

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Isolamento de fungo produtor de enzimas
xilanolíticas: produção e caracterização
de xilanase.

ANA CLÁUDIA ELIAS PIÃO BENEDETTI

Orientador : Prof. Dr. Rubens Monti

Araraquara – SP
2009

ANA CLÁUDIA ELIAS PIÃO BENEDETTI

Isolamento de fungo produtor de enzimas
xilanolíticas: produção e caracterização
de xilanase.

Tese apresentada a Faculdade de
Ciências Farmacêuticas - UNESP
Araraquara, como requisito para
obtenção do título de Doutora em
Ciências dos Alimentos.

Orientador : Prof. Dr. Rubens Monti

Araraquara – SP
2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

B462i Benedetti, Ana Cláudia Elias Pião
 Isolamento de fungo produtor de enzimas xilanolíticas: produção e
 caracterização de xilanase. / Ana Cláudia Elias Pião Benedetti. –
 Araraquara, 2009
 108 f.

 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita
 Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
 em Alimentos e Nutrição
 Orientador: Rubens Monti

 1.Xilanase. 2.Fungo termófilo. 3.Resíduos agrícolas. 4.Caracterização
 física-cinética da enzima. . I. Monti, Rubens, orient. II.Título.

CAPES: 50700006

COMISSÃO EXAMINADORA

**Prof. Dr. Rubens Monti
(Orientador)**

**Prof. Dr. Luiz Henrique Souza Guimarães
(Membro)**

**Profa. Dra. Olga Luisa Tavano
(Membro)**

**Profa. Dra. Maristela Freitas Sanches Peres
(Membro)**

**Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento
(Membro)**

Araraquara, 26 de junho de 2009

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Noely e Otávio,
Luz de Deus na minha vida.
Amar-vos-ei eternamente.*

*Ao meu marido,
pela solidão que ele enfrentou.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por sempre me amar. Pai, misericordioso!

Ao Prof. Dr. Rubens Monti, pelas orientações, pelas oportunidades, pela confiança e por ensinar a ser melhor a cada dia.

A estagiária, Eliana Dantas da Costa, pelas madrugadas de trabalho. Esta Tese tem um pouco de você. Serei eternamente grata.

Ao amigo, Emerson Donato, por socorrer-me na lavagem de milhões de tubos e pela palavra amiga. Você caiu do céu!

Aos meus colegas do Laboratório de Enzimologia, Olga, Antônio, Paulo, Daniela, Andréa, Caio, Carol, Vinícius e Julio pela ótima convivência e amizade. Especial ao Caio por auxiliar-me na etapa final deste trabalho.

A Edinéia e Marisa, departamento de Ciências Biológicas, sempre dispostas auxiliar-me nas emergências, e a Adriana, técnica do laboratório de Microbiologia do departamento de Alimentos e Nutrição, por doar alças para a realização dos isolamentos e repiques dos fungos utilizados neste trabalho.

Ao Sr. Elpidio Negrão, sitiante da região de Avaré, por ceder o bagaço de cana de açúcar para realização deste trabalho.

A todos os amigos do Grupo de Oração Universitária (GOU), em especial, Carol, Joyce, Mariana e Viviane, que passaram por minha vida e deixaram muitas saudades, pela amizade e pela ajuda sempre presente.

A Claudia Lúcia Molina, Sônia Ornellas, Laura Rosin pela dedicação e o carinho nesta etapa tão importante da minha vida.

“¹Debaixo do céu há momento para tudo, e tempo certo para cada coisa: ²Tempo para nascer e tempo para morrer. Tempo para plantar e tempo para arrancar a planta. ³Tempo para matar e tempo para curar. Tempo para destruir e tempo para construir. ⁴Tempo para chorar e tempo para rir. Tempo para gemer e tempo para bailar. ⁵Tempo para atirar pedras e tempo para recolher pedras. Tempo para abraçar e tempo para se separar. ⁶Tempo para procurar e tempo para perder. Tempo para guardar e tempo para jogar fora. ⁷Tempo para rasgar e tempo para costurar. Tempo para calar e tempo para falar. ⁸Tempo para amar e tempo para odiar. Tempo para a guerra e tempo para a paz. ⁹Que proveito o trabalhador tira de sua fadiga? ¹⁰Observei a tarefa que Deus entregou aos homens, para com ela se ocuparem: ¹¹tudo o que ele fez é apropriado para cada tempo. Também colocou o senso da eternidade no coração do homem, mas sem que o homem possa compreender a obra que Deus realiza do começo até o fim. ¹²Então compreendi que não existe para o homem nada melhor do que se alegrar e agir bem durante a vida. ¹³E compreendi também que é dom de Deus que o homem possa comer e beber, desfrutando do produto de todo o seu trabalho. ¹⁴Compreendi que tudo o que Deus fez dura para sempre. A isso nada se pode acrescentar, e disso nada se pode tirar. Deus fez assim para ser temido. ¹⁵O que existe, já havia existido; o que existirá, também já existiu. Deus busca aquilo que foge. ¹⁶Observei outra coisa debaixo do sol: Em lugar do direito, encontra-se o injusto. ¹⁷E concluí que o justo e o injusto estão debaixo do julgamento de Deus, por que existe tempo para cada coisa e um julgamento para cada ação”.

(Eclesiastes, 3, 1-17)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS.....	III
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. Estrutura da parede celular vegetal.....	18
2.2. Estrutura e degradação da xilana.....	19
2.3. Produção de xilanases	22
2.3.1. Micro - organismos mesófilos e termófilos.....	22
2.3.2. Fermentação submersa (FSm) e no estado sólido (FES).....	24
2.3.3. Aplicações das xilanases.....	27
2.3.4. Imobilização de enzimas.....	32
4. OBJETIVOS.....	40
4.1. Objetivos específicos.....	40
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
5.1. Preparo dos resíduos agrícolas.....	41
5.1.1 Preparo do resíduo agrícola – Sabugo de Milho (SM).....	41
5.1.2. Preparo do resíduo agrícola – Bagaço de Cana (BC).....	42
5.1.3. Preparo do resíduo agrícola – Tegumentos das Sementes de Soja (TSS).....	42
5.1.4. Preparo do Farelo de Trigo (FT).....	43
5.1.5. Preparo do resíduo agrícola Escapo Floral da Bananeira.....	44
5.2. Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	45
5.3. Isolamento do micro-organismo.....	45
5.4. Manutenção do micro-organismo.....	46
5.5. Obtenção de conídios.....	46
5.6. Meios de cultivos.....	47
5.6.1. Meio líquido.....	47
5.6.2. Meio semi-sólido.....	47
5.7 Crescimento em meio líquido e meio semi-sólido.....	48

5.8. Obtenção da enzima extracelular e micelial de meios líquidos e semi-sólidos.....	49
5.8.1. Obtenção de enzima do meio líquido.....	49
5.8.2. Obtenção da enzima de meio semi-sólido.....	49
5.8.3. Obtenção de enzimas intracelulares.....	49
5.9. Clarificação do meio.....	49
5.9.1. Precipitação com acetona 3v (v/v) a frio.....	50
5.9.2. Filtração em caulim.....	50
5.9.3 Filtração em terra diatomácea.....	50
5.9.4. Precipitação com Sulfato de Amônio.....	50
5.10. Determinação da atividade enzimática e de proteína.....	51
5.11. Determinação do pH ótimo de atividade da enzima xilanase do fungo FCUP1.....	51
5.12. Determinação da temperatura ótima de atividade da enzima xilanase do fungo FCUP1.....	52
5.13. Determinação da estabilidade térmica	52
5.14. Determinação da estabilidade em pH.....	52
5.15. Cromatografia em Sílica Gel P60.....	52
5.16. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	53
5.17. Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$	53
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	54
6.1. Caracterização dos resíduos agrícolas utilizados como fontes de carbono para o crescimento de micro-organismos.....	54
6.2. Resíduos agrícolas estudados como suportes para aplicação em imobilização de enzimas.....	56
6.3. Produção e caracterização de xilanases.....	57
6.3.1. Isolamento e Identificação de novos fungos filamentosos.....	57
6.3.2. Manutenção das linhagens	59
6.4. Produção de xilanase pelo fungo FCUP1 através de crescimento em culturas líquidas.....	59

6.4.1. Identificação do melhor meio, melhor fonte de carbono e melhor pH para o crescimento e produção de xilanase.....	59
6.4.2. Precipitação da enzima solúvel do meio M4 e M4 modificado.....	68
6.4.3. Influência das diferentes fontes de açúcares sobre a produção de xilanase extracelular pelo fungo FCUP1.....	69
6.4.4. Indução e repressão da síntese de xilanase.....	71
6.5. Meio semi-sólido.....	72
6.6. Clarificação do meio.....	76
6.7. Efeito da temperatura e do pH sobre atividade xilanolítica e estabilidade.....	77
6.8. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	81
6.9. Cromatografia em Sílica Gel P60.....	81
6.10. Eletroforese SDS-PAGE.....	83
7. CONCLUSÃO.....	85
7.1. Perspectivas para trabalhos futuros.....	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de célula vegetal mostrando constituintes estruturais (A). Esquema mostrando a organização da celulose na parede celular (B)....	18
2	Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana.....	21
3	Esquema representativo de um processo de produção da polpa de celulose.....	28
4	Representação dos tipos de imobilização de enzimas mais utilizados.....	34
5	Microscopia eletrônica de gel de agarose.....	37
6	Estrutura química da agarose (A). Representação do poro de agarose (B).....	37
7	Sabugo de milho.....	41
8	Bagaço de cana de açúcar (colmos e restos foliares)	42
9	Tegumentos das sementes de soja.....	43
10	Farelo de trigo.....	44
11	Escapo Floral da Bananeira.....	44
12	Imagens de microscopia dos resíduos agrícolas. (1) Bagaço de cana; (2) Tegumento das sementes de soja; (3) Sabugo de milho; (4) Escapo floral de bananeira; (5) Farelo de trigo. (A) Microscopia óptica – objetiva 10X; (B) Microscopia eletrônica de varredura – 2000X; (C) Microscopia eletrônica de varredura – 5000X.	55
13	Cromatografia em Sílica Gel P60 do produto de hidrólise da xilana obtido com derivado glioxil-agarose em diferentes tempos em pH 5.0 a 40°C. O x_1 : xilose e x_2 : xilobiose são utilizados como padrões e 3 - 60 minutos; 4 – 120 minutos e 5 – 1080 minutos.....	57

LISTA DE FIGURAS (continuação)

Figura		Página
14	Imagem da microscopia óptica do corpo de frutificação do fungo FCUP1	58
15	Efeito da temperatura ótima sobre atividade da xilanase.....	78
16	Estabilidade temperatura sobre atividade da xilanase.....	79
17	Efeito do pH ótimo sobre atividade da xilanase.....	80
18	Estabilidade pH sobre atividade da xilanase.....	80
19	Gráfico de determinação dos parâmetros cinéticos por Hanes-Woolf (1932).....	81
20	Cromatografia em Sílica Gel P60 do produto de hidrólise da xilana em diferentes tempos em pH 5.0. X ₁ : xilose; X ₂ : xilobiose.	82
21	Eletroforese em SDS-PAGE. (1) Padrão de massa molecular; (2) extrato cru filtrado em caulim; (3) extrato cru filtrado em terra diatomácea; (4) extrato cru.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Características de algumas xilanases produzidas por microrganismos.....	26
2	Produção de xilanase por FCUP1 em meio M4* em diferentes valores de pH, tempo de cultivo, utilizando como fonte de carbono o sabugo de milho a 40°C.....	60
3	Produção de xilanase por FCUP1 em meio M4* em diferentes valores de pH, tempo de cultivo, utilizando como fonte de carbono o bagaço de cana a 40°C.....	61
4	Produção de xilanase por FCUP1 em meio M4* em diferentes valores de pH, tempo de cultivo, utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo a 40°C.....	62
5	Produção de xilanase por FCUP1 em meio M4* em diferentes valores de pH, tempo de cultivo, utilizando como fonte de carbono os tegumentos das sementes de soja a 40°C.....	63
6	Produção de xilanase por FCUP1 no meio M4 modificado* em diferentes pHs, tempo de cultivo, utilizando como fonte de carbono o sabugo de milho a 40°C.....	64
7	Produção de xilanase por FCUP1 em meio M4 modificado* em diferentes valores de pH, tempo de cultivo, utilizando como fonte de carbono o bagaço de cana a 40°C.....	65
8	Produção de xilanase por FCUP1 em meio M4 modificado* em diferentes valores de pH, tempo de cultivo, utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo a 40°C.....	66

LISTA DE TABELAS (CONTINUAÇÃO)

Tabela		Página
9	Produção de xilanase por FCUP1 em meio M4 modificado* em diferentes valores de pH, tempo de cultivo, utilizando como fonte de carbono os tegumentos das sementes de soja a 40°C.....	67
10	Efeitos da precipitação em acetona a frio usando o meio M4*	68
11	Efeitos da precipitação em acetona a frio usando o meio M4 modificado*	69
12	Produção de xilanase extracelular por FCUP1 em diferentes carboidratos usando meio M4*, pH 7, 40°C por 16hs.....	70
13	Produção de xilanase extracelular por FCUP1 em diferentes carboidratos usando meio M4 modificado*, pH 7, 40°C por 16hs.....	70
14	Atividade xilanolítica em filtrado de cultura pelo fungo FCUP1 em diferentes fontes de carbono a 40°C.....	72
15	Produção de xilanase utilizando meio semi-sólido com diferentes fontes de carbono e água de torneira*, por 6 dias a 35°C.....	74
16	Produção de xilanase utilizando meio semi-sólido com diferentes fontes de carbono e água de maceração de milho*, por 6 dias a 35°C.....	74
17	Produção de xilanase pelo fungo FCUP1 utilizando meio semi-sólido utilizando Avicel*, por 6 dias a 37°C.....	75
18	Clarificação do meio de cultivo do fungo FCUP1 utilizando o meio M4 modificado* + 1% sabugo de milho, pH 6,6, 37°C por 18 hs.....	77

RESUMO

A descoberta de resíduos agrícolas, como fonte de energia renovável tem colaborado para o desenvolvimento industrial e preservação do meio ambiente. Desta maneira, a degradação da parede celular destes resíduos tem grande importância na fabricação de pães, alimentos, bebidas, têxtil, papel e celulose entre outros produtos. A degradação enzimática destes polímeros esta se tornando uma alternativa mais atraente do que a utilização de substâncias químicas e processos mecânicos. Alguns fungos termófilos participam desta degradação enzimática, como *Humicola grisea* var. *thermoidea*, isolado do solo, é conhecido como bom produtor do complexo xilanolítico. Além deste, um fungo termófilo isolado da polpa do fruto cupuaçuzeiro em decomposição foi estudado e produziu xilanase. Esses fungos foram mantidos em meios sólidos contendo ágar e farinha de aveia. O fungo isolado da polpa do fruto cresceu em meio líquido empregando diferentes resíduos agrícolas como fonte de carbono. Dentre os vários resíduos empregados para se otimizar a produção de xilanase, o melhor foi o sabugo de milho. Esse foi utilizado nos experimentos na proporção de 1,0% (m/v), em meio líquido contendo 0,1% CaCO_3 , 0,5% NaCl , 0,1% NH_4Cl ; 0,5% água de maceração de milho. O pH ótimo foi 5,0 e a temperatura ótima de 60°C. A xilanase presente no extrato clarificado em caulim apresentou cinética Michaeliana com K_m de $10,41 \pm 0,282 \text{ mgmL}^{-1}$ e $V_{\max}$ $3,32 \pm 0,053 \text{ U (mg protein)}^{-1}$. Para acompanhar o processo de clarificação da enzima solúvel realizou-se SDS-PAGE verificando a presença de uma banda protéica com atividade xilanolítica de massa molecular de aproximadamente 30kDa e a Cromatografia Sílica Gel P60 para verificar os produtos da hidrólise da xilana em função do tempo e da associação de xilosidase do fungo termófilo *Humicola* com a xilanase do fungo isolado do fruto em decomposição. O objetivo deste trabalho consistiu em adquirir conhecimento sobre as propriedades bioquímicas do complexo xilanolítico desse fungo isolado da polpa do fruto cupuaçuzeiro em decomposição, preparar resíduos agrícolas e utilizá-los como fontes de carbono que induziriam a produção de xilanase. E estudar a viabilidade destes resíduos para imobilização de enzimas.

Palavras-chave: xilanase, fungo termófilo, complexo xilanolítico

ABSTRACT

The researches of agricultural residues as renewable energy sources have been contributing for the industrial development and the environment conservation. Thus, the degradation of these residues' cell walls has great importance in fabrication of bread, food, drinks, textile, paper, cellulose, and other products. The enzymatic degradation of such polymers is becoming an attractive option when compared to the use of chemical substances and mechanical processes. Some thermophilic fungi take role in this enzymatic degradation, such as *Humicola grisea* var. *thermoidea*, isolated from soil, and is known to be a good producer of the xylanolytic complex. Besides it, another thermophilic fungus, isolated from the *Theobroma grandiflorum* decomposing fruit pulp, was studied and also produced xylanases. These fungi were kept in solid media containing agar and oat bran. The fungus isolated from the fruit pulp grew in liquid media in which different kinds of agricultural residues were employed as carbon sources. Among the various types of residues that were used to optimize the xylanase production, corn cobs proved to be the best one. It was used in assays in a proportion of 1,0% (m/v), in liquid media containing 0.1% of CaCO_3 , 0.5% of NaCl, 0.1% of NH_4Cl , and 0.5% of corn steep liquor. The pH optima was 5.0 and the temperature optima was 60°C. The xylanase present in the kaolin clarified extract showed a K_m of $10.41 \pm 0.282 \text{ mg.mL}^{-1}$, and $V_{\max}$ $3.32 \pm 0.053 \text{ U (mg.protein)}^{-1}$. In order to follow the soluble enzyme clarification process, SDS-PAGE was run, verifying the presence of a proteic band with xylanolytic activity of, approximately, 30kDa of molecular mass. Furthermore, Silica Gel 60 Thin Layer Chromatography (TLC) was used to verify the xylan hydrolysis products in function of time and the association of *Humicola* sp. thermophilic fungus xylosidase with the xylanase produced by the fruit pulp isolated fungus. The aim of this work was acquire knowledge about the biochemical properties of the xylanolytic complex of this fungus isolated from the *Theobroma grandiflorum* decomposing fruit pulp, prepare agricultural residues to use them as carbon sources capable of inducing xylanase production. Also, study the viability of these residues for use in enzymes immobilization.

Keywords: xylanase, thermophilic fungus, xylanolytic complex

1- INTRODUÇÃO

No cenário global, a deterioração do meio ambiente tem aumentado por causa do uso de produtos químicos em diversas aplicações industriais. Por isso, tem-se investido em pesquisas que possam melhorar o ambiente e promover tecnologia de baixo custo. Além disso, os resíduos agrícolas e agro-industriais são empregados como fontes de energia não somente para criar um ambiente limpo, mas também, tornar o solo fértil e proveitoso, melhorando assim a propriedade e produção agrícola, e consequentemente, manter equilíbrio ecológico e a biodiversidade (NINAWA e KUHAD, 2005). Devido esse contexto atual, os materiais lignocelulósicos, estão sendo usados cada vez mais como fonte de carbono renovável e representam a principal proporção da biomassa de plantas terrestres (BOUDET et al., 2003; SANCHEZ, 2009). Esses materiais possuem em sua composição celulose, hemicelulose e lignina, os quais sofrem o processo de hidrólise enzimática por micro-organismo, liberando carboidratos que são utilizados como fontes de energia e carbono. Esse processo degradativo é de fundamental importância biológica e industrial.

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

Atualmente, os micro-organismos que tem adaptação à termofilia tem despertado grande interesse na biotecnologia. Os mecanismos de termoresistência das biomoléculas destes micro-organismos podem constituir modelos interessantes para a bioengenharia ou ainda, o uso direto das mesmas em bioprocessos. As enzimas termoestáveis tem sido usadas como ferramenta para a Biologia Molecular (Taq polimerase), como aditivo de detergentes e sabões (proteases e celulasas), no processamento industrial do amido (α -amilase, glucose isomerase) e na indústria de polpa de papel (xilanase) e surgem como alternativas de interesse em outros bioprocessos, como o de síntese orgânica (lipases, proteases, oxidoredutases), no setor de diagnóstico, no tratamento de resíduos e na produção de ração animal (HAKI e

RAKSHIT, 2003; COLOMBATTO et al., 2004). E conjuntamente ao exposto, técnicas de imobilização estão entre as áreas de pesquisa mais relevantes, podendo inclusive auxiliar na solução de problemas na área agroindustrial, uma vez que os resíduos gerados poderão vir a ser utilizados como suportes para enzimas imobilizadas, reduzindo enormemente os custos de produção.

Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo isolar novos fungos, definir meios de cultivo e fontes de carbono que induzem a produção de xilanase pelos novos fungos e pelo fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* e estudar a viabilidade de resíduos agrícolas como suportes alternativos para imobilização de enzimas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estrutura da parede celular vegetal

A parede celular vegetal é formada por polissacarídeos como celulose, hemiceluloses, pectina e lignina, que formam um complexo de estrutura rígida. A celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza e possui uma estrutura insolúvel de cadeia linear e homogênea, composto por β -D-glicopiranosídios unidos por ligações β -1,4; a pectina consiste em um grupo de heteropolissacarídeos formados por unidades de ácido-D-galacturônico unidas por ligações α -1,4 (KULKARNI et al., 1999; ARO et al., 2005); já as hemiceluloses são constituídas por um complexo de heteropolímeros formados por diferentes resíduos de açúcares como D-xilose, D-manose, D-arabinose, D-galactose e D-glicose, dentre outros, e por seus ácidos urônicos. Eles são nomeados de acordo com o principal resíduo de açúcar da cadeia polimérica (ARO et al., 2005). A lignina é altamente resistente à degradação química e biológica, e confere dureza à madeira. É encontrada em concentrações maiores na lamela média, atuando como um cimento entre as fibras da madeira, e também está presente na parede celular, principalmente na parede celular secundária, formando junto com a hemicelulose uma matriz amorfa, onde as microfibrilas de celulose estão embebidas e protegidas contra a degradação (MARTINEZ et al., 2005). Observa-se, na Figura 1, a representação esquemática da parede secundária de uma célula vegetal.

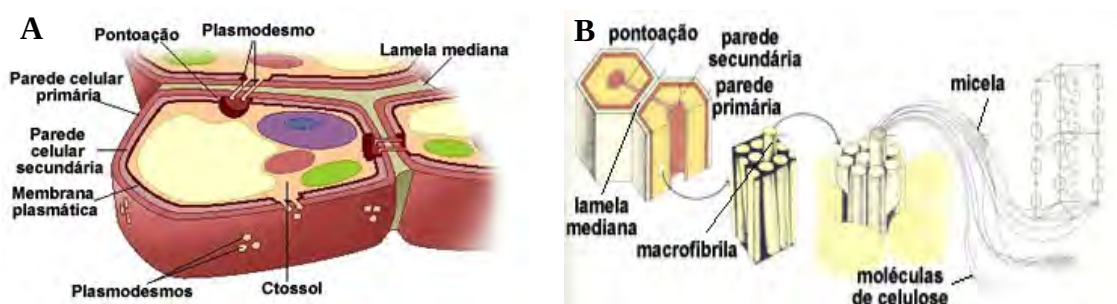


Figura 1. Esquema de célula vegetal mostrando constituintes estruturais.

Fonte: <http://www.anatomiavegetal.ib.ufu.br/paredecelular> (A). Esquema mostrando a organização da celulose na parede celular. Fonte: Raven et al., 2001 (B).

2.2. Estrutura e degradação da xilana

O principal polissacarídeo componente da hemicelulose é a xilana, o qual está presente em todas as camadas da parede celular vegetal na interface entre a celulose e a lignina. A xilana após a celulose, é a mais abundante fonte renovável de carbono presente na madeira e resíduos agrícolas (ZANOELO et al., 2004). É uma molécula heterogênea que consiste de cadeia principal com ligações β -1,4 de polixilose até uma cadeia com ramificações de arabinose, manose, galactose, glicose e ácidos. Na natureza, sua degradação e modificação podem ser feitas por diferentes micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos (FERREIRA et al., 1999; MAHESHWARI et al., 2000; ABDEL-SATER e EL-SAID, 2001; LENARTOVICZ, 2003). Na natureza, o interesse pela hidrólise da xilana se dá pela ação de várias enzimas do complexo xilanolítico (LEE et al., 2009). As xilanases fazem parte desse complexo, os quais são responsáveis pela hidrólise catalítica da xilana. Essas enzimas são principalmente produzidas por micro-organismos e responsáveis pela decomposição das paredes celulares das plantas, que com outras enzimas hidrolisam polissacarídeos, que também digerem a xilana durante a germinação de algumas sementes. As xilanases são também encontradas em algas marinhas, protozoários, lesmas, crustáceos, insetos e sementes de plantas (SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997). Entre as fontes microbianas, fungos filamentosos são importantes, pois eles secretam no meio níveis mais elevados de xilanase do que as bactérias e leveduras (HALTRICH et al., 1996; POLIZELI et al., 2005). Entre as espécies de fungos, *Humicola grisea* var. *thermoidea* tem conquistado considerável atenção como fonte rica de xilanases. Recentes estudos têm demonstrado que estes fungos produzem xilanases com diferentes propriedades (MEDEIROS et al., 2007). Por isso, as origens diversas da xilana ocorrem devido a sua heterogeneidade estrutural, refletindo na ocorrência de múltiplas formas de xilanases. Essas enzimas são variadas na estrutura tri-dimensional. Elas podem ser encontradas em seis famílias das glicosidase hidrolase (GH): GH5, GH7, GH8, GH10, GH11 e GH43. As famílias se diferem uma das outras quanto às propriedades físico-químicas, estrutura, modo de ação e especificidade do substrato (COLLINS et al., 2005; PUCHART e BIELY, 2007). Devido à estrutura heterogênea a xilana requer para sua

degradação a ação de muitas enzimas xilanolíticas (Figura 3). Este sistema enzimático é composto particularmente pelas enzimas: β -1,4-Endoxilanasas (1,4- β -D-xilana xilohidrolases; EC 3.2.1.8) que clivam as ligações internas glicosídicas da cadeia principal da heteroxilana, diminuindo o grau de polimerização do substrato. A clivagem do substrato não é ao acaso e as ligações a serem hidrolisadas dependem da natureza do substrato (comprimento e/ou grau de ramificação) e também da presença de substituintes (LI et al., 2000). Inicialmente, os principais produtos da reação são xilooligossacarídeos, mas posteriormente, outras pequenas moléculas de monossacarídeo, dissacarídeo e trissacarídeo de xilose, isto é, xilose, xilobiose e xilotriose podem ser liberados. Assim, as endoxilanasas podem ser classificadas em dois tipos de acordo com o produto final da reação: as que catalisam a hidrólise nos pontos de ramificação 1,3- α -1- arabinofuranosil de arabinoxilanas em adição à hidrólise das ligações da cadeia principal, e aquelas que não hidrolisam estes pontos de ramificação (MATSUO et al., 1998; RIZZATTI, 2004; CZJZEK et al., 2005). As β -D-xilosidases (β -D-xilosídeo xilohidrolases; EC 3.2.1.37) são exoglicosidases que hidrolisam xilooligossacarídeos pequenos e xilobiose, a partir da extremidade não redutora, liberando xilose (KUMAR e RAMÓM, 1996; MATSUO et al., 1998; LENARTOVICZ, 2003; RIZZATTI, 2004; CZJZEK et al., 2005). Estas enzimas são capazes de clivar substratos artificiais como *p*-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo (ANDRADE, 2002; RIZZATTI, 2004). Um importante papel é atribuído a essas enzimas, pois as xilanases são inibidas por altas concentrações de seus produtos e uma das funções das β -D-xilosidases é diminuir esta inibição causada pela concentração de xilooligossacarídeos (ANDRADE et al., 2004; POLIZELI et al., 2005). As β -D-xilosidases têm sido caracterizadas em vários fungos e bactérias, mas pouco se conhece sobre a regulação de sua biossíntese (ANDRADE et al., 2004). Em fungos filamentosos, estas enzimas estão associadas ao micélio podendo ser detectadas também no extrato celular ou durante o crescimento. As β -D-xilosidases apresentam uma massa molecular de 60 a 360 kDa sendo geralmente glicoproteínas. Elas possuem pH ótimo entre 4,0 e 5,0, e as temperaturas ótimas podem variar entre 40°C a 80°C, dependendo do micro-organismo estudado (POLIZELI et al., 2005). Outras atividades microbianas são capazes de afetar a conversão da xilana em

seus constituintes. Estas enzimas agem cooperativamente, ocorrendo um sinergismo entre elas, os quais apresentam as seguintes atividades: α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) removem os resíduos de L-arabinose substituídos no carbono três (C3) das unidades de xilose (KANEKO et al., 1993; RIZZATTI, 2004); α -glucuronidasases (EC 3.2.1.131) hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,2 entre o ácido glucurônico ou ácido metil-glucurônico e resíduos de xilose em glucuronoxilano (ANDRADE, 2002; RIZZATTI, 2004); acetilxilana esterases (EC 3.1.1.6) removem grupos O-acetil a partir dos carbonos dois e/ou três (C2 e/ou C3) dos resíduos de xilose na acetilxilana (SHAO e WIEGEL, 1992; CAUFRIER et al., 2003; RIZZATTI, 2004); e os ácidos fenólicos esterases também podem estar presentes: ácido ferrúlico esterase (3.1.1.73) e o ácido *p*-coumárico esterase (EC 3.1.1.-) clivam na xilana as ligações éster entre resíduos de cadeia lateral de arabinose e ácido ferrúlico ou ácido *p*-coumárico, respectivamente (RIZZATTI, 2004; POLIZELI et al., 2005).

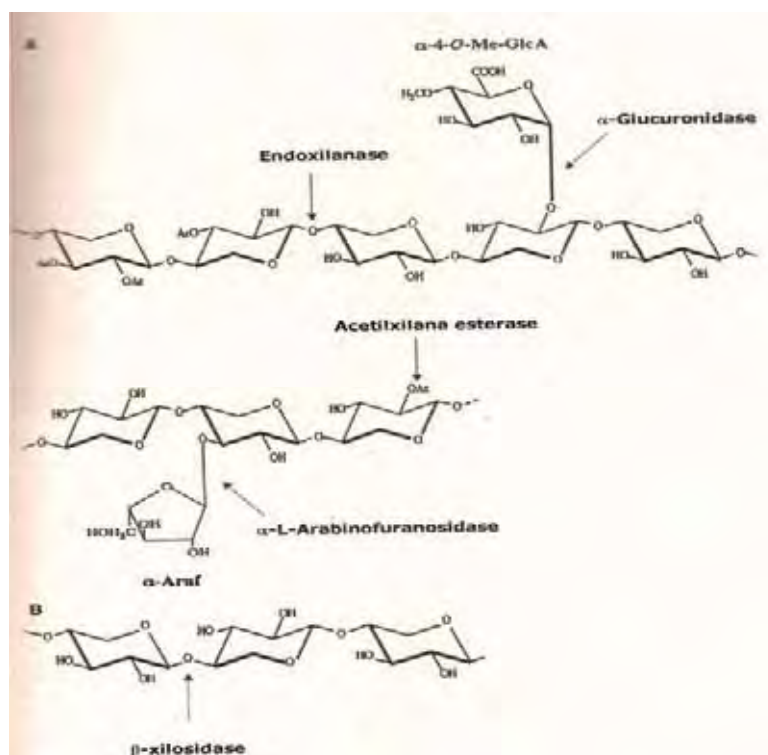


Figura 2. Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana (A). Hidrólise de xilooligossacarídeos pela β -xilosidase (B). Abreviações: AC-grupos acetil; α -Araf - α -arabinofuranose; α -O-Me-GlcA - ácido α -4-O-metilglucurônico (adaptado de SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997).

2.3. Produção de xilanases

2.3.1. Micro-organismos mesófilos e termófilos

Alguns organismos são especiais por possuírem características em adaptar-se a ambientes extremos, nos quais fatores como pH, temperatura, pressão e concentração de sal ultrapassam os valores considerados como padrões para a maioria dos seres vivos (LASA e BERENGUER, 1993). Dentre todos esses fatores, a temperatura é o que mais influência a função das biomoléculas e a manutenção das estruturas biológicas. Isso ocorre porque a maioria dos organismos conhecidos pode crescer numa faixa rigorosa de temperatura. Entretanto, a existência de ambientes geotermicamente estáveis tem permitido a seleção ou a persistência de micro-organismos que não apenas resistem, mas também requerem altas temperaturas para sobreviver. Esses micro-organismos são chamados termófilos (ou termofílicos) e são classificados em: termófilos moderados que incluem organismos com faixa de crescimento entre um mínimo de 20°C e um máximo de 55°C, sendo as temperaturas ótimas entre 40 e 50°C. Nesse grupo estão incluídos os procariotos dos domínios Bacteria e Archaea e os eucariotos (Domínio Eukarya – fungos filamentosos); termófilos extremos que incluem micro-organismos capazes de crescer bem em temperaturas entre 65°C a 85°C. Esse grupo é representado pelos procariotos dos domínios Bacteria e Archaea; hipertermófilos, entre os quais estão as Archaea com temperaturas ótimas de crescimento de 85°C até 110°C. Entre os organismos hipertermófilos, o *Picrococcus fumari* é o que consegue crescer em temperaturas mais elevadas, entre 90 e 113°C (HUBER et al., 1986).

Poucas espécies de Eucariotos conseguem crescer entre 45 e 55°C, sendo classificadas como termofílicas moderadas. Dentre 50.000 espécies de fungos descritas, somente cerca de 30 crescem em temperaturas entre 40 e 45°C (MAHESHWARI et al., 2000), embora existam algumas espécies com capacidade de crescer entre 60 e 62°C. O primeiro fungo termófilo isolado foi *Mucor pusillus*, há um século atrás. Em seguida, Hugo Miehle estudou a microflora de pilha de compostagem de resíduos agrícolas, isolando outras espécies de fungos termófilos (MOUCHACCA, 1997).

Na natureza em ambiente mesofílico, os organismos termófilos moderados desenvolvem-se em processo de compostagem durante fase de alta temperatura (acima de 40°C), sucedendo a microflora mesolítica (CHANG et al., 2006; GOMES et al., 2007). Nesse processo são destacadas três fases: na primeira, a microbiota mesofílica cresce aceleradamente, absorvendo as fontes de carbono prontamente assimiláveis e solúveis, como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos ou polímeros de acesso mais fácil, gerando calor por reações metabólicas exotérmicas e elevando a temperatura para aproximadamente 40°C. Esse aumento de temperatura inibe o crescimento dos mesófilos e estimula a germinação dos esporos dos fungos e endósporos das bactérias termófilas, iniciando a segunda fase do processo. Nessa etapa, as fontes de carbono são mais facilmente assimiláveis já foram esgotadas inteiramente, restando os polissacarídeos constituintes da biomassa, como celulose, hemicelulose e pectina, cuja degradação requer intensa liberação de enzimas extracelulares. O resultado desse processo é a degradação do material vegetal a polímeros menores e um aumento da temperatura para próximo de 60°C. A terceira fase do processo caracteriza-se pela inibição do crescimento dos fungos e redução de atividade bioquímica no material, embora as atividades das bactérias extremófilas e hipertermófilas sejam continuadas (MAHESHWARI et al., 2000). Pelo exposto, espera-se que fungos e bactérias termófilos moderados sejam potenciais produtores de enzimas despolimerizantes. Entretanto, alguns destes fungos termófilos como *Thermomyces lanuginosus*, *Talaromyces dupontii* e *Mucor* (*Rhizomucor*) *pusillus* não conseguem utilizar a celulose como fonte de carbono. Porém, a incapacidade de hidrolisar um determinado polímero, como celulose, não significa que o fungo não tenha sistema enzimático para hidrólise de outro polímero. Alguns fungos, como *Humicola insolens*, não degradam celulose, mas são capazes de usar a xilana como fonte de carbono e crescem mais rapidamente sobre esse polímero que em meio com açúcares mais simples. O mesmo ocorre com fungos pectinolíticos termófilos nem sempre são bons produtores de enzimas hemicelulolíticas. Por outro lado, os organismos que não despolimerizam a matéria orgânica podem crescer comensalmente, utilizando açúcares liberados por outros organismos (SING et al., 2000). Por isso pesquisas sobre micro-organismos que utilizam a xilana envolvida em

sistema enzimático estão tornando-se relevantes em termos ecológico e ambiental. As xilanases são sintetizadas por micro-organismos mesófilos (25°C a 40°C) e termófilos (40°C a 85°C). Entre os fungos mesófilos, os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* são importantes na produção de xilanases. Os fungos termófilos abrangem *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Humicola grisea*, *Melanocarpus albomyces*, *Paecilomyces variotti*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces emersonii*, *Thermomyces lanuginosus* e *Thermoascus aurantiacus*, *Fusarium proliferatum*, *Paecilomyces thermophila*, *Scytalidium thermophilum*. As xilanases desses fungos possuem temperatura ótima entre 50°C e 80°C e são muitos estáveis nesses limites. Essas enzimas são glicoproteínas, e a maioria exibe alta atividade na faixa entre pH 4,5 e 6,5. Suas formas são variadas e a maioria demonstra massa molecular variável entre 6 a 38 kDa. Dentre esses fungos, a *Thermomyces lanuginosus* é produtora de altas concentrações de xilanase livre de celulase em fermentação submersa em meio com resíduos agrícolas como fonte de carbono (ANAND et al., 1990; KALOGERIS et al., 1998; MAHESWARI et al., 2000; DAMASO et al., 2003; LI et al., 2005). Também, foi descrito o fungo termófilo *Myceliophthora* sp. IMI 387099 é produtor de duas endoxilanases termoestáveis ativas e estáveis a pH alcalino (CHADHA et al., 2004). Nos últimos anos, muitos esforços têm sido direcionados para o isolamento de micro-organismos termófilos e até extremófilos, pois produzem enzimas com maior estabilidade (ANDRADE et al., 1999; RIZZATTI et al., 2001; MONTI et al., 2003). Industrialmente, as xilanases podem ser produzidas em fermentações no estado sólido e no submerso (POLIZELI et al., 2005).

2.3.2. Fermentação submersa (FSm) e no estado sólido (FES)

A fermentação submersa tem como característica principal a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis (MARTINS, 2001). Esse processo apresenta variáveis na forma de condução podendo ser contínuo, descontínuo e semicontínuo. No processo contínuo (MONTESINOS et al., 1996) há um fluxo ininterrupto de entrada de substrato e saída de caldo fermentado conforme as necessidades do micro-organismo; já os processos descontínuos são conduzidos na forma de batelada, isto é, o meio de cultura é

inoculado com micro-organismo e o processo segue até o esgotamento de nutrientes e/ou acúmulo do produto de interesse. O processo de batelada consiste na alimentação do reator durante o processo, visando o aumento da produção e permitindo o estudo dos aspectos cinéticos do processo (PINHEIRO, 2006).

As xilanases são produzidas por diferentes bactérias e fungos, como exemplo, *Trichoderma* sp, *Bacillus* sp, *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Aureobasidium* sp e *Talaromyces* sp (LI et al., 2000). A produção de xilanase comercial se concentra principalmente nos fungos *Trichoderma* sp e *Aspergillus* sp. A procura por cepas fúngicas é maior pela facilidade de extração da enzima do ponto de vista industrial, já que os fungos sintetizam enzimas extracelulares que são lançadas em um substrato externo e, portanto, elimina-se a etapa de rompimento celular (HALTRICH et al., 1996). E também, pela estabilidade e atividade em pH e temperatura extrema (KULKARNI et al., 1999). Por isso, a grande maioria das enzimas utilizadas industrialmente são produzidas por este processo de fermentação, mas é economicamente inviável pelo elevado custo do processo (PANDEY et al., 2000). Já fermentação no estado sólido utiliza substratos insolúveis com baixas porcentagens de água em sua composição, os quais devem atuar tanto como suporte fisiológico quanto como, fonte de nutrientes na ausência de água livre (PANDEY, 2003). Neste tipo de fermentação várias fontes de carbono (substrato principal) podem se utilizadas, entre elas cita-se: farelo de trigo (ISIL e NILUFER, 2005); bagaço de cevada (KRONBAUER et al., 2007), bagaço de cana de açúcar (SOUZA et al., 1999; MILAGRES et al., 2004; KRONBAUER et al., 2007), torta de soja (PINHEIRO, 2006). Neste processo de fermentação deve-se observa alguns aspectos importantes, como seleção do micro-organismo, a escolha do substrato, a otimização dos produtos, o isolamento e a purificação do produto (PANDEY, 2003).

De acordo com Silveira e colaboradores (1999), as vantagens do uso da fermentação no estado sólido com relação à fermentação submersa é baixo custo, melhora a estabilidade, imita o habitat natural do fungo, produz enzima com atividades específicas mais altas, gera um produto enriquecido e facilita o controle de produção da enzima processada. Para Couto e Saromán (2006) a fermentação em estado sólido reproduz processos microbiológicos naturais. No

caso de aplicações industriais, esses processos naturais, quando monitorados, produzem o produto desejado. Assim, vários produtos de valor agregado tem sido produzidos por essa técnica fazendo uso de matérias primas provenientes da natureza (PANDEY et al., 2000). O trabalho em questão utilizou a fermentação submersa e fermentação no estado sólido. A seguir a Tabela 1 mostra as características quanto ao peso molecular, temperatura ótima, pH ótimo, pl e K_m de algumas xilanases produzidas por micro-organismos.

Tabela 1 – Características de algumas xilanases produzidas por micro-organismos

Micro-organismos	Peso Molecular (kDa)	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo	pl	K_m (mg/mL)	Referências
<i>Aspergillus aculeatus</i>	18; 26; 52	50; 50; 70	4,0; 4,0; 5,0	5,6; 9,0; 3,8	*	FUJIMOTO et al.; 1995
<i>Aspergillus awamori</i>	39; 23; 26	45-55	4,0– 5,5	*	*	KORMELINK et al.; 1993
<i>Aspergillus fischeri</i>	31	60	6,0	*	4,89	RAJ & CHANDRA, 1996
<i>Aspergillus fumigatus</i>	8.5	55	5,5	*	2,19-5,19	SILVA et al.; 1999
<i>Aspergillus giganteus</i>	21; 24	50	6,5; 6,0	*	*	FIALHO & CARMONA, 2004
<i>Aspergillus Kawachil</i>	35; 26; 29	60; 55; 50	5,5; 4,5; 2,0	3,5-6,7	*	ITO et al.; 1992
<i>Aspergillus nidulans</i>	22; 34	62; 56	5,5; 6,0	3,4	0,97	FERNÁNDEZ-ESPINAR, 1994
<i>Aspergillus oryzae</i>	35	60	5,0	*	*	KITAMOTO et al.; 1999
<i>Aspergillus sojae</i>	33; 36	60; 50	5,0; 5,5	3,5; 3,75	*	KIMURA et al.; 1995
<i>Aspergillus sp.</i>	26; 21	50	5,0	7,2; 4,7	*	KHANNA et al.; 1995
<i>Aspergillus sydowii</i>	33	50	4,0	*	*	GHOSH & NANDA, 1994
<i>Aspergillus terreus</i>	*	45	4,5	*	0,83mM	GHAREIB & EL DEIN, 1992
<i>Aspergillus versicolor</i>	19; 32	55; 55	6,0; 6,0-7,0	*	2,3	CARMONA et al.; 1998, 2005
<i>Acrophialophora nainiana</i>	22	55	7,0	*	16,1	SALLES et al.; 2000
<i>Aureobasidium pullulans</i>	25	54	4,4	9,7	7,6	LI et al.; 1993
<i>Bacillus sp.</i>	99	75	6,0	*	0,7	BAITAILLON et al.; 2000
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	25; 47; 57	50	5,0-7,0	8,9; 8,4; 5,0	*	BARAZNENOK et al.; 1999
<i>Cryptococcus sp.</i>	22	40	2,0	7,4	*	IEFUJI et al.; 1995
<i>Fusarium oxysporum F3</i>	20.8; 23.5	60; 55	6,0	9,5; 8,5-8,7	0,41; 0,37	CHRISTAKOPOULOS et al.; 1996
<i>Humicola grisea var. thermoidea</i>	23	70	5,5	*	3,3	MONTI et al.; 1991
<i>Myceliophthora sp.</i>	53; 53	75	6,0	5,2; 4,8	*	CHADHA et al.; 2004
<i>Penicillium brasilianum</i>	31	*	*	> 9,0	*	JORGENSEN et al.; 2003
<i>Penicillium capsulatum</i>	22	48	3,8	2,8	7,0-32,0	RYAN et al.; 2003
<i>Penicillium sp.</i>	25	50	2,0	4,7	0,0083	KIMURA et al.; 2000
<i>Streptomyces sp.</i>	24.5; 37.5; 38	55-60	6,0-8,0	*	2,22; 1,05; 0,97	GEORIS et al.; 2000
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	*	70-75	4,0-5,0	6,8; 5,5	*	KALOGERIS et al.; 1998
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	24.7	70	6,0-6,5	3,9	*	SINGH et al.; 2000
<i>Trichoderma harzianum</i>	20; 29	50; 60	5,0; 5,0	9,4; 9,5	0,58	TAN et al.; 1985
* valores não determinados						

Fonte: POLIZELI et al., 2005.

2.3.3. Aplicações das xilanases

O interesse no estudo do complexo xilanolítico está relacionado ao seu emprego nos diversos processos biotecnológicos. Em alguns deles, há necessidade de enzimas purificadas, enquanto que, em outros, a conversão da xilana em xilose é feita por meio da utilização de extratos enzimáticos brutos.

Segundo Biely (1985), a aplicação da xilanase divide-se em duas categorias, uma associada à polissacaridases (por exemplo, celulasas) e outra livre de celulase. Atualmente, uma das principais aplicações das xilanases e outras enzimas é no pré-branqueamento da polpa de celulose na indústria de papéis. Tradicionalmente são necessários dois processos para a obtenção de uma polpa de celulose pura: cozimento e branqueamento. O processo de cozimento mais importante é o kraft, que envolve o uso de sulfito, bissulfito e íons hidroxila para degradar a lignina da madeira, deixando-a solúvel no licor de cozimento (PATEL et al., 1993). Sob alta temperatura e pressão, 90 a 95% da lignina é modificada ou solubilizada e o conteúdo das fibras se separa. A xilana é dissolvida no licor de cozimento devido à alta temperatura e pH. No entanto, à medida que o processo se desenvolve, a alcalinidade diminui e a xilana degradada precipita-se de forma mais ou menos cristalina sobre a celulose (BUCHERT et al., 1992). São realizadas algumas lavagens a fim de separar os rejeitos (nós de madeira e cavacos não cozidos), visando à limpeza da polpa e retirada do licor remanescente. Neste estágio as fibras são escuras, pois ainda contém lignina residual do cozimento.

O branqueamento da polpa divide-se em dois estágios: o pré-branqueamento e o branqueamento propriamente dito. O pré-branqueamento remove mais uma parte desta lignina residual do cozimento e pode ser realizado por diversos processos tais como: hidrólise enzimática, reações de substituição ou adição de oxigênio, dependendo da indústria. Nesta etapa a pasta tem uma coloração amarela pálida e não é adequado para fabricação de papel de boa qualidade para impressão ou escrita. Este tingimento é causado por resíduos de lignina sobre fibras das paredes. Na sequência, no branqueamento, a pasta tem coloração branca pura, através da mudança de absorção de luz das substâncias formadas por produtos que quebram a lignina. O processo de branqueamento pode ser dividido em três estágios: o primeiro estágio é usado ozônio (O_3) e dióxido de cloro (ClO_2); no segundo estágio,

hidróxido sódico (NaOH), oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e no último é realizado outro tratamento com dióxido de cloro. O uso de cloro resulta na produção de organoclorados que são produtos da degradação da lignina, os quais são altamente tóxicos e mutagênicos, necessitando tratamento dos efluentes na planta da fábrica de papel (POLIZELLI et al., 2005). A Figura 4 é um esquema representativo das diversas etapas do processo de produção de celulose.

Regulamentos ambientais têm restringido o uso de compostos clorídricos em processos de branqueamento nas indústrias de papel e celulose, assim a xilanase vem sendo utilizada em pré-branqueamentos como uma alternativa em tais processos (VIKARI et al., 1994). Estes processos de pré-branqueamento reduziram o uso de compostos clorídricos em até 30%. Como resultado houve a diminuição de 15% a 20% na liberação de organoclorados nos efluentes das indústrias de papel (KULKARNI et al., 1999). Muitas indústrias do Canadá, Estados Unidos, Suécia e Finlândia estão usando xilanases nas sequências de branqueamento (ARAÚJO et al., 1999).

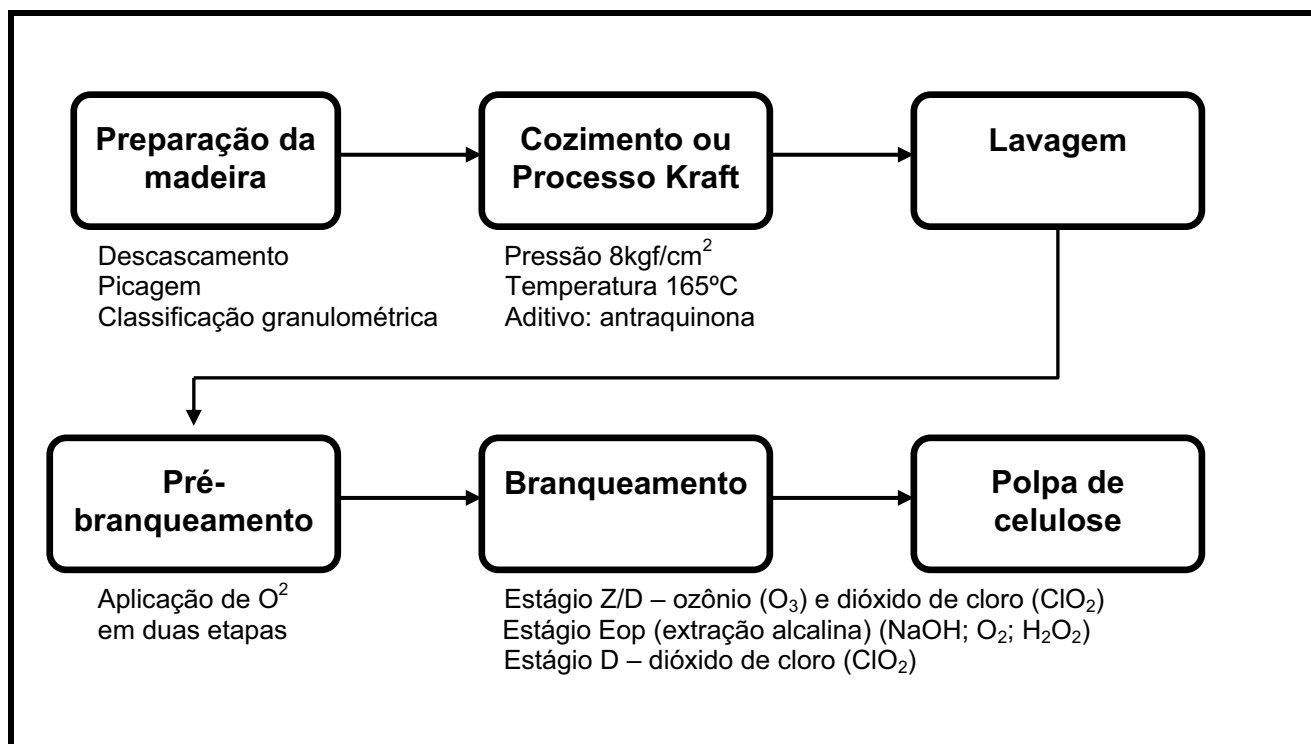


Figura 3. Esquema representativo de um processo de produção da polpa de celulose (Fonte: RIZZATTI, 2004).

Existem algumas teorias que o tratamento com xilanases tem função de remover a xilana precipitada da superfície da polpa (ocorrida durante o cozimento), mas não está totalmente esclarecida, a maneira exata ainda de como as xilanases agem nos processos de branqueamento.

Outra aplicação do complexo xilanolítico é no processamento de fibras vegetais, como o cânhamo ou o linho na indústria têxtil. O processo consiste na incubação de caules de rami secos com xilanases que liberam fibras de celulose intactas que não necessitam da etapa branqueamento (PRADE, 1995).

O uso desse complexo xilanolítico na produção de rações animais é importante no setor de agronegócios. As xilanases são componentes de formulação de ração animal, juntamente com glucanase, pectinase, celulase, protease, amilase, fitase, galactosidase e lipase. Elas quebram arabinoxilanas presentes na ração, reduzindo a viscosidade do material bruto. A arabinose encontrada na parede das células dos grãos tem um efeito antinutricional para aves domésticas. Quando esses componentes encontram-se na forma solúvel, eles se possível elevam a viscosidade da ração ingerida interferindo na instabilidade e absorção de outros componentes. Se a xilanase é acrescentada na ração contendo milho e sorgo, ambos são alimentos de baixa viscosidade, ela melhora a digestão dos nutrientes na parte inicial do trato digestivo, resultando em uma melhora no uso de energia. A ação conjunta com as glucanases, pectinases, celulases, proteases, amilases, fitases, galactosidases e lipases melhoram a digestibilidade da mistura alimentar (POLIZELI et al., 2005).

Na indústria alimentícia, como por exemplo, na panificação, as xilanases podem ser usadas junto com alfa-amilase que leva à produção de maltose, aumentando a maciez e a textura da massa e do miolo e mantendo o pão fresco por mais tempo. Já amilase maltogênica e a xilanase dão estabilidade à massa, enquanto a protease altera a elasticidade e a textura do glúten e melhora a cor e o sabor do pão (MUSSATTO et al., 2007). As xilanases vem sendo usadas sobre as arabinoxilanas, que representam 2 a 3% (p/p) da farinha de trigo, e absorvem cerca de 1/3 da água adicionada à massa, impedindo o desenvolvimento do glúten, reduzindo, assim o volume do pão e prejudicando a textura do mesmo. Assim, a aplicação de xilanases

(arabinosidases) à farinha leva à liberação da água retida nas arabinoxilanas, melhorando o manuseio da massa e permitindo a obtenção de um produto final com maior volume, melhorando a estrutura de miolo e textura (KULKARNI et al., 1999; HARBAK e THYGESEN, 2002; CAMACHO e AGUILAR, 2003). Além disso, uma grande quantidade de arabinoxilooligossacarídeos pode ser benéfico à saúde, pois influencia o funcionamento do intestino delgado, melhorando a digestão e absorção dos açúcares; proteção contra as doenças cardiovasculares; prevenção de câncer colo retal e auxilia no aumento do bolo fecal e esvaziamento intestinal periódico nas evacuações (MENEZES e DURRANT, 2008). Nas fábricas de biscoitos, a xilanase é recomendada na fabricação de cream-crackers e wafer, melhora a textura, palatibilidade e uniformidade (POLIZELLI et al., 2005).

As xilanases também são utilizadas na clarificação de sucos e vinhos (BIELY, 1985), na liquefação de frutas e mucilagem de café (WONG et al., 1988). Em 1930, quando iniciou-se a fabricação de sucos de frutas cítricas o rendimento era pequeno, pois ocorria problema na sua filtração devido à turvação causada pelo amido. O conhecimento elevado dos constituintes químicos das frutas e o uso das enzimas microbianas ajudaram a resolver esse problema. Atualmente, xilanases em combinação com celulasas, amilases e pectinases, provocam melhorias na liquefação das frutas e vegetais; na estabilização da polpa de fruta; na recuperação de aromas, óleos essenciais, vitaminas, sais minerais, cor dos alimentos e pigmentos; redução da viscosidade; hidrólise das substâncias que impedem clarificação física e química do suco, ou que podem causar escurecimento no concentrado.

Os avanços das técnicas de biologia molecular permitiram outras aplicações das xilanase. De acordo, com Ganga et al., (1999), uma levedura recombinante do vinho foi construída com gene para xilanase de *Aspergillus nidulans xlnA*, resultando em um vinho com melhor aroma de frutas que o convencional. Durante a fabricação da cerveja, a parede celular da cevada é hidrolisada permitindo a quebra do amido. Porém, há a liberação de longas cadeias de arabinoxilanas, que aumentam a viscosidade podendo deixar a cerveja turva. Assim, as xilanases auxiliam na solubilização das arabinoxilanas a oligossacarídeos menores, diminuindo sua viscosidade e,

consequentemente, eliminando a turbidez da cerveja (DEBYSER et al., 1997; DERVILLY et al., 2002; PRODUCTS AND SOLUTIONS NOVOZYMES, 2008).

A xilanase e xilano não são bastante usados na indústria farmacêutica. A xilanase foi algumas vezes empregada com complexo de enzimas (hemicelulases, proteases e outras) em suplementos alimentares, mas poucos produtos medicinais possuem essa formulação (POLIZELLI et al., 2005). Já os produtos da hidrólise da xilana, como a xilose, podem ser transformados em combustíveis líquidos (etanol), solventes e adoçantes artificiais de baixa caloria. A primeira etapa é a deslignificação da hemicelulose que é material rico em xilana, seguido da hidrólise pela ação das xilanases e hemicelulases, produzindo açúcares como a xilose. Na etapa seguinte os produtos são fermentados, principalmente por levedura (*Pichia stipitis* e *Candida shehatae*) produzindo xilitol ou etanol (SREENATH e JEFFRIES, 2000). Entre os açúcares usados na produção do álcool etílico, a xilose representa 5% a 20%. Xilitol é um poliálcool com poder de adoçante comparado com a sacarose (PARAJÓ et al., 1998). É um adoçante não cancerígeno indicado para indivíduos obesos e diabéticos, recomendado para prevenção de osteoporose e infecções respiratórias, desordem do metabolismo de lipídios e lesões parenterais e rins. Uma variedade de produtos comerciais contendo xilitol, por exemplo, goma de mascar pode ser encontrada no mercado. Embora a hidrólise enzimática da xilana é método de obtenção da xilose, o atual xilitol comercial é produzido em larga escala por catálise química. Esse processo é considerado de alto custo, pois a xilose foi inicialmente purificada em várias etapas. Além disso, reações químicas frequentemente produzem produtos tóxicos na fermentação que são da decomposição do material lignocelulósico; também na liberação de açúcares, produtos podem ser formados da degradação da glicose (hidroximetilfurfural), xilose (furfural), e da estrutura da lignina (compostos aromáticos e fenólicos e aldeídos). Substâncias liberadas da estrutura da lignocelulose, como material de extração e ácido acético (isto é, terpenos e seus derivados, tropolones e compostos fenólicos como os flavonóides, quinonas, ligninas e taninos, ou corrosão dos equipamentos (ferro, cromo, níquel e cobre) podem ter poder inibidor da atividade microbiana. O desenvolvimento de tecnologia mais apropriadas na produção de xilitol tem causado grande expectativa para o uso de indústrias de alimentos,

farmacêuticas e odontológicas (POLIZELLI et al., 2005). Esses são alguns exemplos que mostram a contribuição das enzimas do complexo xilanolítico para diversas aplicações nos processos industriais.

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, quando estocadas ou durante o uso em processos industriais. Para que a catálise enzimática seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de protegê-las de possível inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, o processo de imobilização em suportes sólidos tem sido desenvolvido para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (VILLENEUVE et al., 2000).

A utilização destas técnicas tem sido crescente nos últimos vinte anos e, com isso, novas informações teóricas e aplicações práticas estão surgindo (VILLENEUVE et al., 2000). O uso de biocatalisadores imobilizados também é crescente em escala industrial, especialmente na indústria farmacêutica, de detergentes, couros e panificação, entre outras (PRODUCTS AND SOLUTIONS NOVOZYMES, 2008).

2.3.4. Imobilização de enzimas

As enzimas têm importante papel na produção de vários produtos, principalmente em processos biocatalíticos, aplicados nas indústrias alimentícias e de bebidas. Uma das vantagens da enzima é a grande especificidade de ação, condições simples para a catálise de reações e diversidade de processos passíveis de serem realizados em relação a catalisadores químicos. A possibilidade de obtenção de fontes microbianas é outra característica importante, levando a uma grande disponibilidade, comparativamente a outras fontes, como tecidos animais (PSZCZOLA, 2001). A desvantagem do uso das enzimas na aplicação industrial se deve ao alto custo para isolar e purificar, além de sua recuperação do meio reacional no final do processo catalítico (MORANA et al., 2006). Por isso, atualmente, emprega-se a técnica de imobilização de enzimas que é um dos processos capazes de aumentar a eficiência de diversas enzimas, pois a instabilidade e impossibilidade de reuso na forma livre são obstáculos na sua utilização. Esses obstáculos poderão ser superados parcialmente ou totalmente através da

imobilização enzimática. A imobilização enzimática é um método desenvolvido para restringir o movimento da enzima, que fica ligada ou confinada na região do espaço dos géis (polímeros grandes de matrizes porosas) permitindo assim, que o substrato tenha acesso a essa enzima, e conseqüentemente, liberando o produto. Este método, além de estabilizar a enzima, também permite sua reutilização (BICKERSTAFF, 1997). O termo enzima imobilizada foi adotado pela primeira vez na Conferência de Engenharia Enzimática, em Hennicker, New Hampshire, Estados Unidos, em 1971 (GOULART, 2007).

A imobilização de biocatalizadores tem atraído a atenção para sua utilização em bioprocessos. Em geral, biocatalizadores imobilizados são estáveis e de fácil manuseio quando comparados a suas formas livres. Uma das mais importantes características é que podem ser usados repetidamente em processos em batelada ou com fluxo contínuo. Vários métodos de imobilização de biocatalizadores têm sido desenvolvidos e atualmente são utilizados extensivamente (FUKUI e TANAKA, 1990). No entanto, não existe um método ideal de imobilização enzimática. A técnica de imobilização a ser utilizada deverá estar de acordo com a finalidade do produto e com as características específicas das enzimas e dos catalisadores químicos.

Uma das aplicações industriais que utiliza enzima imobilizada, conhecida mundialmente, é a conversão de xarope de glicose em xarope com alto teor de frutose pela glicose isomerase imobilizada, com grande aplicação na indústria de alimentos (GUISÁN, 2006).

No processo de imobilização de enzimas, não devem sofrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo da enzima. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização. As principais vantagens obtidas no processo de imobilização são: (i) aumento das estabilidades térmica e operacional, protegendo o sítio ativo da enzima da inativação; (ii) permite sua reutilização em outras etapas do processo; (iii) redução de custo operacional e (iv) fácil separação e recuperação da enzima do meio reacional, reduzindo custo e etapas de purificação do produto (PAIVA et al., 2000; VILLENEUVE et al., 2000; DALLA-VECCHIA et al., 2004).

A imobilização pode ocorrer através de métodos químicos (adsorção, ligação covalente, “crosslinking”) ou através de métodos físicos, como por exemplo, deposição física para uso em meios orgânicos, aprisionamento em géis ou microcápsulas, membranas ou sistemas de fases orgânico/aquoso ou aquoso/aquoso (ADLERCREUTZ, 1993). A Figura 5 mostra esquemas de diferentes procedimentos de imobilização.

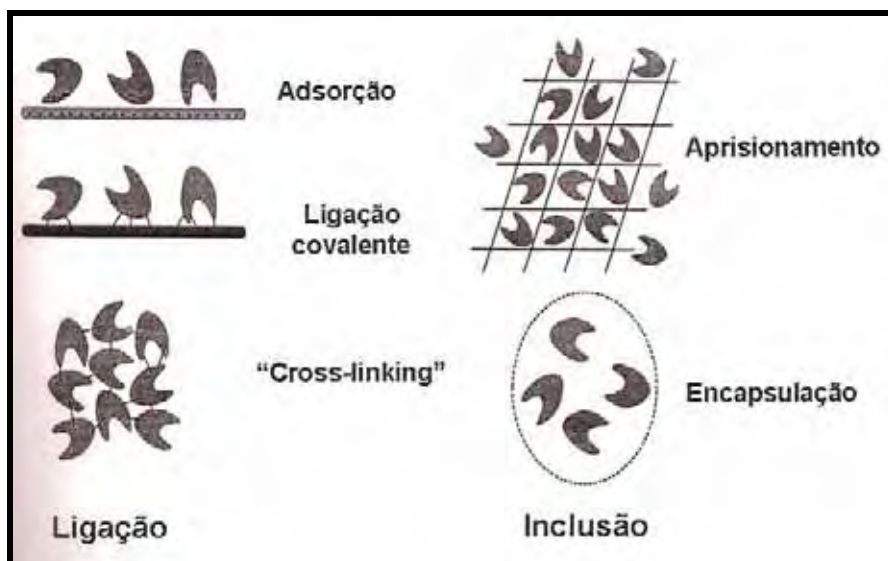


Figura 4. Representação dos tipos de imobilização de enzimas mais utilizados (Modificação de BICKERSTAFF, 1997).

O método adsorção é feito entre a enzima e o material insolúvel. Ela é confinada em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (suporte). Dentre os métodos empregados na imobilização de enzimas envolvem processos de retenção física ou união química ao suporte. Dentre os diversos métodos de imobilização, a adsorção física é o mais simples e um dos mais estudados. A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações de Van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras. Vários materiais podem ser usados para este propósito e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo (VILLENEUVE et al., 2000).

A imobilização por inclusão consiste em "confinar" uma proteína em um polímero insolúvel ou matriz polimérica, de maneira a impedir a liberação da enzima, mas permite a entrada do substrato. Neste caso a enzima está totalmente envolvida pelo sistema, onde se cria uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas, alguns substratos e produtos se difundem (GOULART, 2007). A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a perda da atividade.

A imobilização de enzimas através de ligações covalentes entre a enzima e suporte é uma das mais interessantes do ponto de vista de aplicação industrial do derivado produzido, quando se deseja recuperar a enzima ou suporte posteriormente, já que além da manipulação mais simples do derivado este apresenta maior resistência e estabilidade em relação à enzima livre. A união covalente entre a enzima e suporte requer grupos ativos no suporte disponíveis para reagirem com grupos presentes nos aminoácidos das proteínas em questão. Os principais aminoácidos envolvidos nestes processos geralmente são lisina, cisteína, tirosina e histidina, além desses a metionina, triptofano, arginina, ácido aspártico e glutâmico, esses em menor expressão (ARROYO, 1998; BICKERTAFF, 1997; GUISÁN et al., 1997).

No caso da imobilização por ligações covalentes a união entre enzima e suporte pode se dar por um ponto apenas, ligação unipontual, ou por mais pontos, ligação multipontual. A imobilização multipontual, consiste na formação de várias ligações covalentes entre uma molécula de enzima e o suporte. Este procedimento aumenta a rigidez da molécula de enzima imobilizada, conferindo-lhe maior resistência a mudanças conformacionais induzidas pelo calor, solventes orgânicos e/ou outros agentes desnaturantes (GUISAN, 1988; TARDIOLI et al., 2003). Existem estratégias que permitem imobilizar proteínas multipontualmente por três vias diferentes de resíduos: amino-terminal, resíduos de lisina e grupos carboxílicos. Estes são os resíduos mais frequentemente encontrados sobre a superfície das proteínas (SRERE e UYEDA, 1976).

Há dois métodos de imobilização por ligações covalentes: imobilização direta, as uniões covalentes ligam-se diretamente ao suporte; e a imobilização indireta, as uniões covalentes ligam-se antes aos braços espaçadores, os quais estão fixados em um suporte ativado. Para que ocorra a imobilização é necessário a preparação dos géis de agarose e ativação do suporte.

A utilização de enzimas imobilizadas em géis é bastante descrita na literatura, e geralmente apresenta vantagens operacionais como possibilidade de reutilização, reações em batelada ou contínua, rápida interrupção da hidrólise, formação controlada do produto e fácil separação, e a possibilidade de plantas industriais para processos contínuos ou passos consecutivos para uma maior eficiência do processo (ARSLAN et al., 2000). De maneira geral, não há um material de suporte ou método de imobilização ideal para fornecer um padrão de imobilização (TÜMTÜRK et al., 2000); o que determinará este suporte serão suas características e a forma de ligação entre ele e a enzima. De qualquer maneira, suas características físicas e químicas, solubilidade, resistência, segurança, custos de produção e rendimento da reação devem ser considerados (BICKERSTAFF, 1997). Assim, é possível encontrar na literatura os mais diferentes tipos de suportes e derivados para imobilizações enzimáticas, covalentemente ou reversíveis.

Pesquisas recentes têm sido desenvolvidas para descobrir novos tipos de suportes e métodos de imobilização. Entre os suportes utilizados podemos citar polissacarídeos (agarose, celulose, amido, dextrana, quitosana), proteínas (colágeno, gelatina, albumina), polímeros sintéticos (poliacrilatos, polimetacrilatos, poliacrilamida, poliamidas, vinil e polímeros alils), minerais (bentonite, sílica) e materiais fabricado (vidro não poroso, vidro de poro controlado (CABRAL e KENNEDY, 1991).

A agarose é um polímero natural extraído de algas vermelhas, e sua estrutura química permite que géis muito resistentes sejam formados. Estes géis têm uma estrutura macro-reticular com malha muito aberta, que pode ser modificada simplesmente variando-se a concentração de agarose (Figura 6).

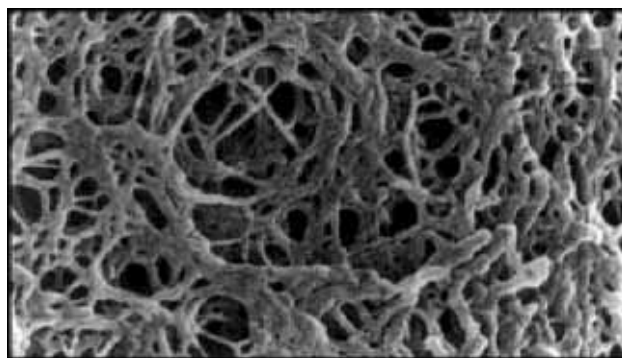


Figura 5. Microscopia eletrônica de gel de agarose (Fonte: DNA ENGINEERING/AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS).

As fibras da agarose são constituídas de unidades de agarobiose, açúcar cujas hidroxilas serão transformadas através de reações químicas em grupos ativos onde se ligarão as enzimas a serem imobilizadas (Figura 7). Às hidroxilas livres da agarose podem ser ligados braços químicos para imobilização das enzimas, produzindo suportes glioxil-agarose, amino-agarose (ou monoaminoetil-N-aminoetil – MANAE) ou glutaraldeído-agarose. Essas transformações químicas não são possibilidades exclusivas da agarose, podendo ser realizadas em outros tipos de suporte (GUISÁN et al., 1997).

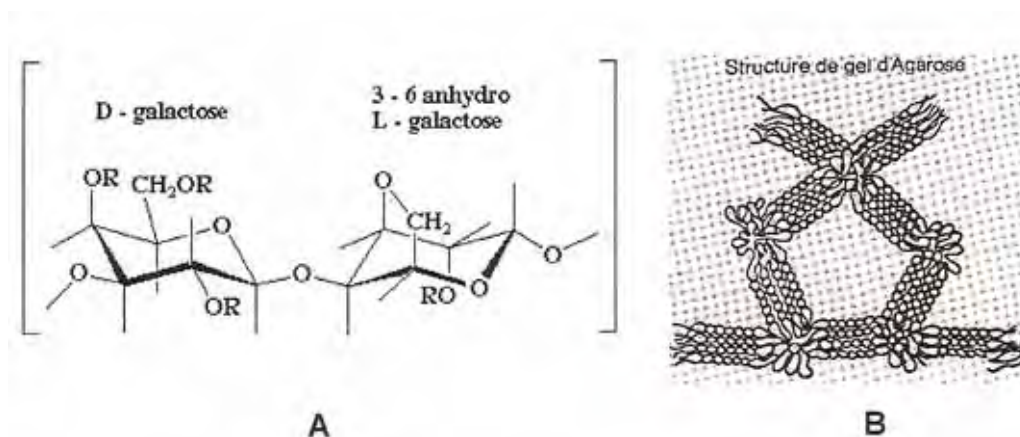


Figura 6. Estrutura química da agarose (A). Representação do poro da agarose (B). (Fonte:<http://ead.univ-angers.fr>).

O uso da agarose como suporte para imobilização oferece, entre outras, a vantagem de ser resistente à degradação microbiana e mecanicamente, apresentar transparência óptica, ser atóxico e de fácil manuseio. Dentre os suportes preparados a partir do gel de agarose estão: o glioxil-agarose e o

monoaminoetil-N-aminoetil (MANAE)- agarose (GUISÁN et al., 1997). Estes suportes são produzidos a partir da transformação dos grupamentos hidroxilas da agarose em grupos gliceril e logo levados a glioxil.

O suporte glioxil orienta a imobilização de enzima através de sua área de superfície que contenha maior densidade de grupamentos amino, incluindo-se o amino-terminal da molécula e os grupamentos ϵ -amino das cadeias laterais das lisinas. Em condições amenas de pH durante o processo de imobilização, serão estabelecidas preferencialmente as ligações com os grupos amino-terminal, enquanto que condições de altos valores de pH (pH 10,0 – 10,5) possibilitam que os grupamentos amino das lisinas estejam reativos e se estabeleça ligações entre estes resíduos de aminoácidos e o suporte (GUISÁN et al., 1997).

Existem estratégias que permitem a estabilização de enzimas multiméricas, como a que ocorre com a adição de glutaraldeído a enzimas previamente imobilizadas. Neste procedimento, a molécula de glutaraldeído liga-se ao grupo ϵ -amino das lisinas e à molécula de glutaraldeído ligada ao grupo primário do suporte, estabelecendo uma ligação covalente multipontual; seu uso também é possível em suportes epóxi-acrílicos, como o Sepabeads, antes ou após a adsorção das enzimas (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005a; LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005b; TORRES et al., 2003).

Outra técnica que pode ser utilizada para a estabilização de enzimas multiméricas é o uso de macromoléculas polifuncionais que mantêm a integridade das subunidades da enzima. Dextranas comerciais atuam bem nesta técnica de pós-imobilização. As dextranas oxidadas por periodato produzem uma estrutura poli-aldeídica adequada para reagir com os grupos amino das proteínas. As reações entre os poli-aldeídos e a proteína ocorre através da formação de bases de Schiff, e então a reação é finalizada com a redução por boroidreto, onde as bases de Schiff são reduzidas a grupo amino secundários e os poli-aldeídos são convertidos em poli-alcoóis (FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al., 1999; HIDALGO et al., 2003).

A modificação química dos grupos carboxílicos de superfície (carboxil terminal, ácido aspártico e ácido glutâmico) com 1-etil-3-(dimetilamino-propil)

carbodiimida (EDAC), na presença de etilenodiamina (EDA) também é utilizada na estabilização de enzimas (GOULART, 2007). Nesta reação ocorre a formação de amida entre o grupo carboxílico ativado da proteína e o grupo amino do EDA, formando um grupo amino primário livre. Este novo grupo amino apresenta um valor de pK ao redor de 9,2, sendo mais reativo que os grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina da superfície da proteína. Além disso, o grau de modificação pode ser controlado pela concentração de EDAC usado durante a reação (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005c)

Outra metodologia para melhorar a estabilidade conformacional de uma enzima é sua imobilização em suportes ativados com grupos epóxidos (MATEO et al., 2000a; MATEO et al., 2000b; PESSELA et al., 2003). Este suporte apresenta as seguintes vantagens: permite que braços espaçadores curtos sejam ligados; uma camada simples e muito densa de grupos epóxidos estáveis e reativos pode ser facilmente preparada; os grupos epóxidos permitem a imobilização por diferentes grupos da superfície da enzima (amino, tiol, fenol, imidazol, hidroxila); a reação enzima-suporte pode ser facilmente interrompida através do bloqueio dos grupos epóxi com diferentes reagentes. No entanto, não há um método ideal de imobilização enzimática. O procedimento de imobilização a ser utilizado deverá estar de acordo com as características próprias da enzima e com a finalidade do produto.

4. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar e conhecer as propriedades bioquímicas do complexo xilanolítico de uma espécie fúngica termofílica isolada da polpa do fruto do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) em estado de decomposição.

4.1. Objetivos específicos

- Utilizar resíduos agrícolas como fonte de carbono para o novo fungo termófilo isolado;
- Determinar melhores meios de cultivo e fontes de carbono para induzir a produção de xilanase por este micro-organismo;
- Caracterizar a atividade xilanolítica no extrato cru, quanto ao pH e temperatura ótima, estabilidade, K_m e V_{max} , energia de ativação e produto de hidrólise;
- Preparar suportes alternativos a partir dos resíduos agrícolas para serem utilizados futuramente na imobilização de enzimas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Preparo dos resíduos agrícolas

Os resíduos agrícolas foram obtidos na região de Araraquara (SP) e Avaré (SP). Os resíduos utilizados foram: sabugo de milho (SM), bagaço de cana (BC), farelo de trigo (FT), tegumentos das sementes de soja (TSS) e escapeo floral da bananeira (EFB). Estes resíduos agrícolas foram empregados como fonte de carbono para produção de xilanase pelas três espécies de fungos isolados do fruto de cupuaçuzeiro.

5.1.1 Preparo do resíduo – Sabugo de Milho (SM)

O preparo desse resíduo pode ser dividido em duas etapas:

- 1º Etapa: Coleta e trituração

Foram coletadas de 70 a 100 espigas de milho do Assentamento da região de Araraquara (Figura 7). As espigas foram debulhadas, os grãos foram descartados e os sabugos foram limpos em seguida e cortados em suas extremidades. Após, foram triturados na picadora de resíduos agrícolas (UNESP – Araraquara) para redução do tamanho.

- 2º Etapa: Preparo do resíduo

Pegou-se o sabugo de milho triturado, o qual foi passado em tamis com malha de abertura de 2,00 mm. A matéria-prima que não transpôs foi triturada no liquidificador para diminuir a granulometria, em seguida foi passado em tamis com malha de abertura de 0,125 mm. O pó preparado ficou armazenado em frascos plásticos para posterior utilização.



Figura 7. Sabugo de milho.

5.1.2. Preparo do resíduo – Bagaço de Cana (BC)

O preparo desse resíduo pode ser dividido em duas etapas:

- 1º Etapa: Coleta e trituração

O saco de 60 kg de bagaço de cana de açúcar (colmos + restos foliares) foi doado pelo Sr. Ovídio Negrão, sitiante da cidade de Avaré (SP) (Figura 8). O bagaço foi colocado em uma bacia com água corrente; esperou-se decantar a sujeira e passou-se por peneira de café a parte suspensa. Esse procedimento foi repetido cinco vezes. A última lavagem foi realizada com água destilada. Retirou-se o excesso de água, distribuiu-se em bandejas e foram colocados em estufa com circulação forçada de ar a 100°C para a secagem.

- 2º Etapa: Preparo do resíduo

O bagaço de cana (colmos + restos foliares) depois de seco foi passado em tamis com malha de abertura de 2,00 mm. A matéria-prima que não transpôs foi triturada no liquidificador para diminuir a granulometria, em seguida foi passado em tamis com malha de abertura de 0,125 mm. O pó preparado ficou armazenado em frascos plásticos para posterior utilização.



Figura 8. Bagaço de cana de açúcar (colmos e restos foliares).

5.1.3. Preparo do resíduo – Tegumentos das Sementes de Soja (TSS)

O preparo desse resíduo pode ser dividido em duas etapas:

- 1º Etapa: Coleta e trituração

O tegumento das sementes de soja foi cedido pela Usina de Soja (UNISOJA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de

Araraquara (Figura 9). Foi colocado em uma bacia com água corrente; esperou-se decantar a sujeira e passou-se por peneira de café a parte suspensa. Esse procedimento foi repetido duas vezes. A última lavagem foi realizada com água destilada. Retirou-se o excesso de água, distribuiu-se em bandejas e foram colocados em estufa com circulação de ar a 100°C para secar.

- 2º Etapa: Preparo do resíduo

O tegumento da soja depois de seco foi passado em tamis com malha de abertura de 2,00 mm. A matéria-prima que não transpôs foi triturada no liquidificador para diminuir a granulometria, em seguida foi passado em tamis com malha de abertura de 0,125 mm. O pó preparado ficou armazenado em frascos plásticos para posterior utilização.



Figura 9. Tegumentos das sementes de soja.

5.1.4. Preparo do resíduo – Farelo de Trigo (FT)

O preparo desse resíduo pode ser dividido em duas etapas:

- 1º Etapa: Coleta e trituração

O farelo de trigo foi adquirido diretamente em supermercado de Araraquara, não sendo necessária uma pré-limpeza (Figura 10).

- 2º Etapa: Preparo do resíduo

O farelo de trigo foi passado em tamis com malha de abertura de 2,00 mm. A matéria-prima que não transpôs foi triturado em um liquidificador para diminuir a granulometria, em seguida foi passado em tamis com malha de

abertura de 0,125 mm. O pó preparado ficou armazenado em frascos plásticos para posterior utilização.



Figura 10. Farelo de trigo.

5.1.5. Preparo do resíduo – Escapo Floral da Bananeira (EFB)

O preparo desse resíduo foi feito em uma etapa:

- 1º Etapa: Coleta e trituração

O Escapo floral da bananeira foi adquirido de um sítio próximo à cidade de Araraquara (Bairro Machado) (Figura 11). Depois de triturado na picadora (UNESP – Araraquara), lavou-se várias vezes para tirar sua nódoa e, em seguida, foi secado ao sol por uma semana, e armazenado em frascos plásticos para posterior utilização.



Figura 11. Escapo Floral da Bananeira.

5.2. Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após o preparo dos resíduos foram feitas lâminas contendo os diferentes pós agrícolas para que fossem realizadas a Microscopia Óptica no laboratório de Parasitologia do Prof. Dr. João Aristeu Rosa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp- Araraquara. O microscópio óptico funciona com um conjunto de lentes (ocular e objetiva) que ampliam a imagem transpassada por um feixe de luz. Já a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi feito no Instituto de Química – Unesp – Araraquara, o qual permite a análise da topografia da amostra, com excelente resolução da imagem obtida. A imagem é obtida por reflexão de feixe de elétrons pela superfície da amostra, e uma imagem é produzida por feixes de elétrons refletidos. Para que fossem feitas as imagens dos resíduos agrícolas foi necessário recobri-los com uma fina camada de ouro. Estas imagens microscopia óptica e eletrônica de varredura foram feitas para observar formas, tamanhos e densidade dos poros das estruturas dos resíduos agrícolas.

5.3. Isolamento do micro-organismo

Após um incêndio no final de 2007 no Departamento todas as cepas de fungos do laboratório do Prof. Dr. Rubens foram perdidas, então se iniciou o isolamento de novas linhagens produtoras de enzimas. Foram isolados no Laboratório de Enzimologia Industrial do Departamento de Alimentos e Nutrição – FCFAR – UNESP- Araraquara, fungos filamentosos da polpa do fruto de cupuçuazeiro em decomposição, sendo denominados Fungo do Cupuaçu (FCUP1, FCUP2 e FCUP3). Esses fungos foram isolados por Benedetti (2008), com auxílio de uma alça estéril, retirando-se da superfície dessa polpa o micro-organismo de interesse, os quais foram repicados em meio com 2% ágar e 4% de farinha de aveia. Este meio foi descrito por Monti (1989) em sua tese de Doutorado. Verificou-se que esses novos isolados produziam um pigmento preto (FCUP1), pigmento verde (FUCP2) e pigmento marrom esbranquiçado (FCUP3). Os fungos de pigmentos preto foram incubados a 40°C, com crescimento em 4 dias. Já os de pigmentos verde e marrom esbranquiçado foram incubados em temperatura ambiente (26°C), com crescimento em 4 a 7 dias.

No primeiro isolamento desses fungos FCUP1, FCUP2 e FCUP3 foi adicionado clorofenicol (antibiótico) na superfície do meio com o objetivo de impedir o crescimento de outros micro-organismos indesejáveis (KUNZ, 1983).

O trabalho desenvolvido focou na caracterização parcial de algumas enzimas produzidas pelo fungo filamentosso FCUP1, por ser um fungo termófilo de grande interesse para aplicação industrial.

Outro fungo utilizado nesse estudo foi *Humicola grisea* var. *thermoidea* isolado do solo por Chaves et al.(1989), no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A cepa desse micro-organismo foi cedida pelo Prof. Dr. João Atílio Jorge, da Faculdade Filosofia Ciências e Letras da USP de Ribeirão Preto. Este fungo, também foi mantido em meio sólido inclinado contendo 2% de ágar e 4% de farinha de aveia a 40°C por 10 dias.

5.4. Manutenção do micro-organismo

Segundo Neder (1992), vem-se buscando melhores técnicas de manutenção de culturas o mais próximo possível de seu estado original. A manutenção dos fungos *Humicola* sp, FCUP-1, FCUP-2 e FCUP-3 foram feitos através de repiques no período de um mês em meio de cultura contendo 2% de ágar e 4% de farinha de aveia em pó, os quais foram incubados a 40°C. Após o crescimento, as culturas foram armazenadas em geladeira a 4°C (culturas estoques) para posterior uso.

5.5. Obtenção de conídios

Os conídios foram obtidos a partir de culturas estoques. Para cada tubo de cultura foram adicionados 10mL de água estéril, de onde se retiravam volumes destas suspensões, variando entre 1 e 2mL (5×10^7 células/mL) (MONTI, 1989). Em seguida, adicionou-se em meio líquido com diferentes fontes de carbono ou em meio semi-sólido para crescimento e produção de enzimas, a 40°C, por 18 horas.

5.6. Meios de cultivos

Foram testados meios líquidos e semi-sólidos na indução do crescimento e produção de enzimas.

5.6.1. Meio líquido

a) Meio M4

CaCO ₃	0,1%
NaCl.....	0,5%
Gelatina.....	0,25%
Água de maceração de milho.....	0,5%
Água destilada q.s.p.....	100mL
pH inicial.....	6,0

b) Meio M4 modificado

CaCO ₃	0,1%
NaCl.....	0,5%
NH ₄ Cl.....	0,1%
Água de maceração de milho.....	0,5%
Água destilada q.s.p.....	100mL
pH inicial.....	6,0

5.6.2. Meio semi-sólido

Esse meio foi preparado em frasco Erlenmeyer de 250mL constituído de diferentes fontes de carbono, utilizado em crescimento estacionário, com as seguintes composições:

- 2,5g de farelo de trigo + 5,0mL de água de torneira ou água de maceração de milho.
- 2,5g de sabugo de milho + 5,0mL de água de torneira ou água de maceração de milho.
- 2,5g de bagaço de cana (colmos + resíduos foliares) + 5,0mL de água de torneira ou água de maceração de milho.

- 2,5g de tegumento das sementes de soja + 5,0mL de água de torneira ou água de maceração de milho.
- 2,5g de avicel (celulose) microcristalina + 7,0mL de água de maceração de milho.
- 1,25g de avicel (celulose) microcristalina + 1,25g de farelo de trigo + 7,0mL de água de maceração de milho.
- 1,25g de avicel (celulose) microcristalina + 1,25g de farelo de trigo + 7,0mL de água de torneira.

Após esterilização a 120°C por 20 minutos, o meio de cultura foi inoculado com a suspensão de conídios (5×10^7 células/mL), e incubado a 40°C em condições estacionárias, por 6 dias.

5.7. Crescimento em meio líquido e meio semi-sólido

Aos meios líquidos foram adicionadas diferentes fontes de carbono com concentrações apropriadas. Após a esterilização a 120°C por 20 minutos, foram inoculados com 5×10^7 células/mL de suspensão de conídios coletados nos tubos de cultura (MONTI, 1989), e então, incubados em mesa incubadora com agitação orbital de 120rpm a 40°C, sendo o crescimento interrompido após 12 ou 16 horas, e em alguns experimentos após 18 horas. Em seguida, o conteúdo de cada frasco foi filtrado a vácuo em papel Whatman nº 1 (LEMBO et al., 2006), e o sobrenadante (filtrado) foi utilizado para verificação da atividade enzimática e dosagem de proteína.

Para o crescimento estacionário, utilizou-se o meio semi-sólido, onde foram inoculadas 5×10^7 células/mL de suspensão de esporos do fungo. Os frascos foram incubados em estufa a 40°C, por 6 dias. Após o crescimento, adicionaram-se 30mL de água de osmose reversa gelada em cada frasco, mexeu-se com bagueta de vidro e deixou-se em repouso na geladeira, por 30 minutos. Filtrou-se a vácuo e, quando necessário, durante a filtração, lavou-se com mais 10mL de água de osmose reversa gelada, sendo o sobrenadante (filtrado) utilizado para verificação da atividade enzimática e dosagem de proteína.

5.8. Obtenção da enzima extracelular e micelial de meios líquidos e semi-sólidos

5.8.1. Obtenção de enzima do meio líquido

A massa micelial resultantes das culturas descritas nas condições acima foi separada do meio de cultivo por filtração a vácuo utilizando o funil de Büchner contendo papel de filtro Whatman nº 1. O filtrado (meio de cultura livre de células) foi usado como uma preparação de enzimas extracelulares.

5.8.2. Obtenção da enzima de meio semi-sólido

A obtenção de enzimas a partir de culturas estacionaria foi feita, adicionando-se 30mL de água de osmose reversa gelada (4°C) aos frascos de cultivo, em seguida mexeu-se com bagueta de vidro e deixando-se em repouso na geladeira, por 30 minutos. A seguir a cultura foi filtrada a vácuo utilizando o funil de Büchner contendo papel de filtro Whatman nº1. O filtrado (meio de cultura livre de células) foi usado como uma preparação de enzimas extracelulares.

5.8.3. Obtenção de enzimas intracelulares

Para obtenção dessas enzimas foi utilizada a massa micelial produzida pelo fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Essa massa era lavada com água destilada (cerca de duas vezes o volume do meio) e prensada entre folhas de papel de filtro para retirar o máximo possível de água embebida. Depois de congelado, o micélio foi macerado com areia tratada em tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,0 até a ruptura das células em gral de porcelana previamente gelado. O macerado foi ressuspenso com água destilada de modo que a suspensão não ficasse muito viscosa. A areia e os restos celulares foram removidos por centrifugação a 7400g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante desta centrifugação foi denominado extrato bruto e utilizado como fonte de enzima intracelular.

5.9. Clarificação do meio

Para obter-se um extrato mais limpo, livre de pigmentos e polissacarídeos, crescidos em meio M4 modificado e com sabugo de milho

como fonte de carbono, fez-se a clarificação, com uso de diferentes procedimentos, descritos nos itens a seguir.

5.9.1. Precipitação com acetona 3v (v/v) a frio

A clarificação do meio foi obtida precipitando-se as proteínas do meio de cultura (enzima solúvel obtida do filtrado) utilizando-se acetona a frio (1:3 v/v - solução de enzima: acetona). Após o período de 30 minutos, centrifugou-se o material a 7400g por 20 minutos a 4°C, sendo que o sobrenadante foi descartado e, inverteram-se os tubos para secagem de toda acetona. O precipitado obtido foi ressuspenso no menor volume possível de água destilada, e congelado para posteriormente ser utilizado para dosagens das atividades enzimáticas e proteínas.

5.9.2. Filtração em caulim

Ao filtrado de cultura (enzima solúvel) foi adicionado caulim (4g/100mL de meio), agitando-se cuidadosamente com uma bagueta. Em seguida levou-se para a geladeira por 30 minutos, sendo a seguir filtrado em papel de filtro com auxílio de uma bomba a vácuo, sendo o filtrado recolhido para dosagens de atividade enzimática e proteínas.

5.9.3. Filtração em terra diatomácea

Ao filtrado de cultura (enzima solúvel) foi adicionada terra diatomácea (4g/100mL de meio), agitando-se cuidadosamente com uma bagueta. Em seguida levou-se para a geladeira por 30 minutos, sendo a seguir filtrado em papel de filtro com auxílio de uma bomba a vácuo, sendo o filtrado recolhido para dosagens de atividade enzimática e proteínas.

5.9.4. Precipitação com Sulfato de Amônio

Ao filtrado de cultura (enzima solúvel) adicionou-se sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70%, e deixado em repouso por 12 horas na geladeira. Em seguida centrifugou-se a 7400g por 20 minutos a 4°C. Ressuspendeu-se o precipitado no menor volume possível de água e dialisou-se contra água por 12 horas, 2

trocas para retirar o excesso do sal sulfato de amônia que interfere na determinação de açúcares redutores e dosagem de proteína.

5.10. Determinação da atividade enzimática e de proteína

A determinação da atividade enzimática da enzima solúvel (enzima livre) ou derivados (enzima imobilizada) foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). As condições dos ensaios utilizadas para xilanase foi 0,54% de xilano como substrato, 4,9mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0 e 0,1mL da enzima, perfazendo um volume final de 5mL. Os ensaios foram conduzidos a 40°C, com agitação constante durante 60 minutos. O açúcar redutor xilose produzido na mistura foi estimado através da variação da densidade ótica em 540 nanômetros, conforme descrito por Miller (1959). Uma unidade enzimática (UI) para atividade da xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto ($\epsilon = 0,308 \mu\text{mol}^{-1} 0,25\text{mL cm}^{-1}$). A atividade específica foi definida através da relação entre o número de unidades por miligrama de proteína. A quantificação de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (1951), modificado por Hartree (1972), com absorvidade igual a 3,871 $\text{mg}^{-1} 0,5\text{mL cm}^{-1}$.

5.11. Determinação do pH ótimo de atividade da enzima xilanase do fungo FCUP1

A atividade enzimática em função do pH foi verificada, incubando a enzima com o substrato em seis sistemas tampões. Para o sistema 0,1M acetato-fosfato-Tris, o valor do pH variou de 3,0 a 9,0, sendo que para pH 3,0 a 5,0 utilizou-se tampão acetato de sódio; para pH 6,0 e 7,0 utilizou-se tampão fosfato de sódio e para pH 8,0 e 9,0 utilizou-se o tampão Tris-HCl. Após período de incubação de 20 minutos a 40°C, a reação foi interrompida com adição de DNS, e a reação foi desenvolvida por aquecimento do meio reacional em banho-maria de água fervente por 5 minutos. A densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro ($\lambda = 540\text{nm}$).

5.12. Determinação da temperatura ótima de atividade da enzima xilanase do fungo FCUP1

A determinação da temperatura ótima de hidrólise foi verificada incubando a enzima com o substrato em diferentes temperaturas, no intervalo de 25^oC a 90^oC. Os ensaios enzimáticos foram realizados em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 com agitação constante. A reação foi interrompida com adição de DNS e a coloração foi desenvolvida por aquecimento do meio reacional em banho de água fervente por 5 minutos. A densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro ($\lambda = 540\text{nm}$). A atividade específica foi definida como a quantidade de açúcar redutor produzido em velocidade inicial de 1 μmol por minuto e por mg de proteína.

5.13. Determinação da estabilidade térmica

Para determinar a estabilidade térmica da xilanase extracelular frente à temperatura utilizou-se o filtrado de cultivo que foram incubados a 25, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 80 e 90^oC por 40 minutos na ausência de substrato. As amostras foram retiradas incubadas em gelo por 5 minutos, sendo determinada a atividade residual em reação usando 0,54% (p/v) de xilano em tampão acetato de sódio 50mM (pH 5,0) a 60^oC com constante agitação. Nessas temperaturas foram estimadas as meias vidas através de curvas da porcentagem da atividade residual contra o tempo de incubação.

5.14. Determinação da estabilidade em pH

A metodologia utilizada para avaliar a estabilidade em diferentes pH foi incubar o filtrado de cultivo em diferentes valores de pH de 3,0, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0 utilizando-se tampão McIlvaine de 3,0 a 8,0 e tampão glicina-NaOH para 9,0. Após 40 minutos de incubação à temperatura ambiente, foi determinada a atividade xilanase residual em reação usando 0,54% (p/v) de xilano em tampão acetato de sódio 50mM (pH 5,0) a 60^oC com constante agitação.

5.15. Cromatografia em Sílica Gel P60

Produtos de hidrólise do xilano, formados na ação da xilanase, foram separados por cromatografia ascendente em camada fina usando sílica gel P60

no sistema acetato de etila/ ácido acético/ ácido fórmico/água (9:3:1:4), por volume. Como padrão foi utilizado xilose e xilobiose. A cromatografia foi revelada com orcinol 0,2% em ácido sulfúrico-metanol (1:9 v/v) (FONTANA et al., 1988). O aparecimento da cor azul se dá, após a permanência da placa por 5 minutos a 100°C.

5.16. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As amostras para a eletroforese foram preparadas adicionando-se igual volume de tampão de ruptura e das alíquotas da enzima produzida pelo fungo FCUP1 purificadas em acetona, caulim, terra diatomácea e sulfato de amônio.

A eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS foi realizada em placa Mini-VE, de acordo com método de Laemmli (1970), utilizando-se acrilamida a 12% conforme soluções descritas abaixo. O tempo de corrida foi de aproximadamente 30 minutos em 20 mA. O volume aplicado de cada uma das amostras foi de 27 µL para o extrato bruto (enzima solúvel), 20µL para a enzima purificada em acetona, caulim, terra diatomácea e sulfato de amônia e 4 µL de padrão. A polimerização da acrilamida se inicia com a adição de persulfato de amônio, e é acelerada pela adição de Temed. O composto utilizado para efetuar a dissociação é o detergente iônico SDS. A amostra é desnaturada por aquecimento a cerca de 100°C, durante três minutos, na presença de excesso de SDS e de reagente sulfidrílico (β-mercaptoetanol). E a técnica de coloração foi com prata segundo HEUKESHOVEN, J. e DERNICK, R., 1985. Na eletroforese utilizou-se como padrão um kit de massa molecular da Amersham Biosciences GE, constituído de fosforilase b (97 kDa); albumina do soro bovino (66 kDa); ovoalbumina (45 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e alfa-lactoalbumina (14,4 kDa).

5.17. Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$

A determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ da enzima foi realizado pela média aritmética entre os três procedimentos propostos por Lineweaver-Burk (1934), Eadie-Hofstee e Hanes-Woolf (1932), utilizando como substrato a xilana birchwood.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. Caracterização dos resíduos agrícolas utilizados como fontes de carbono para o crescimento de micro-organismos

Na caracterização dos resíduos agrícolas foram feitas as imagens dos para verificação das formas, tamanhos e densidade dos poros das estruturas dos resíduos agrícolas. A seguir na Figura 12 são apresentadas as fotos dos resíduos agrícolas em microscopia ótica objetiva 10x ($10 \times 100 = 1000$) e em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). O microscópio ótico demonstra detalhes da amostra, enquanto o microscópio eletrônico de varredura (MEV) tem como objetivo visualizar mais detalhes da amostra a ser analisada, o qual é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação (até 300.000 X) e resolução. Nele um feixe de elétrons é extremamente estreito é usado para varrer as amostras. O feixe tem vários efeitos sobre as amostras, dos quais o principal para nossa finalidade é que ele faz com que a própria amostra emita elétrons. A imagem é construída em sequência, no tempo, à medida que a amostra é varrida. Este tipo de microscópio tem importante papel na taxonomia de insetos e fungos, área de geologia, superfícies de diversas estruturas de plantas e animais, entre outras (GALLETI, 2003). A seguir são apresentadas as fotos das estruturas fibrosas dos resíduos agrícolas detalhadamente. Os procedimentos de preparação destes resíduos foram descritos detalhadamente no item 5.1.1 a 5.1.5. E também, foram empregados como fontes de carbono para o crescimento do fungo isolado da polpa do fruto cupuaçuzeiro em decomposição verificando a produção da xilanase, os quais os resultados serão discutidos nas tabelas de 2 a 9.

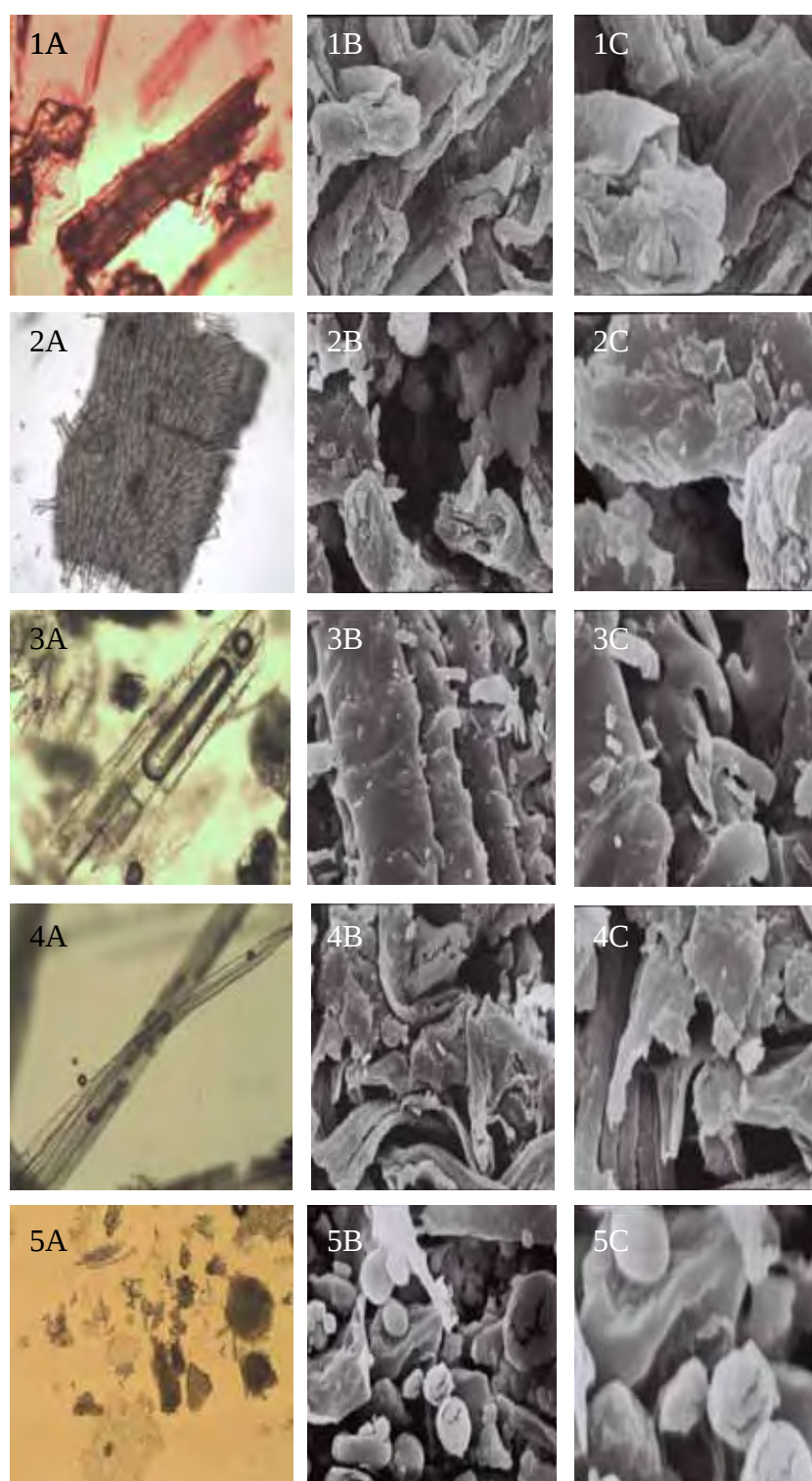


Figura 12. Imagens de microscopia dos resíduos agrícolas. (1) Bagaço de cana; (2) Tegumento das sementes de soja; (3) Sabugo de milho; (4) Escapo floral de bananeira; (5) Farelo de trigo. (A) Microscopia óptica – objetiva 10X; (B) Microscopia eletrônica de varredura – 2000X; (C) Microscopia eletrônica de varredura – 5000X.

6.2. Resíduos agrícolas estudados como suportes para aplicação em imobilização de enzimas

Os resíduos agrícolas foram também preparados para serem empregados como suportes na imobilização de enzimas, não sendo utilizado nesse trabalho, mas foram testados por outros alunos de mestrado e doutorado do Laboratório de Enzimologia, e conseguiu-se ligar covalentemente três enzimas diferentes, sendo a lacase, invertase e peroxidase em dois tipos destes resíduos. Também foi enviada amostra do resíduo sabugo de milho para Instituto de Catálise da Espanha, para que sejam feitos estudos sobre a determinação de números de hidroxilas presentes nestes resíduos com a finalidade de caracterizá-los para facilitar a ligação de seus grupamentos químicos aos grupamentos químicos das enzimas, tornando assim, um suporte de grande importância para área de imobilização de enzimas.

Os resultados de imobilização apresentado neste trabalho foi de testes preliminares da xilanase produzida por *Humicola grisea* var. *thermoidea* utilizando como suporte agarose-glioxil. Após a imobilização neste suporte realizou-se a cinética enzimática tendo como substrato a xilana e a enzima xilanase imobilizada. Durante o ensaio enzimático retirou-se alíquotas e aplicou-se em Cromatografia em Sílica Gel P60 (Figura 13) seguindo o método de Fontana et al. (1988). Com esse método foi possível identificar os produtos da hidrólise da xilana obtido com o derivado agarose-glioxil. Verificou-se em tempos de 60 a 120 minutos menor produção de xilooligossacarídeos (xilobiose, xilotriose, xilotetraose e xilopentose), enquanto em 1080 minutos maior produção desses produtos da hidrólise do xilano. Com estes resultados confirmamos a imobilização da xilanase de *Humicola grisea* var. *thermoidea* em glioxil-agarose, com manutenção da atividade.

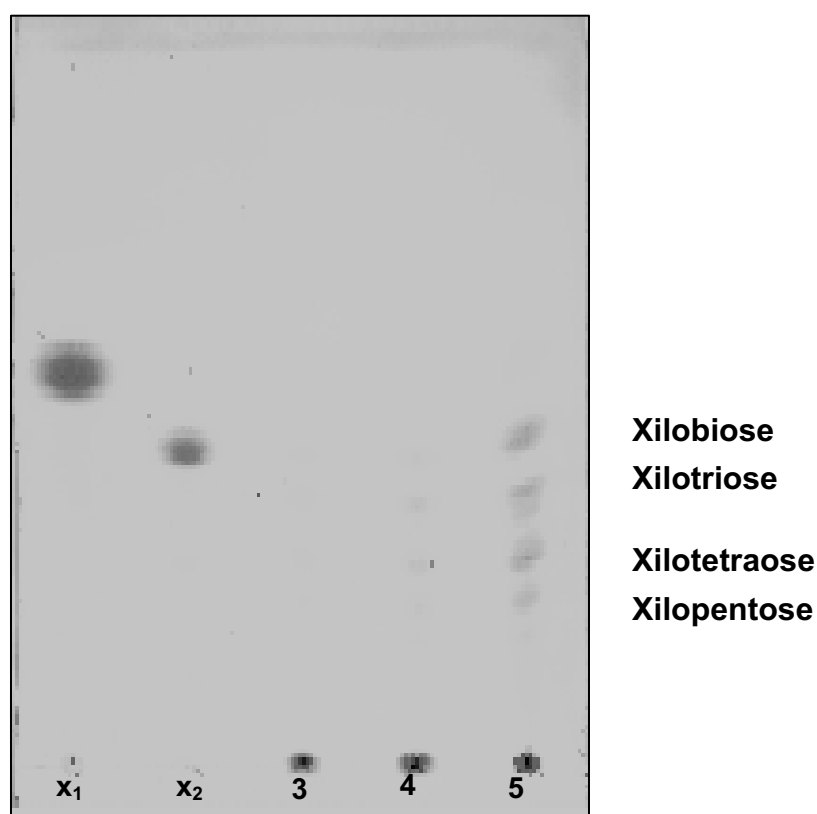


Figura 13. Cromatografia em Sílica Gel P60 do produto de hidrólise da xilana obtido com derivado glioxil-agarose em diferentes tempos em pH 5.0 a 40°C. O x_1 : xilose e x_2 : xilobiose são utilizados como padrões e 3 - 60 minutos; 4 – 120 minutos e 5 – 1080 minutos.

6.3. Produção e caracterização de xilanases

6.3.1. Isolamento e Identificação de novos fungos filamentosos

Neste trabalho de Doutorado foram isolados por Benedetti, três cepas de fungos filamentosos, a partir da polpa do fruto cupuaçuzeiro em decomposição. Destas três cepas, apenas o fungo com crescimento a 40°C teve suas hifas, raízes e corpo de frutificação fotografados em lâminas, identificados como FCUP1 (Figura 13), classificado parcialmente pelo Prof. Dr. Rubens Monti como pertencente ao gênero *Rhizomucor*, entretanto a classificação definitiva deste fungo isolado do fruto cupuaçuzeiro está sendo realizada pela Dra. Derlene Attili de Angelis do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro.



Figura 14. Imagem da microscopia óptica do corpo de frutificação do fungo filamentososo do FCUP1.

O primeiro fungo termófilo estudado foi *Mucor pusillus*, isolado do pão e descrito por Lindt em 1886 (SALAR e ANEJA, 2007a). Em 1978, por Schipper denominado de *Rhizomucor pusillus* (SALAR e ANEJA, 2007b).

Outro micro-organismo usado nesse trabalho foi o gênero *Humicola* que é pertencente à classe Deuteromicetos e a família Dematiaceae. Várias espécies deste gênero foram isolados na natureza e estudadas por Hayashida e Yoshioka, (1980); Mishra et al., (1981); Yoshioka et al., (1982); Maheshwari et al., (2000); Rajoka et al., (2005). Desse gênero destacamos a espécie *Humicola grisea* var. *thermoidea*, que é fungo termófilo, isolado do solo por Chaves (1982) e identificado de acordo com as características morfológicas de Cooney e Emerson (1964) e estudado por Monti (1989). Esse fungo produz diferentes enzimas carboidrases extracelulares que são encontradas na degradação do xilano, presentes na hemicelulose. A completa degradação do xilano requer ação cooperativa de várias enzimas hidrolíticas (sistema xilanolítico), os quais destacam-se as exoxilanases e endoxilanases. As atividades xilanolíticas do *Humicola grisea* foram investigadas, e consequentemente, foram descritas algumas propriedades de maior ou menor importância dessas atividades de xilanases extracelulares (MONTI et al., 1991). Neste trabalho foi observado que o tempo de incubação do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* é maior do que as três novas cepas isoladas (FCUP1, FCUP2, FCUP3). Conforme comentado anteriormente, esse trabalho focou em

conhecer algumas propriedades bioquímicas da xilanase produzida pelo fungo isolado FCUP1, fungo termófilo e de grande interesse para aplicação industrial.

6.3.2. Manutenção das linhagens

Conforme estudo realizado por Monti (1989), verificou-se que melhor meio estudado para obtenção de conídios para o fungo foi o meio desenvolvido no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, que contém 2% de agar e 4% de farinha de aveia em pó. Neste estudo, utilizou-se o mesmo meio, e as culturas foram mantidas a 40°C em tubos de ensaio com ágar inclinado. Após 4 e 7 dias para o FCUP1 e *Humicola grisea* var. *thermoidea*, respectivamente, foram estocadas em temperatura de 4°C até o momento de uso.

6.4. Produção de xilanase pelo fungo FCUP1 através de crescimento em culturas líquidas

6.4.1. Identificação do melhor meio, melhor fonte de carbono e melhor pH para o crescimento e produção de xilanase

Os resultados apresentados a seguir indicaram que o fungo FCUP1 secreta xilanase termoestável, quando crescido em diferentes fontes de carbono de baixo custo. As melhores atividades específicas dependem do meio de cultivo, fonte de carbono e pH inicial do cultivo. Fungos filamentosos descritos na literatura são hábeis para produzir diferentes enzimas em fermentações submersas. Nos últimos anos tem havido um esforço grande para o isolamento de fungos termófilos bons produtores de enzimas xilanolíticas (POLIZELI et al., 2005). Nas Tabelas 2 a 9 são apresentados os resultados obtidos com o fungo termófilo isolado e crescido em diferentes valores de pH e diferentes meio de cultivo (M4, M4 modificado), e tendo como fonte de carbono diferentes resíduos agrícolas (pó de sabugo de milho (SM), pó de bagaço de cana de açúcar (BC), pó de farelo de trigo (FT) e pó de tegumentos das sementes de soja (TSS)).

Os resultados da tabela 2 obtidos com o fungo termófilo isolado e crescido em diferentes valores iniciais de pH, tendo como fonte de carbono o pó de sabugo de milho indicam que as melhores atividades específicas foram obtidas

com 16 horas de cultivo, em pH inicial de 7.0 e 8.0 (0,170 e 0,174 U/mg proteína, respectivamente), utilizando o meio M4. Estudos feitos por Monti et al., 2003, comprovaram que a composição do meio e tipo de substrato tem grande influência na produção da enzima, e enquanto que Coelho e Carmona (2003), utilizando o sabugo de milho como fonte de carbono por *Aspergillus giganteus* CCT 3232 obteve valores elevados de atividade específica e Peixoto-Nogueira et al., (2009), trabalhando com *Aspergillus fumigatus* RP04 e *Aspergillus niveus* RP05 em meio de cultivo suplementado com diferentes fontes de carbono, concluíram que o pó de sabugo de milho foi o responsável pela maior produção de xilanase.

Tabela 2 – Produção de xilanase por FCUP1 em meio M4* em diferentes valores de pH, tempo de cultivo, utilizando como fonte de carbono o sabugo de milho a 40°C.

Experimentos	Tempo de cultivo (horas)	pH inicial – pH final	Prot (mg/mL)	UI (μmols/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
1	12	4,0 – 6,1	2,86	0,042	0,015
2	12	5,0 – 6,4	2,21	0,145	0,066
3	12	6,0 – 6,7	2,19	0,148	0,068
4	12	7,0 – 6,8	2,21	0,119	0,054
5	12	8,0 – 7,1	2,14	0,162	0,076
6	16	4,0 – 5,2	2,01	0,267	0,133
7	16	5,0 – 5,9	2,43	0,365	0,150
8	16	6,0 – 6,5	2,50	0,378	0,152
9	16	7,0 – 6,8	3,26	0,555	0,170
10	16	8,0 – 7,1	2,64	0,459	0,174

Os valores apresentados são as médias de três experimentos. *Composição do meio de cultivo M4: 0,1% CaCO₃, 0,5% NaCl; 0,25% gelatina, 0,5% água de maceração de milho. Fonte de carbono: 1% pó sabugo de milho.

Os resultados apresentados na Tabela 3 indicam que atividade xilanolítica em pH 4 com 12 horas foi de 0,041 (U/mg proteína) e nos valores de pH 4 e 5 com 16 horas foi de 0,028 e 0,029 (U/mg proteína) utilizando o meio de cultivo M4 com bagaço de cana como fonte de carbono. Observou-se

que o bagaço de cana indicou menor produção de xilanases, quando comparado com a Tabela 2.

Tabela 3 - Produção de xilanase por FCUP1 em meio M4* em diferentes valores de pH, tempo de cultivo, utilizando como fonte de carbono o bagaço de cana a 40°C

Experimentos	Tempo de cultivo (horas)	pH inicial – pH final	Proteína (mg/mL)	UI (μmols/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
1	12	4,0 - 6,2	1,40	0,057	0,041
2	12	5,0 - 7,3	2,27	0,010	0,005
3	12	6,0 - 7,6	2,27	0,007	0,003
4	12	7,0 - 7,4	2,48	0,007	0,003
5	12	8,0 - 8,0	2,37	0,015	0,006
6	16	4,0 - 5,7	1,77	0,049	0,028
7	16	5,0 - 6,5	2,17	0,063	0,029
8	16	6,0 - 7,4	2,31	0,032	0,014
9	16	7,0 - 7,3	2,66	0,058	0,022
10	16	8,0 - 7,6	2,01	0,022	0,011

Os valores apresentados são as médias de três experimentos. *Composição do meio de cultivo M4: 0,1% CaCO₃, 0,5% NaCl, 0,25% gelatina, 0,5% água de maceração de milho. Fonte de carbono: 1% bagaço de cana.

Segundo Isil e Nilufer (2005), o resíduo agrícola (biomassa do bagaço de cana) é material fibroso resultante da extração do suco da cana de açúcar que contem diferentes frações de celulose, hemicelulose e lignina. Esses autores relatam que para utilizar essa fonte é necessário aplicação de outro micro-organismo capaz de produzir outras enzimas que auxiliam na hidrólise dessa biomassa. A biomassa (materiais lignocelulósicos) está difundida na natureza e o xilano é um polissacarídeo encontrado na fração hemicelulósica da lignocelulose. Segundo Khandeparker e Numan (2008), a estrutura química da lignocelulose força os micro-organismos a desenvolverem muitas enzimas que auxiliam a quebra dessa fração, e alguns micro-organismos facilitam a biodegradação desses resíduos agrícolas. Isso é o complexo de enzimas formados na forma bifuncional ou multifuncional. Em trabalho semelhante

obteve-se valores de atividades xilanolíticas maior de *Streptomyces cyaneus* SN32 (NINAWA E KUHAD, 2005). Então, concluiu-se que o bagaço de cana é um material lignocelulósico, de fácil obtenção, que será mais bem estudado para que possa ser aproveitado como fonte de carbono para o crescimento de vários micro-organismos.

Na Tabela 4, o meio de cultivo utilizado é igual das tabelas anteriores, mudando somente a fonte de carbono para farelo de trigo. Observou-se que o pH 5,0 para 16h de crescimento apresentou melhor atividade xilanolítica de 0,083 U/mg proteína, em relação aos demais pH. Podemos observar que atividade presente no extrato cru e determinada foi também obtida com *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niveus* (PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2009) e *Paecilomyces thermophila* J18 (YANG et al., 2006) e *Streptomyces cyaneus* SN32 (NINAWA E KUHAD, 2005).

Tabela 4 - Produção de xilanase por FCUP1 em meio M4* em diferentes valores de pH, tempo de cultivo, utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo a 40°C

Experimentos	Tempo de cultivo (horas)	pH inicial – pH final	Proteína (mg/mL)	UI (μmols/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
1	12	4,0 - 4,8	2,41	0,017	0,007
2	12	5,0 - 6,2	2,05	0,028	0,014
3	12	6,0 – 6,6	2,25	0,004	0,002
4	12	7,0 – 7,1	2,20	0,010	0,004
5	12	8,0 – 7,2	2,21	0,015	0,007
6	16	4,0 – 4,6	2,04	0,130	0,064
7	16	5,0 – 6,0	2,29	0,191	0,083
8	16	6,0 – 6,7	2,53	0,082	0,034
9	16	7,0 – 6,9	2,65	0,137	0,052
10	16	8,0 – 6,7	2,70	0,154	0,057

Os valores apresentados são as médias de três experimentos. *Composição do meio de cultivo M4: 0,1% CaCO₃, 0,5% NaCl, 0,25% gelatina, 0,5% água de maceração de milho. Fonte de carbono: 1% farelo de trigo

Na Tabela 5 são apresentados os resultados de produção da atividade xilanolítica em meio de cultivo M4 com pó de tegumentos das sementes de

soja. Neste meio em pH inicial 6,0 em 16 horas conseguiu-se atividade específica igual 0,036 (U/mg proteína). O trabalho desenvolvido por Bakir et al., 2001, relata que produção de xilanase por *Rhizopus oryzae*, foi melhor quando acrescentou ao meio 3% de espiga de milho (fonte de carbono) e 1% de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (fonte de nitrogênio), 0,5% cloreto de sódio (NaCl) e 1% de tegumento da soja. Este relato foi confirmado ao verificar os resultados da Tabela 9 da produção xilanase aumentou 86% em meio M4 modificado (0,1% CaCO_3 ; 0,5% NaCl; 0,1% NH_4Cl ; 0,5% água de maceração de milho; 1% pó de tegumentos das sementes de soja).

Tabela 5 - Produção de xilanase por FCUP1 em meio M4* em diferentes valores de pH, tempo de cultivo, utilizando como fonte de carbono os tegumentos das sementes de soja a 40°C

Experimentos	Tempo de cultivo (horas)	pH inicial - pH final	Proteína (mg/mL)	UI ($\mu\text{mols/mL}$)	Atividade Específica (U/mg proteína)
1	12	4,0 – 5,2	1,76	0,010	0,006
2	12	5,0 – 6,3	1,89	0,017	0,009
3	12	6,0 – 6,8	3,41	0,018	0,005
4	12	7,0 – 7,1	2,65	0,019	0,007
5	12	8,0 – 7,1	2,40	0,015	0,006
6	16	4,0 – 5,3	1,85	0,037	0,020
7	16	5,0 – 5,9	2,06	0,036	0,017
8	16	6,0 – 6,1	1,93	0,068	0,036
9	16	7,0 – 8,0	2,24	0,016	0,007
10	16	8,0 – 6,7	2,04	0,040	0,019

Os valores apresentados são as médias de três experimentos. *Composição do meio de cultivo M4: 0,1% CaCO_3 , 0,5% NaCl, 0,25% gelatina, 0,5% água de maceração de milho. Fonte de carbono: 1% pó tegumentos das sementes de soja.

Novos experimentos foram realizados e são apresentados os resultados de produção e atividade xilanolítica em meio M4 modificado, onde a gelatina foi substituída por cloreto de amônio. Pode-se observar na Tabela 6, que houve aumento de duas vezes na atividade específica, em 16 horas de cultivo e pH inicial igual a 8,0, usando como fonte o pó de sabugo de milho (0,362 (U/mg proteína). A atividade específica presente no extrato bruto e determinada neste

trabalho é idêntica à obtida de *Rhizopus stolonifer* (GOULART et al., 2005) e apresenta níveis próximos da xilanase de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, quando crescido na mesma fonte de carbono (resultados não apresentados).

Tabela 6 - Produção de xilanase por FCUP1 no meio M4 modificado* em diferentes valores de pH, tempo de cultivo, utilizando como fonte de carbono o sabugo de milho a 40°C.

Experimentos	Tempo de cultivo (horas)	pH inicial - pH final	Proteína (mg/mL)	UI (μmols/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
1	12	4,0 – 6,3	1,32	0,062	0,047
2	12	5,0 – 6,7	1,14	0,074	0,065
3	12	6,0 – 8,1	0,94	0,018	0,019
4	12	7,0 – 7,2	0,41	0,091	0,223
5	12	8,0 – 7,5	0,39	0,096	0,243
6	16	4,0 - 6,0	0,99	0,300	0,303
7	16	5,0- 6,3	0,97	0,297	0,305
8	16	6,0 - 6,6	1,19	0,295	0,246
9	16	7,0 - 7,2	1,40	0,434	0,309
10	16	8,0 - 7,5	1,36	0,493	0,362

Os valores apresentados são as médias de três experimentos. *Composição do meio de cultivo M4 modificado: 0,1% CaCO₃, 0,5% NaCl, 0,1% NH₄Cl, 0,5% água de maceração de milho. Fonte de carbono: 1% pó sabugo de milho.

Os resultados apresentados na Tabela 7 com o meio M4 modificado, observou-se um aumento 3,6 vezes na atividade específica, em 16 horas de cultivo e pH inicial igual a 5,0 usando o pó de bagaço de cana como fonte de carbono (0,106 U/mg proteína). Pesquisa semelhante foi realizada com *Aspergillus fumigatus* RP04 e *Aspergillus niveus* em meio líquido a 40°C testando como fonte de carbono bagaço de cana de açúcar (PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2009).

Tabela 7 - Produção de xilanase por FCUP1 no meio M4 modificado* em diferentes valores de pH, tempo de cultivo, utilizando como fonte de carbono o bagaço de cana a 40°C

Experimentos	Tempo de cultivo (horas)	pH inicial - pH final	Proteína (mg/mL)	UI (μmols/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
1	12	4,0 - 6,7	0,74	0,018	0,024
2	12	5,0 - 7,1	0,72	0,004	0,005
3	12	6,0 - 7,6	0,68	0,009	0,014
4	12	7,0 - 7,6	0,68	0,012	0,017
5	12	8,0 - 7,8	0,66	0,016	0,024
6	16	4,0 - 7,1	0,58	0,037	0,065
7	16	5,0 - 6,8	0,60	0,064	0,106
8	16	6,0 - 7,3	0,65	0,060	0,093
9	16	7,0 - 7,5	0,60	0,031	0,052
10	16	8,0 - 8,0	0,68	0,014	0,021

Os valores apresentados são as médias de três experimentos. *Composição do meio de cultivo M4 modificado: 0,1% CaCO₃, 0,5% NaCl, 0,1% NH₄Cl, 0,5% água de maceração de milho. Fonte de carbono: 1% bagaço de cana

Na Tabela 8 utilizou-se o meio M4 modificado e a fonte de carbono pó de farelo de trigo. Identificou-se que a atividade xilanolítica no tempo de cultivo de 16 hs em pH 5,0 de 0,179 (U/mg proteína), pH 6,0 de 0,246 (U/mg proteína) e em pH 8,0 de 0,302 (U/mg proteína) apresentaram valores diferenciados devido as variações de pH. Outros experimentos semelhantes foram realizados com a mesma fonte de carbono (farelo de trigo) e a atividade xilanolítica foi obtida de *Humicola grisea* var. *thermoidea* (MANDALARI et al., 2008), de *Talaromyces thermophilus* (MAALEJ et al., 2008) em fermentação submersa.

Tabela 8 - Produção de xilanase por FCUP1 no meio M4 modificado* em diferentes valores de pH, tempo de cultivo, utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo a 40°C

Experimentos	Tempo de cultivo (horas)	pH inicial - pH final	Proteína (mg/mL)	UI (μmols/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
1	12	4,0 - 5,0	1,29	0,024	0,019
2	12	5,0 - 6,4	1,51	0,068	0,045
3	12	6,0 - 6,7	1,54	0,092	0,059
4	12	7,0 - 5,7	1,35	0,042	0,031
5	12	8,0 - 6,3	1,38	0,042	0,030
6	16	4,0 - 4,2	0,99	0,131	0,132
7	16	5,0 - 5,7	1,36	0,244	0,179
8	16	6,0 - 5,9	1,22	0,300	0,246
9	16	7,0 - 4,8	1,09	0,226	0,206
10	16	8,0 - 5,3	1,00	0,303	0,302

Os valores apresentados são as médias de três experimentos. *Composição do meio de cultivo M4 modificado: 0,1% CaCO₃, 0,5% NaCl, 0,1% NH₄Cl, 0,5% água de maceração de milho. Fonte de carbono: 1% pó farelo de trigo.

Os resultados apresentados na Tabela 9 utilizaram-se também o meio M4 modificado e a fonte de carbono o pó de tegumentos das sementes de soja com 16 horas de cultivo as melhores atividades específicas foram 0,083 (U/mg proteína) em pH 5,0 e 0,096 (U/mg proteína) em pH 8,0. Observou-se que os valores determinados em relação aos diferentes valores de pH não foram discrepantes, sendo essencial primeiramente aumentar o tempo de cultivo e/ou melhorar a composição do meio acrescentando conjuntamente ao tegumentos das sementes de soja outras fontes carbono e nitrogênio para verificar a produção de xilanase pelo FCUP1. Verificou-se em relação ao meio M4 as atividades específicas foram melhores. Por isso, Sudan e Bajaj (2007) explicam que o mecanismo que comanda a formação das enzimas extracelulares são influenciadas pela disponibilidade de precursores para síntese de proteína. Além disso, a fonte de nitrogênio pode significativamente afetar o pH do meio durante a fermentação, sucessivamente influenciar a atividade enzimática. Já Bahdan et al., (2004) empregou sulfato de amônio e acetato de amônio no

meio de produção para obter atividade máxima de xilanase por *Myceliophthora* sp. Isso vem confirmar o que foi pesquisado por Polizeli et al., (2005) que as melhores atividades dependem do meio de cultivo, fonte de carbono e pH inicial do cultivo.

Tabela 9 - Produção de xilanase por FCUP1 no meio M4 modificado* em diferentes valores de pH, tempo de cultivo, utilizando como fonte de carbono os tegumentos das sementes de soja a 40°C

Experimentos	Tempo de cultivo (horas)	pH inicial – pH final	Proteína (mg/mL)	UI (μmols/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
1	12	4,0 – 5,9	1,43	0,018	0,012
2	12	5,0 – 6,3	1,19	0,023	0,019
3	12	6,0 – 6,8	1,49	0,022	0,015
4	12	7,0 – 6,2	1,48	0,029	0,020
5	12	8,0 – 6,1	1,25	0,049	0,039
6	16	4,0 – 4,8	ND**	0,075	ND**
7	16	5,0 – 5,3	1,10	0,091	0,083
8	16	6,0 – 4,9	0,99	0,066	0,067
9	16	7,0 – 4,6	0,71	0,058	0,081
10	16	8,0 – 4,4	0,78	0,075	0,096

Os valores apresentados são as médias de três experimentos. *Composição do meio de cultivo M4 modificado: 0,1% CaCO₃, 0,5% NaCl, 0,1% NH₄Cl, 0,5% água de maceração de milho. Fonte de carbono: 1% pó tegumentos das sementes de soja. **Não determinado.

Concluiu-se com estes resultados que alguns fatores como tempo de cultivo, temperatura, composição do meio e fonte de carbono influenciaram a produção xilanolítica pelo fungo FCUP1. Além destes, na literatura são estudados outros como, a variação no tamanho da partícula da fonte de carbono que é fornecida ao ataque de vários fungos que altera o metabolismo microbiano, e conseqüentemente, altera atividade enzimática (SURVANA LAXMI et al., 2008) e a presença dos materiais lignocelulósicos nos resíduos agrícolas (farelo de trigo, bagaço de cana, sabugo de milho, tegumento de soja), que possuem celulose, hemicelulose e lignina que variam em composição e proporção entre as plantas. (SANCHEZ, 2009).

6.4.2. Precipitação da enzima solúvel do meio M4 e M4 modificado

Baseado nos resultados apresentados nas Tabelas 2 a 9, foi feita a precipitação da enzima solúvel produzida somente nos meios com sabugo de milho (pH 4 e 8), e farelo de trigo (pH 5 e 8), já que ambos apresentaram boa atividade específica, para meios de cultivos M4 e M4 modificado.

Os resultados apresentados na Tabela 10 e 11 mostram o efeito da precipitação (purificação parcial) em acetona da enzima solúvel produzida pelo fungo FCUP1. Para se obter uma proteína (enzima) pura utilizam-se alguns métodos de separação por diferença de solubilidade. Segundo Boyer (1993), os agentes frequentemente usados para precipitação de proteína são os sais inorgânicos (exemplo o sulfato de amônio), os solventes orgânicos (metanol, etanol e acetona), polietileno glicol, pH e temperatura. Ele explica que os solventes orgânicos funcionam como agentes precipitantes de duas formas, uma é desidratando a proteína e a outra diminuindo a constante dielétrica da solução. Assim, como as enzimas são proteínas solúveis em soluções aquosas, o uso da acetona provocou o rompimento da interação proteína-água diminuindo assim sua solubilidade, conseqüentemente, aumentando a interação proteína-proteína (concentração da proteína ao meio) e dos valores da determinação das atividades enzimáticas (U/mg prot) e de proteínas (mg/mL) conforme apresentado nas tabelas abaixo.

Tabela 10 – Efeitos da precipitação em acetona a frio usando o meio M4*

pH inicial	Fonte de carbono (1%)	Proteína (mg/mL)	UI (μ mols/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
4	SM	10,29	12,45	1,21
8	SM	10,66	18,04	1,69
5	FT	14,22	7,12	0,501
8	FT	13,31	4,23	0,317

Os valores apresentados são as médias de três experimentos. *Composição do meio de cultivo M4: 0,1% CaCO_3 ; 0,5% NaCl; 0,25% gelatina; 0,5% água de maceração de milho. Fonte de carbono: 1% pó sabugo de milho (SM) ou 1% de farelo de trigo (FT)

Tabela 11 – Efeitos da precipitação em acetona a frio usando o meio M4 modificado*

pH inicial	Fonte de carbono (1%)	Proteína (mg/mL)	UI (μ mols/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
4	SM	2,63	13,06	4,96
8	SM	2,72	15,78	5,80
5	FT	6,40	13,20	2,06
8	FT	3,73	13,77	3,68

Os valores apresentados são as médias de três experimentos. *Composição do meio de cultivo M4 modificado: 0,1% CaCO_3 ; 0,5% NaCl; 0,1% NH_4Cl ; 0,5% água de maceração de milho. Fonte de carbono:; 1% pó sabugo de milho (SM) ou 1% de farelo de trigo (FT)

Outros métodos de separação de proteína serão explicados conforme o seu emprego no experimento. E para que tenha purificação completa é necessário o emprego de outros métodos como cromatografia por troca iônica, adsorção, filtração em gel, por afinidade, eletroforese de gel (KOOLMAN E RÖHM, 2005).

Concluiu-se que o método de precipitação empregado nas Tabelas 10 e 11 foi eficaz devido a retirada das impurezas presentes no extrato não purificado, mas para conseguir uma melhor purificação dessas enzimas foi necessário empregar outros processos de clarificação como, caulim, terra de diatomácea, sulfato de amônia, conforme descritos no item 5.9 desse trabalho.

6.4.3. Influência das diferentes fontes de açúcares sobre a produção de xilanase extracelular pelo fungo FCUP1

Os resultados das Tabelas 12 e 13 apresentam o efeito das diferentes fontes de açúcares usando xilano birchwood como substrato para produção de xilanase extracelular pelo fungo FCUP1. Verificou-se que o fungo crescido na fonte de carbono 1% xilana, obteve as melhores atividades xilanolíticas de 0,077 e 0,131 U/mg proteína nos meios de cultivo M4 e M4 modificado, respectivamente. Avicel não foi boa fonte de carbono para produção de xilanase, sendo também relatado por Carmona e colaboradores (1997). Kulkarni et al. (1999), relata que a produção eficiente das enzimas xilanolíticas depende do substrato escolhido e da composição do meio. Geralmente, os micro-organismos durante o crescimento, em meio de cultivo com substratos

que contem xilana, induzem a produção de xilanases (PURKARTHOFER e STEINER, 1995). Essa condição foi comprovada nos valores obtidos da produção xilanase como fonte de carbono nos diferentes meio de cultivo. E podemos concluir que o cloreto de amônio, constituinte do meio de cultivo M4 modificado foi também bom indutor de produção de xilanase.

Tabela 12 - Produção de xilanase extracelular pelo fungo FCUP1 em diferentes carboidratos usando meio M4*, pH 7, 40°C por 16hs

Fontes de Carbono 1%	pH final	V(mL)	Proteína (mg/mL)	UI (μ mols/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
Glicose	3,9	25	2,31	0,037	0,016
Frutose	4,4	25	3,38	0,033	0,010
Sacarose	3,9	27	2,79	0,021	0,007
Maltose	3,7	26	2,40	0,004	0,002
Xilana	7,4	24	2,64	0,204	0,077
Amido	3,1	25	2,38	0,022	0,009
Avicel	7,0	26	2,41	0,007	0,003

Os valores apresentados são as médias de três experimentos. *Composição do meio de cultivo M4: 0,1% CaCO_3 ; 0,5% NaCl; 0,25% gelatina; 0,5% água de maceração de milho.

Tabela 13 - Produção de xilanase extracelular pelo fungo FCUP1 em diferentes carboidratos usando meio M4 modificado*, pH 7, 40°C por 16hs

Fontes de Carbono 1%	pH final	V(mL)	Proteína (mg/mL)	UI (μ mols/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
Glicose	4,2	27	0,79	0,031	0,038
Frutose	3,9	27	1,20	0,041	0,034
Sacarose	4,4	24	0,89	0,021	0,024
Maltose	4,4	27	0,82	0,012	0,015
Xilana	6,9	24	1,22	0,160	0,131
Amido	3,9	27	0,84	0,028	0,033
Avicel	7,5	25	0,86	0,006	0,007

Os valores apresentados são as médias de três experimentos. *Composição do meio de cultivo M4 modificado: 0,1% CaCO_3 ; 0,5% NaCl; 0,1% NH_4Cl ; 0,5% água de maceração de milho.

6.4.4. Indução e repressão da síntese de xilanase

Foram feitos vários testes experimentais. Verificou-se que o meio M4 modificado apresentou melhor eficiência na produção de xilanase, logo optou-se em adotar este meio para verificar a indução e repressão da síntese de xilanase.

Para estabelecer o efeito da fonte de carbono na produção de xilanase, o fungo isolado FCUP1 foi crescido em meio M4 modificado, contendo diferentes fontes de carbono e em meio sem fonte de carbono, por 18 horas (Tabela 14). Os resultados apresentados nesta tabela mostram que a glicose atuou como repressor de síntese das xilanases neste micro-organismo. Obteve-se 100% de inibição da produção das enzimas quando foi utilizada 1% de xilana e 2% de glicose no meio de cultivo. Os resultados mostram também que em presença de glicose o pH final do meio de cultivo, por 18 horas, é levemente acidificado, com valores de pH entre 4,2 – 5,3. Entretanto, a presença de xilose no cultivo não reprimiu a síntese das xilanases. Quando se utilizou 1% deste açúcar, a atividade específica obtida foi de 94% comparada com a obtida no crescimento com xilana e na presença de xilana 1% com xilose 0.5% houve um aumento entre 5% na atividade xilanolítica. Esses resultados mostram que o micro-organismo possui diferentes mecanismos de indução enzimática, comparando-se com os estudos de regulação realizados por Rizzatti et al., 2008, com *Aspergillus phoenicis*, mostrando redução nos níveis enzimáticos quando glicose foi adicionada a xilana ou xilose. Segundo estes mesmos autores, os mecanismos de repressão por carbono não envolve somente a proteína CREA, mas também o AMP cíclico, que estão relacionados com a regulação da transcrição de xilanase.

Tabela 14 - Atividade xilanolítica em filtrado de cultura pelo fungo FCUP1 em diferentes fontes de carbono a 40°C.

Fonte de carbono	pH Final	Atividade		Atividade Específica de Xilanase (U/mg proteína)	Ativação (+)/ Inibição (-)
		Proteína (mg/mL)	de Xilanase (U/mL)		
Ausência	6,6	1,07	0	0	-100%
Xilana 1%	7,4	0,698	0,388	0,556	0
Xilana 1% + glicose 0.5%	6,6	0,714	0,368	0,515	-7.4%
Xilana 1% + glicose 1%	4,6	0,658	0,063	0,096	-82.7%
Xilana 1% + glicose 2%	5,3	0,970	0	0	-100%
Glicose 1%	4,2	0,594	0,025	0,042	-92.4%
Xilose 1%	6,9	1,090	0,574	0,527	-6%
Xilana 1% + xilose 0.5%	7,0	0,940	0,550	0,585	+5.2%
Xilana 1% + xilose 1%	6,1	1,173	0,672	0,573	+3.1%
Xilana 1% + xilose 2%	6,7	1,710	0,294	0,172	-30.9%

Os valores apresentados são as médias de três experimentos. *Composição do meio de cultivo M4 modificado: 0.1% CaCO₃, 0.5% NaCl, 0.1% NH₄Cl, 0.5% água de maceração de milho. pH inicial 6.0.

6.5. Meio semi-sólido

Tendo o objetivo de conhecer melhor a produção de xilanase pelo fungo isolado de fruto em decomposição (FCUP1) foi realizado teste de fermentação em estado sólido. O termo fermentação em estado sólido, ou fermentação semi-sólida, ou fermentação em meio semi-sólido aplica-se ao processo de crescimento de micro-organismos sobre substratos sólidos sem presença de água livre. Água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (PINTO et al., 2005).

O interesse por este tipo de fermentação é devido a forma simples e próxima ao modo de vida natural de muitos micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentos (COUTO e SANROMÁN, 2006). Esses últimos são mais adaptáveis ao tipo de processo, pois são capazes de crescerem com pouca água e muitos sólidos presentes, e também a sua forma de crescimento por meio de hifas, favorecendo a colonização do meio (DURAND, 2003).

É conhecido que as variáveis essenciais para produção de distintas enzimas são as composições do meio de cultivo, sistema de cultivo, temperatura, pH, tempo de cultivo e fonte de carbono. Além disso, a escolha do substrato indutor adequado é um importante fator para otimização da produção de xilanase (HALTRICH, 1996; KULKARNI et al., 1999). O fungo FCUP1 foi crescido em fonte de carbono umedecido em 5mL de água de torneira ou 5mL de água de maceração de milho de forma estacionária em estufa a 40°C, por seis dias em meio semi-sólido contendo 1% (m/v) de diferentes fontes de carbono procedentes de resíduos agroindustriais e resíduos agrícolas disponíveis na região de Araraquara e Avaré. Esses resíduos (fontes de carbono) podem ser utilizados por micro-organismos xilanolíticos, por serem encontradas em grandes quantidades e apresentarem baixo custo. Estas fontes foram testadas com a finalidade de verificar sua eficiência na indução da atividade xilanase. Dentre os diferentes cultivos das Tabelas 15 e 16, foram observados em tegumento de soja, farelo de trigo, sabugo de milho e bagaço de cana em meio semi-sólido em água de torneira apresentaram valores de atividades cerca de 6 vezes, 3 vezes, 2,5 vezes e 1,8 vezes, respectivamente, maiores do que as atividades xilanolíticas do meio em água de maceração de milho. Então foi observado que o tegumento de soja não somente foi consumida pelo fungo como fonte de carbono, mas também como fonte de nitrogênio. O mesmo ocorreu no trabalho desenvolvido por Survana Laxmi et al. (2008), que usou a farinha de soja como fonte de nitrogênio para o *Aspergillus* sp RSP-6. Também com *Aspergillus tamaraii* que produziu xilanase em diferentes fontes de carbono como sabugo de milho, farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar (FERREIRA et al., 1999)

Na Tabela 16, quanto à composição da água de maceração de milho, um subproduto rico em carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fosfato (RIVAS et al., 2004) juntamente com as fontes de carbono, que possuem celulose, hemicelulose e lignina, tornaram-se um meio trabalhoso de ser hidrolisado pelo Fungo FCUP1, obtendo assim, valores menores de produção de xilanase. Esses valores podem ser alterados, aumentando seu tempo de cultivo, temperatura, pH e testar novas quantidades (%) de fontes de carbono ao meio.

Tabela 15 - Produção de xilanase utilizando meio semi-sólido com diferentes fontes de carbono e água de torneira*, por 6 dias a 35°C.

Fontes de Carbono 1%	pH final	V(mL)	Prot (mg/mL)	Atividade de Xilanase (U/mL)	Atividade Específica de Xilanase (U/mg proteína)
Tegumento de soja	4,8	39	2,14	0,325	0,152
Farelo de trigo	6,7	45	2,34	0,336	0,144
Sabugo de milho	3,2	60	1,36	0,188	0,139
Bagaço de cana	4,5	54	0,58	0,055	0,094

*Condições: 2,5g de tegumento de soja, farelo de trigo, sabugo de milho ou bagaço de cana e 5mL de água de torneira e H₂O destilada qs (quantidade suficiente para umedecer os meios).

Tabela 16 - Produção de xilanase utilizando meio semi-sólido com diferentes fontes de carbono e água de maceração de milho*, por 6 dias a 35°C.

Fontes de Carbono 1%	pH final	V(mL)	Prot (mg/mL)	Atividade de Xilanase (U/mL)	Atividade Específica de Xilanase (U/mg proteína)
Tegumento de soja	4,6	41	10,56	0,288	0,027
Farelo de trigo	5,9	46	7,28	0,322	0,044
Sabugo de milho	5,8	53	7,30	0,404	0,055
Bagaço de cana	6,0	52	6,52	0,331	0,051

*Condições: 2,5g de tegumento de soja, farelo de trigo, sabugo de milho ou bagaço de cana e 5mL de água de maceração de milho e H₂O destilada qs (quantidade suficiente para umedecer os meios).

Em seguida procurou-se verificar a presença das enzimas amilase, protease e celulase para o sobrenadante (enzima solúvel) produzida nos meios de fermentação submersa (M4 e M4 modificado) com sabugo de milho e tegumento de soja, como fontes de carbono, não foi observado atividade enzimática para essas enzimas, enquanto no meio de fermentação semi-sólido, verificou-se a presença das enzimas amilase e protease produzida nos meios com tegumento de soja e água de torneira ou água de maceração de milho. Foi observado a presença da enzima amilase somente no meio com tegumento de

soja e água de maceração de milho; já para a enzima protease o teste foi negativo para ambos os meios (dados não mostrados).

Outra série de experimentos utilizando o meio semi-sólido foi realizada, na qual o fungo FCUP1 cresceu em presença de avicel, e então se dosou a atividade para celulase (avicelase) e xilanase. Os resultados mostraram que o filtrato do cultivo não apresentou atividade considerável para a enzima celulase (avicelase), e a atividade para a enzima xilanase não foi favorecida pela presença de avicel, mas pela fonte de carbono farelo de trigo e água de torneira, conforme Tabela 17, logo foi possível confirmar, juntamente com os resultados da tabela 15, que a água de torneira foi melhor na produção de xilanase pelo fungo do fruto em decomposição. Verificou-se que nesse cultivo não foram detectados valores de atividades celulolíticas nas condições de ensaio. Esse fato mostra que o fungo FCUP1 é bom produtor de xilanase, mas não de celulase, indicando que o extrato bruto pode ter aplicações em situações nas quais as atividades celulolíticas são indesejáveis.

Tabela 17- Produção de xilanase pelo fungo FCUP1 utilizando meio semi-sólido utilizando Avicel*, por 6 dias a 37°C.

Fontes de Carbono 1%	pH final	V(mL)	Prot (mg/mL)	Atividade de Xilanase (U/mL)	Atividade Específica de Xilanase (U/mg proteína)
Avicel + H₂O Milho	4,1	30	25,02	0,037	0,002
Avicel + Farelo					
trigo+ H₂O	5,2	35	0,83	0,443	0,536
torneira					
Avicel + Farelo					
trigo+ H₂O Milho	4,1	30	28,80	0,067	0,002

*Condições: 2,5g de avicel em 7mL de H₂O milho; 1,25g de avicel + 1,25g de farelo de trigo + 7mL de H₂O torneira; 1,25g de avicel + 1,25g de farelo de trigo + 7mL de H₂O milho, e H₂O destilada qs (quantidade suficiente para umedecer os meios).

6.6. Clarificação do meio

As proteínas para serem purificadas precisam passar por alguns métodos que as purifiquem e as caracterizem para serem aplicadas em pesquisas e áreas da medicina e biotecnologia (LEHNINGER, 1991).

Nesse trabalho, foi feita uma purificação parcial para diminuir os interferentes nas dosagens de proteína e atividade específica xilanolítica, os filtrados de cultivo com meio M4 modificado foram submetidos a diferentes tratamentos: filtração em caulim e em terra diatomácea, precipitação com acetona e com sulfato de amônio.

O tratamento em sulfato de amônio, que é um sal inorgânico e o mais empregado, pois é altamente solúvel em água, reduz assim a água disponível que interage com as proteínas (BOYER, 1993). A solubilidade das proteínas depende da concentração de sais (forças iônica) do meio. As proteínas em geral se solubilizam mal em água. Com as forças iônicas crescentes aumenta sua solubilidade, pois mais e mais íons inorgânicos bem-hidratados ligam-se à superfície da proteína, impedindo a agregação das moléculas ("salinização"). Em forças iônicas muito altas, o sal desidrata as proteínas e leva à agregação e à precipitação das moléculas ("dessalinização"). Por isso, pode-se separar as proteínas de uma mistura por sua solubilidade adicionando sulfato de amônio (KOOLMAN e RÖHM, 2005). Após esse tratamento emprega-se a diálise para remover sais que interferem na purificação e caracterização das proteínas (BOYER, 1993). A diálise é um processo onde as proteínas são separadas das substâncias de baixo peso molecular. As moléculas grandes ficam retidas dentro das membranas com poros ultramicroscópicos. Assim, as moléculas pequenas, como os sais, atravessam os poros destas membranas, porém as proteínas de alto peso molecular permanecem no interior da mesma. Estando a mistura de proteínas livre das moléculas pequenas podem ser separadas com base no tamanho por filtração em gel (cromatografia) ou SDS-PAGE. No mercado estão disponíveis uma variedade de materiais e tamanhos de membranas de diálise, podendo ser de material gelatinoso, celulose e celofane (BOYER, 1993, LEHNINGER, 1991).

Nesse trabalho, em todos os tratamentos empregados foi possível obter extrato clarificado e com atividade específica aumentada, exceto com a precipitação com sulfato de amônio (Tabela 18). A metodologia que se mostrou

mais adequada foi com a filtração em caulim, proporcionando um aumento de 1,32 vezes na atividade específica quando comparado com o filtrado sem clarificação. Resultados semelhantes foram obtidos para o extrato cru de *Humicola grisea* var. *thermoidea* (MONTI et al., 1991). A filtração em terra diatomácea e precipitação com acetona também aumentaram a atividade específica em 1,25 vezes e 1,2 vezes, respectivamente. E para acompanhar o processo de clarificação do extrato cru, realizou-se SDS-PAGE, conforme resultados apresentados na Figura 25, onde é possível observar nas nos poços 2 e 3 uma banda protéica correspondente a uma xilanase termofílica. Os ensaios seguintes foram realizados com o cru filtrado em caulim.

Tabela 18 – Clarificação do meio de cultivo do fungo FCUP1 utilizando o meio M4 modificado* + 1% sabugo de milho, pH 6,6, 40°C por 18 hs.

Clarificação	pH final	Proteína (mg/mL)	Atividade de Xilanase (U/mL)	Atividade Específica de Xilanase (U/mg proteína)
Filtrado de Cultivo	5,5	1,15	0,445	0,385
Caulim	5,5	0,85	0,431	0,509
Terra diatomácea	5,9	0,88	0,426	0,481
Acetona	N.D.**	0,93	0,431	0,465
Sulfato de amônio	N.D.**	1,41	0,427	0,303

*Condições: 0,1% CaCO₃, 0,5% NaCl, 0,1% NH₄Cl e 0,5% água de maceração de milho.

**Não determinado

6.7. Efeito da temperatura e do pH sobre atividade xilanolítica e estabilidade

A temperatura ótima da xilanase presente no extrato cru filtrado em caulim foi estimada ser de 60°C, e 78% da atividade máxima foi encontrada no intervalo de 45°C e 65°C (Fig. 15). A temperatura ótima de hidrólise da xilanase pelo fungo FCUP1 foi idêntica à de *Ceriporiopsis subvermispura* (MILAGRES et al., 2005) e de *Aspergillus fischeri* (CHANDRA e CHANDRA, 1996), e ainda comparável com xilanases de outros fungos termófilos, as quais variam de 40°C a 60°C, tais como *Humicola grisea* var. *thermoidea* (MONTI et al., 1991;

MONTI et al., 2003), *Rhizopus stolonifer* (GOULART et al., 2005), *Aspergillus versicolor* (CARMONA et al., 1998), e *Thermomyces lanuginosus* (PUCHART et al., 1999).

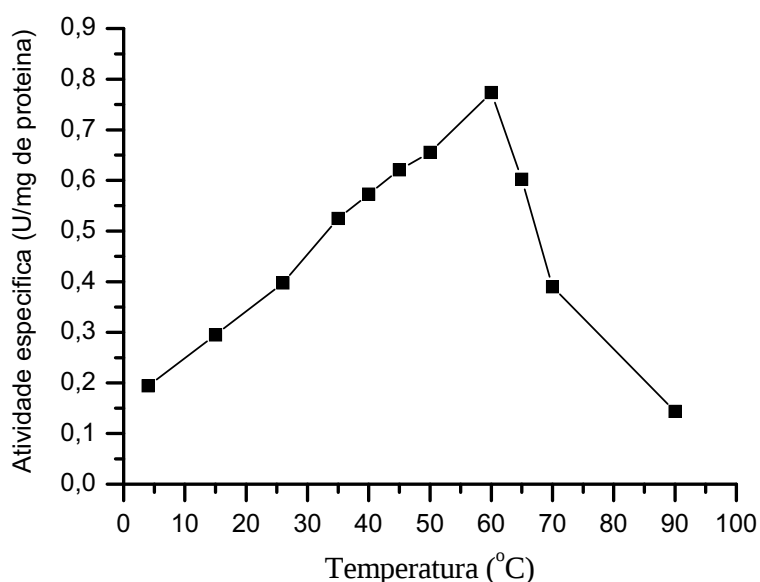


Figura 15. Efeito da temperatura ótima sobre atividade da xilanase.

A enzima apresentou boa estabilidade térmica a 40°C e 50°C, com preservação de 80 a 90% de sua atividade por meia hora, e sua meia-vida, a 60°C, foi de 30 minutos Figura 16. A meia-vida encontrada a essa temperatura foi superior à de xilanases de *Aspergillus* sp. (GAWANDE e KAMAT, 1998), de 15 minutos, e *Aspergillus versicolor* (CARMONA et al., 1998), e inferior às de *Humicola grisea* var. *thermoidea* (LUCENA NETO e FERREIRA-FILHO, 2004), de 5.5 horas, *Aspergillus tamaritii* (GOUDA E ABDEL-NABY, 2002), de 50 minutos, e *Acrophialophora nainiana* (CARDOSO e FERREIRA-FILHO, 2003), de uma hora.

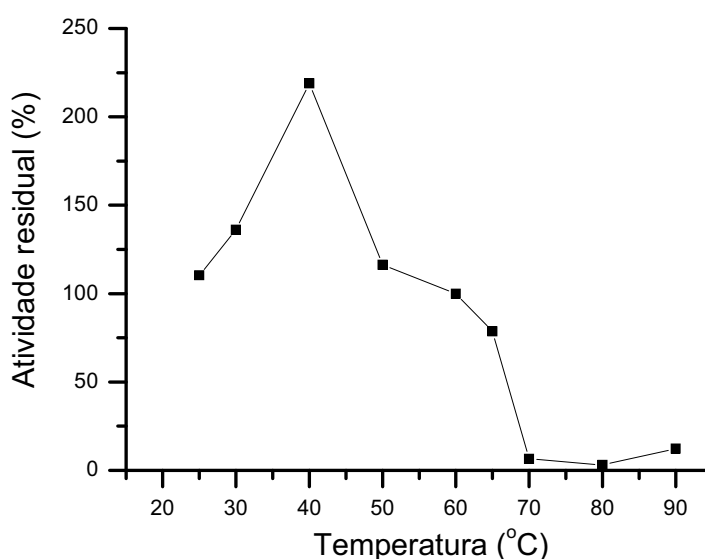


Figura 16. Estabilidade temperatura sobre atividade da xilanase

O valor da energia de ativação (EA) calculado a partir da porção linear de Arrhenius plot foi de 19.05 KJ/mol (4.55 Kcal/mol), ou seja, a energia necessária para a hidrólise da xilana foi inferior àquelas obtida para a xilanase de fungos alkali tolerantes *Aspergillus fischeri* (CHANDRA e CHANDRA, 1996) e a de *Aspergillus tamaraii* (GOUDA et al., 2002), que foram de 27.4 KJ/mol e 24.06 KJ/mol, respectivamente.

O pH para a atividade máxima da xilanase foi estimado ser 5.0, e 80% e 76% da atividade máxima foram encontrados em pH 3.0 e 7.0, respectivamente (Figura 17). O pH ótimo da xilanase do Fungo FCUP1 determinado neste trabalho está de acordo com os demais determinados para as xilanases microbianas (CARMONA et al., 1998; SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997; POLIZELI et al., 2005; MILAGRES et al., 2005; FENGXIA et al., 2008).

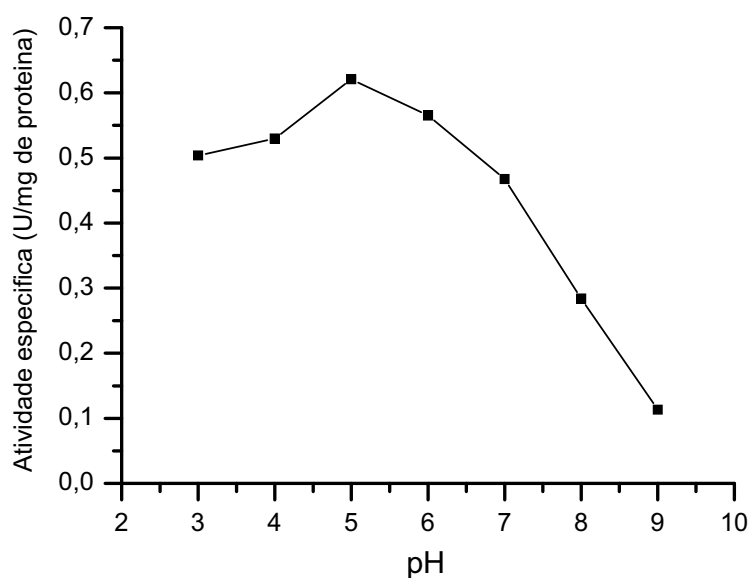


Figura 17. Efeito do pH ótimo sobre atividade da xilanase

O perfil de estabilidade em relação ao pH sobre atividade da xilanase está representado na Figura 18. Observou-se estabilidade superior a 70% nos pH de 4,0 a 6,0 e pH 8,0, estabilidade entre 60 a 70% em pH 3,0 e pH 7,0 e estabilidade inferior a 20% no pH 9,0. Foram observados três picos no pH 5,0, 6,0 e 8,0. A enzima produzida pelo fungo FCUP1 do fruto em decomposição apresenta-se estável em uma faixa de pH 4,5 a 6,0.

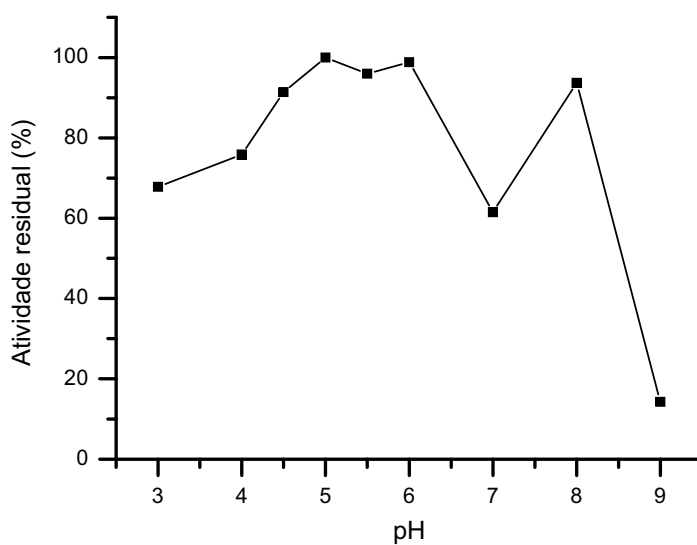


Figura 18. Estabilidade pH sobre atividade da xilanase

6.8. Determinação dos parâmetros cinéticos

Valores de K_m e V_{max} foram estimados usando xilana (birchwood-Sigma) como substrato em pH 5,0 e 60°C foi empregado procedimento proposto por Hanes-Woolf (1932) demonstrado na Figura 19. A xilanase presente no extrato clarificado apresentou cinética Michaeliana típica com K_m de $10,41 \text{ mg mL}^{-1} \pm 0,282 \text{ mg mL}^{-1}$ e V_{max} igual a $3,32 \text{ U (mg proteína)}^{-1} \pm 0,053 \text{ U (mg proteína)}^{-1}$, com três repetições. Tendo em vista que os valores de K_m de xilanase encontrados na literatura, para o mesmo substrato, variam, de modo geral, de 1 a 8 mg/mL, o valor obtido neste trabalho é coerente, levando-se em consideração o fato de o extrato utilizado ter sido apenas clarificado.

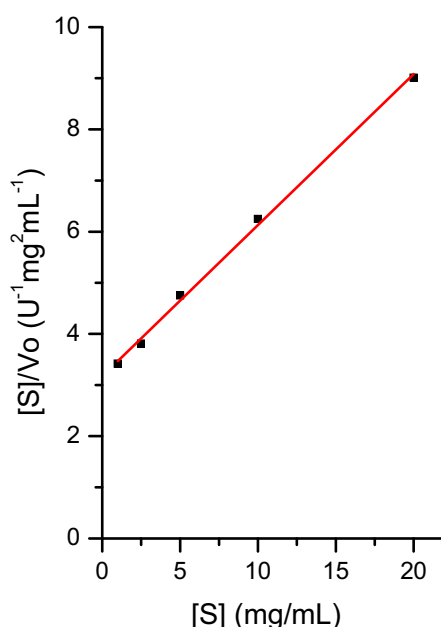


Figura 19. Gráfico de determinação dos parâmetros cinéticos por Hanes-Woolf (1932)

6.9. Cromatografia em Sílica Gel P60

Os produtos de hidrólise da xilana em função do tempo e da associação do extrato bruto do micélio do *Humicola grisea* var. *thermoidea* com a xilanase de FCUP1 presente no extrato clarificado foram analisados por cromatografia de camada fina e estão apresentados na Figura 20 (FONTANA et al., 1988).

Segundo Almeida et al., 1995, o *Humicola grisea* var. *thermoidea*, tido como bom produtor de xilosidase intracelular. Verificou-se que em curtos tempos de hidrólise da xilana (30-120 minutos), a presença de xilobiose, xilotriose, xilotetraose e xilopentose. Com 1080 minutos, detectou-se xilose, xilobiose e, conseqüentemente, houve diminuição de xilotetraose e xilopentose. Esses resultados são bastante interessantes devido à ocorrência da produção direta de xilose utilizando-se enzimas extracelulares presentes no extrato clarificado. Entretanto, enzimas xilanolíticas extracelulares de micro-organismos como *Thermoanaerobacter ethanolicus* (SHAO e WIEGEL, 1992), *Aspergillus versicolor* (CARMONA et al., 1998), *Humicola grisea* var. *thermoidea* (MONTI et al., 1991), *Rhizopus stolonifer* (GOULART et al., 2005) não produzem xilose como produto de hidrólise devido ao fato da xilosidase estar associada às células, nestes micro-organismos. Nossos resultados mostram que as enzimas xilanolíticas produzidas por FCUP1 produzem xilose, entretanto, quando em ação conjunta com a xilosidase intracelular do *Humicola* melhora a hidrólise da xilana e tem-se produção imediata de xilose.

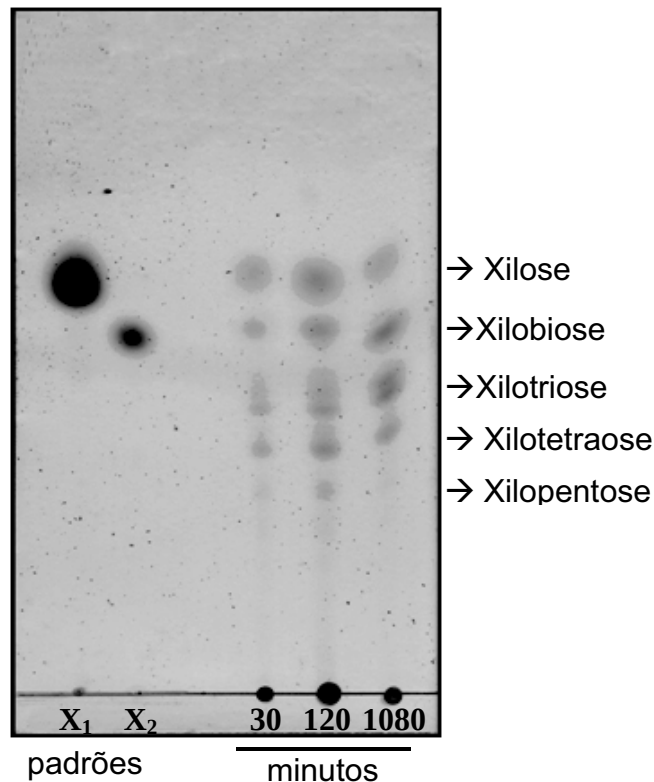


Figura 20. Cromatografia em Sílica Gel P60 do produto de hidrólise da xilana em diferentes tempos em pH 5.0. X₁: xilose; X₂: xilobiose.

Concluiu-se com a análise de cromatografia em camada delgada de sílica gel que há um sinergismo entre as enzimas xilanolíticas do FCUP1 e *Humicola grisea* var. *thermoidea*, devido ao aparecimento de xilooligossacarídeos (xilose, xilobiose, xilotriose, xilotetraose, xilopentose) que são produtos de hidrólise da xilana. Outros estudos serão realizados para purificação e caracterização destas enzimas.

6.10. Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi utilizado para verificar a pureza do extrato cru, quando submetidos vários tratamentos, como filtração em caulim e em terra de diatomácea. Neste processo, as moléculas se deslocaram em um campo elétrico e a velocidade de migração das amostras analisadas dependeram de três fatores, como tamanho, forma e sua carga elétrica. No SDS-PAGE, um preparo prévio da mistura de proteínas faz com que apenas a massa seja crucial para a migração. Isto ocorre quando é adicionado o sulfato sódico lauril. Ele é um detergente que possuem grupos apolares e polares (anfipáticas). Ele quebra oligômeros de proteínas em subunidades e as desnatura. Nas cadeias peptídicas abertas, a molécula de SDS se liga e confere a elas uma carga fortemente negativa. Para a desnaturação completa, adicionam-se tióis para separar as pontes dissulfídicas nas proteínas. Na etapa final após eletroforese é feita a coloração conforme descrita em material e métodos (item 5.16). Os resultados apresentados na Figura 21 mostram uma banda proteína nos poços 2 e 3, com atividade xilanolítica, e indicam que a filtração em caulim e terra de diatomácea foram tratamentos rápidos e eficientes. Observando os resultados desta figura, verificou-se que estas bandas possuem massa molecular aproximadamente de 30kDa. Outros experimentos serão feitos para a determinação definitiva desta massa molecular.

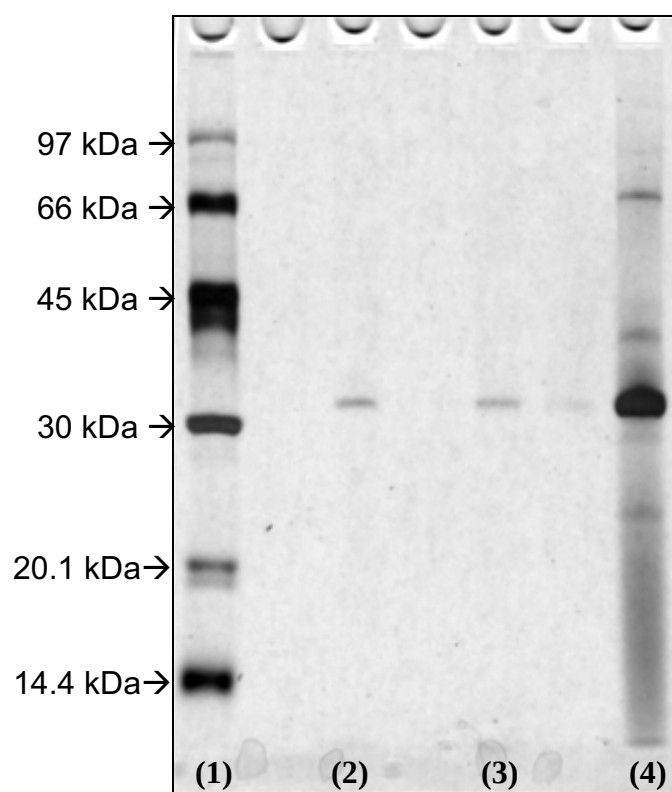


Figura 21. Eletroforese em SDS-PAGE. (1) Padrão de massa molecular; (2) extrato cru filtrado em caulim; (3) extrato cru filtrado em terra diatomácea; (4) extrato cru.

7. CONCLUSÃO

O meio M4 modificado constituído por 0,1% CaCO_3 , 0,5% de NaCl, 0,1% NH_4Cl e 0,5% de água de maceração de milho, tendo como fonte de carbono sabugo de milho, com pH inicial igual a 6,0 e com tempo de crescimento de 16 horas, foi o melhor meio para a produção da enzima xilanase extracelular pelo fungo termófilo, identificado como FCUP1, isolado da polpa do fruto de cupuaçuzeiro em decomposição.

O valor ótimo para o pH da enzima estudada produzida pelo fungo FCUP1 foi determinado como pH 5,0 e a temperatura 60°C, e os parâmetros cinéticos determinado foi K_m igual 10,41 mg mL^{-1} e $V_{\max}$ igual a 3,32 U (mg proteína)⁻¹.

Verificou-se que entre diferentes fontes de carbono a glicose atuou como repressor de síntese da xilanase, enquanto xilose não reprimiu essa síntese, mostrando diferentes mecanismos de indução enzimática pelas células do fungo estudado. A xilana não age como um indutor direto, pois sendo estruturalmente um polímero, não pode atingir níveis intracelulares, então, necessita desencadear um mecanismo de sinalização para a expressão gênica de enzimas xilanolíticas. Este mecanismo envolve resíduos menores, como, xilobiose e xilotriose, entre outros. As xilanases constitutivas são responsáveis pela produção destes xilooligossacarídeos a partir da xilana. Através de permeases, estes xilooligossacarídeos são transferidos para o interior das células desencadeando a transcrição de genes do sistema xilanolítico (BIELY, 1985).

Na cromatografia sílica em gel P60, utilizando enzima extracelular do fungo FCUP1 e a enzima intracelular (micélio) do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* foi possível observar na hidrólise da xilana, o aparecimento do xilooligossacarídeos (xilose, xilobiose, xilotriose, xilotetraose e xilopentose), mostrando que houve um sinergismo entre as enzimas xilanolíticas do FCUP1 e *Humicola grisea* var. *thermoidea*.

O processo de clarificação do extrato bruto estudado, produzido pelo fungo isolado da polpa do fruto cupuaçuzeiro em decomposição, foi acompanhado por SDS-PAGE banda correspondente a xilanase termofílica com massa molecular acima de 30kDa. Outros estudos serão realizados para purificação e caracterização destas enzimas.

Os resultados de imobilização apresentado neste trabalho foram testes preliminares da xilanase produzida por *Humicola grisea* var. *thermoidea* utilizando como suporte agarose-glioxil. Foi possível identificar pelo método Cromatografia em Sílica Gel P60 os produtos da hidrólise da xilana obtido com o derivado agarose-glioxil. Verificou-se a produção de xilooligossacarídeos (xilobiose, xilotriose, xilotetraose e xilopentose). Com estes resultados confirmamos a imobilização da xilanase de *Humicola grisea* var. *thermoidea* em glioxil-agarose, com manutenção da atividade.

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que esse trabalho é de grande relevância científica, pois forneceu princípios básicos para desenvolvimento de trabalhos futuros.

7.1. Perspectivas para trabalhos futuros

O estudo da produção de xilanase pelo fungo FCUP1 ofereceu subsídios para etapas posteriores, como:

a) Classificação do novo isolado

A classificação definitiva do fungo termófilo, identificado como FCUP1, isolado da polpa do fruto do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) em estado de decomposição.

b) Planejamento experimental

Em fase inicial, tendo objetivo a produção da xilanase em batelada. Estudos serão realizados para padronização do meio de cultivo (fermentação sólida e/ou submersa), manutenção do micro-organismo, pH, tamanho e tipo de tratamento aplicado às fontes de carbono e/ou fontes de resíduos agrícolas, e posteriormente produção em fermentadores em escala laboratorial, proporcionando novos conhecimentos que possam ser aplicado em produção industrial.

c) Caracterização dos resíduos agrícolas

Estudar detalhadamente as estruturas celulares, espécies e os números de hidroxilas presentes nos resíduos agrícolas empregados nesse trabalho com intuito de selecionar os melhores como fonte de carbono, produtor de enzima de interesse e para a área de imobilização.

d) Técnica de imobilização utilizando resíduos agrícolas

A técnica de imobilização está entre as áreas de pesquisa mais relevantes na atualidade, podendo inclusive auxiliar na solução de problemas na área agroindustrial brasileira, uma vez que os resíduos gerados poderão vir a ser utilizados como suportes alternativos para enzimas imobilizadas, reduzindo os custos de produção. Por isso, devido ao alto custo da agarose, que é o suporte utilizado para várias enzimas, emprega-se o suporte originário de resíduos agrícolas previamente caracterizados, proporcionando assim, economia industrial e preservação do ambiente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADLERCREUTZ, P. Immobilized enzymes. In: NAGODAWITHANA, T.; REED, G. (Ed). **Enzymes in food processing**. San Diego: Academic Press, 1993. cap.5, p. 103-119.

ALMEIDA, E.M.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENZI, H.F., JORGE, J.A. Purification and biochemical characterization of β -xylosidase *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 130, p. 171-176, 1995.

ANAND, L.; KRISHNAMURTY, S.; VITHAYATHIL, P.J.; Purification and properties of xylanase from the thermophilic fungus, *Humicola lanuginosa*. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 276, p. 546 – 553, 1990.

ANDRADE, C.M.M.C.; PEREIRA JR, N.; ANTRANIKIAN, G. Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. **Rev. Microbiol.**, v. 30, p. 287-298, 1999.

ANDRADE, S.V. **Estudos comparativos das β -xylosidases produzidas por *Aspergillus versicolor* cultivado em xilana ou xilose como únicas fontes de carbono. 2002. 78 f.** Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

ANDRADE, S.V.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENZI, H.F.; JORGE, J.A. Effect of carbon source on the biochemical properties of β -xylosidases produced by *Aspergillus versicolor*. **Process Biochem.** v. 39, p. 1931-1938, 2004. DOI:10.1016/j.procbio.2003.09.024

ARAUJO, J.H.B.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Bleaching of kraft pulp with commercial xylanases. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.79, p. 713-722, 1999. DOI: 10.1385/ABAB:79:1 – 3: 713

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, N. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, p. 719-739, 2005. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.11.006

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. **Ars Pharmac.**, v. 39, n. 2, p. 23-39, 1998.

ARSLAN, F.; TÜMTÜRK, H.; ÇAYKARA, T; SEN, M., GÜVEN, O. The effect of gel composition on the adsorption of invertase on poly(acrylamide/maleic acid) hydrogels. **Food Chem.**, v. 70, p. 33-38, 2000. DOI:10.1016/S0956-7135(99)00114-0

BADHAN, A.K.; CHADHA, B.S.; SONIA, K.G.; SAINI, H.S.; BHAT, M.K. Functionally diverse multiple xylanase of thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Enz. Microbial Technol.**, v. 35, n. 5, p. 460-466, 2004. DOI: 10.1016/j.enzmichte.2004.07.002

BAKIR, U. YAVASCAOGLU, S.; GUVENC, F. ERSAYIN, A. An endo- β -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biotechnol characterization. **Enz. Microbial Technol.** v. 29, p. 328-334, 2001.

BICKERSTAFF, G.F. Immobilization of enzymes and cells. In: Immobilization of enzymes and cells. BICKERSTAFF, G. F. Totowa: Humana Press, 1997. cap.1, p.1-11.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends Biotechnol.**; v.3., p. 286-290, 1985

BOUDET, A.M.; KAJITA, S.; GRIMA-PETTENATI, J.; GOFFNER, D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. **Trends in Plant Science**, v.8, p.576-581,2003. DOI: 10.1016/j.tplants.2003.10.001

BOYER, R.F. Modern Experimental Biochemistry. Madri: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1993. 432p.

BUCHERT, J.; RANUA, M.; KANTELINEM, A.; VILKARI, L. The role of two *Trichoderma reesei* xylanases in the bleaching of kraft pulp. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 37,N. 6, p. 825-829, 1992. DOI: 10.1007/BF00174853

CABRAL, J.M.S.; KENNEDY, J.F. Covalent and coordination immobilization of proteins. In: TAYLOR, R.F. (Ed.). **Protein immobilization: fundamentals and applications**. New York: Marcel Dekker, 1991. cap.3, p. 73-138.

CAMACHO, N.A.; AGUILAR, O.G. Production, purification and characterization of a low molecular mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in bakery. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 104,n. 3, p. 159-172, 2003. DOI: 10.1385/ABAB:104:3:159

CARDOSO, O.A.V.; FERREIRA-FILHO, E.X. Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **FEMS Microbiol. Letters.**, v. 223, n. 2, p. 309-314, 2003. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00392-6

CARMONA, E. C.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ROSIM MONTEIRO, R. T.; JORGE, J. A. Xylanase production by *Aspergillus versicolor*. **J. Basic. Microbiol.**, v.6, p. 387-394, 1997. DOI: 10.1002/jobm.3620370602

CARMONA, E.C.; BROCHETO-BRAGA, M.R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; JORGE, J.A. Purification and biochemical characterization of endoxylanase from the *Aspergillus versicolor*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 166, p. 311-315, 1998. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13906.x

CHADHA, B.S.; AJAY, B.K.; MELLON, F.; BHAT, M.K. Two endoxylanases active and stable at alkaline pH from the newly isolated thermophilic fungus, *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **J. Biotechnol.**, v. 109, n. 3, p. 227-237, 2004. DOI: 10.1016/j.biotech.2003.12.010

CHANDRA, T.S.; CHANDRA, K. Purification and characterization of xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 145, p. 457-461, 1996. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08616.x

CHANG, J.I.; TSAI, J.J.; WU, K.H. Thermophilic composting of food waste. **Bioresource Technol.**, v. 97, n. 1, p. 116-122, 2006. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.02.013.

CHAVES, V.M.G. **Características fisiológicas de um fungo termófilo isolado de compostagem e propriedades de seu complexo celulase.** 1982. 60f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1982.

CHAVES, V.M.G.; SILVA, D. O.; BRUNE, W.; MOREIRA, M.A. Cellulolytic activities of *Humicola* sp. **Rev. Microbiol.**, v. 20, p. 460-465, 1989.

COELHO, G.D.; CARMONA, E.C. Xylanolytic complex from *Aspergillus giganteus*: production and characterization. **J. Basic Microbiol.**, v. 43, n. 4, p. 269-277, 2003. DOI:10.1002/jobm.200390030

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, p. 3-23, 2005. DOI:10.1016/j.femsre.2004.06.005.

COLOMBATTO, D. ; MOULD, F.L.; BHAT, M. K.; PHIPPS, R. H.; OWEN, E.; In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage:I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 111, p. 111-128, 2004. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2003.08.010.

COONEY, D.G; EMERSON, R. (1964). Thermophilic fungi – an account of their biology, activities and classification. W.H. Freeman and Co., San Francisco.

COUTO, S R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid state fermentation to food industry – A Review. **J. Food Eng**, v. 73, p. 190 – 197, 2006. DOI:10.1016/j.foodeng.2005.05.022.

CRAUFRIER, F.; MARTINOU, A.; DUPONT, C.; BOURIOTIS, V. Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. **Carbohydr. Res.** v 338, nº 7, p. 687-692, 2003. DOI: 10.1016/S0008-6215(03)00002-8

CZJZEK, M.; DAVID, A.B.; BRAVMAN, T.; SHOHAM, G.; HENRISSAT, B.; SHOHAM, Y. Enzyme-substrate complex structures of a GH39 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. **J. Mol. Biol.** v. 353, p. 838-846, 2005. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.09.003.

DALLA-VECCHIA, R. NASCIMENTO, M. G. SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quim. Nova**, v. 27, nº 4, p. 623-630, 2004.

DAMASO, M.C.T.; ALMEIDA, M.S.; KURTENBACH, E.; MARTINS, O. B.; PEREIRA JR, N.; ANDRADE, C.M.M.C.; ALBANO, R.M. Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 10, p. 6064-6072, 2003. DOI: 10.1128/AEM.69.10.6064-6072.2003

DEBYSER, W. DERDELINCKX, G.; DELCOUR, J.A. Arabinoxylan solubilization and inhibition of the barley malt system by wheat during mashing with wheat whole meal adjunct, evidence for a new class of enzyme inhibitors in wheat. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 55, p. 153-157, 1997.

DERVILLY, G.; LECLERCQ, C.; ZIMMERMAN, D.; ROUE, C.; THIBAUT, J.F.; SAULINER, L. Isolation and characterization of high molecular mass water-

soluble arabinoxylans from barley malt. **Carbohydr Polym.**, v. 47, p. 143-149, 2002. DOI: 10.1016/S0144-8617(01)00172-2

DNA ENGINEERING/AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS. Disponível em: [http://openwetware.org/wiki/BE.109: DNA engineering/Agarose gel electrophoresis](http://openwetware.org/wiki/BE.109:DNA_engineering/Agarose_gel_electrophoresis). Acesso em: 16 mar. 2008.

DURAND, A. Bioreactors designs for solid state fermentation. **Biochem. Eng. J.**, v. 13, n. 2/3, p. 113-125, 2003. DOI: 10.1016/S1369-703X(02)00124-9

FENGXIA, LU; MEI, LU.; ZHAOXIN, LU.; XIAOMEI BIE; HAIZHEN ZHAO; YI WANG. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. **Bioresource Technol.**, v. 99, n. 13, p. 5938-5941, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.10.051

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RODRÍGUEZ, V.; MATEO, C.; PENZOL, G.; HERNÁNDEZ-JUSTIZ, O.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA, F.; GUIBAN, J.M. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. **J. Molec.. Catal. B: Enzym.**, v.7, n. 1-4, p. 181-189, 1999. DOI: 10.1016/S1381-1177(99)00028-4

FERREIRA, G.; BOER, C.G.; PERALTA, R.M. Production of xylanolytic enzymes by *Asperillus tamari* in solid state fermentation. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.173, p. 335-339, 1999. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13522.x

FONTANA, I. D.; GEBARA, M.; BLUMEL, M.; SCHNEIDER, H.; MACKENZIE, C. R.; JONHSON, K.G. α - 4-O-Methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods Enzymol**, v.160, p. 560-571, 1988.

FUKUI, S.; TANAKA, A. Immobilization. In: GERHARTZ, W. (Ed). **Enzymes in industry**: production and applications. New York: VCH, 1990. p.63-76.

GALLETI, S.R. Introdução à microscopia eletrônica. **Biológico.**, v. 65, n.1/2, p. 33-35, 2003.

GANGA, M.A.; PIÑAGA, F.; VALLÉS, S.; RAMÓN, D.; QUEROL, A. Aroma improving in microvinification processes by the use of a recombinant wine yeast strain expressing the *Aspergillus nidulans xlnA* gene. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 47, n. 3, p.171-178, 1999. DOI: 10.1016/S0168-1605(98)00202-5.

GARASSINI, L. El suelo y su microflora. **Rev. Fac. Agron.**, v. 4, p.178-198, 1962.

GAWANDE, P.V.; KAMAT, M.Y. Immobilization of *Aspergillus* sp. on nylon bolting cloth for production of xylanase. **J. Ferm. Bioeng.**, v. 86, n. 2, p. 243-246, 1998. DOI:10.1016/S0922-338X(98)80122-0

GOMES, E.; GUEZ, M.A.U., MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Quim. Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GOUDA, M.K.; ABDEL-NABY, MOHAMED A. Catalytic properties of the immobilized *Aspergillus tamarii* xylanase. **Microbiol Res.**, v. 157, n. 4, p. 275-281, 2002. DOI: 10.1078/0944-5013-00165

GOULART, A.J.; CARMONA, E.C.; MONTI, R. Partial purification and properties of cellulase-free alkaline xylanase produced by *Rhizopus stolonifer* solid-state fermentation. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 40, n. 3, p. 327- 333, 2005.

GOULART, A.J. **Imobilização multipontual de invertase e inulinase em suportes sólidos: caracterização físico-cinética dos derivados estabilizados.** 2007. 128 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

GUISÁN, J.M.; Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enz. Microb. Technol.**, v. 10, p. 375 – 382, 1988.

GUISÁN, J.M.; PENZOL, G.; ARMISEN, P.; BASTIDA, A.; BLANCO, R.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GARCÍA-JUNCEDA, E. Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates. In: BICKERSTAFF, G. F. (Ed.). **Immobilization of enzymes and cells**. Totowa: Humana Press, 1997. cap 30, p. 261-275.

GUISÁN, J.M. Immobilization of enzymes as the 21st century begins: an already solved problem or still an exciting challenge? In: GUISÁN, J.M. (Ed.). **Immobilization of enzymes and cells**. Totowa: Humana Press, 2006. cap 1, p. 1-13.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. . **Bioresource Technol.**, v. 89, p. 17-34, 2006. DOI:10.1016/S0960-8524(03)00033-6.

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

HANES, C.S. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. **Biochem. J.**, v. 26, p. 1406-1421, 1932.

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

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

HAYASHIDA, S.; YOSHIOKA, H. Production and purification of thermostable cellulases from *Humicola insolens* YH-8. **Agric. Biol. Chem.**, v. 44, p. 1721-1728, 1980.

HEUKESHOVEN, J.; DERNICK, R., Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. **Electrophoresis**, v. 6, n. 3, p. 103-112, 1985.

HIDALGO, A.; BETANCOR, L.; LÓPEZ-GALLEGU, F.; MORENO, R.; BERENGUER, J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J.M. Design of an immobilized preparation of catalase from *Thermus thermophilus* to be used in a wide range of conditions. Structural stabilization of a multimeric enzyme. **Enzyme. Microb. Technol.**, v.33, p.278-285, 2003.

HUBER, R.; LANGWORTHY, T.A.; KÖNIG, M.T.; WOESE, C.R.; SLEYTR, U. B.; STETTER, K.O. *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. **Arch. Microbiol.**, v. 144, n. 4, p. 324-333, 1986. DOI: 10.1007/BF00409880.

ISIL, S.; NILUFER, A. Investigation of factors affecting xylanase activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3. **Braz. Arch. of Biol.**, v. 48, n. 2, p. 187 – 193, 2005.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, D.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: characterization of two isozymes. **J. Biotechnol.**, v. 60, n. 3, p. 155-163, 1998. DOI: 10.1016/S0168-1656(97)00186-7

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

KHANDEPARKER, R.; NUMAN M. TH. Bifunctional xylanases and their potencial use in biotechnology. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.35, p. 635-644, 2008. DOI 10.1007/s10295-008-0342-9

KRONBAUER, E.A.W.; PERALTA, R.M.; OSAKU, C.A.; KADOWAKI, M.K. Produção de xilanase por *Aspergillus casielus* com diferentes fontes de carbono. **B. CEPPA**, v.25, n. 2, p. 207-216, 2007.

KOOLMAN, J. RÖHM, KLAUS-HEINRICH. Bioquímica: texto e atlas. 3 ed. Porto Alegre:Artmed, 2005. 478p.

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

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

KUNZ, B. Cultivo de micro-organismos para la producción de alimentos: obtención, aplicaciones e investigación. Zaragoza: Acribia, 1983. 125 p.

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

LASA, I.; BERENGUER, J. Thermophilic enzymes and their biotechnological potencial. **Microbiology**., v. 9, n. 2, p. 77-89, 1993.

LEE, J.W.; PARK, J.Y.; KWON, M.; CHOI, I.G. Purification and characterization of a thermostable xilanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. **J. Biosc. and Bioengi.**, v. 107, n. 1, p. 33-37, 2009. DOI:10.1016/j.jbiosc.2008.09.06.

LEHNINGER, A. L. Princípios de bioquímica. São Paulo: Sarvier. 1991, 725p.

LEMBO, T.; AZEVEDO, M.O.; BLOCH J.R., C.; FILHO, E.X.F. Purification and partial characterization of a new β -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p. 475-479, 2006. DOI:10.1007/s11274-005-9059-3

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

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

LI, X.T.; JIANG, Z.Q.; LI, L.T.; YANG, S.Q.; FENG, W.Y.; FAN, J.Y.; KUSAKABE, I. Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. **Bioresource Technol.**, v. 96, n. 12, p. 1370-1379, 2005. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.11.006

LÓPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; MATEO, C.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **J. Biotechnol.**, v. 119, p. 70-75, 2005a. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.05.021.

LÓPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; HIDALGO, A.; ALONSO, N.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Preparation of a robust biocatalyst of D-amino acid oxidase on sephabeads supports using the glutaraldehyde crosslinking method. **Enz. Microb. Technol.**, v.37, n.7, p. 750-756, 2005b. DOI:10.1016/j.enzmictec.2005.04.016

LÓPEZ-GALLEGO, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; BETANCOR, L.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **J. Biotechnol.**, v. 116, p. 1-10, 2005c. DOI:10.1016/j.jbiotec.2004.09.015.

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

LUCENA-NETO, S.A.; FERREIRA-FILHO, E.X. Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 35, p. 86-90, 2004.

MAALEJ, I.; BELHAJ, I.; MASMOUDI, N. F.; BELGHITH, H. Higly thermostable xylanase of the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*: purification and characterization. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 2008. DOI: 10.1007/s12010-008-8317-x

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

MANDALARI, G.; BISIGNANO, G.; LO CURTO, R.B.; WALDRON, K.W.; FAULDS, C.B. Production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on industrial food processing by-products. **Bioresource Technol**, v.99, p. 5130-5133, 2008. DOI:101016/j.biortech.2007.09.022.

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

MARTINS, T. S. **Produção e purificação de lípases de *Yarrowia lipolytica*** **IMUFRJ 50682**. 2001. Dissertação (Mestrado Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports

by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enz. Microb. Technol.**, v. 26, p. 509-515, 2000a. DOI: 10.1016/S0141-0229(99)00188-X.

MATEO, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M. Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of ohysical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 739-745, 2000b. DOI: 10.1021/bm000071q

MATSUO, M.; ENDOU, A.; OKADA, T.; YAMAOKA, Y. Purification and characterization of β -xylosidase from *Thermoascus* sp.. **J. Ferment. Bioengi.**, v. 86, nº 4, p. 403-405, 1998.

MEDEIROS, R.G.; SILVA, L.P.; AZEVEDO, R.B.; SILVA JR, F.G.; FILHO, E.X. F. The use of atomic force microscopy as a tool to study the effect of a xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in kraft pulp bleaching. **Enz. Microb. Technol.**, v. 40, p. 723-731, 2007. DOI:10.1016/j.enzmictec.2006.06.004.

MENEZES, C.R.; DURRANT, L.R. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.587-592, 2008.

MILAGRES, A.M.F.; SANTOS, E.; PIOVAN, T.; ROBERTO, L.C. Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. **Process Biochem.**, v. 39, n.11, p. 1387-1391, 2004. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00272-3

MILAGRES, A.M.F.; MAGALHÃES, P.O.; FERRAZ, A. Purification and properties of a xylanase from *Ceriporiopsis subvermispora* cultivated on *Pinus taeda*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 253, n. 2, p. 267-272, 2005. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.09.055

MILLER, G.H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MISHRA, M.M.; KAPOOR, K.K.; JAIN, M.K.; SING, C.P. Cellulose degradation by *Humicola lanuginosa*. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 76, p. 159-160, 1981.

MONTESINOS, J. L.; OBRADORS, N.; GORDILLO, M. A.; VALERO, F.; SOLA, C. Effect of nitrogens sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 59, n. 1, p. 25-37, 1996. DOI: 10.1007/BF02787855.

MONTI, R. **Produção de celulase e xilanase pelo fungo termófilo *Humicola grisea* variedade *thermoidea* RP-17: fatores que afetam a produção e propriedades bioquímicas das enzimas.** 1989. 169 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1989.

MONTI, R.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A. Purification and properties of an extracellular xylanase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Can. J. Microbiol.** v.37, p.675-681, 1991.

MONTI, R.; CARDELLO, L.; CUSTÓDIO, M.F.; GOULART, A.J.; SAYAMA, A.H.; CONTIERO, J. Production and purification of an endo-1-4- β -xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* by electroelution. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, p. 124-128, 2003.

MORANA, A.; MANGIONE, A.; MAURELLI, L.; FIUME, I.; PARIS, O.; CANNIO, R.; ROSSI, M. Immobilization and characterization of a thermostable β -xylosidase to generate a reusable biocatalyst. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 39, p. 1205-1213, 2006. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.03.010.

MOUCHACCA, J. Thermophilic fungi: biodiversity and taxonomic status. **Cryptogamie Mycologie**. v. 18, n.11, p. 19-69, 1997.

MUSSATO, S.I.; FERNANDES, M.; MILGRES, A.M.F. Enzimas poderosa ferramenta na indústria. **Ciência hoje**, v. 41, nº. 242, p. 28 – 33, 2007.

NEDER, R.N. **Microbiologia**: manual de laboratório. São Paulo: Nobel, 1992, 138p.

NINAWA, S.; KUHAD, R.C. Use of xylan-rich cost effective agro-residues in the production of xylanase by *Streptomyces cyaneus* SN32. **J. Appl. Microbiol.**, v. 99, p. 1141-1148, 2005.

PAIVA, A.L.; BALCÃO, V.M.; MALCATA, F.X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 27, p. 187-204, 2000. DOI: 10.1016/S0141-0229(00)00206-4

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: I – bioprocess and products. **Process Biochem.**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUES, H.; DOMÍNGUES, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 1, Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresour. Technol.**, v. 65, p. 191-201, 1998.

PATEL, R.N.; GRABSKI, A.C.; JEFRIES, T.W. Chromophore release from kraft by purified *Spremomices roseiscleroticus* xylanase. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 39, p. 405-412, 1993.

PESELA, B.C.C.; MATEO, C.; FUENTES, M.; VIAN, A.; GARCIA, J.L.; CARRASCOSA, A.V.; GUISAN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition. Complete hydrolysis of lactose in dairy products. **Enzyme Microbial Technol.**, v. 33, n. 2-3, p. 199-205, 2003. DOI: 10.1016/S0141-0229(03)00120-0.

PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; MICHELIN, M.; BETINI, J.H.A.; JORGE, J.A.; TERENCE, H.F.; POLIZELLI, M.L.T.M. Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extraction cellulose pulp biobleaching. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 36, p. 149-155, 2009. DOI:10.1007/s10295-008-0482-y.

PINHEIRO, T.L.F. “**Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo**”. 2004. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2006.

PINTO, G.A.S.; BRITO, E.S.; ANDRADE, A.M.R.; FRAGA, S.L.P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Comunicado Técnico**, 102, p. 1-5, Agosto, 2005.

POLIZELLI, M.L.; RIZZATTI, A.C.; MONTI, R.; TERENCE, H.; JORGE, J. AMORIM, D. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** (Mini-Review), v. 67, n.5, p. 577-591, 2005. DOI: 10.1007/s00253-005-1904-7.

PRADE, R.A. Xylanases, from biology to biotechnology. **Biotechnol. Gen. Engin. Rev.**, v. 13, p. 101-131, 1995.

PRODUCTS AND SOLUTIONS NOVOZYMES. Disponível em: <http://www.novozymes.com>. Acesso em: 17 mar. 2008.

PSZCZOLA, D.E. From soybean to spaghetti: the broadening use of enzymes. **Food Technol.**, v.55, p. 54-64, 2001.

PUCHART, V.; KATAPODIS, P.; BIELY, P.; KREMICKÝ, L.; CHRISTAKOPOULOS, P.; VRSANSKÁ, M.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J.; BHAT, M.K. Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic

fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme Microbial Technol.**, v. 24, p. 355-361, 1999. DOI: 10.1016/S0141-0229(98)00132-X.

PUCHART, V.; BIELY, P. A simple enzymatic synthesis of 4-nitrophenyl β -1,4-D-xylobioside, a chromogenic substrate for assay and differentiation of endoxylanases. **J. Biotechnol.**, v. 128, p. 576-586, 2007. DOI:10.1016/j.jbiotec.2006.12.011

PURKARTHOFER, H.; STEINER, W. Induction of endo- β -xylanase in the fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme Microbial Technol.**, v. 17, n.2, p. 114-118, 1995. DOI: 10.1016/0141-0229(94)00039-T

RAJOKA, M.I.; HUMA, T.; KHALID, A.M.; LATIF, F. Kinetics of enhanced substrate consumption and endo- β -xylanase production by a mutant derivative of *Humicola lanuginosa* in solid-state fermentation. **World J. Microbiol Biotechnol.**, v. 21, n. 6-7, p. 869-876, 2005. DOI:10.1007/s11274-004-6030-7.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & EICHCHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6^a . ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2001.

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R. **Microbiologia prática**: roteiro e manual: bactérias e fungos. São Paulo: Atheneu, 1993. p. 109-110

RIVAS, B.; MOLDES, A.B.; DOMINGUEZ, J.M.; PARAJO, J.C. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep licor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 97, p. 93 - 98, 2004.

RIZZATTI, A.C.S.; JORGE, J.A.; TERENZI, H.F.; RECHIA, C.G.V.; POLIZELI, M.L.T.M. Purification and properties of a thermostable extracellular β -xylosidase

produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 26, p. 156-160, 2001.

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

RIZZATTI, A.C.S.; FREITAS, F.Z.; BERTOLINI, M.C.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. Regulation of xylanase in *Aspergillus phoenicis*: a physiological and molecular approach. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 35, p. 237-244, 2008. DOI:10.1007/s10295-007-0290-9

SALAR, R.K.; ANEJA, K.R. Thermophilic fungi: taxonomy and biogeography. **J. Agric. Technol.**, v. 3, n. 1, p. 77-107, 2007a. In: LINDT, W. Mitteilungen über einige neue pathogene Schimmelpilze. Arch. Exp. Path. Pharmacol., v. 21, p. 269-298, 1986.

SALAR, R.K.; ANEJA, K.R. Thermophilic fungi: taxonomy and biogeography. **J. Agric. Technol.**, v. 3, n. 1, p. 77-107, 2007b. In: SCHIPPER, M.A.A. Studies in Micology, v. 17, p. 53-71, 1978.

SALLES, B.C.; CUNHA, R.B.; FONTES, W.; SOUSA, M.V.; FERREIRA-FILHO, E.X. Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **J. Biotechnol.**, v. 81, p. 199-204, 2000.

SALLES, B.C.; CUNHA, R.B.; FONTES, W.; SOUSA, M.V.; FERREIRA-FILHO, E.X. Effect of cellulase-free xylanases from *Acrophialophora nainiana* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on eucalyptus kraft pulp. **Process Biochem.**, v. 40, n. 1, p. 343-349, 2005.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol. Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009. DOI:10.1016/j.biotechadv.2008.11.001.

SAHA, B. Purification and properties of an extracellular β -xylosidase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Bioresource technology**, v. 90, p. 33-38, 2003. DOI:10.1016/S09060-8524(03)00098-1

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

SILVEIRA, F.Q.P.; XIMENES, F.A.; CACAIS, A.O.G.; MILAGRES, A.M.F.; MEDEIROS, C.L.; PULS, J.; FILHO, E.X.F. Hydrolysis of xylans by enzyme systems from solid cultures of *Trichoderma harzianum* strains. **Braz. J. of Med. and Biol. Research.**, v. 32, p. 947-952, 1999.

SING, S.; PILLARY, B.; PRIOR, B.A. Thermal stability of β -xylanses produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains. **Enzyme Microbial Technol.**, v. 26, p. 502-508, 2000.

SOUZA, M.C.O.; ROBERTO, I.C.; MILAGRES, A.M.F. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 52, p. 768 – 772, 1999.

SREENATH, H.K.; JEFFRIES, T.W. Production of ethanol from wood hydrolysate by yeasts. **Bioresour. Technol.**, v. 72, n.3, p. 253-260, 2000. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00113-3

SRERE, P.A.; UYEDA, K. Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices. **Methods Enzymol.**, v.44, p.11-19, 1976.

STRUCTURE DU GEL D'AGAROSE. Disponível em: <http://ead.univ-angers.fr/~jaspard/Page2/Cours/6CoursDEUST/CHROMATOGRAPHIE/2FIGURES/3AFFINITE/2Sepharose/11Sepharose.htm>. Acesso em: 16 mar. 2008.

SUDAN, R.; BAJAJ, B.K. Production and biochemical characterization of xylanase from an alkalitolerant novel species *Aspergillus niveus* RS2. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 23, p. 491-500, 2007. DOI:10.1007/s11274-006-9251-0

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 17, n. 1, p. 39-67, 1997. DOI: 10.1007/s002530051589.

SURVANA LAXMI, G.; SATHISH, T.; SUBBA RAO, CH.; BRAHMAIAH, P.; HYMAVATHI, M.; PRAKSHAM, R.S. Palm fiber as novel substrate for enhanced xylanase production by isolated *Aspergillus* sp RSP-6. **Curr. Trends in Biotechnol. and Pharm.**, v. 2, n. 3, p. 447 - 455, 2008.

TARDIOLI, P.W.; PEDROCHE, J; GIORDANO, R.L.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M. Hidrolysis of proteins by immobilized-stabilized alcalase-glyoxyl agarose. **Biotechnol. Prog.**, v. 19, p. 352-360, 2003. DOI: 10.1021/bp025588n.

TORRES, R.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; PALOMO, J.M.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. A novel heterofuncional epoxy-amino sepabeadas for a new enzyme immobilization protocol: immobilization-stabilization of β -galactoside from *Aspergillus oryzae*. **Biotechnol. Prog.**, v.19, p. 1056-1060, 2003. DOI: 10.1021/bp025771g.

TÜMTÜRK, H.; ARSLAN, F; DISLI, A.; TUFAN, Y. Immobilization of invertase attached to a granular dimmer acid-co-alkyl polyamine. **Food Chem.**, v. 69, p. 5-9, 2000.

VIIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. Xylanases in bleaching, from an idea to the industry. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 13, p. 335-350, 1994. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00053.x.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** v. 9, p. 113-148, 2000. DOI: 10.1016/S1381-1177(99)00107-1.

WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SANDDLER, J.N. Multiplicity of -1-4-xylanase in microorganisms, functions and applications. **Microbiol. Rev.**, v. 52, n. 3, p. 305-317, 1988.

ZANOELO, F.F.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 31, p. 170-176, 2004. DOI:10.1007/s10295-004-0129-6

YANG, S.Q.; YAN, Q.J.; JIANG, Z.Q.; LI, L.T.; TIAN, H.M.; WANG, Y.Z. High-level α -xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. **Bioresour. Technol.**, v. 97, p. 1794-1800, 2006. DOI:10.1016/j.biortech.2005.09.007.

YOSHIOKA, H.; ANRAKU, S.I.; HAYASHIDA, S. Production and purification of a novel type of CM-Case from *Humicola grisea* var. *thermoidea* YH-78. **Agric. Biol. Chem.**, v. 46, p. 75-82, 1982.