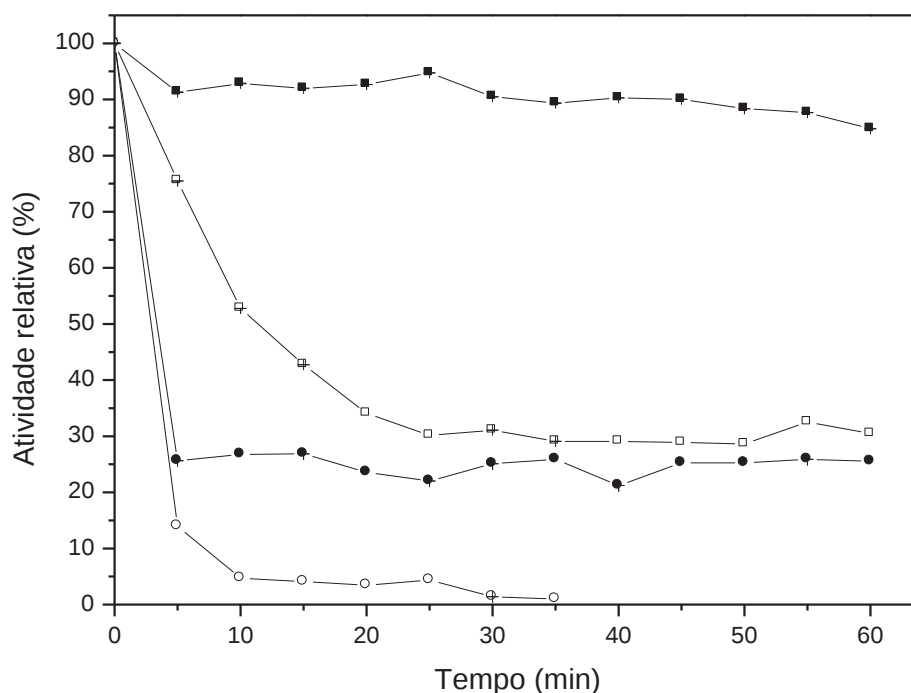
$\alpha$ -L-Arabinofuranosidases produzidas por diversos outros fungos geralmente apresentam temperatura ótima entre 50 e 70°C. Para a de *P. canescens*, a enzima purificada apresentou temperatura ótima de 70°C, e no extrato bruto entre 50 e 70°C (CUROTTO et al., 1998; SINITSYNA et al., 2003). As  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases de *P. capsulatum* e *P. funiculosum* apresentaram atividade ótima a 60°C, assim como a de *P. janczewskii*; já, as de *P. purpurogenum*, *P. chrysogenum* e *P. brasilianum* apresentaram temperatura ótima de 50°C (De IOANNES et al., 2000; FILHO et al., 1996; GUAIS et al., 2010; PANAGIOTOU et al., 2006; SAKAMOTO e KAWASAKI, 2003).



**Figura 10** – Efeito da temperatura sobre a atividade  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase de *P. janczewskii*. Condições de cultivo: meio líquido de Vogel, pH 5,0 por 10 dias em condição agitada (120 rpm) a 25°C.

A  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase de *P. janczewskii* apresentou maior estabilidade a 40°C, mantendo mais de 90% de sua atividade durante os 60 min de ensaio. A 50°C uma queda na atividade para 52,78% da atividade inicial foi verificada após 10 minutos. A 60 e 70°C os valores de meia-vida foram inferiores a 5 min em ambas as temperaturas, como pode ser observado na **Figura 11**.

A 60°C e pH 4,0 a meia-vida de duas arabinofuranosidasas produzidas por *P. capsulatum*, Ara I e Ara II, também foi baixa com 17,5 e 8 min, respectivamente (FILHO et al., 1996). *P. chrysogenum* produz uma arabinofuranosidase que não apresentou atividade a 60°C, enquanto que a 50°C e pH 5,0 mais de 80% da atividade inicial foi mantida após 1 hora de incubação (SAKAMOTO e KAWASAKI, 2003).



**Figura 11** – Estabilidade da  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase de *P. janczewskii* em diferentes temperaturas. 40°C (■); 50°C (□); 60°C (●); 70°C (○). Condições de cultivo: meio líquido de Vogel, pH 5,0 por 10 dias em condição agitada (120 rpm) a 25°C.

Algumas arabinofuranosidasas produzidas por bactérias se mostraram mais resistentes a altas temperaturas, como aquela produzida por *Arthrobacter sp.*, que apresentou meia-vida de 20 min a 80°C, e a de *Thermobacillus xylanilyticus*, com uma meia-vida de 2 h a 90°C (CUROTTO et al., 1998; KHANDERPARKER et al., 2008).

#### 4.2.3. Influência de íons e outras substâncias

Algumas enzimas, para desempenhar sua função, necessitam de um ou mais componentes químicos adicionais, ou cofatores, que podem ser íons inorgânicos ou moléculas orgânicas. Alguns sais inorgânicos também podem ajudar na estabilidade enzimática. Os metais são conhecidos como sendo capazes de estabilizar proteínas, sendo que alguns íons de metais bivalentes, já estudados, são

responsáveis pela estabilização da estrutura e oligomerização de algumas proteínas (GOMES et al., 2007; NELSON e COX, 2011).

A atividade  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase pode ser afetada por íons metálicos, detergentes iônicos e não iônicos e agentes quelantes e redutores, dependendo da enzima e da concentração do agente utilizado (NUMAN e BHOSLE, 2006). Neste trabalho a influência de 17 substâncias, presentes nas concentrações de 2 e 10 mM, foi avaliada sobre a atividade da  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase produzida por *P. janczewskii*.

Como pode ser observado na **Tabela 6**, a atividade enzimática foi levemente ativada pela presença dos íons  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{NH}_4^+$ . Na presença de  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e citrato de sódio, a enzima não apresentou alterações significativas em sua atividade. Por outro lado sua atividade foi negativamente afetada na presença dos íons  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , e intensamente afetada na presença de  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  à 10 mM. O mercúrio é conhecido por interagir com grupos sulfidril de proteínas, alterando a estrutura e reduzindo o desempenho na catálise (KAHNDEPARKER et al., 2008). A presença de  $\text{Co}^{2+}$  reduziu significativamente a atividade enzimática apenas na concentração de 10mM. Em *P. chrysogenum* também foi verificado que os íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  afetam a atividade da  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, sendo que os demais íons avaliados não apresentaram efeitos sobre a atividade desta enzima (SAKAMOTO e KAWASAKI, 2003).

A atividade foi consideravelmente afetada por PMSF, sendo que esta substância se liga à serinas, bem como a cisteínas, sendo utilizada para identificar a presença de serinas no sítio ativo de enzimas, especialmente proteases. Geralmente é usada para inibir serina e cisteína proteases que possam digerir as proteínas de interesse após a lise celular (JAMES, 1978). Desta maneira, o efeito dessa substância sobre a  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase indica a presença de serinas ou cisteínas importantes para a estrutura tridimensional e/ou catálise.

| Substância                               | Atividade Relativa (%) |              |
|------------------------------------------|------------------------|--------------|
|                                          | 2mM                    | 10mM         |
| <b>Controle</b>                          | 100,0                  | 100,0        |
| <b>CuCl<sub>2</sub></b>                  | 81,9 ± 17,7            | 8,2 ± 2,4    |
| <b>ZnSO<sub>4</sub></b>                  | 102,8 ± 9,3            | 77,0 ± 20,5  |
| <b>MnSO<sub>4</sub></b>                  | 111,5 ± 13,2           | 117,1 ± 12,0 |
| <b>BaCl<sub>2</sub></b>                  | 124,5 ± 7,6            | 112,5 ± 8,7  |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b>                  | 120,5 ± 8,1            | 116,5 ± 11,2 |
| <b>NH<sub>4</sub>Cl</b>                  | 114,4 ± 7,0            | 121,5 ± 8,8  |
| <b>NaCl</b>                              | 111,2 ± 6,3            | 110,8 ± 9,9  |
| <b>Pb(CH<sub>3</sub>COO<sub>2</sub>)</b> | 69,0 ± 14,2            | 47,9 ± 8,9   |
| <b>MgSO<sub>4</sub></b>                  | 61,8 ± 13,2            | 56,8 ± 11,2  |
| <b>CoCl<sub>2</sub></b>                  | 96,5 ± 12,2            | 33,7 ± 17,3  |
| <b>HgCl<sub>2</sub></b>                  | 44,6 ± 12,7            | 14,3 ± 21,9  |
| <b>Citrato Na</b>                        | 96,2 ± 11,7            | 106,7 ± 14,5 |
| <b>SDS</b>                               | 8,3 ± 16,7             | 5,1 ± 5,0    |
| <b>EDTA</b>                              | 63,1 ± 22,3            | 61,0 ± 7,3   |
| <b>PMSF</b>                              | 50,3 ± 8,2             | 22,0 ± 11,3  |
| <b>DTT</b>                               | 71,1 ± 15,8            | 62,3 ± 21,0  |
| <b>β-mercaptoetanol</b>                  | 57,2 ± 10,4            | 66,8 ± 13,3  |

**Tabela 6:** Influência de íons e outras substâncias na atividade α-L-arabinofuranosidase de *P. janczewskii*.

Tanto o DTT, quanto o β-mercaptoetanol reduziram parcialmente a atividade da enzima. Ambos são agentes redutores que reduzem ligações dissulfeto de proteínas, sendo que o DTT possui uma ação mais eficiente. Ambos são comumente adicionados em reações enzimáticas para inibir a oxidação de resíduos livres de sulfidril e desta maneira manter a atividade enzimática (KNIGHT, 2004; CLELAND, 1964; RUEGG e RUDINGER, 1977). No caso da α-L-arabinofuranosidase a redução da atividade por esses agentes sugere que pontes dissulfeto devem estar presentes na sua estrutura.

O efeito negativo do DTT sobre a  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase indica que ela não apresenta cisteína, mas cistinas. Uma vez que ele impede que as ligações S-H de cisteínas sejam oxidadas, preservando ou até aumentando a atividade de enzimas que contém esse aminoácido.

A adição de EDTA levou a uma redução na atividade enzimática, indicando que esta arabinofuranosidase necessita de algum íon metálico como cofator, diferindo daquelas produzidas por *T. xylanilyticus*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bifidobacterium longum*, as quais não tiveram a atividade afetada pela presença desta substância (GILEAD e SHOHAM, 1995; DEBECHE et al., 2000; NUMAN e BHOSLE, 2006).

A presença de SDS reduziu quase que completamente a atividade enzimática em ambas as concentrações. Como o SDS é um detergente que interfere nas interações hidrofóbicas da enzima, impedindo que a mesma mantenha sua estrutura tridimensional (NELSON e COX, 2011), essa observação indica que as concentrações utilizadas são suficientes para causar a desnaturação dessa enzima.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Penicillium janczewskii* apresentou considerável produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases usando bagaço de cevada, bagaço de laranja, xilano de aveia e arabinose como substrato. A produção dessa enzima em bagaço de laranja e bagaço e cevada é bastante interessante considerando que estes resíduos agroindustriais estão disponíveis em grande escala e a baixo custo durante todo o ano. Por esta razão, numa segunda etapa, avaliou-se a concentração destes resíduos no meio, com a intenção de aumentar a produção enzimática.

As maiores atividades foram obtidas nos cultivos com BSG e BL nas concentrações de 3,0 e 5,0% e de 1,5 a 3,0%, respectivamente, sendo que a mistura de ambos os substratos a 2% (1:1) mostrou atividade ainda maior. Os resultados obtidos com estes resíduos foram inferiores aos encontrados com xilano de aveia a 1%, entretanto ambos foram utilizados como uma alternativa de baixo custo ao uso do substrato puro.

A temperatura ótima para a produção dessa enzima foi 25°C, e o melhor pH de cultivo foi de 5,0. A linhagem apresentou produção enzimática aproximadamente 9 vezes maior quando cultivada em condições agitadas, indicando que, provavelmente, tanto a agitação quanto a morfologia apresentada pelo fungo quando cultivado nestas condições foram importantes para o aumento da produção da enzima. Além disso, o crescimento do fungo foi maior e mais rápido durante o cultivo em condição agitada.

A caracterização enzimática indicou que esta  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase apresenta atividade ótima a 60°C com uma meia vida de 10 min a 50°C e 5 min a 60 e 70°C. O pH ótimo foi de 4,0, com uma alta estabilidade na faixa de 2,0 a 8,0. A utilização de enzimas microbianas em temperaturas superiores a 50°C é muito interessante para a aplicação no branqueamento da polpa de papel, especialmente quando utilizadas em conjunto com outras como as xilanases de linhagens fúngicas, as quais são geralmente utilizadas em uma faixa de pH que varia de 4,0 a 6,0 e temperatura entre 35 e 60°C. Desta maneira a  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase apresenta temperatura e pH ótimos e estabilidade favoráveis a sua aplicação industrial nessas condições, tanto sozinha quanto em combinação com outras enzimas xilanolíticas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASPINALL, G.O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: The Biochemistry of Plants, Ed.: Preiss J., **Academic Press**, London, v. 3, p.473–500, 1980.
- AYRON A.P., WILSON B., STRAUSS C.R., WILLIAMS P.J. The properties of glycosidases of *Vitis vinifera* and a comparison of their  $\beta$ -glucosidase activity with that of exogenous enzymes. An assessment of possible applications in enology. **Am J Enol Vitic**, Davis, v.38, p.182-188, 1997.
- BAJPAI, P. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. **Adv Appl Microbiol**, v.43, p.141-189, 1997.
- BELDMAN, G., SEARLE-VAN LEEUWEN, M.J.F., DE RUITER, G.A., SILIHA, H.A., VORAGEM, A.G.J. Degradation of arabinans by arabinases from *Aspergillus aculeatus* and *Aspergillus niger*. **Carbohydr Polym**, Barking, v.20, p.159-168, 1993.
- BELDMAN, G., SCHOLS, H.A., PISTON, S.M., SEARLE-VAN LEEUWEN, M.J.F., VORAGEN, A.G.J. Arabians and arabinan degrading enzymes. In: **Adv Macromol Carbohydr Res**, v.1, p.1-64, 1997.
- BEZALEL L, SHOHAM Y, ROSENBERG E. Characterization and delignification activity of a thermostable  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus*. **Appl Microbiol Biotechnol**, Oxford, v.40, p.57-62, 1993.
- BIELY, P. Xylanolytic enzymes. In: WHITAKER, J.R., VORAGEN, A.G.J., WONG, D.W.S. (Eds.) **Handbook of Food Enzymology**, Marcel Dekker, Inc. New York, p.879-916, 2003.
- BON, E.P.S., FERRA, M.A., CORVO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Editora Interciência, Ltda, Rio de Janeiro, 2008. p.307-33.
- BRAUN, S., VECHT-LIFSHITZ, S.E. Mycelial morphology and metabolite production. **Tibtech**, v.9, 1991.
- CLELAND, W.W. Dithiothreitol, A New Protective Reagent for SH Groups. **Biochemistry**, v.3, p.480-482, 1964.
- COEN JA, DEHORITY BA. Degradation and utilization of hemicellulose from intact forages by pure cultures of rumen bacteria. **Appl Microbiol**, Washington, v.20, p.362-368, 1970.

- CONSIDINE, P.J., HACKETT, T.J., COUGHLAN, M.P. Solid-state cultivation of *Penicillium capsulatum* on beet pulp. **Biotechnol Lett**, Dordrecht, v.9, n.2, p.131-134, 1987.
- COUGHLAN, M.P. Cellulose degradation by fungi. In: WM Fogarty, and CT Kelly (ed.), **Microbial enzymes and biotechnology**, 2nd ed. Elsevier Applied Science, London, p1-36, 1990.
- CANTAREL, B.L., COUTINHO, P.M., RANCUREL, C., BERNARD, T., LOMBARD, V., HENRRISAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Res**, v.37, p.233-238, 2009. Disponível em: <http://www.cazy.org/>. Acesso em 23Nov.2011.
- CUROTTO, E., NAZAL, A., AGUIRRE, C., CAMPOS, V., DURÁN, N. Enzymatic Pretreatment of Kraft Pulps from *Pinus radiata* D Don With Xylanolytic Complex of *Penicillium canescens* (CP1) Fungi. **Appl Biochem Biotech**, v.73, 1998.
- DEBOY, R.T., MONGODIN, E.F., FOUTS, D.E., TAILFORD, L.E., KHOURI, H., EMERSON, J.B., MOHAMAUD, Y., WATKINS, K., HENRRISAT, B., GILBERT, H.J., NELSON, K.E. Insights into plant cell wall degradation from the genome sequence of the soil bacterium *Cellvibrio japonicus*. **J Bacteriol**, v.190, p.5455-63, 2008.
- DE IOANNES, P., PEIRANO, A., STEINER, J. EYZAGUIRRE, J. An  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Penicillium purpurogenum*: production, purification and properties. **J Biotechnol**, Amsterdam, v.76, p.253-258, 2000.
- DEBECHE, T., CUMMINGS, N., CONNERTON, I., DEBEIRE, P., O'DONOHUE, M.J. Genetic and Biochemical Characterization of a Highly Thermostable  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*. **Appl Environ Microbiol**, v.66, p.1734-1736, 2000.
- DEHORITY B.A. Rate of isolated hemicellulose degradation and utilization by pure cultures of rumen bacteria. **Appl Microbiol**, Washington, v.15, p.987-993, 1967.
- DENSTADLI, V., WESTERENG, B., BINIYAM, H.G., BALANCE, S., KNUTSEN, S.H., SVIHUS, B. Effects of structure and xylanase treatment of

brewer's spent grain on performance and nutrient availability in broiler chickens. **Brit Poultry Sci**, v.51, p.419-426, 2010.

- FERNANDEZ-ESPINAR, M.T., PENA, J.L., PINAGA, F., VALLES, S.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase production by *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiol Lett**, Amsterdam, v.115, p.176-181, 1994.
- FILHO, E.X.F., PULS, J., COUGHLAN, M.P. Purification and characterization of two arabinofuranosidases from solid-state cultures of the fungus *Penicillium capsulatum*. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.62, p.168-173, 1996.
- GAN, Q., ALLEN, S.J., TAYLOR, G. Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. **Biochem Eng J**, Amsterdam, v.12, p.223-229, 2002.
- GILEAD, S., SHOHAM, Y. Purification and characterization of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. **Appl Environ Microbiol**, v.61, p.170-174, 1995.
- GILBERT, H.J., HAZLEWOOD, G.P. Bacterial cellulases and xylanases. **J Gen Microbiol**, London, v.139, p.187-194, 1993.
- GOBBETTI, M., LAVERMICOCCA, P., MINERVINI, F., DE ANGELIS, M., CORSETTI, A. Arabinose fermentation by *Lactobacillus plantarum* in sourdough with added pentosans and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase: a tool to increase the production of acetic acid. **J Appl Microbiol**, Oxford, v.88, p.317-324, 2000.
- GOMES, E., GUEZ, M.A.U.G., MARTIN, N., SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Quim. Nova**, v.30, p.136-145, 2007.
- GREVE, L.C., LABAVITCH, J.M., HUNGATE, R.E.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8: purification and possible roles in hydrolysis of alfafa cell wall. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.47, p.1135-1140, 1984.
- GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**, 2a edição, New York: Wiley-Liss Inc, 1994. 458p.
- GUAIS, O., TOURRASSE, O., DOURDOIGNE, M., PARROU, J.L., FRANCOIS, J.M. Characterization of the family GH54  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases in *Penicillium funiculosum*, including a novel protein

bearing a cellulose-binding domain. **Appl Microbiol Biotechnol**, Oxford, v.87, p.1007-1021, 2010.

- GUERFALI, M., CHANBOUNI, M., GARGOURI, A., BELGHITH, H. Improvement of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase production by *Talaromyces thermophilus* and agro-industrial residues saccharification. **Appl Microbial Biotechnol**, v.85, p.1361-1372, 2010.
- GÜBITZ, G.M.; HALTRICH, D.; LATAL, B.; STEINER, W. Mode of depolymerization of hemicellulose by various mannanases and xylanases in relation to their ability to bleach softwood pulp. **Appl Microbiol Biotechnol**, Oxford, v.47, p.658-621, 1997.
- HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K.D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresour Technol**, Essex, v. 58, p.137-161, 1996.
- HASHIMOTO, T.; NAKATA, Y. Synergistic degradation of arabinoxylan with  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, xylanase and  $\beta$ -xylosidase from soy sauce koji mold, *Aspergillus oryzae*, in high salt condition. **J Biosci Bioeng**, Osaka, v.95, p.164-169, 2003.
- HENRISAT, B.; DAVIES, G.J. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases families, modules and implications for genomics. **Plant Physiol**, Minneapolis, v.124, p.1515-1519, 2000.
- HESPELL, R.B.; O'BRYAN, P. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Butyrivibrio fibrisolvens* GS133. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.58, p.1082-1088, 1992.
- HOOD, E.E., HOOD, K.R. FRITZ, S.E. Hydroxyproline-rich glycoproteins in cell walls of pericarp from maize. **Plant Sci**, Limerick, v.79, p.13-22, 1991.
- HUIGE, N.J. Brewery by-products and Effluents. **Handbook of Brewing**, Taylor and Francis Group, 2006. 59p.
- JAMES, G.T. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethyldulfonyl fluoride in buffers. **Anal Biochem**, v.86, p.574, 1978.
- JIMÉNEZ, T.; MARTINEZ-ANAYA, M.A. **Enzymes, a key to improve bread and dough quality: degradation by products and relationship with quality**. In: Abstracts of the 17<sup>th</sup> ICC Conference of the Cereal Across the

Continents, 1999, Instituto de Agroquímica Tecnologia de Alimentos, Valencia, p.168.

- KHANDEPARKER, R., NUMAN, M.T.H., MUKHERJEE, B., SATWEKAR, A., BOHSLE, N.B. Purification and characterization of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 in solid-state fermentation. **Process Biochem**, v.43, p.707-712, 2008.
- KAJI, A.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase. **Adv Carbohydr Chem Biochem**, New York, v.42, p.383-394, 1984.
- KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 2004. 452p.
- KNIGHT, J. J. 2-Mercaptoethanol. In: **Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis** (Ed: L. Paquette) 2004.
- KNOB, A., CARMONA, E.C. Cell-associated acid  $\beta$ -xylosidase production by *Penicillium sclerotiorum*. **New Biotechnol**, v.00, 2009.
- KORMELINK, F.M.J.; VORAGEN, A.G.J. Degradation of different [(glucurono)arabino] xylans by combination of purified xylan degrading enzymes. **Appl Microbiol Biotechnol**, Oxford, v.38, p.688-695, 1993.
- KROGH, K.B.R., MORKEBERG, A., JORGENSEN, H., FRISVAD, J.C., OLSSON, L. Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Appl Biochem Biotech**, p.389-401, 2004.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiol Rev**, Amsterdam, v. 23, p. 411- 456, 1999.
- LEE, S.F., FORSBERG, C.W. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Can J Microbiol**, Ottawa, v.33, p. 1011-1016, 1987.
- LEE,R.C.; HRMOVA, M.; BURTON, R.A.; LAHNSTEIN, J.; FINCHER, G.B. Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from barley with  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\beta$ -D-xylosidase activity: characterization, primary structure, and COOH-terminal. **J Biol Chem**, Bethesda, v.278, p.5377-5387, 2003.
- LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S.L. **The Dynamic Plant Cell Wall**. 4a edição, New York, 2000.

- LOUNTERI, E. **Fungal  $\alpha$ -arabinofuranosidases and  $\alpha$ -galactosidases acting on polisaccharydes**. Tese Doutorado, Biotechnology and food research, Helsinki University of Technology (Espoo, Filand), 1998.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the Follin phenol reagent. **J Biol Chem**, Bethesda, v.193, p. 265-275, 1951.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., DUNLAP, P.V., CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**, 12a edição, Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.
- MARTINEZ-ANAYA, M.A.; DEVESA, A. **Enzymes and sourdough starters govern bread and dough quality: influence on dough-bread pentosans**. In: Abstracts of the 17<sup>th</sup> ICC Conference of the Cereal Across the Continents, 1999, Instituto de Agroquímica Tecnologia de Alimentos, Valencia, p.168.
- MATSUO, N.; KANEKO, S.; KUNO, A.; KOBAYASHI, H.; KUSAKABES, I. Purification, characterization and gene cloning of two  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases from *Streptomyces chartreusis* GS901. **Biochem J**, London, v.346, p.9-15, 2000.
- MUSSATO, S.I., ROBERTO, I. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **J Chem Technol Biotechnol**, Lorena, v.81, p.268-274, 2006.
- NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011, 1274p.
- NUMAN, M.Th., BHOSLE, N.B.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. **J Ind Microbiol Biotechnol**, Hampshire, v. 33, p. 247-260, 2006.
- PANAGIOTOU, G., KEKOS, D., MACRIS, B.J., CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v.18, p.37-45, 2003.
- PANAGIOTOU, G., GRANOUILLET, P., OLSSON, L. Production and partial characterization of arabinoxylan-degrading enzymes by *Penicillium brasilianum* under solid-state fermentation. **Appl Microbiol Biotechnol**, Oxford, v.72, p.1117-1124, 2006.

- PANAGIOTOU, G., OLAVARRIA, R., OLSSON, L. *Penicillium brasilianum* as a enzyme factory; the essential role of feruloyl esterases for the hydrolysis of the plant cell wall. **J Biotechnol**, Lyngby, v.130, p.219-228, 2007.
- PITT, J.I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. 3. ed. North Ryde: Food Science Australia, 2000, 62p.
- POLIZELI, M. L. T.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, H. F.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, Oxford, v. 67, p. 577-591, 2005.
- POUTANEN, K., TENKANEN, M., KORTE, H., PULS, J. Accessory enzymes involved in the hydrolysis of xylans. In: Leatham G.F., Himmel, M.E., editors. **Enzymes in biomass conversion**. Washington, DC: American Chemical Society, p.426-436, 1991.
- RAHMAN, S.A.K.M.; KATO, K.; KAWAI, S.; TAKAMIZAWA, K. Substrate specificity of the  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Rhizomucor pusillus* HHT-1. **Carbohydr Res**, Amsterdam, v.338, p.1469-1476, 2003.
- RAVEN P.H.; EVERT R.F.; EICHHORN S.E. **Biologia Vegetal**. 7th ed. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2007. 830p.
- RUEGG, U.T.; RUDINGER, J. Cleavage of disulfide bonds in proteins. **Methods Enzymol**, v.47, 1977.
- RYE, C.S.; WITHERS, S.G. Glycosidase mechanisms. **Curr Opin Chem Biol**, London, v.4, p.573-580, 2000.
- SAHA, B.C.; BOTHAST, R.J. Purification and characterization of a novel thermostable  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from a color-variant strain of an *Aureobasidium pullulans*. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.64, p.216-220, 1998.
- SAHA, B.C.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnol Adv**, New York, v. 18, p.403-423, 2000.
- SAID, S., PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Editora: Próprio autor, Ribeirão Preto, 2004, 416p.
- SAKAMOTO, T., KAWASAKI, H. Purification and properties of two type-B  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases produced by *Penicillium chrysogenum*. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v.1621, p.204-210, 2003.

- SAKAMOTO, T., THIBAUT, J-F. Exo-arabinase of *Penicillium chrysogenum* Able to release arabinose from  $\alpha$ -1,5-L-Arabinan. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.67, n.7, p.3319-3321, 2001.
- SANTOS, M., JIMÉNEZ, J.J., BARTOLOMÉ, B., GÓMEZ-CORDOVE, C., DEL NOZALA, M.J. Variability of brewer's spent grain within a brewery, **Food Chem**, v.80, p.17-21, 2003.
- SERI, K.; SANAI, K.; MATSUO, N.; KAWAKUBO, K.; XUE, C.; INOUE, S. L-arabinose selectivity inhibits intestinal sucrase in uncompetitive manner and reduces glycemic response after sucrose ingestion in animals. **Metabolism**, v.45, p.1368-1374, 1996.
- SHALLOM, D.; BELAKHOV, V.; SOLOMON, D.; GILEAD-GROPPER, S.; BAASOV, T.; SHOHAM, G.; SHOHAMA, Y. The identification of the acid-base catalyst of  $\alpha$ -arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase. **FEBS Lett**, Amsterdam, v.514, p.163-167, 2002.
- SHOFIQUUR-RAHMAN, A. K. M. S.; SUGITANI, N.; HATSU, M.; TAKAMIZAWA, K. A role of xylanase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and xylosidase in xylan degradation. **Can J Microbiol**, Ottawa, v. 49, p. 58-64, 2003.
- SINITSYNA, O.A., BUKHTOYAROV, F.E., GUSAKOV, A.V., OKUNEV, O.N., BEKKAREVITCH, A.O., VINETSKY, Y.P., SINITSYN, A.P. Isolation and properties of major components of *Penicillium canescens* extracellular enzyme complex. **Biochemistry**, Moscow, v.68, p.1200-1209, 2003.
- SOZZI, G.O.; GREVE, L.C.; PRODY, G.A.; LABAVITCH, J.M. Giberellic acid, synthetic auxinns, and ethylene differentially modulate  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activities in antisense 1-amonocyclopropane-1-carboxylic acid synthase Tomato Pericarp Disc. **Plant Physiol**, Minneapolis, v.129, p.1330-1340, 2002.
- TAKAO, M.; AKIYAMA, K.; SAKAI, T. Purification and characterization of thermostable endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinase from a strain of *Bacillus thermodenitrificans*. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.68, p.1639-1646, 2002.

- TAUKE-TORNISIELO, S. M.; GARLIPP, A.; RUEGGER, M.; ATTILI, D. S.; MALAGUTTI, E. Soilborne filamentous fungi in Brazil. **J Basic Microbiol**, Berlin, v.45, n.1, p.72-82, 2005.
- TERRASAN, C. R. F. **Produção e caracterização do complexo xilanolítico de *Penicillium janczewskii***. 2007. 68f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.
- TERRASAN, C.R.F., TEMER, B., DUARTE, M.C.T., CARMONA, C.C. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresour Technol**, Rio Claro, v.101, p.4139-4143, 2010.
- UFFEN, R.L. Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. **J Ind Microbiol Biot**, v.19, p.1-6, 1997.
- UHLIG, H., BEDNAR, E.M.L. **Industrial Enzymes and their applications**. 1a edição. Wiley-Interscience, 1998. 454p.
- VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Micob Genet Bull**, v.13, p.42-43, 1956.
- WARD, O.P., MOO-YOUNG, M. Degradation of cell wall and related plant polysaccharides. **CRC Crit Rev Biotechnol**, Boca Raton, v.8, p.237-274, 1989.
- WAINWRIGHT, M.P., TRINEI, A.P.J., MOORE, D. Aggregation of spores and biomass of *Phanerochaete chrysosporium* in liquid culture and the effect of anionic polymers on this process, Great Britain, **Mycol Res**, v.97, p.801-806, 1993.
- WEAVER, J.; WHITEHEAD, T.R.; COTTA, M.A.; VALENYINE, P.C.; SALTERS, A.A. Genetic analysis of a locus on the *Bacteroides ovatus* chromosome which contains xylan utilization genes. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.58, p.2764-2770, 1992.